



**HAL**  
open science

# Utilisation de miPEPs pour étudier et contrôler l'interaction Orobanche cumana - Tournesol

Sabine Tourneur

► **To cite this version:**

Sabine Tourneur. Utilisation de miPEPs pour étudier et contrôler l'interaction Orobanche cumana - Tournesol. Biologie végétale. Université de Nantes, 2021. Français. ⟨NNT : 2021NANT4026⟩. ⟨tel-05375946⟩

**HAL Id: tel-05375946**

**<https://theses.hal.science/tel-05375946v1>**

Submitted on 21 Nov 2025

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

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



HAL Authorization





UNIVERSITÉ DE NANTES  
FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE  
ÉCOLOGIE GÉOSCIENCES AGRONOMIE ALIMENTATION (EGAAL)

Année 2021

**Utilisation de miPEPs pour étudier et contrôler l'interaction  
*Orobanche cumana* - Tournesol**

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité : Biologie et physiologie végétales

*Présentée  
et soutenue par*

**Sabine TOURNEUR**

*Le 12 mars 2021, devant le jury ci-dessous*

Président	<b>Bruno FAVERY,</b>	Directeur de Recherche, INRAE
Rapporteurs	<b>Fabien NOGUÉ,</b> <b>Bruno FAVERY,</b>	Directeur de Recherche, INRAE Directeur de Recherche, INRAE
Examineurs	<b>Christine LELANDAIS-BRIERE,</b> <b>Mireille CHABAUD,</b>	Maître de conférences, Université de Paris-Saclay Ingénieur de recherche HC, INRAE

*Directeurs de thèse :*

Pr. Philippe DELAVault  
Dr. Jean-Philippe COMBIER



# Remerciements

J'adresse mes sincères remerciements à M. Bruno Favery et M. Fabien Nogué pour avoir accepté de me faire bénéficier de leurs expertises pour l'évaluation de mes travaux de thèse ; ainsi qu'à Mme Christine Lelandais-Briere et Mme Mireille Chabaud pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Mes remerciements vont ensuite aux membres de mon comité de suivi de thèse, M. Thomas Guillemette et M. Stéphane Muños pour leurs conseils avisés et leurs encouragements lors des différents comités réalisés.

Je remercie mes directeurs de thèse M. Philippe Delavault et M. Jean-Philippe Combier, ainsi que M. Philippe Simier, directeur de LBPV pour m'avoir permis de travailler sur ce sujet passionnant. Je remercie plus particulièrement mes deux directeurs de thèse pour leur disponibilité, leurs précieux conseils et leurs questionnements qui m'ont poussé dans ma réflexion ainsi que pour leur aide et leur soutien notamment dans la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie Mme Mireille Chabaud et M. Stéphane Muños pour leur gentillesse et leurs conseils dans la réalisation des co-cultures d'orobanches et de tournesols. Je les remercie également pour m'avoir fourni d'autres lots de graines de plantes parasites.

Je remercie l'ensemble des membres du laboratoire, Jean-Bernard, Lucie, Séverine, Grégory, Christophe, Hocine et Anne-Sophie pour l'accueil chaleureux que j'ai reçu, pour les conversations m'ayant permis d'améliorer mes recherches, mais aussi pour le soutien que vous m'avez procuré.

Je remercie également mes deux stagiaires, Joséphine et Thibault, pour leur bonne humeur et leur aide précieuse dans l'avancement de ma thèse.

Je porte une attention particulière aux technicien(nes) sans qui la recherche serait beaucoup moins facile. Je vous remercie Céline, Johanness, Yolène et Sabine pour votre aide. Sabine, nous avons passé énormément de temps ensemble au laboratoire mais aussi en dehors avec le sport. Je te remercie pour tous le temps que tu m'as consacré, ton aide, ton écoute et pour les fous rires partagés. Tu as été une confidente et un soutien pour moi dans cette ville où je ne connaissais personne à mon arrivée.



Je remercie les membres actifs du « Blobs », club du bureau des doctorantes et de l'assistant ingénieur. Je remercie particulièrement Alexandre pour son aide dans le comptage long et fastidieux des graines germées mais aussi pour son aide précieuse dans ma sociabilisation à Nantes. Merci à ma reine vénérée, Lisa, pour les fous rires partagés et les sorties, même si nous ne nous sommes côtoyées que durant une année. Estelle, merci pour ta bonne humeur, pour ces trois années à avoir partagé le même bureau ; pour tous les précieux conseils que tu m'as donné sur le déroulement d'une thèse, pour ton aide à la bonne réalisation des manip assez casse-têtes d'haustoriogénèse et surtout pour ta patience et pour tes réponses parfois magiques aux questions souvent très bêtes que j'ai pu te poser.

Je remercie également le département de Biologie, et plus particulièrement Delphine. Il aura fallu attendre ma dernière année de thèse pour que nous fassions enfin connaissance. Tu as été une très belle rencontre. Je te remercie pour ta présence et pour ton soutien.

Merci à ma team Normande : Marie, Laurent et Antoine, pour toutes ces soirées passées ensemble, pour tous les fous rires et pour votre présence. PS : le Montbard ça n'est pas bon... Antoine, je te remercie pour ton soutien qui a été indispensable.

Swann, tu es arrivé au moment difficile qu'est la rédaction. Tu m'as apporté beaucoup de soutien et d'aide pour ma fin de thèse. Je te remercie également pour ta présence et ta patience.

Pour finir, je remercie ma famille, qui m'a toujours soutenue et encouragé dans la poursuite de mes études.



# Table des matières

Remerciements.....	3
Table des matières .....	7
Liste des figures.....	13
Liste des tableaux.....	21
Liste des abréviations .....	23
Relevé de la production scientifique .....	29
Introduction bibliographique.....	33
I. Les plantes parasites.....	33
A. Classification et diversité.....	34
B. La famille des Orobanchaceae .....	35
C. Le cycle de développement des plantes holoparasites épirhizes.....	38
1. La phase souterraine .....	39
2. La phase aérienne .....	43
II. Les phases clés du développement induites par la plante hôte .....	44
A. L'induction de la germination des plantes parasites .....	44
1. Les strigolactones .....	44
2. Les autres stimulants de germination.....	48
3. La perception des stimulants de germination .....	49
B. L'haustoriogenèse : formation d'un organe spécifique appelé haustorium .....	50
1. Les composés phénoliques.....	50
2. Les hormones végétales .....	52
III. Les méthodes de lutttes contre les orobanches.....	55
A. Les pratiques culturales .....	55
B. Les méthodes chimiques .....	56
C. Les biocontrôles .....	57
D. La création et l'utilisation de lignées résistantes .....	58
IV. Les miARN et les miPEP (miRNA-encoded PEPTides) .....	61
A. Les miARN : synthèse, mode d'action et rôle chez les plantes .....	61
1. La voie de synthèse .....	61



2.	Mode d'action et rôle chez les plantes .....	63
B.	Les miPEP : origine et mode d'action .....	75
V.	Problématique de recherche.....	78
<b>Chapitre 1 : Effet des miPEP lors des processus de germination et d'haustoriogenèse des orobanches .....</b>		
<b>85</b>		
I.	Introduction .....	85
II.	Matériels et méthodes .....	87
A.	Matériel végétal.....	87
B.	Désinfection des graines et conditionnement .....	87
C.	Identification et synthèse des miPEP .....	88
1.	<i>Orobanche cumana</i> .....	88
2.	<i>Phelipanche ramosa</i> .....	88
D.	Tests de germination.....	88
E.	Tests d'haustoriogenèse .....	90
F.	PCR quantitative en temps réel .....	91
G.	Analyses statistiques.....	95
III.	Résultats .....	96
A.	Expression des gènes cibles des miARN lors de la germination des graines d' <i>O. cumana</i> ....	96
B.	Effets phénotypiques des miPEP lors de la germination .....	99
1.	Les miPEP d' <i>O. cumana</i> .....	99
2.	Les miPEP de <i>P. ramosa</i> .....	101
C.	Effets phénotypiques des miPEP lors de l'haustoriogenèse .....	102
1.	Les miPEP d' <i>O. cumana</i> .....	102
2.	Les miPEP de <i>P. ramosa</i> .....	105
IV.	Discussion.....	108
<b>Chapitre 2 : Les miPEP peuvent modifier les étapes clés du développement des orobanches et leur capacité d'infestation.....</b>		
<b>123</b>		
I.	Introduction .....	123
II.	Matériels et méthodes .....	125
A.	Matériel végétal.....	125
B.	Désinfection des graines.....	125



C.	Production d'exsudats de tournesol.....	125
D.	Tests de germination.....	127
E.	Tests d'haustoriogenèse et suivi d'expression de gènes .....	127
F.	Co-culture en minirhizotron .....	128
G.	Co-culture en godet.....	130
H.	PCR quantitative en temps réel .....	131
I.	Analyses statistiques.....	133
III.	Résultats .....	133
A.	Les miPEP319 d' <i>O. cumana</i> .....	133
1.	Effet sur la germination .....	134
2.	Effet sur la formation de l'haustorium .....	143
3.	Effet sur le pathosystème.....	144
B.	Les miPEP319 de <i>P. ramosa</i> .....	145
1.	Effet sur la germination .....	146
2.	Effet sur la formation de l'haustorium .....	147
C.	Effets des miPEP156, miPEP159, miPEP164 et miPEP172 sur la germination d' <i>O. cumana</i> 151	
1.	Effet des miPEP156 .....	151
2.	Effet du miPEP159.....	154
3.	Effet du miPEP164.....	155
4.	Effet des miPEP172 .....	156
D.	Impact des miPEP172 sur l'haustoriogenèse .....	161
1.	<i>O. cumana</i> .....	161
2.	<i>P. ramosa</i> .....	163
E.	Effet du miPEP396 sur l'haustoriogenèse de <i>P. ramosa</i> .....	168
IV.	Discussion.....	169
	Conclusion et perspectives .....	181
	Références bibliographiques .....	193



# Liste des figures

## Introduction bibliographique

**Figure 1** : Aperçu de la diversité morphologique chez les Angiospermes parasites (Heide-Jørgensen, 2008).

**Figure 2** : Diversité des plantes parasites chez les angiospermes d'après Heide-Jørgensen, 2008.

**Figure 3** : Emergences et hampes florales d'holoparasite épiphyses.

**Figure 4** : Répartition d'*Orobanche cumana* et de *Phelipanche ramosa* dans le monde (Parker, 2012).

**Figure 5** : Cycle de développement d'*Orobanche cumana*.

**Figure 6** : Morphologie des haustoriums chez les Orobanchaceae.

**Figure 7** : Morphologie des tubercules d'holoparasites.

**Figure 8** : Développement de la hampe florale d'*O. cumana* jusqu'à floraison.

**Figure 9** : Structure des premiers stimulants de germination de *Striga* identifiés à partir d'exsudats racinaires (Brun *et al.*, 2018).

**Figure 10** : Structure du GR24, un analogue synthétique des strigolactones.

**Figure 11** : Structure canonique des strigolactones et de leur précurseur (Brun *et al.*, 2018).

**Figure 12** : Voie de biosynthèse des strigolactones (Brun *et al.*, 2018).

**Figure 13** : Principaux rôles des strigolactones lors du développement des plantes (Waters *et al.*, 2017).

**Figure 14** : Structure de quelques stimulants de germination des plantes parasites (Xie *et al.*, 2010; Brun *et al.*, 2018).

**Figure 15** : Structure de trois flavonoïdes inducteurs de l'haustoriogenèse (Joel, 2013).

**Figure 16** : Synthèse du DMBQ à partir de l'acide syringique (Joel, 2013).

**Figure 17** : Structure de l'acide indole-3-acétique (IAA) et de l'éthylène.

**Figure 18** : Exemples de rôles des cytokinines chez les plantes (d'après Werner and Schmölling, 2009).

**Figure 19** : Larves de *Phytomyza orobanchia* parasitant les tubercules (A, B), les tiges (C, D) et les ovaires avec graines (E, F) de *P. ramosa* (Piwowarczyk *et al.*, 2018).

**Figure 20** : Schéma simplifié de la biosynthèse des miARN (Mallory and Vaucheret, 2006).

**Figure 21** : Mode d'action des miARN.

**Figure 22** : Gènes cibles de miARN et processus biologiques impliqués (Mallory and Vaucheret, 2006).

**Figure 23** : Rôle des miARN dans la régulation des phytohormones végétales (Curaba *et al.*, 2014).

**Figure 24** : Représentation schématique des interactions entre les miR156, miR172, leurs régulateurs et leurs gènes cibles.

**Figure 25** : Rôles des miR156 et miR172 dans la transition de la phase juvénile à la phase adulte et de la phase végétative à la phase reproductive (Li *et al.*, 2017).

**Figure 26** : Représentation schématique des interactions entre les miR156 et les miR171, ainsi que leur implication dans la formation des trichomes *via* l'interaction entre leurs gènes cibles (Li *et al.*, 2017).

**Figure 27** : Mode d'action des miR159 sur la voie de signalisation de l'ABA *via* leurs gènes cibles, *MYB101* et *MYB33*.



**Figure 28** : Représentation schématique de la voie de signalisation des miR319.

**Figure 29** : Interaction des miR160, miR167 et miR390 avec leurs gènes cibles.

**Figure 30** : Voie de biosynthèse des miARN et des miPEP.

**Figure 31** : Effets des miPEP de la famille du miR171 sur l'expression du gène *LOM1* (Couzigou *et al.*, 2017).

**Figure 32** : Phénotypes de la tige foliaire en réponse au traitement avec le miPEP165a chez *A. thaliana* (Ormancey *et al.*, 2020).

**Figure 33** : Déroulement et objectifs du projet miPEPiTO.

## Chapitre 1

**Figure 1.1** : Réseau de régulation potentiel des miARN dans les graines de maïs sèches et imbibées (Li *et al.*, 2013).

**Figure 1.2** : Visualisation de la reprise métabolique et de la protrusion des radicules après coloration au MTT des graines d'*O. cumana*.

**Figure 1.3** : Quantification par qRT-PCR de l'expression relative de gènes cibles de miARN 48 h après induction de la germination d'*O. cumana* par un traitement avec le *rac*-GR24 à  $10^{-10}$  M.

**Figure 1.4** : Pourcentage d'inhibition de la reprise métabolique et de la protrusion de la radicule des graines d'*O. cumana* 54 h après co-traitement avec les miPEP et le *rac*-GR24.

**Figure 1.5** : Pourcentage d'inhibition de la reprise métabolique et de la protrusion de la radicule des graines de *P. ramosa* 96 h après co-traitement avec les miPEP et le *rac*-GR24.

**Figure 1.6** : Effet de traitements avec des cytokinines sur la formation des haustoriums.

**Figure 1.7** : Pourcentage d'haustoriums formés après un traitement par des miPEP de graines germées d'*O. cumana*.

**Figure 1.8** : Pourcentage d'inhibition de la formation d'haustorium après un traitement avec des miPEP et une CK, la *c/tZ*, sur des graines germées d'*O. cumana*.

**Figure 1.9** : Pourcentage d'haustoriogenèse après un traitement avec des miPEP sur des graines germées de *P. ramosa*.

**Figure 1.10** : Pourcentage d'inhibition de la formation d'haustorium après un traitement avec des miPEP et une CK, la *c/tZ*, sur des graines germées de *P. ramosa*.

**Figure 1.11** : Les microARNs et leurs gènes cibles respectifs sont impliqués dans le développement et la germination des graines (Rodrigues and Miguel, 2017).

**Figure 1.12** : Détection des miARN par qRT-PCR en temps réel durant l'imbibition des graines d'orge (Bai *et al.*, 2017).



## Chapitre 2

- Figure 2.1 :** Photographie du système de production d'exsudats racinaires de tournesols.
- Figure 2.2 :** Co-culture de tournesols sensibles et d'*O. cumana* en minirhizotron.
- Figure 2.3 :** Co-culture de tournesols sensibles et d'*O. cumana* en godet.
- Figure 2.4 :** Pourcentage de reprise métabolique et de protrusion des racicules de graines d'*O. cumana* après traitement avec le *rac*-GR24 en présence ou non de miPEP.
- Figure 2.5 :** Pourcentage de reprise métabolique et de protrusion des racicules de graines d'*O. cumana* après traitement avec le DCL en présence ou non de miPEP.
- Figure 2.6 :** Pourcentage de reprise métabolique et de protrusion des racicules de graines d'*O. cumana* après traitement avec les exsudats racinaires de tournesol en présence ou non de miPEP.
- Figure 2.7 :** Pourcentage de reprise métabolique et de protrusion des racicules de graines d'*O. cumana* du lot OclN23 après traitement avec le DCL en présence ou non de miPEP.
- Figure 2.8 :** Pourcentage de reprise métabolique et de protrusion des racicules de graines d'*O. cumana* du lot OclN23 après traitement avec les exsudats racinaires de tournesol en présence ou non de miPEP.
- Figure 2.9 :** Quantification par qRT-PCR de l'expression relative de 4 gènes cibles de miR319 et trois gènes cibles du miR159, 48 h après induction de la germination d'*O. cumana* par un traitement au *rac*-GR24 avec ou sans miPEP319.
- Figure 2.10 :** Quantification par qRT-PCR de l'expression relative de 4 gènes cibles de miR319 à 6 temps après induction de la germination d'*O. cumana* par un traitement avec le *rac*-GR24 avec ou sans miPEP.
- Figure 2.11 :** Quantification par qRT-PCR de l'expression relative du pri-miR319a à 6 temps différents après induction de la germination d'*O. cumana* par un traitement avec le *rac*-GR24 en présence ou non de miPEP.
- Figure 2.12 :** Pourcentage d'haustoriogénèse après un traitement avec la *c/tZ* avec ou sans les miPEP319 sur des graines germées de *O. cumana*.
- Figure 2.13 :** Taille des tournesols et nombre d'accrochages d'orobanche par tournesol à la suite d'un traitement avec le miPEP319a ou le miPEP319b.
- Figure 2.14 :** Taille des tournesols et nombre d'accrochages d'orobanche par tournesol à la suite d'un traitement avec le miPEP319a ou le miPEP319b.
- Figure 2.15 :** Pourcentage de reprise métabolique et de protrusion des racicules de graines de *P. ramosa* après traitement avec le *rac*-GR24 en présence ou non de miPEP.
- Figure 2.16 :** Pourcentage d'haustoriogénèse après un traitement avec la *c/tZ* en présence ou non de miPEP319 sur des graines germées de *P. ramosa*.
- Figure 2.17 :** Quantification par qRT-PCR de l'expression relative de gènes marqueurs de l'haustoriogénèse et de gènes cibles des miR319 et miR396 12 h et 48 h après traitement avec la *c/tZ* seule, le miPEP319a seul ou après traitement avec la *c/tZ* et le miPEP319a.
- Figure 2.18 :** Pourcentage de reprise métabolique et de protrusion des racicules de graines d'*O. cumana* après traitement avec le *rac*-GR24 en présence ou non de miPEP.
- Figure 2.19 :** Quantification par qRT-PCR de l'expression relative de 3 gènes cibles de miR156 48 h après induction de la germination d'*O. cumana* par un traitement avec le *rac*-GR24 en présence ou non de miPEP156.
- Figure 2.20 :** Pourcentage de reprise métabolique et de protrusion des racicules de graines d'*O. cumana* après traitement avec le *rac*-GR24 en présence ou non de miPEP.



- Figure 2.21** : Quantification par qRT-PCR de l'expression relative de 3 gènes cibles du miR159 et 4 gènes cibles des miR319, 48 h après induction de la germination d'*O. cumana* par un traitement avec le *rac*-GR24 en présence ou non de miPEP159.
- Figure 2.22** : Pourcentage de reprise métabolique et de protrusion des racines de graines d'*O. cumana* après traitement avec le *rac*-GR24 en présence ou non de miPEP164.
- Figure 2.23** : Quantification par qRT-PCR de l'expression relative de 2 gènes cibles du miR164 48 h après induction de la germination d'*O. cumana* par un traitement avec le *rac*-GR24 en présence ou non de miPEP164.
- Figure 2.24** : Pourcentage de reprise métabolique et de protrusion des racines de graines d'*O. cumana* après traitement avec le *rac*-GR24 en présence ou non de miPEP.
- Figure 2.25** : Quantification par qRT-PCR de l'expression relative de 4 gènes cibles de miR172 48 h après induction de la germination d'*O. cumana* par un traitement avec le *rac*-GR24 avec ou sans les miPEP172.
- Figure 2.26** : Pourcentage d'haustoriogénèse après un traitement avec la *c/tZ* en présence ou non de miPEP172 sur des graines germées de *O. cumana*.
- Figure 2.27** : Pourcentage d'haustoriogénèse après un traitement avec la *c/tZ* en présence ou non de miPEP172 sur des graines germées de *P. ramosa*.
- Figure 2.28** : Quantification par qRT-PCR de l'expression relative de 2 gènes cibles des miR172, d'un gène cible des miR156 et de 3 gènes marqueurs de l'haustoriogénèse, 12 et 48 h après induction de la germination de *P. ramosa* par un traitement avec le *rac*-GR24 avec ou sans le miPEP172b.
- Figure 2.29** : Quantification par qRT-PCR de l'expression relative de 2 gènes cibles des miR172, d'un gène cible des miR156 et de 3 gènes marqueurs de l'haustoriogénèse, 12 et 48 h après induction de la germination de *P. ramosa* par un traitement avec le *rac*-GR24 avec ou sans le miPEP172b.
- Figure 2.30** : Pourcentage d'haustoriogénèse après un traitement avec la *c/tZ* en présence ou non de miPEP396 sur des graines germées de *P. ramosa*.
- Figure 2.31** : Schéma non exhaustif des interactions entre les miR159 et miR319, leurs gènes cibles et des phytohormones impliquées dans la germination des graines.
- Figure 2.32** : Schéma représentant le réseau non exhaustif des acteurs de la voie de signalisation du miR319 et l'impact de l'ajout de miPEP319 lors de la germination d'*O. cumana*.
- Figure 2.33** : Schéma représentant le réseau non exhaustif du réseau de régulation des miARN étudiés lors de l'haustoriogénèse chez *P. ramosa*.

## Conclusion et perspectives

- Figure 3.1** : Représentation schématique de la voie de régulation de miARN et de leurs gènes cibles.



# Liste des tableaux

## Chapitre 1

**Tableau 1.1** : Liste des couples d'amorces utilisés pour les qRT-PCR dans ce chapitre.

**Tableau 1.2** : Synthèse de la modification de l'expression relative des gènes cibles de miARN chez *O. cumana*.

**Tableau 1.3** : Synthèse de l'effet des miPEP lors de la germination d'*O. cumana* et de *P. ramosa*.

**Tableau 1.4** : Synthèse de l'effet des miPEP lors de l'haustoriogenèse d'*O. cumana* et de *P. ramosa*.

**Tableau 1.5** : Tableau récapitulatif des modifications de l'expression relative de gènes cibles de miARN à la suite d'un traitement au *rac*-GR24 lors de la germination d'*O. cumana* ; et de l'effet phénotypique des miPEP d'*O. cumana* et de *P. ramosa* lors de la germination et de l'haustoriogenèse.

## Chapitre 2

**Tableau 2.1** : Composition du milieu de culture TT au demi (Tadano and Tanaka, 1980).

**Tableau 2.2** : Composition du milieu de culture Long Ashton medium phosphate au demi.

**Tableau 2.3** : Liste des couples d'amorces utilisés pour les qRT-PCR dans ce chapitre.



# Liste des abréviations

2-PEITC : 2-phényléthylisothiocyanate

ABA : Acide abscissique

ACC : Acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique

ACN : Acétonitrile

ADN : Acide désoxyribonucléique

AGO1 : Argonaute1

AP2 : Adaptor protein 2

ARF : Auxin response factor

ARN : Acide ribonucléique

BHT : Benzothiadiazole

*c/tZ* : *cis-trans*-zéatine

CDD : Carotenoid cleavage dioxygenase

CK : Cytokinine

D14 : DWARF14

DCL : Déhydrocostus lactone

DCL1 : Dicer-like1

DMBQ : 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone

EGR : Early growth responsive protein

FAM : 5-caroxyfluorescein

FB : F-Box proteins

GA : Acide gibbéréllique

GR24 : Gerry Roseberry 24

GRF : Growth Regulating actor

HAM : HAIRY MERISTEM

HB : Homeodomain leucine zipper

HIF : Haustorium Inducing Factor



HTL : HYPOSENSITIVE TO LIGHT  
IAA : Acide indole 3-acétique  
ITC : Iothiocyanates  
JA : Acide jasmonique  
KAI2 : KARRIKIN INSENSITIVE2  
KAR : Karrikin  
LGS1 : LOW GERMINATION STIMULANT 1  
LOM1 : LOST MERISTEMS 1  
MAX2 : MORE AXILLARY GROWTH2  
miARN : micro-ARN  
miPEP : miRNA-encoded PEPTide  
MTT : Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide  
NF-YA : Nuclear transcription factor Y  
ORF : Open Reading Frame  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
PHB : PHABULOSA  
PHV : PHAVOLUTA  
PPM : Plant preservative mixture  
Pre-miARN : Precursor-microARN  
Pri-miARN : Primary-microARN  
RdRP : RNA dependent RNA polymerase  
REV : Revoluta  
RISC : RNA-induced silencing complex  
RR5 : Response Regulator 5  
SAR : Resistance systémique acquise  
SE : SERRATE  
SL : Strigolactone  
SMAX : SUPPRESSOR of MAX2-1  
SMXL : SMAX-Like



SPL : Squamosa promoter binding like

TAS3 : Trans-Acting siRNA

TCP : TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA, and PROLIFERATING CELL FACTOR

TOE : TARGET OF EAT

TRN2 : Tornado2

UBI : Ubiquitin

ZFP6 : Zinc Finger Protein 6



# Relevé de la production scientifique

Congrès scientifiques :

**The 4th International Symposium on Sunflower Broomrape 2-4 July 2018, Bucharest, RO**

**Tourneur S, Combier JP, Muños S, Laurent T, Delavault P.** miPEPiTO project: a new strategy to study and control the sunflower – *O. cumana* interaction. *Présentation par poster.*

**15th World Congress on Parasitism Plants 30 June-5 July 2019, Amsterdam, NL**

**Tourneur S, Roudaire T, Combier JP, Muños S, Laurent T, Delavault P.** miPEP: new tools to study and control *Orobanche cumana*. *Présentation par poster.*

Communication orale :

**12th edition of SFR Quasav's PhD student day**

**Tourneur S, Combier JP, Muños S, Laurent T, Delavault P.** miPEP: new tools to study and control *Orobanche cumana*. *Communication orale et présentation par poster.*



# **Introduction bibliographique**



# Introduction bibliographique

## I. Les plantes parasites

Le parasitisme correspond à une interaction entre deux organismes pendant laquelle seul un des deux partenaires, appelé « parasite », tire un bénéfice. Ce parasite vit alors au détriment de l'autre organisme appelé « hôte ». Chez les plantes, le parasitisme se caractérise par l'existence d'un organe spécifique, appelé haustorium, permettant aux plantes parasites de se fixer et de se nourrir d'autres plantes (Kuijt, 1969; Musselman and Dickison, 1975). Le parasitisme semble être apparu 12 fois de manière indépendante chez les angiospermes (Nickrent *et al.*, 1998; Barkman *et al.*, 2007; Bromham *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2015; Nickrent, 2020). Il en découle ainsi une grande diversité de morphologies chez les plantes parasites (Figure 1).

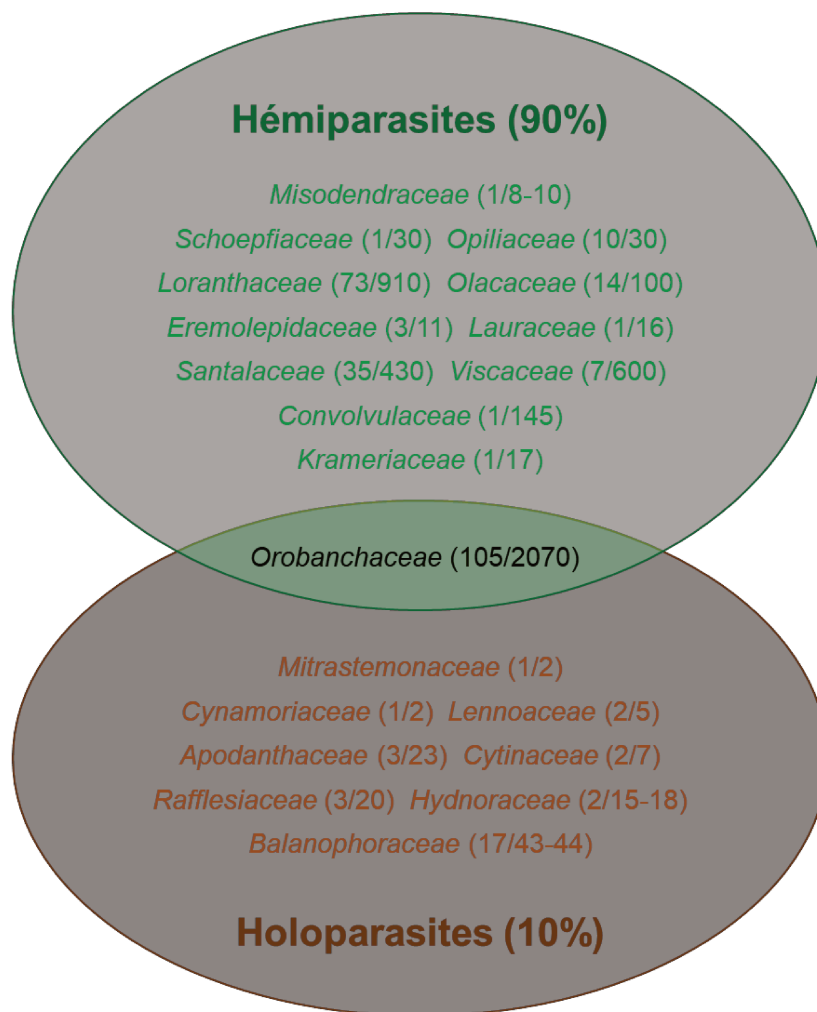


**Figure 1 : Aperçu de la diversité morphologique chez les Angiospermes parasites (Heide-Jørgensen, 2008).**

Les plantes parasites présentent une grande diversité de phénotypes. Elles peuvent être épiphytes telles que (A) *Viscum album* (Viscaceae), (B) *Psittacanthus ramiflorus* (Loranthaceae), (D) *Cuscuta europaea* (Convolvulaceae) ou épiphyses telles que (C) *Santalum album* (Santalaceae), (E) *Striga asiatica* (Orobanchaceae), (F) *Trypsharia versicolor* (Orobanchaceae), (G) *Pholisma sonora* (Lennoaceae), (H) *Mitrastema yamamotoi* (Mitrastemonaceae) et (I) *Rafflesia keithii* (Rafflesiaceae).

## A. Classification et diversité

Il existe environ 280 genres de plantes parasites regroupées en 20 familles (**Figure 2**) (Heide-Jørgensen, 2008). Elles représentent approximativement 4750 espèces soit environ 1,6 % des Angiospermes dicotylédones (Nickrent *et al.*, 1998; Heide-Jørgensen, 2008; Westwood *et al.*, 2010; Nickrent, 2020). Une seule espèce de plante parasite a été identifiée chez les Gymnospermes : *Parasitaxus ustus* (Feild and Brodribb, 2005).



**Figure 2 : Diversité des plantes parasites chez les angiospermes d'après Heide-Jørgensen, 2008.**

Les 20 familles de plantes parasites sont regroupées en fonction de leurs capacités photosynthétiques. La famille des *Orobanchaceae* est la seule regroupant des plantes hémiparasites et holoparasites. *Famille* (nombre de genres/nombre d'espèces).

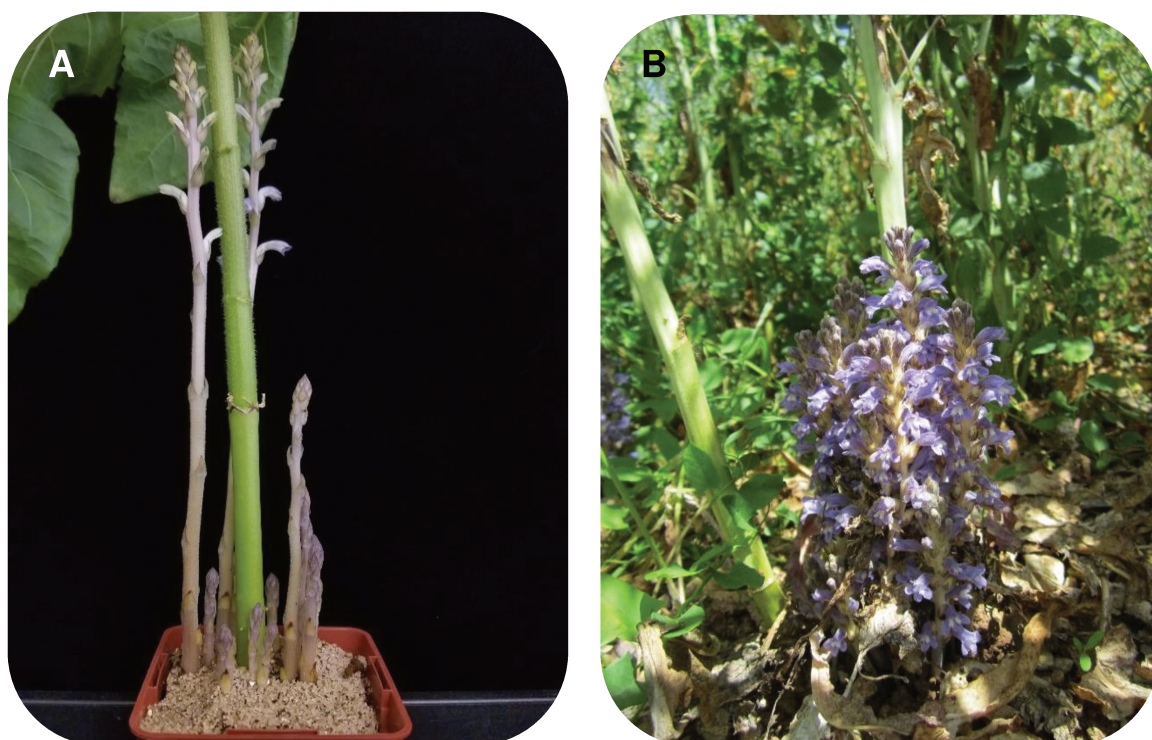
Les plantes parasites peuvent être classées en fonction de trois critères : leurs sites de fixation sur la plante hôte, leurs niveaux de dépendance à l'hôte et leurs degrés d'hétérotrophie liés à leur capacité photosynthétique. Il existe deux catégories de plantes parasite en fonction de leurs sites de fixation possibles : les plantes parasites de tiges dites épiphytes telles que la cuscute (ex. *Cuscuta campestris*) et celles de racines dites épirhizes telles que les orobanches (ex. *Orobanche cumana*). Les épiphytes représentent 60% des plantes parasites contre 40% pour les épirhizes (Heide-Jørgensen, 2008, Joel *et al.*, 2013). Le second critère, qui est le niveau de dépendance à l'hôte, permet de distinguer deux groupes : les plantes parasites facultatives qui peuvent effectuer leur cycle de vie sans la plante hôte et les plantes parasites obligatoires qui sont entièrement dépendantes de leurs hôtes pour les nutriments, l'eau et le carbone (Irving and Cameron, 2009). La dernière classification repose sur leur degré d'hétérotrophie c'est à dire leurs capacités photosynthétiques. Les plantes hémiparasites sont chlorophylliennes et sont donc capables d'effectuer la photosynthèse. Elles peuvent être des parasites facultatifs tels que *Triphysaria versicolor* mais aussi des parasites obligatoires tels que *Striga hermonthica*. Les hémiparasites représentent 90% de l'ensemble des plantes parasites. Les holoparasites sont quant à elles achlorophylliennes et donc incapables de réaliser la photosynthèse. Elles sont donc hétérotrophes et totalement dépendantes de la plante hôte. Ce sont donc toutes des plantes parasites obligatoires. Les holoparasites représentent 10% des plantes parasites (Heide-Jørgensen, 2008, Joel *et al.*, 2013). La famille des *Orobanchaceae* est la seule famille regroupant des espèces hémiparasites et holoparasites (**Figure 2**, Westwood *et al.*, 2010).

## B. La famille des Orobanchaceae

Près de la moitié des plantes parasites appartiennent à la famille des *Orobanchaceae*. Cette famille est composée de 105 genres représentant 2070 espèces de plantes parasites de racines (**Figure 2**, Bennett and Mathews, 2006; Tank *et al.*, 2006; Kokla and Melnyk, 2018) mais également des plantes du genre *Linderbergia* qui sont des plantes non parasites (Olmstead *et al.*, 2001). Le genre *Orobanche* est celui comprenant le plus grand nombre de plantes parasites. Ce genre regroupe 170 espèces de parasites épirhizes (Schneeweiss *et al.*, 2004a; b; Joel, 2009). Il a été scindé en deux genres distincts en fonction du caryotype. Le genre *Orobanche* est composé d'espèces avec un génome haploïde à 19 chromosomes et le genre *Phelipanche* composé d'espèces avec un génome haploïde à 12 chromosomes (Schneeweiss *et al.*, 2004a; b; Joel, 2009). Ainsi, dans la littérature *Orobanche ramosa* L. est équivalent à *Phelipanche ramosa* L. Pomel selon la nouvelle nomenclature (Joel, 2009; Parker, 2009).

Les hémiparasites obligatoires du genre *Striga* et les holoparasites des genres *Orobanche* et *Phelipanche* comptent parmi les espèces engendrant mondialement le plus de dégâts aux cultures avec des pertes de rendements allant de 20 à 80 % (Parker, 2009; Delavault, 2015; Kokla and Melnyk, 2018). En 1991, plus de 16 millions d'hectares étaient considérés à risque d'infestation par les plantes parasites des genres *Orobanche* et *Phelipanche* dans le bassin méditerranéen et en Asie de l'ouest, considérées comme les zones natives de ces genres. La zone d'infestation par ces plantes parasites s'est ensuite étendue en Amérique du nord, au sud et sud-est de l'Asie, en Afrique, en Europe et en Australie. En 1991, le genre *Striga*, quant à lui présent sur 5 millions d'hectares en Afrique, engendrait une perte financière estimée à plus de 300 millions de Dollars. Ce genre est également présent en Asie et en Australie (Mohamed *et al.*, 2006; Parker, 2009).

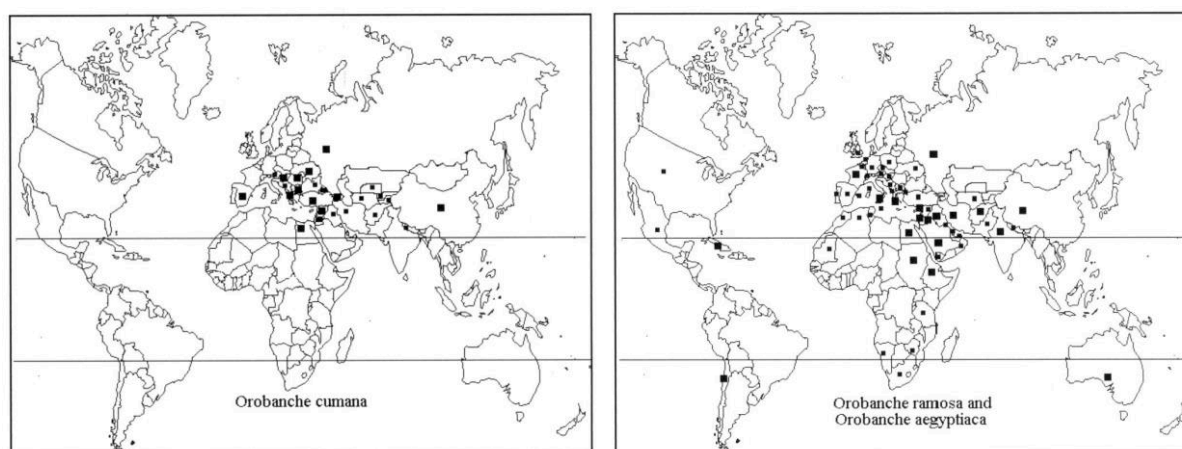
Sept espèces d'*Orobanche* et *Phelipanche* sont considérées comme des adventices majeures en Europe : *O. cranata* Forsk., *O. cumana* Wallr., *P. ramosa* L. Pomel (**Figure 3**), *P. aegyptiaca* Pers., *O. foetida* Poir., *O. cernua* Loefl. et *O. minor* Sm. Concernant le genre *Striga*, trois espèces sont considérées comme des problématiques majeures en agriculture : *S. hermonthica* (Del) Benth., *S. asiatica* (L.) Kuntze et *S. gesnerioides* (Willd.) Vatke (Parker, 2009).



**Figure 3 : Emergences et hampes florales d'holoparasite épiphyses.**

Photographies (A) d'un tournesol infesté par *O. cumana* Wallr. en culture en pot et (B) d'un colza, infesté par *P. ramosa* L. Pomel dans un champ à Saint-Maxire, en Nouvelle-Aquitaine (crédit : LBPV).

Le Laboratoire de Biologie et de Pathologie Végétales de l'Université de Nantes étudie majoritairement deux espèces d'*Orobanchaceae* : *O. cumana* Wallr. et *P. ramosa* L. Pomel., en raison de leur présence en France. *Orobanche cumana* Wallr. présente une spécificité d'hôte pour le tournesol (Mohamed *et al.*, 2006; Parker, 2009; Delavault, 2015; Krupp *et al.*, 2019). Elle est la contrainte biotique la plus importante pour la production de tournesol en Europe du sud et dans les pays limitrophes de la mer noire, de la mer Méditerranée et en Russie (**Figure 4**). Cette plante parasite est également présente en Chine (Mohamed *et al.*, 2006; Parker, 2009; Ruiz *et al.*, 2015). *Phelipanche ramosa* L. Pomel est, quant à elle, un parasite à spectre d'hôtes très large. En effet, elle peut parasiter plusieurs espèces dans plusieurs familles de plantes. Les familles majoritairement infestées sont les *Solanaceae* telles que la tomate (*Solanum lycopersicum*), la pomme de terre (*Solanum tuberosum*), les aubergines (*Solanum melongena*) et le tabac (*Nicotiana tabacum*), ainsi que les *Brassicaceae* telles que la moutarde (*Bassica spp.*) et le colza (*Brassica napus* L.). *P. ramosa* s'est principalement propagée dans les pays limitrophes de la mer méditerranée (**Figure 4**) (Parker, 2009, 2012). Cette plante est l'adventice parasite majeure du colza en France (Gibot-Leclerc *et al.*, 2003; Brault *et al.*, 2007; Auger *et al.*, 2012; Gauthier *et al.*, 2012).

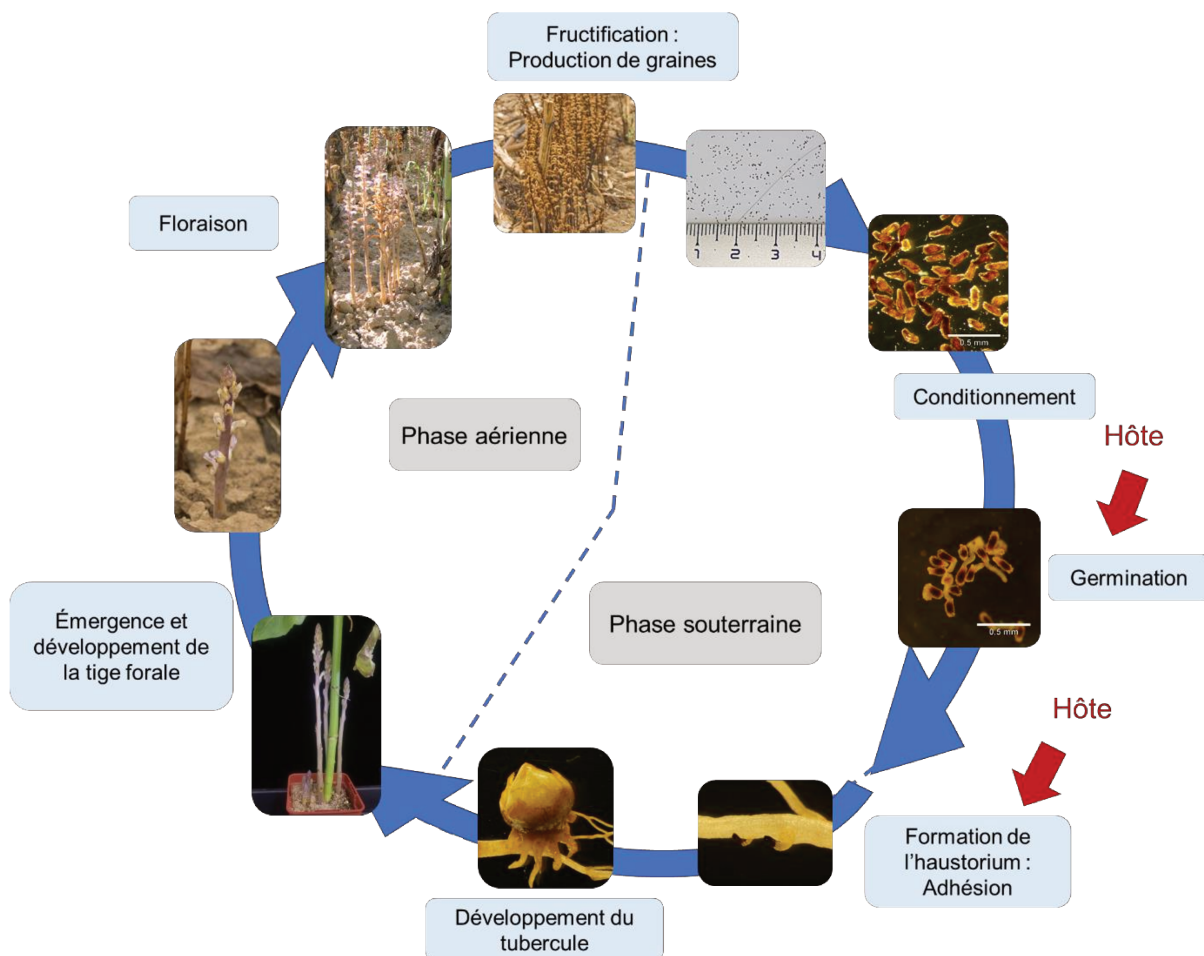


**Figure 4 : Répartition d'*Orobanche cumana* et de *Phelipanche ramosa* dans le monde (Parker, 2012).**

Les symboles les plus grands représentent les pays dans lesquels ces plantes parasites causent de sérieux dommages sur les cultures. Les petits symboles représentent les pays dans lesquels sont localisées ces plantes parasites sur des hôtes sauvages et générant peu de dommages sur les cultures.

## C. Le cycle de développement des plantes holoparasites épirhizes

Les plantes holoparasites épirhizes étant entièrement dépendantes de leurs hôtes, elles ont dû adapter leur cycle de développement et le synchroniser à celui de leurs plantes hôtes (Brault *et al.*, 2007; Gibot-Leclerc *et al.*, 2012). Elles ont ainsi un cycle de développement particulier majoritairement souterrain (**Figure 5**, Delavault, 2015). *P. ramosa* et *O. cumana* ont des cycles de vie très similaires (Bouwmeester *et al.*, 2003).



**Figure 5 : Cycle de développement d'*Orobanche cumana*.**

Ce cycle est composé de plusieurs phases de développement dont certaines sont induites par la présence de stimulants libérés dans la rhizosphère par les racines de la plante hôte : la germination et la formation de l'haustorium (Bouwmeester *et al.*, 2003; Goyet *et al.*, 2019).

## 1. La phase souterraine

### **a. Le conditionnement**

La phase souterraine débute avec l'imbibition des graines d'orobanche dans le sol correspondant à la période de conditionnement. Cette période est nécessaire à l'acquisition de la capacité germinative des graines (Musselman, 1980; Brun *et al.*, 2018). La capacité germinative est influencée par des facteurs environnementaux tels que l'humidité environnante ou la température permettant aux graines de sortir de dormance au moment propice, afin d'être synchronisées au cycle de développement de leur hôte (Gibot-Leclerc *et al.*, 2012). Par exemple, la température de conditionnement des graines d'*Orobanche* et *Phelipanche* doit être comprise entre 10 et 30 °C avec un optimal de 20 °C pour *P. ramosa* (Gibot-Leclerc *et al.*, 2004; Brun *et al.*, 2018) et un optimal entre 23 et 26 °C pour *O. cumana* (Mohamed *et al.*, 2006) afin d'acquérir la capacité germinative. La durée de la phase de conditionnement varie selon les espèces, elle peut aller de 3 jours à plusieurs semaines (Gibot-Leclerc *et al.*, 2004; Brun *et al.*, 2018). Elle est de 4 jours minimum pour *P. ramosa* (Lechat *et al.*, 2012, 2015) et *O. cumana*. Une imbibition prolongée sans présence de stimulant de germination induit une dormance secondaire des graines permettant la prolongation de leur durée de vie dans le sol (Kebreab and Murdoch, 1999; Gibot-Leclerc *et al.*, 2004). La phase de conditionnement débute avec l'absorption d'eau par l'endothélium, entraînant son gonflement et induisant à son tour l'ouverture du micropyle. Cette ouverture permet la perception des molécules de la rhizosphère comme les stimulants de germination, par des récepteurs probablement présents dans les cellules du péricarpe puisqu'elles sont localisées à l'interface entre la rhizosphère et l'embryon après l'ouverture du micropyle (Joel *et al.*, 2012; Lechat *et al.*, 2012). Une réduction de la quantité d'acide abscissique (ABA) est observée lors du conditionnement mais n'est pas suffisante chez les plantes parasites pour induire la germination (Lechat *et al.*, 2012). Cette réduction d'ABA est probablement due à une exsudation naturelle dans le milieu (Chae *et al.*, 2004; Lechat *et al.*, 2012). Parallèlement, une déméthylation globale de l'ADN est observée lors de cette phase de conditionnement, qui est un préalable nécessaire à l'expression de gènes impliqués dans la germination (Lechat *et al.*, 2015).

### **b. La germination**

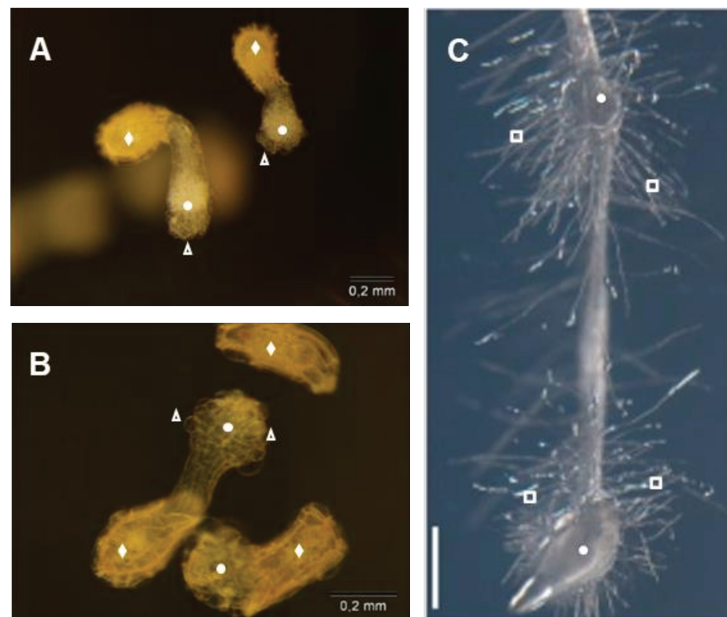
Les stimulants de germination émis par les racines de la plante hôte dans la rhizosphère sont perçus par les récepteurs devenus accessibles à la suite de la phase de conditionnement (Joel *et al.*, 2012; Lechat *et al.*, 2012). Ces stimulants peuvent être des strigolactones (Yoneyama *et al.*, 2010; Brun *et al.*, 2018) mais aussi des sesquiterpènes lactones (Pérez de Luque *et al.*, 2000; Joel *et al.*, 2011), des composés phénoliques ou encore des

isothiocyanates (Auger *et al.*, 2012). La perception de ces stimulants caractérise le début de la phase de germination (Bouwmeester *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2010). Les stimulants de germination induisent une surexpression du gène *CYP707A1* codant une 8'-hydroxylase impliquée dans le catabolisme de l'ABA dans des cellules localisées entre l'embryon et le micropyle (Lechat *et al.*, 2012). La déméthylation de l'ADN lors du conditionnement est nécessaire à l'activation de ce gène (Lechat *et al.*, 2015). Sa surexpression entraîne alors une diminution importante de quantité d'ABA dans les graines déclenchant les mécanismes impliqués dans le processus de germination. La proximité de la plante hôte est nécessaire à la perception des molécules par les graines de la plante parasite. La distance maximale pour permettre l'induction de la germination varie selon les espèces. Chez *P. ramosa*, seules les graines se trouvant à moins de 4 mm de la racine de l'hôte vont percevoir les stimulants de germination contre 10 mm pour *O. crenata* (Gibot-Leclerc *et al.*, 2012). Les graines de plantes parasites possèdent de faibles réserves, il est donc essentiel pour elles de germer à proximité de la racine de l'hôte afin de l'atteindre avant épuisement de la totalité de ces réserves (Joel *et al.*, 2011). Il est également vital pour ces plantes de se fixer rapidement à l'hôte afin d'y prélever les éléments nécessaires à leur développement (Fernández-Aparicio *et al.*, 2020). Si la fixation n'a pas lieu, la graine va dégénérer et mourir (Yoneyama *et al.*, 2010). Elle doit ainsi se réaliser dans les 3 ou 4 jours pour *P. ramosa* (Gibot-Leclerc *et al.*, 2012). Les températures optimales de germination de *P. ramosa* et d'*O. cumana* sont les mêmes que celles pour le conditionnement (Gibot-Leclerc *et al.*, 2004; Mohamed *et al.*, 2006; Brun *et al.*, 2018).

### **c. La formation de l'haustorium**

La fixation de la plante parasite sur les racines de l'hôte nécessite la formation d'un organe spécifique appelé haustorium (Westwood *et al.*, 2010; Clarke *et al.*, 2019). Les plantes parasites facultatives présentent des haustoriums latéraux et terminaux comme chez *Phtheirospermum japonicum* (**Figure 6**, Cui *et al.*, 2016). Les plantes parasites obligatoires vont quant à elles présenter uniquement des haustoriums terminaux comme chez *P. ramosa* et *O. cumana* (Joel *et al.*, 2013; Yoshida *et al.*, 2016). L'étape de formation de l'haustorium appelée haustoriogenèse est dépendante de la perception de molécules appelées HIFs (Haustorium Inducing Factor) produites par les racines de la plante hôte (Clarke *et al.*, 2019). Ces HIFs peuvent être des composés phénoliques tels que les xenognosines, premiers HIFs identifiés (Lynn *et al.*, 1981; Steffens *et al.*, 1982) et le 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone (DMBQ, Yoshida *et al.*, 2016; Cui *et al.*, 2018) ; ou des hormones végétales comme les cytokinines (CKs, Goyet *et al.*, 2019).

□



**Figure 6 : Morphologie des haustoriums chez les Orobanchaceae.**

Les haustoriums de plantes parasites obligatoires tels que *P. ramosa* (A) et *O. cumana* (B) sont terminaux. Ils présentent une boursoufflure avec de nombreuses papilles. Les plantes parasites facultatives telles que *P. japonicum* (C) vont présenter des haustoriums latéraux avec des poils haustoriaux (Cui *et al.*, 2016). (• : haustorium ; ♦ : tégument ; Δ : papilles ; ◻ poils haustoriaux).

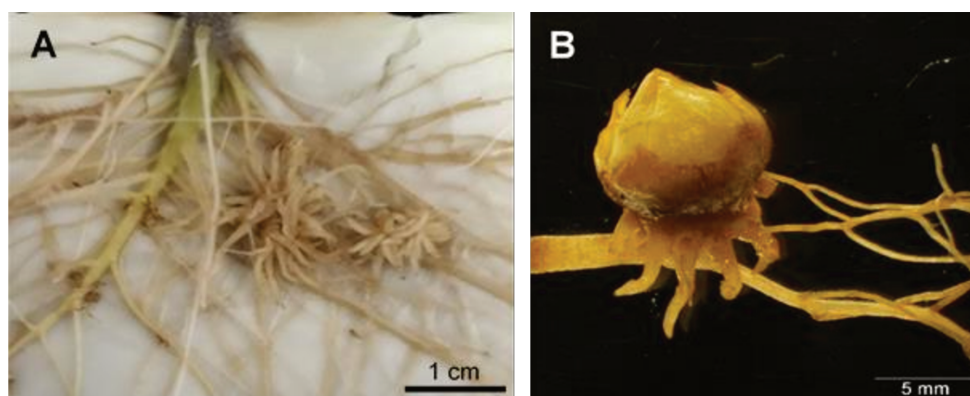
La perception de ces molécules entraîne l'arrêt de l'élongation de la racine et la formation des structures haustoriales précoces ou EHS (Early Haustorium Structure) telles que le gonflement de l'apex racinaire chez *P. ramosa* (Goyet *et al.*, 2017). L'expansion cellulaire va alors passer de longitudinale à radiale provoquant ce gonflement de l'apex racinaire (Joel and Losner-Goshen, 1994). Deux types de structures sont alors observés chez les plantes parasites : les poils haustoriaux, comme chez *P. japonicum* (Cui *et al.*, 2016) et *S. hermonthica* (Hood *et al.*, 1998), et les papilles haustoriales comme chez *P. ramosa* et *O. cumana* (Figure 6). Ces structures seraient dérivées des poils absorbants et des trichomes des plantes autotrophes issues respectivement de l'expansion cellulaire du rhizoderme et de l'épiderme (Hülkamp *et al.*, 1994; Mendoza and Alvarez-Buylla, 2000). Les haustoriums terminaux présentent des papilles riches en hémicellulose formant un épithélium adhésif composé de sécrétions glucidiques. Les papilles haustoriales sont en forme de couronne permettant l'adhésion à l'hôte (Joel and Losner-Goshen, 1994; Yoder, 1999; Yoshida *et al.*, 2016).

L'invasion de l'épiderme, des tissus du cortex et du cylindre vasculaire de la racine de l'hôte (Yoneyama *et al.*, 2010) est possible grâce à la force exercée par l'haustorium, provoquée par une expansion cellulaire du méristème de manière longitudinale, couplée à l'action d'enzymes émises par le parasite permettant de dissocier les cellules de l'hôte sans provoquer leur lyse (Musselman, 1980; Irving and Cameron, 2009; Fernández-Aparicio *et al.*, 2016). Des pectines

méthyl-estérase ont été détectées au niveau des haustoriums d'*Orobanche*, elles seraient impliquées dans la dissociation des cellules de l'hôte (Losner-Goshen *et al.*, 1998; Yoder, 1999). Des gènes associés au métabolisme des pectines sont fortement exprimés lors des stades précoces du développement de l'haustorium chez *S. hermonthica* (Yoshida *et al.*, 2019). La connexion au système vasculaire de la plante hôte est essentielle pour le prélèvement des nutriments et de l'eau afin de permettre la survie de la plante parasite (Kuijt, 1977; Westwood *et al.*, 2010; Fernández-Aparicio *et al.*, 2020). La connexion au xylème permet de fournir l'eau et les minéraux. Une connexion au phloème est nécessaire chez les holoparasites afin de prélever les acides aminés, les acides organiques et les glucides (Abbes *et al.*, 2009; Westwood, 2013; Ekawa and Aoki, 2017). Cette connexion au phloème est symplastique chez *O. cumana* (Krupp *et al.*, 2019). Les nutriments détournés de la plante hôte par la plante parasite sont métabolisés par les cellules de l'haustorium et transportés vers un organe de stockage, le tubercule (Delavault *et al.*, 2002; Péron *et al.*, 2017).

#### **d. Le développement du tubercule**

Après fixation à la racine et connexion au système vasculaire, un organe de réserve appelé tubercule (**Figure 7**) se forme et grossit à l'extérieur de la plante hôte (Yoneyama *et al.*, 2010; Delavault, 2015). Des pseudo-racines appelées aussi racines adventives peuvent être observées à la base du tubercule (Joel, 2013; Yoshida *et al.*, 2016). Ce tubercule permet le stockage d'amidon pour permettre la croissance, la floraison et la formation de graines chez la plante parasite (Joel and Losner-Goshen, 1994; Yoshida *et al.*, 2016). Le tubercule va ensuite bourgeonner pour former une tige achlorophyllienne qui va ensuite émerger du sol.



**Figure 7 : Morphologie des tubercules d'holoparasites.**

Les tubercules de *P. ramosa* (A) possèdent de nombreuses racines adventives leur conférant un aspect d'araignée. Les tubercules d'*O. cumana* (B) ne possèdent pas ou très peu de racines adventives donnant une forme sphérique (Crédit photo A : Estelle Billard et B : Sabine Tourneur).

## 2. La phase aérienne

### a. L'émergence et développement de la tige florale

L'émergence de la tige caractérise le début de la phase aérienne du cycle de développement des holoparasites (**Figure 5**). Une hampe florale va ensuite se développer et produire une multitude de petites fleurs (**Figure 8**). Chez *P. ramosa*, la hampe florale ramifiée est composée d'une dizaine de fleurs bleues-mauves mesurant de 1 à 1,5 mm (Gibot-Leclerc *et al.*, 2012). *O. cumana* présente une unique hampe présentant également une dizaine de fleurs mauves.



**Figure 8 : Développement de la hampe florale d'*O. cumana* jusqu'à floraison.**

La hampe florale d'*O. cumana* peut atteindre une trentaine de centimètres. Elle est ornée d'une dizaine de petites fleurs mauves (Crédit photo : Sabine Tourneur).

### b. La fructification : production de graines

La majorité des plantes parasites sont autogames (Pieterse and Verkleij, 1991). C'est notamment le cas des orobanches *O. cumana* et *P. ramosa*. L'autofécondation des fleurs va conduire à la formation de capsules. Cette étape correspond à la fructification (Delavault, 2015). Chaque capsule contient des centaines de graines. Dans le cas d'infestation sévère par

*P. ramosa*, un pied de colza peut être infesté par 15 à 20 hampes, chaque hampe florale est composée d'une dizaine de fleurs produisant chacune de 600 à 800 graines (Gibot-Leclerc *et al.*, 2012). Chaque plante parasite va ainsi produire environ 150 000 graines qui composent et renouvellent le stock grainier du sol (Parker and Riches, 1993; Kebreab and Murdoch, 2001). Les graines d'orobanche sont de forme ovale, mesurent de 200 à 400  $\mu\text{m}$  et pèsent de 15 à 25  $\mu\text{g}$  (Joel *et al.*, 2011, 2012; Gibot-Leclerc *et al.*, 2012). Elles sont composées d'un embryon réduit dépourvu de cotylédon avec des réserves majoritairement lipidiques (Joel *et al.*, 2012). Elles peuvent rester en dormance une vingtaine d'années dans le sol en attente de perception de stimulants de germination (Joel *et al.*, 2007, 2011; Pointurier *et al.*, 2019).

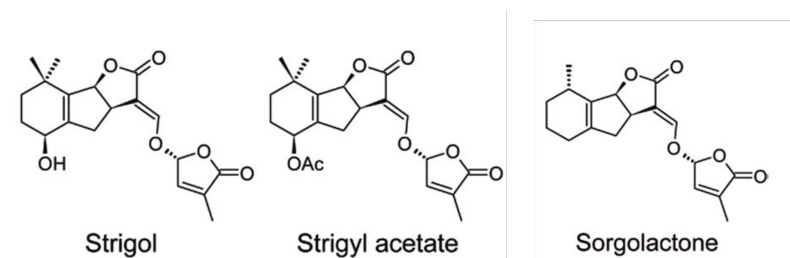
## II. Les phases clés du développement induites par la plante hôte

### A. L'induction de la germination des plantes parasites

La germination est induite par des molécules produites par la plante hôte appelées stimulants de germination. Il existe plusieurs catégories de stimulants de germination (Brun *et al.*, 2018) : des strigolactones (Yoneyama *et al.*, 2010; Lechat *et al.*, 2012; Yoneyama, 2020), des sesquiterpènes (Pérez de Luque *et al.*, 2000; Joel *et al.*, 2011), des polyphénols et des isothiocyanates (ITC, Auger *et al.*, 2012). Les strigolactones regroupent la majorité des stimulants de germination (Brun *et al.*, 2018).

#### 1. Les strigolactones

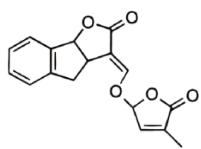
La première strigolactone identifiée comme stimulatrice de la germination de *Striga lutea* a été isolée à partir d'exsudats racinaire de coton, elle a été nommée strigol (**Figure 9**, Cook *et al.*, 1966). Le strigol est également présent en plus faible quantité dans les exsudats racinaires de maïs, de millet et de sorgho (Siame *et al.*, 1993). Un deuxième composé stimulant la germination de *S. lutea* a ensuite été isolé à partir des mêmes exsudats racinaires. Il s'agit du strigyl acétate (**Figure 9**, Cook *et al.*, 1972). Le sorgolactone, un stimulant de germination de *Striga* analogue du strigol a été isolé à partir d'exsudats de sorgho (Hauck *et al.*, 1992). Ces terpénoïdes lactones présentant une analogie de structure avec le strigol ont été classées sous le nom de strigolactones (Butler, 1994).



**Figure 9 : Structure des premiers stimulants de germination de *Striga* identifiés à partir d'exsudats racinaires (Brun *et al.*, 2018).**

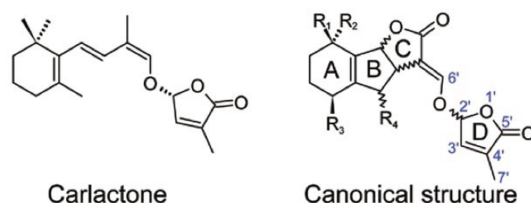
Le strigol et le strigyl acétate ont été les premières strigolactones identifiées (Cook *et al.*, 1966, 1972). Elles ont été isolées à partir d'exsudats racinaires de coton. Le sorgolactone a été isolé à partir d'exsudats racinaires de sorgho (Hauck *et al.*, 1992).

Un analogue synthétique des strigolactones, le GR24 (Gerry Roseberry 24), présente une très forte activité inductrice de la germination chez les plantes parasites des genres *Striga* et *Orobanche* (Figure 10, Wigchert *et al.*, 1999).



**Figure 10 : Structure du GR24, un analogue synthétique des strigolactones.**

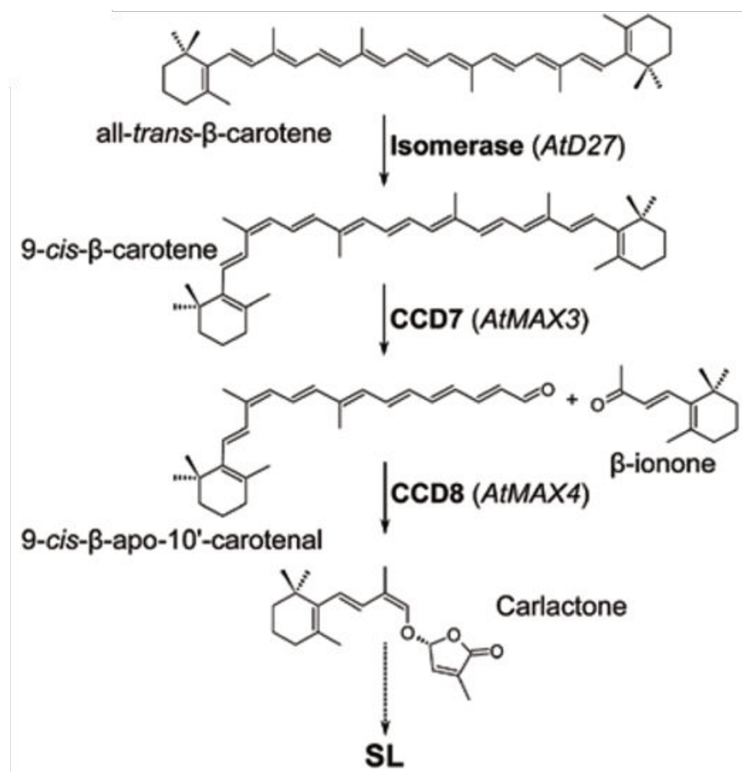
Les strigolactones sont composées d'une lactone tricyclique liée par une liaison éno-éther à un cycle buténolide D (Figure 11). Cette liaison entre le cycle C et le D est une structure essentielle à l'activité inductrice de la germination (Yoneyama *et al.*, 2010; Brun *et al.*, 2018). La majorité des strigolactones naturelles ont leur cycle D avec une configuration en 2'-R. Cette configuration est responsable de la forte activité inductrice de la germination (Yoneyama *et al.*, 2010). Les strigolactones sont issues de la voie de biosynthèse des caroténoïdes (Matusova *et al.*, 2005; Al-Babili and Bouwmeester, 2015). Elles proviennent d'un précurseur commun, le carlactone (Figure 11, Yoneyama *et al.*, 2010; Seto *et al.*, 2014).



**Figure 11 : Structure canonique des strigolactones et de leur précurseur (Brun *et al.*, 2018).**

Le carlactone est le précurseur des strigolactones. Il est issu de la voie des caroténoïdes. Les strigolactones sont composées d'une lactone tricyclique liée à un cycle buténolide par une liaison éno-éther.

Le carlactone est produit à partir de l'all-*trans*- $\beta$ -carotène par l'action d'une isomérase permettant la production de 9-*cis*- $\beta$ -carotène, lui-même transformé en 9-*cis*- $\beta$ -apo-10'-caroténal par action de deux dioxygénases nommées CCD7 et CDD8 (CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE, **Figure 12**, Seto *et al.*, 2014; Al-Babili and Bouwmeester, 2015; Brun *et al.*, 2018). Les enzymes CDD7 et CDD8 sont codées respectivement par les gènes *MAX3* et *MAX4* chez *A. thaliana* (Ruyter-Spira *et al.*, 2013; Al-Babili and Bouwmeester, 2015; Brun *et al.*, 2018). Le 9-*cis*- $\beta$ -apo-10'-caroténal est ensuite converti en strigolactones par des processus encore partiellement méconnus. Le gène *MAX1* serait impliqué dans ce processus (Brun *et al.*, 2018).

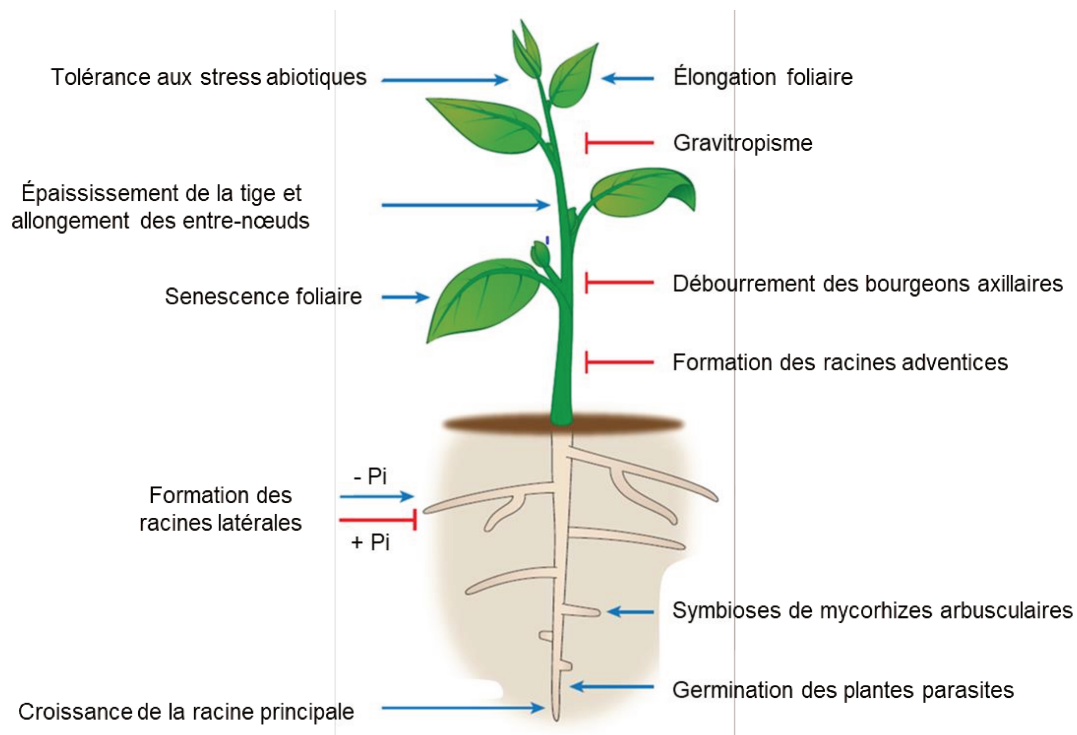


**Figure 12 : Voie de biosynthèse des strigolactones (Brun *et al.*, 2018).**

Le carlactone est synthétisé à partir du all-*trans*- $\beta$ -carotène grâce à l'action d'une isomérase et de deux dioxygénases.

Les strigolactones (SLs) sont des phytohormones impliquées dans une multitude de processus biologiques (**Figure 13**). Elles sont naturellement exsudées dans la rhizosphère par les plantes. L'émission de ces SLs dans le sol sert de stimulant de germination pour les plantes parasites mais également de signal précoce dans la mise en place de symbioses mycorhiziennes bénéfiques pour les plantes (Akiyama and Hayashi, 2006; Yoneyama *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2010). Les SLs vont rapidement et fortement stimuler la prolifération cellulaire des champignons mycorhiziens à arbuscules ainsi que la ramification de leurs hyphes (Akiyama *et al.*, 2005, 2010; Besserer *et al.*, 2006, 2008). Une carence en phosphate va

entraîner une augmentation de l'exsudation de SLs (Yoneyama *et al.*, 2012) afin de stimuler le recrutement et la croissance de ces champignons, dont la fonction est de rendre le phosphate et l'azote du sol assimilable par les plantes (Akiyama and Hayashi, 2006; Yoneyama *et al.*, 2007a; b; Al-Babili and Bouwmeester, 2015). Les strigolactones sont aussi impliquées dans le développement de la plante. Elles vont par exemple moduler la formation de racines latérales en l'inhibant, et l'élongation des poils absorbants en la stimulant (Kapulnik *et al.*, 2011a; b; Brewer *et al.*, 2013). Elles vont également moduler le développement des parties aériennes des plantes en inhibant le débourrement des bourgeons axillaires et donc la ramification des tiges (Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2013; Waldie *et al.*, 2014), en favorisant l'allongement des entre-nœuds (de Saint Germain *et al.*, 2013) et en modifiant le gravitropisme de la plante (Sang *et al.*, 2014). Une étude a montré que les SLs favorisent la tolérance aux stress abiotiques tels que la sécheresse ou les stress salins chez *A. thaliana* (Ha *et al.*, 2014).



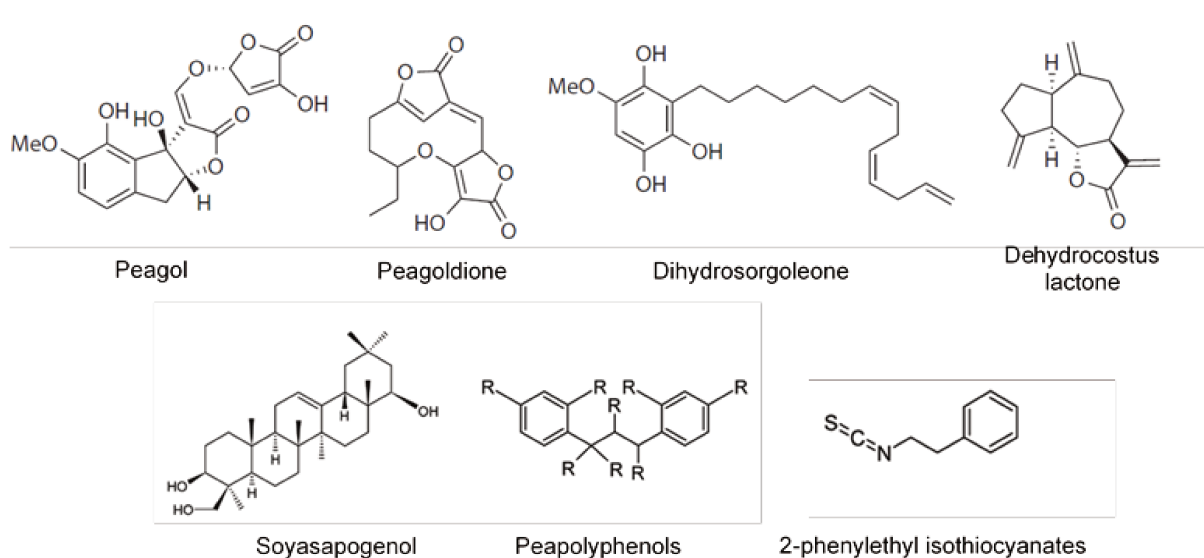
**Figure 13 : Principaux rôles des strigolactones lors du développement des plantes (Waters *et al.*, 2017).**

Les strigolactones sont impliquées dans le développement des plantes. Elles vont intervenir au niveau foliaire par exemple en favorisant l'élongation foliaire, l'allongement et l'épaississement de la tige ou encore la senescence des feuilles. Elles sont impliquées dans la tolérance aux stress abiotiques, l'inhibition du gravitropisme et le débourrement des bourgeons axillaires. Les SLs interviennent également au niveau racinaire en favorisant la croissance de la racine principale, la formation de racines latérales, les symbioses endomycorhiziennes mais également la germination des plantes parasites.

Ainsi, les strigolactones ont des rôles importants dans le développement des plantes mais aussi dans les interactions avec les autres organismes du sol, qu'ils soient bénéfiques comme les champignons mycorhiziens à arbuscules, ou pathogènes comme les plantes parasites.

## 2. Les autres stimulants de germination

Des stimulants de germination apparentés aux strigolactones appelés strigolactones-like (SL-like) ont été découverts dans des exsudats de pois. Le peagol et la peagoldione induisent la germination d'*Orobanche foetida* et de *Phelipanche aegyptiaca* respectivement (**Figure 14**, Evidente et al., 2009). Il existe d'autres stimulants de germination comme le dihydrosorgoleone, isolé à partir d'exsudats de sorgho (Chang *et al.*, 1986) et inducteur de la germination de *S. asiatica* (**Figure 14**).



**Figure 14 : Structure de quelques stimulants de germination des plantes parasites (Xie *et al.*, 2010; Brun *et al.*, 2018).**

Le peagol et la peagoldione sont des stimulants de germination des plantes parasites des genres *Orobanche* et *Phelipanche*. Le dihydrosorgoleone stimule la germination de *S. asiatica*. Le dehydrocostus lactone est un stimulant spécifique d'*O. cumana*. Les composés phénoliques tels que le soyasapogenol et les peapolyphenols stimulent respectivement *O. minor* et *O. foetida*. Le 2-PEITC stimule la germination de *P. ramosa*.

Des composés phénoliques sont également inducteurs de la germination des plantes parasites. On retrouvera ainsi le soyasapogenol, identifié à partir d'exsudats de vesce, et des polyphénols A-C, isolés à partir d'exsudats de pois. Le soyasapogenol stimule la germination d'*O. minor* et les polyphénols A-C stimulent la germination d'*O. foetida* (**Figure 14**, Evidente et al., 2010, 2011).

Des guaianolides sesquiterpènes lactones tels que le dehydrocostus lactone (DCL) sont exsudés par les racines de tournesol et stimulent la germination de plantes parasites (**Figure 14**). Le DCL est composé de trois cycles, le cycle A possède 6 carbones contrairement aux strigolactones. Il ne possède pas de cycle D mais stimule tout de même la germination d'*O. cumana* et d'*O. minor* avec une efficacité similaire à celle du GR24 (Pérez de Luque *et al.*,

2000; Joel *et al.*, 2011; Raupp and Spring, 2013; Brun *et al.*, 2019). Cette spécificité serait causée par l'absence de cycle D. En effet, une étude a montré que l'ajout de ce cycle sur le DCL enlève cette spécificité permettant par exemple d'induire la germination de *P. ramosa* (Macías *et al.*, 2009). Cette étude conforte l'idée que le cycle D est essentiel à l'activité des strigolactones chez la majorité des plantes parasites. D'autres sesquiterpènes lactones ont été identifiés dans les exsudats de tournesol : le costunolide, la tomentosine et la 8-epixanthatine. Ces molécules stimulent la germination d'*O. cumana* mais ne stimulent pas celle de *P. ramosa* (Raupp and Spring, 2013).

Une autre catégorie de molécules, les isothiocyanates (ITC), est capable d'induire la germination des plantes parasites. Ces ITC sont issus de l'hydrolyse, par des myrosinases, de glucosinolates exsudés dans la rhizosphère par les Brassicacées telles que le colza (Auger *et al.*, 2012). Les glucosinolates ne sont pas des stimulants de germination, seuls les produits de leur hydrolyse sont actifs. C'est le cas du 2-phényléthylisothiocyanate (2-PEITC), un ITC qui est le stimulant de germination majoritaire de *P. ramosa* dans la rhizosphère du colza (Auger *et al.*, 2012; Brun *et al.*, 2019).

Ainsi, il existe une multitude de stimulants de germination chez les plantes parasites. Ces stimulants ont des structures différentes entraînant une différence d'activité stimulatrice. Certains de ces stimulants sont espèces spécifiques comme le DCL pour *O. cumana* et d'autres stimulent plusieurs plantes parasites comme les strigolactones. La grande diversité de stimulants de germination permet une reconnaissance spécifique de la plante hôte par la plante parasite.

### 3. La perception des stimulants de germination

Les stimulants de germination tels que les SLs et les karrikines (KAR, molécules produites lors de feux de forêts) sont perçus par des récepteurs de la famille des  $\alpha/\beta$  hydrolases. Il existe deux familles de récepteurs, les  $\alpha/\beta$  hydrolases DWARF14 (D14) et la famille des KARRIKIN INSENSITIVE2 (KAI2) aussi appelés HYPOSENSITIVE TO LIGHT (HTL, Conn *et al.*, 2015; Waters *et al.*, 2017).

D14 est impliqué dans la perception des SLs chez les plantes non-parasites mais n'est pas présent chez les plantes parasites. La liaison du cycle D de la SL à ce récepteur va induire le clivage de la liaison éno-éther entre le tricycle et le cycle D permettant un changement de conformation du D14. Ce changement de conformation permet le recrutement d'une protéine F-box, MORE AXILLARY GROWTH2 (MAX2) et d'autres protéines, SMAX-LIKE (SMXL) impliquées notamment dans le contrôle de la ramification des tiges (Waters *et al.*, 2017; Clarke *et al.*, 2019).

Les récepteurs KAI2 présentent des similarités structurales avec D14. Ils sont impliqués dans la perception des KARs chez les plantes non-parasites tel qu'*A. thaliana* (Conn *et al.*, 2015). Les KARs sont produites lors de feux de forêts. La perception de ces molécules induit la germination des plantes non-parasites afin de permettre la re-végétalisation des terrains brûlés (Flematti *et al.*, 2015). Il a été montré par exemple que les KARs stimulent la germination des graines d'*A. thaliana* (Nelson *et al.*, 2009). Ces récepteurs sont également présents chez les hemiparasites facultatifs tels que *T. versicolor* et *P. japonicum* ; chez les hémiparasites obligatoires tels que *S. hermonthica* et chez les holoparasites tels que *P. aegyptiaca*, *O. cumana* et *O. minor* (Conn *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2020b). KAI2d, un membre de la famille des KAI2s va percevoir les SLs chez les plantes parasites. La perception de ces SLs induit, comme pour D14, le recrutement de MAX2 après clivage de la liaison éno-éther et le changement de conformation de KAI2. MAX2 va dégrader un répresseur transcriptionnel, SUPPRESSOR OF MAX2-1 (SMAX1), potentiellement inhibiteur de l'expression du gène *CYP707A* (Brun *et al.*, 2018). L'expression de ce gène va alors induire le catabolisme de l'ABA modifiant la balance ABA/GA et induisant donc la germination des plantes parasites et non-parasites.

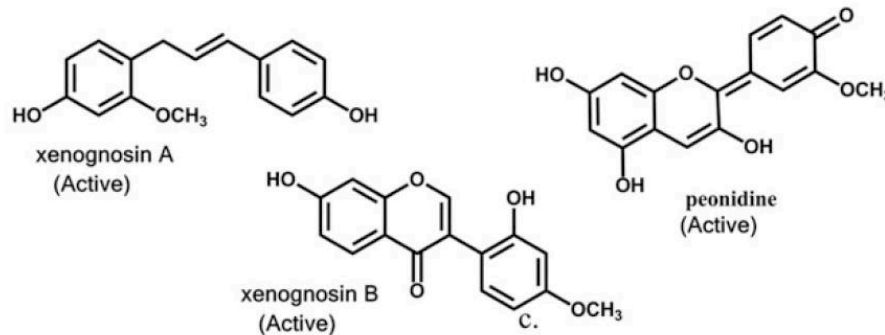
## B. L'haustoriogenèse : formation d'un organe spécifique appelé haustorium

L'haustoriogenèse débute par la mise en place des EHS : la formation d'une boursofflure à l'apex racinaire puis la formation de structures similaires aux poils absorbants et aux trichomes, les papilles et les poils haustoriaux (Goyet *et al.*, 2017). Les EHS sont induits par la perception de molécules stimulatrices appelées HIFs émises dans la rhizosphère par les racines des plantes hôtes.

### 1. Les composés phénoliques

Les premiers HIFs découverts sont des composés phénoliques, deux flavonoïdes nommés xenognosines A et B (**Figure 15**). Ils ont été isolés à partir d'exsudats racinaires d'*Astragalus*, une légumineuse, comme ayant un effet haustoriogène sur *Agalinis purpurea* (Lynn *et al.*, 1981; Steffens *et al.*, 1982). Les flavonoïdes ont un rôle de molécule signal dans la mise en place des nodules lors de l'interaction plante-microbe (Perret *et al.*, 2000). Ils sont donc naturellement émis dans la rhizosphère par les plantes non-parasites afin de permettre la mise en place de symbioses bénéfiques pour ces plantes. Les plantes parasites ont détourné cette signalisation à leur avantage afin de percevoir la présence de la plante hôte. D'autres flavonoïdes ont ensuite été identifiés comme inducteurs de la formation de l'haustorium. C'est

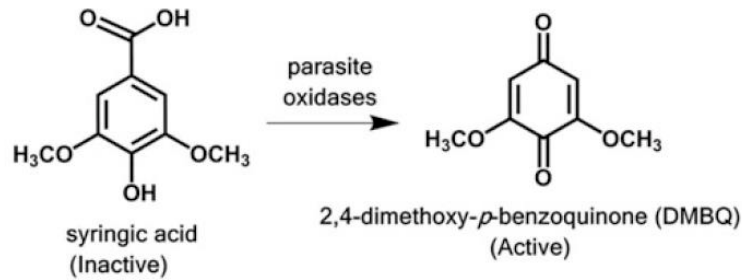
le cas de la péonidine (**Figure 15**), de la famille des anthocyanidines, qui présente une activité inductrice de l'haustoriogenèse importante chez *T. versicolor* (Albrecht *et al.*, 1999), mais aussi chez *S. hermonthica* (Cui *et al.*, 2018).



**Figure 15 : Structure de trois flavonoïdes inducteurs de l'haustoriogenèse (Joel, 2013).**

Les deux premiers HIFs découverts sont les xenognosines A et B. La péonidine fait également partie des flavonoïdes HIFs chez les hémiparasites.

D'autres composés phénoliques avec un effet haustoriogène ont également été identifiés à partir d'exsudats racinaires. C'est le cas du 2,6-diméthoxy-1,4-benzoquinone (**Figure 16**, DMBQ), une quinone isolée à partir d'un extrait racinaire de sorgho (Chang and Lynn, 1986; Yoshida *et al.*, 2016). Le DMBQ présente une activité inductrice de la formation de l'haustorium *in vitro* chez les hémiparasites *P. japonicum* et *S. hermonthica* (Cui *et al.*, 2018). Il provient de la dégradation de la lignine présente dans la paroi des cellules racinaires de l'hôte sous l'action de peroxydases provenant elles-mêmes de l'hôte. Les peroxydases sont activées par le peroxyde d'hydrogène émis par l'hôte qui catalyse la production de quinones à partir de la paroi cellulaire de l'hôte (Keyes *et al.*, 2000; Goyet *et al.*, 2019). Cette dégradation entraîne la libération de composés phénoliques tels que l'acide syringique (**Figure 16**), le précurseur du DMBQ (Keyes *et al.*, 2000; Cui *et al.*, 2018; Clarke *et al.*, 2019). L'acide syringique est oxydé en DMBQ par des oxydases provenant de la plante parasite (**Figure 16**, Bandaranayake *et al.*, 2010). Chez la plante hémiparasite *T. versicolor*, le DMBQ est capté par la racine du parasite et réduit en forme semiquinone, active, par deux quinones réductases : QR1 et QR2 produites par la racine du parasite et dont l'expression des gènes correspondants est stimulée par la présence de DMBQ (Matvienko *et al.*, 2001a; b; Bandaranayake *et al.*, 2010; Yoshida *et al.*, 2016; Ishida *et al.*, 2017). L'implication de QR2 dans le développement de l'haustorium a également été mise en évidence chez *P. japonicum*, une plante hémiparasite facultative.



**Figure 16 : Synthèse du DMBQ à partir de l'acide syringique (Joel, 2013).**

L'acide syringique est oxydé en DMBQ par des oxydases provenant de la plante parasite.

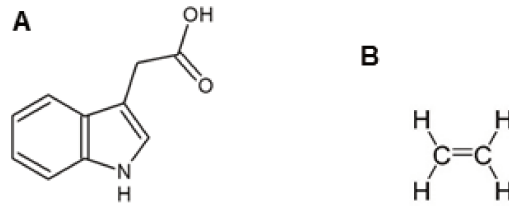
Il a été montré que le degré du potentiel redox des composés phénoliques est important pour leur activité inductrice de la formation de l'haustorium (Yoshida *et al.*, 2016). La reconnaissance des acides phénoliques varie en fonction des espèces de parasites. Par exemple l'acide coumarique présente une activité supérieure à l'acide syringique chez *T. versicolor* mais n'induit pas la formation de l'haustorium chez *Agalinis purpurea* et inversement pour l'acide sinapinique (Albrecht *et al.*, 1999). Le DMBQ quant à lui est inactif chez les holoparasites tels que *O. cumana*, *P. ramosa* et *P. aegyptiaca* (Yoshida *et al.*, 2016; Goyet *et al.*, 2017).

## 2. Les hormones végétales

Des études ont montré l'implication des phytohormones telles que l'auxine, l'éthylène (ET) ou les CKs dans la formation des haustoriums des hémiparasites et des holoparasites (Keyes *et al.*, 2000; Wrobel and Yoder, 2001; Tomilov *et al.*, 2005; Goyet *et al.*, 2019). Ces phytohormones sont impliquées dans la régulation de nombreux processus biologiques chez les plantes. Les CKs stimulent par exemple la formation de racines latérales alors que les auxines l'inhibent (Schaller *et al.*, 2015).

L'accumulation d'auxine et d'éthylène est un événement précoce dans le développement de l'haustorium chez l'hémiparasite facultatif *T. versicolor*. En effet, l'application d'acide aminocyclopropane carboxylique (ACC), un précurseur de l'éthylène (**Figure 17**), ou d'acide indole-3-acétique (IAA, **Figure 17**), un membre de la famille des auxines, induit le développement de poils épidermiques et/ou le gonflement de la racine d'*A. thaliana* et de *T. versicolor* (Tomilov *et al.*, 2005). Les structures obtenues sont délocalisées et ne sont pas identiques à celles obtenues avec l'application d'HIFs. L'ajout d'inhibiteurs de l'efflux auxinique ou d'antagonistes à l'auxine induit une diminution de la formation d'haustorium en présence de DMBQ (Tomilov *et al.*, 2005). Une analyse transcriptomique a montré que l'auxine présente un rôle essentiel dans la formation de l'haustorium chez l'hémiparasite *S. album* (Zhang *et al.*, 2015). Une autre

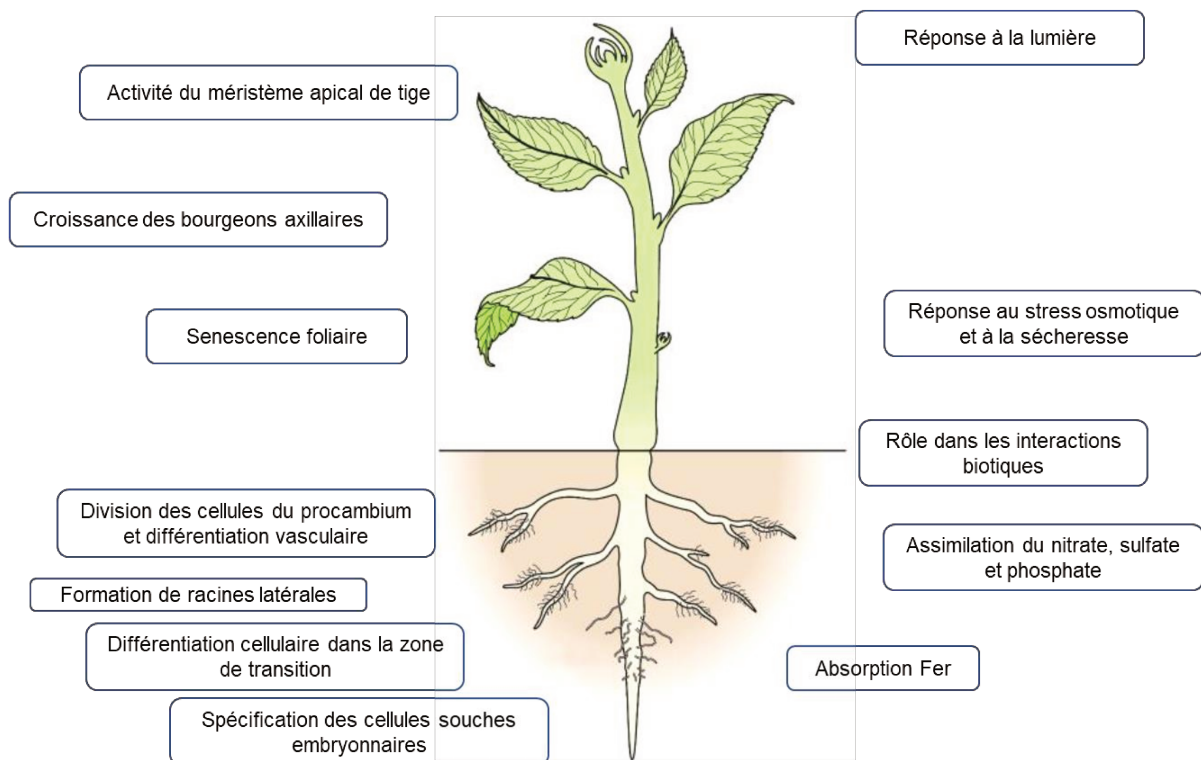
étude menée sur l'implication de l'auxine lors de la formation de l'haustorium chez *P. japonicum* a montré que l'inactivation du gène *YUC3* codant pour la flavine monooxygénase YUCCA impliquée dans la biosynthèse de l'auxine induit une diminution de la fréquence de formation d'haustoriums (Ishida *et al.*, 2016). L'auxine présente donc un rôle important dans la formation de l'haustorium chez les hémiparasites facultatifs (Tomilov *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2015). L'ajout d'auxine n'induit pas la formation d'haustorium chez les parasites obligatoires tels que *S. asiatica* et *P. ramosa* (Keyes *et al.*, 2000; Goyet *et al.*, 2017).



**Figure 17 : Structure de l'acide indole-3-acétique (IAA) et de l'éthylène.**

L'acide indole-3-acétique (A) et l'éthylène (B) sont des molécules inductrices de l'haustoriogenèse chez l'hémiparasite *T. versicolor* (Tomilov *et al.*, 2005).

Les cytokinines (CKs) sont impliquées dans la croissance et le phénotype racinaire des plantes en favorisant la ramification des racines (**Figure 18**). Elles ont également un rôle important dans la morphogénèse et dans l'activité des méristèmes (Werner *et al.*, 2001; Werner and Schmülling, 2009). Il a été montré que l'haustoriogénèse pouvait être induite par des CKs chez les plantes parasites obligatoires tels que *P. ramosa* et *T. versicolor* (Keyes *et al.*, 2000; Goyet *et al.*, 2017). De faibles concentrations en kinétine, une CK synthétique, induisent la formation d'haustorium chez *S. asiatica* (Keyes *et al.*, 2000). De plus les CKs présentent une fenêtre précise de concentrations induisant la formation de l'haustorium. Cette gamme de concentrations active varie selon les CKs. Une concentration trop forte en CKs inhibe la formation de l'haustorium de *P. ramosa* (Goyet *et al.*, 2017). L'intensité de l'activité inductrice de l'haustoriogénèse varie donc selon les CKs appliquées.



**Figure 18 : Exemples de rôles des cytokinines chez les plantes (d'après Werner and Schmülling, 2009).**

Les cytokinines jouent un rôle dans une multitude de processus biologiques intrinsèques à la plante tels que la germination, la croissance foliaire et racinaire mais aussi dans des processus de réponse à des facteurs environnementaux tels que la lumière.

Ainsi, ces phytohormones sont naturellement présentes dans les plantes et participent à l'induction haustoriale des plantes parasites. Les cytokinines sont les seuls HIFs connus à ce jour chez les holoparasites.

### III. Les méthodes de lutttes contre les orobanches

Les plantes parasites telles que *P. ramosa* et *O. cumana* sont actuellement un problème majeur pour les cultures à intérêt agronomique (Parker, 2009). Les graines de petites tailles produites en grande quantité par les orobanches sont facilement dispersées par le vent, l'eau, les animaux, les machines agricoles et les lots de semences contaminées (Sallé and Aber, 1986; Parker and Riches, 1993), entraînant une propagation rapide entre parcelles. Les particularités de développement des plantes parasites n'ont pas permis de développer des moyens de lutte efficaces et durables. Il existe cependant plusieurs méthodes de lutte avec des efficacités variables : l'utilisation d'hôtes résistants, la mise en place de pratiques culturales visant à diminuer leur propagation et leur multiplication ainsi que l'utilisation de méthodes de lutte chimiques ou de biocontrôles (Joel, 2000; Fernández-Aparicio *et al.*, 2011, 2016).

#### A. Les pratiques culturales

La rotation des cultures est très répandue dans la lutte contre les adventices (Liebman and Dyck, 1993). Cette pratique culturale s'avère cependant inefficace dans la lutte contre les adventices parasites. En effet, des holoparasites tels que *P. ramosa* possèdent dans leur spectre d'hôtes des plantes adventices en plus de plantes à intérêts agronomiques (Gibot-Leclerc *et al.*, 2003). Ces plantes adventices agissant comme des hôtes entraînent ainsi un renouvellement du stock grainier dans le sol et l'augmentation de l'infestation des parcelles en absence de culture. De plus, les graines de plantes parasites restent en dormance plus de 20 ans dans le sol en absence de plante hôte, ce qui implique l'abandon des parcelles pour la culture potentiellement hôte lorsque ces dernières sont fortement infestées. Ce fut le cas au Soudan et en Éthiopie où des cultures et des champs ont dû être abandonnés à cause d'une infestation trop importante de *P. ramosa* sur les cultures de tomates (Parker, 2009).

L'utilisation de plantes appelées « faux hôtes » permet d'induire la germination dite « suicide » des plantes parasites tout en empêchant leur fixation (Rubiales *et al.*, 2009; Fernández-Aparicio *et al.*, 2016), aboutissant à la mort des graines germées (Gibot-Leclerc *et al.*, 2003). Une étude a par exemple montré que l'utilisation de « faux hôtes » tels que le maïs et le haricot dans la rotation de culture permettait de diminuer de plus de 70% le stock grainier de *P. ramosa* et ainsi d'augmenter les rendements des cultures de tomates en Éthiopie (Abebe *et al.*, 2005). L'utilisation de plantes pièges permet également de diminuer le stock grainier dans le sol (Rubiales *et al.*, 2009; Fernández-Aparicio *et al.*, 2016). Cette méthode consiste à utiliser des cultures fortement sensibles aux plantes parasites afin de les détruire une fois la fixation établie pour diminuer la quantité de graines dans le sol tout en empêchant la formation de

nouvelles graines. L'utilisation de navette (*Brassica campestris* var. *toria*) comme plante piège a par exemple permis de diminuer le stock grainier d'*O. aegyptiaca* de 30% (Acharya *et al.*, 2002). Même si ces méthodes permettent de diminuer la quantité de graines dans le sol, le stock grainier étant très important (Parker and Riches, 1993; Kebreab and Murdoch, 2001), elles ne permettent pas de détruire la totalité des graines du parasite.

Un arrachage manuel des hampes d'orobanches peut être réalisé avant fructification pour diminuer le stock grainier. Cette méthode ne permet pas d'empêcher les dommages sur les cultures car ils se produisent avant l'émergence de la plante parasite et elle n'est efficace que partiellement et après seulement plusieurs saisons (Ransom, 2000).

## B. Les méthodes chimiques

La germination suicide peut également être induite par traitement du sol avec des stimulants de germination synthétiques comme le GR7, un analogue synthétique des strigolactones (Johnson *et al.*, 1981). Cette technique n'est pas utilisée à cause de l'instabilité de ce composé ainsi que d'un problème d'optimisation de formulation (Johnson *et al.*, 1981; Fernández-Aparicio *et al.*, 2016). Le Nijmegen-1, un autre analogue synthétique des strigolactones induisant la germination de *P. ramosa*, a été testé comme agent de germination suicide sur des champs de tabac infestés. L'application de cet analogue en champs permet de réduire le stock grainier d'orobanche dans le sol (Zwanenburg *et al.*, 2009). Cette méthode de lutte est peu efficace en raison de la quantité de graines très importante dans le sol.

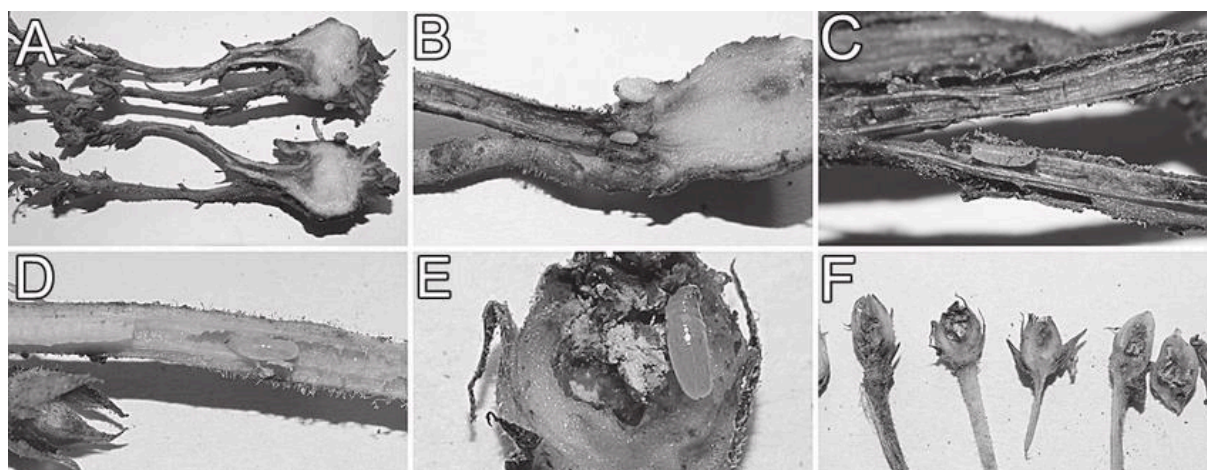
Des traitements chimiques tels que ceux à base de Benzothiadiazole (BTH) permettent de limiter l'attachement de la plante parasite et de retarder le développement des tubercules (Pérez-de-Luque *et al.*, 2004). Cette molécule induit l'activation de la résistance systémique acquise (SAR) chez la plante hôte (Sauerborn *et al.*, 2002; Véronési *et al.*, 2009). Cependant l'apparition de symptômes tardifs sur la plante hôte (Gibot-Leclerc *et al.*, 2012) ne permet pas d'effectuer un traitement adapté de manière précoce.

L'utilisation d'herbicide reste complexe. En effet, la plante parasite émerge du sol une fois la plante hôte en culture, il est nécessaire d'utiliser des herbicides sélectifs pour ne pas détruire la culture en place. Des lignées de tournesols résistant aux herbicides telles que les imidazolinones ont été développées et commercialisées permettant de détruire le parasite sans affecter la plante hôte (Parker, 2009).

D'autres méthodes existent telles que le traitement des sols par fumigation ou encore l'application de toxines microbiennes mais elles restent peu utilisées car trop coûteuses et polluantes pour la première et peu efficace pour la deuxième (Fernández-Aparicio *et al.*, 2016).

## C. Les biocontrôles

Des insectes peuvent être utilisés comme biocontrôle. C'est le cas de *Phytomyza orobanchia* avec les orobanches. En effet, les larves de cet insecte vont se nourrir des tubercules, des tiges et des capsules des orobanches (**Figure 19**) entraînant une forte réduction de la production de graines. Cette méthode de lutte est difficile à mettre en place puisqu'elle nécessite une forte quantité de ces insectes et le maintien de la population dans le champ. Les pratiques culturales comme l'utilisation d'insecticide servant à préserver les cultures d'autres insectes ravageurs, la présence d'ennemis naturels de ces insectes ou encore les changements de température liés au climat rendent difficile le maintien d'une population stable de ces insectes. Il a par exemple été montré que l'efficacité de ce biocontrôle est fortement réduite à basses températures (Klein and Kroschel, 2002).



**Figure 19** : Larves de *Phytomyza orobanchia* parasitant les tubercules (A, B), les tiges (C, D) et les ovaire avec graines (E, F) de *P. ramosa* (Piwowarczyk *et al.*, 2018).

Des études ont montré que *Fusarium oxysporum* f.sp *orthoceras* pouvait être utilisé comme agent de biocontrôle des orobanches. Ce champignon présente un effet inhibiteur d'*O. cumana* sans impacter le développement de la plante hôte, le tournesol, ni le développement d'autres plantes de cultures telles que le blé, la tomate, le maïs, le tabac et la carotte (Bedi, 1994; Kakhaki *et al.*, 2017). L'utilisation de souches pathogènes telles que *F. oxysporum* reste cependant limitée car elle implique la dispersion d'un agent hautement pathogène pour d'autres cultures.

## D. La création et l'utilisation de lignées résistantes

La résistance du tournesol à *O. cumana* a été observée puis utilisée en Russie au 20<sup>ème</sup> siècle afin de générer des accessions résistantes (Parker, 2012; Ruiz *et al.*, 2015). Il existe en fait plusieurs types de résistance chez l'hôte agissant à différents stades du développement du parasite (Irving and Cameron, 2009; Fernández-Aparicio *et al.*, 2016) :

- La première consiste à agir sur la germination (Labrousse *et al.*, 2001) soit en diminuant la quantité de stimulant émis par la plante hôte, soit en produisant des molécules inhibitrices par la plante hôte (Serghini *et al.*, 2001; Irving and Cameron, 2009). La résistance de certaines accessions de fève vis-à-vis des plantes holoparasites des genres *Orobancha* et *Phelipanche* a été corrélée à une production de SLs moins importante (Fernández-Aparicio *et al.*, 2014).
- La deuxième consiste à empêcher l'attachement du parasite (Irving and Cameron, 2009). La mise en place de mécanismes de défense physique chez la plante hôte lors de la perception du parasite permettent de limiter l'attachement de la plante parasite à l'hôte. En effet, une lignification de l'endoderme et du péricycle de la racine de l'hôte empêchant la pénétration de la plante parasite a été observée chez des légumineuses en présence d'*O. crenata* (Pérez-de-Luque *et al.*, 2005). Une étude a montré qu'une résistance à *O. cumana* chez le tournesol était associée au gène *HaOR7* qui code pour un récepteur de type kinase. Ce récepteur reconnaît une protéine d'*O. cumana*, AvrOR7, induisant une résistance consistant à empêcher la connexion au système vasculaire de l'hôte (Duriez *et al.*, 2019).
- La troisième consiste à stopper le parasite après attachement. La plante hôte peut induire la nécrose du parasite post attachement (Labrousse *et al.*, 2001; Irving and Cameron, 2009). Cette nécrose peut être causée par l'occlusion des vaisseaux conducteurs de la plante parasite (Pérez-de-Luque *et al.*, 2005), mais aussi par désorganisation cellulaire de l'haustorium (Labrousse *et al.*, 2001). La plante hôte peut former une capsule autour du parasite dans la racine afin de l'isoler et de provoquer sa mort (Labrousse *et al.*, 2001; Cameron *et al.*, 2006). Elle peut également produire des molécules de défense induisant la nécrose des plantes parasites comme cela a été montré chez le tournesol lors de l'infestation par *O. cumana* (Letousey *et al.*, 2007; de Zélicourt *et al.*, 2007). En effet, une augmentation de l'expression du gène *HaDef1* codant une défensine est observée quelques jours après la fixation d'*O. cumana* sur les racines du tournesol. Cette augmentation de la production de défensine est observée chez les tournesols résistants et elle coïncide avec la nécrose des tubercules.

Si l'utilisation d'hôtes résistants est la méthode de lutte la plus employée, elle reste cependant limitée. En effet, la création de nouvelles variétés de plantes de cultures présentant une résistance vis-à-vis des plantes parasites est longue et difficile (Parker, 2012). Chez certaines plantes de grande culture, aucune résistance n'a été identifiée. De plus, les résistances sont rapidement contournées avec l'apparition de nouvelles races de plantes parasites de plus en plus virulentes. Ce fût par exemple le cas en 2000 avec l'apparition d'une race d'*O. cumana* ayant contourné les gènes de résistance *Or1* à *Or5* chez le tournesol (Fernández-Martínez *et al.*, 2000).

Globalement, les méthodes de luttés utilisées individuellement ne sont pas efficaces. Une approche intégrée est actuellement la solution recommandée (Pérez-de-Luque *et al.*, 2010). L'utilisation d'herbicides étant de plus en plus controversée (plan Écophyto 2+ publié en 2018 visant à diminuer de 25% l'utilisation de produits phytosanitaires d'ici 2020 et de 50% d'ici 2025 en France (<https://agriculture.gouv.fr/le-plan-ecophyto-quest-ce-que-cest>)) sous-tend la nécessité de développer d'autres méthodes de lutte plus efficaces et durables.

Une nouvelle approche de type biocontrôle, qui fait l'objet de ce travail de thèse, consiste en l'utilisation d'une nouvelle classe de peptides régulateurs appelés miPEP (miRNA-encoded peptide) découverts en 2015 (Lauressergues *et al.*, 2015). En effet, il a été montré que l'ajout exogène de miPEP synthétiques spécifiques à la plante permet de moduler des processus biologiques précis en agissant sur l'expression de miARN et donc sur l'expression de leurs gènes cibles (Lauressergues *et al.*, 2015; Couzigou *et al.*, 2016; Ormancey *et al.*, 2020).

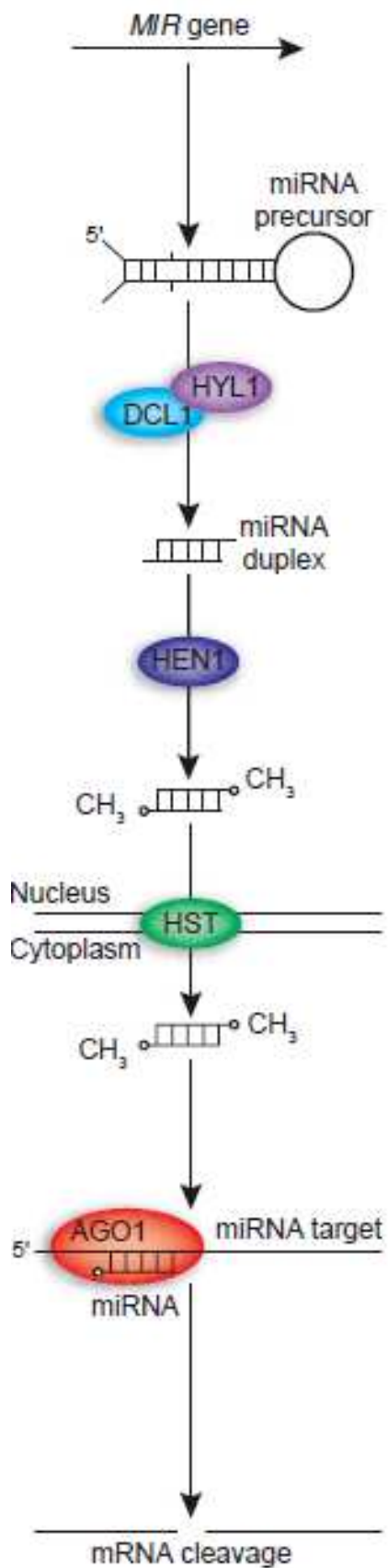


Figure 20 : Schéma simplifié de la biosynthèse des miARN (Mallory and Vaucheret, 2006).

## IV. Les miARN et les miPEP (miRNA-encoded PEPTides)

Les microARNs (miARN) sont des acteurs essentiels de nombreux processus biologiques, agissant sur l'expression de gènes codant pour des protéines de réponse au stress ou des facteurs de transcription impactant le développement, la croissance et la physiologie des plantes (Xie *et al.*, 2005; Mallory and Vaucheret, 2006; Rogers and Chen, 2013; Li *et al.*, 2017).

### A. Les miARN : synthèse, mode d'action et rôle chez les plantes

#### 1. La voie de synthèse

Les miARN sont de petites molécules régulatrices d'ARN de 20 à 24 nucléotides issues de l'expression de gènes *MIR* (Reinhart *et al.*, 2002; Rogers and Chen, 2013). Les gènes *MIR* sont transcrits par une ARN polymérase II (Pol II) en pri-miARN stabilisés par ajout d'une coiffe 7-méthylguanosine à l'extrémité 5' et d'une queue polyadénylée en 3' (Garneau *et al.*, 2007; Rogers and Chen, 2013; Xie *et al.*, 2005). Les miARN possèdent une complémentarité partielle avec une séquence en général proche, entraînant une forme en tête d'épingle de taille variable chez les plantes, entre 50 et 200 nt, mais globalement plus grande que chez les animaux pour lesquels elle est d'environ 70 nt (**Figure 20**, Bartel, 2004; Reinhart *et al.*, 2002).

Les pri-miARN sont maturés en pré-miARN grâce à un complexe protéique contenant notamment une RNase III endonucléase nommée Dicer-like 1 (DCL1, Park *et al.*, 2002; Reinhart *et al.*, 2002), qui clive les parties (bras) 5' et 3' de la boucle. Les pre-miARN sont ensuite maturés en duplex miARN 3p et miARN 5p par clivage de la boucle (Kurihara and Watanabe, 2004). DCL1 agit avec de nombreux partenaires dont HYL1, une protéine liant un dsARN, « double-strand RNA », et SERRATE (SE), une « zinc finger protein » (Han *et al.*, 2004; Chen, 2009; Wang *et al.*, 2019). HYL1 est nécessaire à l'efficacité et à la précision d'action de la DCL1 chez les plantes (Kurihara *et al.*, 2006). SE est nécessaire à la maturation du pri-miARN en miARN, en interagissant avec HYL1 (Yang *et al.*, 2006b; Lobbes *et al.*, 2006).

Le duplex miARN 3p et miARN 5p est ensuite méthylé aux extrémités 3' par une protéine méthyltransférase HEN1. Ces méthylations permettent la protection des ARNs contre les exonucléases ciblant les extrémités 3' des ARNs permettant ainsi d'accroître leur stabilité (Li *et al.*, 2005). Elles auraient aussi un rôle dans la reconnaissance du duplex par la protéine

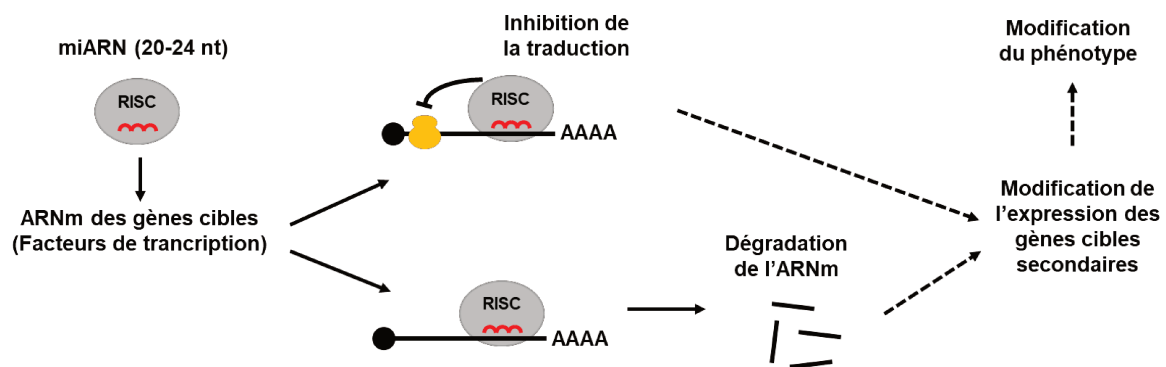
ARGONAUTE1 (AGO1) a activité endonucléase faisant partie du « RNA-induced silencing complex » (RISC), un complexe multiprotéique utilisant les miARN ou les siARNs (petits ARNs interférents) comme matrice pour reconnaître leur ARNm complémentaire (Zhang, 2013). Enfin, ces méthylations pourraient limiter l'utilisation des miARN comme amorces par la RdRP, « RNA dependent RNA polymerase », empêchant la génération d'ARN double brin (dsARN) à partir des ARNm (Yu *et al.*, 2005).

L'exportation du duplex ou du miARN mature dans le cytoplasme chez les plantes serait prise en charge par HASTY (HST), un orthologue d'un récepteur d'exportation nucléaire nommé Exportin 5 (Exp5) présent chez les animaux (Park *et al.*, 2005; Wahid *et al.*, 2010). Une fois exporté, le miARN est pris en charge par le RISC grâce à AGO1. Le miARN sert alors de guide pour cibler l'ARNm correspondant (Li and Zhang, 2016).

La régulation du niveau de miARN accumulés peut être causée par les mécanismes transcriptionnels tels que l'activation/répression par des facteurs de transcription, par remodelage de la chromatine ; mais aussi par des processus épigénétiques comme la modification des histones ou encore le niveau de méthylation de l'ADN. Le niveau de miARN peut également être modulé par des modifications post transcriptionnelles telles que la dégradation de leur précurseurs (Chen, 2009).

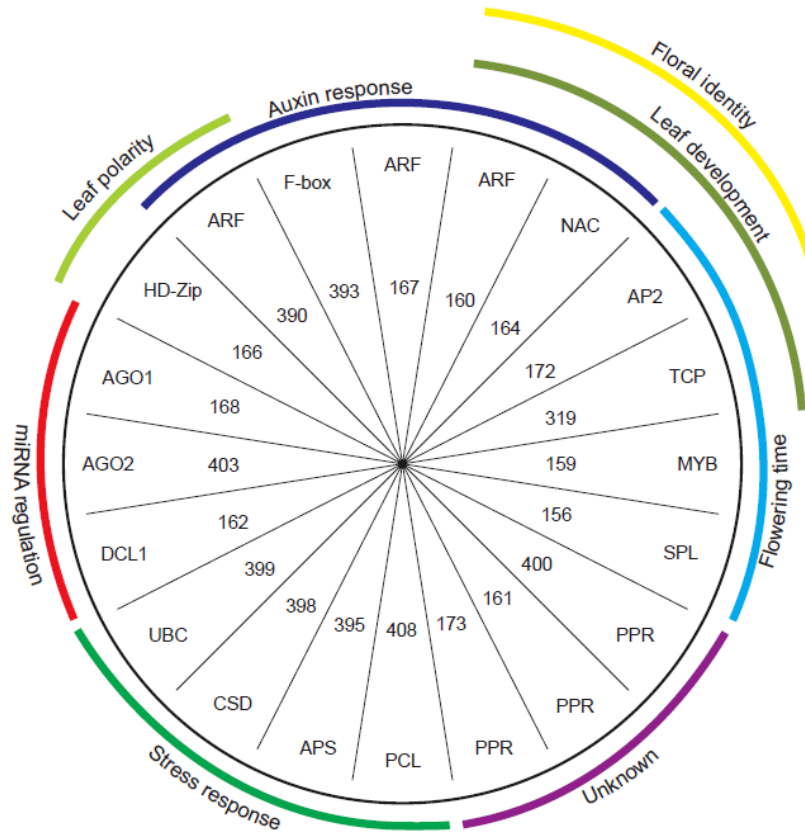
## 2. Mode d'action et rôle chez les plantes

L'ARNm ciblé par le RISC contenant le miARN est soit inhibé au niveau de sa traduction, soit dégradé (**Figure 21**). Chez les plantes, la voie d'action majoritaire des miARN est la dégradation des ARNm cibles (Mallory and Vaucheret, 2006). Les ARNm sont dégradés par le RISC grâce à l'activité endonucléase de AGO1 (Qi *et al.*, 2005; Baumberger and Baulcombe, 2005). La voie d'inhibition de la traduction des ARNm chez les plantes reste tout de même présente même si elle est minoritaire. C'est le cas du miR172 qui agit aussi en inhibant la traduction du gène *APETALA2* chez *A. thaliana* (Chen, 2004; Qi *et al.*, 2005). Les miARN de plantes ont la particularité d'être présents en familles. Ainsi, pour une famille donnée, il peut exister jusqu'à plusieurs dizaines de membres possédant quasiment tous la même séquence de miARN 5p et 3p, mais présents dans des unités transcriptionnelles distinctes et donc possédant une expression et une régulation distinctes.



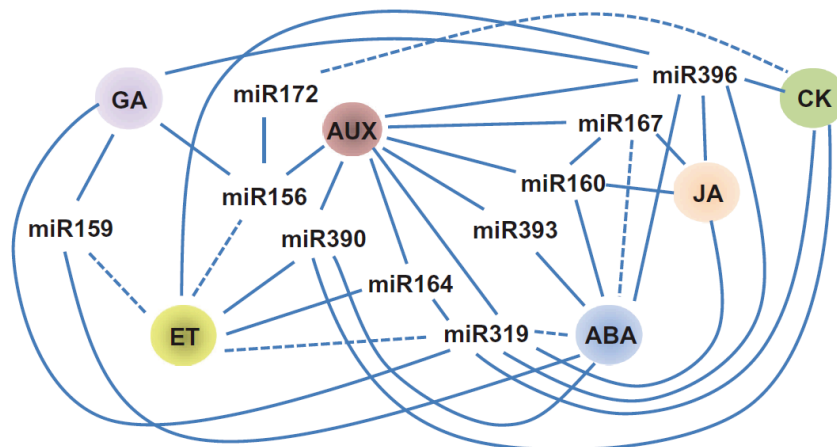
**Figure 21 : Mode d'action des miARN.**

Le miARN régule l'expression de gènes cibles en inhibant la traduction de l'ARNm cible ou en entraînant sa dégradation grâce à sa prise en charge par le RISC (RNA-induced silencing complex).



**Figure 22 : Gènes cibles de miARN et processus biologiques impliqués (Mallory and Vaucheret, 2006).**

Les miARN sont regroupés au centre du cercle avec leur gène cible sur le bord externe du cercle et les processus biologiques dans lesquels ils sont impliqués à l'extérieur (non exhaustif).

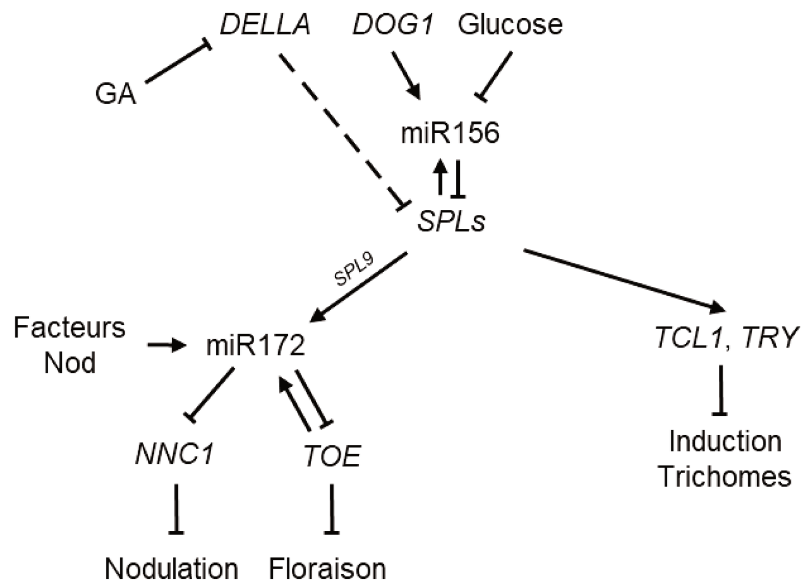


**Figure 23 : Rôle des miARN dans la régulation des phytohormones végétales (Curaba et al., 2014).**

Les miARN sont impliqués dans la régulation des phytohormones et donc dans la régulation des processus biologiques contrôlés par ces phytohormones. Les lignes pleines représentent les connexions moléculaires observées chez *A. thaliana*. Les lignes en pointillé représentent les connexions moléculaires observées chez d'autres plantes (*Medicago* et/ou la tomate). GA : Acide gibbéréllique, ET : éthylène, AUX : auxine, ABA : acide abscissique, JA : acide jasmonique et CK : cytokinine.

Les miARN ciblent majoritairement des gènes clés du développement et de la physiologie des plantes comme des facteurs de transcription, mais aussi des récepteurs hormonaux. Ils sont donc impliqués dans la plupart des processus biologique de la vie des plantes (**Figure 22**, Xie *et al.*, 2005; Mallory and Vaucheret, 2006; Chen, 2009; Li *et al.*, 2017; Bai *et al.*, 2017). Des miARN sont par exemple impliqués dans les processus d'imbibition (Li *et al.*, 2013) et de germination (Das *et al.*, 2015, 2018) des graines, de floraison (Achard *et al.*, 2004) et de prolifération cellulaire (Rodriguez *et al.*, 2016). Certains miARN sont étroitement liés aux phytohormones impliquées dans les transitions entre les différentes phases de développement des plantes (**Figure 23**) et leur expression est elle-même régulée par des phytohormones. Ils sont différenciellement exprimés en fonction du stade de développement de la plante et du tissu incriminé (Zhang *et al.*, 2005; Chen, 2009).

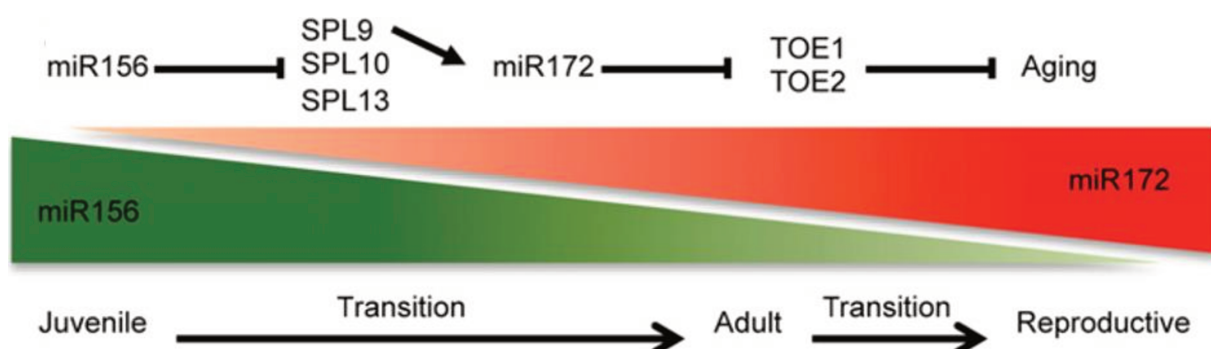
- Les miR156 ciblent des gènes *SQUAMOSA PROMOTER BINDING LIKEs* (*SPLs*, Rhoades *et al.*, 2002; Li and Zhang, 2016). Ils sont impliqués dans différents processus biologiques tels que la régulation de la dormance et de la transition florale (Huang *et al.*, 2013), mais aussi dans l'acquisition de la thermotolérance d'*A. thaliana* (Stief *et al.*, 2014) et dans l'inhibition de la maturation des graines (Nodine and Bartel, 2010; Tang *et al.*, 2012). Une surexpression des gènes *MIR156* favorise l'état de dormance des graines et entraîne un délai de floraison chez la laitue. L'état de dormance des graines est régulé par le gène *DELAY OF GERMINATION1* (*DOG1*) en réponse à des variations de température. L'expression de *DOG1* va entraîner l'augmentation des niveaux de miR156 (**Figure 24**) et une inhibition de la germination indépendamment de la voie de biosynthèse de l'ABA (Huo *et al.*, 2016). L'expression des miR156 peut être régulée par d'autres facteurs environnementaux tels que la disponibilité en nutriment. En effet, la présence de glucose exogène induit une répression de l'expression des gènes *MIR156* permettant le passage de la phase juvénile à la phase adulte (Yang *et al.*, 2013a). Les miR156 sont également impliqués dans le contrôle temporel de la formation des trichomes chez *A. thaliana* (Yu *et al.*, 2010). En effet, le gène *SPL9* cible du miR156, stimule l'expression des facteurs de transcription *MYB*: *TCL1* (*TRICHOMELESS1*) et *TRY* (*TRIPTYCHON*) qui sont des inhibiteurs de la formation de trichomes (**Figure 24**).



**Figure 24 : Représentation schématique des interactions entre les miR156, miR172, leurs régulateurs et leurs gènes cibles.**

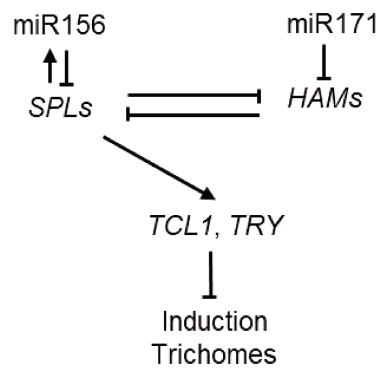
Les traits pleins avec une barre représentent une inhibition directe et les flèches une stimulation directe. Le trait en pointillé représente une inhibition indirecte par dimérisation.

- L'expression des *MIR172* est liée à celle des *MIR156*. En effet, les miR156 régulent négativement l'expression des *MIR172* via *SPL9* et *SPL10* (gènes cibles des miR156) qui stimulent directement l'expression du *MIR172* (**Figure 24, 25**, Wu *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2017). Une mutation du miR156 dans le site de reconnaissance de l'ARNm induit une accumulation de ses ARNm cibles ainsi qu'une stimulation de l'expression des *MIR172*. Ces deux miARN participent à la régulation de la dormance et de la floraison. Les miR156 et miR172 sont positivement régulés par leurs gènes cibles permettant la stabilité des phases juvéniles et adultes (Wu *et al.*, 2009). Une étude a montré que le GA régule la transition florale en induisant la dégradation des répresseurs de transcription *DELLAs*. Ces répresseurs de transcriptions se lient aux SPLs provoquant une diminution de l'expression des *MIR172*. Leur dégradation provoque ainsi une augmentation de la disponibilité des *SPLs* et donc des *MIR172* favorisant l'induction florale (**Figure 24**, Yu *et al.*, 2012). L'accumulation des miR172 entraîne un délai dans le développement des graines (Martin *et al.*, 2010b). Les miR172 inhibent l'expression des gènes *TARGET OF EAT 1 (TOE1)*, *TOE2* et *AP2-like* impliqués dans l'induction florale et du gène *NODULE NUMBER CONTROL1 (NNC1)* impliqué dans la formation de nodule (**Figure 24**). Les gènes *TOE1* et *TOE2* favorisent le maintien de l'identité épidermale juvénile (Wu *et al.*, 2009). Les miR172 sont également associés à la voie de signalisation des CKs (Curaba *et al.*, 2014; Bai *et al.*, 2017), mais aussi à la régulation de la formation des nodules chez le soja. En effet, les niveaux d'expression du miR172c sont stimulés par les facteurs Nod. Cette augmentation de l'expression du miR172c induit une diminution des gènes cibles dont fait partie le gène *NNC1*. Ainsi, une surexpression des *MIR172c* induit la formation de nodules en réponse à la présence de facteurs Nod (Wang *et al.*, 2014).



**Figure 25 : Rôles des miR156 et miR172 dans la transition de la phase juvénile à la phase adulte et de la phase végétative à la phase reproductive (Li *et al.*, 2017).**

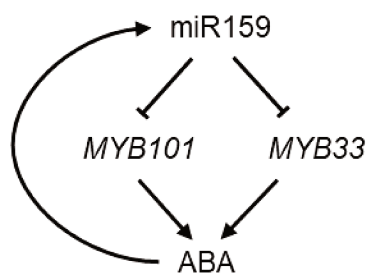
- Les gènes *SPLs*, interagissent avec des gènes *HAMs* (*HAIRY MERISTEM*) cibles des miR171 (**Figure 26**). Ces gènes sont impliqués dans la régulation du méristème et de la morphologie des feuilles chez la tomate (Hendelman *et al.*, 2016). Il a été montré qu'une surexpression des *MIR171* induit une diminution de la densité des trichomes (Xue *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2017). Les miR171 sont aussi impliqués dans les mécanismes de résistance au basses températures (Liu *et al.*, 2008; Lv *et al.*, 2010; Megha *et al.*, 2018).



**Figure 26 : Représentation schématique des interactions entre les miR156 et les miR171, ainsi que leur implication dans la formation des trichomes via l'interaction entre leurs gènes cibles (Li *et al.*, 2017).**

Les traits pleins avec une barre représentent une inhibition directe et les flèches une stimulation directe.

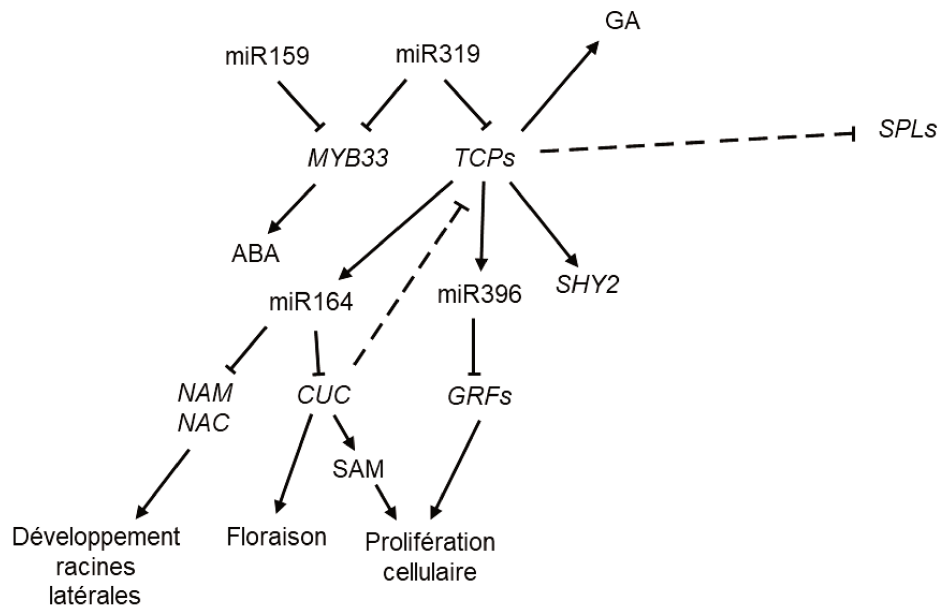
- Les miR159 ont pour gènes cibles les facteurs de transcription *MYB33*, *MYB65* et *MYB101* ((Reyes and Chua, 2007; Allen *et al.*, 2007). Ils sont par exemple impliqués dans le contrôle de la mort cellulaire programmée en interférant dans les voies de signalisation de l'ABA, des GAs et de l'ET (Martin *et al.*, 2010a; Curaba *et al.*, 2014). Les miR159 inhibent la croissance de la racine primaire chez *A. thaliana* via la répression des gènes *MYB33*, *MYB65* et *MYB101* (Xue *et al.*, 2017). Ils participent à la régulation du développement floral (Achard *et al.*, 2004). L'expression des *MIR159* est régulée par les GAs lors du développement floral. Une surexpression des *MIR159* induit une réduction du niveau d'expression du gène *LEAFY* entraînant un délai de floraison en photopériode de jours courts (Achard *et al.*, 2004). Les miR159 participent à la régulation du développement des anthères (Wang *et al.*, 2012). Ils sont également impliqués dans la dormance et la germination des graines d'*A. thaliana* (Reyes and Chua, 2007). L'ABA induit une accumulation des miR159. Cette accumulation provoque une inhibition des gènes *MYBs* entraînant une baisse de la sensibilité des plantes à l'ABA lors de la germination. Les gènes *MYB33* et *MYB101* sont des régulateurs positifs de la voie de signalisation de l'ABA durant la dormance et la germination des graines, les miR159 sont donc des régulateurs négatifs de cette voie de signalisation (**Figure 27**, Reyes and Chua, 2007; Martin *et al.*, 2010a).



**Figure 27 : Mode d'action des miR159 sur la voie de signalisation de l'ABA via leurs gènes cibles, MYB101 et MYB33.**

Les traits pleins avec une barre représentent une inhibition directe et les flèches une stimulation directe.

- Les miR319 présentent de fortes similarités de séquences avec les miR159 (Li *et al.*, 2013). Ces fortes similarités expliquent la présence de gènes cibles communs entre ces deux miARN. Ainsi les gènes *MYB33* sont des cibles des miR159 mais également des miR319 (**Figure 28**). En plus des gènes *MYBs*, les miR319 ciblent des facteurs de transcription *TEOSINTE BRANCHED1*, *CYCLOIDEA*, and *Proliferating Cell Factor (TCPs*, Bai *et al.*, 2017). Des travaux réalisés en 2013 ont montré l'implication des *TCPs* dans l'activité cytokinique stimulant la maturation des feuilles (Efroni *et al.*, 2013). Le facteur de transcription *TCP4* stimule l'expression des miR396 induisant une répression de la prolifération cellulaire (Schommer *et al.*, 2014) et une stimulation de la différenciation cellulaire (Sarvepalli and Nath, 2011). Une étude a montré l'implication de *TCP3* dans la stimulation de l'expression des gènes *MIR164*, *ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1)*, *INDOLE-3-ACETIC ACID3/SHORT HYPOCOTYL2 (IAA3/SHY2)* et *SMALL AUXIN UP RNA (SAUR*, **Figure 28**, Koyama *et al.*, 2010). Les miR319 sont ainsi impliqués dans les voies de régulation de la majorité des phytohormones (**Figure 23**, Curaba *et al.*, 2014). Une étude a montré leurs implications possibles dans la régulation de la voie de l'ET, dans la signalisation cytokinique et leurs potentielles associations à la voie de la JA lors du développement des graines et de la germination (Bai *et al.*, 2017). L'expression des miR319 est inhibée par l'éthylène, l'ABA et les CK mais est stimulée par l'acide jasmonique (JA) et l'auxine (Curaba *et al.*, 2014). Les miR319 sont également impliqués dans le développement des feuilles (Ori *et al.*, 2007) et des fleurs (Nag *et al.*, 2009), mais aussi dans les mécanismes de résistance aux stress abiotiques. Il a été montré qu'une surexpression des gènes *MIR319* favorise la tolérance à la sécheresse et au stress salin chez *Agrostis stolonifera* (Zhou *et al.*, 2013b). Ces miARN sont également impliqués dans la réponse au stress engendré par des températures basses (Kamthan *et al.*, 2015; Megha *et al.*, 2018). Cela a été montré chez *A. thaliana* (Liu *et al.*, 2008), le riz (Lv *et al.*, 2010) et la canne à sucre (Thiebaut *et al.*, 2012). Une surexpression du miR319 favorise la tolérance au froid chez le riz (Yang *et al.*, 2013b).



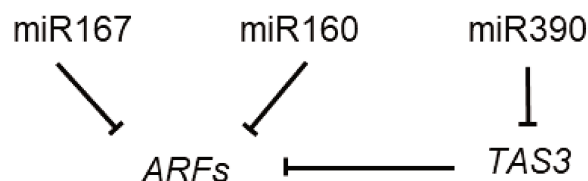
**Figure 28 : Représentation schématique de la voie de signalisation des miR319.**

Les traits pleins avec une barre représentent une inhibition directe et les flèches une stimulation directe. Les traits en pointillés représentent une inhibition indirecte par dimérisation.

- Les miR160 ciblent les gènes *Auxin response factor*, *ARF10*, *ARF16* et *ARF17* chez *A. thaliana* (Liu *et al.*, 2007). Ces miARN sont liés aux phytohormones. Par exemple, une surexpression des miR160 induit une hypersensibilité à l'auxine, une hyposensibilité à l'ABA et aux CKs ainsi qu'une inhibition du développement des nodules symbiotiques chez le soja (Turner *et al.*, 2013). L'hyposensibilité à l'ABA induite par la surexpression des miR160 a également été observée lors de la germination de graines d'*A. thaliana* (Liu *et al.*, 2007). Ces miARN sont essentiels au bon développement de la plante (Mallory *et al.*, 2005). Par exemple, l'inhibition du gène *ARF10* par les miR160 joue un rôle important dans le processus de germination d'*A. thaliana* (Liu *et al.*, 2007), dans la régulation de la formation de la coiffe racinaire (Wang *et al.*, 2005) et la formation de racines adventives avec un effet inhibiteur de l'*ARF17* (Gutierrez *et al.*, 2009).
- Les miR160 et miR165/166 interagissent pour réguler le développement des feuilles et la tolérance vis-à-vis de la sécheresse chez *A. thaliana* (Yang *et al.*, 2019). Ces deux familles de miARN ont un rôle opposé dans la régulation de ces deux mécanismes. En effet, les miR160 favorisent le développement des feuilles par l'action de gènes de signalisation auxinique alors que les miR165/166 favorisent la tolérance à la sécheresse impliquant la voie de signalisation de l'ABA (Yang *et al.*, 2019). Les miR165/166 ciblent des class III Homeodomain-leucine zipper (HD-ZIPIII) tels que les gènes *PHAVOLUTA* (*PHV*), *PHABULOSA* (*PHB*) et *REVOLUTA* (*REV*, Grigg *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2015). Une étude a montré l'implication des miR166 dans le développement des racines et des nodules chez *Medicago truncatula* (Boualem *et al.*, 2008). Une surexpression des miR166 induit une

réduction du nombre de racines latérales et de nodules symbiotiques ainsi qu'un développement anormal des faisceaux vasculaires (Boualem *et al.*, 2008). Les gènes *PHY* et *PHB* sont également impliqués dans la régulation du SAM (Shoot Apical Meristems) en stimulant son développement, dans la régulation du motif apical embryonnaire, de la formation du méristème de tige dans l'embryon, de la polarité des organes tels que les feuilles, du développement vasculaire et de la fonction des méristèmes (Prigge *et al.*, 2005; Itoh *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2015). Le gène *HB15* (*homeodomain leucine zipper*), cible des miR165/166, est sur-exprimé dans la région centrale de l'haustorium lors de son développement (Wakatake *et al.*, 2018). Des études ont montré que les miR165/166 sont régulés par AGO10 qui entre en compétition avec AGO1 pour se lier à ces miARN, empêchant ainsi l'action des miR165/166 sur leurs gènes cibles. Cette liaison induit l'augmentation de l'expression des gènes cibles et donc une stimulation le développement du SAM (Zhu *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2015).

- Les miR164 ciblent les gènes *CUC1/CUC2* (*CUP-SHAPED COTYLEDON*) et *NAC1* (*NAM/ATAF/CUC domain transcription family factor*), des facteurs de transcriptions impliqués dans le développement des racines notamment latérales, dans la régulation de la floraison et de la reproduction (**Figure 28**, Baker *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2005; Das *et al.*, 2015). Les miR164 sont également impliqués dans la régulation du SAM chez *A. thaliana* (Laufs *et al.*, 2004; Hibara *et al.*, 2006).
- Les miR167 ciblent les *ARF6* et *ARF8*. Ils sont impliqués dans la régulation du développement des racines latérales en stimulant leur formation (Gutierrez *et al.*, 2009) mais aussi dans la formation de nodules avec une action stimulatrice chez le soja (Wang *et al.*, 2015). Ce rôle dans le développement des racines est antagoniste à celui des miR160 et plus particulièrement de leur gène cible, *ARF17* (**Figure 29**, Gutierrez *et al.*, 2009). Les *ARF6* et *ARF8* sont impliqués dans la production de JA (Acide Jasmonique) et dans la maturation des fleurs permettant le passage de fleurs immatures à des fleurs matures et fertiles. (Nagpal *et al.*, 2005). L'expression des miR167 est contrôlée par la présence d'auxine exogène chez le riz (Yang *et al.*, 2006a), les miR167 sont donc liés à la voie de signalisation de l'auxine.



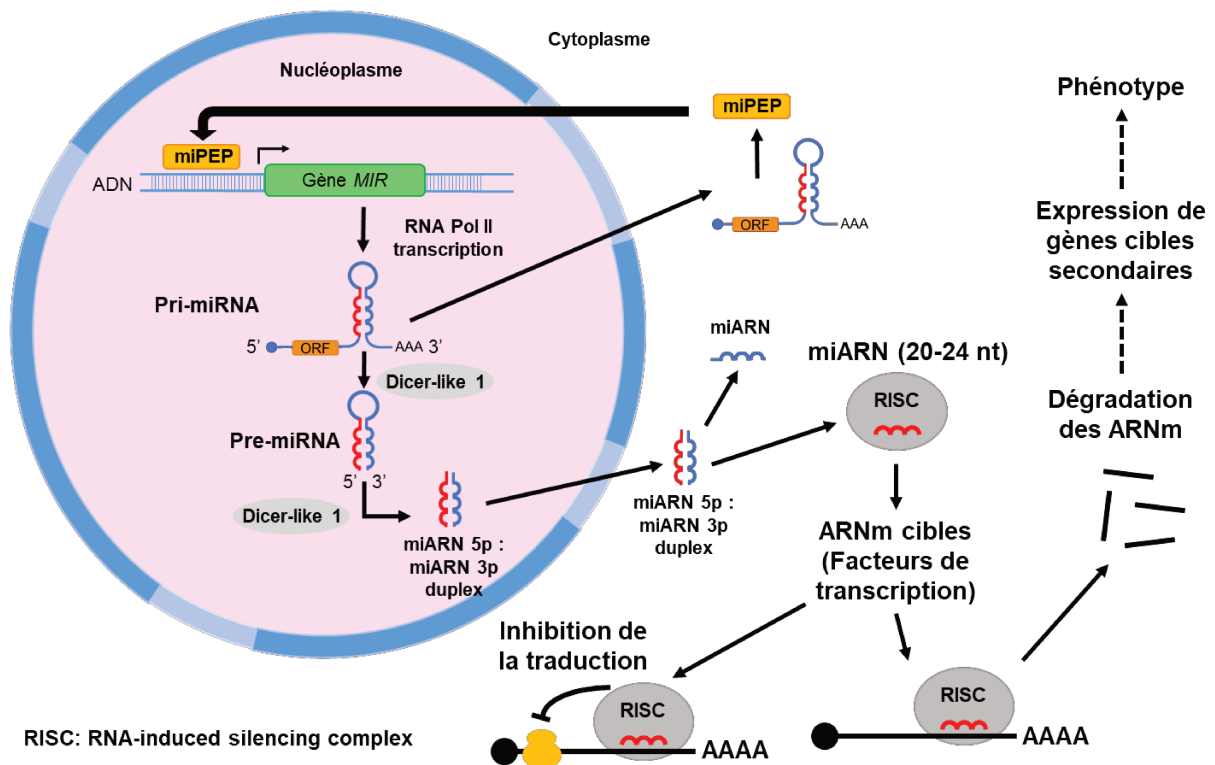
**Figure 29 : Interaction des miR160, miR167 et miR390 avec leurs gènes cibles.**

Les traits pleins avec une barre représentent une inhibition directe.

- Les miR168 ciblent le gène *AGO1* (Vaucheret *et al.*, 2006; Mishra *et al.*, 2019). Ils régulent la phase de transition florale, le développement des fruits et l'épinastie correspondant à la courbure des feuilles vers le bas, chez la tomate (Xian *et al.*, 2014). Les miR168 favorisent également la résistance à un stress biotique tel que l'infection de *Malus hupehensis* par le champignon pathogène *Botryosphaeria dothidea* (Yu *et al.*, 2017).
- Les miR169 ciblent des gènes *Nuclear transcription factor Y (NF-YA)*, Kamthan *et al.*, 2015). Ces miARN favorisent la tolérance à la sécheresse chez *Solanum lycopersicum* en diminuant l'expression des gènes *NF-YA1/2/3* (Zhang *et al.*, 2011). Le phénomène inverse est observé chez *A. thaliana* avec une diminution de la tolérance à la sécheresse lorsque les miR169 sont sur-exprimés et que leurs gènes cibles *NF-YA3/5* sont inhibés (Li *et al.*, 2008; Ni *et al.*, 2013). Ces réponses antagonistes des miR169 sur la tolérance à la sécheresse entre *A. thaliana* et *Solanum lycopersicum* montre un rôle espèce spécifique même si ces miARN sont conservés entre les différentes espèces (Kamthan *et al.*, 2015). Les *NF-YA* sont impliqués dans la gamétogénèse, l'embryogénèse et dans le développement des graines. Une surexpression de ces gènes induit la formation d'embryons somatiques à partir de tissus végétatifs ainsi qu'une hypersensibilité à l'ABA durant la germination (Mu *et al.*, 2013). Une surexpression des miR169 induit également un arrêt du développement des méristèmes ainsi qu'un retard dans la nodulation chez *Medicago truncatula* par inhibition du gène *HAP2-1*, un régulateur transcriptionnel de *NF-YA* (Comber *et al.*, 2006).
- Les miR390 ciblent des ARNs non codants *TAS3 (Trans-Acting siRNA)*, Axtell *et al.*, 2006) ciblant eux-mêmes les *ARF3* et *ARF4* (Allen *et al.*, 2005). Ces miARN sont impliqués par exemple dans la polarité foliaire (Garcia *et al.*, 2006), dans le contrôle de la morphologie des feuilles (Adenot *et al.*, 2006), mais également dans la régulation des motifs et la temporalité du développement végétatif des tiges (Fahlgren *et al.*, 2006).
- Les miR393 ciblent les gènes *Transport Inhibitor Response Protein 1 (TIR1)* et des *F-Box proteins (FB)* tels que les *Auxin signaling F-Box (AFB)*, Parry *et al.*, 2009). Ces miARN sont impliqués par exemple dans la résistance antibactérienne en inhibant la signalisation auxinique via l'inhibition de l'expression de *TIR1* et de *AFB*, des récepteurs auxiniques (Navarro *et al.*, 2006). Ils sont également impliqués dans l'inclinaison des feuilles mais aussi dans la croissance de la racine primaire et des racines secondaires chez le riz (Bian *et al.*, 2012). Les miR393 sont des régulateurs négatifs de la mycorhization chez *Solanum lycopersicum*, *Medicago truncatula* et *Oryza sativa* en bloquant la perception de l'auxine dans les cellules arbusculaires (Etemadi *et al.*, 2014).

- Les mi394 ciblent des gènes *LEAF CURLING RESPONSIVENESS (LCR)* impliqués dans la régulation du développement de la plante et des réponses aux stress notamment biotiques. En effet, une surexpression des mR394 induit une augmentation de la sensibilité d'*A. thaliana* à *Botrytis cinerea* (Tian *et al.*, 2018).
- Les miR395 ciblent les gènes *APS1*, *APS3*, *APS4* et *SULTR* qui sont impliqués dans l'assimilation et le transport du sulfate (Kim *et al.*, 2010; Das *et al.*, 2015). Ces miARN régulent la germination en condition de stress. Une étude a montré des effets antagonistes de deux membres de la famille des miR395 lors de stress abiotiques chez *A. thaliana*. En effet, le miR395c retarde la germination des graines en condition de déshydratation ou de stress salins, alors que le miR395e l'accélère (Kim *et al.*, 2010). Ce différentiel de réponse s'explique par la présence d'un nucléotide différent dans les séquences de ces miARN entraînant la non-reconnaissance des gènes *APS1* et *APS4* par le miR395e. Ces deux gènes sont donc impliqués dans le processus de germination chez *A. thaliana*.
- Les miR396 régulent la prolifération cellulaire et la taille des méristèmes par l'intermédiaire de leurs cibles, les *Growth Regulating Factor (GRF)*, (Rodriguez *et al.*, 2010). *GRF1* et *GRF2* vont stimuler la division cellulaire et donc la croissance des feuilles chez *A. thaliana* (Kim *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2011). Une surexpression des miR396 induit une diminution de l'expression des gènes *GRFs* conduisant à une réduction de la taille des feuilles d'*A. thaliana* (Liu *et al.*, 2009b). Ces miARN sont également impliqués dans la formation des fleurs chez le riz (Liu *et al.*, 2014) et dans la voie de réponse aux CKs (Curaba *et al.*, 2014).

Cet exposé non exhaustif des nombreuses actions des miARN et de leurs interconnexions sous-tend que ces acteurs cellulaires sont impliqués dans une multitude de processus biologiques chez les végétaux.

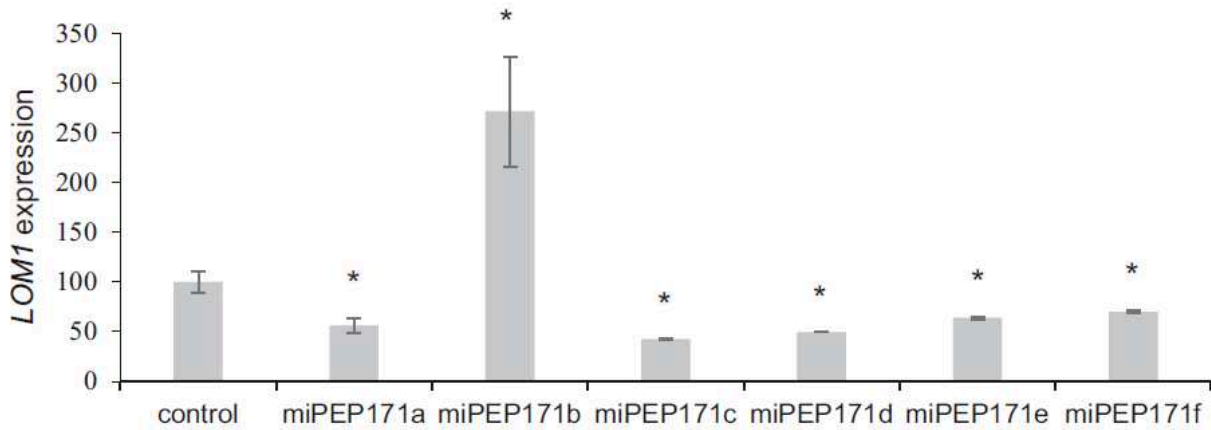


**Figure 30 : Voie de biosynthèse des miARN et des miPEP.**

Les miPEP sont produits à partir d'ORFs présents sur un précurseur du miARN, le pri-miARN. Ils stimulent la transcription de leurs propres précurseurs et donc des miARN associés. Cette stimulation induit une inhibition plus importante des gènes cibles de ces miARN (Couzigou *et al.*, 2015; Laressergues *et al.*, 2015).

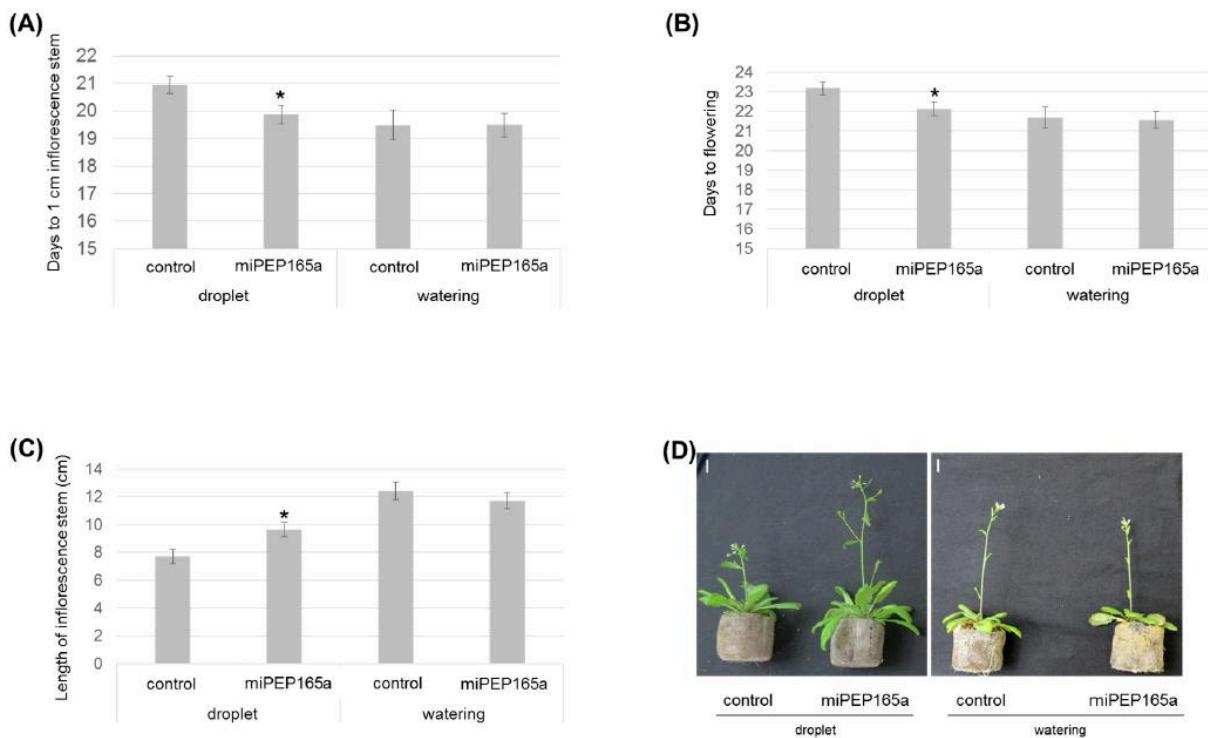
## B. Les miPEP : origine et mode d'action

Une nouvelle classe de peptides régulateurs, les miPEP (miRNA-encoded peptide), a été découverte en 2015 (Laurel *et al.*, 2015; Waterhouse and Hellens, 2015). Chaque miPEP est spécifique d'un miARN et d'une espèce car il est produit à partir de régions non conservées de l'ADN, les ORFs (Open Reading Frame), présents sur le bras 5' du pri-miARN, en amont du miARN (**Figure 30**). Les miPEP, d'une longueur de 3 à 60 acides aminés, stimulent la transcription de leurs propres transcrits primaires (pri-miARN) à partir des gènes *MIR*, entraînant une surexpression du miARN correspondant. Les miPEP induisent donc une régulation négative des gènes cibles spécifiques de leur miARN. Cette régulation moléculaire naturelle de l'expression génique peut être copiée en utilisant des miPEP synthétiques. Ainsi, des étapes spécifiques du développement des plantes peuvent être perturbées temporairement par un traitement exogène avec les miPEP appropriés. Une étude a par exemple montré que l'application exogène du miPEP172c synthétique chez le soja entraîne une surexpression du miR172c et une répression de ses gènes cibles conduisant à une stimulation de la nodulation (Couzigou *et al.*, 2016). Il a aussi été montré que l'ajout du miPEP165a sur des racines d'*A. thaliana* induit une stimulation de la prolifération cellulaire entraînant une augmentation de la longueur de la racine primaire, une accélération de la floraison et une augmentation de la taille des inflorescences (Ormancey *et al.*, 2020). Une autre étude a mis en évidence l'importance du rôle du miPEP858a dans le contrôle de la voie des phénylpropanoïdes et dans le développement d'*A. thaliana* et plus particulièrement la stimulation dose-réponse de la croissance racinaire induite par ce miPEP (Sharma *et al.*, 2020).



**Figure 31 : Effets des miPEP de la famille du miR171 sur l'expression du gène *LOM1* (Couzigou *et al.*, 2017).**

L'expression relative de *LOM1* a été quantifiée par qRT-PCR dans les racines mycorhiziennes traitées avec du solvant (contrôle) ou avec 0,1 mM du miPEP correspondant. L'ajout du miPEP171b induit une augmentation de l'expression du gène *LOM1* contrairement aux autres membres de la famille du miR171 qui induisent une diminution de l'expression de ce gène.



**Figure 32 : Phénotypes de la tige foliaire en réponse au traitement avec le miPEP165a chez *A. thaliana* (Ormancey *et al.*, 2020).**

Les plantes ont été traitées trois fois par semaine soit avec 100  $\mu$ M du miPEP165a au niveau du méristème apicale, soit avec 10  $\mu$ M de miPEP165a par arrosage. La condition contrôle correspond à un traitement avec de l'eau. La vitesse de développement de la tige est caractérisée par le nombre de jours nécessaires pour que la tige florale atteigne 1 cm (A) et pour que les premières fleurs apparaissent (B). Le développement de la tige florale est caractérisé par une mesure de sa taille 24 jours après semis (C). Les plantes traitées avec le miPEP165a au niveau du méristème floral montre une augmentation de la taille de la tige florale contrairement au traitement par arrosage avec ce miPEP. Cela montre l'absence de circulation du miPEP165a entre les parties racinaires et aériennes de la plante.

Les miPEP peuvent également être utilisés comme outils dans l'étude des mécanismes moléculaires sans passer par la transformation de plantes qui reste une procédure contraignante notamment chez les plantes non modèles telles que les plantes parasites. Ils peuvent par exemple être utilisés pour déterminer le rôle d'un membre spécifique d'une famille de miARN. Une étude a en effet montré que l'utilisation d'un miPEP spécifique au miR171b met en évidence sa fonction de protection du gène *LOM1* (*LOST MERISTEMS 1*) impliqué dans la formation de mycorhizes à arbuscules chez différentes espèces de plantes (Couzigou *et al.*, 2017). La surexpression du miR171b induite par l'ajout de son miPEP correspondant entraîne une surexpression de *LOM1* contrairement à tous les autres miPEP membres de la famille des miR171 (**Figure 31**). Il a été montré que le miR171b a perdu sa capacité de clivage de l'ARNm du gène *LOM1*. Son interaction avec l'ARNm entre en compétition avec celle des autres membres de la même famille protégeant ainsi ce gène de la dégradation.

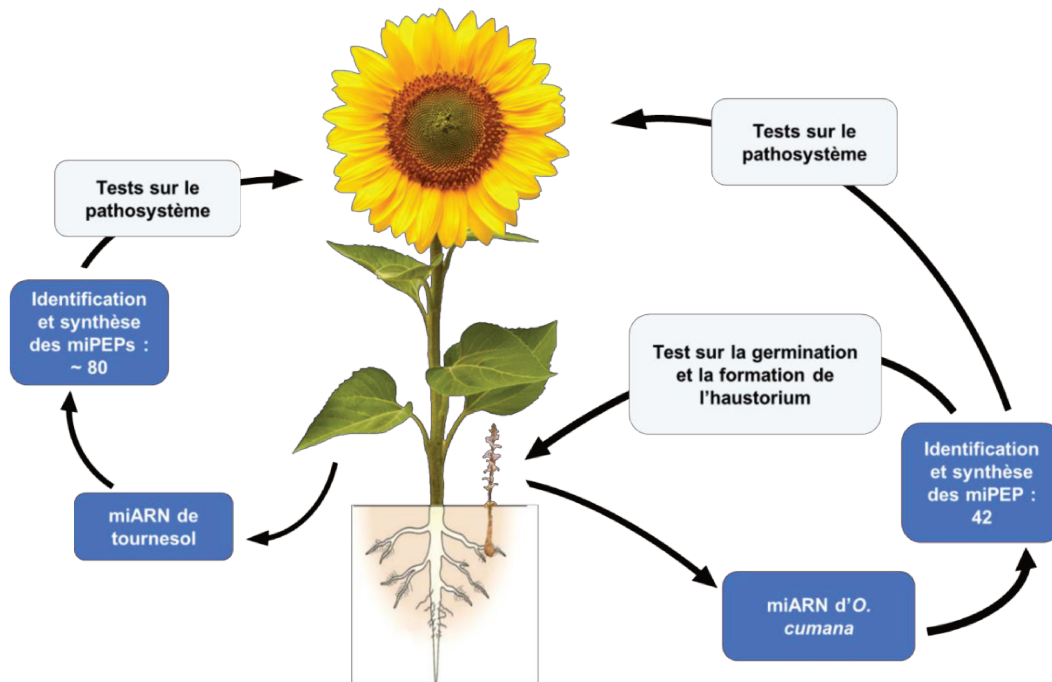
Plusieurs études ont montré que l'ajout exogène d'un miPEP synthétique induit la surexpression du miARN associé chez les plantes (Lauressergues *et al.*, 2015; Couzigou *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2020a; Chen *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2020) mais aussi chez l'humain (Niu *et al.*, 2020; Kang *et al.*, 2020). Une seule étude récente montre les mécanismes d'internalisation d'un miPEP dans la plante et plus précisément dans le noyau des cellules de l'organe concerné (Ormancey *et al.*, 2020). Cette étude montre que le miPEP165a chez *A. thaliana* est internalisé à la fois de manière passive au niveau de l'apex racinaire mais aussi par des processus associés à l'endocytose, notamment par la voie clathrine-dépendante et par l'implication de microdomaines membranaires associés à l'endocytose. L'ajout de ce miPEP au niveau de la racine ne montre pas d'effet sur la tige, il ne serait donc pas transporté entre les racines et les tiges (**Figure 32**). Ce résultat est confirmé par le marquage de ce miPEP avec le colorant fluorescent FAM montrant qu'il n'atteint pas le cylindre central de la racine, il semble bloqué par le péricycle.

Ainsi, des miPEP synthétiques et hautement spécifiques peuvent moduler des processus biologiques particuliers. Ils pourraient présenter un grand intérêt agronomique que ce soit comme biostimulant ou comme biocontrôle dans le cadre des interactions plante – plante parasite. Les miPEP présentent également un grand intérêt pour les études fonctionnelles permettant de s'affranchir par exemple des contraintes générées par la création de mutants. La transformation d'holoparasites tels qu'*O. cumana* et *P. ramosa* est complexe car il s'agit de pathogènes obligatoires. L'utilisation de miPEP est donc très intéressante dans l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans les phases clés de développement de ces plantes parasites.

## V. Problématique de recherche

Les plantes épirhizes holoparasites sont une problématique majeure pour de nombreuses cultures d'intérêt agronomique dans le monde (Parker, 2009). Un cycle de vie majoritairement souterrain et synchronisé avec celui de la plante hôte, et une grande quantité de graines produites avec une grande viabilité dans le sol, rendent le développement de moyens de lutte efficaces et durables contre ces pathogènes très difficile. La compréhension des mécanismes impliqués dans l'induction des phases clés du développement, la germination et l'haustoriogenèse, chez ces plantes parasites est donc essentielle au développement de moyens de lutte ciblés, efficaces et durables. Il existe actuellement peu d'outils pour étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans ces processus.

Ma thèse s'inscrit dans le projet ANR miPEPiTO (Utilisation de miPEP pour contrôler l'interaction Tournesol-Orobanche, ANR-16-CE20-0004). Ce projet regroupe les unités de recherche LIPM (Laboratoire Interaction Plantes Micro-organismes, UMR CNRS-INRA 2594/441, Toulouse), LRSV (Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, UMR 5546 UPS-CNRS, Toulouse), LBPV (Laboratoire de Biologie et de Pathologie Végétales, EA 1157 Université de Nantes) et l'entreprise Micropep Technologies (Toulouse) valorisant l'utilisation de miPEP. Les approches méthodologiques sont l'obtention des répertoires des miARN d'*O. cumana* et de tournesol, l'identification des miPEP correspondants, la synthèse de ceux-ci et leur application sur le pathosystème (**Figure 33**).



**Figure 33 : Déroulement et objectifs du projet miPEPiTO.**

Ce projet repose sur l'identification des miPEP de tournesol et d'*O. cumana* à partir leurs génomes respectifs. Le séquençage complet du génome d'*O. cumana*, non publié (S. Muñoz et P. Delavault) a permis l'identification des miARN et des miPEP par bio-informatique par le LRSV. Le test des miPEP de tournesol est effectué par le LIPM afin d'identifier ceux ayant un effet stimulateur des défenses du tournesol. Ma thèse porte sur l'identification de miPEP d'*O. cumana* ayant un effet sur l'orobanche et/ou sur le pathosystème.

Les objectifs de ce projet sont :

- Étudier le rôle des miARN dans la biologie du pathosystème *O. cumana*/tournesol en effectuant des traitements de miPEP d'*O. cumana* et/ou de tournesol.
- Identifier les miPEP ayant un effet sur le pathosystème soit négatif sur la croissance d'*O. cumana*, soit stimulant des défenses du tournesol dans le but de développer un agent de biocontrôle efficace et durable.

Ma thèse a consisté à cribler les miPEP issus du génome d'*O. cumana*, lors de la germination et l'haustoriogenèse de cette plante parasite, ainsi que sur le pathosystème. Quelques miARN correspondant aux miPEP présentant le plus d'effet lors de la germination d'*O. cumana* ont été identifiés chez une autre espèce de plante parasite, *P. ramosa*. Les miPEP correspondants ont ensuite été identifiés et testés par criblage sur les processus de germination et d'haustoriogenèse de cette *Phelipanche*. Parallèlement, l'expression des gènes cibles des miARN a été étudiée lors de la germination d'*O. cumana* afin d'identifier ceux présentant une régulation et donc étant impliqués dans ce processus.

Les miPEP d'*O. cumana* et de *P. ramosa* ayant le plus d'effet lors des étapes de germination et d'haustoriogenèse ont été sélectionnés afin de réaliser une caractérisation plus fine de leurs effets au niveau phénotypique et moléculaire. Ainsi, les miPEP issus des familles miR156, miR159, miR164, miR172, miR319 et miR396 ont été caractérisés de manière plus approfondie par une analyse de l'expression de leurs gènes cibles lors de la germination et/ou de l'haustoriogenèse après traitement ou non avec ces miPEP. Les effets des miPEP319 ont aussi été évalués lors de tests en co-culture *O. cumana*/tournesol.

Les travaux concernant l'haustoriogenèse ont été réalisés dans le cadre du stage de Master 2 Biologie Végétale « Plant Integrative Biology and Breeding » de Thibault ROUDAIRE : « Les miPEP peuvent-ils affecter la formation de l'haustorium des plantes holoparasites épiphyses ? », que j'ai encadré de janvier à juin 2019.





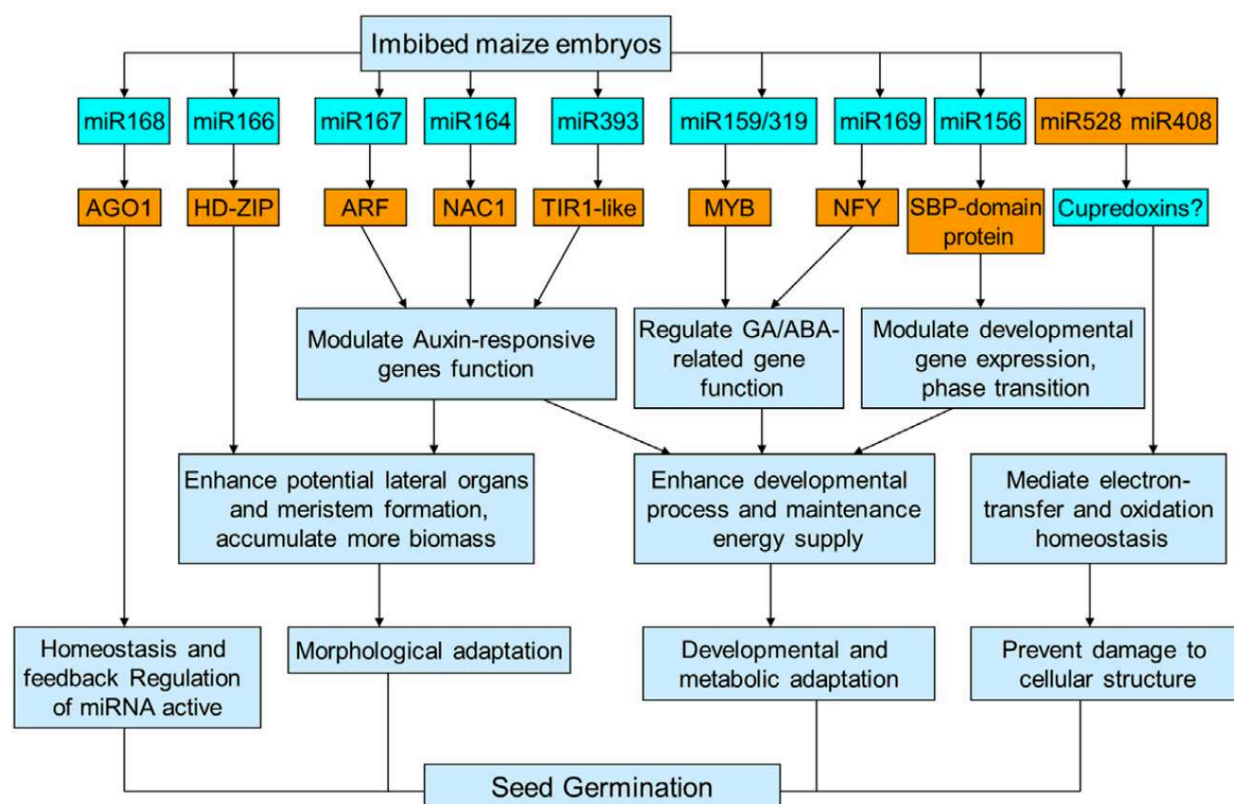
# Chapitre 1



# Chapitre 1 : Effet des miPEP lors des processus de germination et d'haustoriogenèse des orobanches

## I. Introduction

La germination et l'haustoriogenèse sont deux étapes clés du développement des plantes holoparasites épiphyses. La germination de ces plantes parasites doit se dérouler à proximité d'une plante hôte et leur fixation à celle-ci doit être réalisée rapidement pour permettre leur survie. Il a été montré que les miARN sont impliqués dans une multitude de processus biologiques comme la dormance et la germination du maïs (**Figure 1.1**, Li *et al.*, 2013).



**Figure 1.1 : Réseau de régulation potentiel des miARN dans les graines de maïs sèches et imbibées (Li *et al.*, 2013).**

Les cases turquoise et orange représentent respectivement des miARN et leurs gènes cibles sous-exprimés et sur-exprimés lors de l'imbibition des graines.

Parmi les miARN conservés, seuls les miARN de 16 familles ont été identifiés à partir du génome d'*O. cumana*. Il s'agit des miR156, miR159, miR160, miR164, miR165/166, miR167, miR168, miR169, miR171, miR172, miR319, miR390, miR393, miR394, miR395 et miR396. Chez *P. ramosa*, seuls les miARN de 4 familles correspondant à ceux présentant le plus d'effet lors du criblage sur la germination d'*O. cumana* ont été identifiés. Il s'agit des miR156, miR172, miR319 et miR396.

Les miARN étant impliqués dans une multitude de processus biologiques chez les végétaux, il est tentant d'anticiper qu'une modification de leur expression chez les plantes parasites pourrait permettre une modulation de deux processus clés de leur développement, la germination strigolactone-dépendante et l'haustoriogénèse, soit en les stimulant ou en les inhibant. Chez *O. cumana* et *P. ramosa*, l'ajout exogène de miPEP correspondants à ces miARN devrait donc permettre d'atteindre ces objectifs. Ces petits peptides pourraient être utilisés comme des outils dans des études fonctionnelles de l'expression de gènes et/ou comme des agents de biocontrôle. C'est dans cette optique qu'un criblage de leurs effets lors de la germination d'*O. cumana* et de *P. ramosa* a été réalisé. De ce que l'on connaît des modes d'actions des différents miARN, les familles de miPEP 156, 159, 160, 164, 165/166, 167, 172 et 395 semblent être de bons candidats pour moduler la germination des plantes parasites (Li *et al.*, 2013; Das *et al.*, 2015; Huo *et al.*, 2016; Bai *et al.*, 2017). Parallèlement, un suivi de l'expression des gènes cibles des miARN identifiés chez *O. cumana* a été réalisé lors de la germination afin de déterminer ceux potentiellement impliqués dans ce processus et de corrélérer ces résultats avec ceux obtenus lors du criblage phénotypique.

Des criblages de l'effet de miPEP sur le processus d'haustoriogénèse d'*O. cumana* et de *P. ramosa* ont ensuite été réalisés à partir des miPEP associés aux miR156, miR172, miR319 et miR396. Ces miPEP ont été sélectionnés car ils présentent les effets les plus forts lors de la germination d'*O. cumana* et de *P. ramosa*. De plus, 3 de ces familles de miARN, les miR172, miR319 et miR396, ont été identifiés dans la littérature comme liés à la voie des cytokinines (**Figure 23**, page 64 de l'introduction bibliographique, Curaba *et al.*, 2014). Or, l'implication des CKs dans l'induction haustoriale a été démontrée chez *P. ramosa* (Goyet *et al.*, 2017). Ces miPEP sont donc de bons candidats pour moduler le processus d'haustoriogénèse de ces plantes holoparasites.

## II. Matériels et méthodes

### A. Matériel végétal

Le lot de graines d'*O. cumana* Wallr. utilisées pour effectuer les expérimentations est le lot Oc49. Elles ont été récoltées en 2017 dans une parcelle de tournesol (*Helianthus annuus* L.) à Longeville (Vendée, France). Elles ont été tamisées et séparées en 5 fractions en fonction de leur taille. La fraction utilisée correspond aux graines dont la taille est comprise entre 200 et 224  $\mu\text{m}$ . La température optimale de germination des graines d'*O. cumana* est de 25 °C. À cette température, les concentrations en stimulants nécessaires à la germination de 50% des graines (EC50) sont de  $4,82 \cdot 10^{-9}$  M avec le *rac*-GR24 et de  $1,56 \cdot 10^{-9}$  M avec le DCL.

Les graines de *P. ramosa* (L) Pomel récoltées en 2014 dans une parcelle de colza (*Brassica napus* L.) à Saint Martin de Fraigneau (Vendée, France) composent le lot Pram119 utilisé pour effectuer les expérimentations. Ces graines ont été tamisées et divisées en 5 fractions, la fraction utilisée est celle dont la taille des graines est comprise entre 180 et 200  $\mu\text{m}$ . La température optimale de germination des graines de *P. ramosa* est de 21 °C. L'EC50 pour les graines de *P. ramosa* avec un traitement au *rac*-GR24 à 21 °C est de  $8,3 \cdot 10^{-11}$  M.

### B. Désinfection des graines et conditionnement

Les graines d'*O. cumana* sont désinfectées dans de l'hypochlorite de sodium 2,4% pendant 7 min sous agitation, suivi par 3 rinçages à l'eau distillée stérile pendant 30 secondes et 3 rinçages à l'eau distillée stérile pendant 5 min. Les graines sont ensuite amenées à une concentration de 10 mg par mL de milieu d'incubation composé de tampon HEPES à 1 mM, pH 7,5 (Sigma Aldrich, Saint-Louis, États-Unis) et de Plant Preservative Mixture (PPM, Kalys, Bernin, France) à 0,1% p/v. Les graines sont placées dans un tube Falcon<sup>TM</sup> de 50 mL (Dominique Dutscher, Brumath, France) à 25 °C et à l'obscurité pendant 4 jours minimum permettant l'acquisition de la capacité des graines à percevoir les stimulants de germination. Cette étape correspond à la phase de conditionnement des graines.

Les graines de *P. ramosa* sont désinfectées suivant le même protocole que celles d'*O. cumana* avec une légère modification : le temps de désinfection dans l'hypochlorite de sodium 2,4% est de 5 min. Les graines sont ensuite placées à 21 °C à l'obscurité dans le milieu d'incubation pendant 7 jours minimum pour la phase de conditionnement.

## C. Identification et synthèse des miPEP

### 1. *Orobanche cumana*

Les miARN compris entre les miR156 et miR399 ont été identifiés par analyse bio-informatique à partir du génome d'*O. cumana* qui a été séquencé en 2017 par le LIPM dans le cadre du projet HeliOr (Muños *et al.*, 2015). Les miPEP associés ont ensuite été identifiés à partir des séquences des précurseurs des miARN. L'identification des miARN et des miPEP associés d'*O. cumana* a été réalisée par le LRSV (Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales) à partir du génome d'*O. cumana*. Ainsi, 42 miPEP d'*O. cumana* ont été identifiés à partir de pri-miARN issus de 16 familles de miARN (miR156, miR159, miR160, miR164, miR165/166, miR167, miR168, miR169, miR171, miR172, miR319, miR390, miR393, miR394, miR395 et miR396). Les miPEP sont ensuite synthétisés de manière chimique par l'entreprise Smartox Biotechnology (Saint-Egrève, France) puis stockés à -20 °C sous forme lyophilisée. Avant utilisation, les miPEP lyophilisés sont solubilisés avec de l'eau ou de l'ACN 50% selon leur hydrophobicité puis conservés sous forme d'aliquots. La conservation des miPEP sous forme d'aliquots permet d'éviter les cycles de congélation/décongélation délétères à leur efficacité une fois solubilisés (Ormancey *et al.*, 2020).

### 2. *Phelipanche ramosa*

Les précurseurs de 4 miARN, correspondant aux miARN dont les miPEP étaient les plus intéressants chez *O. cumana* lors de la germination ont été identifiés chez *P. ramosa* grâce à une première version du génome fournie par le Professeur Susann Wicke de l'Université Humboldt de Berlin (communication personnelle). Dix-huit miPEP correspondant à 4 familles de miARN (miR156, miR172, miR319 et miR396) ont ainsi été synthétisés : 7 membres de la famille des miR156, 7 membres de la famille des miR172, 2 membres de la famille des miR319 et 2 membres de la famille des miR396.

## D. Tests de germination

Le milieu d'incubation des graines est renouvelé avant d'effectuer les tests de germination afin d'éviter l'anoxie des graines. Pour cela, les graines sont rincées 3 fois avec de l'eau distillée stérile et amenées à une concentration de 10 mg par mL dans un nouveau milieu d'incubation avec de l'HEPES 1 mM, pH 7,5 et du PPM 0,1 % p/v. Les tests de germination sont effectués avec 50 µL de milieu représentant environ 150 graines par puits d'une plaque 96 puits à fond plat (Cell Culture Multiwell Plate Cellstar, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Allemagne) selon le protocole décrit par Pouvreau *et al.* en 2013. Dix µL de stimulant de

germination (*rac*-GR24 ou DCL) et/ou de miPEP sont ajoutés. Le volume est complété à 100  $\mu$ L avec de l'eau distillée. Les contrôles négatifs de germination correspondent au traitement avec l'acétonitrile (ACN, solvant utilisé pour solubiliser les stimulants de germination et certains miPEP) à une concentration correspondant à celle des molécules ajoutées aux graines. Trois réplicats biologiques sont réalisés pour chaque condition. Le *rac*-GR24 a été fourni par le Pr. Binne Zwanenburg de l'Université Radboud de Nimègue, et le DCL par LTK Laboratories Inc. (Saint Paul, MN, États-Unis). Ces deux stimulants de germination sont dissous dans 100 % d'ACN pour obtenir des solutions stocks à une concentration de  $10^{-2}$  M conservées à  $-20$  °C. Les stimulants de germination sont utilisés à différentes concentrations finales (allant de  $10^{-4}$  M à  $10^{-12}$  M) et à un pourcentage en ACN de 0,01% final. Les miPEP sont solubilisés dans de l'eau distillée stérile ou dans de l'ACN à 50 % selon leur hydrophobicité afin d'obtenir une concentration de la solution mère de  $10^{-2}$  M. Ils sont ensuite utilisés à une concentration finale de 100  $\mu$ M. Les tests de germination sont effectués à l'obscurité, à 25 °C et 21 °C pour *O. cumana* et *P. ramosa* respectivement.

Afin de caractériser l'effet phénotypique des miPEP lors de la germination, un traitement avec du MTT (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, États-Unis) à une concentration finale de 0,05 g par L est effectué 54 h et 96 h après traitement pour *O. cumana* et *P. ramosa* respectivement. L'ajout de MTT permet de colorer en violet foncé les graines dont l'activité métabolique a repris (Pouvreau *et al.*, 2013). Un dénombrement des graines dont la radicule a protrudé et de celles ayant seulement repris métaboliquement (**Figure 1.2**) est effectué sous loupe binoculaire (Olympus SZX10, Olympus Europa GmbH, Allemagne) 18 h après ajout du MTT.



**Figure 1.2 :** Visualisation de la reprise métabolique et de la protrusion des radicules après coloration au MTT des graines d'*O. cumana*.

Les analyses moléculaires de suivi d'expression de gènes par qRT-PCR sont effectuées à partir d'ARNs extraits de 7 mg de graines mises à germer dans des plaques 24 puits stériles (Thermo Fisher Scientific, Waltham, États-Unis). Les graines désinfectées et conditionnées comme décrit précédemment sont placées dans une solution d'HEPES 0,5 mM, pH 7,5 et PPM 0.05% à une concentration de 15 mg par mL. Dans chaque puits sont placés 490  $\mu$ L de

graines, 5  $\mu\text{L}$  de *rac*-GR24 ou d'ACN et 5  $\mu\text{L}$  de miPEP, d'eau distillée stérile ou d'ACN en fonction du solvant utilisé pour dissoudre les miPEP. Deux puits par réplicat biologique sont traités pour chaque condition puis mélangés avant récolte afin d'obtenir une quantité de graines suffisante pour réaliser l'extraction des ARNs. Pour chaque traitement sont effectués trois réplicats biologiques. Une fois le contenu des deux puits mélangés, 40  $\mu\text{L}$  de graines sont prélevés et placés dans une plaque 96 puits en deux réplicats servant de contrôle phénotypique des différents traitements. Les 960  $\mu\text{L}$  de graines restantes sont ensuite récupérées aux temps souhaités grâce à un tamis de 100  $\mu\text{m}$  puis séchées avec du papier absorbant, congelées dans de l'azote liquide et placées dans un congélateur à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## E. Tests d'haustoriogenèse

Le test d'haustoriogenèse chez *Phelipanche ramosa* est basé sur le protocole décrit par Goyet *et al.*, 2017. Il est réalisé en plaque 96 puits à fond plat. Les graines sont désinfectées dans de l'hypochlorite de sodium 2,4 % et conditionnées à  $21\text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant 7 jours minimum dans le milieu d'incubation composé d'HEPES 1 mM à pH 7,5 et de PPM à 0,1 % dans un tube Falcon<sup>TM</sup> 50 mL (Dutscher, Brumath, France). Le milieu d'incubation est renouvelé afin d'obtenir une concentration en graines finale de 2,5 mg par mL. Du *rac*-GR24 est ajouté à une concentration finale en de  $10^{-7}$  M. Cinquante  $\mu\text{L}$  de ces graines stimulées avec le *rac*-GR24 sont alors placés dans chaque puits. La plaque 96 puits est placée à  $21\text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant 4 jours pour permettre la protrusion des racines. Après 4 jours d'incubation, le milieu de culture contenant le stimulant de germination est remplacé par les miPEP et/ou la *cis-trans*-zéatine (*c/tZ*), une cytokinine fournie par Olchemin (Olomouc, République Tchèque). Ils sont dilués dans le milieu de conditionnement (HEPES 0,5 M, pH 7,5 et PPM 0,05 %) et 100  $\mu\text{L}$  sont ajoutés sur les graines germées. La formation de l'haustorium est observée 3 jours après la stimulation. Les miPEP sont testés à 7 concentrations allant de  $10^{-9}$  M à  $10^{-4}$  M pour les tests d'induction d'haustoriogenèse et à 100  $\mu\text{M}$  pour les tests d'inhibition. La *c/tZ* est utilisée à 3 concentrations :  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$  et  $10^{-8}$  M, pour les tests d'inhibition.

La mise au point du test d'haustoriogenèse chez *O. cumana* a été réalisée par Thibault Roudaire, stagiaire en Master 2 Biologie Végétale « Plant Integrative Biology and Breeding », que j'ai encadré. Ce test est basé sur celui décrit précédemment pour *Phelipanche ramosa* avec quelques modifications. Les graines d'*O. cumana* sont désinfectées dans de l'hypochlorite de sodium 2,4 % (voir la section « B. Désinfection des graines et conditionnement ») et conditionnées à  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant 4 jours minimum dans le milieu d'incubation composé d'HEPES à 1 mM et du PPM à 1 %. La germination des graines est stimulée par du DCL à  $10^{-7}$  M final en tube Falcon<sup>TM</sup> de 50 mL pendant 30 min, puis les graines sont rincées et re-suspendues à 2,5 mg par mL dans le milieu d'incubation composé d'HEPES

à 0,5 mM et du PPM à 0,05 %. Le DCL a été utilisé à la place du *rac*-GR24 car les EC50 de ces deux stimulants de germination sont très proches ; de plus, Thibault Roudaire obtenait de meilleurs taux de germination avec ce stimulant. Il est nécessaire d'obtenir le meilleur taux de germination possible pour ensuite pouvoir visualiser au mieux le pourcentage d'haustoriogenèse. Un dépôt de 50 µL de graines est effectué par puits dans une plaque de 96 puits. La plaque est incubée à 25 °C et à l'obscurité pendant 54 h permettant ainsi la protrusion des racines. Une fois les racines protrudées, 50 µL de miPEP et/ou de *c/tZ* dilués dans du milieu d'incubation (HEPES 0.5 mM, pH 7,5 et PPM 0,05 %) sont ajoutés aux 50 µL de graines. La formation de l'haustorium est observée 10 jours après stimulation. Les miPEP sont testés à 7 concentrations allant de  $10^{-4}$  M à  $10^{-9}$  M pour les tests d'induction de l'haustoriogenèse et à 100 µM pour les tests d'inhibition. Le *c/tZ* est utilisé à 3 concentrations :  $5.10^{-9}$ ,  $1.10^{-8}$  et  $5.10^{-8}$  M pour les tests d'inhibition.

Le pourcentage d'haustoriogenèse correspond au nombre d'haustoriums formés par rapport au nombre de graines germées (cf « Introduction bibliographique », **Figure 6A et B**).

## F. PCR quantitative en temps réel

Les graines conservées à -80 °C sont broyées à l'aide d'un pilon pour tube 1,5 mL (VWR, Radnor, Etats-Unis) dans des tubes Eppendorfs 1,5 mL (Sarstedt, Allemagne). L'extraction des ARNs totaux est réalisée avec le kit NucleoSpin® RNA Plant (Macherey-Nagel, Hoerd, France) sur les graines broyées avec quelques modifications. L'étape 7 correspondant à la digestion de l'ADN n'est pas effectuée, de même que le premier lavage de l'étape 8. L'élution est effectuée avec 50 µL d'eau RNase free. Un traitement DNase est effectué sur l'éluat avec 6.8 unités Kunitz de DNase RNase-Free (Qiagen, Courtaboeuf, France) pendant 20 min à température ambiante. Les ARNs sont ensuite purifiés avec le kit NucleoSpin® RNA Clean-up XS (Macherey-Nagel, Hoerd, France) avec un volume d'élution final de 30 µL. La quantité et la qualité des ARNs sont déterminées par spectrophotométrie (A260/A280 et A260/A230, NanoDrop Spectrophotometer ND-1000, Labtech International Ltd, Royaume-Uni). Les ARNs purifiés sont conservés à -20 °C.

Les ADNc sont synthétisés à partir de 400 ng d'ARN pour les analyses d'expression des gènes cibles des miARN. Le kit qScript cDNA Supermix (Quanta BioSciences Inc., Gaithersburg, Etats-Unis) est utilisé pour synthétiser les ADNc. Les ADNc sont conservés à -20 °C avant utilisation.

Les PCR quantitatives sont réalisées dans des plaques PCR 96 puits (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems, Foster City, Etats-Unis) grâce au kit PerfeCTa® SYBR® Green SuperMix ROX (Quanta BioSciences Inc., Gaithersburg, Etats-Unis). Le thermocycleur utilisé est un thermocycleur Applied Biosystem 7300 real-time PCR (Applied Biosystem, Foster City, Etats-Unis). Les couples d'amorces utilisés (**Tableau 1.1**) sont identifiés grâce au logiciel Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, Etats-Unis). L'efficacité (E) des couples d'amorces est déterminée à partir de la valeur de la pente issue de la courbe standard des Ct (threshold cycles) en fonction de la quantité d'ADNc selon la formule suivante :  $E = 10^{-(1/\text{pente})}$  (Pfaffl, 2001). Une gamme de dilution au 1/2 est utilisée pour réaliser les réactions de qPCR nécessaires à la réalisation de cette courbe standard grâce au programme Standard Curve. Les cycles de températures pour ce programme sont les suivants : 2 min à 50 °C, 10 min à 95 °C suivis de 40 cycles de 15 sec à 95 °C puis 1 min à 60 °C. La spécificité des couples d'amorces est vérifiée grâce à un cycle de dissociation à la suite du programme Standard Curve. Ce cycle est composé de 15 sec à 95 °C, 1 min à 60 °C, 15 sec à 95 °C puis 15 sec à 60 °C. Les réactions de PCR quantitatives sont réalisées avec 5 µL d'ADNc dilués au 1/10<sup>ème</sup>. Les amorces sont utilisées à une concentration finale de 300 nM par réaction soit un volume de 0,75 µL à une concentration de 10 µM. Le volume total de chaque réaction est de 25 µL. La réaction de PCR quantitative est caractérisée par une succession de cycles de températures, le premier correspond à la dénaturation initiale des ADNc avec une température de 95 °C pendant 10 min, suivi par 40 cycles à 95 °C pendant 15 sec puis 60 °C pendant 1 min correspondant respectivement à une phase de dénaturation et aux phases d'hybridation/élongation. L'expression des gènes étudiés est normalisée par le gène de référence *Ubiquitin10 (UBI10)* pour les tests de germination et d'haustoriogenèse, et par la condition contrôle « traitement solvant ». Les expressions relatives sont calculées à partir des Ct moyennés sur deux réplicats biologiques composés chacun de trois réplicats techniques, et des efficacités des couples d'amorces utilisés selon la formule suivante :

$$\text{Relative expression} = \frac{(E_{\text{target}})^{Ct_{\text{target}}(\text{control-sample})}}{(E_{\text{ref}})^{Ct_{\text{ref}}(\text{control-sample})}}$$

$E_{\text{target}}$  correspond à l'efficacité du couple d'amorces du gène cible et  $E_{\text{ref}}$  correspond à l'efficacité du couple d'amorces du gène référence.  $\Delta Ct$  correspond au différentiel d'expression entre le Ct du contrôle et celui de l'échantillon (Pfaffl, 2001). Cette formule permet de prendre en compte les différences d'efficacité entre les couples d'amorces.

Tableau 1.1 : Liste des couples d'amorces utilisés pour les qRT-PCR dans ce chapitre.

miARN	Gène	Nom	Séquence	Taille amorce
	<i>OcUBI10</i>	Oc_UBI10_Fwd	GAA TTC AAC GAG GGT AAA GCA TCT	24
		Oc_UBI10_Rev	CGG AGT CTG TGA TGG ATG AAA AA	23
miR156	<i>OcSPLa</i>	OcTarget37_Fwd	ACA CTT CAT GAA CGG CAC CAA	21
		OcTarget37_Rev	ATG TTC CAG CCG GGA CTG T	19
	<i>OcSPLb</i>	OcTarget41_Fwd	CCG AAG AAG GCT TTC TGA TCA TAA T	25
		OcTarget41_Rev	GTC GAG CTG TTA AAT CGT ATA GTT TCC	27
	<i>OcSPLc</i>	OcTarget42_Fwd	AAC CCG TGC TGC CAA GTC	18
		OcTarget42_Rev	TAT GCC GCC GGT GAT AAT CT	20
	<i>OcSPLd</i>	OcTarget43_Fwd	GGC CAC AAC GAA CGT AGA AGA	21
		OcTarget43_Rev	GGC GAA AGG GTT CCG TAT C	19
miR160a	<i>OcARF10</i>	OcTarget5_Fwd	ACA CCG GCC CCG CTA A	16
		OcTarget5_Rev	ATA CTA TAT CCG TTT TCG CTA AGA AAG C	28
	<i>OcARF16</i>	OcTarget6_Fwd	CAT TGT TTC GAT GAC AGT CGA GTA T	25
		OcTarget6_Rev	AGG GTC TTC GCG AAA GAA TTG	21
	<i>OcARF17</i>	OcTarget7_Fwd	CCA ACT AAT ACT ACC CCC GAC TGT	24
		OcTarget7_Rev	GCC CCC GGA ACA ATC G	16
miR164a	<i>OcNAMb</i>	OcT13bis_Fwd	GGC GGC GAC ATC AAG AAG	18
		OcT13bis_Rev	GGG ATC GCG AGT TGA CTT GT	20
	<i>OcNAMc</i>	OcT14bis_Fwd	TCC GTG AAC GCG CTG AT	17
		OcT14bis_Rev	GGA AAC GAG AAG CGG AGG AT	20
miR165/166	<i>OcHB15 ou 8</i>	OcTarget1_Fwd	AAT TGC TCT ACA TGC AGC TCT ATG C	25
		OcTarget1_Rev	AGA CGT ATA GCG TAG CAA CCA GAA	24
	<i>OcHB15 ou 8</i>	OcTarget2_Fwd	TCC AAC GGC CTG TCT ACC A	19
		OcTarget2_Rev	GCA AAC TGA AAG GCG ATT GTC	21
	<i>OcPHV</i>	OcTarget3_Fwd	TGA TTT GCG AGA GGT CAT TAA CA	23
		OcTarget3_Rev	CAG CTC TCG TAA AGC ACG TTG TA	23
	<i>OcPHB</i>	OcTarget4_Fwd	AAT GGA TGC TGG CAA GTA CGT	21
		OcTarget4_Rev	GGC TTT GGG CAT TCT GCA TA	20
miR167	<i>OcARFa</i>	OcTarget45_Fwd	GCA ATG AAT GGA AGT TTA GGC ATA T	25
		OcTarget45_Rev	ACA AAC ACA CTC CAT CCC GTA GTA	24
	<i>OcARFb</i>	OcTarget46_Fwd	CAC GAA TGG CGG TTG TGA T	19
		OcTarget46_Rev	CGG ATG GTA TTC CAG CAT TGA	21
	<i>OcARFc</i>	OcTarget47_Fwd	CTC ATT CCC CGG TCT TAA AGA TG	23
		OcTarget47_Rev	GCA TAG CTT GAT CGC CGA TAC	21
miR169	<i>OcNF-YAd</i>	OcTarget22_Fwd	AAG GAA ATT GAT CAA AGC TAG AAA GC	26
		OcTarget22_Rev	ACC GGT GCC CCT TTC TCT	18
	<i>OcNF-YAe</i>	OcTarget23_Fwd	TTT CCT GAG TAC CAA AAA GCT TGA	24
		OcTarget23_Rev	AAG CAG GAT AGC GCG ACT GT	20
miR171	<i>OcHAMA</i>	OcTarget49_Fwd	GAA TCT TCC TGT TTG TTG TTT AGC TAA C	28
		OcTarget49_Rev	GGC GAC AGC TGT TTG ACA AAA	21
	<i>OcHAMB</i>	OcTarget50_Fwd	GGT TTT GGT GTT GTA GAT CAA GGA	24
		OcTarget50_Rev	CTG GAT CTG AAG TTG TTG GGA AA	23
	<i>OcHAMc</i>	OcTarget51_Fwd	CCC TTA CGA GCC CAA GTC TGT	21
		OcTarget51_Rev	GGA AAC GGG CTT TCG ATC A	19

miR172	<i>OcTOEa</i>	OcTarget8_Fwd	ATT GCG GGA AAC AGG TTT ATT TAG	24
		OcTarget8_Rev	ACT TAA TAG CTG CCC TAT CAT ATG CA	26
	<i>OcTOEb</i>	OcTarget9_Fwd	TTG GGC GGT CAA GCT GAA	18
		OcTarget9_Rev	CTC GGA CTG GCA GAA TTT AAC TC	23
	<i>OcTOEd</i>	OcTarget11_Fwd	GAC GAG GTC GAT TGC AAC AGA	21
		OcTarget11_Rev	GGA TCA CGT TCT TGT TGA GGA TT	23
miR159	<i>OcMYB101</i>	OcTarget26bis_Fwd	AGC GAG TCT CCT ATG TTG AGC AA	23
		OcTarget26bis_Rev	GGC TGC AAT CGT GTT GTA CCT	21
miR159 miR319	<i>OcMYB33a</i>	OcTarget28_Fwd	CCT ACA ATA CCA AAA CTC TGC TCT CTA C	28
		OcTarget28_Rev	GGA GTG TGG AAA GGC GAT TC	20
	<i>OcMYB33b</i>	OcTarget29_Fwd	CCG TAG TCC AAT CTC GTC CAC TA	23
		OcTarget29_Rev	GAC CAC TGC TCC CTG GAG AAG	21
miR319	<i>OcTCP2</i>	OcTarget52_Fwd	TGA TTC GAA TTT CTT CCT CAG AAC T	25
		OcTarget52_Rev	TAG AAG CCC GGA CGT GAA GTA	21
	<i>OcTCP3</i>	OcTarget53_Fwd	CAC ACC GCC ATA CAA TTC TAT GAC	24
		OcTarget53_Rev	TGG CAG CTT TGG CTT TTT TTA T	22
miR393	<i>OcFBa</i>	OcTarget30_Fwd	TGC AAG ATG CCC TAA CCT TAG AAG	24
		OcTarget30_Rev	CAA CTG AGG TGC TTT CAC CAG TA	23
	<i>OcFBb</i>	OcTarget31_Fwd	CCT CGT GCA CCA GAC TAT TTA ACC	24
		OcTarget31_Rev	TTC CTT ACA GCT CTC CAC AAT GG	23
	<i>OcFBc</i>	OcTarget32_Fwd	TTC TAT ACT TTT GCC GCC AGA TGT	24
		OcTarget32_Rev	CGG AAG CGG ATT AAA TTT GG	20
	<i>OcFBd</i>	OcTarget33_Fwd	CTC TTA TAA CCG TGG CAA AAC ATT G	25
		OcTarget33_Rev	TCC GGT ATC GTT GGG TTA AGG	21
miR394	<i>OcGalactose oxydase</i>	OcTarget59_Fwd	TGT ACG ACC CGT CAT TGA AGA A	22
		OcTarget59_Rev	GCC ACA GGC AAC AAG ATT ATA TTT T	25
miR396	<i>OcGRFa</i>	OcTarget61_Fwd	CTG GCT GGA AGA ACC GAA ATC	21
		OcTarget61_Rev	AGC TCG AGG AGC AAG AGA AAT C	22
	<i>OcGRFb</i>	OcTarget62_Fwd	ACC TTC TTA TCT TCT CAC TCC AAT CAG A	28
		OcTarget62_Rev	GGA TCT TAG GGC GGG AAA TG	20
	<i>OcGRFc</i>	OcTarget63_Fwd	ATA GCG GCG GAG CTA ACG A	19
		OcTarget63_Rev	GCA TCG GAA GAT GAT GAG ATA TAT TC	26
	<i>OcGRFd</i>	OcTarget64_Fwd	GCT TAC TCT TCT GGT CAT CAT CCA TAC	27
		OcTarget64_Rev	GCC ATT GAG ACG AGC TGA AAT	21
	<i>OcGRFe</i>	OcTarget66_Fwd	TGC CGA TAC GTC GCA GTT T	19
		OcTarget66_Rev	AAC AGT AGC CCA GAG AAG AAT GGT	24
	<i>OcGRFf</i>	OcTarget67_Fwd	CGT GGC ACC TGA TCA GAA ATA C	22
		OcTarget67_Rev	TGA AAC TTC CAC ATG CTT TCT TGA	24
	<i>OcGRFg</i>	OcTarget68_Fwd	TGT GGT GCA GGC AAA GTT TG	20
		OcTarget68_Rev	ATC CGT TCT CCG GCA TCT T	19

## G. Analyses statistiques

Les analyses statistiques des données sont effectuées à partir du logiciel R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)).

Les données de pourcentage d'induction d'haustoriogenèse, d'inhibition de germination et d'haustoriogenèse ont été soumises à une analyse de comparaison par paire (Tukey honestly significant difference (Tukey-HSD)) avec des intervalles de confiance de 99,9 %, 99 % et 95 %. Les moyennes sont des valeurs  $\pm$  SE avec  $n = 3$  pour les tests de germination et  $n = 6$  pour les tests d'haustoriogenèse.

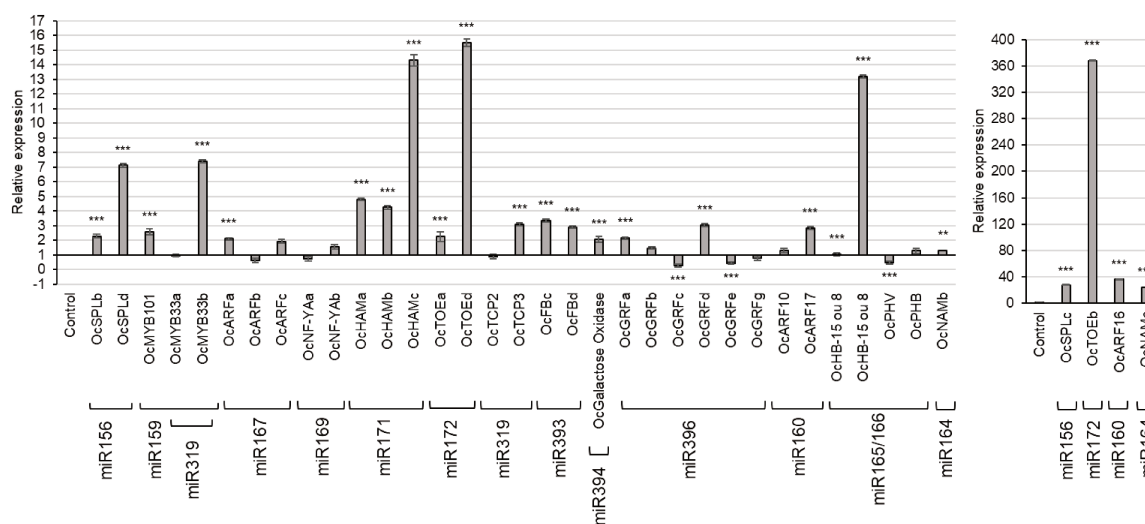
Les données d'expression de gène de graines traitées ou non avec du *rac*-GR24 ont été soumises à des comparaisons par paire (Tukey-HSD) des différents traitements avec le contrôle négatif (traitement solvant seul à 0,1 % (v/v) d'ACN) et avec un intervalle de confiance de 99 %. Les moyennes sont des valeurs  $\pm$  SE ( $n=3$ ).

### III. Résultats

#### A. Expression des gènes cibles des miARN lors de la germination des graines d'*O. cumana*

L'expression relative des gènes cibles de 13 familles de miARN a été déterminée 48 h après stimulation de la germination des graines d'*O. cumana* préconditionnées par du *rac*-GR24  $10^{-7}$  M (**Figure 1.3**). Parmi les 37 gènes cibles étudiés, 23 sont sur-exprimés, 3 sont sous-exprimés et 11 ne présentent pas d'expression différentielle. Les gènes cibles du miR164 n'ont pas pu être identifiés chez *O. cumana*.

Les gènes sur-exprimés sont des gènes cibles de 12 familles de miARN : les miR156, miR159, miR160, miR164 miR165/166, miR167, miR171, miR172, miR319, miR393, miR394 et miR396. Parmi les 23 gènes sur-exprimés, 4 le sont plus de 20 fois : *SPLc* cible du miR156, *ARF16* cible du miR160, *NAMc* cible du miR164 et *TOEb* cible du miR172 (**Figure 1.3**), ils sont sur-exprimés de  $27,7 \pm 0,24$  ;  $35,9 \pm 0,18$  ;  $24,32 \pm 0,327$  et  $368,7 \pm 0,21$  fois respectivement lors de la germination. Les 18 autres gènes sont sur-exprimés entre 2 et 16 fois après stimulation au *rac*-GR24. Il s'agit de gènes *SPL*, *MYB*, *ARF*, *HAM*, *TOE*, *TCP*, *FB*, *Galactose Oxidase*, *GRF*, *HB* et *NAM*.

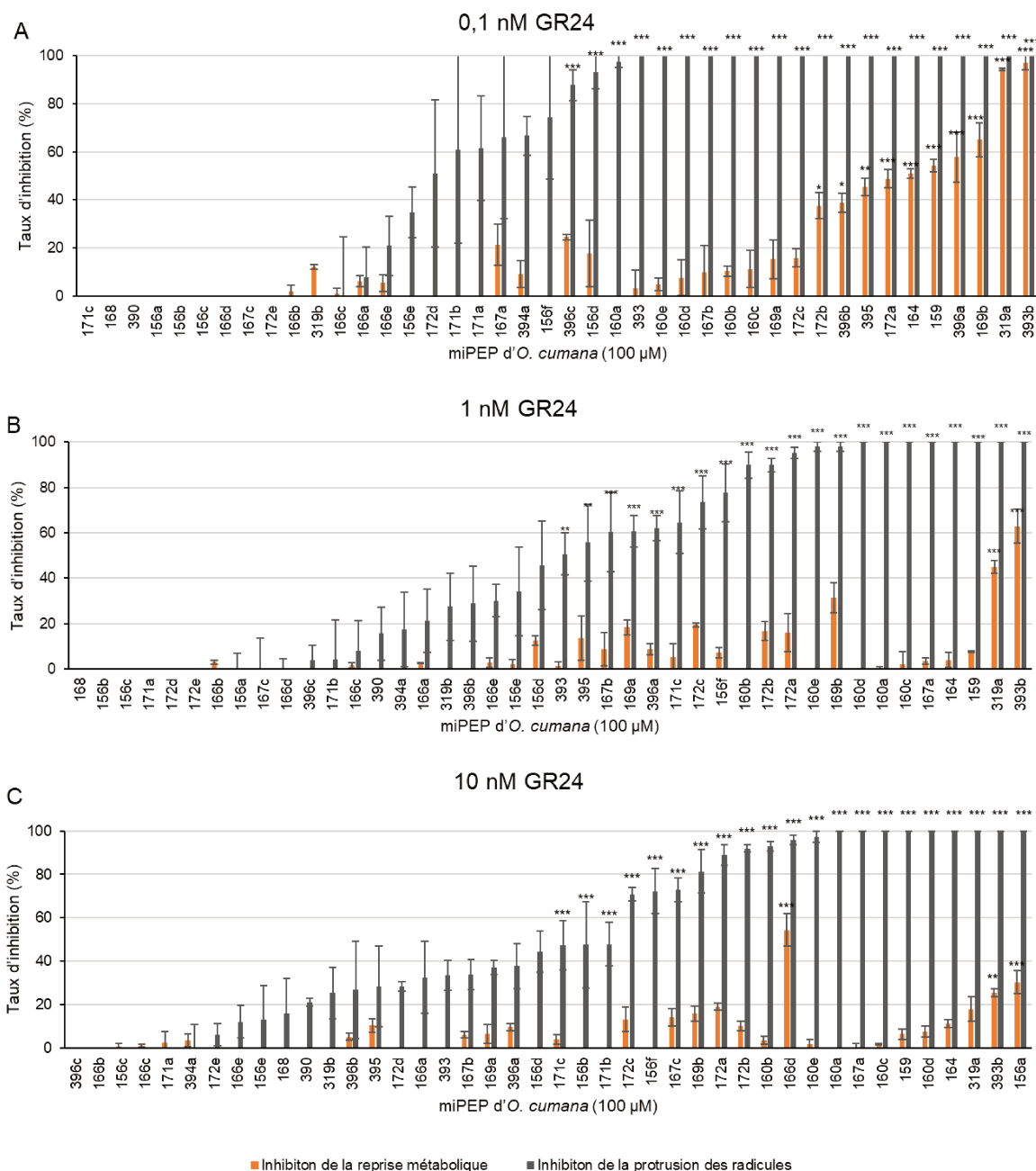


**Figure 1.3 : Quantification par qRT-PCR de l'expression relative de gènes cibles de miARN 48 h après induction de la germination d'*O. cumana* par un traitement avec le *rac*-GR24 à  $10^{-7}$  M.**

Les moyennes et les écarts types ont été calculés à partir de deux réplicats biologiques. L'expression des gènes a été normalisée par rapport au gène de référence *UBI10* et par rapport au contrôle négatif (traitement solvant). La valeur seuil contrôle est fixée à 1, au-dessus de cette valeur, le gène est sur-exprimé et en dessous de celle-ci, il est sous-exprimé. Les valeurs indiquées par trois étoiles sont significativement différentes selon un test de Tukey-HSD ( $p < 0,001$ ).

Les gènes sous-exprimés sont les gènes *PHV* et *GRF* cibles de miR165/166 et miR396 respectivement (**Figure 1.3**). Les niveaux d'expression des deux gènes *NF-YA* cibles de miR169 ne sont pas modulés lors de la germination.

Ainsi, la majorité des gènes cibles de miARN sont sur-exprimés lors de la germination des graines d'*O. cumana*. On peut donc s'attendre à ce que les miARN correspondants soient sous-exprimés lors de ce processus biologique. L'ajout de miPEP, s'ils stimulent l'expression de leurs miARN respectifs et donc inhibent celles de leurs gènes cibles, pourrait ainsi moduler le processus de germination et probablement l'inhiber.



**Figure 1.4 : Pourcentage d'inhibition de la reprise métabolique et de la protrusion de la racicule des graines d'*O. cumana* 54 h après co-traitement avec les miPEP et le *rac*-GR24.**

Les miPEP sont utilisés à une concentration de 100  $\mu\text{M}$  et une concentration en *rac*-GR24 de 0,1 nM (A), 1 nM (B) et 10 nM (C). Les moyennes et les erreurs standard ont été calculées à partir de trois réplicats biologiques. Une, deux et trois étoiles représentent respectivement des niveaux de significativité de  $p < 0,05$  ;  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$  d'après un test de Tukey-HSD.

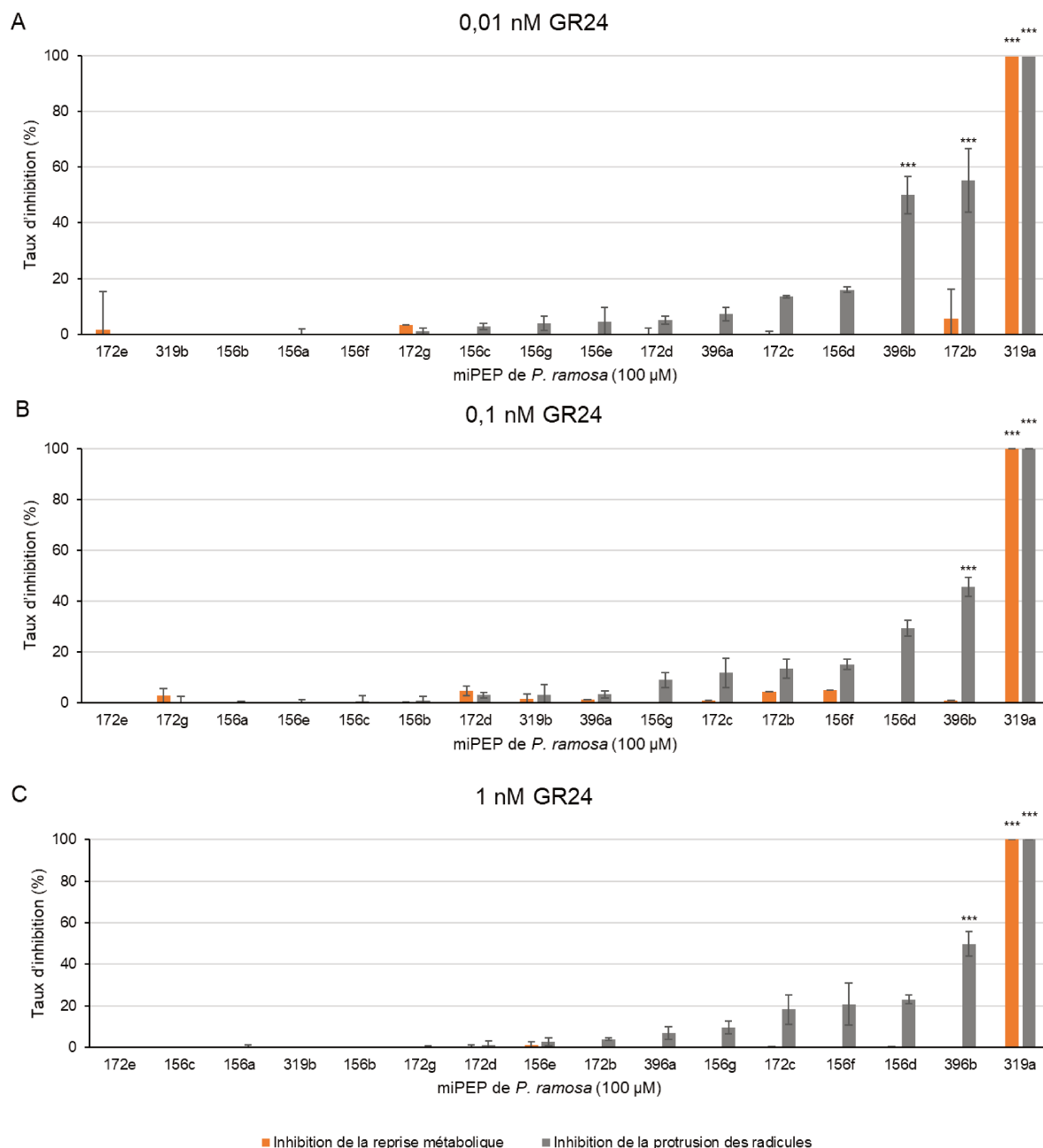
## B. Effets phénotypiques des miPEP lors de la germination

Les mécanismes de régulation de processus biologiques tels que la germination sont des processus extrêmement fins. L'ajout d'une quantité trop élevée de stimulant de germination, le *rac-GR24*, entraîne une saturation du signal et ne permet pas de visualiser l'effet inhibiteur potentiel d'un miPEP. Afin de pallier cet effet saturant, le test de germination a été réalisé à de faibles concentrations en stimulant de germination. Ainsi, trois concentrations en *rac-GR24*, de  $10^{-8}$  M à  $10^{-10}$  M, ont été utilisées pour réaliser le criblage des effets des miPEP lors de la germination. Cette gamme de concentration encadre l'EC50, permettant d'avoir un pourcentage de germination maximal à  $10^{-8}$  M et très faible voire nul à  $10^{-10}$  M.

### 1. Les miPEP d'*O. cumana*

L'analyse bio-informatique du génome d'*O. cumana* a permis d'identifier 42 miPEP issus de 16 familles de miARN. Ces miPEP ont été testés sur les graines d'*O. cumana*. Les graines ont été préalablement désinfectées et conditionnées 7 jours à 25 °C dans le milieu d'incubation. Elles ont ensuite été traitées avec du *rac-GR24* à 3 concentrations encadrant l'EC50 :  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  et  $10^{-10}$  M et des miPEP à 100  $\mu$ M. Les pourcentages de protrusion des radicules et de reprise métabolique des graines ont été déterminés 56 h après traitement.

En préambule, le premier criblage a consisté à tester les 42 miPEP seuls sur les graines d'*O. cumana*. Aucun ne stimule la germination de cette plante holoparasite. Vingt-neuf miPEP faisant partie de 13 familles induisent une inhibition significative de la germination des graines d'*O. cumana* lorsqu'ils sont utilisés en co-traitement avec le *rac-GR24* (**Figure 1.4**). Ces miPEP sont liés aux familles de miARN suivants : miR156, miR159, miR160, miR164, miR166, miR167, miR169, miR171, miR172, miR319, miR393, miR395 et miR396. Parmi ces 29 miPEP, 17 induisent uniquement une inhibition de la protrusion de la radicule, les graines ont repris métaboliquement mais leur radicule n'a pas protrudé. Ils font partie des 8 familles de miARN : miR156, miR160, miR167, miR169, miR171, miR172, miR393 et miR396. Ces miPEP agiraient donc à un stade différent des 12 autres miPEP inhibant à la fois la protrusion des radicules et la reprise métabolique. Ces miPEP agiraient après l'induction de la germination par le stimulant. Les 3 dernières familles de miPEP ne montrent pas d'effet phénotypique lors de la germination. Il s'agit des miPEP liés aux miR168, miR390 et miR394. Ces deux miARN ne semblent donc pas impliqués dans le processus de germination chez *O. cumana*.



**Figure 1.5 : Pourcentage d'inhibition de la reprise métabolique et de la protrusion de la racicule des graines de *P. ramosa* 96 h après co-traitement avec les miPEP et le *rac*-GR24.**

Les miPEP sont utilisés à une concentration de 100  $\mu$ M et une concentration en *rac*-GR24 de 0,1 nM (A), 1 nM (B) et 10 nM (C). Les moyennes et les erreurs standard ont été calculées à partir de trois réplicats biologiques. Une, deux et trois étoiles représentent respectivement des niveaux de significativité de  $p < 0,05$  ;  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$  d'après un test de Tukey-HSD.

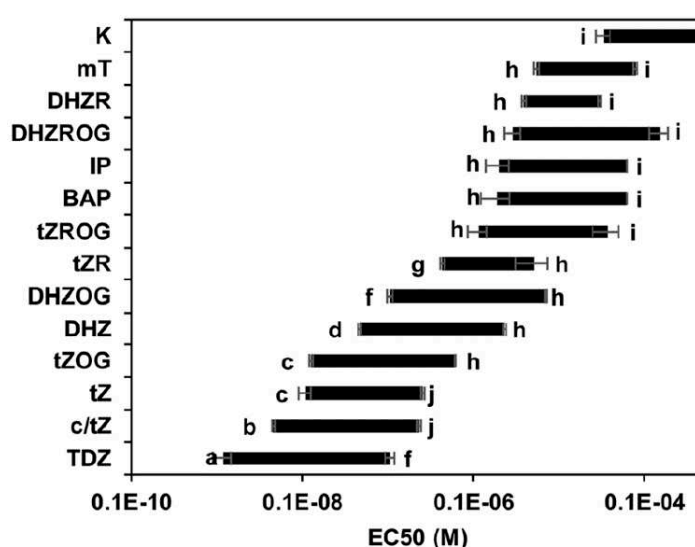
## 2. Les miPEP de *P. ramosa*

Seize miPEP correspondant à 4 familles de miARN ont été identifiés à partir du génome de *P. ramosa*. Ils correspondent aux miPEP inhibiteurs de la germination d'*O. cumana* (**Figure 1.4**) dont les gènes cibles des miARN associés sont fortement sur-exprimés lors de la germination d'*O. cumana* (**Figure 1.3**) mais aussi ceux dont les miARN sont impliqués dans la voie de signalisation des CKs (Curaba *et al.*, 2014). Ils ont été testés sur des graines de *P. ramosa* préalablement désinfectées et conditionnées 7 jours à 21 °C dans le milieu d'incubation à l'obscurité. Elles ont ensuite été traitées avec du *rac*-GR24 à 3 concentrations encadrant l'EC50 :  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  et  $10^{-11}$  M et les miPEP à 100 µM. Les pourcentages de protrusion des radicules et de reprise métabolique des graines ont été déterminés 96 h après traitement.

Les 16 miPEP appliqués seuls sur les graines de *P. ramosa* ne stimulent pas la germination. Parmi les 16 miPEP, 3 présentent un effet inhibiteur de la germination des graines de *P. ramosa* lorsqu'ils sont utilisés en co-traitement avec le *rac*-GR24 (**Figure 1.5**). Ces miPEP sont liés à la famille des miR172, miR319 et miR396. Le miPEP172b et le miPEP396b inhibent uniquement la protrusion de la radicule mais ne modifient pas le pourcentage de reprise métabolique. Le miPEP319a est quant à lui le miPEP induisant la plus forte inhibition de la protrusion de la radicule et de la reprise métabolique. Les miPEP liés à la famille des miR156 n'ont pas d'effet sur le processus de germination de *P. ramosa* dans ces conditions de test.

## C. Effets phénotypiques des miPEP lors de l'haustoriogenèse

Comme pour le test de germination, le test d'haustoriogenèse nécessite de faibles concentrations en molécules inductrices de l'haustorium, les HIFs, afin de visualiser les effets potentiellement inhibiteurs des miPEP. Chez *P. ramosa*, les cytokinines agissent dans des fenêtres étroites de concentrations spécifiques à chacune d'elles. Les CKs n'ont pas d'effet haustorigène si leur concentration est trop faible ou trop élevée (**Figure 1.6**, Goyet *et al.*, 2017). Il n'est pas à exclure que les miPEP agissent également selon une fenêtre précise de concentrations dans ce processus biologique.



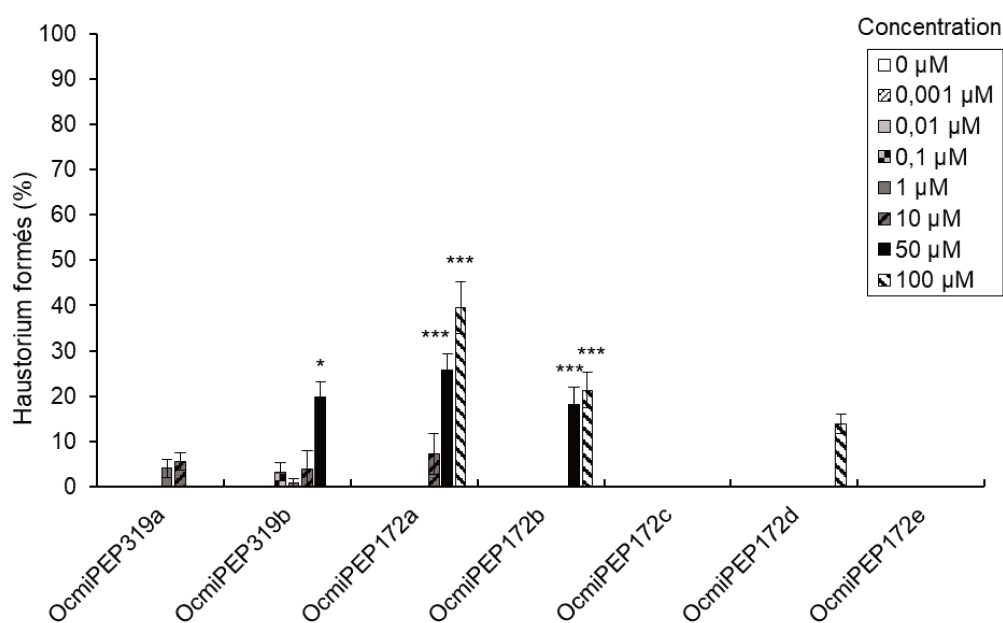
**Figure 1.6 : Effet de traitements avec des cytokinines sur la formation des haustoriums.**

La stimulation est dépendante de la concentration en CKs. Chaque CK possède une fenêtre d'action qui lui est spécifique.

### 1. Les miPEP d'*O. cumana*

Sept miPEP faisant partie de 2 familles ont été testés lors de l'haustoriogenèse chez *O. cumana*. Il s'agit de la famille des miR172 et celle des miR319. Ces deux familles de miARN ont été sélectionnées car des miPEP associés induisent une forte inhibition de la germination d'*O. cumana* (**Figure 1.4**). De plus, il a été montré que les miR319 et miR172 sont impliqués dans la régulation de la majorité des phytohormones dont les CKs (**Figure 23**, page 64 de l'introduction bibliographique, Curaba *et al.*, 2014). Ils sont donc de bons candidats pour moduler le processus d'haustoriogenèse. Les graines ont été préalablement désinfectées et conditionnées 7 jours à 25 °C dans le milieu d'incubation. Elles ont ensuite été traitées par du *rac*-GR24  $10^{-7}$  M et les miPEP à une gamme de concentrations allant de  $10^{-9}$  M à  $10^{-4}$  M. Le pourcentage d'haustoriogenèse a été déterminé 10 jours après les traitements.

Trois miPEP induisent la formation de l'haustorium chez *O. cumana* lorsqu'ils sont appliqués seuls sur des graines germées (**Figure 1.7**). Un des deux miPEP liés à la famille miR319, le miPEP319b, induit la formation de l'haustorium jusqu'à 19,8 % quand il est utilisé à une concentration de 50  $\mu\text{M}$ . Le miPEP172a est celui avec l'effet le plus fort, avec une induction maximale de  $39,5 \pm 5,9$  % lorsqu'il est utilisé à une concentration de 100  $\mu\text{M}$ . Il présente un effet dose/réponse avec une induction de l'haustoriogenèse plus faible à une concentration de 50  $\mu\text{M}$ . Un autre membre de la famille des miPEP172 induit la formation des haustoriums. Le miPEP172b présente ainsi un effet stimulant avec un maximum de  $21,2 \pm 3,9$  % à une concentration de 100  $\mu\text{M}$ . Les miPEP172a et b présentent leur effet le plus fort à 100  $\mu\text{M}$ , correspondant à la concentration maximale utilisée pour réaliser ce test (**Figure 1.7**). Ainsi, la fenêtre d'action de ces deux miPEP pourrait s'étendre au-delà de cette concentration. Les miPEP présentent le même profil que les CKs car tout comme les CKs, des concentrations trop élevées n'induisent pas la formation de l'haustorium (Goyet *et al.*, 2017).



**Figure 1.7 : Pourcentage d'haustoriums formés après un traitement par des miPEP de graines germées d'*O. cumana*.**

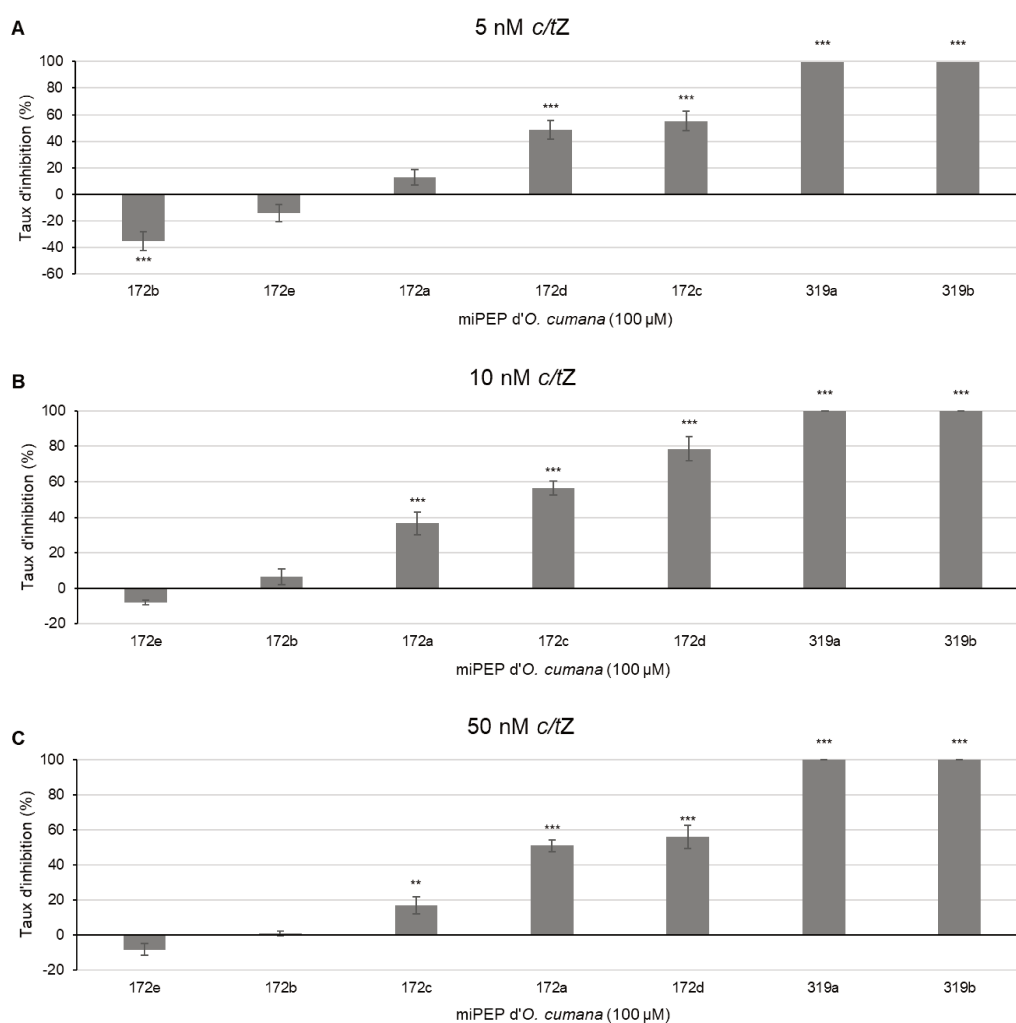
Un traitement avec le DCL à  $10^{-7}$  M permet de faire germer les graines d'orobanche. Le traitement avec les différents miPEP est effectué à 7 concentrations 54 h après la stimulation de la germination. Le pourcentage d'haustoriums formés est déterminé 10 jours après le traitement par les miPEP. Les moyennes et les erreurs standard sont issues de 6 réplicats biologiques. Une, deux et trois étoiles représentent respectivement des niveaux de significativité de  $p < 0,05$  ;  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$  d'après un test de Tukey-HSD.

Parmi les 7 miPEP testés en co-traitement avec la cytokinine *c/tZ* chez *O. cumana*, 5 induisent une diminution significative du pourcentage d'haustoriums formés et un seul induit une augmentation de ce pourcentage.

Les miPEP319a et b induisent une inhibition totale de la formation d'haustoriums à une concentration de 100  $\mu\text{M}$  couplée à un traitement avec la *c/tZ* aux trois concentrations utilisées :  $5.10^{-9}$ ,  $1.10^{-8}$  et  $5.10^{-8}$  M. Les miPEP172a, c et d induisent une inhibition du pourcentage d'haustoriums formés comprise entre environ 15 et 80 % avec une inhibition maximale de  $51,03 \pm 3,32$  %,  $56,36 \pm 3,89$  % et  $78,54 \pm 6,72$  % respectivement (**Figure 1.8**).

Le miPEP172b induit une augmentation significative du pourcentage d'haustoriums formés lorsqu'il est utilisé à 100  $\mu\text{M}$  en co-traitement avec la *c/tZ* à une concentration de  $5.10^{-9}$  M.

Le miPEP172e n'induit pas de modification significative du pourcentage d'haustoriums formés lorsqu'il est utilisé à une concentration de 100  $\mu\text{M}$  en co-traitement avec la *c/tZ*.

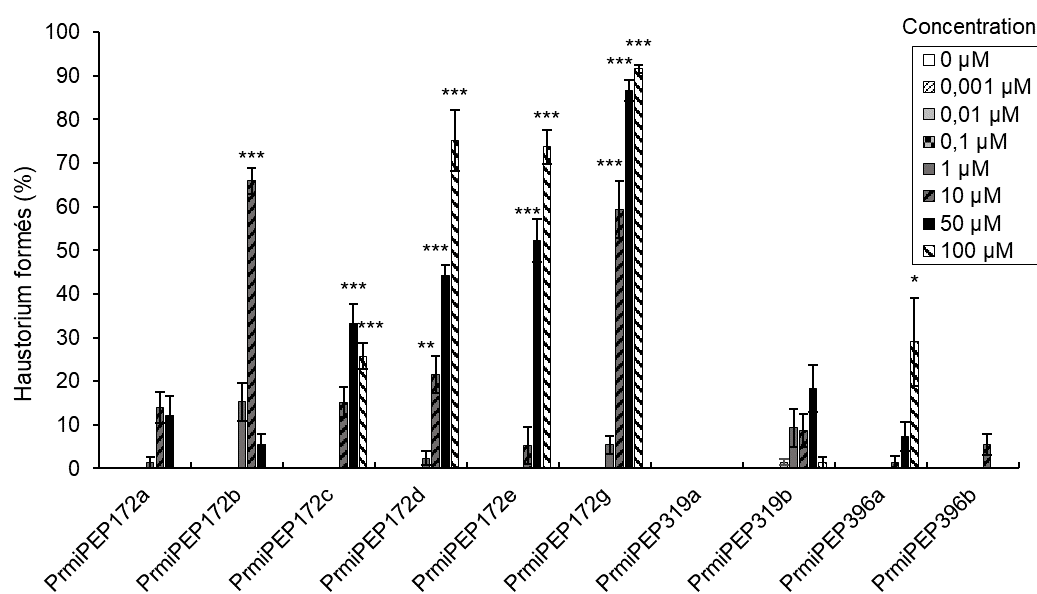


**Figure 1.8 : Pourcentage d'inhibition de la formation d'haustorium après un traitement avec des miPEP et une CK, la *c/tZ*, sur des graines germées d'*O. cumana*.**

Un traitement au DCL  $10^{-7}$  M induit la germination des graines d'orobanche. Les traitements miPEP 100  $\mu\text{M}$  et *c/tZ* à 3 concentrations  $5.10^{-9}$  M (A),  $1.10^{-8}$  M (B) et  $5.10^{-8}$  M (C) sont effectués 54 h après la stimulation de la germination. Le pourcentage d'haustoriums formés est déterminé 10 jours après le traitement par les miPEP. Les moyennes et les erreurs standard sont issues de 6 réplicats biologiques. Une, deux et trois étoiles représentent respectivement des niveaux de significativité de  $p < 0,05$  ;  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$  d'après un test de Tukey-HSD.

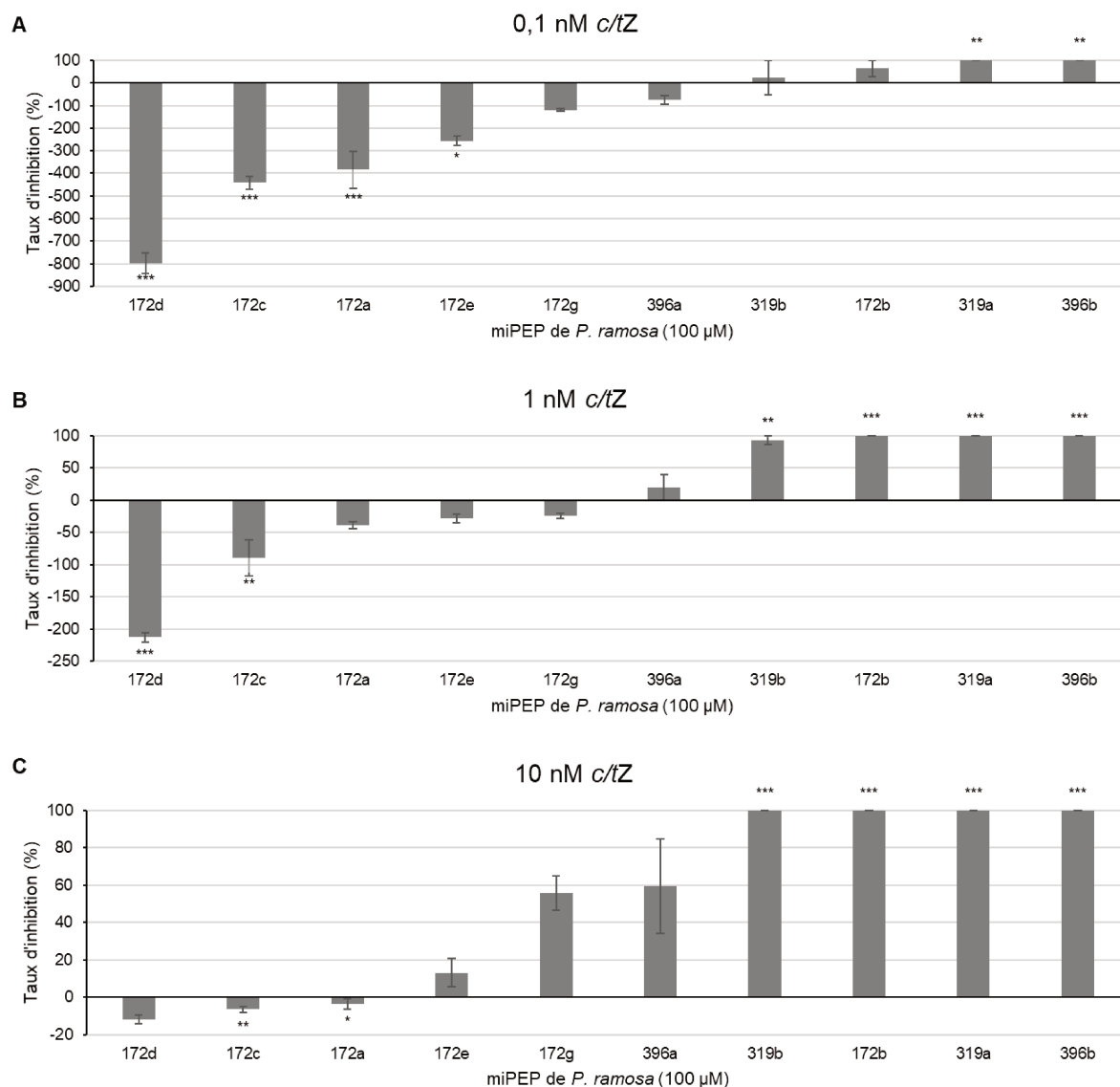
## 2. Les miPEP de *P. ramosa*

Parmi les 4 familles de miPEP identifiées chez *P. ramosa*, seulement 3 familles regroupant 10 miPEP ont été testées lors de l'haustoriogenèse. Il s'agit des miPEP liés aux miR172, miR319 et miR396. Ils ont été sélectionnés car ces 3 familles sont celles parmi lesquelles se trouvent des miPEP présentant un effet inhibiteur de la germination de *P. ramosa*. De plus, les miARN de ces 3 familles sont liés à la voie de réponse aux CKs (Curaba *et al.*, 2014). Six de ces 10 miPEP ont un effet inducteur de l'haustoriogenèse (**Figure 1.9**). Les miPEP319 n'ont pas d'effet inducteur de ce processus. Le miPEP396a induit la formation de l'haustorium avec un pourcentage maximal de  $29,1 \pm 10,1$  % pour une concentration en miPEP de  $100 \mu\text{M}$ . Les miPEP liés au miR172 présentent une large amplitude de réponse avec un effet inducteur supérieur à 50 % d'haustoriums formés pour 4 membres parmi les 6 testés. Le miPEP172g présente la plus forte induction avec un maximum de  $91,6 \pm 0,9$  % à la concentration maximale en miPEP utilisée pour ce test, de  $100 \mu\text{M}$ . L'activité haustoriogène du miPEP172g est similaire à celle des CKs chez *P. ramosa* et plus particulièrement à celle de la TDZ, la CK la plus active chez cet holoparasite (Goyet *et al.*, 2017).



**Figure 1.9 : Pourcentage d'haustoriogenèse après un traitement avec des miPEP sur des graines germées de *P. ramosa*.**

Un traitement avec le DCL à  $10^{-7}$  M permet de faire germer les graines d'orobanche. Le traitement avec les différents miPEP est effectué à 7 concentrations 4 jours après la stimulation de la germination. Le pourcentage d'haustoriums formés est déterminé 3 jours après traitement aux miPEP. Les moyennes et les erreurs standard sont issues de 6 réplicats biologiques. Une, deux et trois étoiles représentent respectivement des niveaux de significativité de  $p < 0,05$  ;  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$  d'après un test de Tukey-HSD.



**Figure 1.10 : Pourcentage d'inhibition de la formation d'haustorium après un traitement avec des miPEP et une CK, la *c/tZ*, sur des graines germées de *P. ramosa*.**

Un traitement avec le DCL à  $10^{-7}$  M permet de faire germer les graines d'orobanche. Les traitements sont effectués 96 h après la stimulation de la germination avec les différents miPEP à une concentration de 100  $\mu$ M et avec la *c/tZ* à 3 concentrations :  $1.10^{-10}$  M (A),  $1.10^{-9}$  M (B) et  $1.10^{-8}$  M (C). Le pourcentage d'haustoriums formés est déterminé 3 jours après le traitement avec les miPEP. Les moyennes et les erreurs standard sont issues de 6 réplicats biologiques. Une, deux et trois étoiles représentent respectivement des niveaux de significativité de  $p < 0,05$  ;  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$  d'après un test de Tukey-HSD.

Les 10 miPEP identifiés chez *P. ramosa* ont été utilisés en traitement couplé avec la *c/tZ* afin de visualiser l'effet potentiellement inhibiteur de la formation de l'haustorium de ces miPEP. Parmi ces miPEP, 4 induisent une inhibition de l'haustoriogenèse, 4 autres induisent une stimulation et 2 ne présentent pas d'effet sur ce processus biologique (**Figure 1.10**). Ces miPEP présentent un effet dose-réponse. Plus la concentration en CKs augmente et moins les miPEP qui stimulent l'haustoriogenèse n'ont d'effet et plus les miPEP qui l'inhibent ont de l'effet.

Parmi les 4 miPEP inhibiteurs, les miPEP319a et miPEP396b induisent une inhibition totale de ce processus aux trois concentrations en *c/tZ* utilisées ; et les miPEP319b et 172b induisent une inhibition totale ou presque aux concentrations en *c/tZ* supérieures ou égales à  $1.10^{-9}$  M (**Figure 1.10**).

Les miPEP172a, c, d et e présentent un effet stimulateur de l'haustoriogenèse lorsqu'ils sont utilisés en co-traitement avec la *c/tZ*. L'effet le plus fort a été observé à une concentration en CK de  $10^{-10}$  M et en miPEP de 100  $\mu$ M (**Figure 1.10 A**).

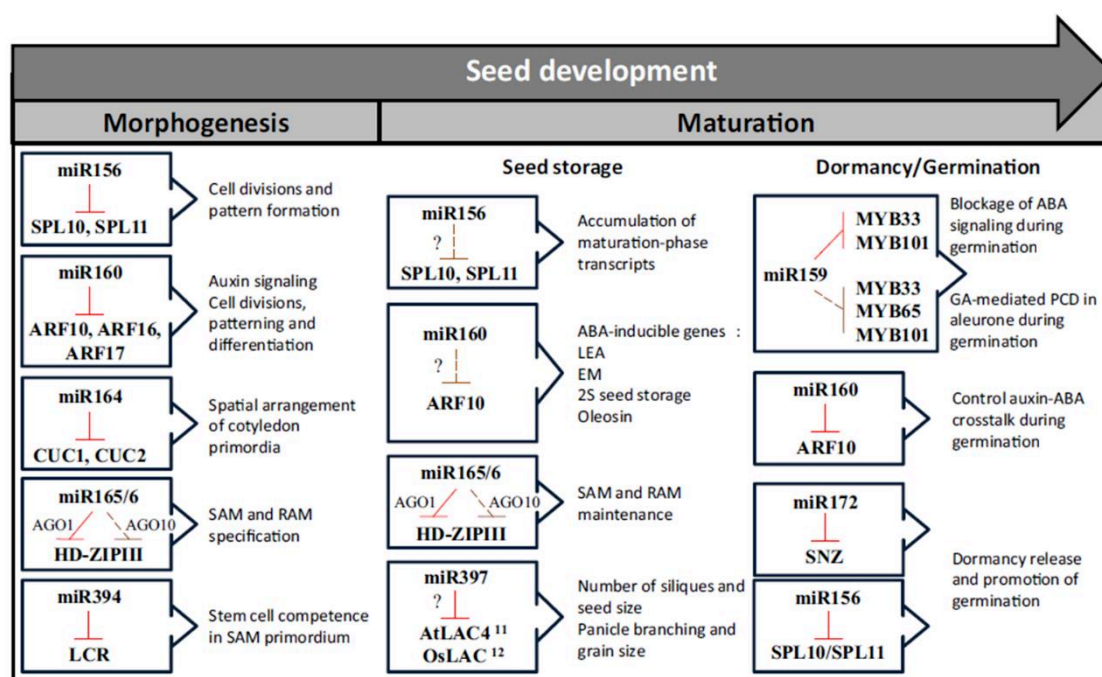
Les miPEP172g et miPEP396a n'induisent pas de modification significative du pourcentage d'haustoriums formés lorsqu'ils sont utilisés à 100  $\mu$ M en co-traitement avec la *c/tZ* à  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$  et  $10^{-8}$  M (**Figure 1.10**).

## IV. Discussion

Les résultats des expérimentations réalisées dans ce chapitre ont permis d'identifier les gènes cibles de miARN différentiellement exprimés lors de la germination d'*O. cumana* tels que des *SPLs*, des *MYBs*, des *ARFs*, des *HAMs*, des *TOEs*, des *TCPs*, des *FBs*, un *Galactose oxidase*, des *GRFs*, des *HBs*, un *PHY* et un *PHB*, cibles de miR156, 159, 160, 165/166, 167, 171, 172, 319, 393, 394 et 396 (**Figure 1.3**). Ils ont également permis de mettre en évidence l'action de miPEP sur des processus biologiques spécifiques aux plantes parasites induits par l'hôte : la germination et l'haustoriogenèse. Ces effets ont été montrés sur des graines d'*O. cumana* et de *P. ramosa*.

### ***L'expression de gènes cibles de miARN est modulée lors de la germination***

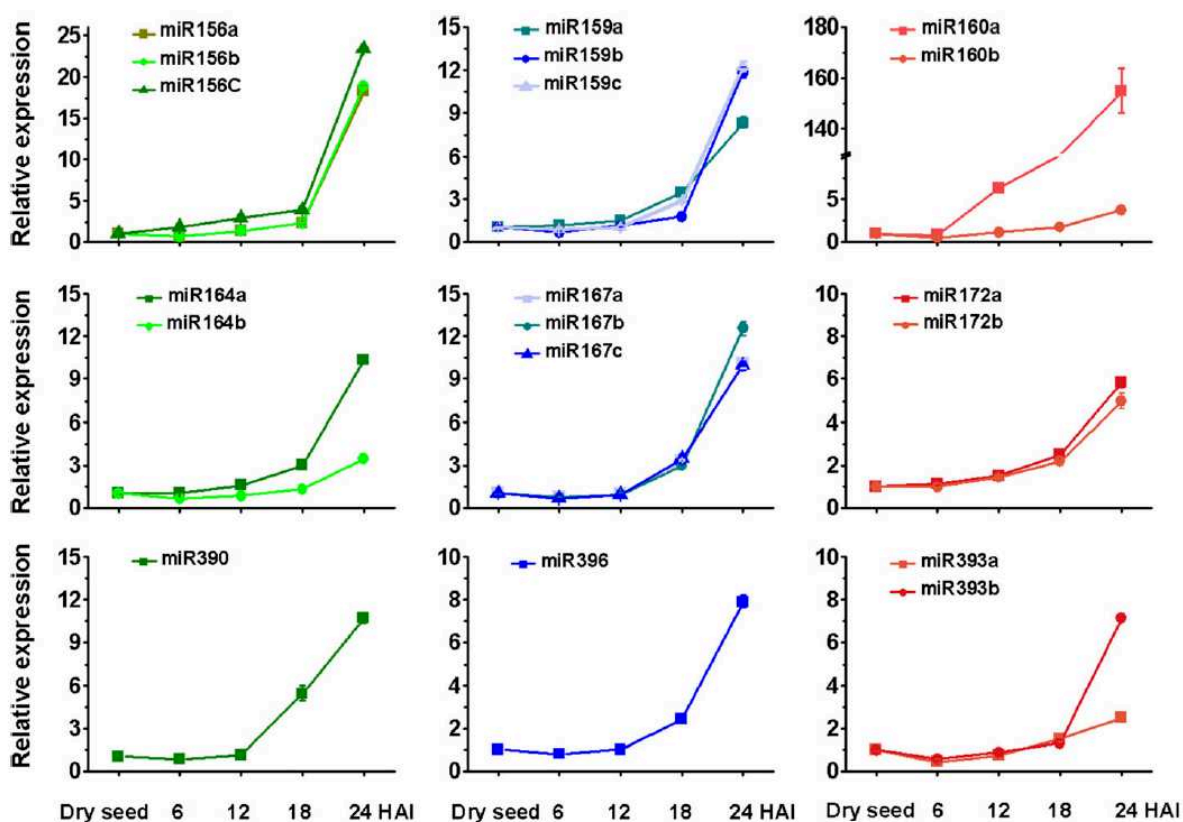
Les miARN sont impliqués dans une multitude de processus biologiques dont font partie l'imbibition et la germination des graines (**Figure 1.11**, Rodrigues and Miguel, 2017). Lors de ces processus, leurs niveaux d'expression peuvent être modulés par des facteurs environnementaux tels que la température (Huo *et al.*, 2016), la sécheresse (Ferdous *et al.*, 2017) et les stress salins (Ding *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2015).



**Figure 1.11 : Les microARNs et leurs gènes cibles respectifs sont impliqués dans le développement et la germination des graines (Rodrigues and Miguel, 2017).**

Seules sont représentées les interactions entre les miARN et leurs gènes cibles dont la fonction dans le développement des graines a été validée par des expérimentations. Les lignes pleines terminées par une barre représentent une régulation post-transcriptionnelle active par dégradation de l'ARNm cible ou par inhibition de sa traduction. Les lignes en pointillé indiquent une diminution de l'efficacité de la régulation post-traductionnelle du gène cible. Les points d'interrogations représentent les gènes cibles de miARN pour lesquels la validation de l'interaction a été observée à une autre étape du développement de la graine.

Une étude réalisée sur le maïs a par exemple montré la régulation négative d'une grande quantité de miARN 24 h après imbibition des graines à température ambiante (**Figure 1.1**, Li *et al.*, 2013). Une autre étude menée sur l'orge a, au contraire mis en évidence une surexpression des miARN 24 h après imbibition des graines (**Figure 1.12**, Bai *et al.*, 2017). L'imbibition des graines d'orge n'a pas été réalisée à température ambiante mais à 4 °C. Cette dualité de réponse en fonction de la température a également été observée chez *A. thaliana* avec une majorité des miARN sur-exprimés à 4 °C mais sous-exprimés à température ambiante (Das *et al.*, 2018). Ainsi, la température lors de l'imbibition des graines est un facteur influençant l'expression des miARN et donc des gènes cibles correspondants.



**Figure 1.12 : Détection des miARN par qRT-PCR en temps réel durant l'imbibition des graines d'orge (Bai *et al.*, 2017).**

Les ARNs totaux ont été isolés à partir d'embryons de trois réplicats biologiques sur graines sèches et 6, 12, 18 et 24 HAI (heures après imbibition) à 4 °C. Les niveaux d'expression des graines sèches ont été fixés à 1.

L'étude de l'expression de gènes cibles de miARN chez *O. cumana* a permis de mettre en évidence une augmentation significative de l'expression de la majorité des gènes étudiés 48 h après stimulation de la germination (**Figure 1.3, Tableau 1.2**). Des gènes cibles des miR156, miR159, miR160, miR164, miR165/166, miR167, miR171, miR172, miR319, miR393, miR394 et miR396 sont ainsi sur-exprimés. La surexpression de gènes cibles de miARN impliquerait ainsi la sous-expression de ces miARN. Ces résultats concordent avec ceux obtenus lors de l'imbibition et la germination des graines de maïs à température ambiante (**Figure 1.1**). En effet, une augmentation des niveaux d'expression est observée pour des gènes cibles de miR156, miR164, miR166, miR167, miR169, miR319 et miR393 (Li *et al.*, 2013). Le gène *PHV* cible des miR165/166 ainsi que les gènes *GRFc* et *GRFe* cibles des miR396 sont sous-exprimés lors de la germination contrairement aux autres gènes cibles de ces miARN. Cette sous-expression pourrait être causée par d'autres mécanismes de régulation transcriptionnelle plus complexes. Les gènes cibles du miR169 ne montrent pas de modification de leur niveau d'expression 48 h après stimulation de la germination, ce miARN ne semble donc pas impliqué dans le processus de germination d'*O. cumana* (**Figure 1.3, Tableau 1.2**). Les miPEP correspondant aux miARN dont l'expression des gènes cibles est modulée sont de bons candidats pour inhiber ou stimuler la germination des graines d'*O. cumana*.

**Tableau 1.2 : Synthèse de la modification de l'expression relative des gènes cibles de miARN chez *O. cumana*.**

L'expression relative de gènes cibles de miARN est analysée 48 h après traitement avec du *rac*-GR24  $10^{-7}$  M. Les gènes cibles ont été regroupés par familles de miARN et classés en 3 catégories selon leur modification d'expression 48h après stimulation de la germination : sous-exprimé, non modulé et sur-exprimé.

	Sous-exprimé	Expression relative non modulée	Sur-exprimé
<i>O. cumana</i>	<i>PHV</i> (miR165/166) <i>GRFc, e</i> (miR396)	<i>NF-YAa, b</i> (miR169)	<i>SPLb, c, d</i> (miR156) <i>MYB101, MYB33</i> (miR159) <i>ARF16, 17</i> (miR160) <i>HB15 ou 8</i> (miR165/166) <i>ARFa</i> (miR167) <i>HAMa, b, c</i> (miR171) <i>TOEa, b, d</i> (miR172) <i>TCP3, MYB33</i> (miR319) <i>FBc, d</i> (miR393) <i>Galactose oxydase</i> (miR394) <i>GRFa, d</i> (miR396) <i>NAMb, NAMc</i> (miR164)

### Les miPEP influencent la germination et l'haustoriogénèse

L'ajout de miPEP stimulant spécifiquement l'expression de leur miARN correspondant permet de moduler des processus biologiques. Il a par exemple été montré que l'ajout de miPEP pouvait modifier le mécanisme de nodulation (Couzigou *et al.*, 2016) ou encore le développement de la racine primaire et la floraison (Ormancey *et al.*, 2020). Les résultats des expérimentations réalisées ont montré que l'application de ces miPEP ne permet pas de stimuler la germination des graines d'*O. cumana* ni de *P. ramosa*. L'application de certains miPEP en co-traitement avec du *rac*-GR24 permet en revanche d'inhiber partiellement ou totalement la germination des graines d'*O. cumana* et de *P. ramosa* (**Tableau 1.3**). Ces miPEP agissent soit en inhibant la protrusion des radicules uniquement, soit en inhibant la reprise métabolique des graines ainsi que la protrusion des radicules.

**Tableau 1.3 : Synthèse de l'effet des miPEP lors de la germination d'*O. cumana* et de *P. ramosa*.**

L'effet inhibiteur des miPEP d'*O. cumana* a été visualisé à la suite d'un co-traitement avec des miPEP à 100  $\mu$ M et du *rac*-GR24 à  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$  ou  $10^{-8}$  M pour *O. cumana* et à  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$  et  $10^{-9}$  M pour *P. ramosa*. Une distinction est effectuée entre l'inhibition de la protrusion des radicules accompagnée de l'inhibition de la reprise métabolique et l'inhibition de la protrusion des radicules uniquement.

	miPEPs sans effet	miPEPs avec un effet inhibiteur en co-traitement avec un stimulant de germination	
		Protrusion	Reprise métabolique + protrusion
<i>O. cumana</i>	miPEP156c, e miPEP165/166a, b, c, e miPEP168 miPEP171a miPEP172d, e miPEP319b miPEP390 miPEP394	miPEP156b, d, f miPEP160a, b, c, d, e miPEP167a, b, c miPEP169a miPEP171b, c miPEP172c miPEP393a miPEP396c	miPEP156a miPEP159 miPEP164 miPEP165/166d miPEP169b miPEP172a, b miPEP319a miPEP393b miPEP395 miPEP396a, b
<i>P. ramosa</i>	miPEP156a, b, c, d, e, f, g miPEP172c, d, e, g miPEP319b miPEP396a	miPEP172b miPEP396b	miPEP319a

Concernant le processus d'haustoriogenèse, la majorité des miPEP testés montre un effet stimulant lorsqu'ils sont utilisés seuls ou en co-traitement, et/ou un effet inhibiteur en co-traitement avec une cytokinine (**Tableau 1.4**).

**Tableau 1.4 : Synthèse de l'effet des miPEP lors de l'haustoriogenèse d'*O. cumana* et de *P. ramosa*.**

L'effet inhibiteur des miPEP d'*O. cumana* a été visualisé à la suite d'un co-traitement avec les miPEP à 100  $\mu\text{M}$  et la *c/tZ* à  $5.10^{-9}$ ,  $1.10^{-8}$  ou  $5.10^{-8}$  M. Le co-traitement est effectué avec les miPEP à 100  $\mu\text{M}$  et la *c/tZ* à  $1.10^{-10}$ ,  $1.10^{-9}$  et  $1.10^{-8}$  M pour *P. ramosa*. L'effet inducteur de l'haustoriogenèse est visualisé après traitement des graines prégermées avec les miPEP à des concentrations allant de  $10^{-4}$  à  $10^{-9}$  M.

	miPEPs sans effet	miPEPs avec un effet inhibiteur en co-traitement avec la <i>c/tZ</i>	miPEPs avec un effet inducteur ou stimulant
<i>O. cumana</i>	miPEP172e	miPEP172a, c, d miPEP319a, b	miPEP172a, b miPEP319b
<i>P. ramosa</i>	-	miPEP172b miPEP319a, b miPEP396b	miPEP172a, b, c, d, e, g miPEP396a

Douze miPEP faisant partie de 10 familles sont des inhibiteurs de la protrusion des racines et de la reprise métabolique des graines d'*O. cumana* (**Tableau 1.3**) Il s'agit des miR156, miR159, miR164, miR165/166, miR169, miR172, miR319, miR393, miR395 et miR396. Dix-sept miPEP associés à 8 familles de miARN, les miR156, miR160, miR167, miR169, miR171, miR172, miR393 et miR396, inhibent uniquement la protrusion des racines des graines d'*O. cumana*. Pour finir, 13 miPEP n'induisent pas de modification de la germination des graines d'*O. cumana*. Ils sont associés aux familles des miR156, miR165/166, miR168, miR171, miR172, miR319, miR390 et miR394. Concernant *P. ramosa*, seul un miPEP associé à la famille des miR319 induit une inhibition de la protrusion et de la reprise métabolique ; deux miPEP associés aux familles des miR172 et miR396 inhibent uniquement la protrusion des racines. Les autres miPEP associés aux familles des miR156, miR172, miR319 et miR396 n'induisent pas de modification de la germination de *P. ramosa* dans ces conditions de test. Ainsi, des miPEP associés à une même famille de miARN peuvent présenter différents profils de réponses sur le processus de germination soit en inhibant uniquement la protrusion des racines, soit en inhibant à la fois la protrusion des racines et la reprise métabolique ou encore en n'induisant aucune modification lors de la germination des graines. Les miR159 ciblent deux gènes *MYB33* ainsi qu'un autre gène, le *MYB101* (**Figure 27**, page 69 de l'introduction bibliographique). La surexpression de ces deux gènes lors de la germination d'*O.*

*cumana* met en évidence leur probable implication dans ce processus biologique (**Figure 1.3**). La surexpression de cette famille de gènes a déjà été mise en évidence lors de l'imbibition et de la germination des grains de maïs (Li *et al.*, 2013). Des travaux ont montré l'implication des gènes *MYBs* dans la voie de signalisation de l'ABA (Reyes and Chua, 2007), une phytohormone inhibitrice de la germination et stimulatrice de la dormance des graines (Lechat *et al.*, 2012; Shu *et al.*, 2015, 2016). L'effet de ce miPEP lors de l'haustoriogenèse n'a pas été caractérisé car il présente le même profil de réponse que le miPEP319a chez *O. cumana*. De plus, le miR159 est impliqué dans les mêmes voies de signalisation que le miR319 *via* la régulation du gène *MYB33*. Le miR159 est également impliqué dans le développement floral (Achard *et al.*, 2004), le contrôle de la mort cellulaire programmée (Martin *et al.*, 2010a) et le développement de la racine primaire (Xue *et al.*, 2017). Leur implication dans la dormance et la germination des graines a été mise en évidence chez *A. thaliana* (Reyes and Chua, 2007). Le miPEP associé à la famille du miR159 n'a pas été identifié chez *P. ramosa*.

Les 5 miPEP160 identifiés chez *O. cumana* induisent une inhibition quasi-totale de la protrusion des racicules sans modifier le pourcentage de reprise métabolique des graines (**Tableau 1.3**). Les miARN correspondant à ces miPEP agiraient donc au niveau de la protrusion des racicules, après la perception des stimulants de germination et initiation de la reprise métabolique des graines. Leurs actions diffèrent de celles des miPEP156, miPEP159, miPEP164, miPEP165/166, miPEP169, miPEP172, miPEP319, miPEP393, miPEP395 et miPEP396 (**Tableau 1.3**) qui inhibent également la reprise métabolique des graines. Ces miPEP agiraient, contrairement aux miPEP160, au niveau de la perception des stimulants de germination ou dans la cascade de signalisation en amont de la reprise métabolique. Les miR160 ciblent des *ARFs*. L'analyse de l'expression relative de l'*ARF16* lors de la germination d'*O. cumana* montre une forte induction de son expression (**Figure 1.3**). Les *ARF10* et *ARF16* sont impliqués dans la régulation du développement de la coiffe racinaire en inhibant la division et stimulant la différenciation cellulaire chez *A. thaliana* (Wang *et al.*, 2005). Une surexpression de ces *ARFs* induit une baisse de la sensibilité des plantes à l'auxine. Une surexpression des miR160 induit donc une hypersensibilité à l'auxine mais aussi à une hyposensibilité aux cytokinines chez le soja (Turner *et al.*, 2013). L'*ARF17* est également sur-exprimé lors de la germination induite d'*O. cumana* (**Figure 1.3**). Ce gène est un inhibiteur du développement des racines latérales chez *A. thaliana* (Gutierrez *et al.*, 2009).

L'application de miPEP164 sur des graines stimulées au *rac*-GR24 induit une inhibition de la protrusion des racicules et de la reprise métabolique (**Figure 1.4**). Les gènes cibles du miR164 sont sur-exprimés chez *O. cumana* lors de la germination. Le miR164 serait donc potentiellement impliqué dans la germination des graines d'*O. cumana*. Ce miPEP n'a pas été

sélectionné pour caractériser son effet lors de l'haustoriogenèse. Le miPEP correspondant au miR164 n'a pas été identifié chez *P. ramosa*.

Parmi les 5 miPEP identifiés chez *O. cumana* à partir des miR165/166, un seul montre un effet inhibiteur de la germination (**Figure 1.4**). Les gènes cibles des miR165/166 présentent une réponse antagoniste lors de la germination (**Figure 1.3**). En effet, le gène *HB-15/8* est sur-exprimé alors que le gène *PHV* est sous-exprimé. Le gène *PHV* stimule le SAM et donc le développement des méristèmes de tige (Prigge *et al.*, 2005; Itoh *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2015). La germination n'implique pas le développement des tiges, la sous-expression du gène *PHV* lors de la germination est donc cohérente. Les gènes *HB-15/8* sont par exemple sur-exprimés lors de la formation de l'haustorium chez *P. japonicum* (Wakatake *et al.*, 2018). La surexpression de ce gène lors de la germination, un processus biologique impliquant également le développement des racines, n'est donc pas surprenante.

Les miPEP167 présentent le même profil de réponse phénotypique que les miPEP160 lors de la germination d'*O. cumana* en inhibant uniquement la protrusion de la radicule des graines (**Figure 1.4**). Les miR167 ciblent également des *ARFs*. Parmi les trois gènes cibles identifiés, un seul montre une augmentation de son expression relative lors de la germination d'*O. cumana* (**Figure 1.3**). Les gènes cibles des miR167 sont des *ARF6* et *8* stimulant la formation de racines latérales ayant un effet opposé aux *ARF10*, *16* et *17*, inhibiteur de ce processus chez *A. thaliana* (Gutierrez *et al.*, 2009).

Le miPEP168 n'induit pas de modification du processus de germination d'*O. cumana*. Les gènes cibles du miARN associé n'ont pas été identifiés chez *O. cumana*. Ce miARN cible *AGO1* et est impliqué dans le développement de parties aériennes des plantes comme cela a été montré chez la tomate (Xian *et al.*, 2014). Il ne serait donc probablement pas impliqué dans la germination des plantes holoparasites.

Les miPEP169 induisent une inhibition de la protrusion des racicules et de la reprise métabolique chez *O. cumana* (**Figure 1.4**). Cependant, aucune modification significative de l'expression des gènes cibles des miR169 identifiés et étudiés n'est observée (**Figure 1.4**). Les miR169 ciblent des facteurs de transcription nucléaire, *NF-YA*, impliqués dans différents processus biologiques tels que la gamétogénèse, l'embryogénèse (Mu *et al.*, 2013) et la tolérance à la sécheresse (Li *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011; Ni *et al.*, 2013). Même si les miR169 sont conservés entre les espèces, leurs rôles semblent être espèce spécifiques. Les miR169 vont par exemple favoriser la tolérance vis-à-vis de la sécheresse chez *Solanum lycopersicum* alors qu'ils vont la diminuer chez *A. thaliana* (Kamthan *et al.*, 2015). Une surexpression des miR169 induit un arrêt du développement des méristèmes chez *Medicago truncatula* (Combier *et al.*, 2006), ce qui concorde avec l'effet inhibiteur de la germination des

graines d'*O. cumana*. Les analyses des expressions relatives des gènes sont effectuées à un temps donné, ici 48 h après traitement. L'absence de modification transcriptionnelle des gènes cibles de ces miARN à ce timing n'indique pas une absence totale de modification de leurs expressions lors de la germination. Il existe des mécanismes transcriptionnels de rétrocontrôle de l'expression des gènes pouvant s'être déroulés avant le timing d'analyse choisi.

Trois miPEP171 ont été identifiés chez *O. cumana*. Deux d'entre eux sont inhibiteurs de la protrusion des racines uniquement (**Figure 1.4**). Les trois gènes cibles des miR171 étudiés, *HAMa*, *HAMb* et *HAMc* sont sur-exprimés lors de la germination d'*O. cumana* (**Figure 1.3**). Ces gènes sont impliqués dans le développement de l'embryon et dans la régulation des méristèmes apicaux de tige. Il a été montré que les miR171 sont exprimés dans les cellules de surface de l'embryon et dans les méristèmes apicaux de tige d'*A. thaliana* (Takanashi *et al.*, 2018). Les résultats présentés dans ce chapitre mettent en évidence l'implication des miR171 dans la germination de cette plante holoparasite.

Les miPEP172 présentent des effets différents allant de l'inhibition de la protrusion de la racine seule ou avec inhibition de la reprise métabolique ; jusqu'à l'absence d'effet sur les graines d'*O. cumana*, comme cela a été visualisé avec les miPEP156. Un seul miPEP172 de *P. ramosa* induit une inhibition de la protrusion des racines de cette plante parasite. Les gènes *TOE*, cibles des miR172, sont sur-exprimés de manière exponentielle lors de la germination d'*O. cumana* (**Figure 1.3**). Le gène *TOEb* présente la plus grande surexpression allant jusqu'à plus de 360 fois lors de la germination d'*O. cumana*. La modification de l'expression des gènes cibles des miR172 concorde avec l'effet phénotypique de ces miPEP observé lors de la germination des graines d'*O. cumana*. De plus, les miR172 ont été montrés comme impliqués dans l'induction florale (Yu *et al.*, 2012) et dans le développement des graines (Martin *et al.*, 2010a). Les miR172 seraient donc impliqués dans le processus de germination des graines d'*O. cumana*. Ces miPEP ont ensuite été testés sur le mécanisme d'haustoriogenèse d'*O. cumana* et de *P. ramosa* (**Tableau 1.3**). Cette famille de miPEP est celle présentant l'effet inducteur de l'haustoriogenèse le plus fort parmi l'ensemble des miPEP testés chez *O. cumana* (**Figure 1.7**) et *P. ramosa* (**Figure 1.9**). L'utilisation de ces miPEP en co-traitement avec des cytokinines induit une inhibition de l'haustoriogenèse aux concentrations les plus fortes en cytokinines chez *O. cumana* (**Figure 1.8**) alors que le miPEP172b présente un effet inducteur lorsqu'il est utilisé seul (**Figure 1.7**). L'ajout de CKs supplémentaires à une concentration en miPEP déjà élevée pourrait induire une sortie de la gamme de concentration de miPEP inductrice de l'haustoriogenèse. Cette gamme de concentration précise, nécessaire à l'effet inducteur de l'haustoriogenèse, a été montrée pour les CKs (Goyet *et al.*, 2017) et pourrait expliquer cette dualité de réponse des miPEP. Le miPEP172b stimule l'haustoriogenèse à une faible concentration en CKs. Chez *P. ramosa*,

seul un miPEP172 inhibe la formation de l'haustorium (**Figure 1.10**). Les autres stimulent l'haustoriogenèse lorsqu'ils sont utilisés en co-traitement avec les CKs.

Deux miPEP associés à la famille des miR319 ont été identifiés chez *O. cumana* et *P. ramosa*. Dans ce chapitre, nous avons montré que le miPEP319a d'*O. cumana* inhibe totalement la reprise métabolique des graines à de faibles concentrations en *rac*-GR24 alors que le miPEP319b ne présente pas d'effet significatif lors de la germination (**Figure 1.4**). Le miPEP319b d'*O. cumana* induit la formation des haustoriums lorsqu'il est appliqué seul (**Figure 1.7**). Les miPEP319a et miPEP319b d'*O. cumana* inhibent totalement l'haustoriogenèse lorsqu'ils sont utilisés en co-traitement avec une cytokinine, la *c/tZ*, inductrice de ce processus en condition contrôle (**Figure 1.8**). Le même profil de réponses est observé avec les miPEP319 de *P. ramosa* présentant un effet inhibiteur total de la protrusion et de la reprise métabolique pour le miPEP319a et une absence d'effet pour le miPEP319b aux différentes concentrations testées (**Figure 1.5**). Les miPEP319 de *P. ramosa* n'induisent pas la formation des haustoriums et inhibent totalement la formation des haustoriums lorsqu'ils sont utilisés en co-traitement avec la *c/tZ* (**Figure 1.10**). Les miR319 sont impliqués dans la régulation des voies de signalisation de la majorité des phytohormones (**Figure 23**, Curaba *et al.*, 2014; Bai *et al.*, 2017) et sont donc impliqués dans une multitude de processus biologiques. Le rôle des miR319 dans la régulation de la dormance et de la germination a été montré sur des graines d'*A. thaliana* (Reyes and Chua, 2007; Li *et al.*, 2013). Les résultats présentés dans ce chapitre montrent l'implication des miR319 dans la germination et l'haustoriogenèse des plantes holoparasites, *O. cumana* et *P. ramosa*. Les analyses moléculaires réalisées ont mis en évidence la surexpression d'un des deux *TCPs* identifiés comme gène cible des miR319 chez *O. cumana*, lors de la germination (**Figure 1.3**). Une modification de l'expression de ces gènes va induire une modification de plusieurs cascades de régulation. En effet, les *TCPs* stimulent l'expression des *MIR164* impliqués notamment dans la régulation de la prolifération cellulaire, de la floraison et du développement des racines latérales (**Figure 28**). Les analyses moléculaires effectuées ont également mis en évidence une surexpression d'un gène *MYB33*, un autre gène cible des miR319, lors de la germination d'*O. cumana* (**Figure 1.3**). L'ensemble de ces résultats d'analyse d'expression de gènes confirment l'implication des miR319 dans le processus de germination des graines d'*O. cumana*.

Le miPEP390 n'induit pas de modification du processus de germination d'*O. cumana*. Les gènes cibles du miARN associé n'ont pas été identifiés chez *O. cumana*. Ce miARN cible des ARNs non codants, *TAS3* (Axtell *et al.*, 2006) ciblant eux-mêmes les *ARF3* et *4* (Allen *et al.*, 2005). Le miR390 est impliqué dans la régulation du développement des parties aériennes. Ce

miARN ne serait donc probablement pas impliqué dans la germination des plantes holoparasites.

Un membre de la famille des miPEP393 inhibe lui aussi la protrusion de la radicule et la reprise métabolique des graines d'*O. cumana* à de faibles concentrations en *rac*-GR24 (**Figure 1.4**). Les miR393 sont notamment impliqués dans la signalisation auxinique (Navarro *et al.*, 2006), dans la régulation de la mycorhization (Etemadi *et al.*, 2014) et dans la croissance racinaire (Bian *et al.*, 2012). Les deux gènes cibles de ces miARN sont surexprimés lors de la germination d'*O. cumana* (**Figure 1.3**). Ces miARN semblent donc impliqués dans la germination de cette plante holoparasite. L'ajout des miPEP correspondants inhiberait cette surexpression et induirait une inhibition de la germination, ce qui a été observé lors de ces expérimentations (**Tableau 1.2**). L'action de ces miPEP n'a pas été caractérisée lors de l'haustoriogenèse des graines d'*O. cumana* au vu du grand nombre de miPEP identifiés chez cette dernière, de la complexité et du temps de réalisation des tests d'haustoriogenèse. Le choix s'est orienté vers l'analyse des miPEP319, présentant le même profil de réponse phénotypique que les miPEP393, et dont les miARN sont liés à la majorité des phytohormones (**Figure 23**). Les miPEP associés à la famille des miR393 n'ont pas été identifiés chez *P. ramosa*, le génome ayant été séquencé de manière plus tardive, l'identification des miPEP a été restreinte à ceux présentant le plus grand intérêt au vu des résultats obtenus chez *O. cumana*.

L'application du miPEP394 sur des graines d'*O. cumana* stimulées au *rac*-GR24 n'induit pas de modifications significatives de la germination (**Figure 1.4**). Une augmentation de l'expression relative du gène *Galactose oxidase* est observée lors de la germination de cette plante parasite. Cette surexpression reste cependant à la limite du seuil de significativité avec une expression relative à 2,06 avec un seuil à 2. Les gènes cibles *LCR*, majoritaires des miR394 n'ont pas été identifiés chez *O. cumana*. Ce miARN ne semble pas être impliqué de façon majoritaire dans le processus de germination.

Le miPEP395 est inhibiteur de la protrusion de la radicule des graines d'*O. cumana* mais aussi de la reprise métabolique (**Figure 1.4**). Cette famille de miARN cible des *APS* et *SULTR* impliqués dans l'assimilation et le transport du sulfate (Kim *et al.*, 2010). Ces gènes n'ont pas été identifiés chez *O. cumana*. Des travaux ont montré l'implication des miR395 dans la germination en conditions de stress abiotiques chez *A. thaliana* (Kim *et al.*, 2010).

Les miPEP396 inhibent la protrusion des radicules et/ou la reprise métabolique d'*O. cumana* (**Figure 1.4**). Deux miPEP396 ont été identifiés chez *P. ramosa*. Un seul montre un effet inhibiteur de la germination de cette plante holoparasite (**Figure 1.5**). L'application du miPEP396a de *P. ramosa* sur des graines prégermées induit la formation d'haustoriums

lorsqu'il est appliqué seul (**Figure 1.9**). Les deux miPEP396 de *P. ramosa* inhibent la formation d'haustoriums lorsqu'ils sont appliqués en co-traitement avec des CKs (**Figure 1.10**). Les gènes cibles des miR396 présentent une réponse antagoniste lors de la germination des graines d'*O. cumana* (**Figure 1.3**). Deux *GRFs* sont sous-exprimés et deux autres sont sur-exprimé. Les *GRFs* stimulent la prolifération cellulaire et régulent ainsi la taille des méristèmes (Rodriguez *et al.*, 2010). Les résultats de l'effet des miPEP396 lors de la germination et de l'haustoriogénèse concordent avec une inhibition des *GRFs*, stimulateurs de la prolifération cellulaire et donc du développement.

L'ensemble de ces données démontrent l'implication des miR156, miR159, miR160, miR165/166, miR167, miR171, miR172, miR319, miR393 et miR396 dans les mécanismes de germination et d'haustoriogénèse des plantes holoparasites (**Tableau 1.5**).

**Tableau 1.5 : Tableau récapitulatif des modifications de l'expression relative de gènes cibles de miARN à la suite d'un traitement au rac-GR24 lors de la germination d'*O. cumana* ; et de l'effet phénotypique des miPEP d'*O. cumana* et de *P. ramosa* lors de la germination et de l'haustoriogénèse.**

Les effets stimulants sont représentés par un '+' et les effets inhibiteurs par un '-'. Les '+' et '-' représentent un effet stimulant ou inhibiteur selon le gène cible étudié ou selon le miPEP utilisé, associé à une même famille de miARN. Les 'Ø' représentent une absence de modification. Les cases grisées représentent une absence de résultats découlant de l'absence de tests pour ces conditions.

	Expression relative des gènes cibles lors de la germination d' <i>O. cumana</i>	Protrusion des racines		Reprise métabolique des graines		Haustoriogénèse	
		miPEP d' <i>O. cumana</i>	miPEP de <i>P. ramosa</i>	miPEP d' <i>O. cumana</i>	miPEP de <i>P. ramosa</i>	miPEP d' <i>O. cumana</i>	miPEP de <i>P. ramosa</i>
miR156	+	-	Ø	-	Ø		
miR159	+	-		-			
miR160	+	-		Ø			
miR164	+	-		-			
miR165/166	+ et -	-		-			
miR167	+	-		Ø			
miR168		Ø		Ø			
miR169	Ø	-		-			
miR171	+	-		Ø			
miR172	+	-	-	-	Ø	+ et -	+ et -
miR319	+	-	-	-	-	+ et -	-
miR390		Ø		Ø			
miR393	+	-		-			
miR394	+	Ø		Ø			
miR395		-		-			
miR396	+ et -	-	-	-	Ø		+ et -

Les miARN font partie d'un réseau d'interactions complexes de régulation de l'expression de gènes cibles primaires, majoritairement des facteurs de transcription, régulant à leur tour l'expression de gènes secondaires. Les miARN régulent également l'expression d'autres gènes *MIR* et donc la cascade de régulation correspondant aux miARN associés. De plus, il existe des boucles de rétrocontrôle de l'expression des gènes *MIR* modifiant donc leurs propres expressions et celles de leurs gènes cibles. Il est par conséquent difficile de prédire et d'identifier avec certitude l'effet des miPEP dans les mécanismes de régulation moléculaires.

Une caractérisation plus fine des effets phénotypiques et moléculaires de quelques miPEP a été réalisée afin de déterminer plus précisément l'effet de ces miPEP lors de la germination et de l'haustoriogenèse de *O. cumana* et de *P. ramosa*. Les résultats de cette caractérisation sont présentés dans le chapitre 2.



# Chapitre 2



# Chapitre 2 : Les miPEP peuvent modifier les étapes clés du développement des orobanches et leur capacité d'infestation

## I. Introduction

Les cribrages des effets des miPEP identifiés chez *O. cumana* et *P. ramosa* lors des processus de germination et d'haustoriogénèse, présentés dans le chapitre 1, a permis d'identifier les familles de miPEP présentant des effets majeurs sur ces deux processus biologiques. Ces cribrages ont été réalisés avec une concentration en miPEP de 100  $\mu\text{M}$  couplés à trois concentrations en stimulant de germination ou d'haustoriogénèse. Afin de caractériser de manière plus fine l'effet de certains miPEP lors de ces deux processus biologiques, une gamme de concentrations plus grande a été utilisée en miPEP de  $10^{-9}$  à  $10^{-4}$  M, et en stimulant de germination allant de  $10^{-12}$  à  $10^{-7}$  M, ou d'haustoriogénèse allant de  $5 \cdot 10^{-9}$  à  $5 \cdot 10^{-8}$  M pour *O. cumana* et allant de  $10^{-10}$  à  $10^{-8}$  M pour *P. ramosa*.

La famille des miPEP319 a été sélectionnée afin de réaliser une caractérisation plus précise de leurs effets car un des deux membres de cette famille, le miPEP319a, présente l'effet inhibiteur de la germination le plus fort alors que le miPEP319b, n'induit pas de modification significative de ce processus biologique chez *O. cumana* (**Figure 24**, page 66 de l'introduction bibliographique) et chez *P. ramosa* (**Figure 25**, page 67 de l'introduction bibliographique). D'autre part, les deux membres de cette famille de miPEP induisent une inhibition de l'haustoriogénèse lorsqu'ils sont utilisés en co-traitement avec la cytokinine *c/tZ* aux trois concentrations testées chez *O. cumana* (**Figure 26**, page 68 de l'introduction bibliographique) et aux deux concentrations les plus fortes appliquées chez *P. ramosa* (**Figure 29**, page 72 de l'introduction bibliographique). Inversement, seul un des deux miPEP présente un faible effet inducteur de l'haustoriogénèse, inférieur à 20 %, chez *O. cumana* (**Figure 26**, page 68 de l'introduction bibliographique), alors que les miPEP319 de *P. ramosa* n'induisent pas la formation des haustoriums (**Figure 28**, page 71 de l'introduction bibliographique). Ces résultats et l'implication des miR319 dans les voies de régulation des principales phytohormones végétales telles que l'ABA, les CKs, le GA, l'éthylène et l'auxine (**Figure 23**, page 64 de l'introduction bibliographique, Curaba *et al.*, 2014) m'ont amenée à sélectionner cette famille de miPEP pour effectuer des tests plus approfondis. Ainsi, une caractérisation plus fine de leurs effets physiologiques et moléculaires lors de la germination et de l'haustoriogénèse a été réalisée chez les deux espèces. En complément, l'effet des miPEP319 d'*O. cumana* sur l'infestation des tournesols a été analysé.

Les familles de miPEP156, 159, 164 et 172 issus du génome d'*O. cumana* ont également été étudiées plus en détail afin de caractériser leurs effets phénotypiques et moléculaires lors du processus de germination de cette espèce parasite. Les trois familles de miARN associés présentent un lien avec les miR319 précédemment sélectionnés. En effet, le miR159 possède deux gènes cibles en commun avec les miR319 (**Figure 1.2**, page 91 du chapitre 1), le miR164 est une cible indirecte des miR319 *via* les *TCPs* (**Figure 28**, page 71 de l'introduction bibliographique) et les miR156 participent indirectement à la régulation de l'expression des *TCPs* par le biais de la dimérisation de leurs cibles, les *SPLs* avec ces *TCPs*, rendant ces deux familles de facteurs de transcriptions inactifs (Rodriguez *et al.*, 2016). De plus, certains miPEP156 induisent une inhibition de la germination (**Figure 1.4**, page 100 du chapitre 1). Les miR156 ont été montrés comme impliqués dans la régulation de la dormance des graines (Huo *et al.*, 2016) mais aussi dans l'imbibition et la germination (Li *et al.*, 2013). Trois miPEP156 ont été sélectionnés parmi les 6 miPEP d'*O. cumana* regroupant deux miPEP avec un effet inhibiteur de la protrusion des racines (miPEP156d et miPEP156f) et un n'ayant pas induit d'effet (miPEP156e) lors du criblage réalisé sur la germination (**Figure 1.4**, page 100 du chapitre 1). Le miR159 a été sélectionné car en plus de posséder des gènes cibles en commun avec les miR319, le miPEP159 associé induit une inhibition totale de la germination à 100  $\mu$ M quelle que soit la concentration en *rac*-GR24 utilisée. Le miPEP164 induit lui aussi une inhibition totale de la germination. Les miPEP172a, miPEP172b et miPEP172c ont montré un effet inhibiteur de la germination lors du criblage. Les miR172 sont impliqués dans la régulation de la dormance et de la germination des graines (Wu *et al.*, 2009), ainsi que dans la voie de réponse aux CKs (Curaba *et al.*, 2014). Les miPEP172a, miPEP172b et miPEP172c ont ainsi été sélectionnés pour des analyses plus poussées. Le miPEP172d a également été sélectionné pour visualiser la différence au niveau de l'expression des gènes cibles entre un miPEP inhibant la germination et un miPEP sans effet sur ce processus biologique.

Les miPEP156, miPEP159 et miPEP164 n'ont pas été sélectionnés pour caractériser plus finement leurs effets sur la formation des haustoriums car le test d'haustoriogénèse a été mis au point chez *O. cumana* au cours de ces travaux de thèse alors qu'ils étaient déjà au point chez *P. ramosa*. De plus, ces tests sont complexes à mettre en œuvre et très chronophages. Le choix des miPEP s'est porté principalement sur ceux dont un lien avait déjà été mis en évidence avec la voie de réponse aux CKs, ce qui n'est pas le cas de ces trois familles de miARN.

Les criblages réalisés lors du processus d'haustoriogénèse ont permis de mettre en évidence l'effet inhibiteur des miPEP172a, c et d d'*O. cumana* (**Figure 1.8**, page 106 du chapitre 1) ainsi que du miPEP172b de *P. ramosa* (**Figure 1.10**, page 108 du chapitre 1). Ils ont également permis la mise en évidence de l'effet inducteur de la formation des haustoriums des

miPEP172a et b d'*O. cumana* (**Figure 1.7**, page 105 du chapitre 1) et des miPEP172a, b, c, d, e et g de *P. ramosa* (**Figure 1.9**, page 107 du chapitre 1), ainsi que l'absence d'effet du miPEP172e d'*O. cumana* (**Figure 1.8**, page 106 du chapitre 1). Le miPEP172b de *P. ramosa* présente ainsi à la fois un effet inhibiteur et un effet inducteur. Cette dualité d'activité des miPEP est similaire à celle des cytokinines qui peuvent être inductrices ou inhibitrices de la formation de l'haustorium chez *P. ramosa* selon les concentrations appliquées (Goyet *et al.*, 2017). Une caractérisation plus précise de l'effet phénotypique et moléculaire de ces miPEP lors de l'haustoriogenèse a donc été réalisée afin de mieux comprendre ces mécanismes. Les miPEP396a et miPEP396b de *P. ramosa* présentant respectivement des effets stimulateur et inhibiteur sur la formation de l'haustorium (**Figure 1.16**, page 106 du chapitre 1) ont fait l'objet d'une étude plus approfondie sur leur effet phénotypique lors de ce processus biologique.

## II. Matériels et méthodes

### A. Matériel végétal

Deux lots de graines d'*O. cumana* sont utilisés pour ces études. Le lot Oc49 a été récolté en Vendée en 2017 sur une parcelle de tournesol (*Helianthus annuus* L.). Le lot OcIN23 a été fourni par le LIPM et est issu d'une multiplication réalisée en 2018 des graines récoltées à Moulis, en Gironde en 2017. Ce lot a servi au séquençage du génome d'*O. cumana* dans le cadre du projet HeliOr (2017).

Les graines de tournesol (*Helianthus annuus*), accession 2603, fournies par le LIPM correspondent à un cultivar sensible à *O. cumana* (Labrousse *et al.*, 2001) .

### B. Désinfection des graines

Le protocole de désinfection des graines d'*O. cumana* et de *P. ramosa* est présenté dans la section « Matériels et méthodes » du chapitre 1.

Les graines de tournesols sont désinfectées par un bain de 7 minutes sous agitation dans de l'hypochlorite de sodium 2,4 % suivi par trois rinçages de 30 secondes et 3 rinçages de 5 minutes avec de l'eau distillée stérile.

### C. Production d'exsudats de tournesol

Des graines de tournesols préalablement désinfectées sont placées dans un système de culture sur support inerte à raison d'une graine par pot. Le système de culture est composé de deux pots en plastique opaque Nicot de 700 mL (Nicoplast, Maisod, France) superposés. Le

premier pot est rempli de billes de verre sodocalcique de 3 mm de diamètre (Dutscher, Brumath, France) recouvertes d'une couche de 5 mm de vermiculite (Cecoval, Saint-Julien-de-Concelles, France) pour maintenir à l'obscurité le système racinaire (**Figure 2.1**). Ce pot est percé pour permettre la récupération des exsudats racinaires dans le second pot. Le système de culture est autoclavé avant utilisation pour obtenir une stérilité partielle. L'arrosage est effectué avec du TT au demi stérile (**Tableau 2.1**, pH = 6, Tadano and Tanaka, 1980) jusqu'à effleurement des billes de verre, 3 fois par semaines. Les exsudats racinaires sont récupérés 1 fois par semaine et testés sur des graines d'*O. cumana* préalablement désinfectées et conditionnées. Les exsudats présentant une activité inductrice de la germination sont concentrés par SPE (extraction en phase solide) inverse à haute performance avec le kit « Strata-x 33u Polymeric Reversed Phase » (Phenomex<sup>®</sup>, Torrance, États-Unis). L'élution est effectuée avec 6 mL d'ACN pur. L'échantillon est ensuite placé dans un évaporateur rotatif R II Rotavapor (Buchi AG, Flawil, Suisse). Le culot obtenu est solubilisé dans de l'ACN 50 %. Cette étape permet la concentration de l'échantillon. Il est ensuite conservé à -20 °C.



**Figure 2.1** : Photographie du système de production d'exsudats racinaires de tournesols.

**Tableau 2.1** : Composition du milieu de culture TT au demi (Tadano and Tanaka, 1980).

	Concentration (M)	MM (g.mol <sup>-1</sup> )
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	1,43E-03	80,04
<b>NaNO<sub>3</sub></b>	1,00E-03	84,99
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	1,60E-04	119,98
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	1,00E-03	110,99
<b>MgSO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O</b>	1,00E-03	120,36
<b>MES Monohydrate</b>	5,57E-04	213,25
<b>MES Sodium Salt</b>	4,42E-04	217,22
<b>K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	1,00E-03	174,25
<b>MnSO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O</b>	2,00E-05	169,01
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	5,00E-05	61,83
<b>ZnSO<sub>4</sub>/7H<sub>2</sub>O</b>	3,00E-06	287,54
<b>CuSO<sub>4</sub>/5H<sub>2</sub>O</b>	2,00E-07	249,68
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>/Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>/4H<sub>2</sub>O</b>	5,00E-08	1235,9
<b>FeSO<sub>4</sub>/7H<sub>2</sub>O</b>	4,00E-05	278,02

## D. Tests de germination

Les tests de germinations sont réalisés selon le protocole détaillé dans la section « Matériels et méthode » du chapitre 1 avec des concentrations en stimulant de germination allant de  $10^{-12}$  à  $10^{-7}$  M et des concentrations en miPEP allant de  $10^{-4}$  à  $10^{-6}$  M.

Les graines de tournesols préalablement désinfectées sont placées sur un papier filtre circulaire de 13 cm de diamètre (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) dans une boîte de Petri stérile circulaire (150×15 mm, Dominique Dutscher, Brumath, France) et recouverte par un demi-papier filtre. Treize mL d'eau distillée stérile sont ajoutés dans les boîtes, ensuite placées à 21 °C constants à la verticale avec une photopériode de 16 h jour/ 8 h nuit.

## E. Tests d'haustoriogénèse et suivi d'expression de gènes

Le protocole utilisé pour les tests d'haustoriogénèse est le même que celui décrit dans la section « Matériels et méthodes » du chapitre 1.

Les analyses de suivi d'expression des gènes cibles des miARN lors de l'haustoriogénèse sont effectuées par qRT-PCR à partir d'ARNs extraits de 7 mg de graines traitées dans des plaques 24 puits stériles (Thermo Fisher Scientific, Waltham, États-Unis). Les graines désinfectées, conditionnées et prétraitées avec du DCL à  $10^{-7}$  M comme décrit dans la section « Matériels et méthodes » du chapitre 1, sont placées dans une solution d'HEPES 0,5 mM, pH 7,5 et PPM 0,05 % à une concentration de 15 mg par mL. Dans chaque puits sont placés 500  $\mu$ L de milieu d'incubation contenant les graines dont la germination a déjà été induite par le DCL pour *O. cumana* et le GR24 pour *P. ramosa*, et les molécules à tester. Deux puits par réplicat biologique sont utilisés pour chaque condition puis mélangés avant récolte afin d'obtenir une quantité de graines suffisante pour réaliser l'extraction des ARNs. Pour chaque traitement sont effectués trois réplicats biologiques. Une fois les contenus des deux puits mélangés, 40  $\mu$ L de graines sont prélevés et placés dans une plaque 96 puits en deux réplicats servant de contrôle phénotypique des différents traitements. Les 960  $\mu$ L de graines restantes sont ensuite récupérés aux temps souhaités grâce à un tamis de 100  $\mu$ m puis séchés avec du papier absorbant, congelés dans de l'azote liquide et stockées à -80 °C.

## F. Co-culture en minirhizotron

Les co-cultures tournesol / *O. cumana* en minirhizotron sont réalisées en boîtes de Petri carrées de 120×120×17 mm et découpées sur le dessus (lorsqu'elles sont placées à la verticale) permettant d'obtenir une ouverture de 5 cm. Les boîtes sont percées de 3 trous à l'opposé de l'ouverture permettant l'évacuation de l'excédent de solution d'arrosage. Les boîtes de Petri sont remplies de laine de roche (Cultilene, Saint-gobain, Pays-Bas), un support inerte, recouvert d'un papier filtre de 12 cm de côté (Macherey-Nagel, Hoerd, France). Les minirhizotrons sont humidifiés avec 40 mL de solution d'arrosage Long Ashton au demi, pH medium (**Tableau 2.2**, pH 5,6). Une plantule de tournesol mise à germer 6 jours sur papier filtre (voir section « D. Tests de germination » de ce chapitre) est ensuite placée par minirhizotron (**Figure 2.2**).

**Tableau 2.2 : Composition du milieu de culture Long Ashton medium phosphate au demi.**

	Concentration (M)	MM (g.mol <sup>-1</sup> )
KNO <sub>3</sub>	3,71E-03	101,1
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> / 4H <sub>2</sub> O	2,01E-03	236,15
MgSO <sub>4</sub> / 7H <sub>2</sub> O	2,08E-03	120,36
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,50E-06	119,98
NaFe-EDTA	3,00E-05	367,05
MnSO <sub>4</sub> / H <sub>2</sub> O	5,03E-06	169,01
CuSO <sub>4</sub> / 5H <sub>2</sub> O	5,01E-07	249,68
ZnSO <sub>4</sub> / 7 H <sub>2</sub> O	5,22E-07	287,54
BO <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	2,43E-05	61,83
NaCl	4,28E-05	58,44
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> / 4H <sub>2</sub> O	3,64E-08	1235,9
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,25E-05	119,98



**Figure 2.2 : Co-culture de tournesols sensibles et d'*O. cumana* en minirhizotron.**

Les tournesols sont cultivés en présence ou non d'*O. cumana*. L'arrosage est effectué avec une solution de Long Ashton, 2 fois par semaine avec ou sans miPEP à 1 µM. Le dénombrement des accrochages est effectué après 5 semaines de cultures.

Les minirhizotrons sont recouverts d'aluminium afin de maintenir les racines à l'obscurité, et placés en chambre de culture à 21 °C constants avec une photopériode de 16 h jour / 8 h nuit. Après deux jours de culture, les racines sont infestées avec les graines d'*O. cumana* du lot Oc49, préalablement désinfectées et conditionnées 8 jours. Les graines seules ou en présence de miPEP à une concentration de 1 µM finale sont déposées sur la totalité de la surface des papiers filtres. Les témoins négatifs de l'infestation correspondent aux minirhizotrons pour lesquels seul du milieu d'incubation composé d'HEPES 0,5 mM à pH 7,5 et du PPM à 0,05 % est ajouté sur le papier filtre. Afin de vérifier l'absence d'effet des miPEP d'*O. cumana* sur la croissance des tournesols, une solution composée de milieu d'incubation comme décrit précédemment et de miPEP à 1 µM est ajoutée sans graine d'orobanche. Les minirhizotrons sont arrosés deux fois par semaine avec la solution d'arrosage seule ou avec la solution d'arrosage contenant les miPEP. Les minirhizotrons sont arrosés avec 10 mL de solution d'arrosage contenant les miPEP à 1 µM ou avec la solution d'arrosage seule. Un complément est effectué après 7 h avec la solution d'arrosage seule si nécessaire. Le nombre d'accrochages formés par minirhizotron et la taille des tournesols sont déterminés après 5 semaines de co-culture (**Figure 2.2**).

## G. Co-culture en godet

Le système de co-culture en godet carré de 500 mL permet de se rapprocher des conditions naturelles. Le substrat utilisé est un mélange v/v de sable (composé à plus de 5 % de silice libre) et de vermiculite (Cecoval, Saint-Julien-de-Concelles, France). Dans chaque pot sont ajoutés au substrat 30 mg de graines d'*O. cumana* du lot Oc49. Des godets sans graine d'orobanche sont préparés comme témoins avec ou sans miPEP. Les graines de tournesol prégermées à 21 °C pendant 48 h avec une photopériode de 16 h jour / 8 h nuit sont disposées à raison d'une graine par godet préalablement humidifié avec du milieu de culture Long Aston, pH medium (**Tableau 2.2**). Les godets sont arrosés 3 fois par semaine avec 10 mL de la solution Long Aston contenant ou non les miPEP à une concentration de 1 µM. Un complément d'arrosage avec la solution d'arrosage seule est effectué 7 h après le premier arrosage. Les co-cultures sont maintenues jusqu'à 5 semaines après le semis des tournesols (**Figure 2.3**). Le dénombrement des accrochages est réalisé par dépotage des tournesols conduisant à l'arrêt des cultures contrairement aux co-cultures en minirhizotron qui permettent la visualisation des accrochages en continu sans mettre fin à l'expérimentation.



**Figure 2.3 : Co-culture de tournesols sensibles et d'*O. cumana* en godet.**

Les tournesols sont cultivés en présence ou non d'*O. cumana*. L'arrosage est effectué avec une solution de Long Ashton, 3 fois par semaine avec ou sans miPEP à 1 µM. Le dénombrement des accrochages est effectué par dépotage après 5 semaines de culture.

## H. PCR quantitative en temps réel

Le protocole d'extraction des ARNs est le même que celui utilisé dans le chapitre 1 (voir section « Matériels et méthode » du chapitre 1). Les ADNc sont synthétisés à partir de 400 ng d'ARN pour l'analyse de l'expression des gènes cibles des miARN et à partir d'1 µg pour l'analyse de l'expression des précurseurs des miARN. Le kit de RT-PCR utilisé est le kit qScript cDNA Flex Synthesis (Quanta BioSciences Inc., Gaithersburg, Etats-Unis). Ce kit utilise des amorces oligo dT permettant une *reverse transcription* des ARNs possédant une queue PolyA en ADNc. Les ADNc sont conservés à -20 °C. Les PCR quantitatives sont réalisées selon le protocole détaillé dans le chapitre 1 (« Matériels et méthodes »). Les amorces utilisées dans ce chapitre sont référencées dans le tableau 2.3.

**Tableau 2.3 : Liste des couples d'amorces utilisés pour les qRT-PCR dans ce chapitre.**

Les amorces dont le nom contient « *Pr* » sont spécifiques au génome de *P. ramosa* et celles dont le nom contient « *Oc* » sont spécifiques au génome d'*O. cumana*.

miARN	Gène	Nom	Séquence	Taille amorce
	<i>PrUBI10</i>	Pr-UBI10mRNA-Fwd	TGG TAA GCA ATT GGA AGA TGG A	22
		Pr-UBI10mRNA-Rev	AAA ACA GAA GCA AAG ACA CAG CAT	24
	<i>PrARR5</i>	ARR5-F	TCC TTT ATC GGT GTC GGT ATC C	22
		ARR5-R	GGC GGC AGC ACC ATA GG	17
	<i>PrTORNADO2</i>	TORNADO2-F	AAC GAT GCA GCA GAC ATG GA	20
		TORNADO2-R	GCA GGA ATA GCA GAG TTG TGT TTG	24
	<i>PrZFP6</i>	PrGIS3-F	ACG CAC ACA AGA AGG AGA GAC A	22
		PrGIS3-R	TTC GGC TAG CCT GAA TTT GC	20
miR172	<i>PrTOEa</i>	QPrTarget7bis_Fwd	GAG CTA GCA AAA TCT TCG GGT TT	23
		QPrTarget7bis_Rev	ACT CGT CGA CCG GAA AGA ACT	20
	<i>PrTOEd</i>	QPrTarget9_Fwd	AGG CGT TCC TTT GCC TCT ATT	21
		QPrTarget9_Rev	TGC TGC AGA CGA AGA AGA CAA	21
miR159 miR319	<i>PrMYB33a</i>	PrT28bis_Fwd	AAC CCC TCC AAC CGA ACA C	19
		PrT28bis_Rev	AAC CTC TTC CAA CAG CCC ACT A	22
	<i>PrMYB33b</i>	PrT29bis_Fwd	TCC AGG GAT CAG TGG TCT TTT AGA	24
		PrT29bis_Rev	TAT CTC CAT GGC TGC TGA AAT TAG	24
miR156	<i>PrSPLd</i>	PrT39_Fwd	CTA AGT GGA CAG CAG TCA ATG CA	23
		PrT39_Rev	ACG TTG GAT TTC TTG GAA GTT ACC	24
	<i>PrSPLe</i>	PrT40_Fwd	GGA AAA TTT GTT TTC CCC CTA	21
		PrT40_Rev	GCT AGA ATG TCA TTA TCC TTG CAT	24
	<i>PrSPLf</i>	PrT41_Fwd	ATC GTC GCG TGT GCA AAA T	19
		PrT41_Rev	TGA AAA CCT CGG AAG TGG AGT T	22
miR319	<i>PrTCP3</i>	PrT53_Fwd	CAA TCA CGA GCT CAT GCA CAA	21
		PrT53_Rev	CGA CGT CCA GCT GTC GAA T	19
miR396	<i>PrGRFa</i>	PrT61_Fwd	GAG AAT TCA AAG GCG CAA TCA	21
		PrT61_Rev	ATT GAC GCC AGA AAC CAC TGA	21
	<i>PrGRFb</i>	PrT62_Fwd	TGG CCA TCA GCA AAT GTT GA	20
		PrT62_Rev	AAA GCC ACT CGA TGT TTG ATG A	22
	<i>PrGRFd</i>	PrT64_Fwd	CCA CTA GCT GAG GCT TTG AGA TC	23
		PrT64_Rev	CAC ATG GCA GTC GAT AAA GCA	21
	<i>PrGRFe</i>	PrT65_Fwd	TCA CCA TCA GAA GAA GCT TCG A	22
		PrT65_Rev	CCC ATT CCA TCC TAT CAT GTG TT	23
	<i>PrGRFg</i>	PrT66_Fwd	AGT ATT TGG TGG CTG GTT TAC CA	23
		PrT66_Rev	GGC CGA AAG AGC TTC AAA ACT	21
miR319	<i>Ocpre-miR319</i>	Oc_319abis_Fwd	CAT TCA TTC AAG CAC TCA GTA GAA TAC	27
		Oc_319abis_Rev	CAG ACA GAG AGG GAA GAA ACT ATC T	25

## I. Analyses statistiques

Les analyses statistiques des données sont effectuées à l'aide du logiciel R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)). Elles ont été réalisées à partir d'une analyse de la variance et de tests à intervalles multiples de confiance.

Les données de pourcentage d'induction ou de stimulation de la germination ou de l'haustoriogenèse ont été soumises à une analyse de comparaison par paire (Tukey-HSD) avec des intervalles de confiance de 99,9, 99 et 95 %. Les moyennes sont des valeurs  $\pm$  SE avec  $n = 3$  pour les tests de germination et  $n = 6$  pour les tests d'haustoriogenèse.

Les données d'expression de gène ont été soumises à une analyse des variances (ANOVA) avec un intervalle de confiance de 95 %. Les moyennes sont des valeurs  $\pm$  SE ( $n=3$ ).

## III. Résultats

### A. Les miPEP319 d'*O. cumana*

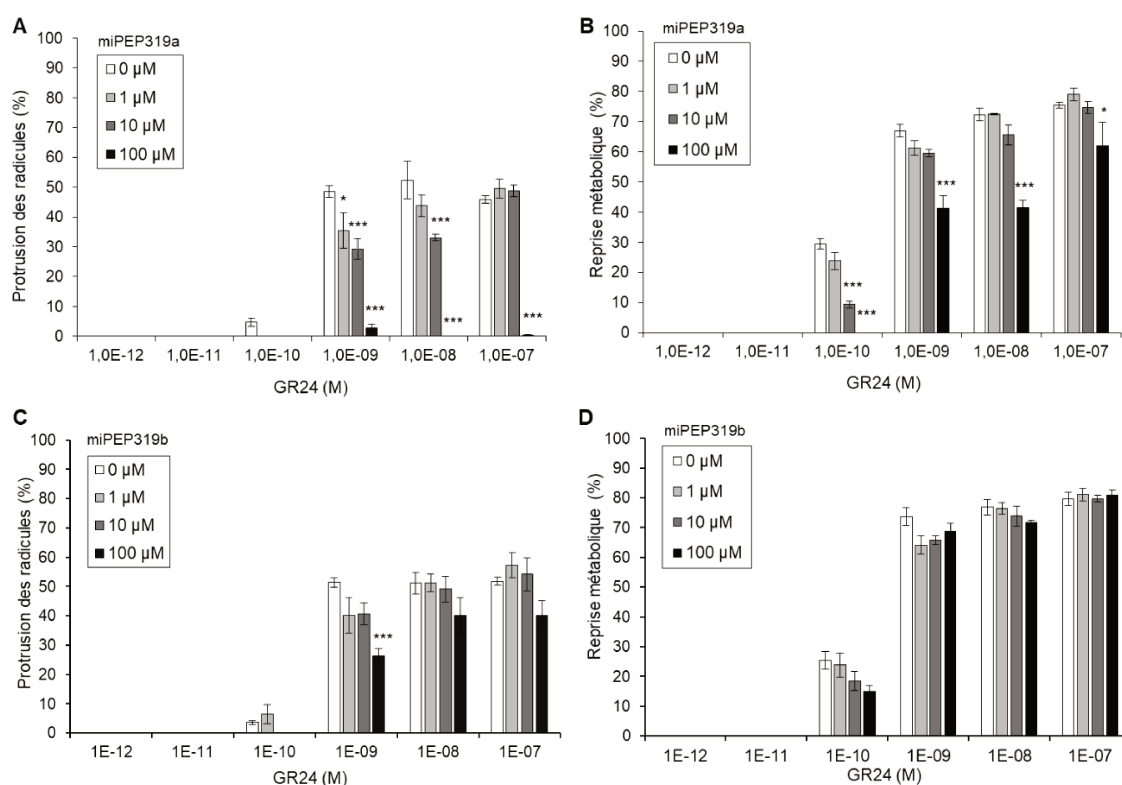
Les résultats de la caractérisation plus fine de l'effet phénotypique et moléculaire des miPEP319 lors de la germination et de l'haustoriogenèse d'*O. cumana* sont présentés dans cette partie. La spécificité d'action des miPEP319 sur l'expression des miR319 est vérifiée par analyse de l'expression des gènes cibles des miR319. L'analyse de l'expression des gènes cibles du miR159 à la suite d'un traitement avec les miPEP319 lors de la germination est réalisée car le miR159 présente une forte homologie de séquence avec les miR319 (Li *et al.*, 2013). Il est donc intéressant de regarder l'impact du traitement avec les miPEP319 sur l'expression des gènes cibles du miR159.

Les résultats de la caractérisation de l'effet des miPEP319 ont été obtenus lors de tests réalisés avec ou sans stimulants de germination en absence de la plante hôte. Afin de caractériser l'effet des miPEP319 sur le patho-système, une co-culture de tournesol et d'orobanche a été effectuée avec ou sans miPEP. L'absence d'effet néfaste de ces miPEP sur le développement de la plante hôte a été vérifiée grâce à une culture de tournesols témoins sans orobanche, traités avec les miPEP.

## 1. Effet sur la germination

### Effet phénotypique

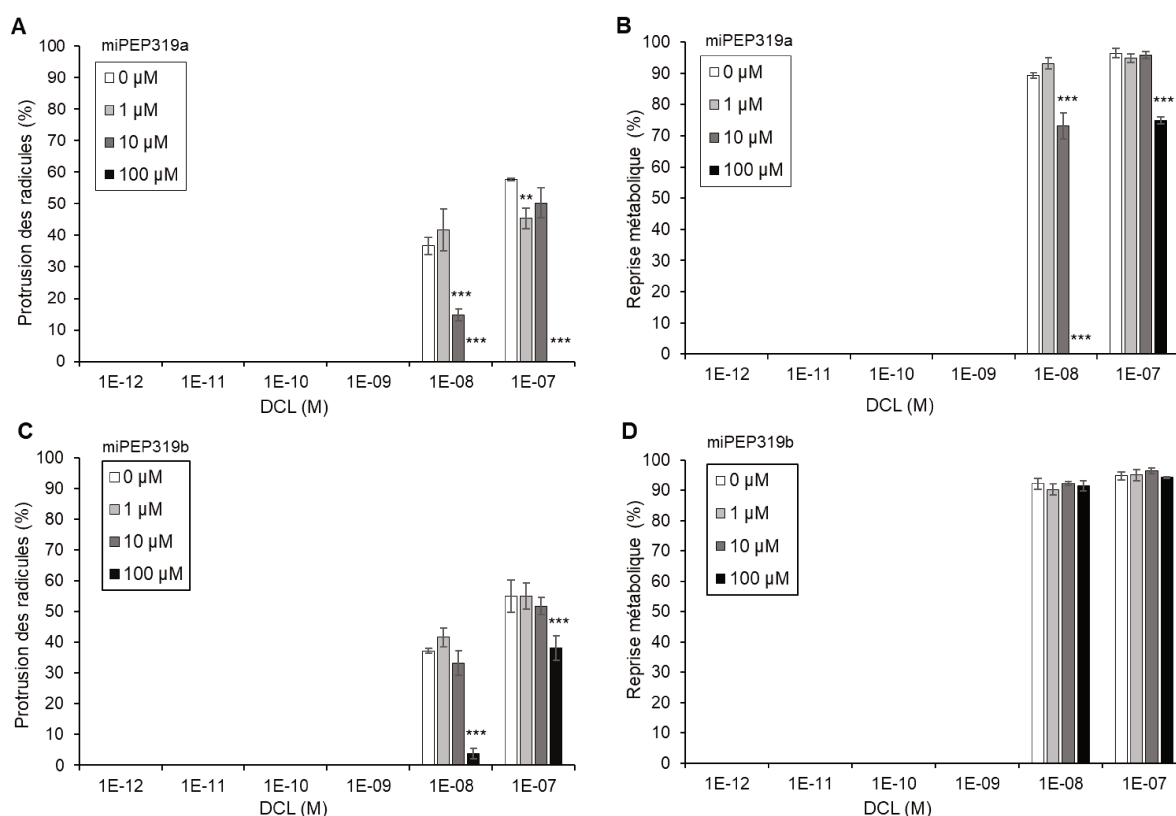
Ces expérimentations ont permis de mettre en évidence une inhibition de la protrusion des graines d'*O. cumana* à la suite d'un traitement avec le miPEP319a pour toutes les concentrations testées lorsque la concentration en *rac*-GR24 inductrice de la germination est la plus faible (**Figure 2.4A**). La plus forte concentration en miPEP induit une inhibition complète de la protrusion des racicules pour toutes les concentrations en *rac*-GR24. Cette inhibition de la protrusion des racicules est accompagnée d'une inhibition de la reprise métabolique à la suite d'un traitement avec une forte concentration en miPEP319a pour toutes les concentrations en *rac*-GR24 testées (**Figure 2.4B**). Le miPEP319b présente un faible effet lors de la germination. En effet, ce miPEP inhibe faiblement la protrusion des racicules uniquement lorsqu'il est utilisé à une forte concentration en miPEP et une faible concentration en *rac*-GR24 (**Figure 2.4C**). De plus, il n'induit pas de modification de la reprise métabolique des graines dans ces conditions de test (**Figure 2.4D**).



**Figure 2.4 : Pourcentage de reprise métabolique et de protrusion des racicules de graines d'*O. cumana* après traitement avec le *rac*-GR24 en présence ou non de miPEP.**

Les pourcentages de reprise métabolique (B et D) et de protrusion des racicules (A et C) des graines d'*O. cumana* du lot Oc49 ont été déterminés 56 h après traitement avec le miPEP319a (A et B) ou le miPEP319b (C et D) seul ou avec du *rac*-GR24. Les moyennes et les erreurs standard ont été déterminées à partir de trois réplicats biologiques. Une, deux et trois étoiles représentent respectivement des différences de la condition contrôle sans miPEP à des niveaux de significativité de  $p < 0,05$  ;  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$  (Tukey-HSD).

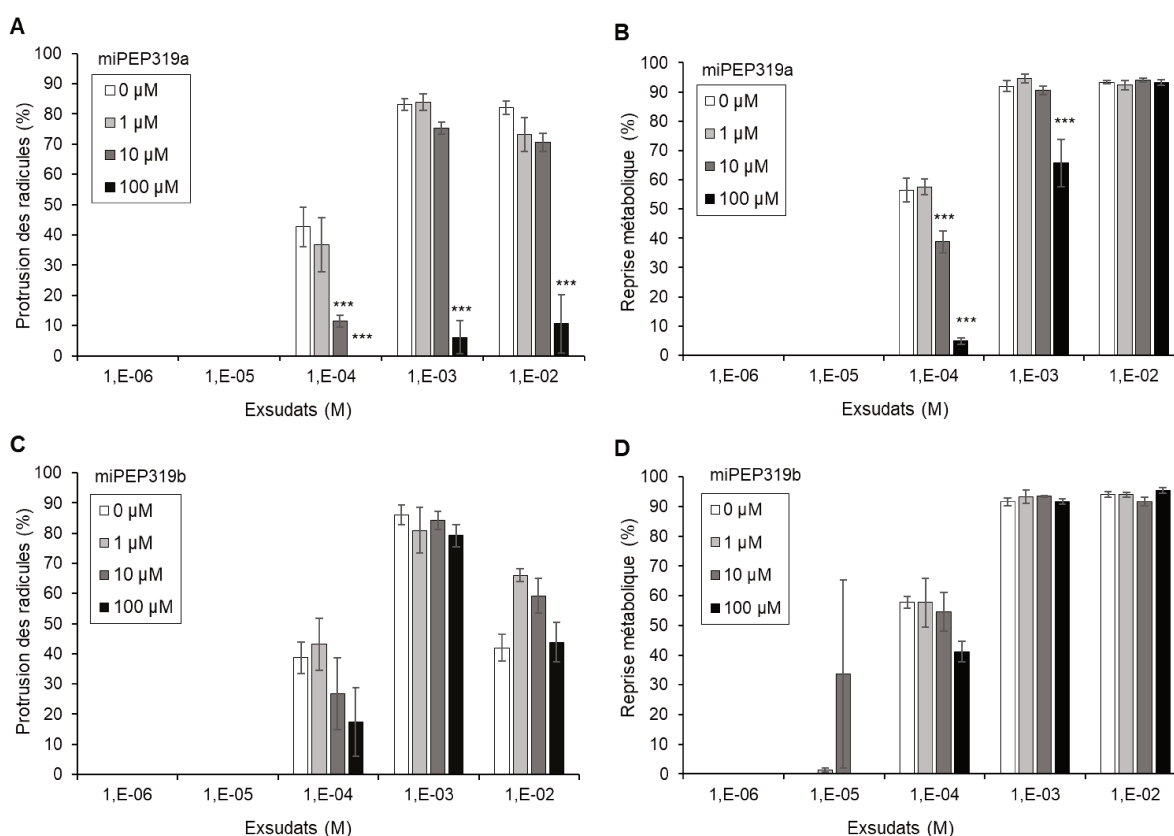
Afin de vérifier que les effets induits par ces miPEP lors de la germination ne sont pas spécifiques au traitement par le *rac*-GR24, un analogue synthétique des strigolactones, la même expérimentation a été réalisée avec du DCL, un stimulant naturel présent dans les exsudats de tournesol. La gamme de concentrations en DCL est la même que celle utilisée en *rac*-GR24 pour les tests précédents. L'utilisation du DCL à la place du *rac*-GR24 a permis de confirmer le fort effet inhibiteur du miPEP319a lors de la germination. Les miPEP319a et miPEP319b induisent le même profil de réponse en présence de DCL (**Figure 2.5**) ou de *rac*-GR24 (**Figure 2.4**).



**Figure 2.5 : Pourcentage de reprise métabolique et de protrusion des racicules de graines d’*O. cumana* après traitement avec le DCL en présence ou non de miPEP.**

Les pourcentages de reprise métabolique (B et D) et de protrusion des racicules (A et C) des graines d’*O. cumana* du lot Oc49 ont été déterminés 56 h après traitement avec le miPEP319a (A et B) ou le miPEP319b (C et D) seul ou avec du DCL. Les moyennes et les erreurs standard ont été déterminées à partir de trois réplicats biologiques. Deux et trois étoiles représentent respectivement des différences de la condition contrôle sans miPEP à des niveaux de significativité de  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$  (Tukey-HSD).

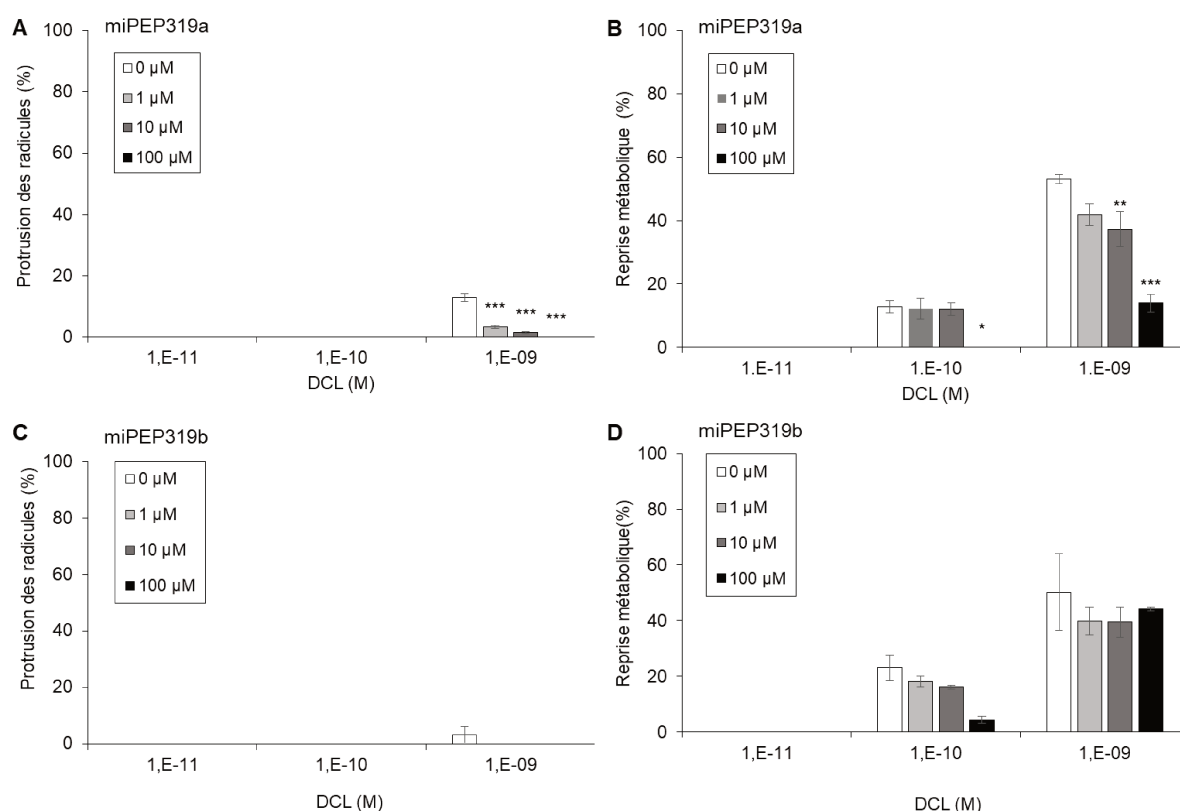
Des exsudats racinaires de tournesols sensibles à l'orobanche ont également été utilisés comme stimulant à la place du *rac*-GR24 afin de se rapprocher le plus possible des conditions naturelles d'induction de la germination des graines d'*O. cumana* par la plante hôte. L'utilisation d'exsudats racinaires de tournesols induit un profil de réponse similaire à l'utilisation de *rac*-GR24 ou de DCL à la suite d'un traitement avec le miPEP319a (**Figure 2.6**). L'effet inhibiteur de la protrusion des racicules est dose réponse et l'inhibition est très forte à la concentration la plus élevée en miPEP (**Figure 2.6A et B**). Le miPEP319b n'induit, quant à lui, pas de modifications significatives de la protrusion des racicules (**Figure 2.6C**), ni de la reprise métabolique (**Figure 2.6D**).



**Figure 2.6 : Pourcentage de reprise métabolique et de protrusion des racicules de graines d'*O. cumana* après traitement avec les exsudats racinaires de tournesol en présence ou non de miPEP.**

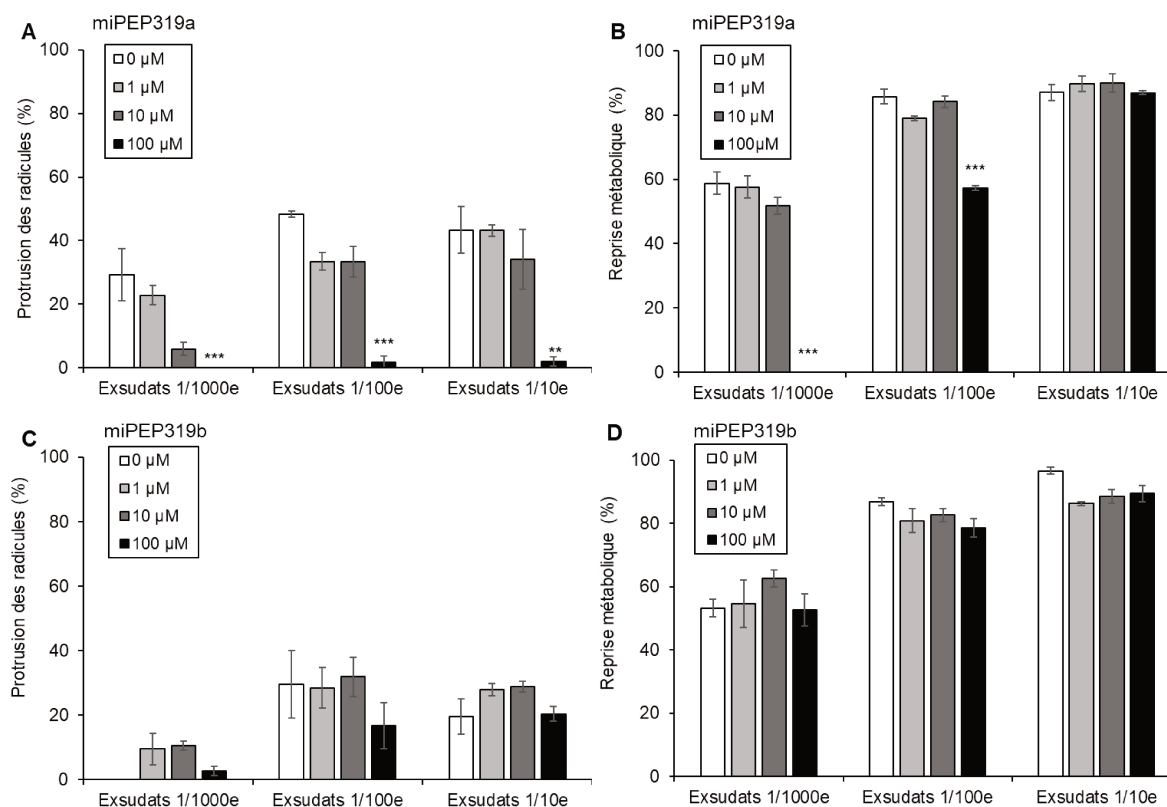
Les pourcentages de reprise métabolique (B et D) et de protrusion des racicules (A et C) des graines d'*O. cumana* du lot Oc49 ont été déterminés 56 h après traitement avec le miPEP319a (A et B) ou le miPEP319b (C et D) seul ou avec des exsudats racinaires de tournesol 2603. Les moyennes et les erreurs standard ont été déterminées à partir de trois réplicats biologiques. Trois étoiles représentent des différences de la condition contrôle sans miPEP à un niveau de significativité de  $p < 0,001$  (Tukey-HSD).

L'effet des miPEP319 a également été caractérisé sur un autre lot de graines d'*O. cumana* afin de confirmer que ces effets inhibiteurs de la germination ne sont pas spécifiques au lot Oc49 provenant de Vendée. Ces miPEP ont ainsi été testés sur le lot OcIN23 issu d'une multiplication en 2018 de graines récoltées en Gironde en 2017 et ayant servi au séquençage du génome d'*O. cumana*, en présence de DCL ou d'exsudats racinaires. Le *rac-GR24* n'a pas été utilisé sur ce lot car les graines germent peu avec ce stimulant synthétique, rendant la visualisation d'un effet inhibiteur potentiel des miPEP très difficile. Une inhibition de la protrusion des racicules est observée pour toutes les concentrations en miPEP319a et en DCL utilisées (**Figure 2.7A**). Le miPEP319a à la plus forte concentration induit également une inhibition de la protrusion des racicules lorsque les exsudats racinaires de tournesols sensibles sont utilisés à la place du DCL (**Figure 2.8A**). Une inhibition de la reprise métabolique est observée pour toutes les concentrations en DCL (**Figure 2.7B**), ou en exsudats racinaires (**Figure 2.8B**) utilisés avec la concentration en miPEP maximale. Le miPEP319b n'a pas d'effet sur la germination des graines de ce lot, qu'il soit utilisé en co-traitement avec du DCL (**Figure 2.7C, D**) ou des exsudats racinaires (**Figure 2.8C, D**).



**Figure 2.7 : Pourcentage de reprise métabolique et de protrusion des racicules de graines d'*O. cumana* du lot OcIN23 après traitement avec le DCL en présence ou non de miPEP.**

Les pourcentages de reprise métabolique (B et D) et de protrusion des racicules (A et C) des graines d'*O. cumana* du lot OcIN23 ont été déterminés 56 h après traitement avec l'OcmiPEP319a (A et B) ou OcmiPEP319b (C et D) seul ou avec du DCL. Les moyennes et les erreurs standard ont été déterminées à partir de trois réplicats biologiques. Une, deux et trois étoiles représentent respectivement des différences avec la condition contrôlée sans miPEP à des niveaux de significativité de  $p < 0,05$  ;  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$  (Tukey-HSD).

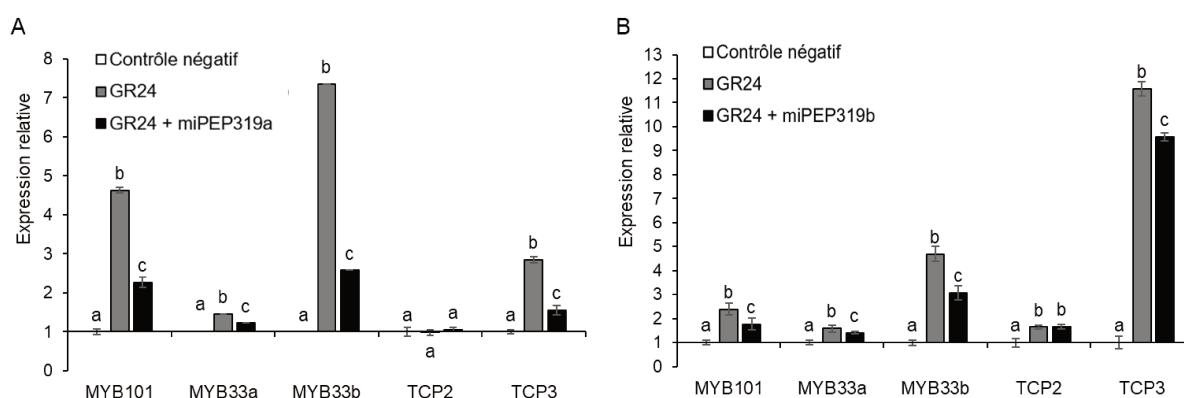


**Figure 2.8 : Pourcentage de reprise métabolique et de protrusion des racines de graines d’*O. cumana* du lot OcIN23 après traitement avec les exsudats racinaires de tournesol en présence ou non de miPEP.**

Les pourcentages de reprise métabolique (B et D) et de protrusion des racines (A et C) des graines d’*O. cumana* du lot OcIN23 ont été déterminés 56 h après traitement avec l’OcmiPEP319a (A et B) ou OcmiPEP319b (C et D) seul ou avec des exsudats racinaires de tournesol 2603. Les moyennes et les erreurs standard ont été déterminées à partir de trois réplicats biologiques. Deux et trois étoiles représentent respectivement des différences avec la condition contrôle sans miPEP à des niveaux de significativité de  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$  (Tukey-HSD).

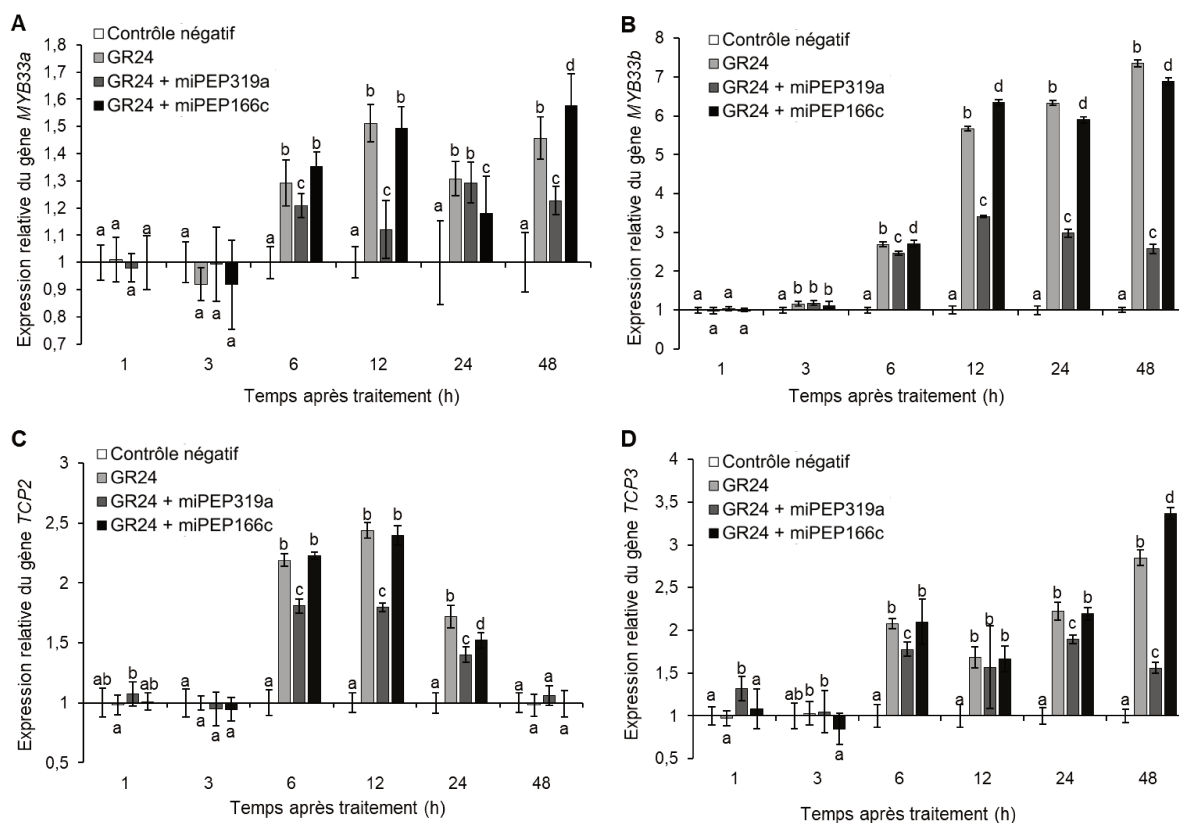
## Effet sur l'expression des gènes cibles des miARN correspondants

Les résultats précédents ont mis en évidence un effet dose réponse du miPEP319a sur la germination des graines d'*O. cumana*. L'expression relative des gènes cibles des miR319 et miR159 a été déterminée 48 h après traitement avec le *rac*-GR24 à  $10^{-10}$  M seul ou avec miPEP319a ou miPEP319b à 100  $\mu$ M. Les gènes cibles du miR159 ont été étudiés car ces miARN présentent de fortes homologies de séquences avec les miR319 et ont des gènes cibles communs avec ce dernier. Cinq gènes ont ainsi été étudiés : le *MYB101* cible de miR159 ; les *MYB33a* et *b* cibles des miR159 et miR319 ; et les *TCP2* et *TCP3*, cibles de miR319 (**Figure 2.9**). Ces gènes montrent une surexpression à la suite d'un traitement au *rac*-GR24 seul. Les gènes *MYBs* et *TCPs* seraient donc impliqués dans le processus de germination. L'ajout du miPEP319a ou du miPEP319b induit une inhibition partielle de l'effet stimulant du traitement au *rac*-GR24 sur l'expression de ces 4 gènes (**Figure 2.9**). Ainsi, les miPEP319 inhibent la germination des graines en diminuant l'effet stimulant du *rac*-GR24 sur l'expression des gènes cibles des miR319 et miR159. Ces résultats tendent à conforter l'effet stimulant des miPEP sur leurs miARN associés et donc l'effet inhibiteur sur les gènes cibles associés.



**Figure 2.9 : Quantification par qRT-PCR de l'expression relative de 4 gènes cibles de miR319 et trois gènes cibles du miR159, 48 h après induction de la germination d'*O. cumana* par un traitement au *rac*-GR24 avec ou sans miPEP319.**

Le gène *MYB101* est une cible du miR159. Les gènes *MYB33* sont à la fois des cibles du miR159 et des miR319. Les gènes *TCPs* sont quant à eux des cibles des miR319. Les graines d'*O. cumana* ont été traitées avec du *rac*-GR24 à  $10^{-10}$  M en présence ou non du miPEP319a à 100  $\mu$ M. Les moyennes et les écarts types ont été calculés à partir de deux réplicats biologiques 48h après traitement. L'expression des gènes a été normalisée par rapport au gène de référence *UBI10* et par rapport au contrôle négatif (traitement solvant). La valeur seuil contrôle est fixée à 1, au-dessus de cette valeur, le gène est sur-exprimé et en dessous de celle-ci, il est sous-exprimé. Les valeurs indiquées par différentes lettres sont significativement différentes de celle du traitement *rac*-GR24 seul ( $p < 0,05$ , ANOVA).



**Figure 2.10 : Quantification par qRT-PCR de l'expression relative de 4 gènes cibles de miR319 à 6 temps après induction de la germination d'*O. cumana* par un traitement avec le *rac*-GR24 avec ou sans miPEP.**

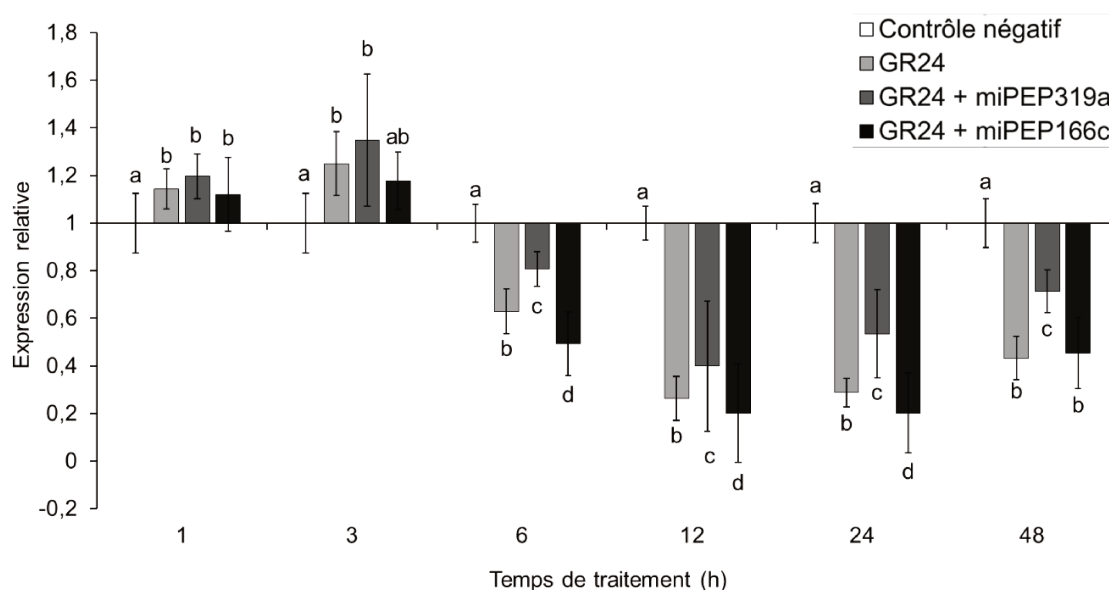
Les moyennes et les écarts types de l'expression des gènes *MYB33a* (A), *MYB33b* (B), *TCP2* (C) et *TCP3* (D), cibles des miR319, ont été calculés à partir de deux réplicats biologiques à la suite d'un traitement avec le *rac*-GR24 à  $10^{-10}$  M seul et/ou avec les miPEP319a ou miPEP166c à 100  $\mu$ M. L'expression des gènes a été normalisée pour chaque point de la cinétique de germination par rapport au gène de référence *UBI10* et par rapport au contrôle négatif (traitement solvant). La valeur seuil contrôle est fixée à 1, au-dessus de cette valeur, le gène est sur-exprimé et en dessous de celle-ci, il est sous-exprimé. Les valeurs indiquées par différentes lettres sont significativement différentes de celle du contrôle négatif ( $p < 0,05$ , ANOVA).

Un suivi des niveaux d'expression relative des 4 gènes cibles des miR319 a été effectué lors d'une cinétique de germination en condition témoin, traitement *rac*-GR24 seul, et à la suite d'un traitement avec le *rac*-GR24 et le miPEP319a permettant de visualiser les effets précoces de ces traitements. Le suivi de l'expression de ces 4 gènes cibles lors d'une cinétique de germination n'a pas été effectué à la suite d'un traitement avec le miPEP319b car cette approche est fortement consommatrice de matériel biologique. Il m'a donc fallu restreindre le nombre de conditions à tester. Le choix s'est porté sur le miPEP319a présentant un effet fortement inhibiteur de la germination. Le miPEP166c a été utilisé comme témoin négatif de traitement par un peptide afin de valider la spécificité des miPEP319 sur l'expression des gènes cibles de leurs miARN associés. En effet, le miPEP166c n'agit pas de manière directe sur l'expression des gènes cibles de miR319 et n'induit pas de modification phénotypique lors de la germination des graines d'*O. cumana* (**Figure 1.4**, page 100 du chapitre 1). De plus, les miR165/166 ne sont pas directement liés à la cascade de régulation des miR319.

Les analyses effectuées confirment les résultats obtenus précédemment avec un effet stimulant du *rac*-GR24 sur l'expression des gènes *MYB33* et du *TCP3* ainsi qu'une absence d'effet pour le gène *TCP2* 48 h après traitement. En revanche, ces tests mettent en évidence l'effet plus précoce du *rac*-GR24 sur l'expression du gène *TCP2* avec une augmentation de son expression la plus importante 12 h après traitement (**Figure 2.10C**). L'ajout du miPEP319a induit une baisse significative de l'expression des 4 gènes étudiés pour la majorité des points de la cinétique de germination en comparaison avec le traitement *rac*-GR24 seul (**Figure 2.10**). L'ajout de ce miPEP permet donc d'inhiber la surexpression induite par l'ajout de *rac*-GR24 lors de la germination des graines d'*O. cumana*.

Le miPEP166c n'induit pas de modification de l'expression des gènes *MYB33a* (**Figure 2.10A**), *TCP2* (**Figure 2.10C**) et *TCP3* (**Figure 2.10D**) avant 24 h. Les modifications d'expressions induites par ce miPEP 24 h après traitement ainsi que les faibles modifications d'expression du gène *TCP2* pourraient être causées par des régulations indirectes pouvant impacter d'autres cascades de régulation d'autres miARN (**Figure 2.10C**).

Afin de vérifier si la baisse des expressions relatives des gènes cibles de miR319 est bien due à l'action spécifique des miPEP319 sur l'expression des pri-miARN correspondants, un suivi de l'expression du pri-miR319a a été effectué lors de la cinétique de germination (**Figure 2.11**). Le suivi de l'expression du pri-miR319b n'a pas été réalisé car sa séquence n'a pas permis d'identifier un couple d'amorces spécifiques à ce transcrite primaire. Ces analyses ont mis en évidence une sous-expression du pri-miR319a à partir de 6 h après traitement au *rac*-GR24 seul. L'ajout du miPEP319a induit une augmentation significative de son expression en comparaison au traitement *rac*-GR24 seul. Le miPEP166c amplifie la sous-expression induite par le *rac*-GR24 pour les points 6 h, 12 h et 24 h après traitement. Ces modifications d'expressions peuvent être causées par des mécanismes de rétrocontrôle et/ou de régulation indirecte d'autres voies de signalisation. Le miPEP166c n'induit donc pas l'accumulation du pri-miR319a contrairement au miPEP319a. Ce dernier stimule donc spécifiquement l'expression de son transcrite primaire (**Figure 2.11**) et donc du miR319a induisant l'inhibition de l'expression des gènes cibles associés qui a été observée dans les expérimentations précédentes (**Figure 2.9A**). L'inhibition de l'expression des gènes cibles est ainsi associée à l'inhibition de la germination observée lors des traitements par le miPEP319a.



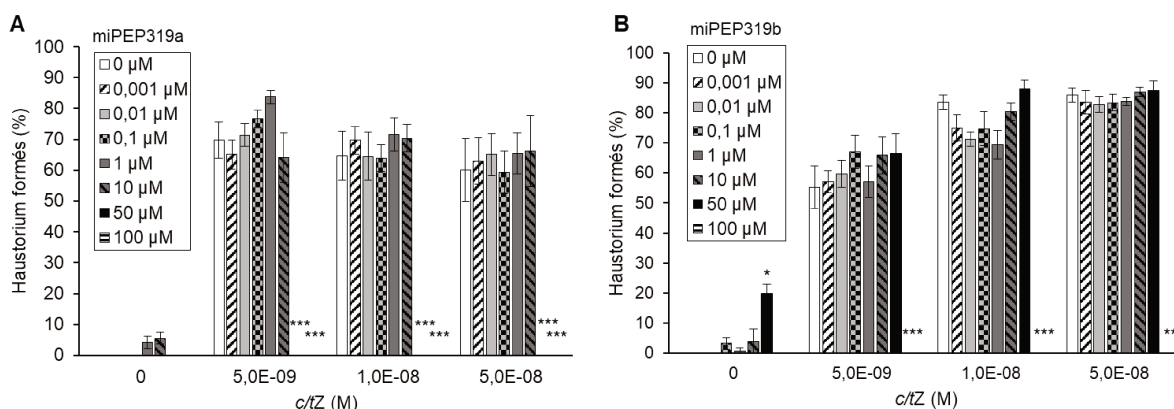
**Figure 2.11 : Quantification par qRT-PCR de l'expression relative du pri-miR319a à 6 temps différents après induction de la germination d'*O. cumana* par un traitement avec le *rac*-GR24 en présence ou non de miPEP.**

Les moyennes et les écarts types de l'expression du pri-miRNA319a, précurseur du miR319a d'*O. cumana*, ont été calculés à partir de deux réplicats biologiques à la suite d'un traitement avec le *rac*-GR24 à  $10^{-10}$  M seul et/ou avec les miPEP319a ou miPEP166c à 100  $\mu$ M. L'expression du précurseur a été normalisée pour chaque point de la cinétique de germination par rapport au gène de référence *UBI10* et par rapport au contrôle négatif (traitement solvant). La valeur seuil contrôle est fixée à 1, au-dessus de cette valeur, le gène est sur-exprimé et en dessous de celle-ci, il est sous-exprimé. Les valeurs indiquées par différentes lettres sont significativement différentes de celle du contrôle négatif ( $p < 0,05$ , ANOVA).

## 2. Effet sur la formation de l'haustorium

### Effet phénotypique

La caractérisation plus poussée de l'effet des miPEP319 sur l'haustoriogenèse réalisée avec une gamme de concentrations en miPEP plus importante a mis en évidence un effet inhibiteur du miPEP319a sur l'haustoriogenèse aux deux concentrations les plus élevées ; 50 et 100  $\mu\text{M}$  (**Figure 2.12A**). Ce miPEP n'induit pas la formation des haustoriums lorsqu'il est appliqué sur des graines germées. Le miPEP319b inhibe lui aussi totalement l'haustoriogenèse à une concentration de 100  $\mu\text{M}$  (**Figure 2.12B**). Contrairement au miPEP319a, le miPEP319b induit la formation des haustoriums à une concentration de 50  $\mu\text{M}$  qui n'est pas la plus élevée testée. L'induction de l'haustoriogenèse par ce miPEP319b se fait dans une moindre mesure comparée à l'effet de la CK seule. Le suivi de l'expression des gènes cibles des miR319 à la suite d'un traitement par les miPEP319 lors de l'haustoriogenèse n'a pas été réalisé car le protocole d'haustoriogenèse n'a pas été optimisé par manque de temps, pour permettre une extraction d'ARNs en quantité et de qualité suffisantes chez *O. cumana*.



**Figure 2.12 : Pourcentage d'haustoriogenèse après un traitement avec la *c/tZ* avec ou sans les miPEP319 sur des graines germées de *O. cumana*.**

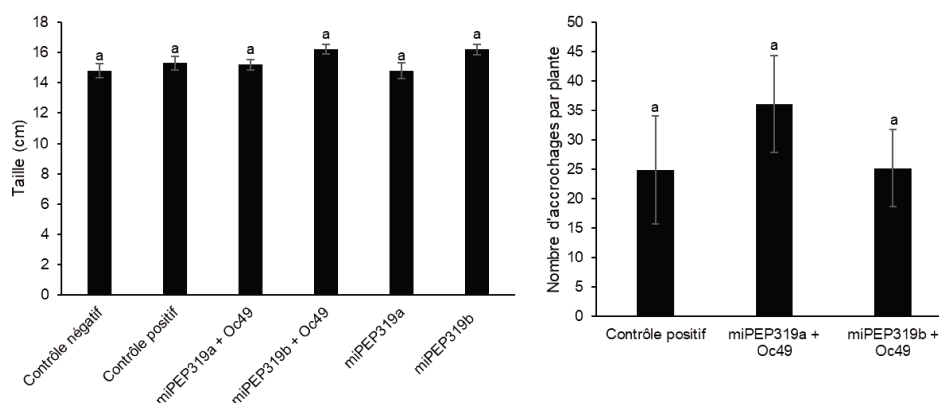
Un traitement avec le DCL à  $10^{-7}$  M permet de faire germer les graines d'orobanche. Le traitement avec les miPEP319a (A) et miPEP319b (B) est effectué à 7 concentrations 54 h après la stimulation de la germination. La *c/tZ* est utilisée à trois concentrations,  $5 \cdot 10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  et  $5 \cdot 10^{-8}$  M. Le pourcentage d'haustoriums formés est déterminé 10 jours après traitement aux miPEP. Les moyennes et les erreurs standard sont issues de 6 réplicats biologiques. Une, deux et trois étoiles représentent respectivement des différences de la condition contrôle sans miPEP à des niveaux de significativité de  $p < 0,05$  ;  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$  (Tukey-HSD).

### 3. Effet sur le pathosystème

Les résultats montrant l'effet des miPEP319 lors de la germination et de l'haustoriogénèse indiquent que le miPEP319a semble être un bon candidat pour développer un agent de biocontrôle contre *O. cumana*. La partie suivante de ce manuscrit présente l'effet des miPEP319 d'une part sur la croissance des tournesols et d'autre part sur l'infestation de ces derniers par l'orobanche. Pour cela, des expérimentations de co-culture ont été réalisées en système minirhizotron sur un support inerte, permettant de visualiser les racines au cours du développement, et en godets pour se rapprocher des conditions naturelles.

#### Co-cultures en minirhizotron

Les expérimentations de co-culture en minirhizotron ont montré l'absence d'effet des miPEP319 sur la taille des tournesols (**Figure 2.13**). L'infestation des tournesols par les orobanches n'induit pas de modification de la taille de ces derniers après 5 semaines de co-culture. L'impact de cette plante holoparasite sur le tournesol n'est donc pas visible après ce temps de culture. Aucune différence significative n'a été observée sur le nombre d'accrochages des graines d'orobanche entre les tournesols mis en co-culture avec des graines d'*O. cumana* dont le substrat est arrosé avec la solution nutritive seule (contrôle positif) et ceux dont le substrat est arrosé avec la solution nutritive contenant le miPEP319a ou le miPEP319b à une concentration de 1  $\mu$ M (**Figure 2.13**).

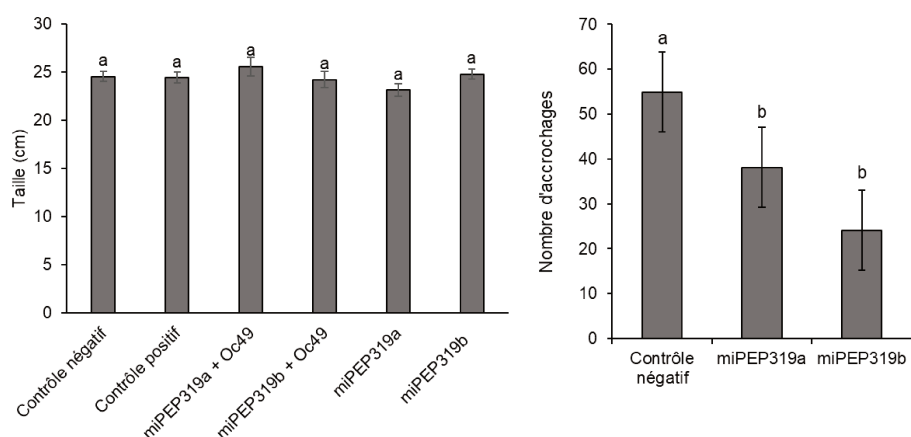


**Figure 2.13 : Taille des tournesols et nombre d'accrochages d'orobanche par tournesol à la suite d'un traitement avec le miPEP319a ou le miPEP319b.**

Les tournesols ont été mis en culture dans des minirhizotron sur un substrat inerte composé de laine de roche avec ou sans orobanches du lot Oc49. Le témoin négatif correspond aux tournesols mis en culture sans orobanche et le témoin positif à ceux avec des orobanches sans application de miPEP319. Des tournesols cultivés sans orobanches ont été traités avec les miPEP319 à 1  $\mu$ M afin de vérifier l'absence d'effets négatifs sur leur croissance. Les mesures de la taille des tournesols ont été effectuées 5 semaines après semis. L'effet des miPEP est caractérisé par le dénombrement des accrochages après 5 semaines de co-culture. Les moyennes et les erreurs standard ont été déterminées à partir de 10 réplicats biologiques. Les résultats avec des lettres différentes sont différents significativement les uns des autres ( $p < 0,05$ ) d'après une ANOVA.

## Co-cultures en godet

Des expériences de co-cultures ont également été réalisées en godets afin de se rapprocher des conditions naturelles. Comme pour les cultures en minirhizotron, la taille des tournesols n'est pas impactée après 5 semaines de culture en godets, quelles que soient les conditions (**Figure 2.14**). Ces résultats confirment l'absence d'effet délétère du traitement avec les miPEP sur le développement des tournesols. L'ajout de miPEP319a ou de miPEP319b dans la solution d'arrosage du substrat induit une diminution significative du nombre d'accrochages d'orobanche sur les tournesols, comparativement aux tournesols mis en co-culture avec des graines d'*O. cumana* arrosés avec la solution nutritive seule (contrôle positif, **Figure 2.14**). Ces miPEP permettent ainsi de diminuer l'infestation des tournesols par *O. cumana* dans ces conditions de test. Ils pourraient donc être utilisés comme agent de biocontrôle.



**Figure 2.14 : Taille des tournesols et nombre d'accrochages d'orobanche par tournesol à la suite d'un traitement avec le miPEP319a ou le miPEP319b.**

Les tournesols ont été mis en culture en godets dans un substrat inerte contenant ou non des orobanches du lot Oc49. Le témoin négatif correspond aux tournesols mis en culture sans orobanche et le témoin positif à ceux en présence d'orobanches sans application de miPEP319. Des tournesols cultivés sans orobanche ont été traités avec les miPEP319 afin de vérifier l'absence d'effets négatifs de ces derniers sur leur croissance. Les mesures de la taille des tournesols ont été effectuées 5 semaines après semis. L'effet des miPEP est caractérisé par le dénombrement des accrochages après 5 semaines de co-culture. Les moyennes et les erreurs standard ont été déterminées à partir de 10 plantes. Les résultats avec des lettres différentes sont différents significativement les uns des autres ( $p < 0,05$ ) d'après une ANOVA.

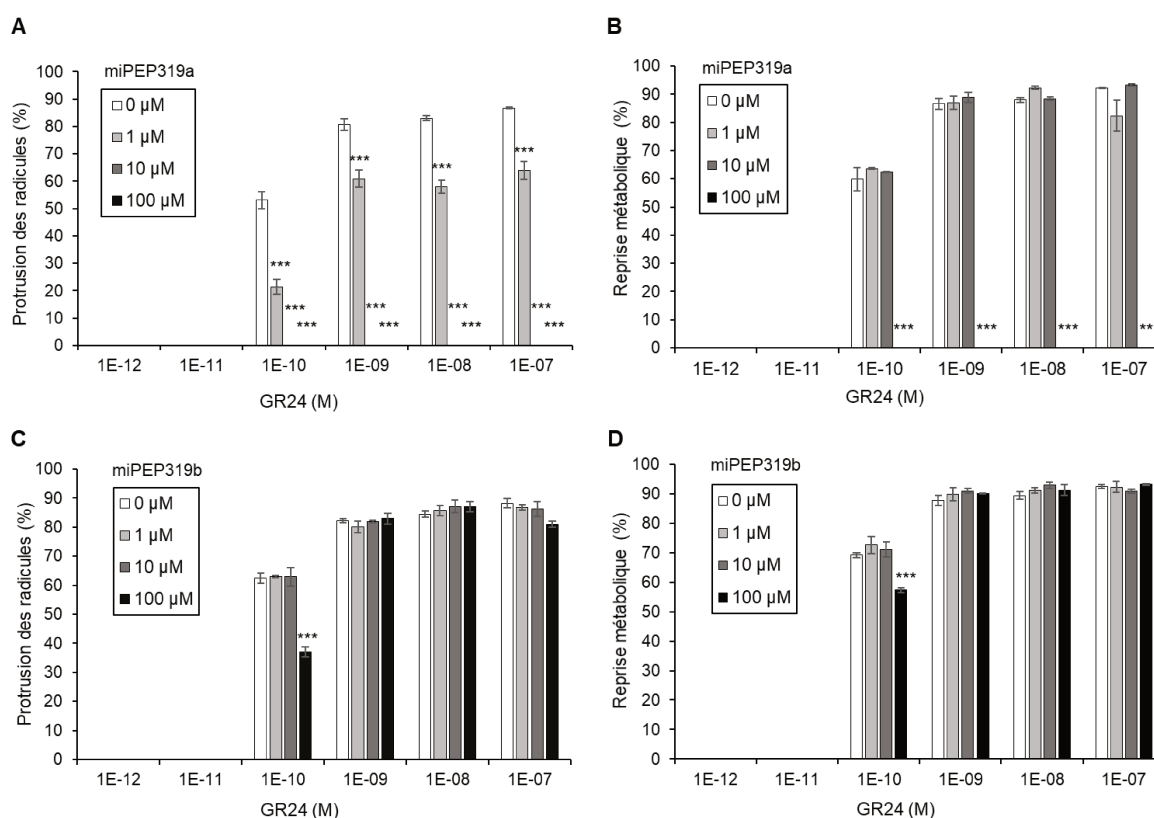
## B. Les miPEP319 de *P. ramosa*

Comme pour les miPEP319 d'*O. cumana*, une caractérisation plus fine de l'effet phénotypique des miPEP319 est effectuée lors de la germination et de l'haustoriogenèse chez *P. ramosa*. Une étude de l'expression des gènes cibles des miR319 a par la suite été réalisée à la suite d'un traitement avec le miEP319a lors de l'haustoriogenèse afin de confirmer l'action spécifique de ce miPEP sur ces gènes.

## 1. Effet sur la germination

### Effet phénotypique

Les tests réalisés ont mis en évidence une inhibition de la protrusion des racicules pour toutes les concentrations en miPEP319a testées (**Figure 2.15A**). Une inhibition totale est observée aux concentrations de 10 et 100  $\mu\text{M}$  en miPEP319a et une inhibition partielle à une concentration de 1  $\mu\text{M}$  quelle que soit la concentration en *rac*-GR24 utilisée. Comme pour les miPEP d'*O. cumana*, l'effet inhibiteur de la protrusion des racicules induit par le miPEP319a est dose réponse. Ce miPEP induit également une inhibition totale de la reprise métabolique lorsqu'il est utilisé à une concentration de 100  $\mu\text{M}$ , quelle que soit la concentration en *rac*-GR24 utilisée (**Figure 2.15B**). Le miPEP319b induit une inhibition de la protrusion des racicules (**Figure 2.15C**), et de la reprise métabolique des graines (**Figure 2.15D**) à une forte concentration en miPEP et une faible concentration en stimulant. Ces profils de réponse sont similaires à ceux observés avec les miPEP319 sur la germination des graines d'*O. cumana* (**Figure 2.4**).



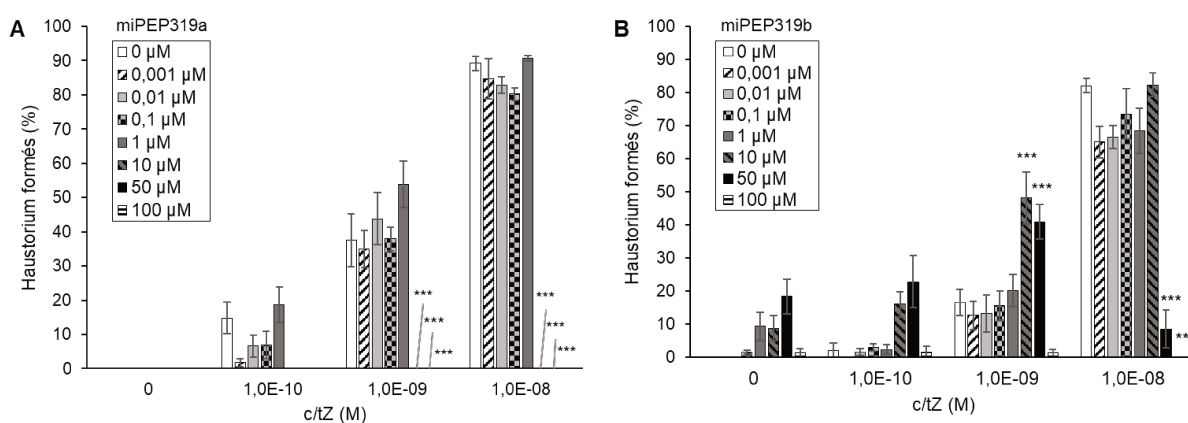
**Figure 2.15 : Pourcentage de reprise métabolique et de protrusion des racicules de graines de *P. ramosa* après traitement avec le *rac*-GR24 en présence ou non de miPEP.**

Les pourcentages de reprise métabolique (B et D) et de protrusion des racicules (A et C) des graines de *P. ramosa* du lot Pram119 ont été déterminés 4 jours après traitement avec le miPEP319a (A et B) ou le miPEP319b (C et D) seul ou avec du *rac*-GR24. Les moyennes et les erreurs standard ont été déterminées à partir de trois réplicats biologiques. Trois étoiles représentent des différences avec la condition contrôle sans miPEP à un niveau de significativité de  $p < 0,001$  (Tukey-HSD).

## 2. Effet sur la formation de l'haustorium

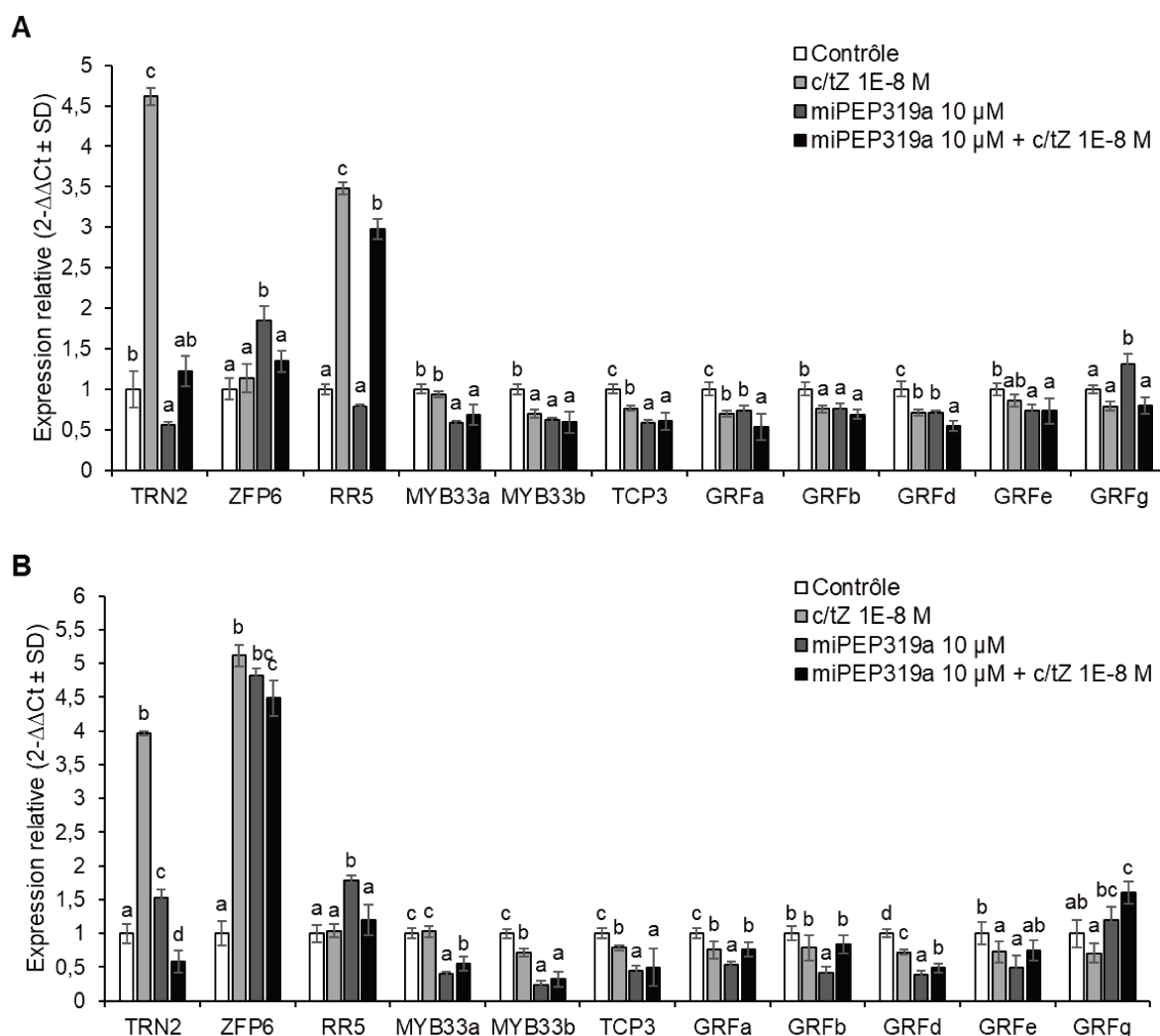
### Effet Phénotypique

Une inhibition de l'haustoriogenèse a été mise en évidence pour le miPEP319a à des concentrations supérieures ou égales à 10  $\mu\text{M}$  (**Figure 2.16A**). Le miPEP319b quant à lui présente des effets antagonistes selon les concentrations en miPEP et en CK utilisées. En effet, il stimule l'haustoriogenèse lorsqu'il est utilisé aux concentrations de 10 et 50  $\mu\text{M}$  couplées à un traitement avec la *c/tZ* à une concentration de  $10^{-9}$  M, alors qu'il l'inhibe lorsqu'il est utilisé aux concentrations de 50 et 100  $\mu\text{M}$  couplé à un traitement avec la *c/tZ* à  $10^{-8}$  M (**Figure 2.16B**). Cette dualité de réponse est semblable à celle des CKs observée lors de l'haustoriogenèse.



**Figure 2.16 : Pourcentage d'haustoriogenèse après un traitement avec la *c/tZ* en présence ou non de miPEP319 sur des graines germées de *P. ramosa*.**

Un traitement avec le *rac-GR24* à  $10^{-7}$  M permet de faire germer les graines d'orobanche. Le traitement avec les miPEP319a (A) et miPEP319b (B) est effectué à 7 concentrations 4 jours après la stimulation de la germination. Le pourcentage d'haustoriums formés est déterminé 3 jours après traitement aux miPEP. Les moyennes et les erreurs standard sont issues de 6 réplicats biologiques. Trois étoiles représentent des différences avec la condition contrôle sans miPEP à un niveau de significativité de  $p < 0,001$  (Tukey-HSD).



**Figure 2.17 : Quantification par qRT-PCR de l'expression relative de gènes marqueurs de l'haustoriogenèse et de gènes cibles des miR319 et miR396 12 h et 48 h après traitement avec la *c/tZ* seule, le miPEP319a seul ou après traitement avec la *c/tZ* et le miPEP319a.**

Des graines prégermées de *P. ramosa* ont été traitées avec la *c/tZ* à  $10^{-8}$  M, le miPEP319a à  $10^{-5}$  M ou avec les deux. Les analyses d'expression de gènes sont effectuées 12 h (A) ou 48 h (B) après traitement. Les moyennes et les écarts types ont été calculés à partir de deux réplicats biologiques. L'expression relative a été déterminée pour un gène marqueur de l'haustoriogenèse : *TRN2*, deux gènes effecteurs des voies de réponses aux CKs : *ZFP6* et *RR5*, 3 gènes cibles des miR319 : *MYB33a*, *MYB33b* et *TCP3* et 5 gènes cibles des miR396 : *GRFa*, *GRFb*, *GRFd*, *GRFe* et *GRFg*. L'expression des gènes a été normalisée par rapport au gène de référence *PrUBI10* et par rapport au contrôle (graines prégermées traitées avec le solvant). La valeur seuil contrôle est fixée à 1. Au-dessus de cette valeur le gène est sur-exprimé et en dessous, il est sous-exprimé. Les résultats avec des lettres différentes sont différents significativement les uns des autres ( $p < 0,05$ ) d'après un test de Tukey-HSD.

### **Effet sur l'expression de gènes cibles des miARN correspondants**

Afin de confirmer la spécificité d'action des miPEP de *P. ramosa*, une analyse de l'expression relative de gènes cibles des miR319 et miR396, de gènes marqueurs de l'haustoriogenèse ainsi que de gènes en lien avec les voies de réponse aux CKs a été effectuée à la suite d'un traitement avec la *c/tZ* et/ou le miPEP319a. Le miPEP319b n'a pas été sélectionné car ce test est chronophage et complexe à réaliser à cause des fenêtres de concentrations actives très étroites des cytokinines. Le choix du miPEP à tester s'est donc porté sur le miPEP319a présentant un effet inhibiteur plus important. Onze gènes ont ainsi été sélectionnés pour étudier l'effet du miPEP319a. Le gène *Tornado2 (TRN2)* a été identifié comme un marqueur de l'haustoriogenèse lors d'un précédent travail de thèse (Goyet, 2017), il est impliqué dans la formation des poils absorbants (Cnops *et al.*, 2000). Les gènes *Zinc Finger Protein 6 (ZFP6)* et *Response Regulator 5 (RR5)* sont des effecteurs des voies de réponses aux CKs impliqués respectivement dans la formation des trichomes (Zhou *et al.*, 2013a) et dans le rétrocontrôle négatif des CKs (Hai *et al.*, 2020). Ces deux gènes sont également utilisés comme marqueurs de l'haustoriogenèse (Goyet, 2017; Goyet *et al.*, 2017). Les gènes *MYB33a*, *MYB33b* et *TCP3* sont des cibles des miR319. Les gènes *GRFa*, *GRFb*, *GRFd*, *GRFe* et *GRFg* sont des cibles des miR396. Ces 5 derniers gènes ont été sélectionnés pour cette étude car l'expression des miR396 est stimulée par les *TCPs* et donc indirectement régulée par les miR319.

Comme attendu, ces analyses mettent en évidence une surexpression de *TRN2* pour les deux temps étudiés après traitement avec la CK seule (**Figure 2.17A**). Les deux gènes *ZFP6* et *RR5* sont sur-exprimés 48 h et 12 h après traitement respectivement. *ZFP6* serait donc un gène de réponse tardive et *RR5*, un gène de réponse précoce aux CKs. Le miPEP319a induit une inhibition de l'expression de *TRN2* après 12 h et une surexpression après 48 h en absence de CK (**Figure 2.17**). Ce miPEP inhibe l'effet de la CK sur l'expression de *TRN2* lorsqu'il est utilisé en co-traitement. Une surexpression précoce du gène *ZFP6* et une réponse plus tardive du gène *RR5* sont observées à la suite d'un traitement avec ce miPEP en comparaison avec le traitement CK seul. L'ajout de ce miPEP va également entraîner une inhibition partielle de l'effet de la CK sur l'expression de ces deux gènes effecteurs des voies de réponse aux CKs. Ces résultats sont cohérents avec l'inhibition de l'haustoriogenèse observée à la suite du co-traitement avec le miPEP et la CK aux mêmes concentrations (**Figure 2.16**). Ce miPEP agirait ainsi sur les voies de réponse aux CKs de manière directe ou non.

Le traitement avec la *c/z* induit une diminution de l'expression relative de la majorité des gènes cibles. Seule l'expression des gènes *MYB33a* et *GRFg* n'est pas modifiée après un traitement avec la CK aux deux temps étudiés (**Figure 2.17**).

Le traitement des graines germées avec le miPEP319a induit une inhibition de l'expression de tous les gènes cibles étudiés 12 h après traitement hormis pour le gène *GRFg* qui lui, est sur-exprimé après 12 h (**Figure 2.17A**). Ce miPEP agit donc de manière spécifique sur l'expression de ces gènes cibles de miARN. Les niveaux d'expression des gènes *MYB33a*, *MYB33b*, *TCP3*, *GRFb* et *GRFe* 12 h après le co-traitement sont similaires à ceux obtenus avec le miPEP seul et sous-exprimés en comparaison au traitement CK. Ce miPEP inhibe ainsi l'effet de la CK. Le co-traitement induit une inhibition plus importante des gènes *GRFa* et *GRFd* après 12h. Il y aurait un effet cumulatif de l'effet du miPEP et de la CK sur l'inhibition de l'expression de ces deux gènes. Pour finir, la CK a un effet inhibiteur de l'action du miPEP sur l'expression du gène *GRFg* pour ramener son expression relative au niveau de celle du contrôle et du traitement avec la CK.

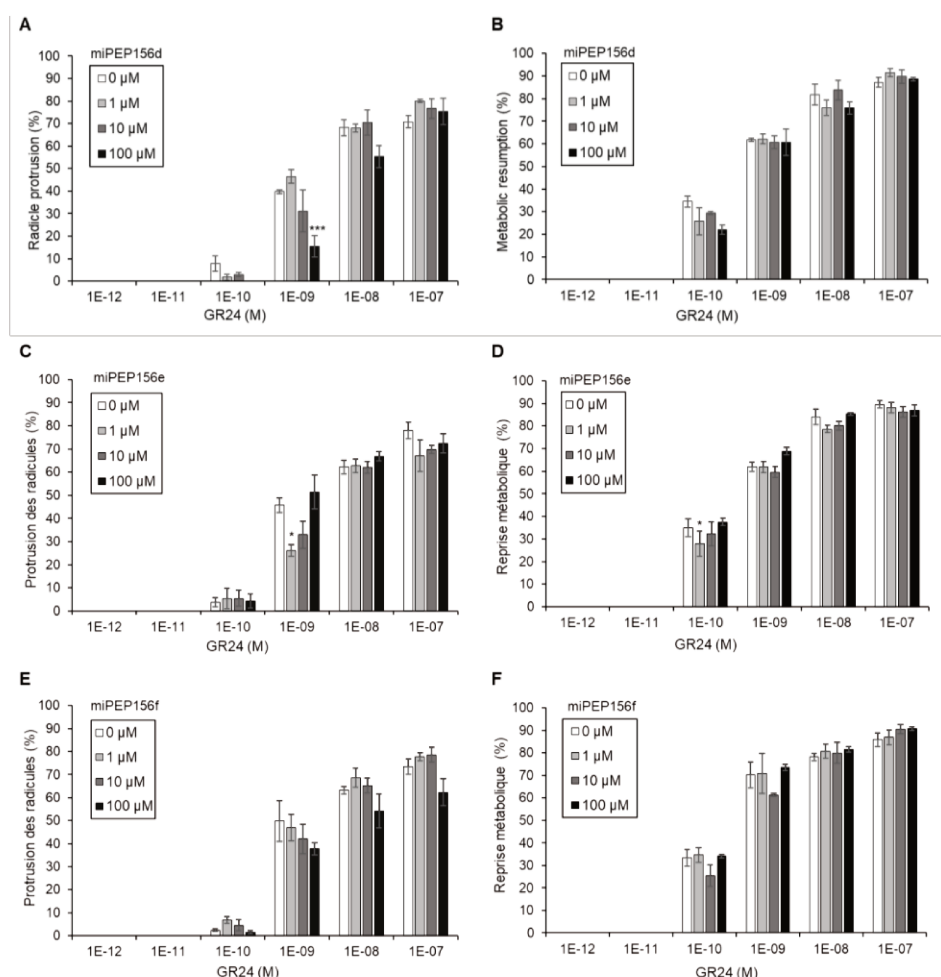
La majorité des gènes étudiés sont sous-exprimés 48 h après un traitement avec le miPEP319a en comparaison à l'effet de la CK seule, sauf pour le gène *GRFe* qui est sous-exprimé dans les mêmes proportions qu'à la suite d'un traitement avec la CK seule (**Figure 2.17B**). Le co-traitement avec le miPEP et la CK induit une sous-expression des gènes *MYB33a*, *MYB33b*, *TCP3* et *GRFd* après 48 h comparativement au traitement CK (**Figure 2.17B**). Cette inhibition de l'expression des gènes *MYB33a* et *GRFd* est moins importante qu'avec le miPEP seul. L'effet du miPEP et de la CK sont donc antagonistes sur l'expression de ces deux gènes. L'ajout de miPEP en complément du traitement avec la CK n'entraîne pas de modification de l'expression des gènes *GRFa*, *GRFb* et *GRFe* comparativement au traitement avec la CK seule, alors que ces gènes sont sous-exprimés à la suite d'un traitement miPEP seul. La CK semble donc avoir un effet dominant sur celui du miPEP pour ces gènes 48 h après traitement. Le gène *GRFg* quant à lui est sur-exprimé à la suite du co-traitement annulant l'effet inhibiteur de la CK seule pour arriver à un niveau d'expression similaire au traitement avec le miPEP seul. Ainsi, l'effet du miPEP sur ce gène semble être dominé par celui de la CK 12 h après traitement alors qu'il semble dominant 48 h après traitement.

## C. Effets des miPEP156, miPEP159, miPEP164 et miPEP172 sur la germination d'*O. cumana*

### 1. Effet des miPEP156

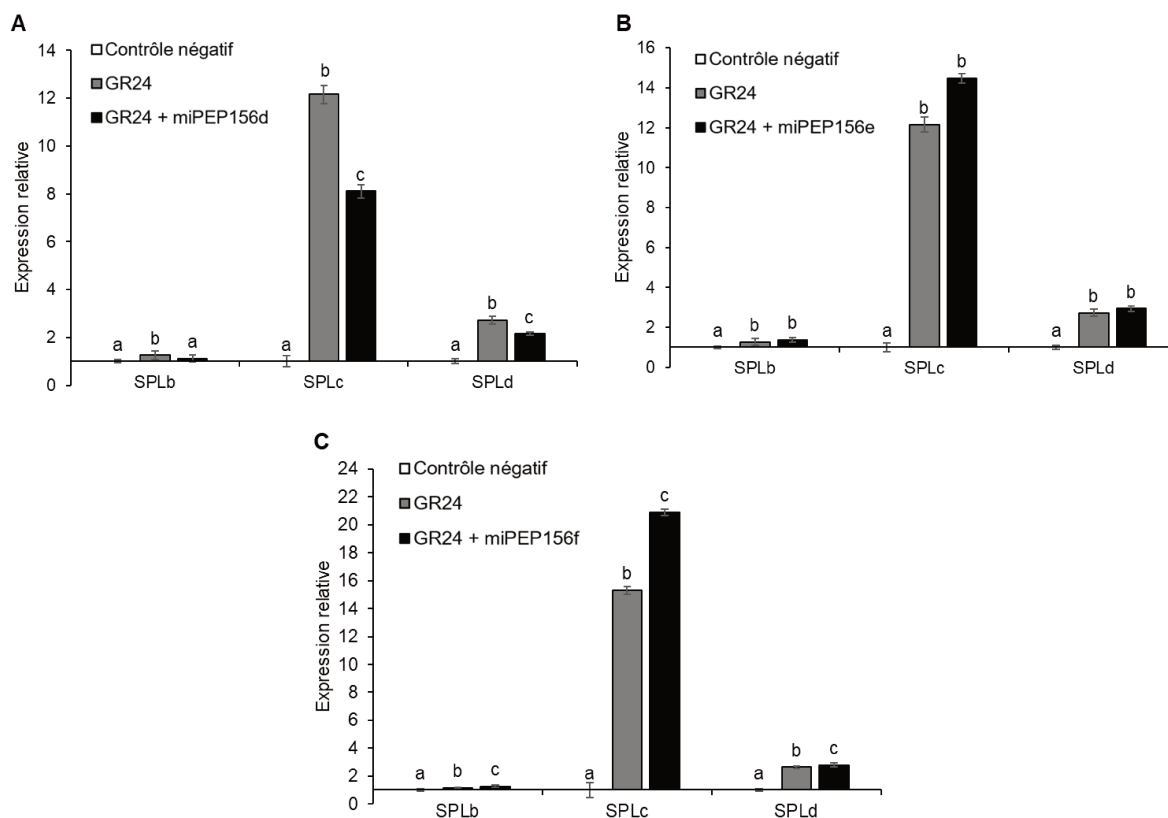
#### Effet Phénotypique

Les tests réalisés montrent une inhibition de la protrusion des racicules lorsque le miPEP156d est utilisé à la concentration la plus élevée, 100  $\mu\text{M}$ , avec une concentration en *rac*-GR24 à  $10^{-9}$  M faible (**Figure 2.18A**) sans modification de la reprise métabolique des graines d'*O. cumana* (**Figure 2.18B**). Les miPEP156e et miPEP156f n'induisent pas ou peu de modification de la germination des graines d'*O. cumana* (**Figure 2.18C, D, E et F**).



**Figure 2.18 : Pourcentage de reprise métabolique et de protrusion des racicules de graines d'*O. cumana* après traitement avec le *rac*-GR24 en présence ou non de miPEP.**

Les pourcentages de reprise métabolique (B, D et F) et de protrusion des racicules (A, C et E) des graines d'*O. cumana* du lot Oc49 ont été déterminés 56 h après traitement avec le miPEP156d (A et B), le miPEP156e (C et D) ou le miPEP156f seul ou avec du *rac*-GR24. Les moyennes et les erreurs standard ont été déterminées à partir de trois réplicats biologiques. Une et trois étoiles représentent respectivement des différences avec la condition contrôle sans miPEP à des niveaux de significativité de  $p < 0,05$  et  $p < 0,001$  (Tukey-HSD).



**Figure 2.19 : Quantification par qRT-PCR de l'expression relative de 3 gènes cibles de miR156 48 h après induction de la germination d'*O. cumana* par un traitement avec le *rac*-GR24 en présence ou non de miPEP156.**

Les moyennes et les écarts types de l'expression des gènes *SPLb*, *SPLc* et *SPLd*, cibles des miR156, ont été calculés à partir de deux réplicats biologiques à la suite d'un traitement avec le *rac*-GR24 à  $10^{-10}$  M seul et/ou avec le miPEP156d (A), le miPEP156e (B) ou le miPEP156f (C) à 100  $\mu$ M. L'expression des gènes a été normalisée par rapport au gène de référence *UBI10* et par rapport au contrôle négatif (traitement solvant). La valeur seuil contrôle est fixée à 1, au-dessus de cette valeur, le gène est sur-exprimé et en dessous de celle-ci, il est sous-exprimé. Les valeurs indiquées par différentes lettres sont significativement différentes de celle du contrôle négatif, selon un test de Tukey-HSD ( $p < 0,001$ ).

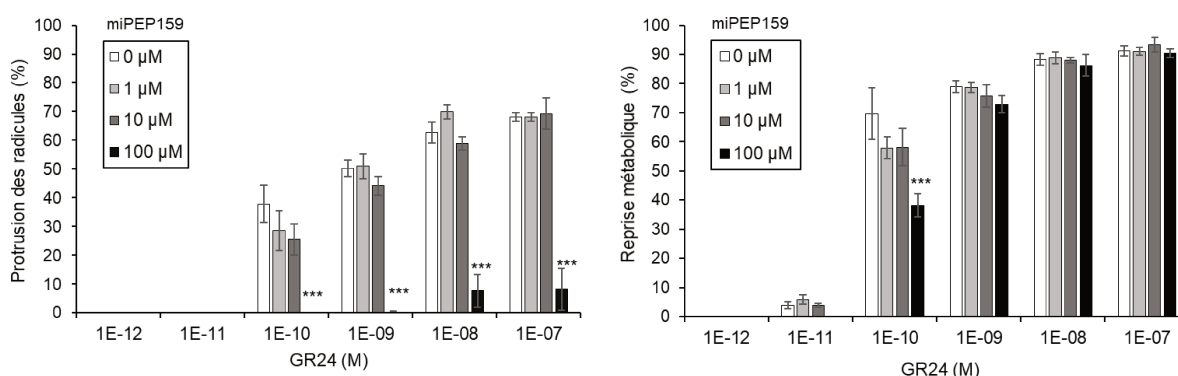
### **Effet sur l'expression de gènes cibles des miARN correspondants**

L'expression relative des gènes cibles des miR156 a été déterminée 48 h après le traitement avec le *rac*-GR24 à  $10^{-10}$  M seul ou avec les miPEP156 à 100  $\mu$ M. Trois gènes cibles *SPLs* des miR156 ont été étudiés. Ceux-ci sont sur-exprimés à la suite d'un traitement avec le *rac*-GR24 seul (**Figure 2.19**). L'ajout du miPEP156d inhibe totalement l'effet du *rac*-GR24 sur le gène *SPLb* et inhibe partiellement l'effet du *rac*-GR24 sur l'expression des deux autres gènes cibles (**Figure 2.19A**). Les résultats précédents ont montré un effet inhibiteur important de germination à la suite du traitement avec ce miPEP (**Figure 2.18A**) ce qui concorde avec cette sous-expression des gènes cibles. Le traitement avec le miPEP156e n'induit pas de modification significative du niveau d'expression des gènes cibles des miR156 en comparaison au traitement avec le *rac*-GR24 seul (**Figure 2.19B**). Cela concorde également avec le très faible effet inhibiteur de ce miPEP observé lors de la germination (**Figure 2.18B**). L'ajout du miPEP156f induit une augmentation significative de l'expression des trois gènes cibles étudiés en comparaison avec le traitement *rac*-GR24 seul (**Figure 2.19C**). Le miPEP156f n'induit pas de modification de la germination, même s'il induit une surexpression des gènes cibles étudiés. La stimulation par une strigolactone de la germination des graines d'*O. cumana* s'accompagnerait donc de la surexpression des gènes *SPLb*, *SPLc*, et *SPLd* sans que cette surexpression seule soit suffisante pour induire la germination.

## 2. Effet du miPEP159

### Effet Phénotypique

Le miPEP159 induit une forte inhibition de la protrusion des racines à une concentration de 100  $\mu\text{M}$  pour toutes les concentrations en *rac*-GR24 utilisées (**Figure 2.20**). Une inhibition de la reprise métabolique est également observée pour la concentration en miPEP la plus forte utilisée, couplée à la concentration la plus faible en *rac*-GR24. Ce miPEP inhibe donc des mécanismes en amont de la reprise métabolique des graines.

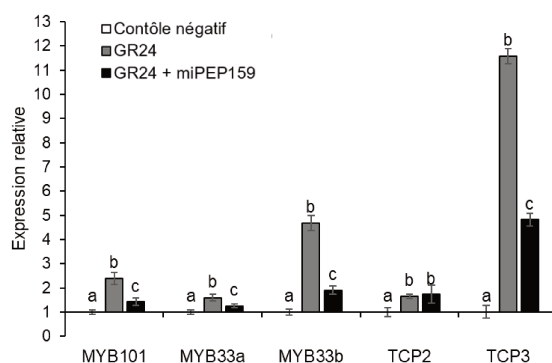


**Figure 2.20 : Pourcentage de reprise métabolique et de protrusion des racicules de graines d'*O. cumana* après traitement avec le *rac*-GR24 en présence ou non de miPEP.**

Les pourcentages de reprise métabolique et de protrusion des racicules des graines d'*O. cumana* du lot Oc49 ont été déterminés 56 h après traitement avec le miPEP159 seul à 1, 10 ou 100  $\mu\text{M}$  ou avec du *rac*-GR24 à une concentration allant de  $10^{-12}$  à  $10^{-7}$  M. Les moyennes et les erreurs standard ont été déterminées à partir de trois réplicats biologiques. Une, deux et trois étoiles représentent respectivement des différences avec la condition contrôle sans miPEP à des niveaux de significativité de  $p < 0,05$  ;  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$  (Tukey-HSD).

### Effet sur l'expression de gènes cibles des miARN correspondants

L'expression relative des gènes cibles des miR159 et miR319 a été déterminée 48 h après traitement avec le *rac*-GR24 à  $10^{-10}$  M seul ou avec le miPEP159. Cinq gènes ont été étudiés : le *MYB101* cible du miR159 ; les *MYB33a* et *b* cibles des miR159 et miR319 ; et les *TCP2* et *3* cibles des miR319. Le traitement avec le *rac*-GR24 seul induit une augmentation de l'expression de l'ensemble de ces gènes (**Figure 2.21**). L'ajout du miPEP159 induit une inhibition de l'effet du *rac*-GR24 sur l'expression des gènes *MYB101*, *MYB33a*, *MYB33b* et *TCP3*. Seule l'expression du gène *TCP3* n'est pas modifiée à la suite d'un traitement avec ce miPEP. L'inhibition de la germination des graines d'*O. cumana* serait causée par l'action du miPEP sur l'expression du miR159 et donc par l'inhibition de l'expression de ses gènes cibles.



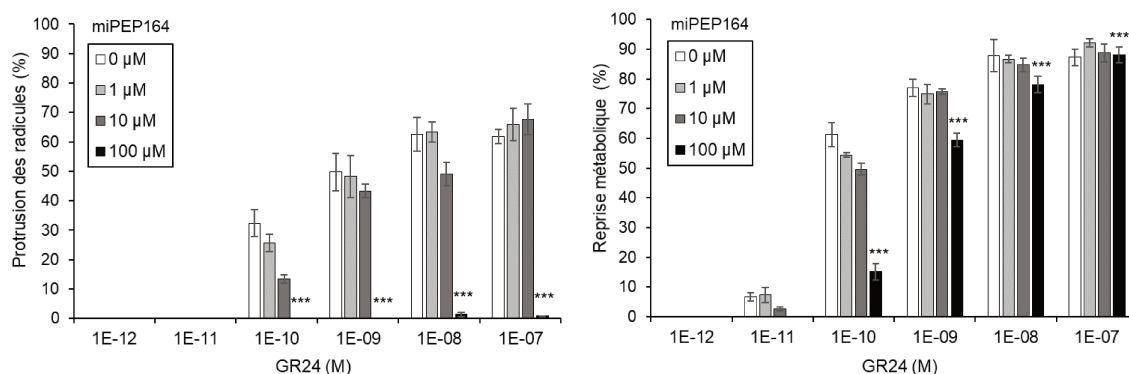
**Figure 2.21 : Quantification par qRT-PCR de l'expression relative de 3 gènes cibles du miR159 et 4 gènes cibles des miR319, 48 h après induction de la germination d'*O. cumana* par un traitement avec le *rac*-GR24 en présence ou non de miPEP159.**

Les moyennes et les écarts types de l'expression des gènes *MYB101*, cibles du miR159 ; *MYB33a* et *MYB33b*, cibles du miR159 et des miR319 et des gènes *TCP2* et *TCP3*, cibles des miR319, ont été calculés à partir de deux réplicats biologiques à la suite d'un traitement avec le *rac*-GR24 seul à  $10^{-10}$  M et/ou avec le miPEP159 à 100  $\mu$ M. L'expression des gènes a été normalisée par rapport au gène de référence *UBI10* et par rapport au contrôle négatif (traitement solvant). La valeur seuil contrôle est fixée à 1, au-dessus de cette valeur, le gène est sur-exprimé et en dessous de celle-ci, il est sous-exprimé. Les valeurs indiquées par différentes lettres sont significativement différentes de celle du contrôle négatif, selon un test de Tukey-HSD ( $p < 0,001$ ).

### 3. Effet du miPEP164

#### Effet Phénotypique

L'ajout de le miPEP164 en co-traitement avec le *rac*-GR24 induit une inhibition totale de la protrusion des radicules avec la plus forte concentration en miPEP ainsi qu'un effet inhibiteur de la reprise métabolique dose réponse avec une forte inhibition à de fortes concentrations en miPEP et de faibles concentrations en *rac*-GR24 (Figure 2.22). Ce miPEP présente le même profil de réponse que le miPEP319a (Figure 2.4A).

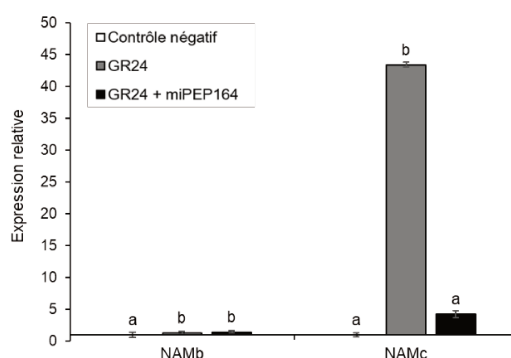


**Figure 2.22 : Pourcentage de reprise métabolique et de protrusion des radicules de graines d'*O. cumana* après traitement avec le *rac*-GR24 en présence ou non de miPEP164.**

Les pourcentages de reprise métabolique et de protrusion des radicules des graines d'*O. cumana* du lot Oc49 ont été déterminés 56 h après traitement avec le miPEP164 seul à 1, 10 ou 100  $\mu$ M ou avec du *rac*-GR24 à une concentration allant de  $10^{-12}$  à  $10^{-7}$  M. Les moyennes et les erreurs standard ont été déterminées à partir de trois réplicats biologiques. Trois étoiles représentent une différence avec la condition contrôle sans miPEP à un niveau de significativité de  $p < 0,001$  (Tukey-HSD).

### Effet sur l'expression de gènes cibles des miARN correspondants

L'expression relative de deux gènes cibles du miR164, *NAMb* et *NAMc*, a été étudiée en réponse à un traitement avec du *rac*-GR24 à  $10^{-10}$  M seul ou avec le miPEP164 à 100  $\mu$ M (**Figure 2.23**). Le traitement avec le *rac*-GR24 induit une augmentation de l'expression relative des trois gènes étudiés. L'ajout du miPEP164 inhibe l'effet du traitement *rac*-GR24 sur l'expression du gène *NAMc* avec un retour au niveau d'expression de la condition contrôle. Le traitement avec ce miPEP n'induit pas de modification de l'expression du gène *NAMb*. Ce miPEP agit donc spécifiquement sur l'expression des gènes cibles de son miARN associé.



**Figure 2.23 : Quantification par qRT-PCR de l'expression relative de 2 gènes cibles du miR164 48 h après induction de la germination d'*O. cumana* par un traitement avec le *rac*-GR24 en présence ou non de miPEP164.**

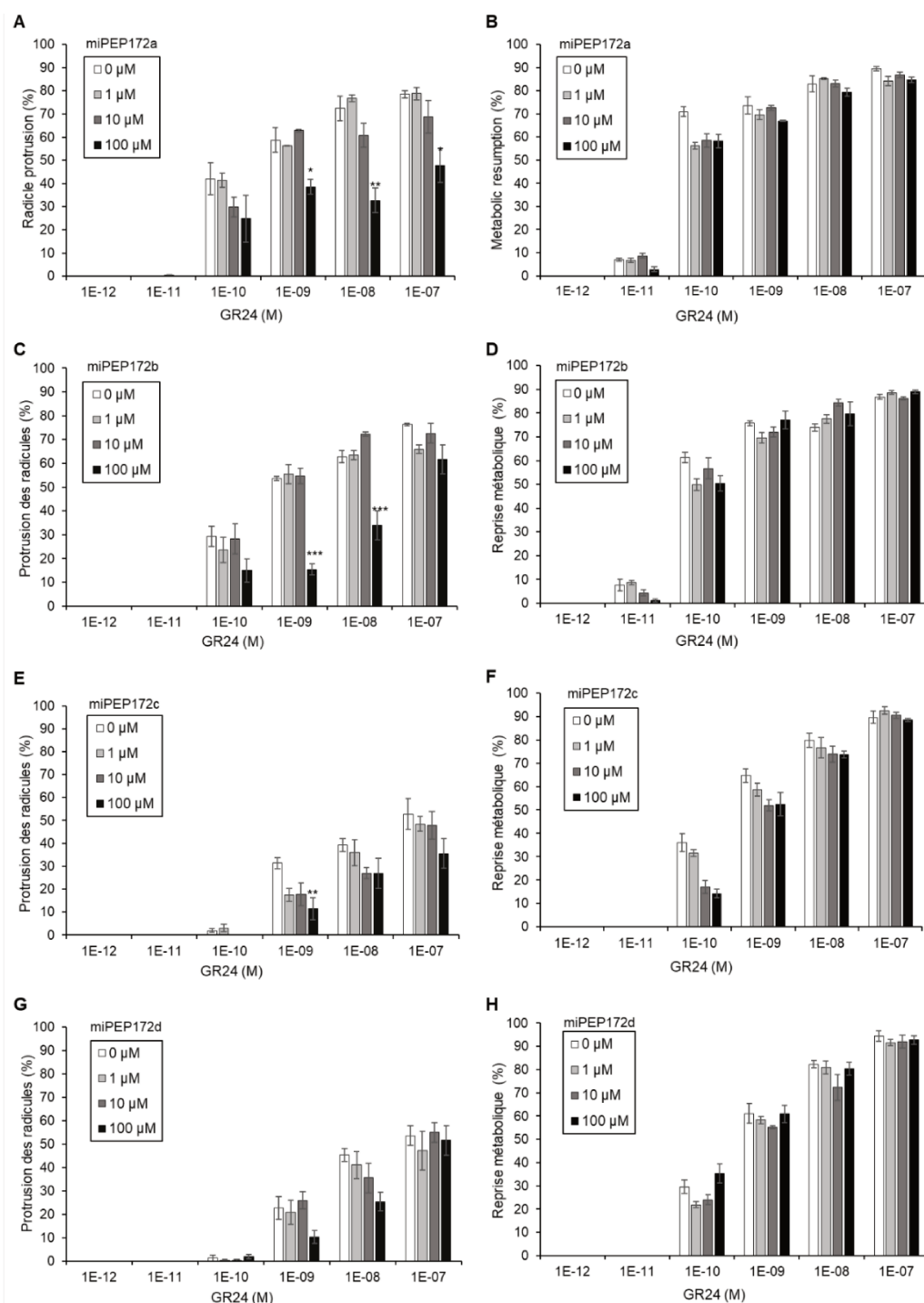
Les moyennes et les écarts types de l'expression des gènes *NAMb* et *NAMc*, cibles du miR164 ont été calculés à partir de deux réplicats biologiques à la suite d'un traitement avec le *rac*-GR24 seul à  $10^{-10}$  M et/ou avec le miPEP164 à 100  $\mu$ M. L'expression des gènes a été normalisée par rapport au gène de référence *UBI10* et par rapport au contrôle négatif (traitement solvant). La valeur seuil contrôle est fixée à 1, au-dessus de cette valeur, le gène est sur-exprimé et en dessous de celle-ci, il est sous-exprimé. Les valeurs indiquées par différentes lettres sont significativement différentes de celle du contrôle négatif, selon un test de Tukey-HSD ( $p < 0,001$ ).

## 4. Effet des miPEP172

### Effet Phénotypique

L'ajout du miPEP172a induit une inhibition de la protrusion des racines des graines d'*O. cumana* à la concentration la plus forte en miPEP, 100  $\mu$ M, pour les concentrations en *rac*-GR24 allant de  $1 \cdot 10^{-9}$  à  $1 \cdot 10^{-7}$  M (**Figure 2.24A**). Le miPEP172b induit une forte inhibition, environ 50 %, de la protrusion des racines à une concentration de 100  $\mu$ M en miPEP et des concentrations en *rac*-GR24 de  $1 \cdot 10^{-9}$  et  $1 \cdot 10^{-8}$  M (**Figure 2.24C**). Le miPEP172c induit également une inhibition de la protrusion des racines à 100  $\mu$ M avec la concentration en *rac*-GR24 de  $1 \cdot 10^{-9}$  M (**Figure 2.24E**). Le miPEP172d n'induit pas de modification de la protrusion des racines (**Figure 2.24G**). Ces trois miPEP n'ont pas d'effets sur la reprise métabolique des graines d'*O. cumana* (**Figures 2.24B, D, F et H**). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus lors du criblage des miPEP d'*O. cumana* (**Figure 1.4**, page 100 du chapitre 1). Ces

miPEP auraient donc une action sur un mécanisme en aval de la reconnaissance du stimulant de germination et de la reprise métabolique ; et en amont de la protrusion des racicules.



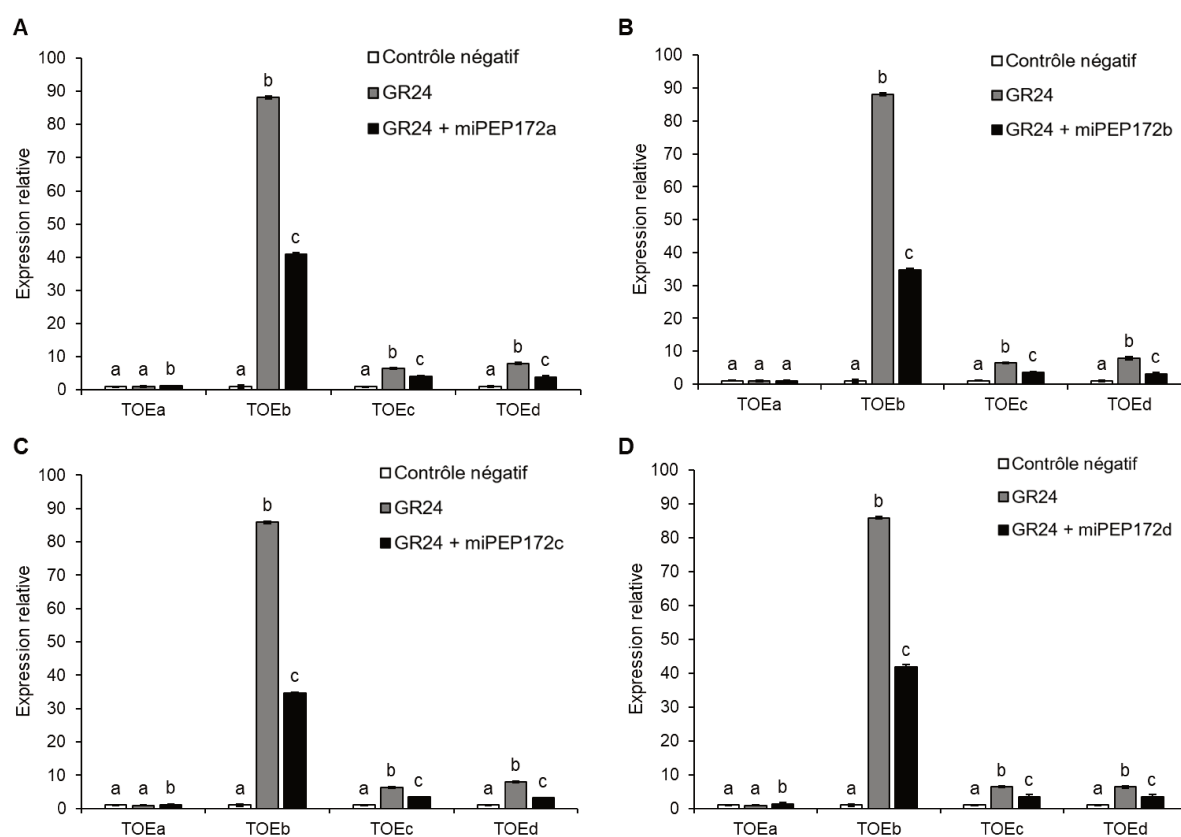
**Figure 2.24 : Pourcentage de reprise métabolique et de protrusion des racicules de graines d'*O. cumana* après traitement avec le *rac*-GR24 en présence ou non de miPEP.**

Les pourcentages de reprise métabolique (B, D et F) et de protrusion des racicules (A, C et E) des graines d'*O. cumana* du lot Oc49 ont été déterminés 56 h après traitement avec le miPEP172a (A et B), le miPEP172b (C et D), le miPEP172c (E et F) ou le miPEP172d (G et H) seuls à des concentrations de 1, 10 ou 100 µM ou avec du *rac*-GR24 à une concentration allant de 10<sup>-12</sup> à 10<sup>-7</sup> M. Les moyennes et les erreurs standard ont été déterminées à partir de trois réplicats biologiques. Une, deux et trois étoiles représentent respectivement des différences avec la condition contrôle sans miPEP à des niveaux de significativité de  $p < 0,05$  ;  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$  (Tukey-HSD).



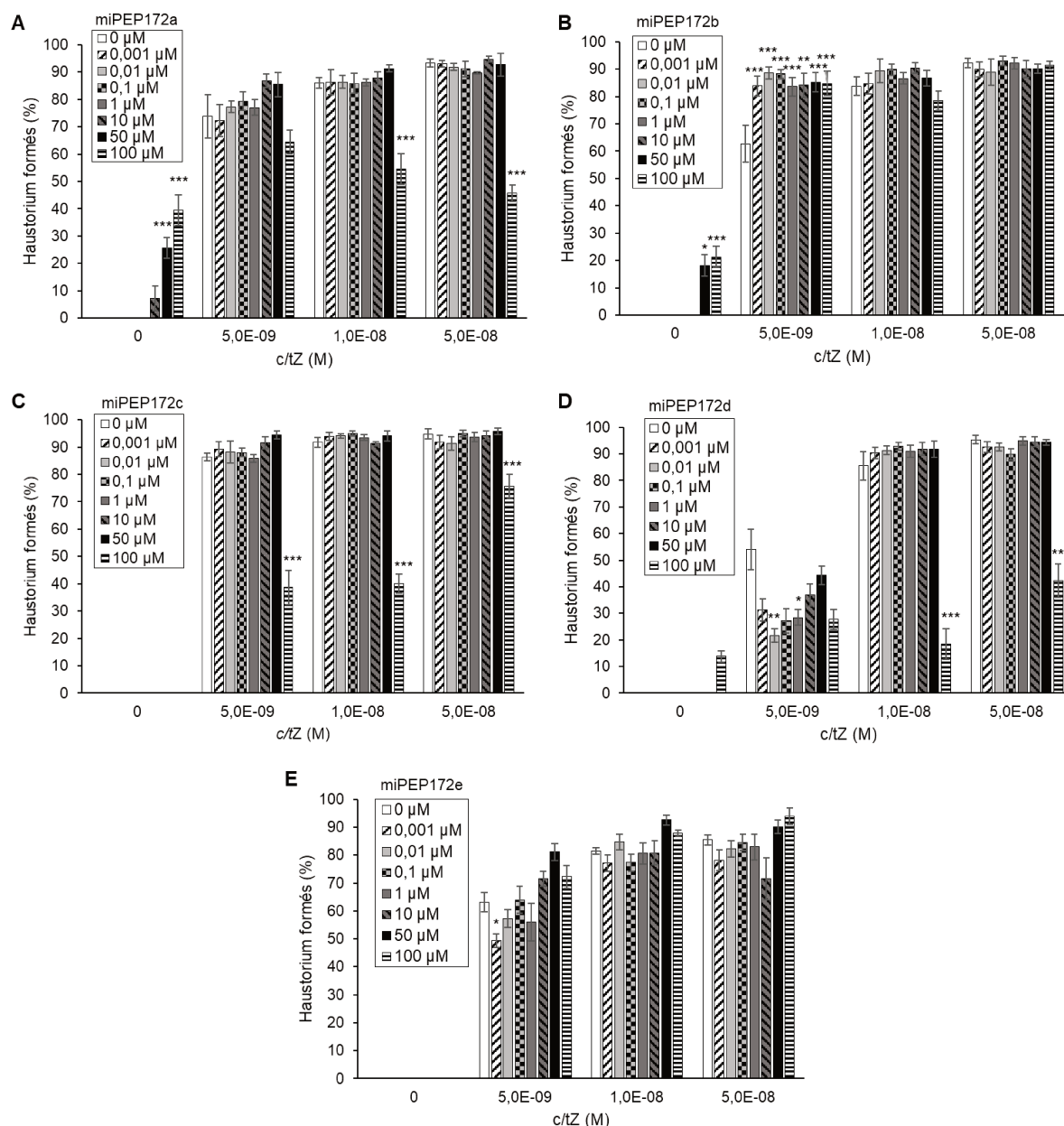
## Effet sur l'expression de gènes cibles des miARN correspondants

Afin de caractériser l'effet des miR172, une analyse de l'expression relative des gènes cibles des miR172 a été réalisée à la suite d'un traitement avec le *rac*-GR24 seul ou avec les miPEP172. L'expression des gènes *TOEb*, *TOEc* et *TOEd* est stimulée par le traitement avec le *rac*-GR24 seul (**Figure 2.25**). Les miPEP172a, miPEP172b, miPEP172c et miPEP172d induisent une diminution de l'expression de ces gènes en comparaison avec le traitement avec le *rac*-GR24 seul. Ainsi, les miPEP172 agissent de manière spécifique sur les gènes cibles des miR172. Ils agiraient donc sur l'expression des miR172. Ces gènes seraient ainsi impliqués dans la germination des graines d'*O. cumana*.



**Figure 2.25 : Quantification par qRT-PCR de l'expression relative de 4 gènes cibles de miR172 48 h après induction de la germination d'*O. cumana* par un traitement avec le *rac*-GR24 avec ou sans les miPEP172.**

Les moyennes et les écarts types de l'expression des gènes *TOEa*, *TOEb*, *TOEc* et *TOEd*, cibles des miR172, ont été calculés à partir de deux réplicats biologiques à la suite d'un traitement avec le *rac*-GR24 seul à  $10^{-10}$  M et/ou avec le miPEP172a (**A**), le miPEP172b (**B**), le miPEP172c (**C**) et le miPEP172d (**D**) à 100  $\mu$ M. L'expression des gènes a été normalisée par rapport au gène de référence *UBI10* et par rapport au contrôle négatif (traitement solvant). La valeur seuil contrôle est fixée à 1, au-dessus de cette valeur, le gène est sur-exprimé et en dessous de celle-ci, il est sous-exprimé. Les valeurs indiquées par différentes lettres sont significativement différentes de celle du contrôle négatif ( $p < 0,05$ , ANOVA).



**Figure 2.26 : Pourcentage d'haustoriogenèse après un traitement avec la *c/tZ* en présence ou non de miPEP172 sur des graines germées de *O. cumana*.**

Un traitement avec le DCL à  $10^{-7}$  M permet de faire germer les graines d'orobanche. Le traitement avec les miPEP172a (A), miPEP172b (B), miPEP172c (C), miPEP172d (D) et miPEP172e (E), est effectué à 7 concentrations 54 h après la stimulation de la germination. Le pourcentage d'haustoriums formés est déterminé 10 jours après traitement aux miPEP. Les moyennes et les erreurs standard sont issues de 6 réplicats biologiques. Une, deux et trois étoiles représentent respectivement des différences de la condition contrôle sans miPEP à des niveaux de significativité de  $p < 0,05$  ;  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$  (Tukey-HSD).

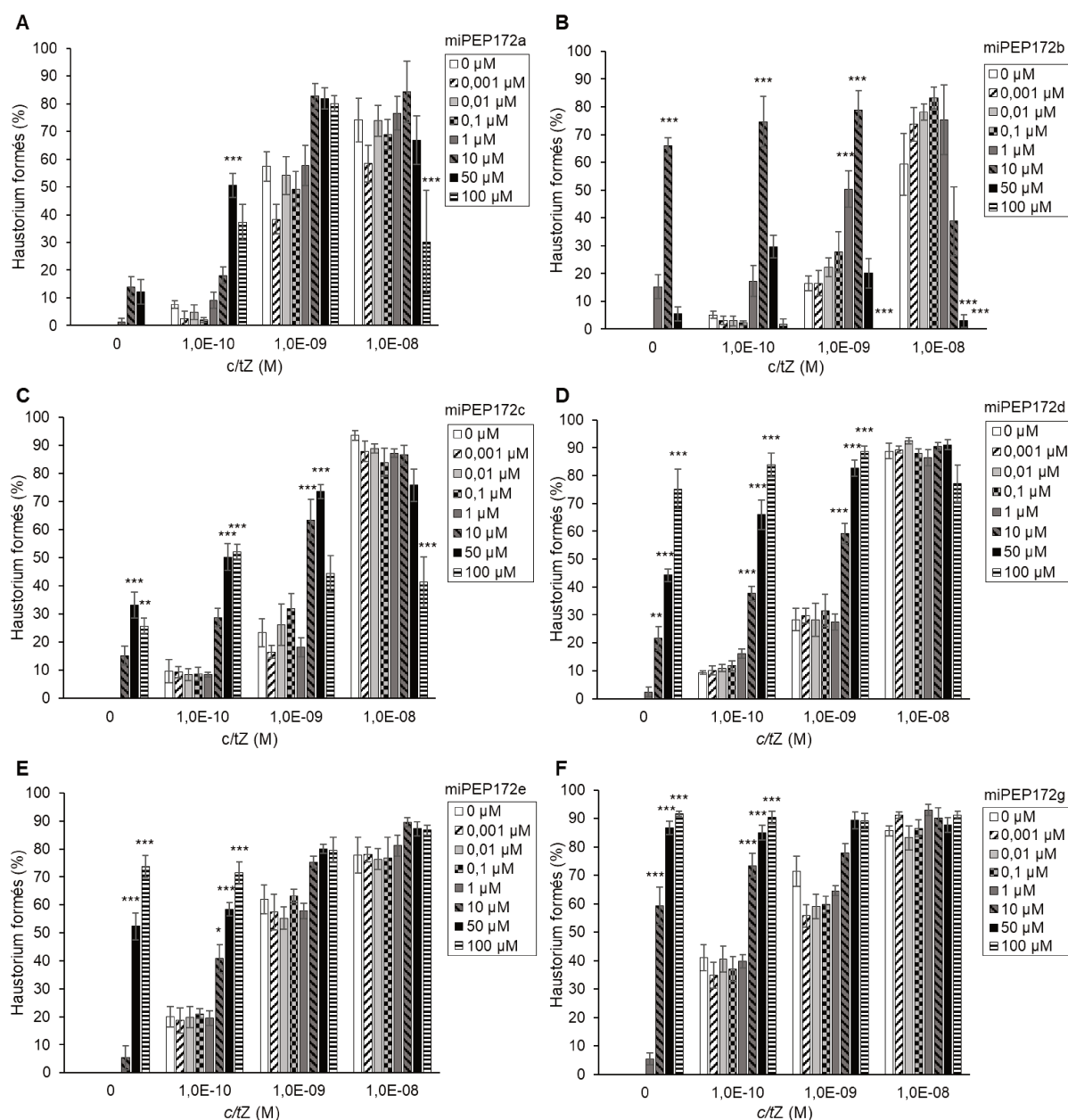
## D. Impact des miPEP172 sur l'haustoriogenèse

### 1. *O. cumana*

#### **Effet Phénotypique**

Cinq miPEP172 ont été testés sur des graines d'*O. cumana* lors de l'haustoriogenèse. Parmi ces 5 miPEP, deux sont inducteurs de l'haustoriogenèse, le miPEP172a et le miPEP172b (**Figure 2.26**). Le miPEP172a induit également une inhibition de la formation des haustoriums lorsqu'il est utilisé à la plus forte concentration, 100  $\mu\text{M}$ , couplé à de fortes concentrations en *c/tZ*, supérieures ou égales à  $1.10^{-8}$  M (**Figure 2.26A**). Ce miPEP présente ainsi un effet antagoniste avec un effet inducteur lorsqu'il est utilisé seul et un effet inhibiteur lorsqu'il est utilisé en co-traitement avec la CK. Le miPEP172b stimule l'haustoriogenèse en présence de CK à de faibles concentrations en *c/tZ*,  $5.10^{-9}$  M pour toutes les concentrations en miPEP172b testées (**Figure 2.26B**). Ce miPEP n'induit pas d'inhibition dans ces conditions de test. Le miPEP172c n'induit pas la formation des haustoriums lorsqu'il est appliqué seul, mais il induit une inhibition de la formation des haustoriums lorsqu'il est appliqué à 100  $\mu\text{M}$  en présence de CK (**Figure 2.26C**). Le miPEP172d n'induit pas l'haustoriogenèse et inhibe la formation des haustoriums à une concentration de 100  $\mu\text{M}$  couplée des concentrations en CK de  $1.10^{-8}$  M et  $5.10^{-8}$  M (**Figure 2.26D**). Le dernier miPEP testé, le miPEP172e n'a pas d'effet sur l'haustoriogenèse dans ces conditions de test (**Figure 2.26E**).

Les miPEP172 présentent ainsi une diversité de réponse. Certains vont être inducteurs de l'haustoriogenèse uniquement, d'autres vont être inhibiteurs uniquement et les derniers vont être inducteurs et inhibiteurs.



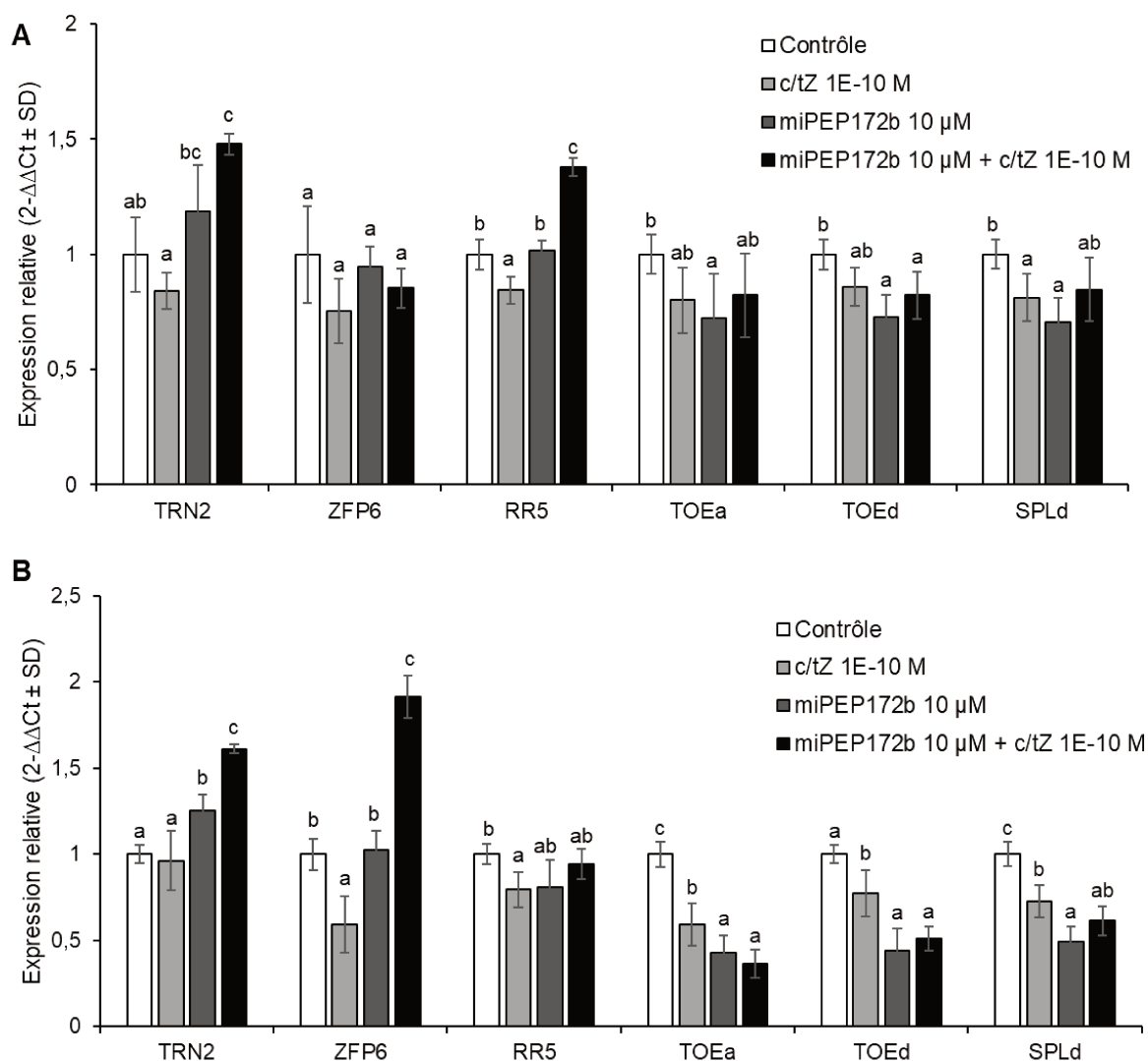
**Figure 2.27 : Pourcentage d’haustoriogenèse après un traitement avec la *c/tZ* en présence ou non de miPEP172 sur des graines germées de *P. ramosa*.**

Un traitement avec le *rac*-GR24 à  $10^{-7}$  M permet de faire germer les graines d’orobanche. Le traitement avec les miPEP172a (A), miPEP172b (B), miPEP172c (C), miPEP172d (D), miPEP172e (E) et miPEP172g (F) est effectué à 7 concentrations 4 jours après la stimulation de la germination. Le pourcentage d’haustoriums formés est déterminé 3 jours après traitement aux miPEP. Les moyennes et les erreurs standard sont issues de 6 réplicats biologiques. Une, deux et trois étoiles représentent respectivement des différences de la condition contrôle sans miPEP à des niveaux de significativité de  $p < 0,05$  ;  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$  (Tukey-HSD).

## 2. *P. ramosa*

### **Effet Phénotypique**

Six miPEP172 ont été testés lors de l'haustoriogenèse des graines de *P. ramosa*. Parmi ces 6 miPEP, 5 induisent la formation d'haustoriums lorsqu'ils sont appliqués seuls sur des graines germées (**Figure 2.27**). Le dernier miPEP, le miPEP172a, n'induit pas l'haustoriogenèse mais la stimule lorsqu'il est utilisé à 50  $\mu$ M et 100  $\mu$ M en co-traitement avec la CK à une concentration de  $10^{-10}$  et  $10^{-8}$  M respectivement (**Figure 2.27A**). Les miPEP172b et miPEP172c stimulent la formation des haustoriums à de faibles concentrations en CK et de fortes concentrations en miPEP ; et l'inhibent à de fortes concentrations en miPEP et en CK (**Figures 2.27B et C**). Ils présentent ainsi des réponses fortement antagonistes sur l'haustoriogenèse en fonction de leurs concentrations et de celles en CK utilisées. Les trois derniers miPEP, le miPEP172d, le miPEP172e et le miPEP172g, stimulent la formation des haustoriums lorsqu'ils sont utilisés à de fortes concentrations couplées à un traitement avec la CK à de faibles concentrations (**Figures 2.27D, E et F**). Ces trois miPEP n'inhibent pas le processus d'haustoriogenèse chez *P. ramosa*.



**Figure 2.28 : Quantification par qRT-PCR de l'expression relative de 2 gènes cibles des miR172, d'un gène cible des miR156 et de 3 gènes marqueurs de l'haustoriogenèse, 12 et 48 h après induction de la germination de *P. ramosa* par un traitement avec le *rac*-GR24 avec ou sans le miPEP172b.**

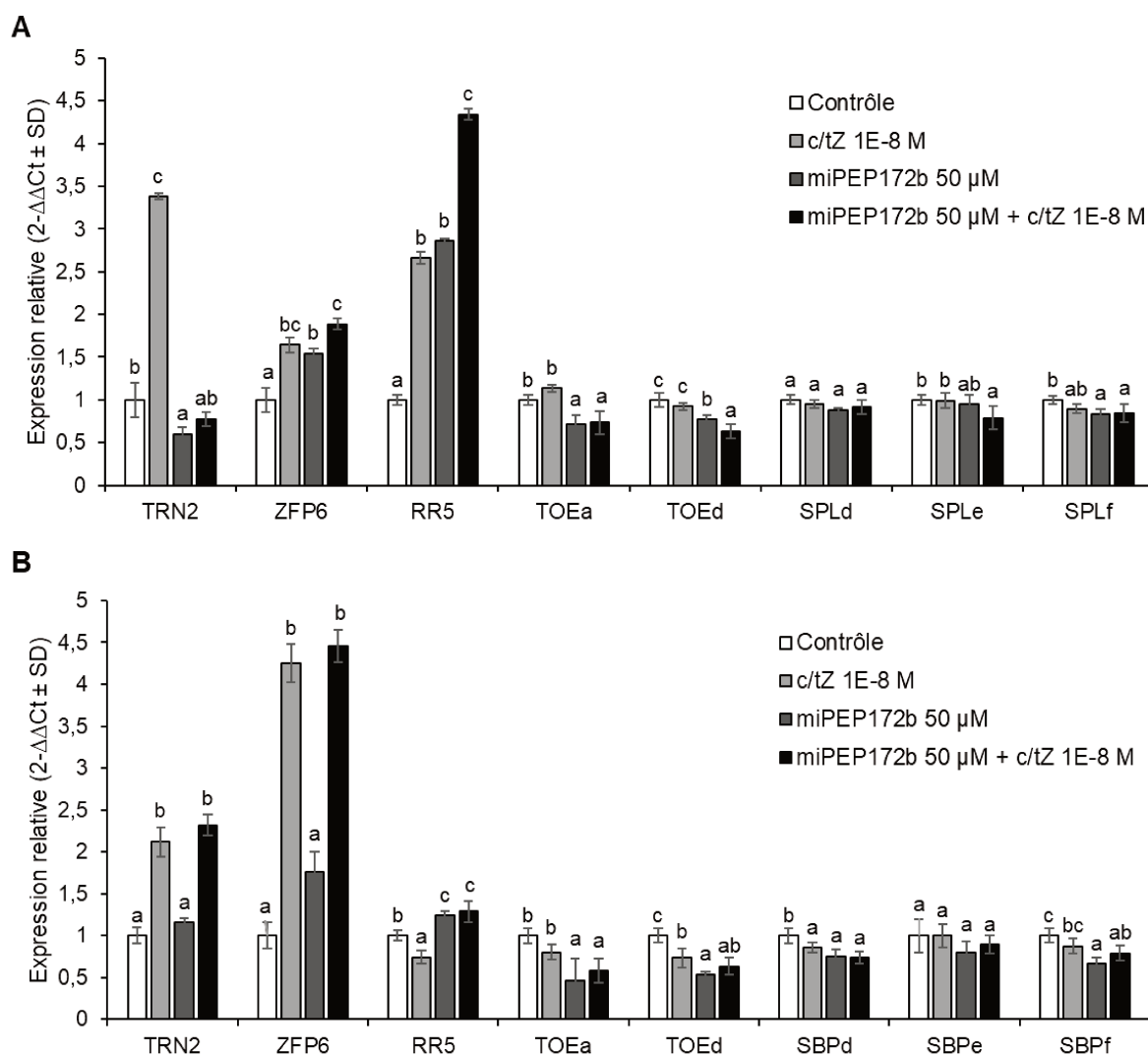
Les moyennes et les écarts types de l'expression des gènes *TOEa* et *TOEb*, cibles des miR172, du gène *SPLd*, cible du miR156 et des gènes *TRN2*, *ZFP6* et *RR5* marqueurs de l'haustoriogenèse, ont été calculés à partir de deux réplicats biologiques 12 h (A) ou 48 h (B) après un traitement avec le *rac*-GR24 à  $10^{-10}$  M seul et/ou avec le miPEP172b à 10  $\mu$ M. L'expression des gènes a été normalisée par rapport au gène de référence *UBI10* et par rapport au contrôle (traitement solvant). La valeur seuil est fixée à 1, au-dessus de cette valeur, le gène est sur-exprimé et en dessous de celle-ci, il est sous-exprimé. Les valeurs indiquées par différentes lettres sont significativement différentes de celle du contrôle négatif ( $p < 0,05$ , ANOVA).

### **Effet sur l'expression de gènes cibles des miARN correspondants**

Le miPEP172b a été sélectionné pour analyser son effet sur l'expression de ses gènes cibles car il présente à la fois une forte induction de l'haustoriogenèse à de faibles concentrations en CK mais aussi une inhibition à de fortes concentrations. Deux concentrations en miPEP172b, 10  $\mu$ M et 50  $\mu$ M, ont ainsi été utilisées pour traiter des graines germées de *P. ramosa* en présence ou non de *c/tZ* afin de tester l'effet de ce miPEP sur l'expression des gènes cibles des miR172 et d'un gène cible des miR156. Les miR156 sont étroitement liés au miR172 dans la régulation de processus biologiques tels que la transition florale (Wu *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2017). L'étude des niveaux d'expression d'un gène cible de miR156 en réponse à un traitement avec le miPEP172 est donc intéressante pour mieux visualiser leur interaction dans le processus de germination de ces plantes holoparasites. Cette étude a été réalisée 12 h et 48 h après traitement avec la CK et/ou le miPEP.

La *c/tZ* n'induit pas de modification de l'expression de *TRN2* (**Figure 2.28**) à une concentration de  $10^{-8}$  M. Elle induit une sous-expression du gène *RR5* 12 h et 48 h après traitement. Le gène *ZFP6* est sous-exprimé 48 h après traitement avec la *c/tZ* (**Figure 2.28B**). Ces résultats concordent avec ceux obtenus lors du test sur l'haustoriogenèse réalisé pour le miPEP319a (**Figure 2.17**). Le traitement avec le miPEP172b à 10  $\mu$ M n'induit pas de modification de l'expression des gènes *ZFP6* et *RR5*. L'expression de *TRN2* est quant à elle amplifiée 48 h après traitement. Le co-traitement de la CK avec le miPEP induit une surexpression des gènes *TRN2* et *RR5* 12 h après traitement et une surexpression des gènes *TRN2* et *ZFP6* 48 h après traitement (**Figure 2.28**). L'ajout de miPEP induit donc une surexpression des gènes marqueurs de l'haustoriogenèse correspondant à l'effet inducteur observé avec le miPEP172b utilisé à 10  $\mu$ M (**Figure 2.28B**).

L'expression des deux gènes cibles des miR172 n'est pas modifiée 12 h après traitement avec la CK (**Figure 2.28A**) et est inhibée 48 h après traitement (**Figure 2.28B**). L'ajout du miPEP172b à une concentration de 10  $\mu$ M induit une inhibition de l'expression de ces deux gènes cibles 48 h après traitement en comparaison avec le traitement CK seul alors qu'aucune différence significative n'est observée 12 h après traitement. Le co-traitement de la CK avec le miPEP induit une inhibition de l'expression de ces deux gènes similaires à celle du traitement avec le miPEP seul après 48 h (**Figure 2.28B**). L'effet du miPEP est donc dominant sur celui de la CK. Le gène *SPLd* cible des miR156 est sous-exprimé après un traitement avec la CK ou le miPEP. Le traitement avec le miPEP inhibe l'expression de ce gène de manière plus importante que le traitement avec la CK seule après 48 h. Le co-traitement induit une légère surexpression de ce gène en comparaison au traitement avec le miPEP seul. Pour ce gène, l'effet de la CK semble dominant sur celui du miPEP.



**Figure 2.29 : Quantification par qRT-PCR de l'expression relative de 2 gènes cibles des miR172, d'un gène cible des miR156 et de 3 gènes marqueurs de l'haustoriogenèse, 12 et 48 h après induction de la germination de *P. ramosa* par un traitement avec le *rac*-GR24 avec ou sans le miPEP172b.**

Les moyennes et les écarts types de l'expression des gènes *TOEa* et *TOEb*, cibles des miR172, du gène *SPLd*, cible du miR156 et des gènes *TRN2*, *ZFP6* et *RR5* marqueurs de l'haustoriogenèse, ont été calculés à partir de deux réplicats biologiques 12 h (**A**) ou 48 h (**B**) après un traitement avec le *rac*-GR24 à  $10^{-8}$  M seul et/ou avec le miPEP172b à 50 µM. L'expression des gènes a été normalisée par rapport au gène de référence *UBI10* et par rapport au contrôle (traitement solvant). La valeur seuil contrôle est fixée à 1, au-dessus de cette valeur, le gène est sur-exprimé et en dessous de celle-ci, il est sous-exprimé. Les valeurs indiquées par différentes lettres sont significativement différentes de celle du contrôle négatif ( $p < 0,05$ , ANOVA).

Les mêmes analyses d'expression de gène ont été effectuées à une concentration plus forte en CK et/ou en miPEP induisant une forte inhibition de l'haustoriogenèse. L'augmentation de la concentration en CK induit une surexpression des gènes *TRN2* et *ZFP6* 12 h et 48 h après traitement (**Figure 2.29**). Le gène *RR5* est quant à lui sur-exprimé de manière précoce 12 h après traitement (**Figure 2.29A**), et sous-exprimé de manière plus tardive 48 h après traitement (**Figure 2.29B**). Ces résultats concordent avec ceux obtenus avec le traitement CK seul à la même concentration lors de l'analyse de l'effet phénotypique du miPEP319a lors de l'haustoriogenèse (**Figure 2.27**). Le gène *ZFP6* est donc un gène de réponse tardif au traitement CK et *RR5*, un gène de réponse précoce.

Le traitement avec le miPEP172b à une concentration plus élevée de 50  $\mu$ M induit une inhibition de l'expression de *TRN2* et une stimulation de l'expression de *ZFP6* et *RR5* à des niveaux similaires à ceux obtenus avec la CK seule 12 h après traitement (**Figure 2.29A**). Pour finir, le miPEP172b n'a pas d'effet à cette concentration sur l'expression des gènes *TRN2* et *ZFP6* 48 h après traitement avec ou sans CK et induit une surexpression de *RR5* avec ou sans CK (**Figure 2.29B**). Une inhibition de la formation des haustoriums a précédemment été mise en évidence lorsque le miPEP172b est appliqué à cette concentration couplée à une concentration en CK de  $10^{-8}$  M (**Figure 2.27**). Ces résultats de l'effet de ce miPEP concordent avec l'effet inhibiteur observé sur l'expression de *TRN2*, gène marqueur de l'haustoriogenèse, dans ces conditions de test.

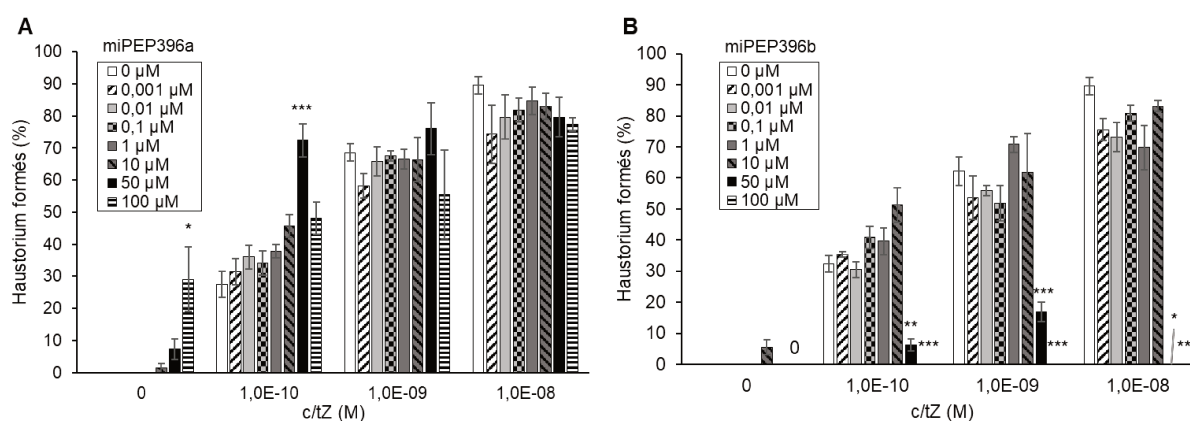
L'analyse de l'expression des gènes cibles du miR172 en présence de CK et/ou de miPEP met en évidence l'effet inhibiteur de ce miPEP 12 h et 48 h après traitement (**Figure 2.29**). Le miPEP172b agit donc spécifiquement sur la régulation de l'expression des gènes cibles des miR172.

L'expression des gènes cibles des miR156, *SPLd* et *SPLe*, n'est pas modifiée par l'ajout de miPEP avec ou sans CK 12 h et 48 h après traitement en comparaison à l'ajout de la CK seule. L'expression du gène *SPLf* n'est pas modifiée après 12 h mais est sous-exprimé en réponse à l'ajout de miPEP seul après 48 h, reflétant un effet plutôt indirect avec un possible mécanisme de rétrocontrôle.

## E. Effet du miPEP396 sur l'haustoriogenèse de *P. ramosa*

### Effet Phénotypique

Les tests réalisés dans ce chapitre ont permis de mettre en évidence l'effet inducteur du miPEP396a à une concentration de 100  $\mu\text{M}$  et l'effet stimulant de ce miPEP à une concentration de 50  $\mu\text{M}$  couplée à un traitement avec la CK à  $10^{-10}$  M (**Figure 2.30A**). Le miPEP396b quant à lui n'induit pas la formation des haustoriums lorsqu'il est appliqué seul mais inhibe ce processus lorsqu'il est appliqué à des concentrations supérieures ou égales à 50  $\mu\text{M}$  en co-traitement avec la CK (**Figure 2.30B**). Les deux miPEP associés à la famille des miR396 de *P. ramosa* vont ainsi induire une réponse antagoniste lors de la formation des haustoriums.



**Figure 2.30 : Pourcentage d'haustoriogenèse après un traitement avec la *c/tZ* en présence ou non de miPEP396 sur des graines germées de *P. ramosa*.**

Un traitement avec la *rac-GR24* à  $10^{-7}$  M permet de faire germer les graines d'orobanche. Le traitement avec les miPEP396a (**A**) et miPEP396b (**B**) est effectué à 7 concentrations 4 jours après la stimulation de la germination. Le pourcentage d'haustoriums formés est déterminé 3 jours après traitement avec la CK et/ou les miPEP. Les moyennes et les erreurs standard sont issues de 6 réplicats biologiques. Une, deux et trois étoiles représentent respectivement des différences de la condition contrôle sans miPEP à des niveaux de significativité de  $p < 0,05$  ;  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$  (Tukey-HSD).

## IV. Discussion

Les résultats des expérimentations présentés dans ce chapitre ont permis de vérifier la spécificité d'action de quelques miPEP d'*O. cumana* et de *P. ramosa* sur l'expression de gènes cibles de leurs miARN associés et de caractériser de manière plus précise l'effet de ces miPEP lors des processus de germination et d'haustoriogenèse des orobanches, mais également l'effet de deux miPEP sur le pathosystème tournesol / *O. cumana*.

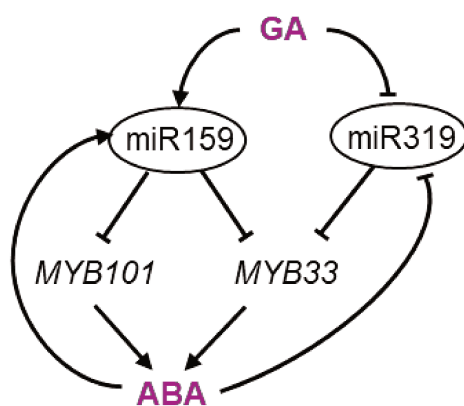
### ***Les miPEP peuvent perturber le processus de germination des orobanches en réduisant spécifiquement l'expression des gènes cibles de leur miARN associé***

Les tests réalisés avec une gamme de concentrations plus grande en miPEP319 d'*O. cumana* couplée à une gamme de concentrations en *rac*-GR24 (**Figure 2.4**), DCL (**Figure 2.5**) ou exsudats racinaires (**Figure 2.6**), ont permis de confirmer l'effet fortement inhibiteur du miPEP319a sur la protrusion des radicules quel que soit le stimulant de germination et le lot de graines d'*O. cumana* utilisés (**Figure 2.5**, **Figure 2.6**, **Figure 2.9** et **Figure 2.10**). Il y aurait ainsi une voie de réponse commune aux différents stimulants de germinations, impliquant les miR319. Le miPEP319b d'*O. cumana* quant à lui ne présente qu'un effet inhibiteur très faible de la protrusion des radicules à la plus faible concentration en *rac*-GR24 ou en DCL couplé à la plus forte concentration en miPEP. De plus, ce miPEP n'a pas d'effet sur la reprise métabolique des graines (**Figure 2.4C, D** et **Figure 2.5C, D**) reflétant un effet moindre comparé au miPEP319a. Les miPEP319 de *P. ramosa* induisent des effets similaires à ceux d'*O. cumana* avec une forte inhibition de la germination à la suite d'un traitement avec le miPEP319a contre un faible effet pour le miPEP319b (**Figure 2.15**). L'implication du miR319 dans la germination serait donc conservée entre ces deux plantes holoparasites avec des effets différents entre les membres d'une même famille. Les miR159 présentant une forte homologie de séquences avec les miR319, une caractérisation plus fine de l'effet du miPEP159 a également été réalisée lors de la germination d'*O. cumana*. Ces expérimentations ont mis en évidence une inhibition totale de la protrusion des radicules et un effet faiblement inhibiteur de la reprise métabolique des graines d'*O. cumana* à une forte concentration en miPEP (**Figure 2.20**).

Chez les plantes parasites, une forte diminution des niveaux d'ABA est observée lors de la phase de conditionnement suivie par une seconde diminution induite par l'ajout de stimulants de germination (Lechat *et al.*, 2012, 2015). Une augmentation des niveaux d'ABA dans le milieu contenant les graines est observée lors du conditionnement laissant penser que cette première diminution de l'ABA est due à une sortie naturelle de cette phytohormone hors de la graine et ne serait pas causée par une régulation moléculaire. L'induction de la germination débute par la perception de stimulants provoquant la surexpression de *CYP707A*. Ces gènes codent des 8'-hydroxylases impliquées dans le catabolisme de l'ABA (Lechat *et al.*, 2012). Une surexpression des *CYP707A* est observée à la suite d'un traitement avec du *rac*-GR24 chez *P. ramosa*. L'induction de ce gène serait donc responsable de la seconde diminution des niveaux en ABA nécessaire à l'induction de la germination (Lechat *et al.*, 2012). Les gènes *MYBs* étant

des régulateurs positifs de la voie de régulation de l'ABA (Reyes and Chua, 2007), ils seraient ainsi probablement également impliqués dans la seconde diminution des niveaux d'ABA responsable de la germination. Ainsi, la régulation des niveaux d'ABA dans les graines est un mécanisme complexe impliquant une multitude de mécanismes de régulation moléculaire des niveaux de l'ABA ou par simple sortie dans le milieu.

Les miR319 inhibent l'expression de facteurs de transcription *MYBs* et *TCPs* (**Figure 2.31**). Ces miARN sont donc des acteurs négatifs de la régulation de la voie de l'ABA. L'ABA étant une phytohormone inhibitrice de l'expression des *MIR319*, cette régulation forme une boucle de rétrocontrôle négative des niveaux d'ABA et une boucle de rétrocontrôle positive de l'expression des miR319 (Liu *et al.*, 2009a). Les miR319 sont aussi négativement régulés par la GA (Liu *et al.*, 2009a). La germination étant induite lorsque la balance ABA/GA penche en faveur de la GA, l'augmentation des niveaux en GA induirait donc une diminution de l'expression des miR319. Les miR319 inhibant les *MYBs*, une diminution de leurs niveaux entraîne une augmentation de l'expression des gènes *MYBs* et ainsi, une augmentation des niveaux d'ABA. Une surexpression de gènes *MYBs* cibles des miR319, est en effet observée en condition contrôle 48 h après induction de la germination d'*O. cumana* (**Figure 1.3**, p 98 chapitre 1). Les mR319 seraient donc impliqués dans le rétrocontrôle de cette balance hormonale en augmentant les niveaux d'ABA lorsque ceux de GA sont supérieurs, afin de revenir à un état d'équilibre. En plus d'inhiber l'expression des miR319, la GA stimule l'expression du gène *MIR159* (**Figure 2.31**). L'action du miR159 sur les niveaux d'ABA a été mise en évidence comme permettant la régulation du passage entre l'état de dormance et de germination des graines (Nonogaki, 2010). Le miR159 cible spécifiquement les *MYB101* et *MYB33*, une diminution de leur expression entraînerait donc une diminution de leur effet stimulant sur la voie de l'ABA (Li *et al.*, 2013). Une baisse des niveaux d'ABA entraînerait à son tour une diminution de l'expression du miR159, correspondant à une boucle de rétrocontrôle positive de l'ABA. Une diminution des niveaux d'expression du *MYB101* devrait être observée sous l'action de l'effet inhibiteur de la GA sur le miR159, ce qui n'est pas le cas. Une surexpression des gènes *MYB101* et *MYB33* est en effet observée lors de la germination d'*O. cumana* 48h après ajout du stimulant de germination (**Figure 1.3**, page 98 du chapitre 1). L'augmentation de l'expression du *MYB101* peut être causée par les différentes boucles de rétrocontrôle de l'expression des *MIRs*. Cette régulation antagoniste de l'expression des *MIR159* et *MIR319* participerait ainsi à la régulation complexe de cette balance hormonale régulant le processus de germination (**Figure 2.31**).

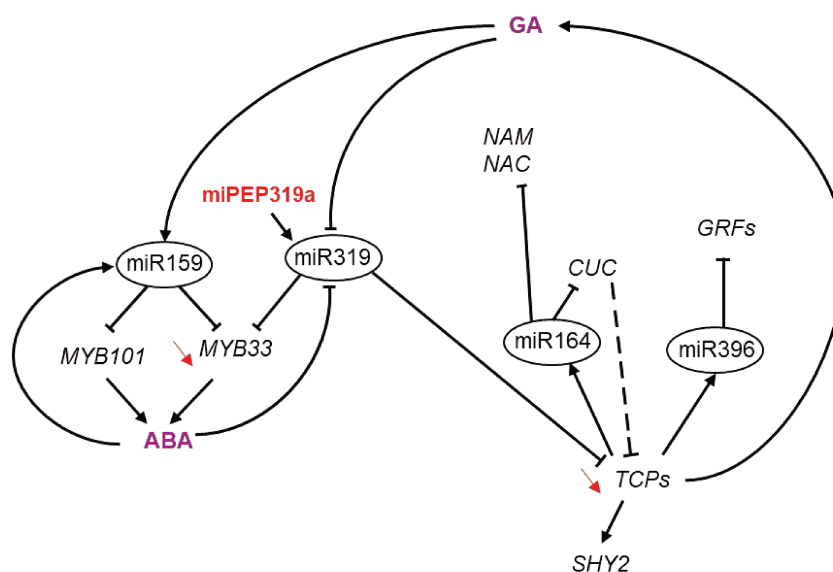


**Figure 2.31 : Schéma non exhaustif des interactions entre les miR159 et miR319, leurs gènes cibles et des phytohormones impliquées dans la germination des graines.**

Les traits pleins avec une barre et les flèches représentent respectivement une inhibition et une stimulation directes. Les miARN sont entourés par des cercles. Les phytohormones sont en violet.

Les *TCPs*, autres gènes cibles des miR319, sont des régulateurs positifs de l'expression du miR164, des miR396 ainsi que le gène *SHY2* (**Figure 2.31**, Koyama *et al.*, 2010; Schommer *et al.*, 2014). Ces facteurs de transcription régulent à leur tour l'expression des gènes *CUC* et *NAM* cibles du miR164, et *GRFs* cibles des miR396 (**Figure 28**, page 71 du chapitre 1). Les miR319 régulent donc directement l'expression des *TCPs* et indirectement l'expression des gènes *CUC*, *NAM* et *GRFs* cibles des miR164 et miR396, *via* les *TCPs*. Les gènes *CUC* et *NAM* sont impliqués respectivement dans l'induction de la floraison et dans la régulation du signal auxinique favorisant la croissance des racines latérales. Les *GRFs* ont un rôle stimulateur de la prolifération cellulaire. Une surexpression des gènes *TCPs*, est observée en condition contrôle 48 h après induction de la germination d'*O. cumana* par traitement des graines avec du *rac-GR24* (**Figure 1.3**, page 98 du chapitre 1).

La surexpression des gènes *MYBs* et *TCPs* induite par le *rac-GR24* est partiellement inhibée par l'ajout du miPEP319a (**Figure 2.9**). Cette inhibition partielle est suffisante pour inhiber le processus de germination de cette plante holoparasite (**Figure 2.4**). L'analyse de l'expression du pri-miARN319a a permis de confirmer l'action spécifique du miPEP319a sur l'expression de son précurseur et donc sur l'expression du miR319a d'*O. cumana* (**Figure 2.11**). Ainsi, l'inhibition de la germination d'*O. cumana* provoquée par l'ajout de miPEP319a est bien le résultat de l'action spécifique du miPEP319a sur son précurseur induisant sa surexpression et donc celle du miR319a provoquant à son tour une inhibition de l'expression de ses gènes cibles, *MYB33* et *TCPs* (**Figure 2.32**).



**Figure 2.32 : Schéma représentant le réseau non exhaustif des acteurs de la voie de signalisation du miR319 et l'impact de l'ajout de miPEP319 lors de la germination d'*O. cumana*.**

Les traits pleins avec une barre et les flèches représentent respectivement une inhibition et une stimulation directes. Les miARN sont entourés par des cercles. Les phytohormones sont en violet. Les flèches rouges représentent l'inhibition observée à la suite d'un traitement avec le miPEP319a sur l'expression des gènes cibles du miR319.

Un traitement avec le miPEP159 induit une diminution de l'expression des gènes *MYB33a*, *MYB33b* et *MYB101* confortant l'idée d'une spécificité d'action de ce miPEP sur son miARN associé (**Figure 2.21**). Le miR159 et les miR319 présentant une forte similarité de séquence, l'expression des gènes cibles des miR319 a été analysée à la suite d'un traitement avec le miPEP159 d'*O. cumana*. La diminution de l'expression du gène *TCP3*, cible des miR319, à la suite d'un traitement avec le miPEP159 montre une régulation directe ou indirecte des miR319 par le miR159 chez *O. cumana*. Une augmentation des niveaux de miR159 va provoquer une diminution des *MYB101* et *MYB33* et donc du niveau d'ABA (**Figure 2.32**, Reyes and Chua, 2007). Or, il a été montré que l'ABA induit une inhibition de l'expression des miR319 (Liu *et al.*, 2009a). La diminution de l'ABA induit donc une augmentation des niveaux des miR319 par levée d'inhibition, entraînant une baisse de l'expression des *TCPs*, cibles des miR319 (**Figure 2.32**). Ces résultats confirment l'implication du miR159 dans la régulation de la germination ainsi que le lien étroit entre les miR319 et le miR159.

Les résultats obtenus dans ce chapitre ont permis la mise en évidence de l'effet fortement inhibiteur du miPEP164 sur la germination d'*O. cumana* quelle que soit la concentration en *rac*-GR24 utilisée avec une forte concentration en miPEP (**Figure 2.22**). L'expression des gènes *NAM*, cibles des miR164, est augmentée à la suite d'un traitement avec le miPEP164 d'*O. cumana*. Ces gènes sont impliqués dans la régulation du signal auxinique, favorisant le développement des racines latérales en stimulant la prolifération cellulaire (Baker *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2005; Das *et al.*, 2015). Ces résultats confirment l'implication du miR164 dans le processus de germination (**Figure 2.23**). L'ajout du miPEP164 induit une inhibition de l'expression des gènes cibles de son miARN. L'inhibition de l'expression de ces gènes cibles tend à confirmer la spécificité d'action de ce miPEP sur l'expression des gènes *NAMs* via le miR164. L'ajout exogène de ce miPEP permet donc l'inhibition spécifique du processus de germination de cette plante holoparasite.

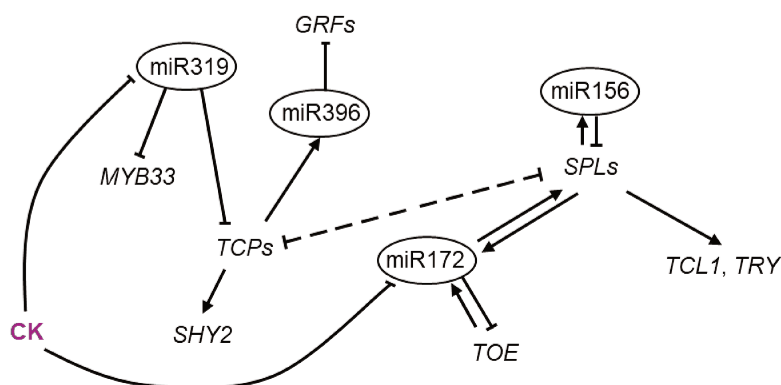
Les miPEP156d et e inhibent faiblement la germination d'*O. cumana* alors que le miPEP156f ne présente pas d'effet sur ce processus dans ces conditions de test (**Figure 2.18**). Ainsi, différents miPEP issus d'une même famille de miARN agissent de manières différentes lors de la germination. L'analyse de l'expression de 3 gènes cibles des miR156 à la suite d'un traitement avec ces 3 miPEP couplé au traitement avec le stimulant de germination montre un effet inhibiteur du miPEP156d, l'absence d'effet du miPEP156e et une surexpression induite par le miPEP156f comparé au traitement *rac*-GR24 seul (**Figure 2.19**). Une étude menée chez la laitue a montré que la surexpression des *MIR156* favorise l'état de dormance des graines et inhibe la germination (Huo *et al.*, 2016). Ainsi, l'inhibition de la germination observée à la suite d'un traitement avec le miPEP156d concorde avec une diminution de l'expression des 3 gènes cibles. Le faible effet inhibiteur du miPEP156e est visible à une concentration en miPEP de 1  $\mu$ M. Les miPEP ayant été utilisés à une concentration de 100  $\mu$ M pour les tests d'analyse d'expression de gènes, il n'est donc pas surprenant de ne pas visualiser d'effet des miPEP sur l'expression de ces gènes. La surexpression des gènes cibles des miR156 en réponse au traitement avec le miPEP156f n'est pas le résultat d'une augmentation de l'effet inhibiteur du miARN associé. Il n'est pas surprenant d'obtenir une augmentation de l'expression de gènes cibles de miARN à la suite d'un traitement avec un miPEP associé à l'un des membres d'une famille de miARN. En effet, une étude a montré que la surexpression du miR171b induite par l'ajout du miPEP associé entraînait une surexpression de son gène cible *LOM1* (Couzigou *et al.*, 2017). Une surexpression des autres membres de la famille des miR171 induit une diminution de l'expression du gène *LOM1*. Le miR171b a perdu sa capacité de clivage de la cible induisant la protection de ce gène cible vis-à-vis des autres membres de la famille des miR171 et donc l'augmentation de son expression. Ainsi, le miR156f d'*O. cumana* pourrait également avoir une action de protection de ses gènes cibles. Deux miPEP spécifiques à 2 miARN issus d'une même famille peuvent donc induire une réponse antagoniste.

Les tests des miPEP172a, b, c et d d'*O. cumana* réalisés avec une gamme de concentrations plus grande en miPEP et en *rac*-GR24 ont permis la confirmation de l'effet inhibiteur des miPEP172a, b et c sur la protrusion des radicules ainsi que l'absence d'effet du miPEP172d (**Figure 2.24**). Les miR172 sont des inhibiteurs de l'expression des gènes *TOEs* (**Figure 2.31**, Li *et al.*, 2017). Ils sont impliqués, avec le miR156, dans la régulation de la dormance et de la

floraison (Wu *et al.*, 2009). L'ajout des miPEP172a, b, c ou d induit une inhibition de l'expression des gènes *TOEb*, *TOEc* et *TOEd* lors de la germination d'*O. cumana* (**Figure 2.25**). Ainsi, les miR172 sont impliqués dans la régulation de la germination d'*O. cumana* par l'intermédiaire de la régulation de l'expression des gènes *TOE*. L'ajout de miPEP associés à ces miARN permet ainsi de modifier spécifiquement l'expression de ces gènes cibles des miR172.

***Les miPEP peuvent perturber le processus d'haustoriogenèse des orobanches en stimulant spécifiquement l'expression des gènes cibles de leur miARN associé***

Les expérimentations réalisées avec une gamme de concentrations plus grande en miPEP et/ou en cytokinine ont permis de confirmer l'effet fortement inhibiteur des miPEP319a et b d'*O. cumana* à de fortes concentrations en miPEP pour toutes les concentrations en *c/tZ* testées (**Figure 2.12**). Le miPEP319a ne présente pas d'effet inducteur de la formation d'haustoriums en présence de CK. Le miPEP319b quant à lui, induit la formation d'haustoriums lorsqu'il est utilisé à une concentration de 50  $\mu$ M, qui n'est pas la plus forte testée. Ce miPEP présenterait donc une fenêtre de concentrations inductrices de la formation des haustoriums de *P. ramosa* comme cela a été montré pour les CKs (Goyet *et al.*, 2017). Les miPEP319a et b de *P. ramosa* induisent eux aussi une inhibition de la formation des haustoriums (**Figure 2.16**). Le miPEP319a n'induit et ne stimule pas la formation d'haustorium de *P. ramosa* (**Figure 2.16A**) contrairement au miPEP319b qui stimule ce mécanisme (**Figure 2.16B**). On pourrait alors supposer que les miR319 seraient liés aux CKs. Cette idée est confortée par une étude prédisant l'implication des miR319 dans la voie de signalisation des CKs lors du développement et de la germination des graines d'orge (Bai *et al.*, 2017). Il a également été montré que les CKs inhibent l'expression des *MIR319* (Liu *et al.*, 2009a; Curaba *et al.*, 2014). Les *TCPs* inhibent l'expression de *SHY2* (**Figure 2.33**) codant pour SHY2, un co-récepteur auxinique qui agit comme un régulateur négatif du signal auxinique. Ce gène est régulé de manière antagoniste par l'auxine et les CKs permettant le contrôle de la balance entre division cellulaire et différenciation (Dello Iorio *et al.*, 2008; Curaba *et al.*, 2014). La surexpression des miR319 induirait une diminution de l'expression des *TCPs* et donc une diminution de l'expression de *SHY2*. Cette baisse d'expression de *SHY2* induit une baisse de la régulation négative du signal auxine conduisant à la poursuite des divisions cellulaires et donc de la croissance des racines empêchant la formation des haustoriums. L'haustoriogenèse débute en effet par l'arrêt de la croissance des racines puis en une différenciation cellulaire menant à la formation de cet organe spécifique. Des travaux de thèse précédemment réalisés au laboratoire montrent que l'application de CKs sur des graines germées de *P. ramosa* induit un arrêt de la croissance des racines ainsi que la différenciation de l'apex en haustoriums (Goyet, 2017; Billard, 2020).



**Figure 2.33 : Schéma représentant le réseau non exhaustif du réseau de régulation des miARN étudiés lors de l'haustoriogenèse chez *P. ramosa*.**

Les traits pleins avec une barre et les flèches représentent respectivement une inhibition et une stimulation directes. Le trait en pointillé représente une inhibition indirecte par dimérisation. Les miARN sont entourés par des cercles. Les phytohormones sont en violet.

L'analyse de l'expression de gènes marqueurs de l'haustoriogenèse et de gènes effecteurs de la voie des CKs à la suite d'un traitement avec le miPEP319a a permis de confirmer le lien entre les miR319 et les CKs. En effet, l'ajout du miPEP319a sur des graines germées induit une stimulation de l'expression des gènes *ZFP6* et *RR5* impliqués respectivement dans la formation des trichomes et dans le rétrocontrôle négatif des CKs (**Figure 2.17**). Cependant, l'effet de ce miPEP sur l'expression de ces gènes n'est pas identique à celui de la *c/tZ*, ce qui concorde avec l'absence d'effet inducteur de l'haustoriogenèse de ce miPEP. Son ajout en co-traitement avec la *c/tZ* induit une inhibition de l'effet de cette dernière sur l'expression du gène *TRN2*, marqueurs de l'haustoriogenèse. Cette inhibition est cohérente avec l'effet inhibiteur de ce miPEP observé sur la formation de l'haustorium (**Figure 2.16A**). Les gènes *MYB33* et *TCP3*, cibles des miR319 sont sous-exprimés en réponse à un traitement des graines de *P. ramosa* avec le miPEP319a (**Figure 2.17**). Ce miPEP inhibe ainsi l'expression des gènes cibles des miARN associés même en présence de la CK. L'effet de ce miPEP semble ainsi spécifique. Les miR396 étant des cibles des TCPs, l'expression des gènes cibles de ces miARN a également été analysée en réponse au traitement avec le miPEP319a afin de vérifier l'impact du miR319 sur la régulation du miR396. Ainsi, l'expression des gènes *GRFa, b, d, e* et *g* a été analysée à la suite d'un traitement avec le miPEP319a de *P. ramosa*. La majorité de ces gènes sont sous-exprimés en réponse à ce miPEP confirmant le lien entre ces deux familles de miARN. Le miPEP396a induit la formation d'haustoriums chez *P. ramosa* (**Figure 2.30A**). Il ne présente pas d'effet inhibiteur de l'haustoriogenèse. Le miPEP396b de *P. ramosa* quant à lui, inhibe la formation des haustoriums (**Figure 2.30B**). Les miPEP396a et b de *P. ramosa* présentent ainsi des profils de réponses opposés lors de l'haustoriogenèse. Cette réponse antagoniste n'est pas surprenante, elle a également été observée à la suite d'un traitement avec les miPEP156. Ces résultats antagonistes reflètent la complexité de la régulation du processus d'haustoriogenèse avec des interactions entre différents miARN impactant l'expression de leurs gènes cibles.

Les expérimentations réalisées dans chapitre avec une gamme de concentrations plus grande en miPEP et/ou en cytokinine ont permis de confirmer l'effet inhibiteur des miPEP172a, c et d et un effet faiblement inhibiteur du miPEP172e sur la formation des haustoriums d'*O. cumana* (**Figure 2.26**). Elles ont également permis de mettre en évidence l'effet fortement inhibiteur du miPEP172b de *P. ramosa* ainsi que des miPEP172a et c non visualisé lors du criblage (**Figure 2.27**). Les miPEP172a et b d'*O. cumana* (**Figure 2.26**) ainsi que des miPEP172a, b, c, d, e et g de *P. ramosa* (**Figure 2.27**) induisent également la formation des haustoriums. Les effets à la fois stimulant et inhibiteur de la formation des haustoriums en fonction de la concentration en miPEP utilisée rappelle l'effet de fenêtre de concentration active propre à chaque CK (Goyet *et al.*, 2017). On peut alors supposer que les miR172, comme les miR319, seraient liés aux CKs chez *O. cumana* et *P. ramosa*. Cette hypothèse est confortée par une étude montrant l'implication des miR172 dans la voie de signalisation des CKs chez l'orge (Bai *et al.*, 2017).

L'expression des gènes cibles des miR172 a été analysée après un co-traitement avec la *c/tZ* et le miPEP172 de *P. ramosa* pour deux conditions reflétant l'effet antagoniste ce miPEP. La première condition correspond à l'effet totalement inhibiteur du miPEP sur l'action de la CK lors de l'haustoriogenèse avec de fortes concentrations en miPEP et en CK (**Figure 2.27**). Une inhibition précoce de l'effet de la CK sur l'expression de *TRN2*, gène marqueur de l'haustoriogenèse est observée en réponse au traitement miPEP (**Figure 2.29**). La deuxième condition correspond à un effet stimulant du miPEP sur l'action de la CK lors de ce processus biologique avec une concentration faible en miPEP avec ou sans CK. Dans ces conditions, ce miPEP induit une augmentation de l'expression du gène *TRN2* concordant avec le phénotype d'induction de l'haustoriogenèse observé (**Figure 2.28**). Le co-traitement du miPEP avec la CK permet d'amplifier la surexpression de *TRN2* provoquant l'induction de l'haustoriogenèse. Le miPEP172 et la CK présentent ainsi un effet cumulatif sur l'expression de *TRN2* et sur l'induction de l'haustoriogenèse. Ce miPEP induit une inhibition de l'expression de ses gènes cibles, *TOEa* et *TOEd* ainsi qu'une faible inhibition de l'expression d'un gène cible des miR156, *SPLf* reflétant le lien entre les miR156 et les miR172. Cet effet synergique de l'effet du miPEP et de la CK est également observé pour les gènes cibles des miR172 et miR156 avec une forte inhibition de ceux-ci lors du co-traitement. Cet effet cumulatif concorde avec l'effet stimulant de l'haustoriogenèse observé pour de faibles concentrations en CK et en miPEP (**Figure 2.27B**). Le miPEP172b agirait ainsi sur les mêmes voies de régulation que celles des CKs, permettant une amplification de la réponse lors d'un co-traitement. Une étude a montré une inhibition de l'expression des gènes *MIR172* à la suite d'un traitement avec une cytokinine, la 6-benzylaminopurine (6-BA) chez le riz (**Figure 2.33**, Liu *et al.*, 2009).

***L'ajout de miPEP exogènes peut diminuer l'infestation des plantes hôtes par les orobanches en impactant spécifiquement leur développement***

L'ensemble de ces résultats montre que les miPEP319 d'*O. cumana* sont de bons candidats pour servir d'agents de biocontrôle. Afin de confirmer cette hypothèse, une co-culture de tournesol et d'*O. cumana* a été réalisée en présence ou non du miPEP319a d'*O. cumana*. L'ajout de ce miPEP sur la co-culture a permis de diminuer le taux d'accrochage des orobanches sans impacter le développement des tournesols (**Figure 2.14**). On peut supposer que cette diminution du nombre d'accrochages serait due à une inhibition de la germination mais aussi de l'haustoriogenèse des graines d'*O. cumana* causée par l'ajout de miPEP319a ou de miPEP319b. Cette hypothèse est confortée par l'effet inhibiteur de ces miPEP sur la germination (**Figure 2.4**) et sur l'haustoriogenèse (**Figure 2.12**) observé lors des tests *in vitro* réalisés lors de ces deux processus biologiques. Le miPEP319b présentant également un faible effet inducteur de l'haustoriogenèse (**Figure 2.4**), la diminution du nombre d'accrochages à la suite d'un traitement avec ce miPEP semblerait donc plutôt liée à l'effet inhibiteur de la germination des graines d'orobanches.



# **Conclusion et perspectives**

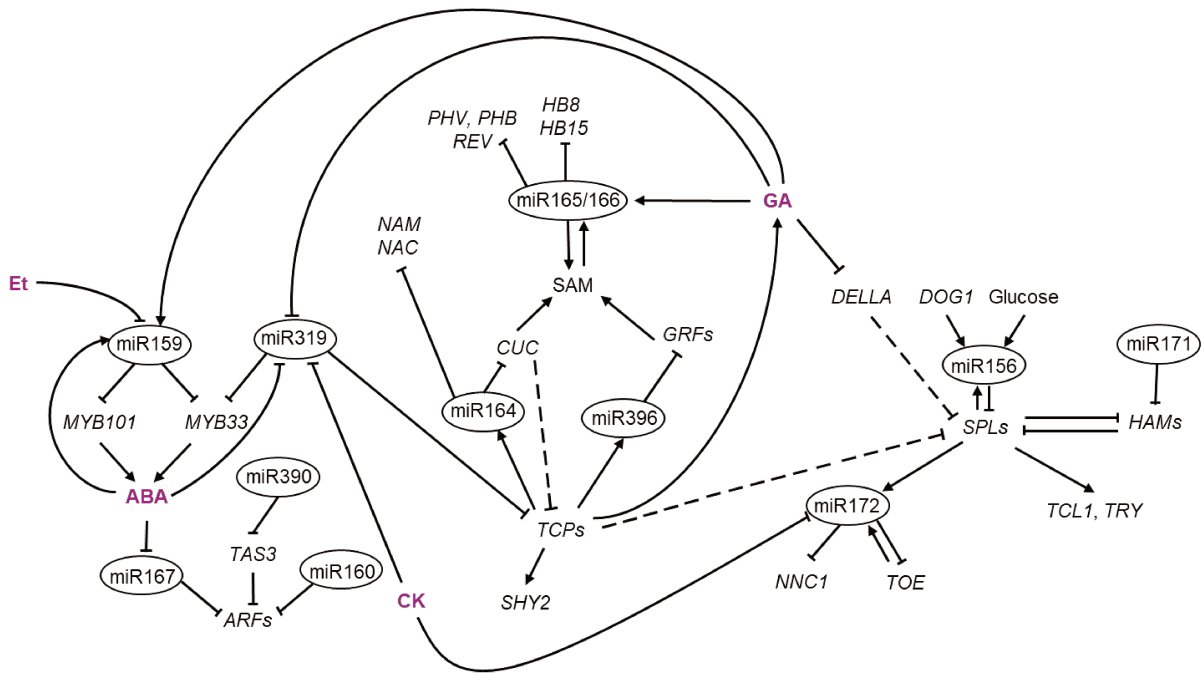


## Conclusion et perspectives

La croissance et la multiplication des plantes holoparasites épirhizes de la famille des *Orobanchaceae* telles qu'*O. cumana* et *P. ramosa* dépendent d'une plante hôte. Cette dépendance a conduit chez ces plantes pathogènes à la mise en place de mécanismes de développement particuliers. La germination est ainsi induite par des molécules émises dans la rhizosphère par l'hôte. Une fois germées, ces plantes doivent se fixer à la racine hôte afin de prélever les éléments nécessaires à leur survie et à leur développement. Cet attachement nécessite la formation d'un organe spécifique, l'haustorium, également induite par des molécules émises dans la rhizosphère par la plante hôte. La majorité de ces plantes parasites possèdent un spectre d'hôte très large allant des plantes de grandes cultures jusqu'aux plantes adventices ; hormis *O. cumana* qui possède un hôte exclusif, le tournesol. La présence de ces plantes parasites sur une parcelle engendre une diminution du rendement pouvant aller jusqu'à la perte totale de la récolte. Actuellement, il n'existe pas de méthodes de lutte efficaces et durables contre ces fléaux. Une meilleure compréhension des mécanismes de développement particuliers de ces plantes est donc nécessaire pour le développement de nouveaux moyens de lutte.

Une nouvelle classe de peptides régulateurs de l'expression de miARN, appelés miPEP, a été découverte en 2015 (Lauressergues *et al.*, 2015). Ces miPEP peuvent être utilisés pour étudier des mécanismes moléculaires à travers l'analyse de l'expression de gènes cibles des miARN associés. Cette découverte est une avancée majeure dans l'étude des voies de régulations de gènes liées aux miARN. Les miPEP sont en effet produits à partir d'ORFs présents dans les précurseurs de miARN qu'ils stimulent spécifiquement. Les miARN étant des régulateurs de l'expression d'une multitude de facteurs de transcription, la modification de leur expression permet de réguler positivement ou négativement l'expression des gènes cibles de ces facteurs de transcription. Les miPEP peuvent ainsi moduler les processus biologiques comme cela a été montré chez le soja avec une stimulation de la nodulation à la suite d'un traitement avec le miPEP172c (Couzigou *et al.*, 2016) ou chez la vigne avec une stimulation du développement de racines latérales à la suite d'un traitement avec le miPEP171d1 (Chen *et al.*, 2020).

Les miARN sont impliqués dans une multitude de processus biologiques notamment lors de la germination et la formation des haustoriums des orobanches *O. cumana* et *P. ramosa* comme cela a été montré lors de ces travaux de thèse. Ils font partie d'un réseau de régulations complexes, notamment en interagissant avec les phytohormones telles que les GA, l'ABA, les CKs et l'éthylène (**Figure 3.1**). Ces phytohormones vont réguler l'expression de miARN, mais elles vont aussi être régulées par ces miARN. Des processus biologiques sont modulés par les balances hormonales comme c'est le cas pour la germination qui est induite lorsque la balance GA/ABA penche en faveur de la GA. L'ajout d'un miPEP capable d'induire spécifiquement une surexpression de son miARN va ainsi perturber cet équilibre pouvant provoquer des stimulations et/ou des inhibitions de la germination et de l'haustoriogenèse difficilement anticipables.



**Figure 3.1 : Représentation schématique de la voie de régulation de miARN et de leurs gènes cibles.**

Les traits pleins avec une barre et les flèches représentent respectivement une inhibition et une stimulation directes. Les traits en pointillés représentent une inhibition indirecte par dimérisation. Les miARN sont entourés par des cercles. Les phytohormones sont en violet.

## **Les miPEP, de nouveaux outils pour étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement des orobanches ?**

### **La germination**

L'ensemble des miPEP identifiés chez *O. cumana* et *P. ramosa* ont été criblés sur le processus de germination de ces deux plantes parasites. Ainsi, parmi les 42 miPEP associés à 16 familles de miARN comprises entre 156 et 399, identifiés chez *O. cumana*, 29 sont inhibiteurs de la germination dont 17 inhibant uniquement la protrusion des racicules et 12 inhibant la protrusion des racicules et la reprise métabolique des graines (**Tableau 1.3**, page 113 du chapitre 1). Ainsi, la majorité des miPEP identifiés chez *O. cumana* permettent l'inhibition de la germination de cette plante parasite *in vitro*. Des analyses complémentaires ont permis d'identifier un effet inhibiteur dose réponse de ces miPEP. Dans le cas du miPEP319a, le peptide avec l'effet inhibiteur le plus important sur la germination, la réponse est similaire quel que soit le stimulant de germination utilisé : le *rac*-GR24, le DCL ou les exsudats racinaires. Ces résultats conduisent à penser que ces stimulants possèdent une cascade de régulations communes après leur perception, sur laquelle agirait le miPEP319a. Chez *P. ramosa*, 4 familles de miPEP ont été sélectionnées à partir des résultats obtenus lors du criblage des miPEP d'*O. cumana*. Seize miPEP faisant partie de ces 4 familles ont été identifiés, parmi lesquels 2 inhibent uniquement la protrusion des racicules et 1 inhibe à la fois la protrusion des racicules et la reprise métabolique des graines, le miPEP319a. Les perspectives seraient d'identifier les miARN d'*O. cumana* au-delà du miR399, ainsi que d'identifier l'ensemble des miPEP de *P. ramosa* pour ensuite les tester lors de la germination de cette plante parasite. Ceci sera envisageable lorsqu'une séquence complète du génome de *P. ramosa* sera accessible, le génome de *P. ramosa* étant de 4,5 Gb, soit deux fois plus grand que celui d'*O. cumana* qui est de 1,9 Gb.

L'analyse de l'expression des miARN est complexe. En effet, leur extraction et isolation sont difficiles du fait de leur petite taille (environ 21 bases). Ils sont simple brin, donc peu stables et facilement dégradés. De plus, les miARN sont rapidement pris en charge par le complexe RISC, leur présence est donc transitoire dans les cellules. L'analyse de l'expression des miARN peut être réalisée en effectuant le suivi de l'expression de leurs précurseurs, les pri-miARN et pré-miARN possédant des séquences plus longues. Ces précurseurs sont eux aussi rapidement pris en charge par la DCL1 qui va les maturer en miARN. Une autre alternative consiste à étudier les modifications d'expression des gènes cibles des miARN étant exprimés de manière moins transitoire que les précurseurs et possédant des séquences plus longues. Leurs modifications d'expression permettent ainsi de visualiser une potentielle modification d'expression des miARN associés.

Le suivi de l'expression des gènes cibles des miARN associés aux miPEP156, 159, 164, 172 et 319 à la suite d'un traitement avec ces miPEP a permis de conforter l'hypothèse de la spécificité d'action des miPEP sur l'expression de leurs miARN associés. En effet, une inhibition de l'expression des gènes cibles des miARN associés est observée à la suite d'un traitement avec la majorité des miPEP testés, hormis pour le miPEP156e qui n'induit pas de

modification de l'expression des gènes cibles et pour le miPEP156f qui induit une surexpression de ces gènes. La surexpression de ces gènes pourrait être causée par un effet protecteur du miPEP156f sur les gènes cibles du miR156f. Un effet similaire a déjà été montré avec le miPEP171b qui induit une surexpression du gène *LOM1*, cible du miR171b grâce à la perte de la capacité de clivage de la cible du miARN (Couzigou *et al.*, 2017). Ce miARN entre en compétition avec les autres miARN de cette famille empêchant leur action inhibitrice sur ce gène. Des analyses plus poussées de l'effet du miPEP156f permettraient de confirmer l'effet stimulant de l'expression des gènes cibles. Afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse de rôle protecteur, des analyses fonctionnelles pourraient être réalisées comme cela a été effectué par Couzigou *et al.*, en 2017. Il faudrait alors réaliser une étape de transformation d'*O. cumana*. La transformation des plantes parasites est complexe à cause de leur cycle de développement nécessitant la présence d'un hôte. Une étude récente a montré la possibilité d'effectuer la transformation de microcals de *P. ramosa* conservant leur caractère infectieux, qui mis en contact avec des racines de plantes hôtes se fixent et régénèrent une hampe florale aboutissant à la production de graines viables (Billard *et al.*, 2020). Ce protocole reste cependant difficile à mettre en œuvre et doit être transféré à *O. cumana*. La technique CRISPR/Cas9 permettrait par exemple de sur-exprimer les différents membres de la famille des miR156 individuellement ou d'inactiver spécifiquement l'expression d'un des membres de cette famille, afin de visualiser leur effet sur l'expression de leurs gènes cibles lors de la germination. Cette technique pourrait être utilisée pour l'ensemble des miPEP présentant des effets intéressants lors de la germination des orobanches. Et plus particulièrement pour les miR319 dont les miPEP associés ont été le plus étudiés, car les miR319 sont liés à la régulation d'autres miARN ainsi qu'à la régulation de la majorité des phytohormones. De plus, ces miPEP induisent la plus forte inhibition de la germination d'*O. cumana*.

La liste des gènes cibles des miARN étudiés est issue des données connues et obtenues chez des organismes modèles comme *Arabidopsis thaliana*, et n'est donc pas exhaustive. D'autre part, les cibles des facteurs de transcription, ciblés par les miARN, sont encore pour la plupart inconnues. Une analyse du transcriptome d'*O. cumana* en réponse au traitement avec les miPEP319, par une analyse RNAseq par exemple, permettrait de visualiser de manière plus précise l'ensemble des gènes dont l'expression est affectée par l'ajout de ce miPEP. Cela permettrait également de mettre en lumière le rôle des miR319 dans la régulation de la germination et les différents acteurs de ce processus. Ces résultats pourraient ensuite être corrélés avec les résultats de qRT-PCR, de phénotypage et de validation fonctionnelle du rôle des miR319 permettant d'obtenir une caractérisation complète de l'effet de ces miPEP lors de la germination d'*O. cumana*.

*O. cumana* et *P. ramosa* étant toutes les deux des plantes holoparasites de la famille des Orobanchaceae, on peut supposer que l'effet d'une même famille de miPEP et donc de miARN est conservé entre ces deux espèces. Une caractérisation plus fine des effets phénotypiques et moléculaires des miPEP319 de *P. ramosa* lors de la germination permettrait de confirmer cette hypothèse. Notamment, un suivi de l'expression des gènes mis en évidence par l'approche transcriptomique chez *O. cumana* permettrait de mettre en lumière l'implication

des miR319 dans ce processus biologique et de visualiser les réponses moléculaires des miR319.

### L'haustoriogenèse

L'haustoriogenèse a été moins étudiée lors de ces travaux de thèse car les tests d'haustoriogenèse sont plus complexes à réaliser que les tests de germination. En effet, seules quelques familles de miPEP, 2 chez *O. cumana* et 3 chez *P. ramosa*, ont été sélectionnées pour effectuer leur criblage lors de ce processus biologique. La poursuite de ces travaux de thèse consisterait à tester l'intégralité des miPEP identifiés chez *O. cumana* et *P. ramosa* sur le processus de formation des haustoriums. Cela permettrait d'identifier d'autres miPEP et donc d'autres miARN potentiellement impliqués dans ce processus biologique complexe. Une analyse de l'évolution du transcriptome à la suite d'un traitement avec un miPEP permettrait de mettre en lumière l'ensemble des gènes impliqués dans ce processus dont l'expression est modulée par les miARN, permettant *in fine* d'identifier les cascades de régulation des miARN impliqués dans la formation des haustoriums. Les miPEP172 ont montré des effets très intéressants lors des tests réalisés chez *P. ramosa* et *O. cumana*. Ils présentent des effets antagonistes avec une induction et une inhibition selon les concentrations en miPEP et en cytokinines utilisées. Cette dualité de réponse rappelle l'effet de gamme de concentrations actives des cytokinines (Goyet *et al.*, 2017). Les miR172 agissent de manière similaire aux cytokinines lors de l'haustoriogenèse avec cette dualité de réponse, mais aussi lors de la germination provoquant une inhibition de ce processus. Les cytokinines provoquent elles aussi une inhibition de la germination de *P. ramosa*. L'effet phénotypique et moléculaire de cytokinines lors de la germination de cette plante parasite fait actuellement l'objet d'une étude au laboratoire dans le cadre du travail post-doctoral d'Estelle Billard. Ce projet a pour but d'approfondir les connaissances sur la germination des plantes parasites et fait suite aux travaux de thèse de Guillaume Brun portant sur l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la germination de *P. ramosa* en réponse aux strigolactones (Brun, 2017; Brun *et al.*, 2018). Une étude comparative des transcriptomes à la suite d'un traitement avec le miPEP172b de *P. ramosa* à une concentration induisant l'haustoriogenèse et à un traitement avec la CK à une concentration induisant aussi la formation des haustoriums, permettrait de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse selon laquelle le miPEP mimerait l'effet de la CK. Ces analyses permettraient également d'identifier des gènes impliqués dans la formation de cet organe spécifique.

Le miPEP319a d'*O. cumana* présente un effet inhibiteur de la germination ainsi que de l'haustoriogenèse mais ne stimule pas ces deux processus biologiques. Ce miPEP agirait donc sur des voies de signalisation différentes de celle des miPEP172 qui montrent des effets à la fois stimulant et inhibiteur. Un suivi de l'expression des gènes cibles des miR319 à la suite d'un traitement avec ce miPEP par qRT-PCR lors de l'haustoriogenèse, permettrait de confirmer cette hypothèse. La cascade de régulation des miR319 lors de l'haustoriogenèse pourrait ensuite être identifiée grâce à une analyse RNAseq.

Ainsi, les miPEP peuvent être utilisés comme outils pour l'étude des processus biologiques particuliers que sont la germination et l'haustoriogenèse des plantes holoparasites *O. cumana* et *P. ramosa*. Leur utilisation a permis d'identifier des miARN potentiellement impliqués dans ces processus biologiques chez *O. cumana* et *P. ramosa* et le lien potentiel entre miARN et les phytohormones. L'utilisation de miPEP a ainsi permis d'enrichir nos connaissances sur ces deux processus biologiques particuliers de ces plantes parasites.

### ***Les miPEP : vers le développement d'un nouvel agent de biocontrôle spécifique et durable ?***

L'effet inhibiteur du miPEP319a sur la germination et l'haustoriogenèse d'*O. cumana* ainsi que sur le nombre d'accrochages de cette plante parasite sur les racines de l'hôte sont des résultats prometteurs pour son utilisation en tant qu'agent de biocontrôle de cette plante parasite. D'autres miPEP induisent une inhibition de la germination et de l'haustoriogenèse dans des proportions différentes. Les miPEP de différentes familles ont montré différents effets inhibiteurs de la germination, soit en inhibant la protrusion des racines uniquement, révélant une action en aval de la reprise métabolique ; soit en inhibant à la fois la protrusion des racines et la reprise métabolique des graines, révélant une action en amont de la reprise métabolique des graines. L'ensemble de ces données laisse penser qu'un mélange de différents miPEP inhibiteurs de la germination et/ou de l'haustoriogenèse pourrait permettre une augmentation de l'effet inhibiteur de l'infestation de l'hôte par cet holoparasite. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en effectuant des tests *in vitro* de l'effet de différents mélanges de miPEP sur les processus de germination et d'haustoriogenèse. Les mélanges présentant les meilleurs résultats pourraient ensuite être testés sur des co-cultures de tournesols et d'*O. cumana*.

Des tests de co-culture pourraient être réalisés avec les miPEP de *P. ramosa* sur le pathosystème colza/*P. ramosa* pour identifier les miPEP pouvant potentiellement être utilisés en tant qu'agent de biocontrôle de cette plante parasite. Les co-cultures de colza et de *P. ramosa* sont largement développées et utilisées au laboratoire, notamment dans le cadre de projets tels qu'ORODUR, portant sur l'identification d'accession de colzas présentant une résistance à *P. ramosa*. Le protocole de co-culture a été mis en place au laboratoire par Mathieu Gauthier lors de ses travaux de thèse (Gauthier, 2012; Gauthier *et al.*, 2012). Les résultats de l'effet des miPEP319 de *P. ramosa* lors de la germination et de la formation des haustoriums sous-tendent que ces miPEP et plus particulièrement le miPEP319a, seraient de bons agents de biocontrôle de cette plante parasite. Des expérimentations de co-culture en godet permettraient de confirmer ou non cette hypothèse.

Les miPEP présentant les meilleurs résultats lors des tests en co-culture seront ensuite testés en champ. Il existe différents formats pour l'utilisation d'agents de biocontrôle. Ils peuvent être utilisés dans les solutions d'arrosage au sol, en pulvérisation foliaire, sous forme de granulés à épandre sur le sol ou encore en enrobage des graines. Les miPEP agissant sur les étapes de pré-attachement de la plante parasite sur la plante hôte, les molécules doivent être présentes dans le sol. Une étude a récemment montré que le miPEP165a ne migrerait pas des racines vers les tiges chez *A. thaliana* (Ormancey *et al.*, 2020), laissant supposer que l'inverse serait réciproque. De plus, le cycle de développement de ces plantes parasites étant majoritairement souterrain, l'utilisation de la vaporisation foliaire serait inefficace. L'utilisation de ces molécules dans les solutions d'arrosage entraînerait l'utilisation d'une quantité très importante en molécules pour obtenir une concentration suffisante à proximité immédiate des racines. L'ensemble de ces informations nous conduisent ainsi à penser que l'enrobage des graines serait le meilleur moyen pour permettre l'action des miPEP. Cette technique est déjà employée pour diffuser des composés chimiques de traitement comme des insecticides tels que le lindane ou les pyréthriinoïdes de synthèse. Cela permettrait leur libération lors des phases précoces de développement de la plante hôte, empêchant l'induction de la germination de l'orobanche. L'entreprise MicroPEP Technologies partenaire du projet miPEPiTO est responsable de toute la partie formulation et méthode d'utilisation des agents de biocontrôles à base de miPEP la plus adaptée pour une utilisation en champ.

Ce modèle pourrait être étendu à une autre plante parasite, *Striga asiatica*, dont la disponibilité du génome (Yoshida *et al.*, 2019) permet l'identification des miARN et ainsi des miPEP. Cette plante est une plante hémiparasite se fixant aux racines de plantes sauvages ou cultivées comme le maïs, le riz ou encore la canne à sucre. L'étude de sa biologie, et plus particulièrement des processus de germination et d'haustoriogenèse, permettrait d'identifier les différences développementales entre les plantes hémiparasites et holoparasites, et plus particulièrement si le rôle des miARN lors de ces deux processus sont conservés entre ces deux types de plantes parasites.

L'utilisation de miPEP sur des plantes parasites étant totalement novatrice, la maîtrise de leur utilisation couplée à la spécificité de développement des plantes parasites a été longue et fastidieuse. La nécessité de la présence d'un stimulant pour induire la germination a complexifié la mise en place d'un test efficace. Il a fallu réaliser des tests à l'aveugle afin de déterminer les concentrations en stimulant et en miPEP nécessaires à la visualisation d'effets potentiels de ces miPEP. Ces étapes de mise en place de protocoles pour aboutir à la visualisation du premier effet d'un miPEP ont nécessité un an de travail. La difficulté de mise au point d'un test permettant de visualiser l'effet des miPEP lors de la germination, m'a appris à être persévérante dans mes recherches. À partir de ce moment s'est ouvert un large éventail

de possibilités de tests à réaliser. La compréhension des effets doses réponses entre la quantité de stimulant de germination et de miPEP lors de la germination a permis de mettre au point un protocole de test plus rapidement sur l'haustoriogenèse. La possibilité d'identification de miPEP chez *P. ramosa* a elle aussi augmenté le champ des possibilités de tests en ajoutant une autre espèce de plante parasite. Il a alors fallu faire des choix sur les miPEP et sur l'espèce à étudier plus finement. Ces choix se sont basés sur les premiers résultats obtenus lors de la germination chez *O. cumana* et sur ce qui est connu dans la littérature de l'implication des miARN lors de la germination. Ces travaux de thèse ont ouvert plusieurs possibilités d'utilisation des miPEP chez les orobanches. Ils peuvent servir d'outils d'étude des mécanismes moléculaires spécifiques mais aussi d'outils de contrôle du développement de ces plantes. L'utilisation de miPEP comme outils d'étude nous permet d'avoir une nouvelle approche pour analyser les mécanismes de germination et d'haustoriogenèse permettant d'agir directement sur l'expression de miARN cibles sans passer par des étapes de transformation de plantes. La possibilité d'utiliser des miPEP comme moyen de lutte contre les plantes parasites est une grande avancée dans le développement de biocontrôle. En effet, ces peptides sont de petites séquences d'acides aminés qui sont naturellement dégradées dans le sol. Leur action spécifique à une espèce permet de cibler spécifiquement la plante parasite à éliminer, tout en préservant le reste de l'écosystème d'une parcelle.





# Références bibliographiques



## Références bibliographiques

### A

- Abbes, Z., Kharrat, M., Delavault, P., Chaïbi, W. and Simier, P.** (2009). Nitrogen and carbon relationships between the parasitic weed *Orobanche foetida* and susceptible and tolerant faba bean lines. *Plant physiology and biochemistry: PPB* **47**, 153–159. doi: 10.1016/j.plaphy.2008.10.004.
- Abebe, G., Sahile, G. and Al-Tawaha, A.-R. M.** (2005). Evaluation of Potential Trap Crops on Orobanche Soil Seed Bank and Tomato Yield in the Central Rift Valley of Ethiopia. *World Journal of Agricultural Sciences* **1** (2), 148-151.
- Achard, P., Herr, A., Baulcombe, D. C. and Harberd, N. P.** (2004). Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development (Cambridge, England)* **131**, 3357–3365. doi: 10.1242/dev.01206.
- Acharya, B. D., Khattri, G. B., Chettri, M. K. and Srivastava, S. C.** (2002). Effect of Brassica campestris var. toria as a catch crop on Orobanche aegyptiaca seed bank. *Crop Protection* **21**, 533–537. doi: 10.1016/S0261-2194(01)00137-5.
- Adenot, X., Elmayan, T., Lauressergues, D., Boutet, S., Bouché, N., Gascioli, V. and Vaucheret, H.** (2006). DRB4-Dependent TAS3 trans-Acting siRNAs Control Leaf Morphology through AGO7. *Current Biology* **16**, 927–932. doi: 10.1016/j.cub.2006.03.035.
- Akiyama, K. and Hayashi, H.** (2006). Strigolactones: Chemical Signals for Fungal Symbionts and Parasitic Weeds in Plant Roots. *Annals of Botany* **97**, 925–931. doi: 10.1093/aob/mcl063.
- Akiyama, K., Matsuzaki, K. and Hayashi, H.** (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **435**, 824–827. doi: 10.1038/nature03608.
- Akiyama, K., Ogasawara, S., Ito, S. and Hayashi, H.** (2010). Structural requirements of strigolactones for hyphal branching in AM fungi. *Plant & Cell Physiology* **51**, 1104–1117. doi: 10.1093/pcp/pcq058.
- Al-Babili, S. and Bouwmeester, H. J.** (2015). Strigolactones, a novel carotenoid-derived plant hormone. *Annual Review of Plant Biology* **66**, 161–186. doi: 10.1146/annurev-arplant-043014-114759.
- Albrecht, H., Yoder, J. I. and Phillips, D. A.** (1999). Flavonoids promote haustoria formation in the root parasite *triphysaria versicolor*. *Plant Physiology* **119**, 585–592. doi: 10.1104/pp.119.2.585.
- Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A. M. and Carrington, J. C.** (2005). microRNA-Directed Phasing during Trans-Acting siRNA Biogenesis in Plants. *Cell* **121**, 207–221. doi: 10.1016/j.cell.2005.04.004.

- Allen, R. S., Li, J., Stahle, M. I., Dubroué, A., Gubler, F. and Millar, A. A.** (2007). Genetic analysis reveals functional redundancy and the major target genes of the Arabidopsis miR159 family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 16371–16376. doi: 10.1073/pnas.0707653104.
- Auger, B., Pouvreau, J.-B., Pouponneau, K., Yoneyama, K., Montiel, G., Le Bizec, B., Yoneyama, K., Delavault, P., Delourme, R. and Simier, P.** (2012). Germination stimulants of *Phelipanche ramosa* in the rhizosphere of *Brassica napus* are derived from the glucosinolate pathway. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* **25**, 993–1004. doi: 10.1094/MPMI-01-12-0006-R.
- Axtell, M. J., Jan, C., Rajagopalan, R. and Bartel, D. P.** (2006). A Two-Hit Trigger for siRNA Biogenesis in Plants. *Cell* **127**, 565–577. doi: 10.1016/j.cell.2006.09.032.

## B

- Bai, B., Shi, B., Hou, N., Cao, Y., Meng, Y., Bian, H., Zhu, M. and Han, N.** (2017). microRNAs participate in gene expression regulation and phytohormone cross-talk in barley embryo during seed development and germination. *BMC plant biology* **17**, 150. doi: 10.1186/s12870-017-1095-2.
- Baker, C. C., Sieber, P., Wellmer, F. and Meyerowitz, E. M.** (2005). The early extra petals1 Mutant Uncovers a Role for MicroRNA miR164c in Regulating Petal Number in Arabidopsis. *Current Biology* **15**, 303–315. doi: 10.1016/j.cub.2005.02.017.
- Bandaranayake, P. C. G., Filappova, T., Tomilov, A., Tomilova, N. B., Jamison-McClung, D., Ngo, Q., Inoue, K. and Yoder, J. I.** (2010). A Single-Electron Reducing Quinone Oxidoreductase Is Necessary to Induce Haustorium Development in the Root Parasitic Plant *Triphysaria*. *The Plant Cell* **22**, 1404–1419. doi: 10.1105/tpc.110.074831.
- Barkman, T. J., McNeal, J. R., Lim, S.-H., Coat, G., Croom, H. B., Young, N. D. and Depamphilis, C. W.** (2007). Mitochondrial DNA suggests at least 11 origins of parasitism in angiosperms and reveals genomic chimerism in parasitic plants. *BMC evolutionary biology* **7**, 248. doi: 10.1186/1471-2148-7-248.
- Bartel, D. P.** (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* **116**, 281–297. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5.
- Baumberger, N. and Baulcombe, D. C.** (2005). Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 11928–11933. doi: 10.1073/pnas.0505461102.
- Bedi, J. S.** (1994). Further studies on control of sunflower broomrape with *Fusarium oxysporum f.sp. orthoceras* - a potential mycoherbicide. *Biology and management of Orobanche. Proceedings of the third international workshop on Orobanche and related Striga research, Amsterdam, Netherlands, 8-12 November 1993.* **1994**, 539–544.
- Bennett, J. R. and Mathews, S.** (2006). Phylogeny of the parasitic plant family Orobanchaceae inferred from phytochrome A. *American Journal of Botany* **93**, 1039–1051. doi: 10.3732/ajb.93.7.1039.

- Besserer, A., Puech-Pagès, V., Kiefer, P., Gomez-Roldan, V., Jauneau, A., Roy, S., Portais, J.-C., Roux, C., Bécard, G. and Séjalon-Delmas, N.** (2006). Strigolactones Stimulate Arbuscular Mycorrhizal Fungi by Activating Mitochondria. *PLoS Biology* **4**(7), e226. doi: 10.1371/journal.pbio.0040226.
- Besserer, A., Bécard, G., Jauneau, A., Roux, C. and Séjalon-Delmas, N.** (2008). GR24, a Synthetic Analog of Strigolactones, Stimulates the Mitosis and Growth of the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Gigaspora rosea* by Boosting Its Energy Metabolism. *Plant Physiology* **148**, 402–413. doi: 10.1104/pp.108.121400.
- Bian, H., Xie, Y., Guo, F., Han, N., Ma, S., Zeng, Z., Wang, J., Yang, Y. and Zhu, M.** (2012). Distinctive expression patterns and roles of the miRNA393/TIR1 homolog module in regulating flag leaf inclination and primary and crown root growth in rice (*Oryza sativa*). *The New Phytologist* **196**, 149–161. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04248.x.
- Billard, E.** (2020). Implication des cytokinines dans la formation de l'haustorium chez la plante parasite *Phelipanche ramosa*. [Thèse de doctorat, Université de Nantes].
- Billard, E., Goyet, V., Delavault, P., Simier, P. and Montiel, G.** (2020). Cytokinin treated microcalli of *Phelipanche ramosa*: an efficient model for studying haustorium formation in holoparasitic plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **141**, 543–553. doi: 10.1007/s11240-020-01813-6.
- Boualem, A., Laporte, P., Jovanovic, M., Laffont, C., Plet, J., Combiér, J.-P., Niebel, A., Crespi, M. and Frugier, F.** (2008). MicroRNA166 controls root and nodule development in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **54**, 876–887. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03448.x.
- Bouwmeester, H. J., Matusova, R., Zhongkui, S. and Beale, M. H.** (2003). Secondary metabolite signalling in host–parasitic plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 358–364. doi: 10.1016/S1369-5266(03)00065-7.
- Brault, M., Betsou, F., Jeune, B., Tuquet, C. and Sallé, G.** (2007). Variability of *Orobancha ramosa* populations in France as revealed by cross infestations and molecular markers. *Environmental and Experimental Botany* **61**, 272–280. doi: 10.1016/j.envexpbot.2007.06.009.
- Brewer, P. B., Koltai, H. and Beveridge, C. A.** (2013). Diverse Roles of Strigolactones in Plant Development. *Molecular Plant* **6**, 18–28. doi: 10.1093/mp/sss130.
- Bromham, L., Cowman, P. F. and Lanfear, R.** (2013). Parasitic plants have increased rates of molecular evolution across all three genomes. *BMC evolutionary biology* **13**, 126. doi: 10.1186/1471-2148-13-126.
- Brun, G.** (2017). Mécanismes moléculaires impliqués dans la germination des plantes en réponse aux strigolactones. [Thèse de doctorat, Université de Nantes].
- Brun, G., Braem, L., Thoiron, S., Gevaert, K., Goormachtig, S. and Delavault, P.** (2018). Seed germination in parasitic plants: what insights can we expect from strigolactone research? *Journal of Experimental Botany* **69**, 2265–2280. doi: 10.1093/jxb/erx472.
- Brun, G., Thoiron, S., Braem, L., Pouvreau, J.-B., Montiel, G., Lechat, M.-M., Simier, P., Gevaert, K., Goormachtig, S. and Delavault, P.** (2019). CYP707As are effectors of karrikin and strigolactone signalling pathways in *Arabidopsis thaliana* and parasitic plants. *Plant, Cell & Environment* **42**, 2612–2626. doi: 10.1111/pce.13594.

**Butler, L. G.** (1994). Chemical Communication Between the Parasitic Weed *Striga* and Its Crop Host. In *Allelopathy, American Chemical Society* **12**, 158–168. doi: 10.1021/bk-1995-0582.ch012.

## C

**Cameron, D. D., Coats, A. M. and Seel, W. E.** (2006). Differential Resistance among Host and Non-host Species Underlies the Variable Success of the Hemi-parasitic Plant *Rhinanthus minor*. *Annals of Botany* **98**, 1289–1299. doi: 10.1093/aob/mcl218.

**Chae, S. H., Yoneyama, K., Takeuchi, Y. and Joel, D. M.** (2004). Fluridone and norflurazon, carotenoid-biosynthesis inhibitors, promote seed conditioning and germination of the holoparasite *Orobanche minor*. *Physiologia Plantarum* **120**, 328–337. doi: 10.1111/j.0031-9317.2004.0243.x.

**Chang, M. and Lynn, D. G.** (1986). The haustorium and the chemistry of host recognition in parasitic angiosperms. *Journal of Chemical Ecology* **12**, 561–579. doi: 10.1007/BF01020572.

**Chang, M., Netzly, D. H., Butler, L. G. and Lynn, D. G.** (1986). Chemical regulation of distance. Characterization of the first natural host germination stimulant for *Striga asiatica*. *Journal of the American Chemical Society* **108**, 7858–7860. doi: 10.1021/ja00284a074.

**Chen, X.** (2004). A MicroRNA as a Translational Repressor of APETALA2 in Arabidopsis Flower Development. *Science (New York, N.Y.)* **303**, 2022–2025. doi: 10.1126/science.1088060.

**Chen, X.** (2009). Small RNAs and their roles in plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **25**, 21–44. doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113417.

**Chen, Q.-J., Deng, B.-H., Gao, J., Zhao, Z.-Y., Chen, Z.-L., Song, S.-R., Wang, L., Zhao, L.-P., Xu, W.-P., Zhang, C.-X., Ma, C. and Wang, S.-P.** (2020). An miRNA-encoded small peptide, vvi-miPEP171d1, regulates adventitious root formation. *Plant Physiology* **183(2)**, 656–670. doi: 10.1104/pp.20.00197.

**Cheng, X., Ruyter-Spira, C. and Bouwmeester, H.** (2013). The interaction between strigolactones and other plant hormones in the regulation of plant development. *Frontiers in Plant Science* **4**, 199. doi: 10.3389/fpls.2013.00199.

**Clarke, C. R., Timko, M. P., Yoder, J. I., Axtell, M. J. and Westwood, J. H.** (2019). Molecular Dialog Between Parasitic Plants and Their Hosts. *Annual Review of Phytopathology* **57**, 279–299. doi: 10.1146/annurev-phyto-082718-100043.

**Cnops, G., Wang, X., Linstead, P., Van Montagu, M., Van Lijsebettens, M. and Dolan, L.** (2000). *Tornado1* and *tornado2* are required for the specification of radial and circumferential pattern in the Arabidopsis root. *Development (Cambridge, England)* **127**, 3385–3394. doi: 10.1242/dev.127.15.3385.

**Combier, J.-P., Frugier, F., de Billy, F., Boualem, A., El-Yahyaoui, F., Moreau, S., Vernié, T., Ott, T., Gamas, P., Crespi, M. and Niebel, A.** (2006). MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes & Development* **20**, 3084–3088. doi: 10.1101/gad.402806.

- Conn, C. E., Bythell-Douglas, R., Neumann, D., Yoshida, S., Whittington, B., Westwood, J. H., Shirasu, K., Bond, C. S., Dyer, K. A. and Nelson, D. C.** (2015). Convergent evolution of strigolactone perception enabled host detection in parasitic plants. *Science* **349**, 540–543. doi: 10.1126/science.aab1140.
- Cook, C. E., Whichard, L. P., Turner, B., Wall, M. E. and Egley, G. H.** (1966). Germination of Witchweed (*Striga lutea* Lour.): Isolation and Properties of a Potent Stimulant. *Science (New York, N.Y.)* **154**, 1189–1190. doi: 10.1126/science.154.3753.1189.
- Cook, C. E., Whichard, L. P., Wall, M., Egley, G. H., Coggon, P., Luhan, P. A. and McPhail, A. T.** (1972). Germination stimulants. II. Structure of strigol, a potent seed germination stimulant for witchweed (*Striga lutea*). *Journal of the American Chemical Society* **94**, 6198–6199. doi: 10.1021/ja00772a048.
- Couzigou, J.-M., Laressergues, D., Bécard, G. and Combier, J.-P.** (2015). miRNA-encoded peptides (miPEPs): A new tool to analyze the roles of miRNAs in plant biology. *RNA biology* **12**, 1178–1180. doi: 10.1080/15476286.2015.1094601.
- Couzigou, J.-M., André, O., Guillotin, B., Alexandre, M. and Combier, J.-P.** (2016). Use of microRNA-encoded peptide miPEP172c to stimulate nodulation in soybean. *The New Phytologist* **211**, 379–381. doi: 10.1111/nph.13991.
- Couzigou, J.-M., Laressergues, D., André, O., Gutjahr, C., Guillotin, B., Bécard, G. and Combier, J.-P.** (2017). Positive Gene Regulation by a Natural Protective miRNA Enables Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Cell Host & Microbe* **21**, 106–112. doi: 10.1016/j.chom.2016.12.001.
- Cui, S., Wakatake, T., Hashimoto, K., Saucet, S. B., Toyooka, K., Yoshida, S. and Shirasu, K.** (2016). Haustorial Hairs Are Specialized Root Hairs That Support Parasitism in the Facultative Parasitic Plant *Phtheirospermum japonicum*. *Plant Physiology* **170**, 1492–1503. doi: 10.1104/pp.15.01786.
- Cui, S., Wada, S., Tobimatsu, Y., Takeda, Y., Saucet, S. B., Takano, T., Umezawa, T., Shirasu, K. and Yoshida, S.** (2018). Host lignin composition affects haustorium induction in the parasitic plants *Phtheirospermum japonicum* and *Striga hermonthica*. *New Phytologist* **218**, 710–723. doi: 10.1111/nph.15033.
- Curaba, J., Singh, M. B. and Bhalla, P. L.** (2014). miRNAs in the crosstalk between phytohormone signalling pathways. *Journal of Experimental Botany* **65**, 1425–1438. doi: 10.1093/jxb/eru002.

## D

- Das, S. S., Karmakar, P., Nandi, A. K. and Sanan-Mishra, N.** (2015). Small RNA mediated regulation of seed germination. *Frontiers in Plant Science* **6**, 828. doi: 10.3389/fpls.2015.00828.
- Das, S. S., Yadav, S., Singh, A., Gautam, V., Sarkar, A. K., Nandi, A. K., Karmakar, P., Majee, M. and Sanan-Mishra, N.** (2018). Expression dynamics of miRNAs and their targets in seed germination conditions reveals miRNA-ta-siRNA crosstalk as regulator of seed germination. *Scientific Reports* **8**, 1233. doi: 10.1038/s41598-017-18823-8.

- De Saint Germain, A. de S., Ligerot, Y., Dun, E. A., Pillot, J.-P., Ross, J. J., Beveridge, C. A. and Rameau, C.** (2013). Strigolactones Stimulate Internode Elongation Independently of Gibberellins. *Plant Physiology* **163**, 1012–1025. doi: 10.1104/pp.113.220541.
- De Zélicourt, A., Letousey, P., Thoiron, S., Campion, C., Simoneau, P., Elmorjani, K., Marion, D., Simier, P. and Delavault, P.** (2007). Ha-DEF1, a sunflower defensin, induces cell death in Orobanche parasitic plants. *Planta* **226**, 591–600. doi: 10.1007/s00425-007-0507-1.
- Delavault, P.** (2015). Knowing the Parasite: Biology and Genetics of Orobanche. *Helia* **38**, 15–29. doi: 10.1515/helia-2014-0030.
- Delavault, P., Simier, P., Thoiron, S., Véronési, C., Fer, A. and Thalouarn, P.** (2002). Isolation of mannose 6-phosphate reductase cDNA, changes in enzyme activity and mannitol content in broomrape (*Orobanche ramosa*) parasitic on tomato roots. *Physiologia Plantarum* **115**, 48–55. doi: 10.1034/j.1399-3054.2002.1150105.x.
- Dello Iorio, R., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M. T., Aoyama, T., Costantino, P. and Sabatini, S.** (2008). A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science (New York, N.Y.)* **322**, 1380–1384. doi: 10.1126/science.1164147.
- Ding, D., Zhang, L., Wang, H., Liu, Z., Zhang, Z. and Zheng, Y.** (2009). Differential expression of miRNAs in response to salt stress in maize roots. *Annals of Botany* **103**, 29–38. doi: 10.1093/aob/mcn205.
- Duriez, P., Vautrin, S., Auriac, M.-C., Bazerque, J., Boniface, M.-C., Callot, C., Carrère, S., Cauet, S., Chabaud, M., Gentou, F., Lopez-Sendon, M., Paris, C., Pegot-Espagnet, P., Rousseaux, J.-C., Pérez-Vich, B., Velasco, L., Bergès, H., Piquemal, J. and Muñoz, S.** (2019). A receptor-like kinase enhances sunflower resistance to *Orobanche cumana*. *Nature Plants* **5**, 1211–1215. doi: 10.1038/s41477-019-0556-z.

## E

- Efroni, I., Han, S.-K., Kim, H. J., Wu, M.-F., Steiner, E., Birnbaum, K. D., Hong, J. C., Eshed, Y. and Wagner, D.** (2013). Regulation of leaf maturation by chromatin-mediated modulation of cytokinin responses. *Developmental Cell* **24**, 438–445. doi: 10.1016/j.devcel.2013.01.019.
- Ekawa, M. and Aoki, K.** (2017). Phloem-Conducting Cells in Haustoria of the Root-Parasitic Plant *Phelipanche aegyptiaca* Retain Nuclei and Are Not Mature Sieve Elements. *Plants* **6(4)**, 60. doi: 10.3390/plants6040060.
- Etemadi, M., Gutjahr, C., Couzigou, J.-M., Zouine, M., Lauressergues, D., Timmers, A., Audran, C., Bouzayen, M., Bécard, G. and Combier, J.-P.** (2014). Auxin perception is required for arbuscule development in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology* **166**, 281–292. doi: 10.1104/pp.114.246595.
- Evidente, A., Fernández-Aparicio, M., Cimmino, A., Rubiales, D., Andolfi, A. and Motta, A.** (2009). Peagol and peagoldione, two new strigolactone-like metabolites isolated from pea root exudates. *Tetrahedron Letters* **50**, 6955–6958. doi: 10.1016/j.tetlet.2009.09.142.

**Evidente, A., Cimmino, A., Fernández-Aparicio, M., Andolfi, A., Rubiales, D. and Motta, A.** (2010). Polyphenols, including the new Peapolyphenols A-C, from pea root exudates stimulate *Orobanche foetida* seed germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 2902–2907. doi: 10.1021/jf904247k.

**Evidente, A., Cimmino, A., Fernández-Aparicio, M., Rubiales, D., Andolfi, A. and Melck, D.** (2011). Soyasapogenol B and trans-22-dehydrocampesterol from common vetch (*Vicia sativa* L.) root exudates stimulate broomrape seed germination. *Pest Management Science* **67**, 1015–1022. doi: 10.1002/ps.2153.

## F

**Fahlgren, N., Montgomery, T. A., Howell, M. D., Allen, E., Dvorak, S. K., Alexander, A. L. and Carrington, J. C.** (2006). Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR3 by TAS3 ta-siRNA Affects Developmental Timing and Patterning in Arabidopsis. *Current Biology* **16**, 939–944. doi: 10.1016/j.cub.2006.03.065.

**Feild, T. S. and Brodrigg, T. J.** (2005). A unique mode of parasitism in the conifer coral tree *Parasitaxus ustus* (Podocarpaceae). *Plant, Cell & Environment* **28**, 1316–1325. doi: 10.1111/j.1365-3040.2005.01378.x.

**Ferdous, J., Sanchez-Ferrero, J. C., Langridge, P., Milne, L., Chowdhury, J., Brien, C. and Tricker, P. J.** (2017). Differential expression of microRNAs and potential targets under drought stress in barley. *Plant, Cell & Environment* **40**, 11–24. doi: <https://doi.org/10.1111/pce.12764>.

**Fernández-Aparicio, M., Westwood, J. H. and Rubiales, D.** (2011). Agronomic, breeding, and biotechnological approaches to parasitic plant management through manipulation of germination stimulant levels in agricultural soils. *Botany* **89**, 813–826. doi: 10.1139/b11-075.

**Fernández-Aparicio, M., Kisugi, T., Xie, X., Rubiales, D. and Yoneyama, K.** (2014). Low strigolactone root exudation: a novel mechanism of broomrape (*Orobanche* and *Phelipanche* spp.) resistance available for faba bean breeding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**, 7063–7071. doi: 10.1021/jf5027235.

**Fernández-Aparicio, M., Reboud, X. and Gibot-Leclerc, S.** (2016). Broomrape Weeds. Underground Mechanisms of Parasitism and Associated Strategies for their Control: A Review. *Frontiers in Plant Science* **7**, 135. doi: 10.3389/fpls.2016.00135.

**Fernández-Aparicio, M., Delavault, P. and Timko, M. P.** (2020). Management of Infection by Parasitic Weeds: A Review. *Plants* **9**, 1184. doi: 10.3390/plants9091184.

**Fernández-Martínez, J., Melero-Vara, J., Muñoz-Ruz, J., Ruso, J. and Domínguez, J.** (2000). Selection of Wild and Cultivated Sunflower for Resistance to a New Broomrape Race that Overcomes Resistance of the Or5 Gene. *Crop Science* **40**, 550–555. doi: 10.2135/cropsci2000.402550x.

**Flematti, G. R., Dixon, K. W. and Smith, S. M.** (2015). What are karrikins and how were they 'discovered' by plants? *BMC Biology* **13**, 108. doi: 10.1186/s12915-015-0219-0.

## G

- Garcia, D., Collier, S. A., Byrne, M. E. and Martienssen, R. A.** (2006). Specification of Leaf Polarity in Arabidopsis via the trans-Acting siRNA Pathway. *Current Biology* **16**, 933–938. doi: 10.1016/j.cub.2006.03.064.
- Garneau, N. L., Wilusz, J. and Wilusz, C. J.** (2007). The highways and byways of mRNA decay. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **8**, 113–126. doi: 10.1038/nrm2104.
- Gauthier, M.** (2012). Etude et caractérisation des mécanismes de résistance de *Brassica napus* (colza, Brassicaceae) vis-à-vis de la plante parasite *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel (Orobanchaceae). [Thèse de doctorat, Université de Nantes].
- Gauthier, M., Véronési, C., El-Halmouch, Y., Leflon, M., Jestin, C., Labalette, F., Simier, P., Delourme, R. and Delavault, P.** (2012). Characterisation of resistance to branched broomrape, *Phelipanche ramosa*, in winter oilseed rape. *Crop Protection* **42**, 56–63. doi: 10.1016/j.cropro.2012.07.002.
- Gibot-Leclerc, S., Brault, M., Pinochet, X. and Sallé, G.** (2003). Rôle potentiel des plantes adventices du colza d'hiver dans l'extension de l'orobanche rameuse en Poitou-Charentes. *Comptes Rendus Biologies* **326**, 645–658. doi: 10.1016/S1631-0691(03)00169-0.
- Gibot-Leclerc, S., Corbineau, F., Sallé, G. and Côme, D.** (2004). Responsiveness of *Orobancha ramosa* L. Seeds to GR 24 as Related to Temperature, Oxygen Availability and Water Potential During Preconditioning and Subsequent Germination. *Plant Growth Regulation* **43**, 63–71. doi: 10.1023/B:GROW.0000038242.77309.73.
- Gibot-Leclerc, S., Sallé, G., Reboud, X. and Moreau, D.** (2012). What are the traits of *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel that contribute to the success of its biological cycle on its host *Brassica napus* L.? *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **207**, 512–521. doi: 10.1016/j.flora.2012.06.011.
- Gomez-Roldan, V., Fermas, S., Brewer, P. B., Puech-Pagès, V., Dun, E. A., Pillot, J.-P., Letisse, F., Matusova, R., Danoun, S., Portais, J.-C., Bouwmeester, H., Bécard, G., Beveridge, C. A., Rameau, C. and Rochange, S. F.** (2008). Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**, 189–194. doi: 10.1038/nature07271.
- Goyet, V.** (2017). Analyse transcriptomique globale et génétique fonctionnelle chez la plante parasite *Phelipanche ramosa*. [Thèse de doctorat, Université de Nantes].
- Goyet, V., Billard, E., Pouvreau, J.-B., Lechat, M.-M., Pelletier, S., Bahut, M., Monteau, F., Spíchal, L., Delavault, P., Montiel, G. and Simier, P.** (2017a). Haustorium initiation in the obligate parasitic plant *Phelipanche ramosa* involves a host-exudated cytokinin signal. *Journal of Experimental Botany* **68**, 5539–5552. doi: 10.1093/jxb/erx359.
- Goyet, V., Wada, S., Cui, S., Wakatake, T., Shirasu, K., Montiel, G., Simier, P. and Yoshida, S.** (2019). Haustorium Inducing Factors for Parasitic Orobanchaceae. *Frontiers in Plant Science* **10**, 1056. doi: 10.3389/fpls.2019.01056.
- Grigg, S. P., Galinha, C., Kornet, N., Canales, C., Scheres, B. and Tsiantis, M.** (2009). Repression of Apical Homeobox Genes Is Required for Embryonic Root Development in Arabidopsis. *Current Biology* **19**, 1485–1490. doi: 10.1016/j.cub.2009.06.070.

**Guo, H.-S., Xie, Q., Fei, J.-F. and Chua, N.-H.** (2005). MicroRNA Directs mRNA Cleavage of the Transcription Factor NAC1 to Downregulate Auxin Signals for Arabidopsis Lateral Root Development. *The Plant Cell* **17**, 1376–1386. doi: 10.1105/tpc.105.030841.

**Gutierrez, L., Bussell, J. D., Păcurar, D. I., Schwambach, J., Păcurar, M. and Bellini, C.** (2009). Phenotypic Plasticity of Adventitious Rooting in Arabidopsis Is Controlled by Complex Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR Transcripts and MicroRNA Abundance. *The Plant Cell* **21**, 3119–3132. doi: 10.1105/tpc.108.064758.

## H

**Ha, C. V., Leyva-González, M. A., Osakabe, Y., Tran, U. T., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Tanaka, M., Seki, M., Yamaguchi, S., Dong, N. V., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Herrera-Estrella, L. and Tran, L.-S. P.** (2014). Positive regulatory role of strigolactone in plant responses to drought and salt stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 851–856. doi: 10.1073/pnas.1322135111.

**Hai, N. N., Chuong, N. N., Tu, N. H. C., Kisiala, A., Hoang, X. L. T. and Thao, N. P.** (2020). Role and Regulation of Cytokinins in Plant Response to Drought Stress. *Plants* **9**(4), 422. doi: 10.3390/plants9040422.

**Han, M.-H., Goud, S., Song, L. and Fedoroff, N.** (2004). The Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 1093–1098. doi: 10.1073/pnas.0307969100.

**Hauck, C., Müller, S. and Schildknecht, H.** (1992). A Germination Stimulant for Parasitic Flowering Plants from *Sorghum bicolor*, a Genuine Host Plant. *Journal of Plant Physiology* **139**, 474–478. doi: 10.1016/S0176-1617(11)80497-9.

**Heide-Jørgensen, H.** (2008). Parasitic flowering plants. *Brill, Leiden-Boston*.

**Hendelman, A., Kravchik, M., Stav, R., Frank, W. and Arazi, T.** (2016). Tomato HAIRY MERISTEM genes are involved in meristem maintenance and compound leaf morphogenesis. *Journal of Experimental Botany* **67**, 6187–6200. doi: 10.1093/jxb/erw388.

**Hibara, K., Karim, Md. R., Takada, S., Taoka, K., Furutani, M., Aida, M. and Tasaka, M.** (2006). Arabidopsis CUP-SHAPED COTYLEDON3 Regulates Postembryonic Shoot Meristem and Organ Boundary Formation. *The Plant Cell* **18**, 2946–2957. doi: 10.1105/tpc.106.045716.

**Hood, M. E., Condon, J. M., Timko, M. P. and Riopel, J. L.** (1998). Primary haustorial development of *Striga asiatica* on host and nonhost species. *Phytopathology* **88**(1), 70–75. doi: 10.1094/PHYTO.1998.88.1.70.

**Huang, D., Koh, C., Feurtado, J. A., Tsang, E. W. T. and Cutler, A. J.** (2013). MicroRNAs and their putative targets in *Brassica napus* seed maturation. *BMC genomics* **14**, 140. doi: 10.1186/1471-2164-14-140.

**Hülkamp, M., Misra, S. and Jürgens, G.** (1994). Genetic dissection of trichome cell development in Arabidopsis. *Cell* **76**, 555–566. doi: 10.1016/0092-8674(94)90118-x.

**Huo, H., Wei, S. and Bradford, K. J.** (2016). DELAY OF GERMINATION1 (DOG1) regulates both seed dormancy and flowering time through microRNA pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, E2199-2206. doi: 10.1073/pnas.1600558113.

## I

**Irving, L. J. and Cameron, D. D.** (2009). Chapter 3 You are What You Eat: Interactions Between Root Parasitic Plants and Their Hosts. *In Advances in Botanical Research*, **50**, pp. 87–138. *Academic Press* doi: 10.1016/S0065-2296(08)00803-3.

**Ishida, J. K., Wakatake, T., Yoshida, S., Takebayashi, Y., Kasahara, H., Wafula, E., dePamphilis, C. W., Namba, S. and Shirasu, K.** (2016). Local Auxin Biosynthesis Mediated by a YUCCA Flavin Monooxygenase Regulates Haustorium Development in the Parasitic Plant *Phtheirospermum japonicum*. *The Plant Cell* **28**, 1795–1814. doi: 10.1105/tpc.16.00310.

**Ishida, J. K., Yoshida, S. and Shirasu, K.** (2017). Quinone oxidoreductase 2 is involved in haustorium development of the parasitic plant *Phtheirospermum japonicum*. *Plant Signaling & Behavior* **12**, e1319029. doi: 10.1080/15592324.2017.1319029.

**Itoh, J.-I., Hibara, K.-I., Sato, Y. and Nagato, Y.** (2008). Developmental Role and Auxin Responsiveness of Class III Homeodomain Leucine Zipper Gene Family Members in Rice. *Plant Physiology* **147**, 1960–1975. doi: 10.1104/pp.108.118679.

**Joel, D. M., Gressel, J. and Musselman, L. J. eds.** (2013a). Parasitic Orobanchaceae: Parasitic Mechanisms and Control Strategies. *Springer-Verlag, Berlin Heidelberg* doi: 10.1007/978-3-642-38146-1.

**Joel, D. M.** (2000). The long-term approach to parasitic weeds control: manipulation of specific developmental mechanisms of the parasite. *Crop Protection* **19**, 753–758. doi: 10.1016/S0261-2194(00)00100-9.

**Joel, D. M.** (2009). The new nomenclature of Orobanche and Phelipanche. *Weed Research* **49**, 6–7. doi: 10.1111/j.1365-3180.2009.00748.x.

**Joel, D. M.** (2013). Functional Structure of the Mature Haustorium. In Parasitic Orobanchaceae: Parasitic Mechanisms and Control Strategies (ed. Joel, D. M., Gressel, J., and Musselman, L. J.), pp. 25–60. *Springer, Berlin, Heidelberg* doi: 10.1007/978-3-642-38146-1\_3.

**Joel, D. M. and Losner-Goshen, D.** (1994). The attachment organ of the parasitic angiosperms *Orobanche cumana* and *O. aegyptiaca* and its development. *Canadian Journal of Botany* **72**, 564–574. doi: 10.1139/b94-075.

**Joel, D. M., Hershenhorn, J., Eizenberg, H., Aly, R., Ejeta, G., Rich, P. J., Ransom, J. K., Sauerborn, J. and Rubiales, D.** (2007). Biology and Management of Weedy Root Parasites. *In Horticultural Reviews* (ed. Janick, J.) **33(4)**, pp. 267–349. *John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA* doi: 10.1002/9780470168011.ch4.

**Joel, D. M., Chaudhuri, S. K., Plakhine, D., Ziadna, H. and Steffens, J. C.** (2011). Dehydrocostus lactone is exuded from sunflower roots and stimulates germination of the root parasite *Orobanche cumana*. *Phytochemistry* **72**, 624–634. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.01.037.

**Joel, D. M., Bar, H., Mayer, A. M., Plakhine, D., Ziadne, H., Westwood, J. H. and Welbaum, G. E.** (2012). Seed ultrastructure and water absorption pathway of the root-parasitic plant *Phelipanche aegyptiaca* (Orobanchaceae). *Annals of Botany* **109**, 181–195. doi: 10.1093/aob/mcr261.

**Johnson, A. W., Gowada, G., Hassanali, A., Knox, J., Monaco, S., Razavi, Z. and Rosebery, G.** (1981). The preparation of synthetic analogues of strigol. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* **1**, 1734–1743. doi: 10.1039/P19810001734.

## K

**Kakhaki, S. H. N., Montazeri, M. and Naseri, B.** (2017). Biocontrol of broomrape using *Fusarium oxysporum* f. sp. *orthoceras* in tomato crops under field conditions. *Biocontrol Science and Technology* **27**, 1435–1444. doi: 10.1080/09583157.2017.1409338.

**Kamthan, A., Chaudhuri, A., Kamthan, M. and Datta, A.** (2015). Small RNAs in plants: recent development and application for crop improvement. *Frontiers in Plant Science* **6**, 208. doi: 10.3389/fpls.2015.00208.

**Kang, M., Tang, B., Li, J., Zhou, Z., Liu, K., Wang, R., Jiang, Z., Bi, F., Patrick, D., Kim, D., Mitra, A. K. and Yang-Hartwich, Y.** (2020). Identification of miPEP133 as a novel tumor-suppressor microprotein encoded by miR-34a pri-miRNA. *Molecular Cancer* **19**, 143. doi: 10.1186/s12943-020-01248-9.

**Kapulnik, Y., Delaux, P.-M., Resnick, N., Mayzlish-Gati, E., Winer, S., Bhattacharya, C., Séjalon-Delmas, N., Combier, J.-P., Bécard, G., Belausov, E., Beekman, T., Dor, E., Hershenhorn, J. and Koltai, H.** (2011a). Strigolactones affect lateral root formation and root-hair elongation in *Arabidopsis*. *Planta* **233**, 209–216. doi: 10.1007/s00425-010-1310-y.

**Kapulnik, Y., Resnick, N., Mayzlish-Gati, E., Kaplan, Y., Winer, S., Hershenhorn, J. and Koltai, H.** (2011b). Strigolactones interact with ethylene and auxin in regulating root-hair elongation in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2915–2924. doi: 10.1093/jxb/erq464.

**Kebreab, E. and Murdoch, A. J.** (1999). A quantitative model for loss of primary dormancy and induction of secondary dormancy in imbibed seeds of *Orobanche* spp. *Journal of Experimental Botany* **50**, 211–219. doi: 10.1093/jxb/50.331.211.

**Kebreab, E. and Murdoch, A. J.** (2001). Simulation of integrated control strategies for orobanche spp. based on a life cycle model. *Experimental Agriculture* **37**, 37–51. doi: 10.1017/S001447970100401X.

**Keyes, J. W., O'Malley, R. C., Kim, D. and Lynn, D. G.** (2000). Signaling Organogenesis in Parasitic Angiosperms: Xenognosin Generation, Perception, and Response. *Journal of Plant Growth Regulation* **19**, 217–231. doi: 10.1007/s003440000024.

**Kim, J. H., Choi, D. and Kende, H.** (2003). The AtGRF family of putative transcription factors is involved in leaf and cotyledon growth in *Arabidopsis*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **36**, 94–104. doi: 10.1046/j.1365-313x.2003.01862.x.

- Kim, J. Y., Lee, H. J., Jung, H. J., Maruyama, K., Suzuki, N. and Kang, H.** (2010). Overexpression of microRNA395c or 395e affects differently the seed germination of *Arabidopsis thaliana* under stress conditions. *Planta* **232**, 1447–1454. doi: 10.1007/s00425-010-1267-x.
- Klein, O. and Kroschel, J.** (2002). Biological control of *Orobancha* spp. with *Phytomyza orobanchia*, a review. *BioControl* **47**, 245–277. doi: 10.1023/A:1014862302818.
- Kokla, A. and Melnyk, C. W.** (2018). Developing a thief: Haustoria formation in parasitic plants. *Developmental Biology* **442**, 53–59. doi: 10.1016/j.ydbio.2018.06.013.
- Koyama, T., Mitsuda, N., Seki, M., Shinozaki, K. and Ohme-Takagi, M.** (2010). TCP Transcription Factors Regulate the Activities of ASYMMETRIC LEAVES1 and miR164, as Well as the Auxin Response, during Differentiation of Leaves in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **22**, 3574–3588. doi: 10.1105/tpc.110.075598.
- Krupp, A., Heller, A. and Spring, O.** (2019). Development of phloem connection between the parasitic plant *Orobancha cumana* and its host sunflower. *Protoplasma* **256**, 1385–1397. doi: 10.1007/s00709-019-01393-z.
- Kuijt, J.** (1969). The biology of parasitic flowering plants. *University of California Press, Berkeley*.
- Kuijt, J.** (1977). Haustoria of Phanerogamic Parasites. *Annual Review of Phytopathology* **15**, 91–118. doi: 10.1146/annurev.py.15.090177.000515.
- Kurihara, Y. and Watanabe, Y.** (2004). *Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 12753–12758. doi: 10.1073/pnas.0403115101.
- Kurihara, Y., Takashi, Y. and Watanabe, Y.** (2006). The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA* **12**, 206–212. doi: 10.1261/rna.2146906.

## L

- Labrousse, P., Arnaud, M. C., Serieys, H., Bervillé, A. and Thalouarn, P.** (2001). Several Mechanisms are Involved in Resistance of *Helianthus* to *Orobancha cumana* Wallr. *Annals of Botany* **88**, 859–868. doi: 10.1006/anbo.2001.1520.
- Laufs, P., Peaucelle, A., Morin, H. and Traas, J.** (2004). MicroRNA regulation of the *CUC* genes is required for boundary size control in *Arabidopsis* meristems. *Development (Cambridge, England)* **131**, 4311–4322. doi: 10.1242/dev.01320.
- Laressergues, D., Couzigou, J.-M., Clemente, H. S., Martinez, Y., Dunand, C., Bécard, G. and Combier, J.-P.** (2015). Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides. *Nature* **520**, 90–93. doi: 10.1038/nature14346.
- Lechat, M.-M., Pouvreau, J.-B., Péron, T., Gauthier, M., Montiel, G., Véronési, C., Todoroki, Y., Le Bizec, B., Monteau, F., Macherel, D., Simier, P., Thoiron, S. and Delavault, P.** (2012). PrCYP707A1, an ABA catabolic gene, is a key component of *Phelipanche ramosa* seed germination in response to the strigolactone analogue GR24. *Journal of Experimental Botany* **63**, 5311–5322. doi: 10.1093/jxb/ers189.

- Lechat, M.-M., Brun, G., Montiel, G., Véronési, C., Simier, P., Thoiron, S., Pouvreau, J.-B. and Delavault, P.** (2015). Seed response to strigolactone is controlled by abscisic acid-independent DNA methylation in the obligate root parasitic plant, *Phelipanche ramosa* L. Pomel. *Journal of Experimental Botany* **66**, 3129–3140. doi: 10.1093/jxb/erv119.
- Letousey, P., De Zélicourt, A., Vieira Dos Santos, C., Thoiron, S., Monteau, F., Simier, P., Thalouarn, P. and Delavault, P.** (2007). Molecular analysis of resistance mechanisms to *Orobanche cumana* in sunflower. *Plant Pathology* **56**, 536–546. doi: 10.1111/j.1365-3059.2007.01575.x.
- Li, C. and Zhang, B.** (2016). MicroRNAs in Control of Plant Development. *Journal of Cellular Physiology* **231**, 303–313. doi: 10.1002/jcp.25125.
- Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J. and Chen, X.** (2005). Methylation Protects miRNAs and siRNAs from a 3'-End Uridylation Activity in Arabidopsis. *Current biology: CB* **15**, 1501–1507. doi: 10.1016/j.cub.2005.07.029.
- Li, W.-X., Oono, Y., Zhu, J., He, X.-J., Wu, J.-M., Iida, K., Lu, X.-Y., Cui, X., Jin, H. and Zhu, J.-K.** (2008). The Arabidopsis NFYA5 Transcription Factor Is Regulated Transcriptionally and Post transcriptionally to Promote Drought Resistance. *The Plant Cell* **20**, 2238–2251. doi: 10.1105/tpc.108.059444.
- Li, D., Wang, L., Liu, X., Cui, D., Chen, T., Zhang, H., Jiang, C., Xu, C., Li, P., Li, S., Zhao, L. and Chen, H.** (2013). Deep Sequencing of Maize Small RNAs Reveals a Diverse Set of MicroRNA in Dry and Imbibed Seeds. *PLoS ONE* **8(1)**, e55107. doi: 10.1371/journal.pone.0055107.
- Li, S., Castillo-González, C., Yu, B. and Zhang, X.** (2017a). The functions of plant small RNAs in development and in stress responses. *The Plant Journal* **90**, 654–670. doi: 10.1111/tpj.13444.
- Liebman, M. and Dyck, E.** (1993). Crop Rotation and Intercropping Strategies for Weed Management. *Ecological Applications* **3**, 92–122. doi: 10.2307/1941795.
- Liu, P.-P., Montgomery, T. A., Fahlgren, N., Kasschau, K. D., Nonogaki, H. and Carrington, J. C.** (2007). Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **52**, 133–146. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03218.x.
- Liu, H.-H., Tian, X., Li, Y.-J., Wu, C.-A. and Zheng, C.-C.** (2008). Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA* **14**, 836–843. doi: 10.1261/rna.895308.
- Liu, Q., Zhang, Y.-C., Wang, C.-Y., Luo, Y.-C., Huang, Q.-J., Chen, S.-Y., Zhou, H., Qu, L.-H. and Chen, Y.-Q.** (2009a). Expression analysis of phytohormone-regulated microRNAs in rice, implying their regulation roles in plant hormone signaling. *FEBS Letters* **583**, 723–728. doi: 10.1016/j.febslet.2009.01.020.
- Liu, D., Song, Y., Chen, Z. and Yu, D.** (2009b). Ectopic expression of miR396 suppresses GRF target gene expression and alters leaf growth in Arabidopsis. *Physiologia Plantarum* **136**, 223–236. doi: 10.1111/j.1399-3054.2009.01229.x.

- Liu, H., Guo, S., Xu, Y., Li, C., Zhang, Z., Zhang, D., Xu, S., Zhang, C. and Chong, K.** (2014). OsmiR396d-Regulated OsGRFs Function in Floral Organogenesis in Rice through Binding to Their Targets OsJMJ706 and OsCR41. *Plant Physiology* **165**, 160–174. doi: 10.1104/pp.114.235564.
- Lobbes, D., Rallapalli, G., Schmidt, D. D., Martin, C. and Clarke, J.** (2006). SERRATE: a new player on the plant microRNA scene. *EMBO reports* **7**, 1052–1058. doi: 10.1038/sj.embor.7400806.
- Losner-Goshen, D., Portnoy, V. H., Mayer, A. M. and Joel, D. M.** (1998). Pectolytic Activity by the Haustorium of the Parasitic Plant Orobanche L. (Orobanchaceae) in Host Roots. *Annals of Botany* **81**, 319–326. doi: 10.1006/anbo.1997.0563.
- Lv, D.-K., Bai, X., Li, Y., Ding, X.-D., Ge, Y., Cai, H., Ji, W., Wu, N. and Zhu, Y.-M.** (2010). Profiling of cold-stress-responsive miRNAs in rice by microarrays. *Gene* **459**, 39–47. doi: 10.1016/j.gene.2010.03.011.
- Lynn, D. G., Steffens, J. C., Kamut, V. S., Graden, D. W., Shabanowitz, J. and Riopel, J. L.** (1981). Isolation and characterization of the first host recognition substance for parasitic angiosperms. *Journal of the American Chemical Society* **103**, 1868–1870. doi: 10.1021/ja00397a062.

## M

- Macías, F. A., García-Díaz, M. D., Pérez-de-Luque, A., Rubiales, D. and Galindo, J. C. G.** (2009). New Chemical Clues for Broomrape-Sunflower Host-Parasite Interactions: Synthesis of Guaianestrinolactones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 5853–5864. doi: 10.1021/jf900870j.
- Mallory, A. C. and Vaucheret, H.** (2006). Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nature Genetics* **38** Suppl, S31-36. doi: 10.1038/ng1791.
- Mallory, A. C., Bartel, D. P. and Bartel, B.** (2005). MicroRNA-Directed Regulation of Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17 Is Essential for Proper Development and Modulates Expression of Early Auxin Response Genes. *The Plant Cell* **17**, 1360–1375. doi: 10.1105/tpc.105.031716.
- Martin, R. C., Liu, P.-P., Goloviznina, N. A. and Nonogaki, H.** (2010a). microRNA, seeds, and Darwin?: diverse function of miRNA in seed biology and plant responses to stress. *Journal of Experimental Botany* **61**, 2229–2234. doi: 10.1093/jxb/erq063.
- Martin, R. C., Asahina, M., Liu, P.-P., Kristof, J. R., Coppersmith, J. L., Pluskota, W. E., Bassel, G. W., Goloviznina, N. A., Nguyen, T. T., Martínez-Andújar, C., Kumar, M. B. A., Pupel, P. and Nonogaki, H.** (2010b). The microRNA156 and microRNA172 gene regulation cascades at post-germinative stages in Arabidopsis. *Seed Science Research* **20**, 79–87. doi: 10.1017/S0960258510000085.
- Matusova, R., Rani, K., Verstappen, F. W. A., Franssen, M. C. R., Beale, M. H. and Bouwmeester, H. J.** (2005). The Strigolactone Germination Stimulants of the Plant-Parasitic Striga and Orobanche spp. Are Derived from the Carotenoid Pathway. *Plant Physiology* **139**, 920–934. doi: 10.1104/pp.105.061382.

- Matvienko, M., Wojtowicz, A., Wrobel, R., Jamison, D., Goldwasser, Y. and Yoder, J. I.** (2001a). Quinone oxidoreductase message levels are differentially regulated in parasitic and non-parasitic plants exposed to allelopathic quinones. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **25**, 375–387. doi: 10.1046/j.1365-313x.2001.00971.x.
- Matvienko, M., Torres, M. J. and Yoder, J. I.** (2001b). Transcriptional responses in the hemiparasitic plant *Triphysaria versicolor* to host plant signals. *Plant Physiology* **127**, 272–282. doi: 10.1104/pp.127.1.272.
- Megha, S., Basu, U. and Kav, N. N. V.** (2018). Regulation of low temperature stress in plants by microRNAs. *Plant, Cell & Environment* **41**, 1–15. doi: 10.1111/pce.12956.
- Mendoza, L. and Alvarez-Buylla, E. R.** (2000). Genetic regulation of root hair development in *Arabidopsis thaliana*: a network model. *Journal of Theoretical Biology* **204**, 311–326. doi: 10.1006/jtbi.2000.2014.
- Mishra, R., Mohapatra, R., Mahanty, B. and Joshi, R. K.** (2019). Analysis of microRNAs and their targets from onion (*Allium cepa*) using genome survey sequences (GSS) and expressed sequence tags (ESTs). *Bioinformatics* **15**, 907–917. doi: 10.6026/97320630015907.
- Mohamed, K. I., Papes, M., Williams, R., Benz, B. W. and Peterson, A. T.** (2006). Global invasive potential of 10 parasitic witchweeds and related Orobanchaceae. *Ambio* **35**, 281–288. doi: 10.1579/05-r-051r.1.
- Mu, J., Tan, H., Hong, S., Liang, Y. and Zuo, J.** (2013). Arabidopsis Transcription Factor Genes NF-YA1, 5, 6, and 9 Play Redundant Roles in Male Gametogenesis, Embryogenesis, and Seed Development. *Molecular Plant* **6**, 188–201. doi: 10.1093/mp/sss061.
- Muños, S., Pérez-Vich, B. and Gouzy, J.** (2015). Towards the genome sequence of *Orobanche cumana*. *13th World Congress on Parasitic Plants (2015)*.
- Musselman, L. J.** (1980). The Biology of Striga, Orobanche, and other Root-Parasitic Weeds. *Annual Review of Phytopathology* **18**, 463–489. doi: 10.1146/annurev.py.18.090180.002335.
- Musselman, L. J. and Dickison, W. C.** (1975). The structure and development of the haustorium in parasitic Scrophulariaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **70**, 183–212. doi: 10.1111/j.1095-8339.1975.tb01645.x.

## N

- Nag, A., King, S. and Jack, T.** (2009). miR319a targeting of TCP4 is critical for petal growth and development in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 22534–22539. doi: 10.1073/pnas.0908718106.
- Nagpal, P., Ellis, C. M., Weber, H., Ploense, S. E., Barkawi, L. S., Guilfoyle, T. J., Hagen, G., Alonso, J. M., Cohen, J. D., Farmer, E. E., Ecker, J. R. and Reed, J. W.** (2005). Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* **132**, 4107–4118. doi: 10.1242/dev.01955.

- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O. and Jones, J. D. G.** (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science (New York, N.Y.)* **312**, 436–439. doi: 10.1126/science.1126088.
- Nelson, D. C., Riseborough, J.-A., Flematti, G. R., Stevens, J., Ghisalberti, E. L., Dixon, K. W. and Smith, S. M.** (2009). Karrikins Discovered in Smoke Trigger Arabidopsis Seed Germination by a Mechanism Requiring Gibberellic Acid Synthesis and Light. *Plant Physiology* **149**, 863–873. doi: 10.1104/pp.108.131516.
- Ni, Z., Hu, Z., Jiang, Q. and Zhang, H.** (2013). GmNFYA3, a target gene of miR169, is a positive regulator of plant tolerance to drought stress. *Plant Molecular Biology* **82**, 113–129. doi: 10.1007/s11103-013-0040-5.
- Nickrent, D. L.** (2020). Parasitic angiosperms: How often and how many? *TAXON* **69**, 5–27. doi: 10.1002/tax.12195.
- Nickrent, D. L., Duff, R. J., Colwell, A. E., Wolfe, A. D., Young, N. D., Steiner, K. E. and dePamphilis, C. W.** (1998). Molecular Phylogenetic and Evolutionary Studies of Parasitic Plants. In *Molecular Systematics of Plants II*, pp. 211–241. Springer, Boston, MA doi: 10.1007/978-1-4615-5419-6\_8.
- Niu, L., Lou, F., Sun, Y., Sun, L., Cai, X., Liu, Z., Zhou, H., Wang, H., Wang, Z., Bai, J., Yin, Q., Zhang, J., Chen, L., Peng, D., Xu, Z., Gao, Y., Tang, S., Fan, L. and Wang, H.** (2020). A micropeptide encoded by lncRNA MIR155HG suppresses autoimmune inflammation via modulating antigen presentation. *Science Advances* **6(21)**, eaaz2059. doi: 10.1126/sciadv.aaz2059.
- Nodine, M. D. and Bartel, D. P.** (2010). MicroRNAs prevent precocious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis. *Genes & Development* **24**, 2678–2692. doi: 10.1101/gad.1986710.
- Nonogaki, H.** (2010). MicroRNA gene regulation cascades during early stages of plant development. *Plant & Cell Physiology* **51**, 1840–1846. doi: 10.1093/pcp/pcq154.

## O

- Olmstead, R. G., Pamphilis, C. W. de, Wolfe, A. D., Young, N. D., Elisons, W. J. and Reeves, P. A.** (2001). Disintegration of the Scrophulariaceae. *American Journal of Botany* **88**, 348–361. doi: 10.2307/2657024.
- Ori, N., Cohen, A. R., Etzioni, A., Brand, A., Yanai, O., Shleizer, S., Menda, N., Amsellem, Z., Efroni, I., Pekker, I., Alvarez, J. P., Blum, E., Zamir, D. and Eshed, Y.** (2007). Regulation of LANCEOLATE by miR319 is required for compound-leaf development in tomato. *Nature Genetics* **39**, 787–791. doi: 10.1038/ng2036.
- Ormancey, M., Le Ru, A., Duboé, C., Jin, H., Thuleau, P., Plaza, S. and Combier, J.-P.** (2020). Internalization of miPEP165a into Arabidopsis Roots Depends on Both Passive Diffusion and Endocytosis-Associated Processes. *International Journal of Molecular Sciences* **21(7)**, 2266. doi: 10.3390/ijms21072266.

## P

- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J. and Chen, X.** (2002). CARPEL FACTORY, a Dicer Homolog, and HEN1, a Novel Protein, Act in microRNA Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* **12**, 1484–1495. doi: 10.1016/S0960-9822(02)01017-5.
- Park, M. Y., Wu, G., Gonzalez-Sulser, A., Vaucheret, H. and Poethig, R. S.** (2005). Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 3691–3696. doi: 10.1073/pnas.0405570102.
- Parker, C.** (2009). Observations on the current status of *Orobanche* and *Striga* problems worldwide. *Pest Management Science* **65**, 453–459. doi: 10.1002/ps.1713.
- Parker, C.** (2012). Parasitic Weeds: A World Challenge. *Weed Science* **60**, 269–276. doi: 10.2307/41497634.
- Parker, C. and Riches, C. R.** (1993). Parasitic weeds of the world: biology and control. *Econ Bot* **48**, 332 (1994). <https://doi.org/10.1007/BF02862335>.
- Parry, G., Calderon-Villalobos, L. I., Prigge, M., Peret, B., Dharmasiri, S., Itoh, H., Lechner, E., Gray, W. M., Bennett, M. and Estelle, M.** (2009). Complex regulation of the TIR1/AFB family of auxin receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 22540–22545. doi: 10.1073/pnas.0911967106.
- Pérez-de-Luque, A., Galindo, J. C., Macías, F. A. and Jorrín, J.** (2000). Sunflower sesquiterpene lactone models induce *Orobanche cumana* seed germination. *Phytochemistry* **53**, 45–50. doi: 10.1016/s0031-9422(99)00485-9.
- Pérez-de-Luque, A., Jorrín, J. V. and Rubiales, D.** (2004). Crenate broomrape control in pea by foliar application of benzothiadiazole (BTH). *Phytoparasitica* **32**, 21. doi: 10.1007/BF02980855.
- Pérez-de-Luque, A., Rubiales, D., Cubero, J. I., Press, M. C., Scholes, J., Yoneyama, K., Takeuchi, Y., Plakhine, D. and Joel, D. M.** (2005). Interaction between *Orobanche crenata* and its Host Legumes: Unsuccessful Haustorial Penetration and Necrosis of the Developing Parasite. *Annals of Botany* **95**, 935–942. doi: 10.1093/aob/mci105.
- Pérez-de-Luque, A., Eizenberg, H., Grenz, J. H., Sillero, J. C., Ávila, C., Sauerborn, J. and Rubiales, D.** (2010). Broomrape management in faba bean. *Field Crops Research* **115**, 319–328. doi: 10.1016/j.fcr.2009.02.013.
- Péron, T., Candat, A., Montiel, G., Veronesi, C., Macherel, D., Delavault, P. and Simier, P.** (2017). New Insights into Phloem Unloading and Expression of Sucrose Transporters in Vegetative Sinks of the Parasitic Plant *Phelipanche ramosa* L. (Pomel). *Frontiers in Plant Science* **7**, 2048. doi: 10.3389/fpls.2016.02048.
- Perret, X., Staehelin, C. and Broughton, W. J.** (2000). Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**, 180–201.
- Pfaffl, M. W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**, e45.

- Pieterse, A. H. and Verkleij, J. A. C.** (1991). Genetic variability in *Orobanche* (broomrape) and *Striga* (witchweed) and its implications for host crop resistance breeding. In *Ecological responses to environmental stresses* (ed. Rozema, J. and Verkleij, J. A. C.), pp. 290–302. Springer Netherlands, Dordrecht doi: 10.1007/978-94-009-0599-3\_25.
- Piowarczyk, R., Mielczarek, Ł. and Guzikowski, S.** (2018). First Report of *Phytomyza orobanchia* (Diptera: Agromyzidae) from Poland and *Chymomyza amoena* (Diptera: Drosophilidae) on *Phelipanche ramosa* (Orobanchaceae). *Florida Entomologist* **101**, 540–542. doi: 10.1653/024.101.0333.
- Pointurier, O., Gibot-Leclerc, S., Corre, V. L., Reibel, C., Strbik, F. and Colbach, N.** (2019). Intraspecific seasonal variation of dormancy and mortality of *Phelipanche ramosa* seeds. *Weed Research* **59**, 407–418. doi: 10.1111/wre.12378.
- Pouvreau, J.-B., Gaudin, Z., Auger, B., Lechat, M.-M., Gauthier, M., Delavault, P. and Simier, P.** (2013). A high-throughput seed germination assay for root parasitic plants. *Plant Methods* **9**, 32. doi: 10.1186/1746-4811-9-32.
- Prigge, M. J., Otsuga, D., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Drews, G. N. and Clark, S. E.** (2005). Class III Homeodomain-Leucine Zipper Gene Family Members Have Overlapping, Antagonistic, and Distinct Roles in Arabidopsis Development. *The Plant Cell* **17**, 61–76. doi: 10.1105/tpc.104.026161.

## Q

- Qi, Y., Denli, A. M. and Hannon, G. J.** (2005). Biochemical specialization within Arabidopsis RNA silencing pathways. *Molecular Cell* **19**, 421–428. doi: 10.1016/j.molcel.2005.06.014.

## R

- Ransom, J. K.** (2000). Long-term approaches for the control of *Striga* in cereals: field management options. *Crop Protection* **19**, 759–763. doi: 10.1016/S0261-2194(00)00101-0.
- Raupp, F. M. and Spring, O.** (2013). New sesquiterpene lactones from sunflower root exudate as germination stimulants for *Orobanche cumana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**, 10481–10487. doi: 10.1021/jf402392e.
- Reinhart, B. J., Weinstein, E. G., Rhoades, M. W., Bartel, B. and Bartel, D. P.** (2002). MicroRNAs in plants. *Genes & Development* **16**, 1616–1626. doi: 10.1101/gad.1004402.
- Reyes, J. L. and Chua, N.-H.** (2007). ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **49**, 592–606. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02980.x.
- Rhoades, M. W., Reinhart, B. J., Lim, L. P., Burge, C. B., Bartel, B. and Bartel, D. P.** (2002). Prediction of plant microRNA targets. *Cell* **110**, 513–520. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00863-2.

- Rodrigues, A. S. and Miguel, C. M.** (2017). The pivotal role of small non-coding RNAs in the regulation of seed development. *Plant Cell Reports* **36**, 653–667. doi: 10.1007/s00299-017-2120-5.
- Rodriguez, R. E., Mecchia, M. A., Debernardi, J. M., Schommer, C., Weigel, D. and Palatnik, J. F.** (2010a). Control of cell proliferation in *Arabidopsis thaliana* by microRNA miR396. *Development (Cambridge, England)* **137**, 103–112. doi: 10.1242/dev.043067.
- Rodriguez, R. E., Schommer, C. and Palatnik, J. F.** (2016). Control of cell proliferation by microRNAs in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **34**, 68–76. doi: 10.1016/j.pbi.2016.10.003.
- Rogers, K. and Chen, X.** (2013). Biogenesis, Turnover, and Mode of Action of Plant MicroRNAs. *The Plant Cell* **25**, 2383–2399. doi: 10.1105/tpc.113.113159.
- Rubiales, D., Fernández-Aparicio, M., Wegmann, K. and Joel, D. M.** (2009). Revisiting strategies for reducing the seedbank of *Orobanche* and *Phelipanche* spp. *Weed Research* **49**, 23–33. doi: 10.1111/j.1365-3180.2009.00742.x.
- Ruiz, M. L. M., Delavault, P., Pérez-Vich, B., Joita, M. P., Bulos, M., Altieri, E. and Domínguez, J.** (2015). History of the race structure of *Orobanche cumana* and the breeding of sunflower for resistance to this parasitic weed: A review. *Spanish journal of agricultural research* **13**, 26. doi: 10.5424/sjar/2015134-8080.
- Ruyter-Spira, C., Al-Babili, S., van der Krol, S. and Bouwmeester, H.** (2013). The biology of strigolactones. *Trends in Plant Science* **18**, 72–83. doi: 10.1016/j.tplants.2012.10.003.

## S

- Sallé, G. and Aber, M.** (1986). Les Phanérogames parasites: biologie et stratégies de lutte. Bulletin de la Société Botanique de France. *Lettres Botaniques* **133**, 235–263. doi: 10.1080/01811797.1986.10824705.
- Sang, D., Chen, D., Liu, G., Liang, Y., Huang, L., Meng, X., Chu, J., Sun, X., Dong, G., Yuan, Y., Qian, Q., Li, J. and Wang, Y.** (2014). Strigolactones regulate rice tiller angle by attenuating shoot gravitropism through inhibiting auxin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 11199–11204. doi: 10.1073/pnas.1411859111.
- Sarvepalli, K. and Nath, U.** (2011). Hyper-activation of the TCP4 transcription factor in *Arabidopsis thaliana* accelerates multiple aspects of plant maturation. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **67**, 595–607. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04616.x.
- Sauerborn, J., Buschmann, H., Ghiasi, K. G. and Kogel, K.-H.** (2002). Benzothiadiazole Activates Resistance in Sunflower (*Helianthus annuus*) to the Root-Parasitic Weed *Orobanche cumana*. *Phytopathology* **92**, 59–64. doi: 10.1094/PHYTO.2002.92.1.59.
- Schaller, G. E., Bishopp, A. and Kieber, J. J.** (2015). The Yin-Yang of Hormones: Cytokinin and Auxin Interactions in Plant Development. *The Plant Cell* **27**, 44–63. doi: 10.1105/tpc.114.133595.

- Schneeweiss, G. M., Colwell, A., Park, J.-M., Jang, C.-G. and Stuessy, T. F.** (2004a). Phylogeny of holoparasitic Orobanche (Orobanchaceae) inferred from nuclear ITS sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **30**, 465–478. doi: 10.1016/s1055-7903(03)00210-0.
- Schneeweiss, G. M., Palomeque, T., Colwell, A. E. and Weiss-Schneeweiss, H.** (2004b). Chromosome numbers and karyotype evolution in holoparasitic Orobanche (Orobanchaceae) and related genera. *American Journal of Botany* **91**, 439–448. doi: 10.3732/ajb.91.3.439.
- Schommer, C., Debernardi, J. M., Bresso, E. G., Rodriguez, R. E. and Palatnik, J. F.** (2014). Repression of Cell Proliferation by miR319-Regulated TCP4. *Molecular Plant* **7**, 1533–1544. doi: 10.1093/mp/ssu084.
- Serghini, K., de Luque, A. P., Castejón-Muñoz, M., García-Torres, L. and Jorrín, J. V.** (2001). Sunflower (*Helianthus annuus* L.) response to broomrape (*Orobanche cernua* Loefl.) parasitism: induced synthesis and excretion of 7-hydroxylated simple coumarins. *Journal of Experimental Botany* **52**, 2227–2234. doi: 10.1093/jexbot/52.364.2227.
- Seto, Y., Sado, A., Asami, K., Hanada, A., Umehara, M., Akiyama, K. and Yamaguchi, S.** (2014). Carlactone is an endogenous biosynthetic precursor for strigolactones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 1640–1645. doi: 10.1073/pnas.1314805111.
- Sharma, A., Badola, P. K., Bhatia, C., Sharma, D. and Trivedi, P. K.** (2020). Primary transcript of miR858 encodes regulatory peptide and controls flavonoid biosynthesis and development in Arabidopsis. *Nature Plants* **6**, 1262–1274. doi: 10.1038/s41477-020-00769-x.
- Shu, K., Meng, Y. J., Shuai, H. W., Liu, W. G., Du, J. B., Liu, J. and Yang, W. Y.** (2015). Dormancy and germination: How does the crop seed decide? *Plant Biology* **17**, 1104–1112. doi: 10.1111/plb.12356.
- Shu, K., Liu, X., Xie, Q. and He, Z.** (2016). Two Faces of One Seed: Hormonal Regulation of Dormancy and Germination. *Molecular Plant* **9**, 34–45. doi: 10.1016/j.molp.2015.08.010.
- Siame, B. A., Weerasuriya, Yohan., Wood, Karl., Ejeta, Gebisa. and Butler, L. G.** (1993). Isolation of strigol, a germination stimulant for *Striga asiatica*, from host plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**, 1486–1491. doi: 10.1021/jf00033a025.
- Steffens, J. C., Lynn, D. G., Kamat, V. S. and Riopel, J. L.** (1982). Molecular Specificity of Haustorial Induction in *Agalinis purpurea* (L.) Raf. (Scrophulariaceae). *Annals of Botany* **50**, 1–7. doi: 10.1093/oxfordjournals.aob.a086332.
- Stief, A., Altmann, S., Hoffmann, K., Pant, B. D., Scheible, W.-R. and Bäurle, I.** (2014). Arabidopsis miR156 Regulates Tolerance to Recurring Environmental Stress through SPL Transcription Factors. *The Plant Cell* **26**, 1792–1807. doi: 10.1105/tpc.114.123851.
- Sun, X., Xu, L., Wang, Y., Yu, R., Zhu, X., Luo, X., Gong, Y., Wang, R., Limera, C., Zhang, K. and Liu, L.** (2015). Identification of novel and salt-responsive miRNAs to explore miRNA-mediated regulatory network of salt stress response in radish (*Raphanus sativus* L.). *BMC Genomics* **16**, 197. doi: 10.1186/s12864-015-1416-5.

## T

- Tadano, T. and Tanaka, A.** (1980). The effect of low phosphate concentrations in culture medium on early growth of several crop plants. *Japanese Journal of Soil Science and Plant Nutrition* **51**, 399–404.
- Takanashi, H., Sumiyoshi, H., Mogi, M., Hayashi, Y., Ohnishi, T. and Tsutsumi, N.** (2018). miRNAs control HAM1 functions at the single-cell-layer level and are essential for normal embryogenesis in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* **96**, 627–640. doi: 10.1007/s11103-018-0719-8.
- Tang, X., Bian, S., Tang, M., Lu, Q., Li, S., Liu, X., Tian, G., Nguyen, V., Tsang, E. W. T., Wang, A., Rothstein, S. J., Chen, X. and Cui, Y.** (2012). MicroRNA-Mediated Repression of the Seed Maturation Program during Vegetative Development in Arabidopsis. *PLOS Genetics* **8**, e1003091. doi: 10.1371/journal.pgen.1003091.
- Tank, D. C., Beardsley, P. M., Kelchner, S. A. and Olmstead, R. G.** (2006). Review of the systematics of Scrophulariaceae s.l. and their current disposition. *Australian Systematic Botany* **19**, 289–307. doi: 10.1071/SB05009.
- Thiebaut, F., Rojas, C. A., Almeida, K. L., Grativol, C., Domiciano, G. C., Lamb, C. R. C., Engler, J. de A., Hemerly, A. S. and Ferreira, P. C. G.** (2012). Regulation of miR319 during cold stress in sugarcane. *Plant, Cell & Environment* **35**, 502–512. doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02430.x.
- Tian, X., Song, L., Wang, Y., Jin, W., Tong, F. and Wu, F.** (2018). miR394 Acts as a Negative Regulator of Arabidopsis Resistance to *B. cinerea* Infection by Targeting LCR. *Frontiers in Plant Science* **9**, 903. doi: 10.3389/fpls.2018.00903.
- Tomilov, A. A., Tomilova, N. B., Abdallah, I. and Yoder, J. I.** (2005). Localized Hormone Fluxes and Early Haustorium Development in the Hemiparasitic Plant *Triphysaria versicolor*. *Plant Physiology* **138**, 1469–1480. doi: 10.1104/pp.104.057836.
- Turner, M., Nizampatnam, N. R., Baron, M., Coppin, S., Damodaran, S., Adhikari, S., Arunachalam, S. P., Yu, O. and Subramanian, S.** (2013). Ectopic Expression of miR160 Results in Auxin Hypersensitivity, Cytokinin Hyposensitivity, and Inhibition of Symbiotic Nodule Development in Soybean1. *Plant Physiology* **162**, 2042–2055. doi: 10.1104/pp.113.220699.

## U

- Umehara, M., Hanada, A., Yoshida, S., Akiyama, K., Arite, T., Takeda-Kamiya, N., Magome, H., Kamiya, Y., Shirasu, K., Yoneyama, K., Kyojuka, J. and Yamaguchi, S.** (2008). Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* **455**, 195–200. doi: 10.1038/nature07272.

## V

- Vaucheret, H., Mallory, A. C. and Bartel, D. P.** (2006). AGO1 Homeostasis Entails Coexpression of MIR168 and AGO1 and Preferential Stabilization of miR168 by AGO1. *Molecular cell* **22**, 129–136. doi: 10.1016/j.molcel.2006.03.011.

**Véronési, C., Delavault, P. and Simier, P.** (2009). Acibenzolar-S-methyl induces resistance in oilseed rape (*Brassica napus* L.) against branched broomrape (*Orobanche ramosa* L.). *Crop Protection* **28**, 104–108. doi: 10.1016/j.cropro.2008.08.014.

## W

**Wahid, F., Shehzad, A., Khan, T. and Kim, Y. Y.** (2010). MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1803**, 1231–1243. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.06.013.

**Wakatake, T., Yoshida, S. and Shirasu, K.** (2018). Induced cell fate transitions at multiple cell layers configure haustorium development in parasitic plants. *Development (Cambridge, England)* **145(14)**, dev164848. doi: 10.1242/dev.164848.

**Waldie, T., McCulloch, H. and Leyser, O.** (2014). Strigolactones and the control of plant development: lessons from shoot branching. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **79**, 607–622. doi: 10.1111/tpj.12488.

**Wang, J.-W., Wang, L.-J., Mao, Y.-B., Cai, W.-J., Xue, H.-W. and Chen, X.-Y.** (2005). Control of Root Cap Formation by MicroRNA-Targeted Auxin Response Factors in Arabidopsis. *The Plant Cell* **17**, 2204–2216. doi: 10.1105/tpc.105.033076.

**Wang, L., Gu, X., Xu, D., Wang, W., Wang, H., Zeng, M., Chang, Z., Huang, H. and Cui, X.** (2011). miR396-targeted AtGRF transcription factors are required for coordination of cell division and differentiation during leaf development in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **62**, 761–773. doi: 10.1093/jxb/erq307.

**Wang, Y., Sun, F., Cao, H., Peng, H., Ni, Z., Sun, Q. and Yao, Y.** (2012). TamiR159 directed wheat TaGAMYB cleavage and its involvement in anther development and heat response. *PloS One* **7**, e48445. doi: 10.1371/journal.pone.0048445.

**Wang, Y., Wang, L., Zou, Y., Chen, L., Cai, Z., Zhang, S., Zhao, F., Tian, Y., Jiang, Q., Ferguson, B. J., Gresshoff, P. M. and Li, X.** (2014). Soybean miR172c Targets the Repressive AP2 Transcription Factor NNC1 to Activate ENOD40 Expression and Regulate Nodule Initiation. *The Plant Cell* **26**, 4782–4801. doi: 10.1105/tpc.114.131607.

**Wang, Y., Li, K., Chen, L., Zou, Y., Liu, H., Tian, Y., Li, D., Wang, R., Zhao, F., Ferguson, B. J., Gresshoff, P. M. and Li, X.** (2015). MicroRNA167-Directed Regulation of the Auxin Response Factors GmARF8a and GmARF8b Is Required for Soybean Nodulation and Lateral Root Development. *Plant Physiology* **168**, 984–999. doi: 10.1104/pp.15.00265.

**Wang, J., Mei, J. and Ren, G.** (2019). Plant microRNAs: Biogenesis, Homeostasis, and Degradation. *Frontiers in Plant Science* **10**, 360. doi: 10.3389/fpls.2019.00360.

**Waterhouse, P. M. and Hellens, R. P.** (2015). Plant biology: Coding in non-coding RNAs. *Nature* **520**, 41–42. doi: 10.1038/nature14378.

**Waters, M. T., Gutjahr, C., Bennett, T. and Nelson, D. C.** (2017). Strigolactone Signaling and Evolution. *Annual Review of Plant Biology* **68**, 291–322. doi: 10.1146/annurev-arplant-042916-040925.

- Werner, T. and Schmülling, T.** (2009). Cytokinin action in plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 527–538. doi: 10.1016/j.pbi.2009.07.002.
- Werner, T., Motyka, V., Strnad, M. and Schmülling, T.** (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10487–10492. doi: 10.1073/pnas.171304098.
- Westwood, J. H.** (2013). The Physiology of the Established Parasite–Host Association. In *Parasitic Orobanchaceae: Parasitic Mechanisms and Control Strategies* (ed. Joel, D. M., Gressel, J., and Musselman, L. J.), pp. 87–114. Springer, Berlin, Heidelberg doi: 10.1007/978-3-642-38146-1\_6.
- Westwood, J. H., Yoder, J. I., Timko, M. P. and dePamphilis, C. W.** (2010). The evolution of parasitism in plants. *Trends in Plant Science* **15**, 227–235. doi: 10.1016/j.tplants.2010.01.004.
- Wigchert, S. C. M., Kuiper, E., Boelhouwer, G. J., Nefkens, G. H. L., Verkleij, J. A. C. and Zwanenburg, B.** (1999). Dose–Response of Seeds of the Parasitic Weeds Striga and Orobanche toward the Synthetic Germination Stimulants GR 24 and Nijmegen 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 1705–1710. doi: 10.1021/jf981006z.
- Wrobel, R. L. and Yoder, J. I.** (2001). Differential RNA expression of  $\alpha$ -expansin gene family members in the parasitic angiosperm *Triphysaria versicolor* (Scrophulariaceae). *Gene* **266**, 85–93. doi: 10.1016/S0378-1119(01)00376-6.
- Wu, G., Park, M. Y., Conway, S. R., Wang, J.-W., Weigel, D. and Poethig, R. S.** (2009). The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in Arabidopsis. *Cell* **138**, 750–759. doi: 10.1016/j.cell.2009.06.031.

## X

- Xian, Z., Huang, W., Yang, Y., Tang, N., Zhang, C., Ren, M. and Li, Z.** (2014). miR168 influences phase transition, leaf epinasty, and fruit development via SIAGO1s in tomato. *Journal of Experimental Botany* **65**, 6655–6666. doi: 10.1093/jxb/eru387.
- Xie, Z., Allen, E., Fahlgren, N., Calamar, A., Givan, S. A. and Carrington, J. C.** (2005). Expression of Arabidopsis MIRNA genes. *Plant Physiology* **138**, 2145–2154. doi: 10.1104/pp.105.062943.
- Xie, X., Yoneyama, K. and Yoneyama, K.** (2010). The strigolactone story. *Annual Review of Phytopathology* **48**, 93–117. doi: 10.1146/annurev-phyto-073009-114453.
- Xue, X.-Y., Zhao, B., Chao, L.-M., Chen, D.-Y., Cui, W.-R., Mao, Y.-B., Wang, L.-J. and Chen, X.-Y.** (2014). Interaction between Two Timing MicroRNAs Controls Trichome Distribution in Arabidopsis. *PLOS Genetics* **10**, e1004266. doi: 10.1371/journal.pgen.1004266.
- Xue, T., Liu, Z., Dai, X. and Xiang, F.** (2017). Primary root growth in *Arabidopsis thaliana* is inhibited by the miR159 mediated repression of MYB33, MYB65 and MYB101. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology* **262**, 182–189. doi: 10.1016/j.plantsci.2017.06.008.

## Y

- Yang, J. H., Han, S. J., Yoon, E. K. and Lee, W. S.** (2006a). 'Evidence of an auxin signal pathway, microRNA167-ARF8-GH3, and its response to exogenous auxin in cultured rice cells.' *Nucleic Acids Research* **34**, 1892–1899. doi: 10.1093/nar/gkl118.
- Yang, L., Liu, Z., Lu, F., Dong, A. and Huang, H.** (2006b). SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in Arabidopsis. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **47**, 841–850. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02835.x.
- Yang, L., Xu, M., Koo, Y., He, J. and Poethig, R. S.** (2013a). Sugar promotes vegetative phase change in Arabidopsis thaliana by repressing the expression of MIR156A and MIR156C. *eLife* **2**, e00260. doi: 10.7554/eLife.00260.
- Yang, C., Li, D., Mao, D., Liu, X., Ji, C., Li, X., Zhao, X., Cheng, Z., Chen, C. and Zhu, L.** (2013b). Overexpression of microRNA319 impacts leaf morphogenesis and leads to enhanced cold tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant, Cell & Environment* **36**, 2207–2218. doi: 10.1111/pce.12130.
- Yang, Z., Wafula, E. K., Honaas, L. A., Zhang, H., Das, M., Fernandez-Aparicio, M., Huang, K., Bandaranayake, P. C. G., Wu, B., Der, J. P., Clarke, C. R., Ralph, P. E., Landherr, L., Altman, N. S., Timko, M. P., Yoder, J. I., Westwood, J. H. and dePamphilis, C. W.** (2015). Comparative transcriptome analyses reveal core parasitism genes and suggest gene duplication and repurposing as sources of structural novelty. *Molecular Biology and Evolution* **32**, 767–790. doi: 10.1093/molbev/msu343.
- Yang, T., Wang, Y., Teotia, S., Wang, Z., Shi, C., Sun, H., Gu, Y., Zhang, Z. and Tang, G.** (2019). The interaction between miR160 and miR165/166 in the control of leaf development and drought tolerance in Arabidopsis. *Scientific Reports* **9**, 2832. doi: 10.1038/s41598-019-39397-7.
- Yoder, J. I.** (1999). Parasitic plant responses to host plant signals: a model for subterranean plant-plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 65–70. doi: 10.1016/s1369-5266(99)80013-2.
- Yoneyama, K.** (2020). Recent progress in the chemistry and biochemistry of strigolactones. *Journal of Pesticide Science* **45**, 45–53. doi: 10.1584/jpestics.D19-084.
- Yoneyama, K., Yoneyama, K., Takeuchi, Y. and Sekimoto, H.** (2007a). Phosphorus deficiency in red clover promotes exudation of orobanchol, the signal for mycorrhizal symbionts and germination stimulant for root parasites. *Planta* **225**, 1031–1038. doi: 10.1007/s00425-006-0410-1.
- Yoneyama, K., Xie, X., Kusumoto, D., Sekimoto, H., Sugimoto, Y., Takeuchi, Y. and Yoneyama, K.** (2007b). Nitrogen deficiency as well as phosphorus deficiency in sorghum promotes the production and exudation of 5-deoxystrigol, the host recognition signal for arbuscular mycorrhizal fungi and root parasites. *Planta* **227**, 125–132. doi: 10.1007/s00425-007-0600-5.

- Yoneyama, K., Xie, X., Sekimoto, H., Takeuchi, Y., Ogasawara, S., Akiyama, K., Hayashi, H. and Yoneyama, K.** (2008). Strigolactones, host recognition signals for root parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi, from Fabaceae plants. *The New Phytologist* **179**, 484–494. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02462.x.
- Yoneyama, K., Awad, A. A., Xie, X., Yoneyama, K. and Takeuchi, Y.** (2010). Strigolactones as Germination Stimulants for Root Parasitic Plants. *Plant and Cell Physiology* **51**, 1095–1103. doi: 10.1093/pcp/pcq055.
- Yoneyama, K., Xie, X., Kim, H. I., Kisugi, T., Nomura, T., Sekimoto, H., Yokota, T. and Yoneyama, K.** (2012). How do nitrogen and phosphorus deficiencies affect strigolactone production and exudation? *Planta* **235**, 1197–1207. doi: 10.1007/s00425-011-1568-8.
- Yoshida, S., Cui, S., Ichihashi, Y. and Shirasu, K.** (2016). The Haustorium, a Specialized Invasive Organ in Parasitic Plants. *Annual Review of Plant Biology* **67**, 643–667. doi: 10.1146/annurev-arplant-043015-111702.
- Yoshida, S., Kim, S., Wafula, E. K., Tanskanen, J., Kim, Y.-M., Honaas, L., Yang, Z., Spallek, T., Conn, C. E., Ichihashi, Y., Cheong, K., Cui, S., Der, J. P., Gundlach, H., Jiao, Y., Hori, C., Ishida, J. K., Kasahara, H., Kiba, T., Kim, M.-S., Koo, N., Laohavisit, A., Lee, Y.-H., Lumba, S., McCourt, P., Mortimer, J. C., Mutuku, J. M., Nomura, T., Sasaki-Sekimoto, Y., Seto, Y., Wang, Y., Wakatake, T., Sakakibara, H., Demura, T., Yamaguchi, S., Yoneyama, K., Manabe, R., Nelson, D. C., Schulman, A. H., Timko, M. P., dePamphilis, C. W., Choi, D. and Shirasu, K.** (2019). Genome Sequence of *Striga asiatica* Provides Insight into the Evolution of Plant Parasitism. *Current Biology* **29**, 3041-3052.e4. doi: 10.1016/j.cub.2019.07.086.
- Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R. W., Steward, R. and Chen, X.** (2005). Methylation as a Crucial Step in Plant microRNA Biogenesis. *Science (New York, N.Y.)* **307**, 932–935. doi: 10.1126/science.1107130.
- Yu, N., Cai, W.-J., Wang, S., Shan, C.-M., Wang, L.-J. and Chen, X.-Y.** (2010). Temporal control of trichome distribution by microRNA156-targeted SPL genes in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **22**, 2322–2335. doi: 10.1105/tpc.109.072579.
- Yu, S., Galvão, V. C., Zhang, Y.-C., Horrer, D., Zhang, T.-Q., Hao, Y.-H., Feng, Y.-Q., Wang, S., Schmid, M. and Wang, J.-W.** (2012). Gibberellin Regulates the *Arabidopsis* Floral Transition through miR156-Targeted SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE Transcription Factors. *The Plant Cell* **24**, 3320–3332. doi: 10.1105/tpc.112.101014.
- Yu, X., Hou, Y., Chen, W., Wang, S., Wang, P. and Qu, S.** (2017). *Malus hupehensis* miR168 Targets to ARGONAUTE1 and Contributes to the Resistance against *Botryosphaeria dothidea* Infection by Altering Defense Responses. *Plant & Cell Physiology* **58**, 1541–1557. doi: 10.1093/pcp/pcx080.

## Z

- Zhang, Y.** (2013). RNA-induced Silencing Complex (RISC). In *Encyclopedia of Systems Biology* (ed. Dubitzky, W., Wolkenhauer, O., Cho, K.-H., and Yokota, H.), pp. 1876–1876. Springer, New York, NY doi: 10.1007/978-1-4419-9863-7\_329.
- Zhang, B. H., Pan, X. P., Wang, Q. L., Cobb, G. P. and Anderson, T. A.** (2005). Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis. *Cell Research* **15**, 336–360. doi: 10.1038/sj.cr.7290302.
- Zhang, X., Zou, Z., Gong, P., Zhang, J., Ziaf, K., Li, H., Xiao, F. and Ye, Z.** (2011). Over-expression of microRNA169 confers enhanced drought tolerance to tomato. *Biotechnology Letters* **33**, 403–409. doi: 10.1007/s10529-010-0436-0.
- Zhang, X., Berkowitz, O., Teixeira da Silva, J. A., Zhang, M., Ma, G., Whelan, J. and Duan, J.** (2015). RNA-Seq analysis identifies key genes associated with haustorial development in the root hemiparasite *Santalum album*. *Frontiers in Plant Science* **6**, 661. doi: 10.3389/fpls.2015.00661.
- Zhang, Q. L., Su, L. Y., Zhang, S. T., Xu, X. P., Chen, X. H., Li, X., Jiang, M. Q., Huang, S. Q., Chen, Y. K., Zhang, Z. H., Lai, Z. X. and Lin, Y. L.** (2020a). Analyses of microRNA166 gene structure, expression, and function during the early stage of somatic embryogenesis in *Dimocarpus longan* Lour. *Plant physiology and biochemistry: PPB* **147**, 205–214. doi: 10.1016/j.plaphy.2019.12.014.
- Zhang, Y., Wang, D., Shen, Y. and Xi, Z.** (2020b). Crystal structure and biochemical characterization of *Striga hermonthica* HYPO-SENSITIVE TO LIGHT 8 (ShHTL8) in strigolactone signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **523**, 1040–1045. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.01.056.
- Zhou, Z., Sun, L., Zhao, Y., An, L., Yan, A., Meng, X. and Gan, Y.** (2013a). Zinc Finger Protein 6 (ZFP6) regulates trichome initiation by integrating gibberellin and cytokinin signaling in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **198**, 699–708. doi: <https://doi.org/10.1111/nph.12211>.
- Zhou, M., Li, D., Li, Z., Hu, Q., Yang, C., Zhu, L. and Luo, H.** (2013b). Constitutive Expression of a miR319 Gene Alters Plant Development and Enhances Salt and Drought Tolerance in Transgenic Creeping Bentgrass. *Plant Physiology* **161**, 1375–1391. doi: 10.1104/pp.112.208702.
- Zhou, Y., Honda, M., Zhu, H., Zhang, Z., Guo, X., Li, T., Li, Z., Peng, X., Nakajima, K., Duan, L. and Zhang, X.** (2015). Spatiotemporal sequestration of miR165/166 by *Arabidopsis* Argonaute10 promotes shoot apical meristem maintenance. *Cell Reports* **10**, 1819–1827. doi: 10.1016/j.celrep.2015.02.047.
- Zhu, H., Hu, F., Wang, R., Zhou, X., Sze, S.-H., Liou, L. W., Barefoot, A., Dickman, M. and Zhang, X.** (2011). *Arabidopsis* Argonaute 10 specifically sequesters miR166/165 to regulate shoot apical meristem development. *Cell* **145**, 242–256. doi: 10.1016/j.cell.2011.03.024.
- Zwanenburg, B., Mwakaboko, A. S., Reizelman, A., Anilkumar, G. and Sethumadhavan, D.** (2009). Structure and function of natural and synthetic signalling molecules in parasitic weed germination. *Pest Management Science* **65**, 478–491. doi: 10.1002/ps.1706.







**Titre :** Utilisation de miPEPs pour étudier et contrôler l'interaction *Orobanche cumana* – Tournesol

**Mots clés :** miPEP, miRNA, Régulation, Germination, Haustorium, Hormones

**Résumé :** Les orobanches sont des plantes parasites de grandes cultures qui peuvent entraîner une perte de rendement pouvant aller jusqu'à 100%. Il n'existe actuellement aucune méthode de lutte efficace et durable. La biologie des orobanches est complexe car elles ne peuvent se développer en l'absence d'un hôte. La présence de l'hôte va induire deux étapes clés de leur développement : la germination et l'haustoriogenèse. Ces processus biologiques sont induits par la perception de molécules exsudées dans la rhizosphère par les racines de l'hôte. Une meilleure compréhension de leur biologie particulière est un prérequis au développement de nouveaux moyens de lutte plus efficaces. La découverte d'une nouvelle classe de peptides régulateurs appelés miPEPs (mi-RNA encoded peptide) a ouvert de nouvelles perspectives d'étude de la biologie des orobanches, mais aussi de développement de nouveaux agents de biocontrôle. Ces miPEPs sont issus d'ORFs présents sur les précurseurs en amont des

séquences des miARNs. Ces miPEPs stimulent spécifiquement l'expression de leurs précurseurs et donc du miARN associé. Le suivi de l'expression des gènes cibles de miARNs à la suite d'un traitement avec le stimulant de germination *rac-GR24* a permis d'identifier les miARNs associés potentiellement impliqués dans la germination d'*O. cumana*. Il a été également montré que l'ajout de miPEPs d'*O. cumana* et de *P. ramosa* permet d'inhiber partiellement la germination et d'inhiber et/ou de stimuler la formation des haustoriums. La spécificité d'action de ces miPEPs sur l'expression des gènes cibles des miARNs associés a été mise en évidence par des tests de qRT-PCR à la suite d'un traitement avec des miPEPs. Enfin, deux miPEPs se révèlent être efficaces pour diminuer le nombre de fixations d'*O. cumana* sur le tournesol lorsqu'ils sont ajoutés à la solution d'arrosage, et sont donc de bons candidats pour être utilisés en tant qu'agent de biocontrôle de ces pathogènes.

**Title:** Use of miPEPs to study and control *Orobanche cumana* - Sunflower interaction

**Keywords:** miPEP, miRNA, Regulation, Germination, Haustorium, Hormones

**Abstract:** Broomrapes are parasitic plants of major field crops that can cause a yield loss of up to 100%. Currently, there is no effective and sustainable methods of control. The biology of broomrapes is complex because they cannot develop in the absence of a host. The host presence induces two key developmental stages which are germination and the formation of the haustorium. These biological processes are induced by the perception of molecules exuded in the rhizosphere by the roots of the host. A better understanding of their biology is required to develop new and more effective methods of control. The discovery of a new class of regulatory peptides called miPEPs (mi-RNA encoded peptides) has opened new perspectives for studying their biology, but also for the development of new biocontrol agents. These miPEPs are derived from ORFs present on miRNAs precursors, upstream of the miRNA sequence. These miPEPs specifically stimulate

the expression of their precursors and therefore of the associated miRNA. Monitoring the expression of miRNA target genes following treatment with the germination stimulant *rac-GR24* allowed the identification of associated miRNAs potentially involved in *O. cumana* germination. This work also shows that the addition of miPEPs of *O. cumana* and *P. ramosa* can partially inhibit germination and inhibit and/or stimulate the haustorium formation. The specificity of action of these miPEPs on the expression of miRNAs associated target genes was demonstrated by qRT-PCR experiments following miPEPs treatment. Finally, two miPEPs have been shown to be effective in reducing the number of *O. cumana* attachments on sunflowers when added to the irrigation solution and are therefore good candidates for use as a biocontrol agent for these pathogens.