



# THÈSE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITÉ DE RENNES

ÉCOLE DOCTORALE N° 600  
*Écologie, Géosciences, Agronomie, Alimentation*  
Spécialité : *Écologie et évolution*

Par

**Harriet MIDDLETON**

## Implication des microARNs dans la communication plante-microbiote rhizosphérique

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 7 Juillet 2023

Unité de recherche : ECOBIO UMR 6553 CNRS (Rennes, FRANCE) & Institut National de la Recherche Scientifique - mECO :labs (Laval, CANADA)

### Rapporteurs avant soutenance :

Florence WISNIEWSKI-DYE Professeure, Université de Lyon 1, FRANCE  
Feth el Zahar HAICHAR Professeure, INSA Lyon, FRANCE

### Composition du Jury :

Président :	Florence WISNIEWSKI-DYE	Professeure, Université de Lyon 1, FRANCE
Examineurs :	Feth el Zahar HAICHAR	Professeure, INSA Lyon, FRANCE
	Fabienne VAILLEAU	Directrice de Recherche, INRAe, LIPME, Castanet-Tolosan, FRANCE
Dir. de thèse :	Abdelhak EL AMRANI	Maître de conférence, ECOBIO CNRS, Université de Rennes, FRANCE
Co-dir. de thèse :	Étienne YERGEAU	Professeur, Institut National de la Recherche Scientifique, CANADA
Co-enc. de thèse :	Cécile MONARD	Chargée de Recherche, ECOBIO CNRS, Université de Rennes, FRANCE

### Invité(s) :

Jean-Philippe COMBIER Directeur de Recherche, CNRS, LRSV, Toulouse, FRANCE



# REMERCIEMENTS

---

Avant d'attaquer les choses sérieuses, je prendrai ces quelques lignes pour exprimer ma gratitude envers toutes les personnes qui ont permis, sans nécessairement le savoir, à cette thèse de voir le jour.

Merci . . .

A mes encadrants de thèse, Abdelhak, Cécile et Étienne. Pour m'avoir fait confiance sur ce projet excitant, pour m'avoir encadrée dans la sérénité le respect, la bonne humeur et l'optimisme. Vous avez su me guider malgré mon entêtement et mes désespoirs, tout en respectant mon autonomie et mes projets. Merci à Abdelhak, pour ton enthousiasme et ta motivation qui ont su me faire persister dans mes recherches. Merci à Cécile, pour ta bienveillance et ton soutien sans faille, à tous les égards. Merci à Étienne, pour ta générosité et ton accueil chaleureux. Vous avez formé un super trio, vous m'avez appris beaucoup scientifiquement, mais aussi humainement. Une thèse en cotutelle internationale pendant une pandémie, fallait y penser . . . et on l'a fait (sans faire exprès)! Vous m'avez beaucoup apporté, et j'espère être devenue une meilleure scientifique à vos côtés.

A mon jury de thèse. Aux examinateurs, pour avoir accepté de participer à ma soutenance et d'enrichir la discussion scientifique. Plus particulièrement, à mes rapportrices, Florence Wisniewski-Dyé et Feth el Zahar Haichar, qui ont consacré leur temps et leur énergie à améliorer ce manuscrit et à apporter une nouvelle vision sur mes travaux.

A tous les chercheurs et chercheuses qui ont participé aux divers examens et comités de suivi de thèse que j'ai réalisés ces dernières années. Aux membres de mon CSI, Cécile Thion, Hugues Renault, Achim Quaiser, et plus particulièrement, Jean-Philippe Combier, qui a activement participé à la réussite de mes expériences, de par son expertise et ses miPEPs. Aux membres de mon examen de synthèse, Philippe Constant et Terrence Hugh Bell, pour leurs encouragements et leur rigueur scientifique. Merci encore à Terrence pour m'avoir invitée à donner un séminaire à Penn State University, c'était très stimulant! Merci à Philippe pour ta motivation et pour avoir ensuite accepté de participer à mon examen de séminaire, aux côtés de Martin Filion.

A l'équipe pédagogique, à Rennes, avec qui j'ai fait mes premiers enseignements, en biologie végétale, en travaux pratiques, et puis, très vite en visio, à découper des fruits et

créer des quizz en ligne ! Merci à Cécile Meunier pour son engagement auprès des étudiants et sa volonté de changer l'enseignement.

A l'équipe « Apprentis Chercheurs » , à Laval (QC), pour m'avoir accepté dans ce programme, où j'ai pu partager ma passion pour la science et mon quotidien de doctorante avec de jeunes du secondaire.

A l'équipe « miARNs », les co-auteurs des travaux principaux de cette thèse, sans qui rien n'aurait été possible. Merci à Julien Tremblay et Emmanuel Clostres pour votre travail acharné pour créer notre outil de prédiction des cibles de miARNs. Merci à Virginie Daburon pour ton aide précieuse au laboratoire, ton énergie et ta motivation admirables. Merci à Christophe Penno et Davoud Farajzadeh pour vos discussions scientifiques. Aux personnes des plateformes techniques, la PEM, ECOGENO, MICRO et ECOCHIM. A Oscar pour m'avoir aidé avec mes innombrables tests d'extractions d'ARN. A Thierry et Rémi, des serres. Au staff qui m'a toujours sorti des abîmes de l'administration française. Notamment, merci à Bertrand pour ta bienveillance.

A toutes les personnes avec qui j'ai pu échanger à ECOBIO, à l'INRS, aux conférences et autres séminaires.

A toutes les personnes et à tous.tes les ami.e.s que j'ai rencontré lors de mon long séjour au Québec, à l'INRS et en dehors. Au labo Yergeau / mECO :LABS, merci pour votre accueil formidable, votre positivité et votre gentillesse. Merci pour tous ces coding/writing clubs, ces discussions, ces réunions pizza/beignes, cette semaine de « rédaction » au chalet, ces karaokés, ces entraînements sportifs au petit matin pour devenir des beasts ! Pour tous ces moments de partage et d'entraide, qui m'ont toujours donné envie d'aller au labo, même quand la motivation de travailler n'est pas là. Merci à Sara, Asmaâ, Numan, Chary, Rob, Mariane & surtout. . .

A mes exceptionnelles acolytes de jaseries, mes elfes de labo préférées, Jess & Emmy. Au-delà du super accueil, l'enthousiasme continuel et le soutien à tout égard, vous m'avez tout de suite inclus dans ce qui deviendra notre trio infernal ! Nos souffrances communes (expériences ratées + coach sportif EY), accompagnées de quelques litchi bombs et de beaucoup de cafés « spécial », nous ont soudées et une amitié sincère en est née. La vie au labo a été pimentée par nos discussions « dramas », basées sur des faits très peu scientifiques, et je suis encore persuadée qu'on pourrait en écrire une série. . . Merci les filles pour tous ces bons moments ! Je sais qu'on se reverra un jour et j'ai déjà hâte.

A la French Gang du Québec, Apolline, Carole, Vincent et Léo-Paul. Vous avez égayé nos soirées et nos weekends, passés au chalet, en randonnée, en escape game, aux soirées

jeux, au bar et au restaurant, en pique-nique, au Mondial de la bière, etc. . . Merci pour tous ces moments de déconnexion et de rigolade. Merci particulièrement à Ananas & Kiwi, pour votre soutien et votre amitié sans faille, sans qui notre salade de fruits ne serait pas complète. Vous êtes géniaux et j'espère que l'on se verra bientôt, au Québec, en Bretagne, en Savoie ou à la Réunion !

A toute la floppée de doctorant.e.s, docteur.e.s & autres spécimens de Rennes. Merci pour votre humour, vos anecdotes et votre légèreté qui ont toujours su égayer mes journées et faire relativiser mes problèmes au labo. Merci pour votre amitié, vos conseils et vos encouragements. Merci pour toutes ces soirées, ces weekends, ces discussions à refaire le monde. Vous êtes de vrais piliers (de bar). Merci au bureau des bioinfo, Morgane, Nathan & Ewen, pour votre accueil (non consenti), votre soutien quotidien et vos conversations inintelligibles. Merci à Thomas, Antoine, Sacha, Rémi, Solène, Léa, Benji, vos +1 : Ophélie, Juliette, Aline, etc. . . , voire vos +2 pour certains ! J'ai hâte que l'on vive tous ensemble dans notre éco-hameau, ça va être fantastique !

A tou.te.s mes ami.e.s, qui sans vraiment comprendre pourquoi j'étais encore et toujours en études, m'ont soutenue durant toute cette thèse, mais aussi depuis de nombreuses années. Merci à la bande du lycée, Gwénaëlle, Bastien, Titouan, Aurélie, Étienne et Raf. Malgré la distance temporelle ou physique, je vous retrouve toujours avec le même plaisir et c'est comme si rien n'avait changé. Merci à la bande du 44, Perrine, Arthur, Paul, Juliette, Angela, Charly, Julie, Barnabé, Benjamin, Sylvain, Solène. Merci pour toutes ces soirées et ces weekends qui m'ont forcée à me déconnecter de la thèse. Merci pour votre convivialité, votre spontanéité, votre humour et votre amitié. A Anne-So pour ta discussion enthousiasmante, ton engagement admirable, ton soutien pendant mon stage de M2 (merci à Eoghan, Adrian et toute l'équipe!) et pendant ma thèse, en France ou au Québec. A ma famille, surtout Mammouth, Lizzou, Bernie & Morgan, et ma belle-famille pour avoir été si encourageants, généreux, réconfortants, bienveillants et aimants. Les weekends, vacances et fêtes passés à vos côtés sont une bulle de sérénité merveilleuse.

A tous mes animaux, merci pour votre loyauté et votre en amour (envers les croquettes). A toutes les Arabidopsis que j'ai sacrifiées au cours des années (RIP).

A toi, qui est à mes côtés depuis maintenant plus de six ans, qui me supporte dans toutes mes couleurs, qui me fait grandir et apprécier la vie, tous les jours. A toi qui a traversé l'Atlantique pour me rejoindre dans l'aventure québécoise. Merci pour tous ces moments de vie, passés et à venir. Merci pour tout, Thomas.

Sans vous, ces années de thèse n'auront pas eu la même saveur. Je suis heureuse

---

d'avoir été autant soutenue et d'avoir pu partager cette aventure avec des personnes aussi formidables. Où que la vie me mène, ces dernières années m'ont forgée et les compétences acquises me serviront peu importe là où j'atterrirai.

Sur ce, je vous souhaite une bonne lecture!

# SOMMAIRE

---

<b>Introduction</b>	<b>11</b>
Contexte général . . . . .	11
1 Les interactions plante-microorganisme . . . . .	11
1.1 De quels microorganismes parle-t-on ? . . . . .	12
1.2 Les symbioses plante-microorganismes . . . . .	15
1.3 Communication bidirectionnelle entre la plante et les microorganismes, dans la rhizosphère . . . . .	22
1.4 Rôle des microorganismes dans le fonctionnement du sol et des plantes	26
1.5 Ingénierie du microbiote de la rhizosphère . . . . .	36
2 Le système plante, comme holobionte . . . . .	39
3 L'ARN comme langage . . . . .	41
3.1 Classification générale des ARNs chez les plantes . . . . .	41
3.2 Classification des petits ARNs non-codants chez les plantes . . . . .	42
3.3 Classification des petits ARNs non-codants chez les microorganismes	46
3.4 Les miPEPs, un outil d'ingénierie du microbiote ? . . . . .	53
3.5 Autres applications basées sur les miARNs . . . . .	56
Introduction spécifique à la thèse . . . . .	56
3.6 Article d'Opinion . . . . .	57
3.7 Hypothèse générale . . . . .	68
3.8 Structure et objectifs de la thèse . . . . .	68
<b>1 Découverte et exploration du rôle des microARNs dans la rhizosphère</b>	<b>71</b>
1 Présentation de l'article . . . . .	71
2 Introduction . . . . .	72
3 Matériel et méthodes . . . . .	74
4 Résultats . . . . .	81
5 Discussion . . . . .	89
6 Remerciements . . . . .	97
7 Extended Data . . . . .	98

8	Supplementary Information . . . . .	111
<b>2</b>	<b>Modification de la composition et de l'activité du microbiote rhizosphérique de <i>Arabidopsis thaliana</i> après application du miPEP159a, b et c</b>	<b>115</b>
1	Présentation de l'article . . . . .	115
2	Introduction . . . . .	116
3	Matériel et méthodes . . . . .	118
4	Résultats . . . . .	123
5	Discussion . . . . .	130
6	Remerciements . . . . .	134
7	Extended Data . . . . .	135
<b>3</b>	<b>Discussion générale</b>	<b>139</b>
1	miARNs dans la rhizosphère . . . . .	139
2	Échanges inter-règles de petits ARNs & mécanismes de ciblage . . . . .	144
3	Effets des miARNs rhizosphériques sur l'activité du microbiote . . . . .	147
4	Les miARNs structurent les communautés microbiennes dans la rhizosphère	151
5	Ingénierie du microbiote basée sur les miARNs et les miPEPs . . . . .	155
	<b>Conclusion</b>	<b>159</b>
	<b>Bibliographie</b>	<b>161</b>
	<b>Liste des figures</b>	<b>185</b>



# SOMMAIRE

---



# INTRODUCTION

---

## Contexte général

### 1 Les interactions plante-microorganisme

Souvent invisibles, méconnus et même redoutés, les microorganismes sont pourtant à la base de toute vie sur Terre. Littéralement, les premières traces de vie, retrouvées dans des stromatolithes fossilisés âgés d'environ 3,5 milliards d'années, sont celles de procaryotes, comme les cyanobactéries [1]. La photosynthèse oxygénique est ensuite apparue chez ces dernières, il y a environ 2,45 milliards d'années, contribuant grandement à la Grande Oxygénation, qui marque l'installation du dioxygène dans notre biosphère. Cette première crise écologique marque un tournant pour les organismes anaérobies qui ont dû s'adapter à ce nouvel élément atmosphérique, donnant naissance aux organismes aérobies. Par la suite, les premiers Eucaryotes auraient incorporé des protéobactéries aérobies, permettant l'utilisation d'oxygène pour survivre, qui ont persisté dans l'organisme, devenant les mitochondries actuelles. Un second évènement d'endosymbiose primaire a permis l'incorporation de cyanobactéries, devenant les chloroplastes actuels, créant ainsi les ancêtres des plantes et des algues. Depuis l'orée de la vie, les microorganismes ont ainsi une place primordiale dans notre biosphère, depuis la création jusqu'au maintien et à l'évolution de toutes les espèces animales, végétales, fongiques ou microbiennes.

Dans cette introduction, je propose un état de l'art autour de la vie microbienne associée aux plantes et la manière dont ces organismes communiquent entre eux. Puis, dans le contexte du 'système plante' comme holobionte, je présente une nouvelle voie possible d'échange entre vie végétale et microbienne à travers les microARNs. Cette ouverture est suivie d'une introduction plus spécifique sur la problématique, les hypothèses et objectifs de ma thèse.

## 1.1 De quels microorganismes parle-t-on ?

Les termes “microorganisme” ou “microbe” se réfèrent à tout organisme microscopique, comprenant ainsi une grande diversité taxonomique. Ces organismes font partie des trois domaines du vivant : les **Bactéries**, les **Archées** et les **Eucaryotes**. Les virus pourraient également être comptés parmi les microorganismes, mais en réalité, ceux-ci ne sont généralement pas considérés comme “vivants”, car ils ne peuvent se répliquer et avoir une activité métabolique qu’à l’intérieur d’une cellule hôte.

Les Procaryotes, ces microorganismes unicellulaires sans noyau, qui sont probablement à l’origine de la vie, évoluent depuis des milliards d’années donnant lieu à une diversité incroyable de microorganismes, dont les Bactéries et Archées actuels. Les Archées ont à la fois des caractéristiques proches des bactéries (absence de noyau et d’organites, ADN circulaire) et proches des eucaryotes (paroi cellulaire sans peptidoglycane, plusieurs ARN polymérase, la méthionine au début de tout peptide)[2]. Ceux-ci, à l’inverse des Bactéries, ne comportent aucune espèce pathogène pour les animaux et ont été initialement détectés dans des milieux extrêmes. En fait, les Archées sont relativement cosmopolites.

Les Bactéries peuvent être distinguées de par leur paroi cellulaire : les bactéries à Gram positif, qui possèdent une épaisse couche de peptidoglycane au-dessus de leur membrane plasmique, et les bactéries à Gram négatif, qui possèdent en plus une membrane externe et ont une plus fine couche de peptidoglycane.

Parmi les **bactéries à Gram positif**, on trouve de nombreuses espèces pathogènes comme *Bacillus anthracis* (causant l’anthrax), *Clostridium botulinum* (botulisme) ou les bactéries à coques que sont les *Staphylococcus* et *Streptococcus*[2]. Cependant, bon nombre de ces bactéries à Gram positif sont très utiles dans notre écosystème, notamment envers les plantes, comme les *Actinomycètes* (anciennement *Actinobactéries*) et les *Bacillota* (anciennement *Firmicutes*) [3].

Les **bactéries à Gram négatif** sont diverses et nombreuses. Les *Pseudomonadota*, par exemple, regroupent des espèces à la fois très liées aux Eucaryotes, comme les bactéries du genre *Rhizobium*, et des espèces autotrophes, comme la fameuse bactérie géante, *Thiomargarita namibiensis*, quasiment visible à l’œil nu (diamètre maximal observé de 0,75mm, Figure 1) [4]. Les Cyanobactéries sont également des bactéries à Gram négatif et sont capables de photosynthèse oxygénique.

Les **Eucaryotes microscopiques**, possédant donc un noyau et des organites, sont souvent moins connus que les bactéries ou les archées, mais font bien partie de ce que l’on appelle les microorganismes. D’ailleurs, lorsqu’on pense aux Eucaryotes, bien souvent,

on cite les Animaux, les Eumycètes (champignons) et les Plantes, alors qu'en réalité, la majorité des Eucaryotes sont des **Protistes**, qui sont majoritairement unicellulaires. Ce groupe polyphylétique contient une diversité de microorganismes, avec des modes de reproduction et de nutrition variés. Pour mettre en avant l'étendue des Protistes, en voici quelques exemples :

- les Kinétoplastidés, comme *Trypanosoma brucei*, transmis par la mouche tsé-tsé causant la maladie du sommeil ;
- les Apicomplexés, comme *Plasmodium falciparum*, causant le paludisme ;
- les Diatomées sont des algues unicellulaires particulièrement belles à observer au microscope ;
- les Oomycètes, comme *Phytophthora infestans*, qui cause le mildiou de la pomme de terre ;
- les Amibozoaires, comportant une grande variété d'amibes.

C'est, d'ailleurs, un Protiste aquatique unicellulaire et flagellé qui serait l'ancêtre des vrais champignons ou **Eumycètes**[2]. Ces derniers sont classifiés dans cinq grands phyla :

- les Chytridiomycètes : abondants dans les lacs et les sols, décomposeurs, parfois parasites, mais aussi mutualistes, possèdent des spores flagellés ;
- les Zygomycètes : moisissures communes sur le pain et certains fruits ;
- les Gloméromycètes : mycorhizes à arbuscules, en relation symbiotique avec plus de 70% des végétaux vasculaires[6] ; [7] ;
- les Ascomycètes : groupe le plus étendu avec une grande variété d'espèces, allant de la levure de boulangerie à des champignons complexes, comme les morilles ou les truffes. En symbiose avec des cyanobactéries/algues vertes formant les lichens. Production des spores dans des cellules reproductrices appelées "asques" ;
- les Basidiomycètes : étape de la reproduction dans des cellules spéciales appelées "basides", pouvant se trouver à la surface des lamelles sous le chapeau. Comporte les polypores et les vesses-de-loup, par exemple. Sont souvent des décomposeurs de végétaux.

Dans le cadre de cette thèse, les efforts sont d'abord concentrés sur les bactéries et les champignons associés aux plantes. Par la suite, la nouvelle voie de communication découverte sera centrée sur la relation plante-bactérie, s'agissant d'un domaine inexploré, tandis que l'étude sur des échanges similaires plante-champignon, hors rhizosphère, avait déjà commencé dans d'autres équipes de recherche.

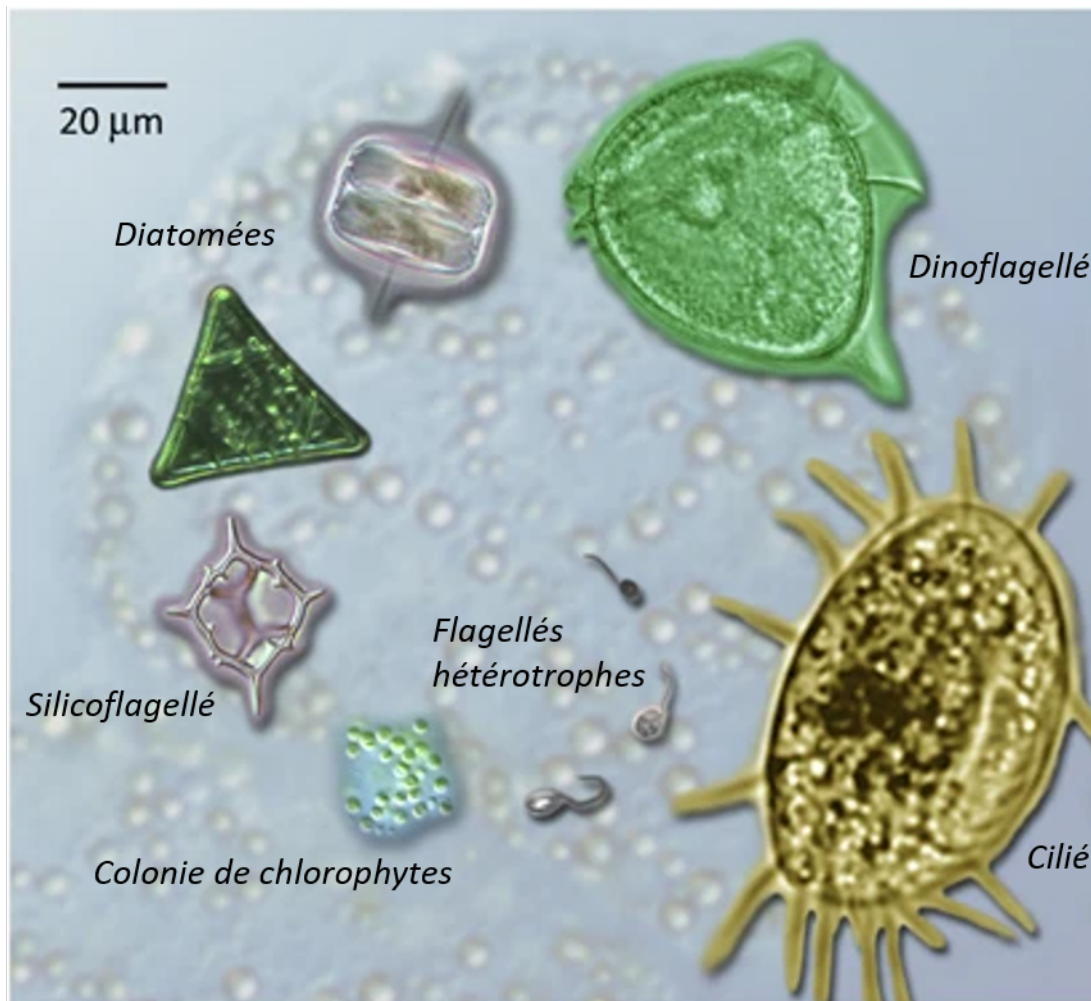


FIGURE 1 – La diversité de formes des protistes est montrée sur fond, à la même échelle, de la bactérie la plus large connue, *Thiomargarita namibiensis*. Figure adaptée de Caron, *et al.*, 2008 [5], un article de perspective questionnant le désintérêt de la recherche pour les protistes, au profit des autres microorganismes. Photographie de *T. namibiensis* par Heide Schulz-Vogt.

## 1.2 Les symbioses plante-microorganismes

Dans le langage courant, le terme “symbiose” se réfère souvent à une interaction entre deux individus engendrant un bénéfice pour les deux partis. L’étymologie du mot évoque le “vivre ensemble”, sans notion de gains. En réalité, une symbiose est une relation intime entre deux organismes, avec des conséquences positives ou négatives, voire sans conséquences. L’hôte de la symbiose est généralement celui qui produit des ressources d’intérêt et le symbionte ou symbiote est celui qui les consomme, en échange de services ou non. Parmi les types de symbioses, on peut en identifier trois majeures : le **mutualisme** qui sous-entend un bénéfice partagé par l’hôte et le symbionte, le **parasitisme** qui décrit une relation où le symbionte est bénéficiaire, mais l’hôte est impacté négativement, tandis que dans le **commensalisme** l’hôte ne subit pas de conséquences notables.

Cette classification traditionnelle est utile pour déterminer la nature d’une relation à un moment donné, mais elle ne tient pas compte des dynamiques relationnelles au cours du temps et des changements environnementaux. Les associations symbiotiques sont en réalité assez plastiques et sont régies par une balance des coûts et des bénéfices, dans des conditions données[8]. Un mutualiste peut devenir un parasite, et *vice-versa*, si un paramètre de la relation varie, comme l’apport en ressources de l’hôte, par exemple. La revue de Leung & Poulin [8] donne de nombreux cas de figures montrant la plasticité des modes symbiotiques et le risque associé à l’utilisation trop stricte de ces termes.

Les symbioses avec des microorganismes sont particulièrement répandues, puisque tous les êtres multicellulaires, dont font partie les animaux et les plantes, sont étroitement associés à un ensemble de microorganismes, qu’on appelle le **microbiote**. Celui-ci est composé de microorganismes, comme les champignons, bactéries et archées, qui, selon les conditions et l’équilibre entre les individus, sont en relation mutualiste, commensale ou parasitaire avec leur hôte.

Dans le monde végétal, les symbioses microbiennes sont étudiées depuis très longtemps et la compréhension du microbiote des plantes est devenue essentielle pour notre agriculture. L’existence même de ces microorganismes associés aux plantes a été suggérée dès la fin du 19ème siècle par le scientifique Beijerinck qui découvrit *Bacterium radicicola*, une bactérie fixatrice d’azote, vivant dans les racines des légumineuses[9]. Les bactéries fixatrices d’azote atmosphérique comme celles du genre *Rhizobium* ont fait l’objet de centaines de publications et sont probablement parmi les microorganismes dit “bénéfiques”, les plus étudiés. Parfois, les Rhizobia parasitent les racines de la plante sans apporter d’azote : c’est le cas des interactions dites “incompatibles”, il s’agit de bactéries qui n’ont

pas pu développer leur association avec la plante, qui peuvent alors switcher entre mutualiste ou parasitaire [10]. Cette incompatibilité serait due à la réaction immunitaire de la plante.



**Et nos symbiotes ?**

Le microbiote humain a fait l'objet de nombreuses études durant les 20 dernières années. Le consortium du "Integrative Human Microbiome Project", démarré en 2007, a pu mettre en lumière toute l'importance d'étudier nos divers microbiotes (nasaux, oraux, intestinaux, vaginaux, épidermiques) en conditions saines ou particulières (maladies inflammatoires de l'intestin, diabète, naissance prématurée)[11]. Leur conclusion générale fut la suivante : chaque être humain a un microbiote qui lui est particulier dont les microorganismes ont été acquis très tôt et qui varient selon l'environnement et les populations. Ce microbiote peut persister, tout comme il peut être rapidement modifié[11]. Pendant longtemps, il était admis que notre corps était constitué de dix fois plus de cellules bactériennes que de cellules humaines, exacerbant l'importance de notre microbiote et remettant en question la définition philosophique de notre identité humaine. Cependant, en 2016, une équipe israélo-canadienne a mis à jour le calcul de ce ratio, en prenant en compte les cellules humaines non-nucléées que sont nos érythrocytes, et a conclu que nous avons environ le même nombre de cellules humaines et de cellules bactériennes[12]. Ces conclusions ne remettent pas en cause l'importance de nos symbiotes bactériens et, d'ailleurs, ces calculs omettent les virus, les phages, les champignons et les archées qui font partie intégrante de notre microbiote. Hormis les conclusions citées plus haut, le Integrative Human Microbiome Project a montré que la composition taxonomique du microbiote est moins corrélée au phénotype de l'hôte, que l'abondance d'une fonction microbienne ou d'une souche spécifique[11]. D'ailleurs, le nombre de gènes bactériens dans l'intestin est estimé 100 fois plus élevé que le nombre de gènes humains[13], donnant une certaine supériorité fonctionnelle au microbiote. Cela pourrait suggérer qu'un même symbiote pourrait être en relation mutualiste, commensale ou parasitaire, dépendamment du contexte et de l'activation de certaines fonctions, dans ce contexte.

Ainsi, tout au long de leur vie, les plantes sont en contact rapproché avec des microorganismes, à travers diverses relations symbiotiques. Elles peuvent les acquérir de trois façons (Figure 2) : (i) les endophytes sont transmis par la **plante mère** à la graine, via la transmission verticale ; (ii) des microorganismes **d'origine florale, foliaire ou des fruits** peuvent être transmis à la graine ; (iii) des microorganismes **du sol**[14]. Lorsque la graine germe et que la plantule se développe, les communautés microbiennes associées vont s'adapter selon les conditions environnementales et diverger selon l'habitat spécifique au sein de la plante. Les microorganismes sont amenés à vivre dans les tissus de la plante, à sa surface ou libres, comme dans la rhizosphère. Ce microbiote est ensuite modulé tout au long de la vie végétale pour s'adapter aux changements biotiques et abiotiques.

Parmi les habitats microbiens dans la plante (Figure 3), il y a la **phyllosphère** : il s'agit des surfaces foliaires de la plante, majoritairement colonisées par des bactéries[16]. Ces microorganismes peuvent être accrochés à la surface ou bien à l'intérieur de la plante, on dit qu'ils sont, respectivement, "ectophytiques" ou "endophytiques"[17]. Chez *Arabidopsis thaliana*, une étude a montré que les communautés microbiennes ectophytiques étaient moins diversifiées que les endophytiques[17]. Dans cette même étude, les auteurs suggèrent que certains microorganismes endophytiques foliaires peuvent être originaires des compartiments endophytiques racinaires et donc potentiellement du sol.

Concernant les parties aériennes de la plante, on pourrait également s'intéresser aux organes reproducteurs, comme les fleurs (**anthosphère**) ou les fruits (**carposphère**), mais le microbiote de ces derniers reste moins étudié, malgré leur intérêt au vu de la transmission du microbiote de ces organes vers la graine[14]. Récemment, il a été proposé que les microbes de l'anthosphère pourraient jouer un rôle important dans l'évolution des fleurs et donc dans la reproduction des Angiospermes[18]. Le microbiote des tiges (**caulosphère**) n'est que très peu étudié, également.

Parmi les habitats souterrains, on peut distinguer 3 lieux de vie microbienne distincts (Figure 4) : l'intérieur des racines (l'endosphère racinaire), la surface des racines (le rhizoplane) et la portion de sol autour des racines sous une forte influence de la plante (la rhizosphère).

Les communautés microbiennes de l'**endosphère racinaire** divergent de celles retrouvées dans le sol ou dans la rhizosphère. Chez *A. thaliana*, elles sont moins diversifiées et sont enrichies en taxons particuliers, comme les *Actinomycètes*, les *Pseudomonadota* et les *Bacillota*[19]. L'endosphère est typiquement dominée par les familles suivantes : *Streptomycetaceae*, *Rhizobiaceae*, *Methylobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, et *Moraxellaceae*, qui

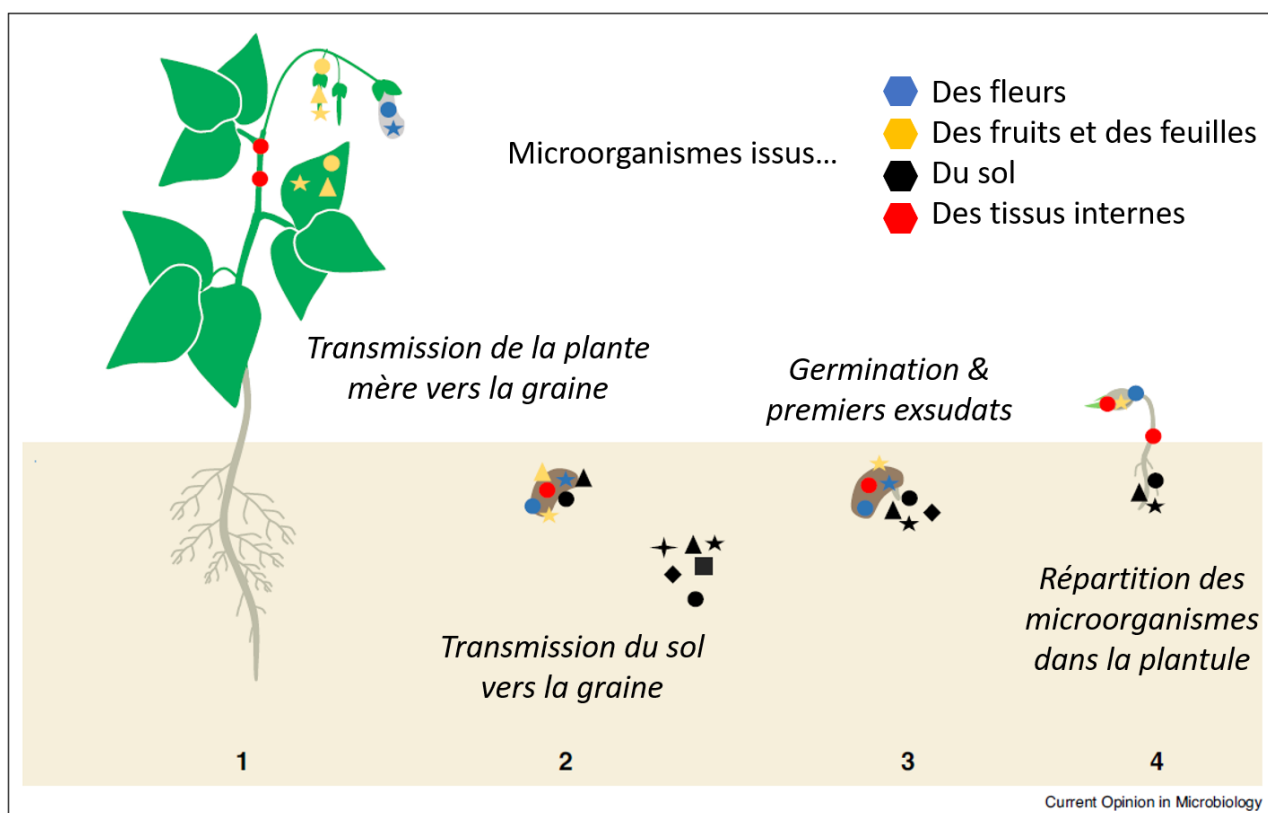


FIGURE 2 – Modes d'acquisition des microorganismes de la plante. (1) et (2) La graine reçoit des membres du microbiote de la plante mère, issus de ses fleurs, ses fruits, ses feuilles ou ses tissus internes (les endophytes). Lorsque la graine tombe de la plante, elle acquiert des microorganismes du sol. (3) Lors de la germination, la graine produit ses premiers exsudats qui commencent à modifier son microbiote. (4) Lorsque la plantule se développe, les microorganismes se répartissent dans ses tissus. Ceux venant de la mère tendent à rester dans la phyllosphère, tandis que ceux du sol restent dans la rhizosphère. Figure adaptée de Shade, *et al.*, 2017 [14].

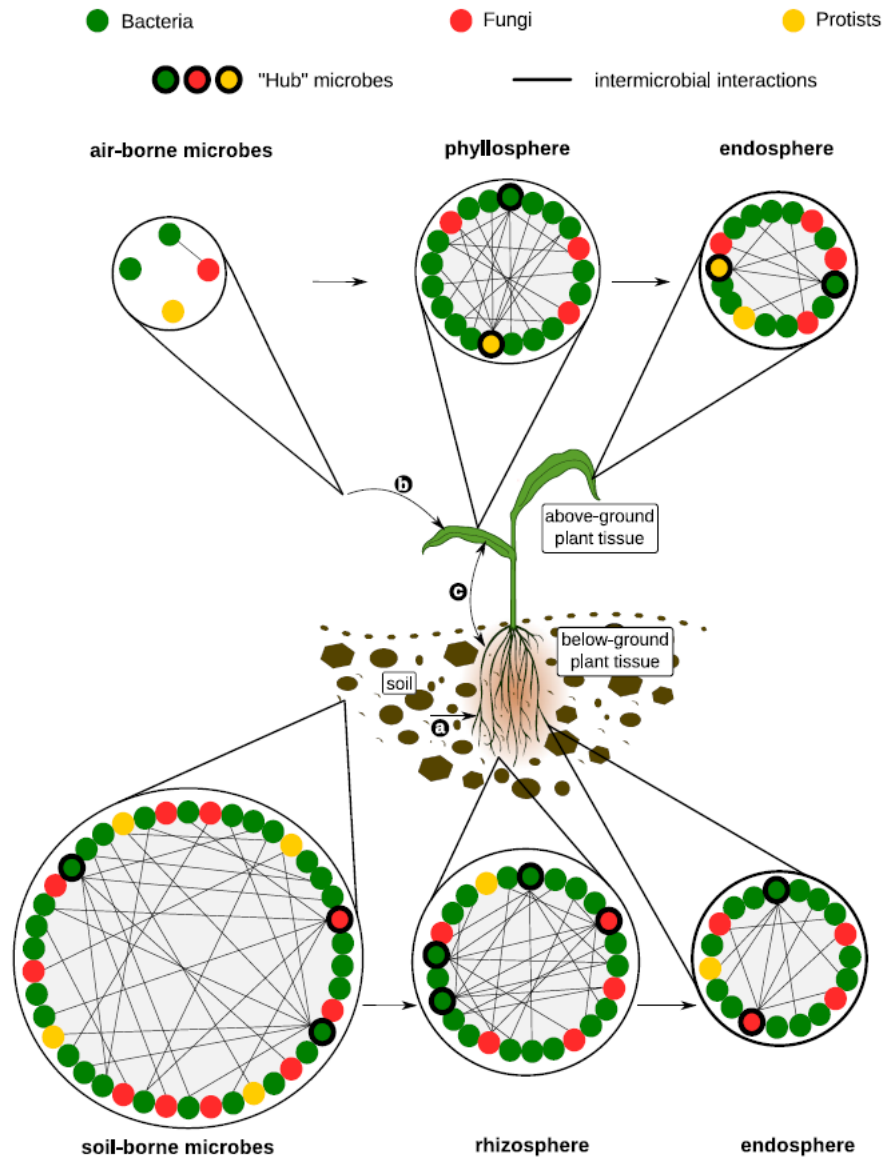


FIGURE 3 – Représentation des habitats microbiens associés à la plante et des interactions entre microorganismes. Chaque interaction, positive ou négative, est imitée par un trait. Les microorganismes dits “hub” (encerclés en gras), ont beaucoup d’interactions avec la communauté et ont une influence structuratrice importante. Les origines majeures des membres de chaque habitat sont schématisés : (a) les microorganismes associés aux racines proviennent du sol ; (b) ceux de la phyllosphère, de l’air ; et (c) des échanges entre le microbiote du système aérien et souterrain sont possibles. Figure tirée de Hassani, *et al.*, 2018 [15].

sont soit capables de produire des métabolites antimicrobiens soit sont des promoteurs de la croissance des plantes[19]. Cela pourrait expliquer leur présence “exclusive” dans les tissus internes des racines d’*A. thaliana*. Côté champignon, la majorité des plantes terrestres abrite, dans leurs racines, des mycorhizes à arbuscules (“arbuscular mycorrhizal fungi” ou AMF, en anglais). Ces Gloméromycètes symbiotiques améliorent la nutrition minérale des plantes, leur capacité photosynthétique, leur croissance, leur tolérance au stress biotique et abiotique[20].

Avant de pouvoir pénétrer les tissus internes de la racine, le microorganisme doit passer par le **rhizoplan**[21] ; [22], qui comporte lui aussi son propre microbiote. Ce dernier est difficile à déterminer, car la limite entre le rhizoplan et la rhizosphère n’est pas distinctive. Cependant, on peut noter la présence d’ectomycorhizes (EcMs)[22]. Ce sont des champignons épiphytes des racines, formant un manteau et un réseau de Hartig, qui sont des réseaux d’hyphes intercellulaires[6]. Ce filet permet le transfert de nutriments entre l’EcM et la plante mycorhizée, comme les eucalyptus, les bouleaux, les peupliers, les chênes et les hêtres[23]. Un exemple parlant d’EcM sont les Ascomycètes du genre *Tuber*, qui forment les truffes que nous consommons, souvent associés aux chênes ou aux noisetiers.

La **rhizosphère** est définie par le sol sous l’influence forte de la plante *via* ses racines, celles-ci relâchent des molécules carbonées, mais aussi des composés antimicrobiens, structurant profondément les communautés microbiennes rhizosphériques. Celles-ci sont plus diversifiées que les communautés endophytes qui sont sélectionnées davantage[17], mais moins riches que celles d’un sol sans plante[21] qui subissent moins de forces sélectives. Le microbiote rhizosphérique comporte les espèces sources pour la constitution de la communauté endosphérique racinaire et on peut observer un gradient décroissant de diversité allant du sol brut vers l’intérieur des racines[19]. Cependant, le microbiote rhizosphérique est plus dense, en termes de quantités de microorganismes, par rapport au microbiote du sol : en effet, les molécules carbonées relâchées par la plante permettent une meilleure croissance microbienne que dans le sol brut, où les ressources sont moindres[24]. Il s’agit de “l’effet rhizosphère”. Celui-ci impacte la composition du microbiote rhizosphérique et est décrit comme plus “fort” chez certaines plantes, signifiant un microbiote bien distinct du sol brut [25].

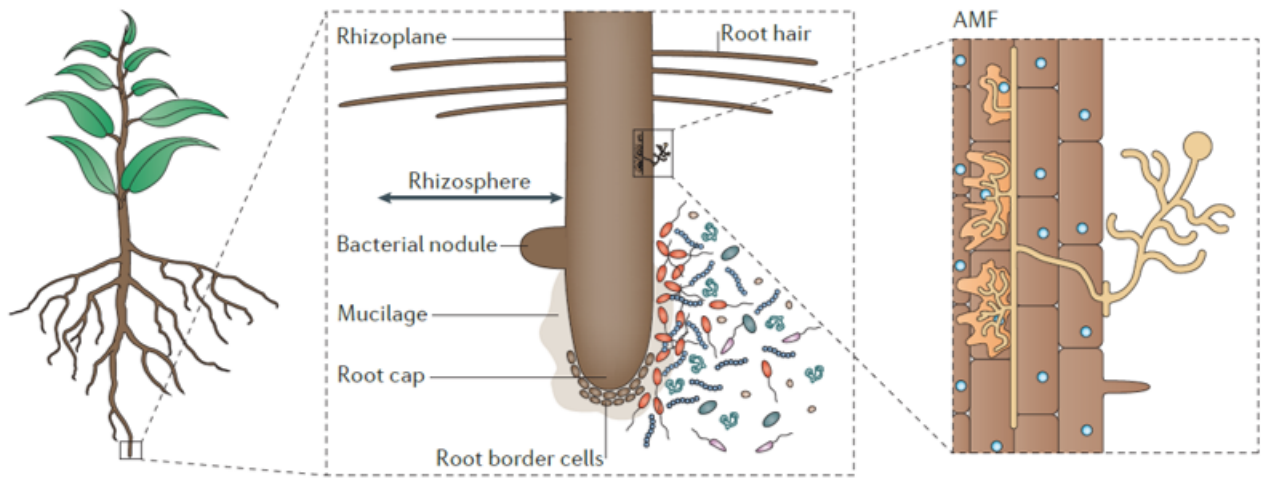


FIGURE 4 – Attirés par les exsudats racinaires, dont ceux produits par les cellules bordantes, et capturés dans le mucilage, les bactéries et champignons forment le microbiote rhizosphérique. Dans l’endosphère, un focus est réalisé sur les AMF (arbuscular mycorrhizal fungi) dont on voit la pénétration par les hyphes fongiques des embranchements intra-cellulaires. Figure tirée de Philippot, *et al.*, 2013 [26].

### 1.3 Communication bidirectionnelle entre la plante et les microorganismes, dans la rhizosphère

La communication peut se définir par un ensemble de mécanismes permettant la transmission d’une ou plusieurs information(s). La communication entre la plante et les microorganismes de la rhizosphère est particulièrement sophistiquée de par le nombre élevé d’échanges inter- et intra-espèces, mais également inter-règnes, autour des racines.

Ces échanges se font en divers contextes (Figure 5) : recrutement de microorganismes d’intérêt, inhibition de microorganismes indésirables, modulation de la composition générale ou de l’activité du microbiote [27]. La sélection de microorganismes avantageux se fait *via* des **exsudats racinaires**, qui sont de natures variées. Il peut s’agir d’exométabolites racinaires, comme des **sucres**, des **acides aminés**, des **acides organiques**, des **peptides**, des **acides nucléiques** ou des **métabolites secondaires**, qui servent de nutriments ou de signaux envers les communautés microbiennes environnantes [25] ; [27]. La qualité de ses exométabolites engendre une régulation préférentielle du microbiote. Les molécules nutritives stimulent le microbiote dans son ensemble, tandis que les signaux chimiques permettent le recrutement spécifique de certains microorganismes.

Ces échanges spécifiques s’illustrent par le cas des symbioses mutualistes présentées

ci-après, où des échanges entre la plante et le symbionte s'enchaînent dans un ordre déterminé. Par exemple, les légumineuses exsudent des flavonoïdes qui sont perçus par des *Rhizobia* qui vont à leur tour produire des facteurs Nod, initiant une cascade de réactions chez la plante, permettant la genèse de nodules racinaires [10]; [25]; [27]. Un autre exemple est celui des AMF, les plantes émettent des strigolactones et des monomères de cutine, perçus par les Gloméromycètes qui relâchent alors des facteurs Myc, entraînant des cascades de réaction (similaires aux facteurs Nod) et la formation des arbuscules dans les cellules racinaires [25]; [27]. Les échanges plante-microorganismes se poursuivent tout au long de la symbiose : de l'initiation à la persistance dans l'hôte [10].

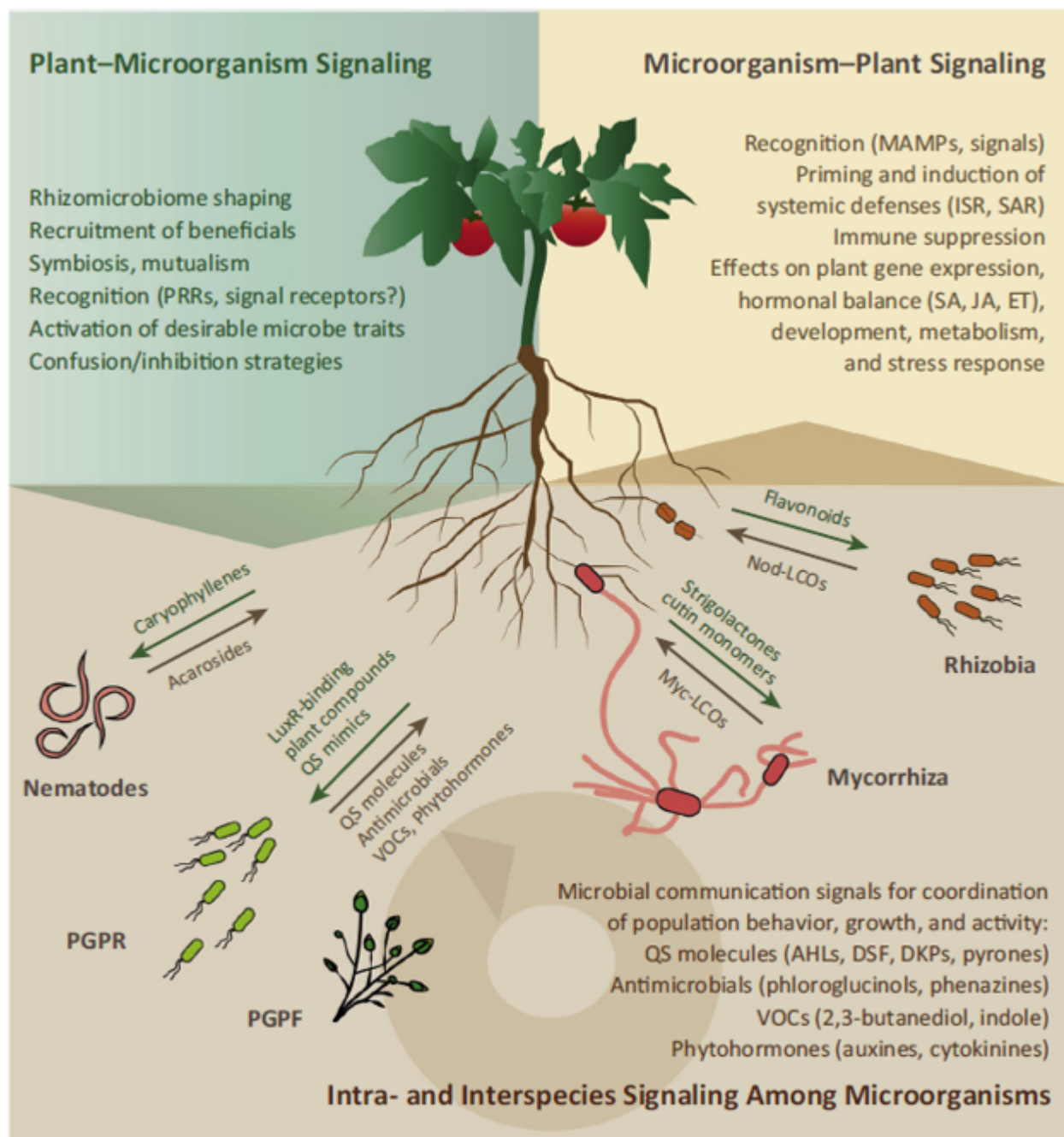
Le microbiote rhizosphérique est également structuré par le mucilage et des molécules spécifiques produites par les cellules bordantes, qui se détachent de l'apex racinaire [25]. Ces exsudats racinaires sont hautement variables et spécifiques au génotype de la plante, à son niveau de domestication ou même à son stade de développement. Par exemple, le lotus et le maïs provoquent un effet rhizosphère plus important qu'*Arabidopsis*, reflétant une composition des exsudats distincte selon l'espèce [25]. La communication plante-microorganisme évolue au fil de l'interaction pour adapter son microbiote, selon les conditions environnementales subies. Dans certaines conditions, notamment de stress biotique ou abiotique, les plantes peuvent changer les quantités de certains acides aminés ou sucres relâchés [25] et produire des molécules à faible teneur en carbone, qui constituent des pré-curseurs pour la synthèse de phytohormones par les microorganismes bénéfiques [28].

Dans un contexte d'inhibition de microorganismes indésirables, les plantes utilisent des stratégies directes et indirectes pour limiter la propagation d'un pathogène microbien. La méthode indirecte consiste à recruter des microorganismes commensaux ou bénéfiques avec des capacités de biocontrôle, pour réguler la population non-désirée. Le biocontrôle entre microorganismes de la rhizosphère est discuté plus loin dans cette Introduction. La méthode directe consiste à sécréter des exométabolites dans la rhizosphère qui vont directement affecter l'écosystème microbien [29]. Par exemple, certaines plantes peuvent perturber les bactéries de la rhizosphère, en produisant soit des molécules inhibitrices de quorum-sensing (QS) soit des molécules imitant celles du QS [30]. Autrement, les plantes empêchent la croissance de certains microorganismes en relâchant des composés antimicrobiens, comme les phénylpropanoïdes et les terpénoïdes, soit directement par les racines soit par leurs cellules bordantes [29].

La plante n'est pas la seule actrice de ses symbioses avec les microorganismes du sol, ces derniers communiquent également entre eux et avec l'hôte. Les microorganismes

produisent une diversité de signaux dans le sol pour coordonner leur croissance et leur activité, comme les molécules de QS, des composés antimicrobiens, des composés organiques volatiles (VOCs) ou des phytohormones [27]. Ces mêmes molécules sont perceptibles par la plante et peuvent avoir des effets importants sur son phénotype : par exemple, les composés antimicrobiens d'origine bactérienne stimulent la défense des plantes en modulant leurs voies hormonales et les VOCs microbiens peuvent également induire une résistance et promouvoir la croissance végétale [28]. Les homologues microbiens des phytohormones, ressemblant aux auxines, gibbérellines et cytokinines, affectent la croissance, le développement des organes, les réponses immunitaires et les signaux hormonaux chez la plante [27]. Au sein de la rhizosphère, une communication bidirectionnelle et inter-règne constante entre la plante et les microorganismes se déroule, afin de coordonner l'hobionte de manière homogène. Il est fascinant de constater que des signaux échangés entre microorganismes (QS, antimicrobiens, VOCs) sont perçus et même imités par les plantes et vice-versa (phytohormones). Il peut s'agir du résultat d'une co-évolution longue et intime durant laquelle les microorganismes ont appris à diriger leur hôte ou, à l'inverse, les plantes ont découvert comment percevoir la communication microbienne dans la rhizosphère [27]. *In fine*, les plantes communiquent avec les microorganismes de la rhizosphère à travers des signaux divers et variés afin de moduler la composition et l'activité des communautés microbiennes qui les entourent.





Trends in Plant Science

FIGURE 5 – Illustration de la diversité des molécules signal utilisées dans les interactions plante-microorganismes, mais également microorganisme-microorganisme, dans la rhizosphère. Ces molécules servent de multiples fonctions, comme l'établissement de symbioses, la défense contre un pathogène ou la coordination de population, dans le cas des bactéries. Ces échanges mettent en évidence un canal bidirectionnel de communication entre la plante et son microbiote, ajouté aux interactions inter-microbiennes. Figure tirée de la revue Venturi & Keels, 2016 [27].

**Déceler la menace microbienne**

Mais comment les plantes distinguent-elles les microorganismes potentiellement bénéfiques de ceux potentiellement pathogènes ? Initialement, il semblerait que les plantes ne fassent pas la distinction : tout microorganisme tentant d'entrer en ses tissus est un objet étranger. Les microbes bénéfiques ou pathogènes sont tous deux reconnus par leurs MAMPs ou PAMPs (Microbe- ou Pathogen-Associated Molecular Patterns), comme la chitine, les peptidoglycans, LPS, le facteur d'élongation Tu ou la flagelline [31]. Ces MAMPs sont perçus par des récepteurs PRR (Pattern-Recognition Receptors) dans les membranes des cellules végétales. Lors de la perception d'un MAMP, une réaction immunitaire est enclenchée, engendrant une accumulation de ROS (Reactive Oxygen Species) et une activation de gènes liés à la défense. Mais tout comme les pathogènes, les microorganismes mutualistes évoluent pour réduire ou outrepasser les défenses végétales [31]. Concernant l'interaction légumineuse-*Rhizobium*, il y a deux modèles proposés quant à la perception initiale de la plante (Figure 6) : (i) réponse de défense modérée et transitoire ou (ii) pas de réponse de défense, dans le cas des interactions compatibles[10]. L'intensité de la réponse immunitaire semble moduler l'activité mutualiste des *Rhizobia* et leur établissement au sein de nodules. Le non-consensus à propos d'une interaction plante-microbe parmi les plus étudiées montre bien la difficulté à classer un microorganisme dans une catégorie bien distincte.

## 1.4 Rôle des microorganismes dans le fonctionnement du sol et des plantes

Dans un premier temps, seront discutées les fonctions générales des microorganismes dans le sol. Dans un deuxième temps, les fonctions microbiennes associées aux plantes seront détaillées plus spécifiquement.

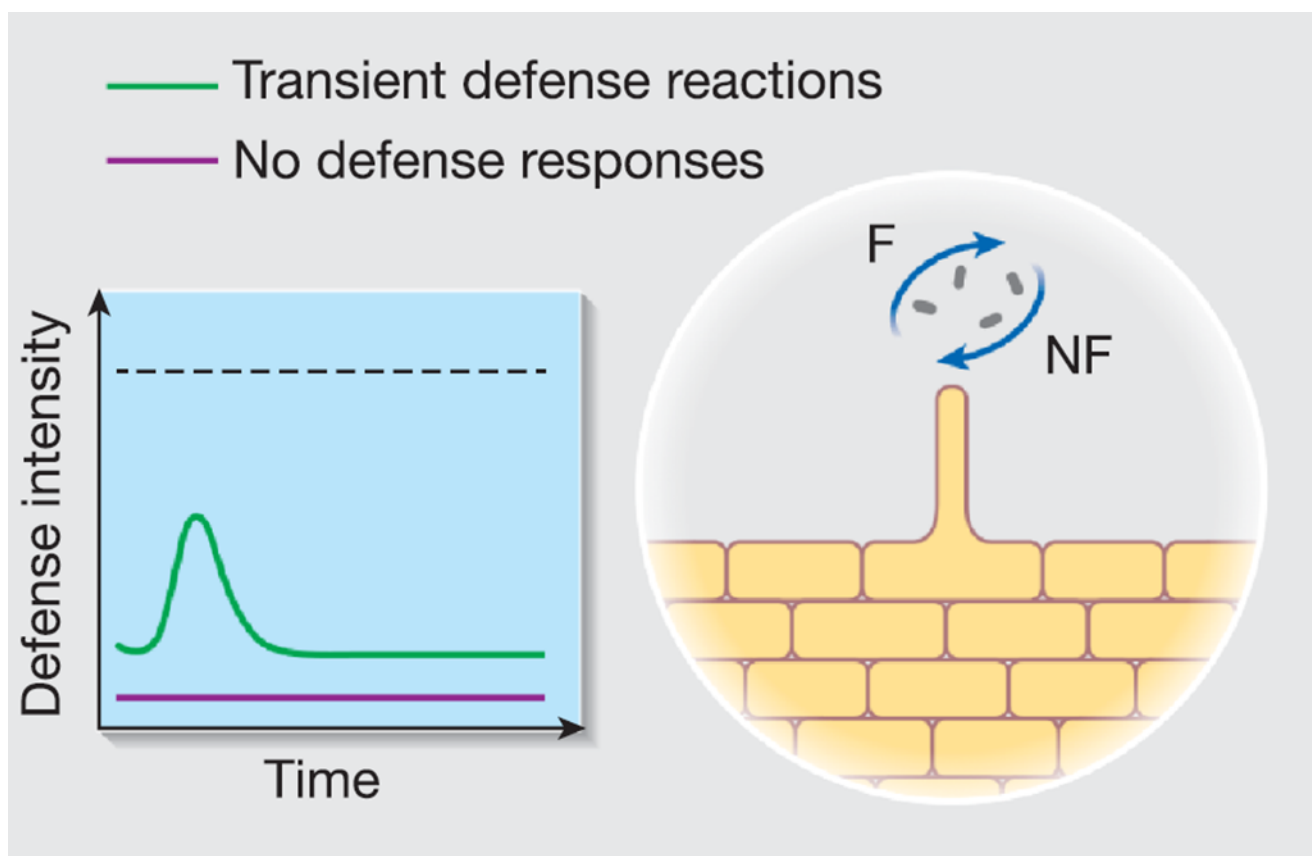


FIGURE 6 – Deux modèles proposés concernant la réaction des légumineuses face aux *Rhizobia*, dans le cas d’une interaction compatible, durant l’échange de flavonoïdes (F) et de facteurs Nod (NF). Le modèle représenté par la ligne verte suggère une réaction de défense modérée et transitoire, sous la ligne en pointillés qui est le seuil au-dessus duquel la nodulation serait interrompue. Le modèle représenté par la ligne violette stipule que la plante ne se défend pas face à ces bactéries bénéfiques. Figure tirée de Benezech, *et al.*, 2019[10].

❖ dans le sol

Dans le sol, les microorganismes ont un rôle vital pour l'écosystème terrestre. Ils permettent notamment le **recyclage des éléments chimiques essentiels** à la vie, comme le carbone, l'azote et le phosphore, mais aussi une multitude d'autres éléments comme le potassium, le fer, le soufre ou le calcium [32]. Les bactéries et champignons du sol recyclent les éléments issus de la matière organique morte en les minéralisant, les rendant réutilisables par d'autres organismes vivants.

Parmi ces cycles biogéochimiques, on trouve, par exemple, le cycle de l'azote (Figure 7), un élément clé pour toute forme de vie, étant à la base des acides aminés et des nucléotides. L'azote est tout particulièrement important pour la vie végétale, pour qui la provision de nutriments azotés est rendue possible par les microorganismes du sol. Ainsi, cet élément est au centre des interactions plante-microorganismes et ceux-ci peuvent entrer en compétition pour certaines sources d'azote. Certaines bactéries sont capables de fixer l'azote atmosphérique ( $N_2$ ) sous forme  $NH_3$  puis de produire des ions ammonium ( $NH_4^+$ ). Ceux-ci peuvent aussi provenir de la décomposition de matière organique par des bactéries et des champignons saprophytes. Puis, des bactéries dites "nitrifiantes" transforment ces ions ammonium en nitrites ( $NO_2^-$ ) puis en nitrates ( $NO_3^-$ ) : c'est la nitrification. Dans un sol anaérobie, des bactéries dites "dénitrifiantes" peuvent utiliser  $NO_2^-$  ou  $NO_3^-$  pour leur respiration cellulaire, produisant d'autres formes azotées comme le  $N_2$  ou le  $N_2O$  qui quittent alors le cycle biologique et sont restitués à l'atmosphère. A travers leur rôle clé dans les cycles biogéochimiques, les microorganismes du sol sont des régulateurs des émissions de gaz à effet de serre (GES), comme le  $CO_2$ , le  $CH_4$  et le  $N_2O$ . Il va sans dire que les microorganismes du sol participent activement aux cycles élémentaires de notre planète.

Les microorganismes du sol interviennent également dans la formation du sol en lui-même, en participant au recyclage des nutriments, à la production et transformation de la matière organique [33]. Typiquement, les mycorhizes et leur mycélium participent grandement à **l'agrégation et la structuration du sol**, par des processus physiques, biochimiques et biologiques [34]. Or, l'agrégation d'un sol impacte directement la durabilité des agroécosystèmes, l'érosion des sols, leur capacité à supporter les changements globaux et leur habilité à stocker du carbone [34].

Certains microorganismes ont la capacité de nettoyer des sols contaminés ou pol-

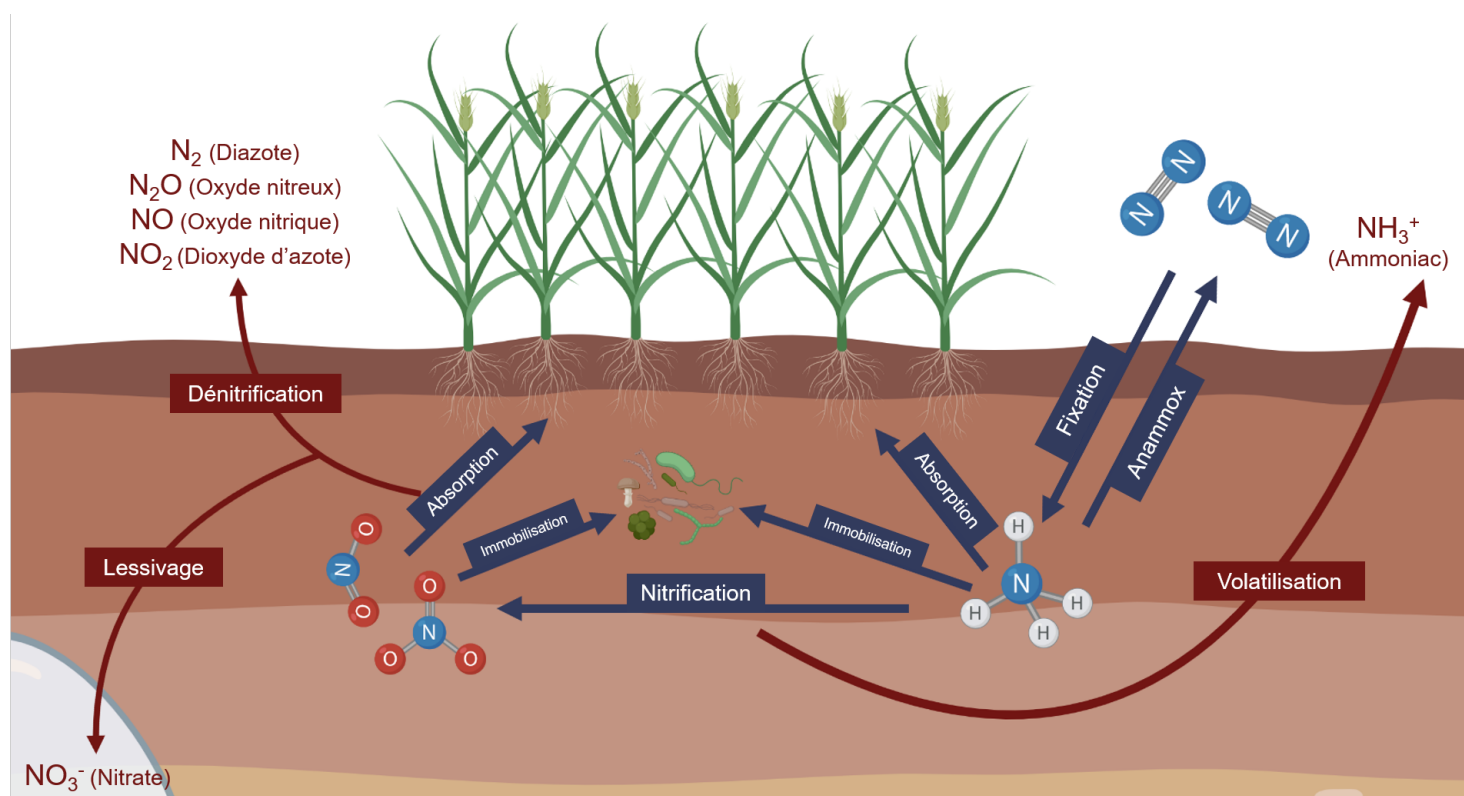


FIGURE 7 – Le cycle de l'azote, démontrant le rôle essentiel des microorganismes dans l'apport de nutriments azotés aux plantes et au recyclage de cet élément dans le sol et dans l'air. Figure réalisée par Emmy L'Espérance (INRS, Laval, QC).

lués, on parle de **bioremédiation**. Prenons deux exemples : les polluants organiques et les métaux lourds. Les pesticides et les hydrocarbures sont des polluants organiques majeurs qui contaminent les sols et l'eau. Ces deux polluants peuvent servir de source carbonée pour certains microorganismes qui vont produire des métabolites plus ou moins dangereux que la molécule mère, voire inoffensifs. Les pesticides peuvent être dégradés par des bactéries, des champignons, des microalgues ou par un consortium[35]. Plusieurs souches bactériennes et fongiques peuvent métaboliser les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), de source pétrogénique, et leur utilisation combinée à une aide physique, chimique ou biologique améliore la dégradation de ces polluants [36]. De par les activités minières, les métaux lourds, comme le mercure, le cadmium ou le plomb, abondent dans certains sols. Les microorganismes peuvent décontaminer le sol de plusieurs façons, notamment : (i) la *biosorption*, un mécanisme généralement passif qui fixe les métaux lourds ; (ii) la *biolixiviation*, un processus de solubilisation des métaux ; et (iii) la *phytoremédiation*, technique de dépollution par les plantes et leurs microorganismes associés [37].

Le microbiote du sol nous offre une pléthore d'autres services écosystémiques non détaillés dans ce paragraphe. Par exemple, les microorganismes sont **à la base des réseaux trophiques dans le sol**, servant de nourriture, directement ou indirectement aux acariens, collemboles, vers de terre et autres constituants de la pédofaune. Un autre exemple non-anecdotique est celui du lien entre la biodiversité de nos sols et **la santé humaine**. De par les services écosystémiques essentiels que ces microorganismes nous offrent, comme le recyclage de l'eau et des nutriments, le contrôle de pathogènes, la lutte contre l'érosion des sols, ils nous sont tout à fait indispensables. En effet, la perte de la biodiversité microbienne du sol est directement liée au risque de maladies chez l'humain, à une nourriture moins nutritive et à un manque d'eau et d'air sains [38].

❖ chez les plantes

Après avoir investigué les rôles des microorganismes dans le sol, cette partie est consacrée aux fonctions microbiennes associées aux plantes, plus spécifiquement. Il s'agit donc de services apportés à la plante hôte par des symbiotes microbiens dits "bénéfiques". En échange, la plante peut fournir des bienfaits dans le cadre d'une relation mutualiste.

Certaines fonctions énumérées dans la partie précédente sont directement béné-

fiques pour les plantes. Par exemple, la fixation de l'azote atmosphérique rend cet élément biodisponible pour les plantes et la structuration du sol profite également à l'établissement des plantes et de leurs racines.

Que ce soit le microbiote de la phyllosphère ou de la rhizosphère, les fonctions principales supportées par les microorganismes sont les mêmes et peuvent être regroupées en quatre catégories : (i) l'acquisition de nutriments ; (ii) la défense contre les pathogènes ; (iii) le support à la croissance *via* les phytohormones ; et (iv) la tolérance aux stress abiotiques (Figure 8). Les exemples suivants évoquent généralement les **bactéries**, car le microbiote de la phyllosphère en est majoritairement constitué et qu'elles occupent également une place prédominante autour des racines. Ces dernières sont appelées, en anglais, "plant-growth-promoting rhizobacteria" (PGPR), c'est-à-dire des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes. Celles-ci sont de genres multiples comme *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Variovorax*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Azospirillum*, *Serratia* et *Azotobacter* [39]. Cependant, les **champignons à mycorhizes** sont aussi des microorganismes importants dans la promotion de la croissance et de la santé végétales.

#### \* Acquisition de nutriments

Dans les racines, on trouve des bactéries diazotrophes libres ou plus étroitement liées aux plantes, comme le cas des *Rhizobium* et *Bradyrhizobium* qui forment des nodules dans les racines des Fabacées. Bien sûr, l'acquisition d'autres éléments nutritifs, comme le phosphore ou le fer (*via* des sidérophores), est optimisée par des bactéries. Sur ce point, les champignons à mycorhizes, comme les AMFs, sont particulièrement performants pour apporter le phosphore, l'azote, le soufre ou des microminéraux, comme le cuivre ou le zinc [20]. Les feuilles abritent un microbiote dont les membres sont capables de fixer l'azote atmosphérique, notamment des cyanobactéries et des diazotrophes libres.

#### \* Biocontrôle des pathogènes

Le microbiote des plantes constitue une barrière efficace contre des microorganismes phytopathogènes. Cette défense microbienne s'effectue de différentes façons.

##### ① Interférence des signaux microbiens

Souvent, les bactéries pathogènes ne produisent leurs facteurs de virulence que lorsqu'une certaine densité bactérienne est atteinte. Celle-ci est détectée par l'accumulation de molécules de quorum-sensing (QS), comme les homosérine lactones (AHLs). Or, certaines bactéries possèdent des enzymes capables de dégrader ces

AHLs. C'est le cas de *Bacillus thuringiensis* qui produit des AHL lactonases, par exemple [40]. Cette interférence spécifique contre le QS est nommée le "quorum-quenching".

② Antagonisme

Les microorganismes qui combattent efficacement les agents pathogènes sont en compétition pour une même niche écologique, échappent à la prédation (les bactéries rhizosphériques se font prédater par des "protozoaires brouteurs") et produisent des composés antimicrobiens [40]. La simple présence d'un microorganisme à un lieu donné peut empêcher l'installation d'un pathogène, mais concernant les racines, ce lieu doit être une micro-niche précise [40]. Une bactérie peut limiter la croissance d'une autre si elles consomment les mêmes sucres, par exemple. D'autres peuvent limiter la croissance de pathogènes fongiques en séquestrant les ions ferriques ( $Fe^{3+}$ ), dans leurs sidérophores [41]; [40]. Dans les feuilles, de nombreux composés antibimicrobiens sont produits par le microbiote, par exemple, par les espèces de *Streptomyces* qui produisent des anti-fongiques, comme la streptomycine [41]. D'autres microorganismes vont émettre des composés organiques volatiles (VOCs) pour empêcher l'installation de pathogènes ou pour signaler la nécessité d'une réponse antimicrobienne.

③ Induction d'une résistance systémique

Certains microorganismes, qui ne sont pas forcément des bons colonisateurs, peuvent quand même être bénéfiques pour la plante et la protéger d'agresseurs en activant son système immunitaire : c'est l'induction de la résistance systémique (ISR). Ainsi des bactéries bénéfiques peuvent préparer la plante à une attaque. Cette défense utilise le jasmonate et l'éthylène. Les éléments déclencheurs d'une ISR peuvent être des LPS, des flagelles, de l'acide salicylique ou des sidérophores [40]. Certains VOCs microbiens peuvent aussi augmenter la résistance des plantes à certains phytopathogènes foliaires [41]. D'autres microorganismes sont capables de faire persister la résistance systémique de la plante en modulant le niveau de ses enzymes antioxydantes ou de ses phytohormones, comme l'auxine, qui est impliquée dans la défense contre certains pathogènes [41]. Il existe d'autres méthodes de biocontrôle, comme la prédation et le parasitisme des pathogènes, ou l'interférence avec son mode de vie, comme sa sporulation ou le développement de ses hyphes [40].

\* **Tolérance accrue aux stress abiotiques**

Le système aérien des plantes est un milieu particulièrement stressant du fait des



nombreux changements physico-chimiques, comme les variations de lumière, de température et d'humidité. Ainsi, le microbiote de la phyllosphère s'est adapté à ce milieu changeant. Beaucoup peuvent améliorer la tolérance de la plante, notamment au stress osmotique et à la sécheresse, *via* la production de phytohormones (auxine, gibbérellines) et d'osmoprotectants (acides aminés, sucres) [41]. De par les fortes radiations UV subies par les microorganismes foliaires, beaucoup produisent des pigments protecteurs, comme les bactéries *Methylobacterium*, *Pseudomonas* et *Sphingomonas* [41]. Celles-ci sont connues pour combattre les stress oxydatifs liés aux UVs, à travers leurs pigments ou leurs enzymes antioxydantes [41]. Dans les racines, les PGPRs qui rendent la plante plus résiliente aux stress abiotiques sont nombreux. Plusieurs espèces d'*Azospirillum*, de *Pseudomonas* et de *Bacillus* allègent l'effet de la sécheresse *via* des mécanismes variés, comme l'accumulation de sucres solubles et d'acides aminés ou le maintien de l'eau dans les feuilles en jouant sur l'ouverture des stomates [39]. Un mécanisme répandu parmi ces bactéries phyto-bénéfiques est la production d'une enzyme, la 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase, qui diminue les niveaux d'éthylène de la plante et donc sa perception du stress [40]. Les PGPRs favorisant la tolérance au stress salin possèdent souvent cette ACC désaminase, c'est le cas d'espèces de *Rhizobium*, de *Pseudomonas*, de *Serratia* et de *Hartmannibacter* [39]. Les AMF atténuent divers stress abiotiques, isolés ou combinés, comme la sécheresse, la salinité, les écarts de température [42]. Ces stress sont minimisés par les AMF, en régulant les processus liés aux phytohormones, comme l'acide abscissique, les aquaporines ou des facteurs de transcription [42].

Tous ces mécanismes reposent sur une modification de la physiologie ou de la réponse de la plante, mais une autre façon de survivre face à un stress est de l'éliminer ou de le diminuer. Lorsqu'une plante subit les effets d'un sol pollué, elle peut compter sur les microorganismes environnants pour s'en débarrasser. Par exemple, les bactéries [41]; [39]; [40] et les champignons [42]; [20] associés aux plantes peuvent aider à la dépollution des sols par les métaux lourds, qui impactent sévèrement la santé des plantes. De notre point de vue, les plantes en association avec leurs microorganismes sont très intéressantes pour la dépollution des sols : c'est la **phyto-rémediation**. Mais, initialement, il s'agit de processus, probablement issus de la coévolution des plantes et leur microbiote, qui permettent de réduire l'impact de ces métaux lourds sur la fitness végétale.

### \* Amélioration de la croissance végétale

L'aide à l'acquisition de nutriments et une meilleure tolérance aux stress biotiques et abiotiques apportées par les microorganismes bénéfiques sont déjà en soit des facteurs favorisant la croissance végétale. Mais ces microorganismes ont un impact encore plus direct sur le développement des plantes, en produisant des phytohormones. Dans la phyllosphère, les *Methylobacterium sp.* produisent de l'auxine, des cytokinines et des gibbérellines, trois phytohormones impliquées dans la croissance végétale [41]. Celles-ci peuvent aussi améliorer la germination et la vigueur des graines. Autour des racines, on trouve également des bactéries productrices d'auxine, mais aussi d'autres molécules comme le butane-2,3-diol, l'acétoïne ou le cofacteur "PQQ" (pyrroloquinoléine quinone), qui favorisent la croissance des plantes [40]. Les AMF aussi peuvent moduler les niveaux de phytohormones chez la plante hôte et ainsi promouvoir son développement [20].

### \* Autres effets bénéfiques

Les microorganismes du sol jouent des rôles absolument essentiels dans la phytosphère : à la fois au niveau individuel d'une plante, mais également au niveau de la biodiversité végétale d'un écosystème. Cela a notamment été démontré chez les AMF qui déterminent en partie la **biodiversité des plantes, la variabilité et la productivité d'un écosystème** [44]. En plus des rôles individuels joués par chaque espèce microbienne, il faut se rappeler que ces microorganismes ont aussi un rôle en tant que communauté. Ainsi, le microbiote entier, de par l'équilibre et les dynamiques entre espèces microbiennes, fournit nécessairement des fonctions différentes que la simple somme des individus qui le composent.

Utilisation des interactions plantes-microorganismes à travers le temps

Avant même la conceptualisation des microorganismes, nos ancêtres les utilisaient dans l'agriculture, notamment les rhizobactéries fixatrices d'azote, associées aux légumineuses. En effet, il y a 6000 ans, au Mexique, il existait déjà des co-cultures de maïs et de légumineuses, comme les haricots. En l'an -1000 av. JC, les premiers peuples d'Amérique du Nord avaient un système de rotation des cultures, souvent appelé les "Trois Soeurs", comprenant le maïs, les haricots et des courges [45]. Le maïs servait de support physique aux haricots qui apportaient l'azote et les courges permettaient de couvrir le sol, empêchant l'évaporation et la pousse de plantes adventices [45]. Par la suite, la plupart des

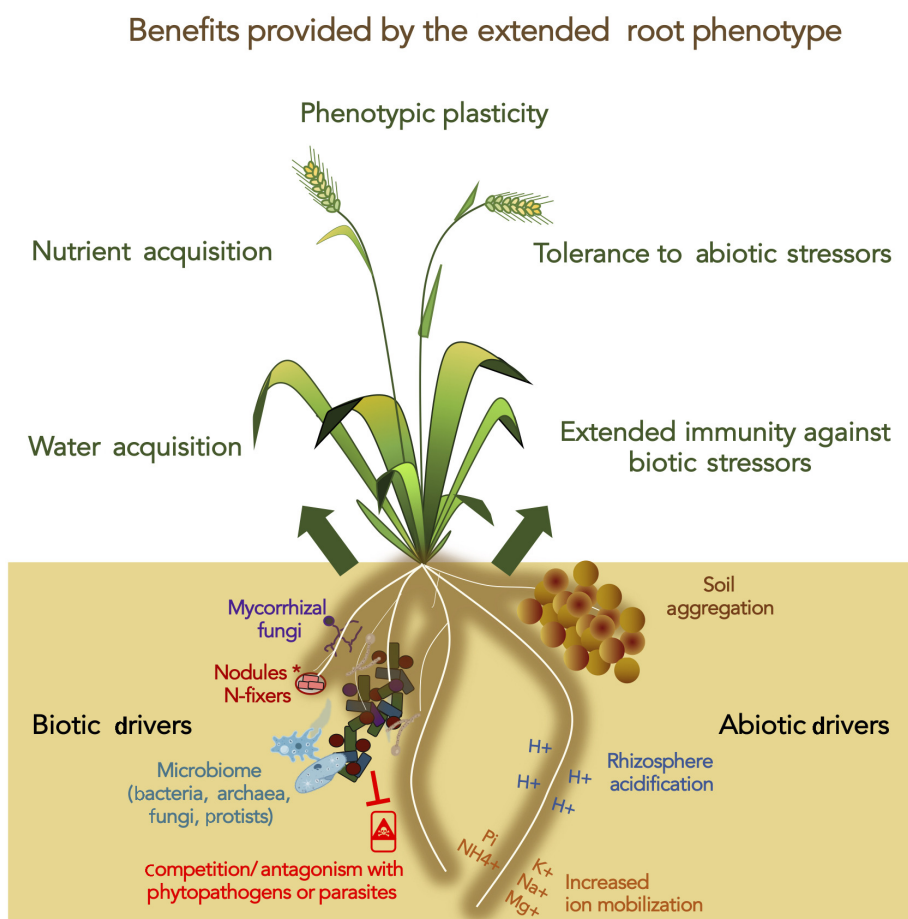


FIGURE 8 – Bénéfices apportés à la plante par le “phénotype étendu des racines”, c’est-à-dire la rhizosphère et ses habitants. L’effet rhizosphère, *via* les exsudats racinaires, modifie les propriétés biotiques et abiotiques du sol entourant les racines. Ces changements entraînent des retours bénéfiques pour la plante, comme une meilleure acquisition de l’eau et des nutriments; une tolérance accrue aux stress et une modification du phénotype végétal. Figure tirée d’une revue de De la Fuente Canto, *et al.*, (2020) qui propose que la rhizosphère soit vue comme un phénotype étendu de la plante, du fait de l’effet des modifications biotiques et abiotiques apportées par la plante [43].

agriculteurs utilisaient le sol dans lequel avaient poussé des légumineuses comme inoculum pour leurs cultures de plantes non-légumineuses, afin d'avoir de meilleurs rendements[46]. Vers la fin du 19ème siècle, ce fut d'ailleurs une méthode recommandée aux Etats-Unis d'Amérique, menant au premier brevetage d'inoculum avec *Rhizobium sp.* en 1896 [46]; [47]. Au fil des décennies, nos méthodes d'utilisation des microorganismes associés aux plantes se sont affinées. Notre compréhension grandissante des écosystèmes microbiens a permis une évolution rapide de ce que l'on appelle "l'ingénierie du microbiote". Aujourd'hui, la simple inoculation d'une souche microbienne bénéfique a été remplacée par des méthodes plus holistiques qui seront discutées ci-après. L'ingénierie microbienne résonne souvent avec une agriculture de précision, moderne et très technique. Cependant, l'utilisation des microorganismes pour optimiser nos cultures peut ressembler davantage aux méthodes ancestrales, qui persistent aujourd'hui, comme les co-cultures, les rotations de cultures, les bandes enherbées en bordure de champs, la jachère, etc. . . D'ailleurs, celles et ceux qui ont la chance d'avoir un jardin potager utilisent le microbiote des plantes au quotidien, notamment par la fabrication de terreau de compost. Le compostage vise à transformer des résidus biologiques inutilisés en terre fertile. De nombreux microorganismes, des bactéries initialement, permettent la décomposition de ces résidus, que ce soit matière brune (feuilles mortes, marc de café, carton, papier. . .) ou matière verte (gazon, épiluchures, adventices arrachées. . .). Durant les phases successives de décomposition, différentes communautés microbiennes se succèdent, comprenant majoritairement des *Bacillota*, des *Pseudomonadota*, des *Actinomycètes* et des *Bacteroidota* [48]. Chaque phase est associée à un type de bactérie adéquat, par exemple, dans la phase initiale où la température monte au-delà des 50°C, on retrouve beaucoup des *Bacillota* thermophiles. L'utilisation des microorganismes dans le jardin ne se limite pas au compost et de plus en plus de méthodes de biocontrôle sont proposées aux particuliers. Un dernier exemple, d'ordre esthétique, concerne les tulipes : au 17ème siècle, des tulipes avec des motifs striés de diverses couleurs se vendaient à prix d'or, menant à de la spéculation pour l'achat de bulbes [49]. Ce n'est qu'au 20ème siècle, qu'on comprit l'origine de ces motifs tant recherchés : un virus, le *Tulip breaking virus* (TBV) [49] ! Aujourd'hui, ces tulipes existent encore, mais sont le produit de sélection variétale.

## 1.5 Ingénierie du microbiote de la rhizosphère

L'ingénierie du microbiote peut se définir par un ensemble d'outils et de connaissances qui permettent la modulation de traits microbiens spécifiques, de l'activité et/ou

de la composition du microbiote. Chez les plantes, le but est **d’optimiser le rôle des microorganismes sur leur fitness**, c’est-à-dire les fonctions microbiennes liées aux apports de nutriments, au biocontrôle des pathogènes, à la promotion de croissance végétale, à la tolérance aux stress, mais aussi à la bioremédiation. Il peut par exemple s’agir de l’inoculation d’une souche de *Rhizobia* dans un champ pour améliorer la fertilité du sol et donc les rendements de la culture. La bioremédiation repose sur l’activité de certains microorganismes, avec ou sans l’implication de la plante. Dans ce cas, l’ingénierie optimise la décontamination du sol en sélectionnant des souches d’intérêt. D’ailleurs, les co-inoculations de bactéries et champignons semblent particulièrement efficaces pour favoriser la biodégradation de polluants organiques, type HAPs [50].

La modulation du microbiote de la rhizosphère repose sur les canaux de communication naturels entre la plante et ses microorganismes. Ainsi, nous prenons avantage de ces **molécules signal**, comme les exsudats racinaires, pour attirer les microorganismes bénéfiques ou décourager les “mauvaises” interactions, ou comme les AHLs bactériens pour stimuler la croissance et le système immunitaire de la plante [51].

Pendant longtemps, l’ingénierie du microbiote de la rhizosphère des plantes reposait sur **l’inoculation d’une souche d’intérêt**, dite “bénéfique”. Ces microorganismes, notamment des *Rhizobia*, des AMF, des fixateurs d’azote libres, des entomopathogènes, des endophytes fongiques et des PGPRs, sont administrés *via* les graines, le sol ou par un spray foliaire [52]. Cette manipulation du microbiote a des limites assez importantes : (i) l’efficacité de souches seules est très variable en champs, (ii) les formulations de produit ne sont pas toujours bonnes et (iii) ces souches persistent peu dans le lieu souhaité [52]. La variabilité et la persistance de ces inocula reposent sur la présence d’un microbiote natif (en compétition avec l’inoculum), les caractéristiques du sol, le climat et le génotype de la plante cultivée [52]. D’autres stratégies sont investiguées pour contrer ces problèmes, par exemple, **l’utilisation d’insectes** pour inoculer des souches florales ou des souches génétiquement améliorées, ou bien, l’inoculation de multiples souches avec diverses fonctions (un consortium microbien), *e.g.* de biocontrôle et d’augmentation de la croissance [52].

Les limites citées précédemment relèvent d’une simplification d’un système complexe, comprenant la plante, ses microorganismes et leurs interactions.

Ainsi, les nouveaux outils considèrent davantage les interactions plante-microorganismes et microorganisme-microorganisme dans leur ensemble. Au lieu d’inoculer une seule souche ou plusieurs souches d’intérêt, on vise plutôt à créer des communautés synthétiques cohé-

sives, formulées pour bénéficier au mieux à la plante. Au risque de rencontrer les mêmes problèmes qu’avec les probiotiques ajoutés au sol, une voie alternative à l’inoculation de souches existe : celle de l’ingénierie microbienne piloté par l’hôte. Le but étant d’utiliser le pouvoir sélectif de la plante pour moduler le microbiote de façon optimale. Pour ce faire, la **sélection variétale** et la **transformation génétique** pourraient créer des plantes qui se connectent au mieux avec des microorganismes bénéfiques [52] ; [51].

Globalement, l’ingénierie détaillée ci-dessus vise soit la plante soit le microbiote, mais une approche plus holistique, dite de “**co-ingénierie**” (Figure 9), prenant en compte la plante et son microbiote comme un tout indissociable, semble être une voie prometteuse [51]. L’exemple type de co-ingénierie est l’utilisation de plantes génétiquement modifiées qui sécrètent des exsudats racinaires spécifiques (des opines) permettant la survie des microorganismes inoculés, préalablement sélectionnés pour leur habilité à dégrader cet exsudat. Cette relation très spécifique entre la plante transgénique et l’inoculum permet une persistance de ce dernier sur le long terme. Cependant, cette méthode concerne quelques microorganismes bénéfiques préalablement identifiés et non pas le microbiote dans son ensemble [51]. La simple rotation des cultures peut aussi être considérée comme une modulation holistique du microbiote [51], car la diversité végétale tournante sur un même sol procure une richesse microbienne plus importante, qui sera naturellement affinée selon la culture du moment et les conditions environnementales.

Le futur de l’ingénierie du microbiote des plantes repose probablement sur des **solutions microbiennes personnalisées**, à l’instar de la médecine personnalisée pour les humains. Cette gestion du microbiote devrait être basée sur les concepts écologiques gouvernant les communautés. En prenant en compte les quatre grands principes d’évolution des communautés (dispersion, spéciation, dérive génétique et sélection) et en évaluant celui qui prédomine dans chaque contexte d’ingénierie, la solution sera adaptée à chaque système [53] ; [54]. Ainsi, la modification *in situ* du microbiote par la spéciation et la sélection semble plus adéquate que l’ajout de souches externes, créant de la dispersion [53]. Cependant, nous devons approfondir notre compréhension des lois d’assemblage des communautés microbiennes, notamment ce qu’on appelle “les effets de priorité”, qui confèrent un avantage sélectif aux microorganismes déjà présents dans une niche (par exemple, les microorganismes qui proviennent de la graine) [54].

Cette perspective pourrait être un cadre de lecture intéressant pour la mise au point de **modèles prédictifs**. En effet, la modélisation basée sur les microbiomes, c’est-à-dire le microbiote et les génomes associés, pourrait prédire l’état d’un écosystème et ses fonc-

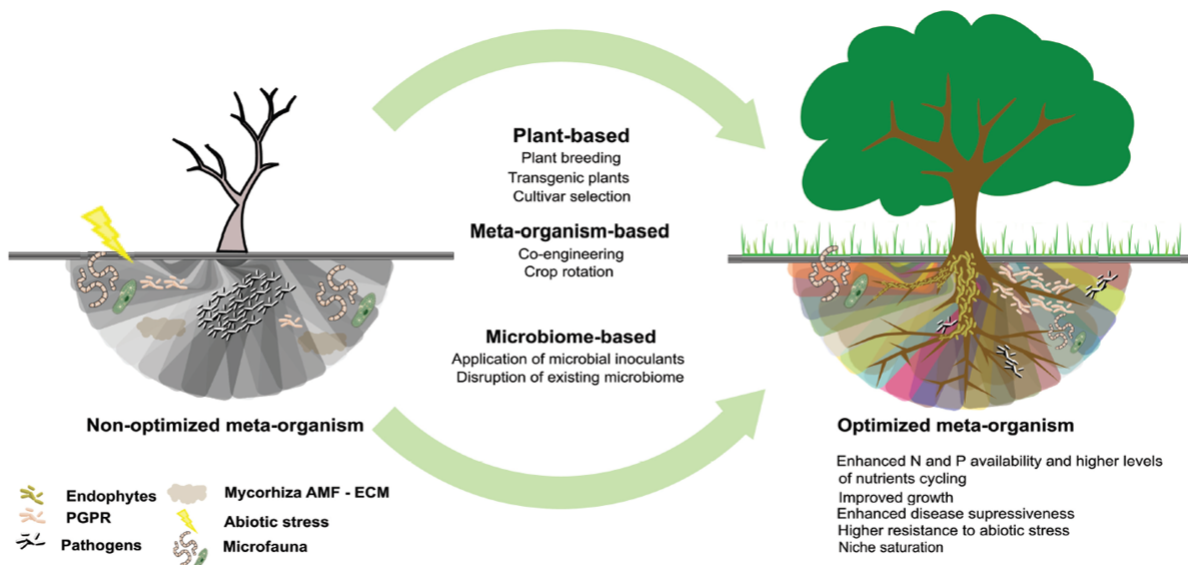


FIGURE 9 – L’ingénierie du microbiote rhizosphérique repose généralement sur des méthodes liées soit à la plante soit aux microorganismes. La revue Quiza, *et al.*, (2015, dont cette figure est tirée) met en avant l’utilisation de méthodes reposant sur l’holobionte, comme la co-ingénierie de la plante et de son microbiote [51].

tionnalités, par exemple, le rendement et la qualité d’une culture [55]. Ces prédictions se baseraient sur un ensemble complexe de paramètres, souvent cryptés dans nos données “omics”, qui pourraient être déchiffrées par l’apprentissage statistique [55]. Ces modèles permettraient d’évaluer la solution microbienne adéquate (changement de pratiques, probiotiques...), selon une multitude de paramètres personnalisés, comme les pratiques et le contexte agricoles ou le type de plante cultivée [55] ; [52].

## 2 Le système plante, comme holobionte

Le terme “holobionte” se réfère à une “unité d’organisation biologique composée de l’hôte et de son microbiote” [56]. Tous les animaux et végétaux sont considérés comme des holobiontes de par leur microbiote abondant et diversifié [57]. Ce concept est souvent associé à Lynn Margulis, une microbiologiste, connue pour sa théorie endosymbiotique. Cette terminologie a été utilisée par la chercheuse à partir du début des années 1990, faisant d’elle la créatrice et référente du concept d’holobionte, même si certains suggèrent que celui-ci remonte aux années 1940, avec le biologiste Adolf Meyer-Abich [58]. L’holobionte stipule que les animaux et les plantes ne sont pas des organismes autonomes,

mais qu'ils forment avec leurs symbiotes microbiens une unité biologique, comprenant le génome des différents partis [56]. L'ensemble de ces gènes forme un complexe co-évolutif. C'est le concept d'hologénome, qui se définit plus spécifiquement par le "contenu génétique au complet du génome de l'hôte, de ses organelles et de son microbiome" [56]. Pendant un temps, l'holobionte et l'hologénome étaient perçus comme des unités de sélection à l'échelle évolutive [59]. Cette théorie était basée sur 4 principes fondamentaux : (i) tous les animaux et les plantes établissent des relations symbiotiques avec des microorganismes, (ii) ces symbiotes sont transmis de génération en génération, (iii) ces associations hôte-microbiote impactent la fitness de l'holobionte et (iv) l'hologénome varie lorsque des changements s'opèrent soit dans le génome de l'hôte soit dans celui du microbiote [59]. Ces principes ont été longuement discutés dans la communauté scientifique, certains y adhérant totalement et d'autres ayant plus de réticences, notamment concernant le concept "d'unité évolutive". Certains prétendent que l'holobionte pourrait être une unité de sélection seulement si les symbiotes microbiens avaient une relation de haute fidélité avec l'hôte [60], or le microbiote est fortement variable au cours de la vie d'un animal ou d'une plante. Une autre critique concerne la transmission du microbiote de génération en génération qui ne peut pas être établie comme un fait commun à travers le vivant à l'heure actuelle, même si cela a été montré chez certains organismes [57]. En revanche, les trois autres principes ont été confirmés d'année en année, notamment le fait que le microbiome évolue très rapidement et peut donc jouer un rôle majeur dans l'adaptation et l'évolution de l'holobionte [57]. De plus, il est souhaitable que les interactions microorganisme-microorganisme soient davantage explorées dans l'équilibre hôte-microbiote [61].

Dans ce contexte, la plante et les microorganismes qui y sont associés forment un holobionte dont les interactions doivent être coordonnées. La coordination de l'hologénome nécessite une voie de communication "universelle" aux différentes espèces formant l'holobionte. Cette communication passe forcément par un langage commun aux hôtes et aux microorganismes. Comme décrit auparavant, il existe de nombreuses molécules utilisées par la plante et son microbiote, utilisées pour communiquer entre espèces différentes. En revanche, il existe une catégorie de molécules abondamment présente à travers le monde vivant, qui pourrait constituer la base d'une voie de communication inter-règne inexplorée dans la rhizosphère : les ARNs.



### 3 L'ARN comme langage

L'ARN, ou acide ribonucléique, est un acide nucléique similaire à l'ADN, présentant quelques différences majeures : (i) l'ARN est composé de sucres riboses alors que l'ADN contient du désoxyribose ; (ii) l'ARN est généralement sous une forme simple brin, tandis que l'ADN est double brin et (iii) parmi les quatre bases azotées de l'ADN (adénine, guanine, cytosine et thymine), la thymine est remplacée par l'uracile dans l'ARN. C'est une molécule très ancienne, à la base de nombreux mécanismes biochimiques, ayant probablement joué des rôles essentiels dans les cellules primitives et donc dans l'évolution de la vie [62]. La notion de "RNA world" se réfère à un monde précédant l'apparition des protéines et de l'ADN, dans lequel l'ARN serait apparu dans des conditions abiotiques et aurait catalysé des réactions essentielles à l'apparition de la vie. En effet, les ribozymes, qui sont des ARNs à activité catalytique, ont certainement permis les réactions fondamentales permettant la synthèse de protéines et le processing d'ARN [62]. Ainsi, l'ARN aurait permis aux premiers organismes de réguler leurs voies métaboliques, devenant une molécule signal essentielle à la vie [62]. Encore aujourd'hui, même après l'apparition des protéines enzymatiques et de nombreuses autres molécules régulatrices, l'ARN reste une molécule signal de prédilection, notamment à travers les ribozymes, les coenzymes et les riboswitches actuels [62].

#### 3.1 Classification générale des ARNs chez les plantes

L'ARN est au cœur du dogme de la biologie moléculaire stipulant que l'ADN, à la base des gènes, est transcrit en ARN messager (ARNm) qui est ensuite traduit en protéine. Les ARNm forment une copie transitoire de l'information génétique, variable selon l'épissage du pré-ARNm, c'est-à-dire selon l'assemblage final d'introns. Les ARNm sont donc des ARNs dit "codants" car ils codent pour une protéine à synthétiser. Cette catégorie d'ARN a été découverte très en amont des autres types d'ARN dits "**non-codants**". Ces ARNs, dont la fonction est restée inconnue pendant de nombreuses années, étaient vu comme une matière noire ou même du "bruit transcriptionnel" [63]. En réalité, une grande majorité du génome code pour ces ARNs non-codants, tandis qu'une fine proportion (1-2%) du génome code pour des ARNm [63]. Parmi ces ARNs non-codants (ARNnc), on distingue trois catégories : les circulaires (ARNcirc), les structuraux et les régulateurs [63].

Pendant un temps, les **ARNcirc** étaient considérés comme de simples erreurs d'épissage, mais se sont révélés être une classe importante d'ARNnc : ils sont largement répandus

dans les dicotylédones et les monocotylédones et sont potentiellement impliqués dans des processus liés au développement et/ou au stress, chez les plantes [64].

Les **ARN structuraux** sont les ARNs de transfert (transportent les acides aminés pour la synthèse protéique), les ARNs ribosomiaux (participent à la traduction), mais aussi les “small nucleolar RNAs” (aident à la modification d’autres ARNs) et les “small nuclear RNAs” (participent à l’épissage des ARNm).

Les **ARNnc régulateurs** peuvent être triés par taille, d’une part ceux qui sont plus longs que 200 nucléotides (nt), les longs ARNnc (ou long non-coding RNAs) et ceux plus courts, entre 20-24nt, les petits ARNs non-codants [65]; [63]. Les long non-coding RNAs sont généralement peu caractérisés, mais ceux qui le sont ont des fonctions de régulation dans des processus biologiques divers : la régulation des ARNm et des mécanismes de transcription, notamment dans le développement des plantes, mais aussi dans la tolérance aux stress abiotique et biotique [63]. Les petits ARNs non-codants sont développés dans le paragraphe suivant.

### 3.2 Classification des petits ARNs non-codants chez les plantes

La plupart des petits ARNs non-codants sont issus d’un ARN double-brin qui a été transformé par une enzyme RNase III, une DICER-like (DCL), formant ainsi un duplex qui est ensuite inséré dans une protéine argonaute (AGO) [66]. Tous les petits ARNs de plante ont une méthylation à l’extrémité 3’, ce qui les rend plus stables, empêchant l’uridylation en 3’ et la dégradation consécutive [66].

Les petits ARNnc forment un groupe diversifié au sein des plantes (Figure 10). Plusieurs classifications se défendent, mais souvent ils sont classés selon leur **biogenèse**. Ainsi, on peut distinguer les petits ARNs provenant d’ARN double-brin, appelés les small interfering RNAs (**siRNAs**), de ceux provenant d’ARN simple-brin avec une structure en épingle à cheveux, appelés les hairpin RNAs (hpRNAs) [65]. Les siRNAs peuvent ensuite être catégorisés en trois sous-groupes : les siRNAs hétérochromatiques, les siRNAs secondaires et les “natural antisense transcript siRNAs” ou NAT-siRNAs. Tandis que les hpRNAs regroupent principalement les microARNs (ou **miARNs**) et les autres ARNs originaires d’un précurseur en épingle à cheveux, sans correspondre aux caractéristiques d’un miARN [65].

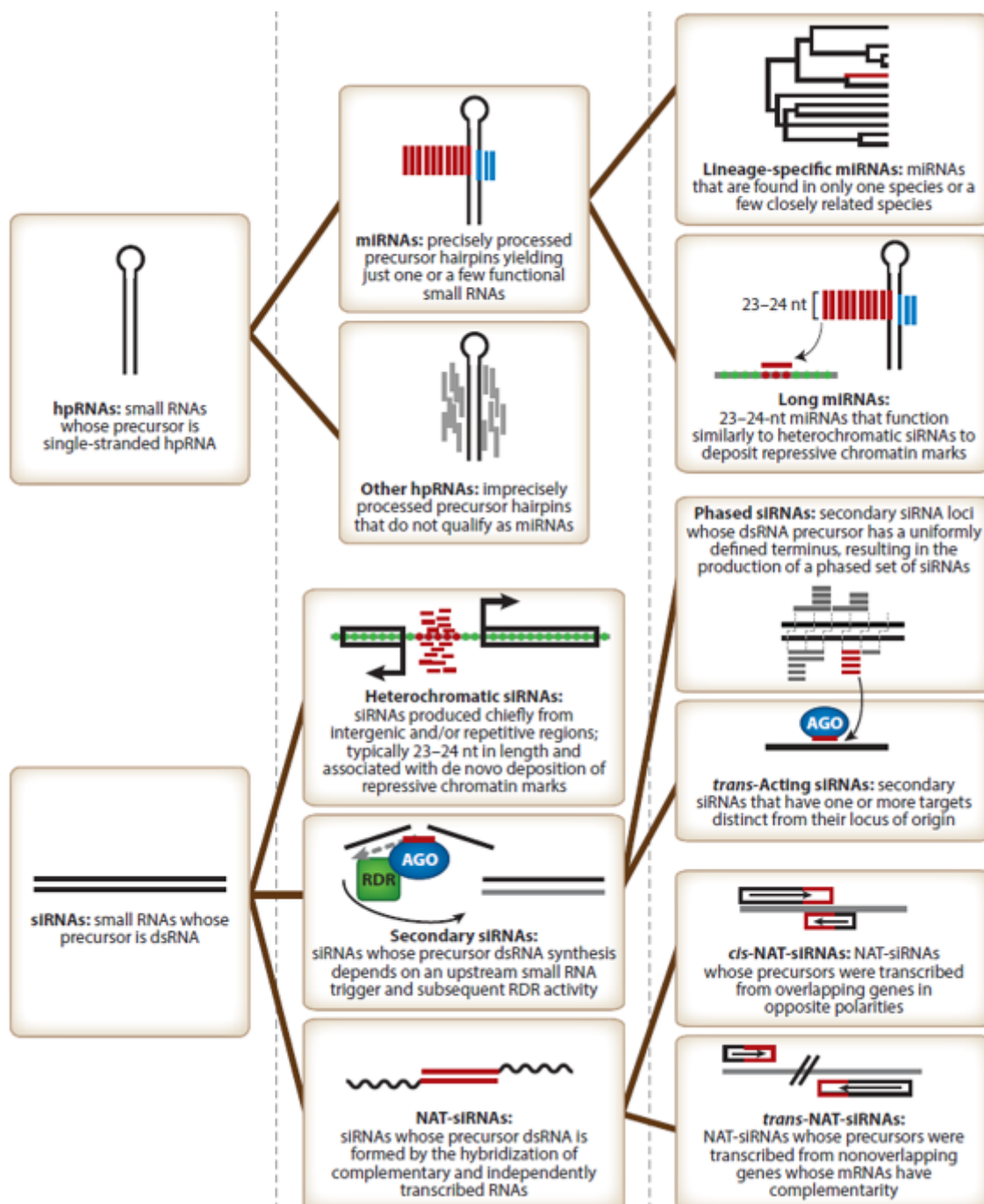


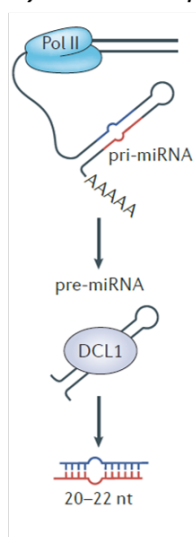
FIGURE 10 – Classification des petits ARNs non-codants chez les plantes, proposée par Axtell, *et al.*, 2013 [65].

**Caractéristiques des miARNs de plantes**

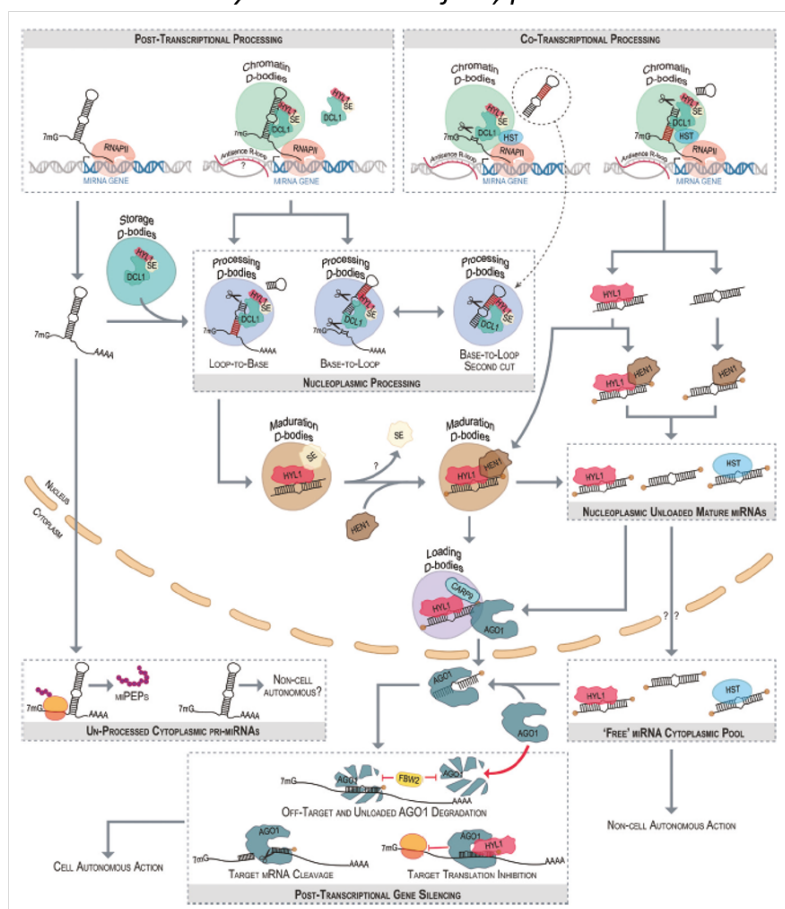
Les miARNs de plante sont des petits ARNs non-codants d'environ 21nt, ayant une fonction de régulation de l'expression des gènes, généralement de l'inhibition d'expression. La biogenèse des miARNs de plante est très complexe et requiert de nombreux co-facteurs et enzymes pour produire un miARN mature, en passant par des formes précurseurs. Dans la littérature, cette biogenèse est parfois sur-simplifiée (Figure 11) car il n'est pas toujours nécessaire d'entrer dans les détails profonds de cette voie de biosynthèse. Ici, je propose une version synthétique de cette voie. Les miARNs de plantes sont encodés par des gènes *MIR* qui sont transcrits par l'ARN polymérase II en **pri-miARN**, simple-brin polyadénylé qui se plie en épingle à cheveux [66]. Post-transcriptionnellement ou co-transcriptionnellement, ce pri-miARN sera pris en charge par un "microprocesseur", composé de trois protéines : DCL1, HYL1 et SE [67]. Ce complexe protéique transforme le pri-miARN en tige-boucle simple, appelé **pre-miARN**. Ce précurseur est alors à nouveau découpé, formant un duplex de miARNs mature, formé d'un brin "actif", le miARN guide, et d'un brin complémentaire, le miARN\* ou miARN passager. Ce complexe est méthylé par HEN1, puis transféré à une protéine AGO qui l'emportera à l'extérieur du noyau [67]. Il se peut que certains miARNs "échappent" à la protéine AGO et sortent indépendamment du noyau, formant un pool de miARNs libres dans le cytoplasme [67]. Communément, le brin "actif" du duplex est chargé dans le complexe **RISC**, le RNA-induced silencing complex, associé à la protéine **AGO1** [68]. Pendant longtemps, il était admis que le brin passager, le miARN\*, était dégradé et n'avait pas de rôle biologique significatif, cependant, certaines études suggèrent le contraire [69]. En effet, les miARNs\* peuvent s'associer avec des protéines AGO pour former un complexe RISC fonctionnel. Non seulement ces miARNs\* s'accumulent dans des tissus spécifiques, à des périodes précises, mais il semblerait qu'ils aient également une réelle fonction biologique, notamment en réponse aux stress [69]. De plus, les miARNs\* peuvent co-réguler des activités intercellulaires avec leur miARN correspondant, voire inhiber la liaison entre ce miARN et sa cible, régulant ainsi son action [69].

## Biosynthèse mise à jour, plus réaliste

## Biosynthèse simplifiée



Borges &amp; Martienssen, 2015



Mencia, et al., 2022

FIGURE 11 – La biosynthèse des miARNs des plantes peut-être simplifiée par la figure de gauche, mais la réalité est plus complexe, avec certaines incertitudes. La figure de droite comprend la fonction de silencage des gènes par les miARNs, grâce aux protéines AGO, mais aussi la synthèse des miPEPs qui seront abordés plus loin. Ici, le complexe RISC est composé de AGO1 et du brin actif du duplex de miARN, mais en réalité, d'autres protéines non représentées sont impliquées dans la formation du complexe comme HSP90 et CYP40 [70].

Les petits ARNs pourraient également être classifiés selon leur **mode d'action**. Les petits ARNs matures et fonctionnels s'associent à une protéine AGO. Selon cette AGO et selon la nature de la cible, les petits ARN peuvent enclencher le clivage et la dégradation de la cible, l'inhibition de sa traduction ou bien le recrutement d'autres cofacteurs [66]. Les miARNs forment une classe d'ARN extensivement étudiée (voir encadré ci-dessus). Une certaine complémentarité est nécessaire entre le miARN et l'ARNm cible pour que le mécanisme de répression se mette en place [65]. Les deux mécanismes de répression

les plus communs chez les miARNs sont le **clivage de la cible** entre le nucléotide 10 et 11 de l'alignement (grâce à l'activité endonucléolytique de l'AGO) et **l'inhibition de la traduction** de la cible [65]. D'autres mécanismes moins connus existent comme la modification de la chromatine, entraînant la répression transcriptionnelle de la cible ou le déclenchement d'une production de siRNAs secondaires [65]. En effet, les siRNAs secondaires proviennent de précurseurs double-brins, produits *via* le ciblage par un petit ARN, puis la synthèse du brin complémentaire par une ARN polymérase [65].

Les petits ARNs de plantes ont des rôles diversifiés, comprenant notamment le silençage génique post-transcriptionnel, *via* la dégradation des ARNm opérée par les miARNs et les siARNs secondaires [66]. D'autres fonctions comprennent la méthylation de l'ADN dirigée par l'ARN, effectuée par les siARNs secondaires et hétérochromatiques, ainsi que le silençage génique transcriptionnel, c'est-à-dire l'inhibition de la transcription, engendrée notamment par les siARNs hétérochromatiques [66]. Dans le noyau, les petits ARNs sont impliqués dans la paramutation (modification épigénétique héréditaire d'un allèle induite par un autre allèle au même locus, souvent associée à la méthylation), dans la régulation de la polyploïdie et de l'hybridation et dans la réparation de l'ADN [66]. Certaines études explorent le rôle de ces ARNs dans la méiose et la gamétogenèse chez les plantes, suspecté de par leur accumulation spécifique à certains moments du cycle cellulaire, dans des zones bien définies, comme dans les anthères [66].

### 3.3 Classification des petits ARNs non-codants chez les microorganismes

Les microorganismes, comme les bactéries et les champignons, ont également une variété de petits ARN non-codants. Ceux-ci sont essentiels pour réguler les gènes microbiens et pour une adaptation rapide à un environnement changeant. Les bactéries se servent abondamment de leurs petits ARNs pour adapter leurs transcriptomes et leurs métabolismes [71]. En plus de la régulation des gènes liés aux changements environnementaux, les petits ARNs bactériens sont également utilisés pour la défense contre des virus, comme les bactériophages, et contre des transposons ; la régulation des plasmides et de la conjugaison [72]. Lors d'un stress environnemental, que ce soit dû à l'osmolarité, un stress oxydatif, la présence d'antibiotiques ou l'homéostasie de différents éléments (fer, sucre...), les bactéries adaptent très vite leur transcriptome grâce à leurs petits ARNs [73]. Par exemple, l'accumulation intracellulaire de glucose phosphorylé active un facteur de transcription

SgrR qui induit le petit ARN SgrS, un ARN anti-sense qui code aussi pour un petit peptide, SgrT. Le petit ARN SgrS réprime l'expression des ARNm liés au transport du glucose et active une phosphatase pour déphosphoryler les sucres et les exporter hors de la cellule. Le peptide SgrT inactive les transporteurs de glucose [73]. Chez les champignons, l'interférence par ARN est beaucoup étudiée chez les phytopathogènes. Ceux-ci utilisent leurs petits ARNs pour supprimer la défense des plantes qu'ils attaquent [74]; [75]. Une étude récente a montré que le champignon ectomycorhizien *Pisolithus microcarpus* produit un miARN qui cible des transcrits contenant des domaines NB-ARC chez la plante hôte, suggérant un rôle de perturbation des signaux de l'hôte pour maintenir la symbiose [76]. Ainsi, les fonctions ciblées et le rôle des petits ARNs microbiens sont divers, mais permettent notamment une adaptation rapide à un contexte biotique ou abiotique changeant.

### Chez les bactéries

Chez les bactéries, on parle de petits ARNs (sRNA) entre 50 et 300nt, ils se lient à leur cible avec une complémentarité parfaite (*cis*-acting sRNAs) ou partielle (*trans*-acting sRNAs) [77]. Ces derniers sont souvent associés à des protéines chaperonnes, comme Hfq ou ProQ, et ciblent plusieurs gènes [77]. Les *trans*-acting sRNAs, incluant les ARNs liés au système CRISPR, sont ceux qui ressemblent le plus aux miARNs eucaryotes [72]. Certains *trans*-acting sRNAs découverts chez *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Salmonella* (souche SE2472) et *Spirulina platensis* se révèlent être exceptionnellement petits, aux alentours de 22nt, provenant de structures en épingle à cheveux [71]; [78]; [79]; [80]; [81]. Ces caractéristiques sont celles des miARNs eucaryotes et le terme "miRNA-size, small RNA" (msRNA) a été proposé pour ces petits ARNs bactériens [79]. Ces msRNAs peuvent être véhiculés *via* des vésicules bactériennes, appelées "outer membrane vesicles" (OMVs), notamment détectées durant l'investigation de pathogènes parodontaux [82]; [83]. Le rôle des msRNAs est encore peu connu, cependant, une étude a montré qu'un msRNA de *Salmonella* ciblait un gène de l'hôte entraînant une réponse anti-microbienne moins forte [81].

Les modes d'actions des autres petits ARNs bactériens sont variés, en se fixant à leur cible, ils peuvent : (i) empêcher la fixation du ribosome sur son site (le ribosome binding site, RBS); (ii) changer la structure de l'ARNm, relâchant le ribosome de son RBS ou révélant des sites sensibles aux RNAses, favorisant la dégradation de l'ARNm; ou (iii) directement dégrader l'ARNm cible, grâce au recrutement de la RNase E [77]. Certain-

ment que d'autres mécanismes d'action existent comme la séquestration de promoteurs [72], mais ceux-ci ne sont pas encore bien connus.

Il existe une autre catégorie de petits ARNs bactériens : les *cis*-acting 5' element non-coding RNAs. Ceux-ci sont encodés dans l'extrémité 5' non-codante de l'ARNm cible, lors d'un changement de température ou de pH ou bien de la liaison entre un petit métabolite et ce petit ARN (riboswitch), ce dernier change de conformation, influençant la transcription du gène cible [72] ; [84].

Actuellement, les petits ARNs bactériens sont majoritairement connus dans les souches modèles, comme *E. coli*, ou dans les souches pathogènes, mais vu la présence de protéines chaperonnes dans de nombreux génomes et le focus sur un petit nombre de taxons, il est très probable qu'une variété de petits ARNs existent chez des bactéries non-modèles [77].

D'ailleurs, cette courte revue des petits ARNs non-codants chez les bactéries est tout à fait non-exhaustive. On pourrait, par exemple, citer les fragments dérivés d'ARN de transfert (ARNt), qui peuvent réguler des gènes, en se fixant aux protéines AGO, comme les miARNs. Des fragments dérivés d'ARNt de *Rhizobia* modulent des gènes de l'hôte liés à l'initiation de la nodulation et de leur développement, utilisant les protéines AGO de l'hôte [85].

## Chez les champignons

Les champignons sont des organismes eucaryotes et possèdent donc des petits ARNs non-codants proches de ceux des plantes avec quelques exceptions. La biogenèse de petits ARNs peut être dépendante ou indépendante des enzymes DCL [86]. Ces ARNs ont souvent été étudiés dans le cadre d'interactions plante-champignon, notamment d'espèces fongiques pathogènes. Prenons l'exemple de *Botrytis cinerea*, ce champignon est capable de réprimer l'expression de gènes immunitaires chez *A. thaliana* et chez la tomate, en utilisant les protéines AGO de la plante [75]. Ces petits ARNs sont produits grâce aux DCL1 et DCL2 [74]. Le pathogène fongique *Verticillium dahliae* utilise également l'envoi de petits ARNs pour inhiber les gènes de défense de la plante, tout en utilisant les protéines AGO végétales [74].

Pendant un temps, l'existence de miARNs chez les champignons était discutée. Aujourd'hui, le terme "milRNA", pour miRNA-like RNA, est utilisé pour se référer aux miARNs fongiques. Ces derniers présentent des différences avec les miARNs d'autres eucaryotes, tout comme les miARNs de plantes diffèrent des miARNs d'animaux. Ces milRNAs présentent toutefois de nombreuses similarités avec les autres miRNAs. Par exemple,



le champignon filamentueux *Neurospora* synthétise des milRNAs grâce aux mêmes enzymes Dicer, à partir de précurseurs en épingle à cheveux et leurs cibles ne sont pas parfaitement complémentaires [86]. Cette étude a montré que les milRNAs fongiques peuvent être synthétisés à l'aide de diverses protéines : (i) comme chez les plantes, avec des protéines Dicer pour la transformation du pre-miARN ; (ii) avec des protéines Dicer, QDE-2, QIP et MRPL3 ; (iii) avec MRPL3 et partiellement avec une Dicer ; et (iv) avec QDE-2, indépendamment de Dicer [86]. C'était la première étude à montrer que les miARNs existaient dans toutes les branches eucaryotes, tout en signalant la diversité de protéines possible impliquées, ce qui pourrait élargir notre définition d'un miARN.

Par la suite, la découverte de milRNAs a continué d'années en années : chez le phytopathogène *Sclerotinia sclerotiorum* [87] ; chez *Puccinia striiformis f. sp. tritici* [88] ; chez *V. dahliae* [89]. Un article récent a utilisé un outil de prédiction pour identifier des milRNAs dans 13 génomes fongiques, résultant en 262 milRNAs potentiels, ciblant des gènes de plantes ou des gènes de tolérance aux stress [90].

### Chez d'autres microorganismes

Dans le monde microbien, les champignons et les bactéries ne sont pas les seuls à produire des petits ARNs non-codants. Toutes les archées investiguées en produisent, de taille variable entre 50 et 500nt, capables de cibler un ARNm en 5' ou en 3' et sont ainsi impliqués dans de nombreux processus biologiques, notamment d'adaptation aux conditions extrêmes [91]. Tout comme les bactéries, les archées ont également un système de défense basé sur l'ARN, sur le système CRISPR, et sur des fragments dérivés d'ARNt [91], considérés comme régulateurs chez les bactéries.

Les oomycètes peuvent aussi produire des petits ARNs, notamment dans le cas d'oomycètes phytopathogènes, comme *Hyaloperonospora arabidopsis*, qui utilise les protéines AGO et le complexe RISC de la plante hôte en combinaison avec ses propres petits ARNs, pour perturber l'immunité végétale [92].

Dans l'idée de la plante comme holobionte, il a été évoqué plus haut qu'une certaine coordination des membres de ce système était nécessaire. Cette régulation paraît encore plus évidente dans le cadre de l'hologénome, car chaque membre du système, et donc leur génome, participe à une sorte de co-évolution entre l'hôte et les microorganismes associés. Cette évolution est permise car les différents partis parlent et comprennent la même langue. Du moins, les membres de l'holobionte s'adaptent de façon synchronisée durant des stress environnementaux. Des études récentes ont en effet montré que la tolérance des

plantes aux stress abiotiques dépend davantage d'une modification de l'holotranscriptome, notamment dans les voies liées aux interactions avec les microbes, que du métabolisme de la plante elle-même [93]; [94]. De par son ancienneté et son universalité, les molécules d'ARN semblent particulièrement pertinentes comme alliées de cette coordination de l'holotranscriptome. Plus précisément, les petits ARNs non-codants, et notamment les miARNs, jouent probablement un rôle insoupçonné, comme molécule signal, au sein de l'holobionte et de l'hologénome plante-microbiote. Cette proposition est détaillée davantage dans notre article d'opinion, inséré dans l'introduction spécifique à la thèse.

**Idées similaires ailleurs...**

Quelques articles de review et d'opinion proposent une vision très similaire, souvent généralisée aux petits ARNs et leur rôle dans les échanges inter-règne. En voici la synthèse de quelques unes :

- ◆ Legüe & Calixto stipulent que les petits ARNs sont capables d'instaurer des changements précis et héréditaires dans l'holobionte et que leur exportation, leur transport et leur import entre l'hôte et le microbiote sont des processus actifs et précis. Ils proposent l'utilisation du modèle nématode *Caenorhabditis elegans* pour étudier ces mécanismes, notamment par le dual RNA-seq afin d'étudier l'holotranscriptome [95].
- ◆ Leitão, *et al.*, passent en revue le rôle des ARNs régulateurs échangés entre cellules, puis se penchent sur leur rôle entre individus d'un holobionte, en prenant l'exemple du corail, des plantes, puis des mammifères. Ils poussent l'analyse en évoquant l'échange d'ARNs régulateurs entre les membres du microbiote. Ils concluent que les ARNs régulateurs sont des messagers fonctionnels, échangeables entre espèces distinctes, qui coïncident parfaitement avec l'idée de régulateurs de l'hologénome [96].
- ◆ Layton, *et al.*, proposent que les miARNs faciliteraient la communication inter-règne, en évoquant des arguments très similaires à ceux que nous proposons concernant l'échange de miARNs entre la plante et son microbiote. Ils se réfèrent notamment aux études ayant montré l'impact des miARNs de plantes sur le microbiote intestinal humain. Ils évoquent également les vésicules qui permettent de protéger et transporter les miARNs entre les individus [72] (Figure 12).

Les miARNs représentent une nouvelle voie de communication plante-microorganisme à explorer. Au-delà d'une compréhension augmentée des interactions plante-microorganismes, les miARNs pourraient être un **nouvel outil dans l'ingénierie du microbiote des plantes**. Ceux-ci complèteraient parfaitement notre arsenal de technologies inter-règnes

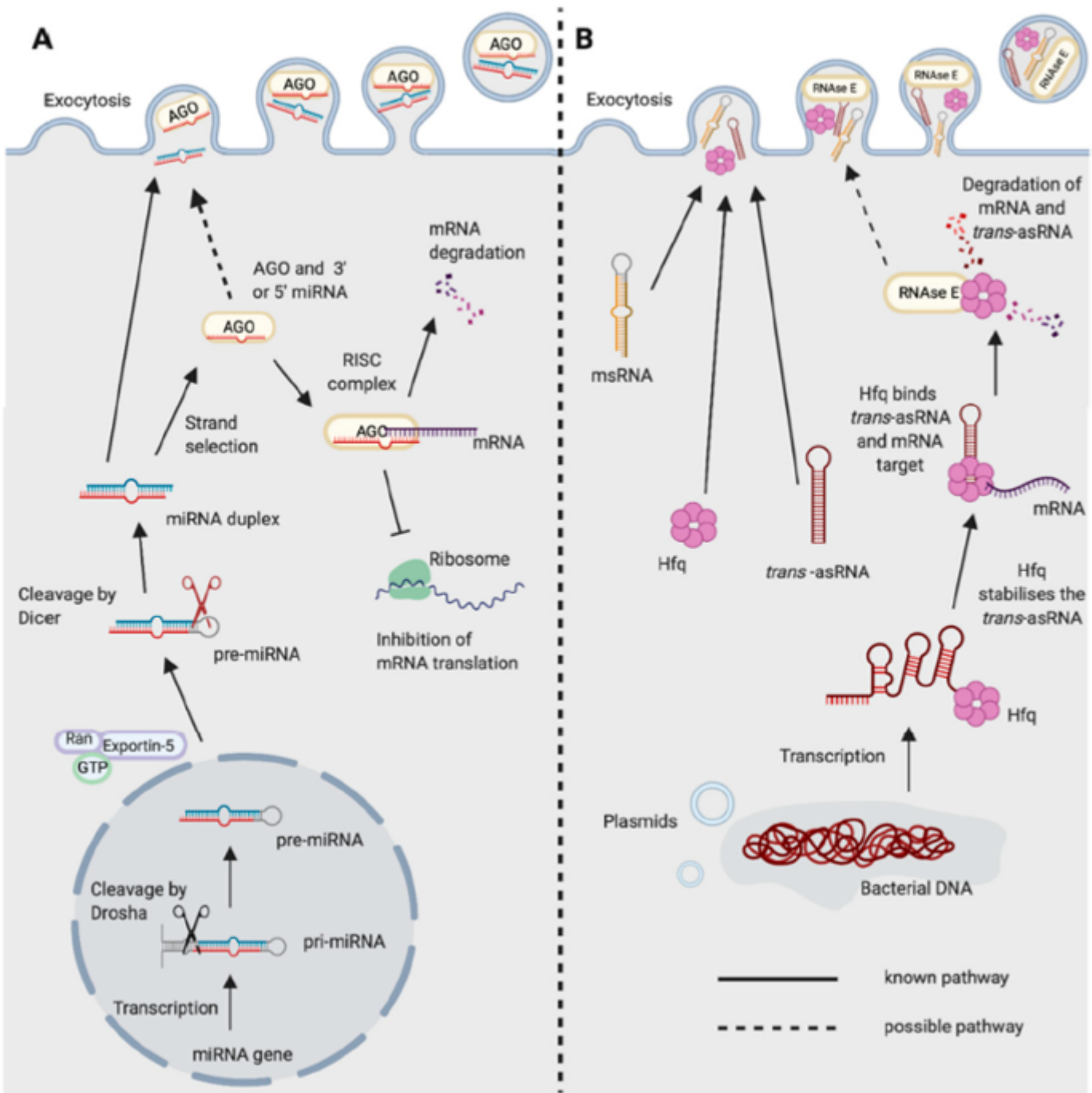


FIGURE 12 – Démonstration de l’universalité des miARNs chez les Eucaryotes (A) et les msRNAs chez les bactéries (B). A noter qu’il n’est pas certain que les miARNs soient chargés dans les protéines AGO avant l’exocytose. Idem pour les bactéries, il n’est pas encore établi que la RNase E soit transportée dans les vésicules bactériennes. Figure tirée de la revue Layton, *et al.*, 2020 [72].

d'interférence par l'ARN, permettant de réguler des gènes de virulence et de contrôler certaines maladies. Par chance, il existe déjà un outil biologique qui permet de moduler les miARNs : les miPEPs.

### 3.4 Les miPEPs, un outil d'ingénierie du microbiote ?

Les **miRNA-encoded peptides** ou “miPEPs” sont des petits peptides régulateurs, encodés dans les pri-miARNs [97]. Leur rôle est d'augmenter la transcription du pri-miARN dans lequel ils sont encodés. L'application sur une plante d'une molécule miPEP de synthèse entraîne une transcription augmentée du pri-miARN correspondant et des changements phénotypiques, selon le miPEP, sa concentration et l'espèce végétale traitée [97].

Les mécanismes précis de biosynthèse des miPEPs ont été découverts très récemment. Les pri-miARNs contiennent plusieurs cadres ouverts de lecture (open reading frames, ORF) codant pour un miPEP, appelés des “miORFs”, dont le premier est le seul exprimé [98]. La transcription d'un gène *MIR* peut engendrer la production de trois types de pri-miARNs (Figure 13) : des longs transcrits, des transcrits courts et des transcrits alternativement épissés [98]. Les longs transcrits s'accumulent dans le noyau et produisent les pre-miARNs, puis les duplexes de miARNs matures. Bien que possédant des miORFs, la production de miPEP ne semble pas être leur fonction principale. Les transcrits courts et les transcrits épissés ne possèdent pas l'information génétique pour produire des miARNs matures. Cependant, ils ont des miORFs et sont systématiquement exportés dans le cytoplasme, ce qui suggère que ces transcrits sont plutôt destinés à la production de miPEPs hors-noyau.

Les miPEPs sont particulièrement intéressants comme outil de recherche de par leur **spécificité d'action** sur leur miARN correspondant, liée à l'interaction physique entre le miPEP et le miORF associé, du moins dans le noyau [98]. Cette spécificité ne concerne pas une famille de miARNs, mais bien un membre unique. Leur utilisation, engendrant la sur-expression d'un miARN particulier, pourrait remplacer la construction et l'utilisation de certains mutants végétaux, facilitant la recherche d'un point de vue technique.

L'utilisation des miPEPs en agronomie semble très probable, ces peptides ayant une action spécifique sur un gène cible, dans une plante donnée. L'idée serait d'appliquer des miPEPs qui modifieraient l'activité de miARNs d'intérêt, associés à une tolérance accrue à un stress ou associés à un phénotype désirable.

La liste des miARNs impliqués dans la **tolérance des plantes aux stress biotiques**

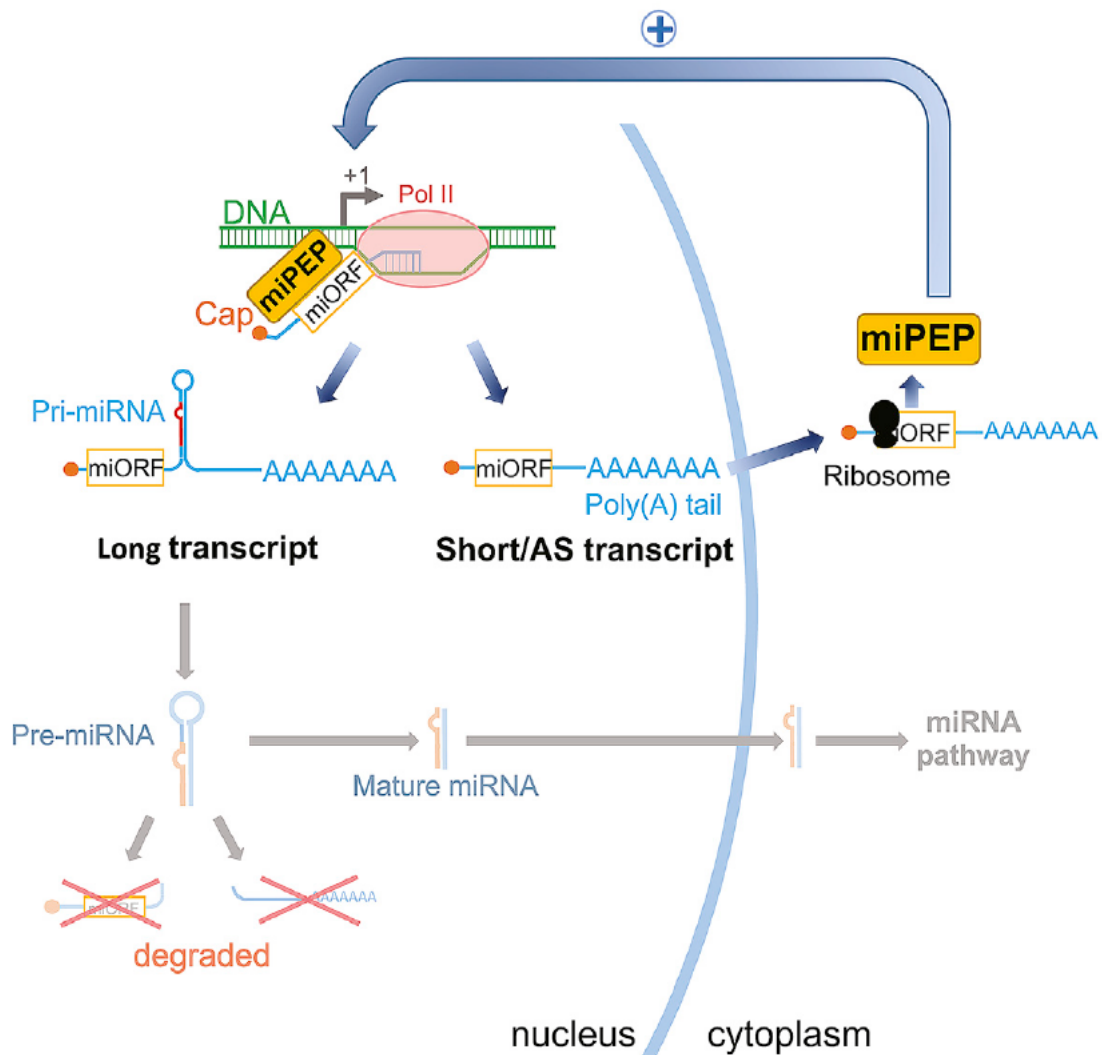


FIGURE 13 – Récapitulatif des différents transcrits issus des gènes *MIR*, résultant en des transcrits longs, des transcrits courts et des transcrits alternativement épissés. Ces derniers seraient traduits en miPEPs, en dehors du noyau. Abstract graphique de l'article Laressergues, *et al.*, 2022.

**et abiotiques** est longue et donne une idée des miARNs qu'il serait pertinent de pouvoir contrôler, *via* l'utilisation de miPEPs. De nombreux miARNs participent à la réponse de la plante aux stress abiotiques, que ce soit la sécheresse, la salinité, le froid, les métaux lourds, l'hypoxie ou les UVs [99]. Le stress environnemental induit des variations d'expression de ces miARNs qui induisent soit l'inhibition de régulateurs négatifs de la tolérance au stress soit l'accumulation de régulateurs positifs [99]. En effet, beaucoup de miARNs sensibles aux stress ciblent des facteurs de transcription. Il est donc nécessaire de comprendre les cascades de réactions entraînées par l'utilisation d'un couple miPEP/miARN, dans des conditions données, spécifiques au couple en question, au stress à combattre, aux tissus et aux plantes ciblées. La lutte contre des stress biotiques pourrait se révéler être plus complexe sur le long terme, car il faut tenir compte des stratégies d'adaptation rapides des microorganismes pathogènes. Prenons l'exemple du coton et de *V. dahliae* [100], nous connaissons les miARNs responsables de l'inhibition des gènes de virulence fongiques et nous pourrions être tentés de produire les miPEPs associés, puis de les appliquer en champs pour créer un anti-fongique basé sur cette aptitude naturelle de la plante. Avant d'amener cette technologie "verte" dans l'environnement, il serait toutefois pertinent d'évaluer la durée de son efficacité avant que le microorganisme ciblé ne s'adapte en proposant une contre-mesure, potentiellement néfaste pour la culture.

Concernant l'amélioration des rendements, l'application de miPEPs sur des plantes a déjà commencé en laboratoire. Chez *A. thaliana*, le miPEP858a augmente l'expression du miR858a, entraînant une accumulation de flavonoïdes, inhibant le transport d'auxine, causant un **allongement des racines** [101]. Chez *Medicago truncatula*, le miPEP171b augmente l'expression du miR171b qui est un miARN protecteur, car il empêche sa cible de se faire cliver par les autres membres de la famille miR171 [102]. Le miR171b cible, et donc protège, le gène *LOM1*, qui est un régulateur positif de la symbiose par les AMFs. Ainsi, l'application du miPEP171b **améliore la mycorhization** de la luzerne par *Rhizophagus irregularis* [102]. Ce dernier exemple montre le potentiel des miPEPs comme outil pour l'ingénierie du microbiote. L'idée serait d'identifier des miARNs de plantes utiles soit pour le recrutement de microorganismes bénéfiques, soit pour l'activation de fonctions bénéfiques liées au microbiote de la plante. Une fois ces miARNs caractérisés, les miPEPs associés pourraient être synthétisés en laboratoire, puis appliqués sur les plantes pour **optimiser son microbiote**.

### 3.5 Autres applications basées sur les miARNs

Hormis les miPEPs, d'autres outils basés sur les mécanismes d'interférence par miARNs existent. Beaucoup d'approches sont basées sur le **silencage des gènes** par des petits ARNs, c'est le cas des outils HIGS (Host-Induced Gene Silencing) ou SIGS (Spray-Induced Gene Silencing) [103]. Le principe de **HIGS** est de modifier la plante pour qu'elle exprime un ARN qui ciblera un gène de virulence chez un pathogène donné. Par exemple, pour produire un miARN particulier dans une plante, il est possible de réaliser un insert codant pour un pre-miARN dans le génome, résultant en la production et la maturation naturelle de **miARNs artificiels** d'intérêt, afin de contrôler certains pathogènes [104].

Dans une étude, Wang, *et al.*, ont démontré que les deux outils, HIGS et SIGS, pouvaient être efficaces contre l'agent de la pourriture grise, *B. cinerea*, responsable de nombreuses pertes de produits cultivés. Pour contrer les petits ARNs excrétés par le phytopathogène et la virulence associée, l'application de petits ARNs ou d'ARNs double-brins qui ciblent les gènes *DCL1* et *DCL2* de *B. cinerea*, a effectivement permis de combattre la maladie [74]. De même, la transformation génétique d'*A. thaliana* et de la tomate, pour qu'elles sécrètent des petits ARNs ciblant ces gènes fongiques, a également atténué la virulence et le développement de *B. cinerea* [74].

Les outils ci-dessus ont pour objectif d'inhiber l'expression du gène ciblé par un miARN ou un autre petit ARN. Mais certaines techniques consistent à **empêcher l'action du miARN**. Dans le cas de certains stress ou en vue d'augmenter les rendements, il peut être pertinent d'empêcher le silencage de gènes ciblés par un miARN [105]. Certaines stratégies sont basées sur la fabrication de **fausses cibles**, comme le target mimicry (TM) ou le short-tandem target mimic (STTM) sont des techniques permettant de bloquer la fonction d'un miARN, par des processus de séquestration [105]. D'autres stratégies reposent sur la séquestration du miARN en question, comme les ARNs circulaires [64] ou les competing endogenous ARNs [106], aussi appelés des **“éponges” à miARN**.

## Introduction spécifique à la thèse

La revue de littérature présentée ci-dessus converge notre intérêt vers les miARNs, qui semblent être des candidats probables comme médiateurs de la communication inter-règne entre la plante et son microbiote et comme coordinateurs génétiques au sein de l'hologénome. Nous avons résumé nos arguments théoriques, ainsi qu'un certain nombre d'études en appui à notre démonstration, dans un article d'opinion intitulé « Rhizos-



pheric Plant–microbe Interactions : miRNAs as a Key Mediator » [107]. Cet ensemble d'informations a mené à l'établissement d'une hypothèse générale pour guider ce travail de thèse.

### **3.6 Article d'Opinion**

## Opinion

## Rhizospheric Plant–Microbe Interactions: miRNAs as a Key Mediator

Harriet Middleton,<sup>1,\*</sup> Étienne Yergeau,<sup>2</sup> Cécile Monard,<sup>1</sup> Jean-Philippe Combier,<sup>3</sup> and Abdelhak El Amrani<sup>1</sup>

The importance of microorganisms in plant development, nutrition, and stress resistance is unquestioned and has led to a more holistic approach of plant–microbe interactions, under the holobiont concept. The structure of the plant microbiota is often described as host driven, especially in the rhizosphere, where microbial communities are shaped by diverse rhizodeposits. Gradually, this anthropogenic vision is fading and being replaced by the idea that plants and microorganisms co-shape the plant microbiota. Through coevolution, plants and microbes have developed cross-kingdom communication channels. Here, we propose that miRNAs are crucial mediators of plant–microbe interactions and microbiota shaping in the rhizosphere. Moreover, we suggest, as an alternative to generally unsuccessful strategies based on microbial inoculants, miRNAs as a promising tool for novel holobiont engineering.

### Cross-Kingdom Communication in the Rhizosphere via miRNAs

Plant-associated microorganisms are essential for the well-being of plants: they have a crucial role in plant development, nutrition, and resistance to various stresses [1]. Notably, the **rhizosphere** (see [Glossary](#)) provides a rich environment in which diverse microbial communities, including plant-beneficial microorganisms, live abundantly, in close relation with the plant. Together, a plant and its associated microbes form a coordinated unit, referred to as a **holobiont** [2]. For this association to remain coordinated, it is necessary to have some form of regulation within and between the microbial communities and the plant. Currently, there is a gap in our knowledge with regards to the assembly and composition dynamics of the rhizospheric **microbiota**. Generally, it is thought that the plant performs a selection of its microbial partners through the influence of its **rhizodeposits**, especially its **root exudates** [3]. However, this unidirectional selection is starting to be questioned [4]. Indeed, the **coevolution** of the plant–microbe holobiont suggests a bi-directional communication, notably regarding the shaping of the rhizospheric microbiota. The composition and function of these communities are modulated by a variety of molecules and signals [5]. Over the past few years, a growing interest in small RNAs (sRNAs, [Box 1](#)), more specifically miRNAs, as mediators of cross-kingdom communication has emerged [6]. Conveyed by **extracellular vesicles** (EVs), mammalian host miRNAs and dietary plant miRNAs have been implicated in regulating the intestinal microbiota by modulating both bacterial gene expression and species abundance [7–9]. In terms of the commonalities between the gut microbiota in animals and the rhizospheric microbiota in plants [10,11], combined with their key role in holobiont nutrition and health, and the universality of the RNA ‘language’, the implication of miRNAs in plant–rhizospheric microbiota **cross-kingdom** interactions is plausible, but completely understudied.

In this opinion paper, we suggest that miRNAs, conveyed by EVs, constitute a cross-kingdom bi-directional communication channel between the plant and its associated rhizospheric microorganisms ([Figure 1](#), Key Figure). Supported by experimental evidence of the connection between

### Highlights

Plants interact with a diversity of microbes, especially in the rhizosphere. The plant and its associated microbes form a coevolved unit called the ‘holobiont’, implying the emergence of bi-directional interkingdom communication channels.

miRNAs may be key mediators of plant–microbe interactions, because they are well conserved throughout the living, can be conveyed by extracellular vesicles over long distances, and are part of interkingdom interactions.

Plant miRNAs are taken up by gut microbiota and phytopathogens, resulting in the modulation of microbial gene expression and, hence, of microbial community activity and composition. In return, microbial miRNA-like RNAs target plant genes and act on their fitness.

<sup>1</sup>University of Rennes 1, CNRS/UMR 6553/OSUR, Ecosystems - Biodiversity - Evolution, 35042 Rennes Cedex, France

<sup>2</sup>Institut National de la Recherche Scientifique, Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Laval, H7V 1B7, Canada

<sup>3</sup>Laboratoire de Recherche en Sciences Vegetales, UMR 5546, UPS, CNRS, Auzouville-Tolosane 31320, France

\*Correspondence: [harriet.middleton@univ-rennes1.fr](mailto:harriet.middleton@univ-rennes1.fr) (H. Middleton).



plant miRNAs and the intestinal microbiota [9] and between plant miRNAs and pathogens [12–15], we propose that miRNAs are implicated in shaping the abundance, composition, functions, and activities of the rhizospheric microbiota.

### What Shapes the Rhizospheric Microbiota?

From the very start of their lives, as a seed and then through all stages of development, from root to shoot, plants are surrounded and populated inside and outside by microorganisms. The significant role of these microorganisms in the survival and growth of the plant is fully accepted and has been thoroughly reviewed elsewhere [1]. Moreover, plant-associated microbes allow the plant to better adapt to its environment [16]. The plant microbiota can be acquired not only from the environment through horizontal transmission, but also directly in the seed from the parent, through vertical transmission [17]. The environmental acquisition of microbes and the laws governing their assembly in the plant holobiont are poorly understood. It is generally thought that, during root penetration of the bulk soil, the soil microbiota gradually differentiates into the rhizospheric microbiota through contact with rhizodeposits, which greatly impact the composition of the microbiota by, for example, having antimicrobial properties or by serving as a **substrate** [18]. After this first community shift, the microbiota composition is fine-tuned not only in a compartment-specific manner (i.e., endosphere, rhizoplane, or rhizosphere) [16], but also depending on host genotype. Indeed, characteristics determined by plant genetic factors, such as root morphology and root exudate quality and quantity, shape the rhizospheric microbiota [3]. In addition, other factors, such as the plant immune system, plant developmental stage, and season, were shown to be involved in shaping the rhizospheric microbiota [19]. The

#### Box 1. Overview of Plant and Microbial Small RNAs

Plants produce a variety of sRNAs, each capable of regulating gene expression through different silencing pathways. These 21–24-nucleotide RNAs originate from hairpin precursors or double-stranded RNA (dsRNA), which are processed by an RNase III Dicer-like protein (DCL) forming sRNA duplexes, with 2'-O-methylation at 3' ends, which in turn are loaded into Argonaute (AGO) proteins to function and repress the expression of target RNAs of complementary sequence [65]. Plant sRNAs encompass small interfering RNAs (siRNAs) and miRNAs.

siRNAs transcripts are converted by an RNA-dependent RNA polymerase (RDRP) into long dsRNAs, which are then processed by DCL proteins into a siRNA duplex. Plant siRNAs are categorized into secondary siRNAs and heterochromatic siRNAs (hetsiRNAs). They are involved in post-transcriptional gene silencing (PTGS), but mostly in RNA-directed DNA methylation (RdDM) and transcriptional gene silencing (TGS) [65].

miRNAs encoded by MIR genes are transcribed by RNA polymerase II (Pol II) into a hairpin structure, the primary-miRNA (pri-miRNA). A DCL protein then processes pri-miRNA into a smaller stem-loop structure, precursor-miRNA (pre-miRNA), which is processed again by DCL protein, forming a mature miRNA duplex (Figure 1). Once loaded into AGO proteins, forming the multiprotein RNA-induced silencing complex (RISC), miRNAs can then repress target gene expression by mRNA cleavage or translation inhibition [65].

Together, plant sRNAs, especially miRNAs, are involved in many regulatory processes and have essential roles in plant development and resilience to stresses. The conservation of miRNA or miRNAs and their mechanisms across the branches of life suggests their importance for many organisms and their potential role as mediator of cross-kingdom communication.

For instance, in the rhizosphere, the plant interacts with diverse microorganisms, capable of producing miRNAs. Similarly to eukaryotic miRNA, bacterial ~22-nucleotide RNA fragments, namely msRNA, obtained from hairpin structures have been discovered [37,38,66] (Figure 1), but their function remains unknown, even though their abundance suggests an important functional role. Aside msRNAs, bacteria have a variety of sRNAs, mainly characterized as *trans*-acting sRNA and *cis*-acting sRNA, but many new bacterial small regulatory RNAs are to be defined [67].

Fungi are eukaryotic organisms and have diverse sRNAs; however, it is still under debate whether they produce miRNAs. Most studies have demonstrated the presence of miRNA in fungi, which are not produced by the same biogenesis pathway as real miRNAs (Figure 1) [33,68]. Interestingly, the evolutionarily ancient lineage of oomycetes also has miRNAs [36,69].

### Glossary

**Coevolution:** process during which two or more species, sharing a close ecological relationship, evolve simultaneously.

**Cross-kingdom:** involves species from distinct taxonomic high ranks (i.e., animals, plants, fungi, protists bacteria, or archaea).

**Dispersal:** the movement of species between communities, from one site to another.

**Drift:** random change in population size due to births and deaths, which can happen in small, low-diversity communities.

**Extracellular vesicles (EVs):** spherical structures with a lipid membrane, comprising microvesicles to exosomes, ranging from 30 nm to 1000 nm in diameter, secreted by a diversity of organisms. Plant EVs range mostly from 20 nm to 500 nm. EVs are involved in intercellular communication because they contain and transport proteins, lipids, nucleic acids, and other molecules.

**Holobiont:** originally termed by Lynn Margulis as an organism, animal, or plant and its symbiotic associations; 'holobiont' now refers to a host macrobe and, more generally, its numerous associated microbes.

**Horizontal gene transfer (HGT):** a mechanism of gene exchange between bacterial cells.

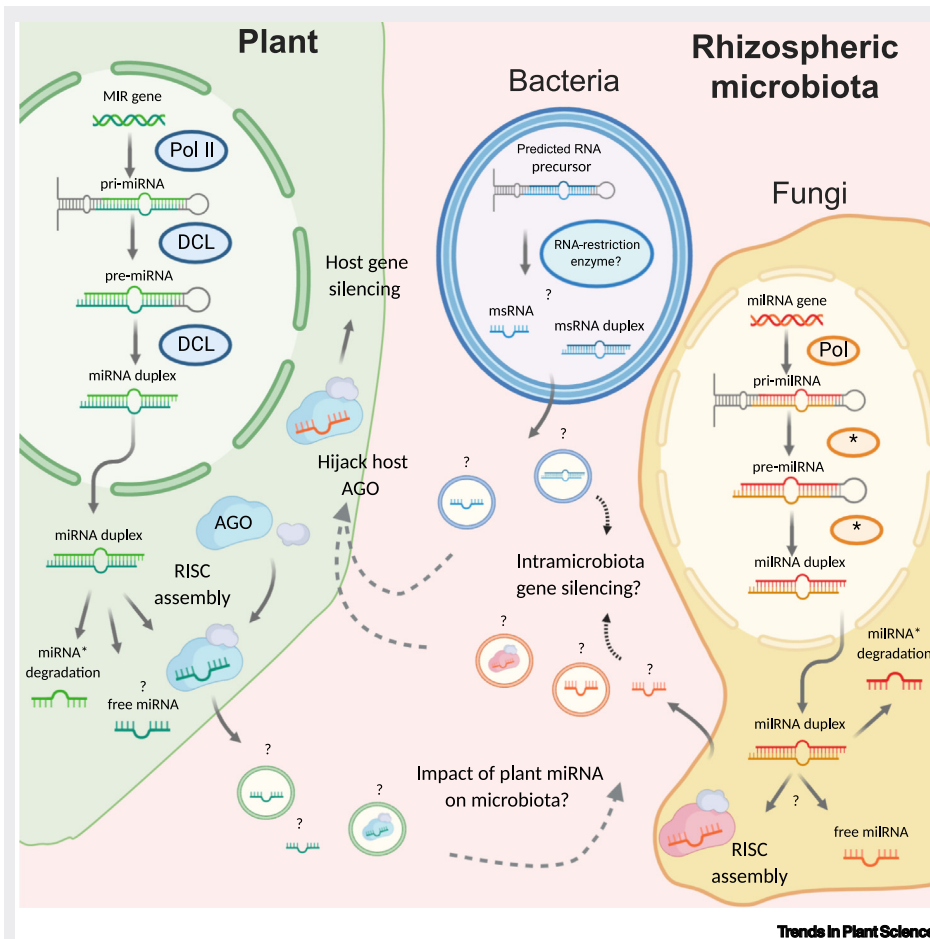
**Inoculum (pl. inocula):** microbial sample destined to be added to a plant or soil, for example.

**Microbial amplification/reduction:** an increase/decrease, respectively in numbers of a certain group of associated microbial species, due to environmental conditions; also known as 'enrichment/depletion'.

**Microbiota:** community of microorganisms living in a specific region (e.g., human intestine, skin or the rhizosphere).

**Rhizodeposits:** variety of carbon- and nitrogen-rich compounds released by roots into their environment (root cells, mucilage, root exudates, soluble lysates, and volatile compounds), responsible for shaping the rhizosphere microbiota [18].

**Rhizosphere:** portion of soil surrounding the root system, greatly influenced by the plant, notably via its rhizodeposits. Microorganisms living in this habitat differ from those living on the rhizoplane (root surface) or in the endosphere (inside plant tissues).



**RNAi:** eukaryotic process of gene silencing at the post-transcriptional level by small noncoding RNAs [siRNA, miRNA, and piwi-interacting (pi)RNA]. Prokaryotes have similar mechanisms, such as miRNA regulatory systems and CRISPR-associated systems [64].

**Root exudates:** a class of rhizodeposits secreted by plants in the meristematic region of root tips, such as sugars and amino acids, but also including organic acids, nucleotides, peptides, fatty acids, and secondary metabolites. The composition of root exudates depends on plant genotype, its developmental stage, and environmental conditions [3].

**Selection:** result of biotic and abiotic influence on the reproductive success (i.e., fitness) of an individual or species. This is the most studied process regarding microbial community composition differences, due to plant exudates or environment, whereas the study of drift, dispersal, and speciation in the microbial field is more complex, or even impossible, to approach [20].

**Speciation:** evolutionary process through which novel species form.

**Substrate:** nutritious substance used by microorganisms to grow and feed on to meet their nutritional requirements.

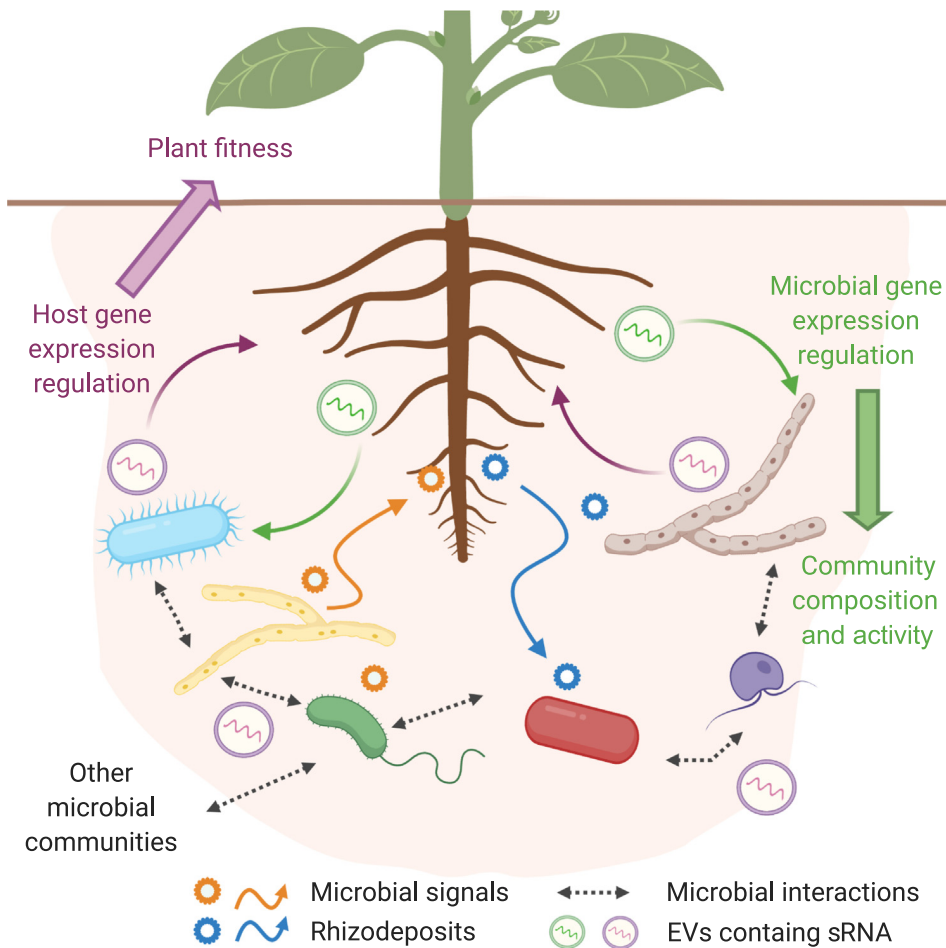
**Figure 1. A Comparison of miRNA and miRNA-like (mil)RNA Biogenesis in Plants and Microbes.** This figure compares miRNA production and interspecies exchanges (dashed arrows) in the rhizosphere. The biosynthetic pathway of plant miRNAs has been extensively studied and comprises mainly Dicer-like protein (DCL) and Argonaute (AGO) proteins. Fungi produce milRNA through at least four different mechanisms [33]: after transcription of milRNA genes, the processing of primary (pri)-miRNA into mature milRNA involves a combination of enzymes (represented by \*), such as Dicer, QDE-2 (an Argonaute protein), MRPL3 (an RNase III), and the exonuclease QIP. Interestingly, there is a Dicer-independent miRNA biogenesis pathway, which provides an opportunity to consider miRNA production in bacteria and archaea that lack Dicer enzymes, but do have Argonaute-like proteins [33]. Although details of bacterial msRNA biogenesis are still to be revealed, multiple studies have predicted similar hairpin RNA precursors, validated by both msRNA and msRNA\*. It is suggested that an RNA-restriction enzyme, such as MazF found in *Escherichia coli*, is involved in msRNA processing [38]. Once the mature miRNA is synthesized, many questions remain as to their movement and function between species: are they transported in extracellular vesicles (EVs) and/or in outer membrane vesicles (OMVs)? Do they travel bound to an AGO protein or freely? What is the role of plant miRNAs in the microbiota? What microbial genes are targeted and for what purpose? How does this regulation shape the microbiota? In return, fungal small RNAs have been shown to use plant AGO proteins to silence host genes, although it is unknown whether bacteria also use this mechanism.

existence of a core microbiota in certain plants, regardless of soil origin and fertilization regimes, further suggests that the assembly and selection of these communities is at least partly plant driven [19].

Even though the assembly of rhizospheric microbial communities seems to be mainly the result of **selection**, it is important to consider the other processes of community assembly: **dispersal**, **drift** and **speciation** [20]. It is suggested that these processes modulate, at varying degrees

**Key Figure**

**Model of Cross-Kingdom Interactions in the Rhizosphere through Exchanges of Extracellular Vesicles (EVs) Containing Small RNA (sRNA)**



**Trends In Plant Science**

**Figure 1.** A suggested representation of plant–microbe interactions in the rhizosphere: the selective power of the host plant is demonstrated through the rhizodeposits (in blue), which have a significant role in shaping the microbiota. Rhizodeposits are diverse in form and function and allow signaling with other organisms and their environment. Microbe development in the rhizosphere depends on these compounds and is somewhat regulated by them, because microbes feed preferentially on certain rhizodeposits as substrates. In turn, microbes produce a variety of signaling molecules (in orange) such as volatile organic compounds, phytohormones, quorum-sensing molecules, and so on, which are perceived by the plant. We suggest that plants and microbes also communicate via EVs, which contain sRNAs, and notably miRNAs or miRNA-like (mil)RNAs. Host plant EVs containing miRNA (in green) can modulate microbial gene expression to their advantage by regulating community composition and activity (bold green arrow, representing the effect of miRNA-mediated regulation). In return, microbes can also regulate host plant gene expression through their EVs containing miRNA (in purple), thus controlling their close environment and plant fitness (bold purple arrow). Additionally, the rhizospheric microbiota members also interact among themselves and with other microbial communities (black dashed arrows), potentially through EVs containing small RNAs. Not to scale.

during plant development, the establishment of microbial communities in the rhizosphere [20]. Changes in the microbiota and its functional diversity are not the sole result of the acquisition of novel microbial strains, selected by the host plant. Such variations in the holobiont are also the consequences of specific **microbial amplification/reduction** and **horizontal gene transfer (HGT)** [21]. The combination of these three processes allows rapid adaptation of the plant holobiont to challenging and changing environments. Such shifts from the original microbial communities to communities specifically tailored to the situation have been observed in many studies. For example, under drought stress, the shift in composition of root microbial communities in rice was characterized by a specific enrichment of certain bacterial taxa, known as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and/or drought stress-resistant bacteria [22]. The authors of this study suggested that the change in root exudation, due to drought stress, was the origin of the selective enrichment of certain microbes. In addition to a change in microbial composition, stressful conditions can also impact microbial activity in the rhizosphere. In hydrocarbon-contaminated soils, both microbial composition and activity are modulated via, for example, a specialization of the microbiota, through selective enrichment of hydrocarbon degraders and PGPRs [23], or stimulation of specific microbial activities, such as hydrocarbon degradation, in the microbes already present [24].

The regulation of rhizospheric microbiota is driven not only by plants, but also by the microbes themselves. Indeed, they can modulate the environment of the plant and even reprogram the plant to their advantage via exudation of phytohormones, volatile organic compounds, quorum-sensing molecules, and antimicrobials [5]. Shaping of the rhizospheric microbiota is also based on microbial metabolite substrate preference [25] and interactions between microbial members. Microbial interactions can be based on cooperative mechanisms, such as quorum sensing and metabolite exchange under nutrient-poor conditions, or competitive mechanisms, such as secretion of antimicrobial compounds [19], but it remains unclear which type of interaction dominates communities.

Overall, microbial interactions can induce an alteration in gene expression within the communicating microbes [3]: hence, microbial interactions modulate both the shape and function of the microbiota. Based on their role in regulating plant-associated microbial communities, some argue that symbionts are ecological engineers of the holobiont [4]. Thus, on top of plant regulation of the rhizospheric microbiota, microbial interactions in the rhizosphere also have an essential role in structuring the plant microbiota.

### The Role of miRNAs in Bi-Directional Cross-Kingdom Communication

Between the host plant and the associated microorganisms, there is a constant two-way dialog, adapted to cross-kingdom communication (Box 2). A well-known example is during the

#### Box 2. Plant–Microbe Interactions under the Hologenome Theory

The hologenome theory states that the combined genomes of the holobiont (e.g., the plant genome and the associated microbial genomes) is one of the biological units subjected to natural selection [21]. This concept is mainly based on the fact that: (i) all animals and plants are associated with a diversity of microbes; (ii) a proportion of these microbes is transmitted between holobiont generations; and (iii) host–microbiota interactions impact the holobiont fitness [70]. This theory could explain the speed at which genetic variation happens in holobionts: the microbiota evolves at a fast rate due to short generation times, horizontal gene transfer (HGT), and the arrival of new microbes in the community [21]. The strong bonds established between a host and its microbiota, combined with the power of microbial evolution, must have significant consequences for coevolution and macroevolution mechanisms in the holobiont. In the case of the plant holobiont, coevolution between plant and microbes suggests the existence of cross-kingdom bi-directional communication. Regarding the diversity and dynamics of the rhizospheric microbiota, it is probable that the host plant coevolves with only a portion of its microbiota, namely the core microbiota, which is often characterized as being stable and transmittable to offspring. However, these two-way interactions allow regulation of the hologenome by including the essential roles of both plant and microbes in holobiont fitness.

establishment of the rhizobium–legume symbiosis, in which the plant produces flavonoids that induce bacterial *nod* genes, resulting in the secretion of Nod factors, which in turn initiates nodule formation, which house the rhizobacteria that will then fix atmospheric nitrogen and transfer it to the plant [26,27].

As discussed previously, a plethora of signaling molecules are exchanged in the rhizosphere. Interestingly, most microbial signaling molecules used to communicate with the host plant are also part of intermicrobial communication [5]. Knowing that these compounds affect plants, in their development or immune system, these signals may allow the microbiota to control the plant, or plants have simply evolved to perceive them. With regards to the holobiont concept, these two possibilities could coexist, because there is constant bi-directional communication between the host and its microbes.

Over the past few years, interkingdom communication studies have bloomed, especially regarding host–microbiota interactions and their implications for human health. Among the different possible mediators of such conversations, sRNAs, more specifically miRNAs, have sparked a growing interest [28] (Box 1).

miRNAs are a class of small noncoding RNAs (~21 nucleotides), implicated in regulating gene expression, either by repressing the translation or by directly cleaving the target mRNA. miRNAs were first discovered in nematodes [29,30], which then led to their identification in organisms ranging from fish to flies and mammals, highlighting their conservation across the animal kingdom [31]. Shortly after, plant miRNAs were described, for the first time, in *Arabidopsis thaliana* [32] and then, miRNA-like RNAs (miRNAs) were characterized in fungi [33] (Box 1).

It was previously thought that miRNAs had appeared with pluricellular organisms and that their function was limited to intercellular communication within a single organism. Since then, miRNAs or miRNAs have also been found in unicellular organisms: first, in *Chlamydomonas reinhardtii* [34,35], then in oomycetes [36] and in bacteria [37], the latter being referred to as miRNA-size small RNA (msRNA) [38]. The discovery of miRNAs in unicellular organisms suggests that miRNA-based gene regulation is an ancient mechanism and could have appeared before the advent of pluricellular life [34]. miRNA, or at least very similar molecules, are indeed evolutionarily well conserved and produced throughout all branches of life.

Moreover, miRNAs are not restricted to intercellular communication within a tissue, organ, or organism: they can be transported over long distances, between individuals and even from one species to another. With regards to other signaling compounds, the ancient and widespread RNA ‘language’ is particularly suited for cross-kingdom communication, because it is used by all organisms that use RNA-based regulation: RNA provides a universally conserved, stable, communication channel [39]. miRNAs, as mediators of such conversations, are conveyed by nanovesicles, generally named EVs, although the term outer membrane vesicles (OMVs) is sometimes used for Gram-negative bacteria [40]. In eukaryotic cells, EVs originate from the fusion of multivesicular bodies with the plasma membrane, whereas bacterial EVs or OMVs are produced through external budding of the bacterial outer membrane [40]. These vesicles function as a protective transportation structure for not only RNA, but also proteins and lipids. Before encapsulation, these molecules are selectively sorted into EVs or OMVs [40], suggesting a functional targeting. Cross-kingdom miRNA exchanges have been described for a multitude of species and interactions (Table 1). Many studies have focused on host–pathogen interactions, often with an emphasis on sRNA-mediated **RNAi** mechanisms, which are conserved virulence mechanisms shared by many pathogens to suppress host immunity [13], whereas the host may target

Table 1. Examples of Cross-Kingdom Communication through sRNAs

Host	Interacting organism	sRNA mobility	sRNA exchanged	sRNA vehicle	Targeted genes	Effect	Refs
Human and mouse	Gut microbiota [ <i>Fusobacterium nucleatum</i> (Fn), <i>Escherichia coli</i> etc.]	From mammalian host to bacteria	miRNA	EVs	dnaK operon, 16S rRNA and rpoB (in Fn); RNase P, rutA, yegH, and fucO (in <i>E. coli</i> )	Regulation of bacterial growth	[7]
	Gut microbiota	From mammalian host to bacteria	miRNA	EVs	$\beta$ -galactosidase, AMUC_RS06985	Upregulation of target gene, enrichment of <i>Akkermansia muciniphila</i> , increasing regulatory T cells and ameliorating multiple sclerosis	[8]
Ginger ( <i>Zingiber officinale</i> )	Gut microbiota ( <i>Lactobacillaceae</i> )	From plant to bacteria	miRNA	Exosome-like nanoparticles	Monooxygenase ycnE	Regulation of bacterial growth and increase in indole-3-carboxaldehyde (I3A)	[9]
Ginger, grapefruit ( <i>Citrus paradisi</i> ), carrot ( <i>Daucus carota</i> ), grape ( <i>Vitis vinifera</i> )	Murine gut cells	From plant to mice	miRNA	Exosome-like nanoparticles	?	Induction of anti-inflammation gene expression	[48]
Soybean ( <i>Glycine max</i> )	Rhizobia bacteria	From bacteria to plant	tRNA-derived small RNA fragments (tRFs)	?	Orthologs of <i>Arabidopsis</i> genes involved in root hair/plant development	Positive regulation of rhizobial infection and nodulation formation in soybean	[71]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	From plant to fungal pathogen	sRNA	EVs	Vesicle-trafficking pathway, vacuolar protein sorting	Decrease in fungal virulence	[72]
Cotton plant ( <i>Gossypium</i> sp.)	<i>Verticillium dahliae</i>	From plant to fungal pathogen	miRNA	?	Virulence genes: Ca <sup>2+</sup> -dependent cysteine protease and an isotrichodermin C-15 hydroxylase	Silencing fungal virulence genes	[12]
Wheat ( <i>Triticum aestivum</i> )	<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i> ( <i>Pst</i> )	From fungal pathogen to plant	miRNA	?	Pathogenesis-related 2 (PR2)	Suppression of plant defenses	[14]
<i>A. thaliana</i> and <i>Nicotiana benthamiana</i>	Parasitic plant <i>Cuscuta campestris</i>	From parasitic plant to host plant	miRNA	?	TIR1, AFB2, and AFB3 (auxin receptors), BLK1 (kinase receptor), SEOR1 (phloem protein), and HSF4 (transcriptional repressor)	mRNA cleavage and secondary siRNA production	[47]

virulence-related genes in the pathogen [41]. Evidence of such host–pathogen interactions were demonstrated between mammals and bacteria [42,43], nematodes and mammals [44], plants and fungi [12,14,15,41,45], plants and insects [46], and between parasitic plants and host plants [47]. Actual bi-directional cross-kingdom RNAi, through sRNA trafficking, was first described between *A. thaliana* and a fungal pathogen, *Botrytis cinerea* [13].

However, an increasing number of studies are now highlighting the role of miRNA exchanges in nonpathogenic relationships, with many focusing on host–microbiota interactions in the gut. Indeed, host miRNAs from intestinal epithelium cells have been shown to impact the composition



of the gut microbiota by specifically entering certain bacteria and regulating the transcription of a range of housekeeping and sugar degradation genes, thereby impacting bacterial growth [7,8]. Interestingly, ingested plants release EVs in the gut, where they are preferentially taken up, along with their content in plant miRNA, by certain target bacteria, inducing a modification of their gene expression [9,48]. In turn, their production and secretion of metabolites may be altered, leading to differential development of bacterial species interacting with these target bacteria [9]. Hence, ingested plants are capable of shaping the gut microbiota of mammals through miRNA-based communication, partly explaining the effect of diet on the gut microbiota.

Given these recent advances in the impact of host miRNAs and plant miRNAs on the gut microbiota, we propose that plants and their rhizospheric microbiota also communicate via miRNAs, regulating microbial composition and activity in the rhizosphere. In addition, it was recently shown that bacterial vesicles can carry their DNA cargo into not only other bacteria [49], a mechanism called 'vesiduction' [50], but also host eukaryotic cells [51]. Hence, it is easily conceivable that mRNA are also conveyed in such a manner and may mediate cross-kingdom communication. Plant miRNAs are tissue specific, and many hundreds are found in the root tissues [52]; thus, it is likely that a subset of these, selected through coevolution with surrounding organisms, would be excreted via EVs in the rhizosphere.

### Holobiont Engineering and Current RNAi Applications

During the current holobiont era, the role of microorganisms in shaping their own communities, alongside the influence of the plant, is becoming a subject of increased interest. In many fields, such as ecological engineering, scientists have aimed to successfully engineer the microbiota of a plant to optimize the ecosystem services provided by the plant holobiont. Many biotech companies worldwide have made significant efforts to create specific **inocula** containing carefully selected microorganisms to improve crop production. However, many of these methods do not translate efficiently from lab to field: inoculated microbes can be in competition with native communities or simply washed away before being able to establish themselves stably. Inoculation of non-native species also raises questions about potential invasive species. Hence, microbiome engineering is slowly evolving into 'holobiont engineering' [53], which is already applied in agricultural practices, such as grafting, organic or low-farming, and plant breeding strategies that include microbiota [54]. Holistic biotechnologies are also being developed, such as approaches based on soil memory [55] or synthetic microbiomes [56]. We suggest that these holobiont engineering techniques could also be based on cross-kingdom communication mediators, such as miRNAs.

Cross-kingdom RNAi technology for crop protection already exists and has been thoroughly investigated, notably host-induced gene silencing (HIGS) which uses genetically modified plants able to express sRNA or double-stranded RNAs (dsRNA) that target specific genes in pathogens [57]. However, HIGS requires the use of genetically modified plants, which is controversial, and even banned in some countries. To counter these issues, environmental RNAi quickly emerged: sRNA or dsRNA are directly applied to the host plant, resulting in both the silencing of specific genes in pathogens and disease control [58]. These environmental RNAi methods are known as spray-induced gene silencing (SIGS). However, SIGS technologies are still in their infancy and encounter many problems, such as penetration, application effects, and production costs: thus, no available SIGS-based products are currently on the market [59,60].

Alternatively, the use of miRNA-encoded peptides (miPEPs) [61,62] as a tool to amplify the expression of specific plant miRNAs, could be an interesting approach. miPEPs are small regulatory peptides, encoded in plant pri-miRNAs (Box 1), capable of enhancing the transcription of their

corresponding miRNA and resulting in a stronger repression of the target mRNA [61]. When synthetic miPEP171b was applied to *Medicago truncatula*, the expression of miRNA171b increased and led to enhanced mycorrhization by *Rhizophagus irregularis* [63]. If our hypothesis, that miRNAs are exchanged between the plant and its rhizospheric microbiota, is confirmed, then the use of miPEPs to stimulate the synthesis and release of certain beneficial plant microRNAs could be a promising tool for many fields in ecological engineering. Indeed, miPEPs could indirectly modulate the rhizospheric microbiota, without the need to add exogenous inocula. Moreover, the application of miPEPs is straightforward and does not require genetic transformation [62], which makes miPEP technology an exciting pathway for holobiont engineering.

### Concluding Remarks and Future Perspectives

Given our current understanding of the role of host and plant miRNA on the composition and activity of the gut microbiota, the universality of the RNA 'language', combined with the potentiality of RNAi technology, our opinion is that miRNAs at least partly shape the rhizospheric microbiota. Such a point of view implies that miRNA-based microbial community manipulation has enormous potential for agriculture, forestry, and environmental remediation. However, more fundamental research is needed to decrypt the implication of miRNAs in plant–microbe communication and especially the impact of plant miRNAs on rhizospheric microbial communities. If our hypotheses are found to be correct, then a new field of perspectives regarding our understanding of plant–microbe interactions and holobiont engineering possibilities will arise, with a plethora of outstanding questions (see [Outstanding Questions](#)).

### References

- Vandenkoornhuise, P. *et al.* (2015) The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytol.* 206, 1196–1206
- Bordenstein, S.R. and Theis, K.R. (2015) Host biology in light of the microbiome: ten principles of holobionts and hologenomes. *PLoS Biol.* 13, e1002226
- Sasse, J. *et al.* (2018) Feed your friends: do plant exudates shape the root microbiome? *Trends Plant Sci.* 23, 25–41
- Uroz, S. *et al.* (2019) Plant symbionts are engineers of the plant-associated microbiome. *Trends Plant Sci.* 24, 905–916
- Venturi, V. and Keel, C. (2016) Signaling in the rhizosphere. *Trends Plant Sci.* 21, 187–198
- Leitão, A.L. *et al.* (2020) Interspecies communication in holobionts by non-coding RNA exchange. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 2333
- Liu, S. *et al.* (2016) The host shapes the gut microbiota via fecal microRNA. *Cell Host Microbe* 19, 32–43
- Liu, S. *et al.* (2019) Oral administration of miR-30d from feces of MS patients suppresses MS-like symptoms in mice by expanding *Akkermansia muciniphila*. *Cell Host Microbe* 26, 779–794
- Teng, Y. *et al.* (2018) Plant-derived exosomal microRNAs shape the gut microbiota. *Cell Host Microbe* 24, 637–652
- Hacquard, S. *et al.* (2015) Microbiota and host nutrition across plant and animal kingdoms. *Cell Host Microbe* 17, 603–616
- Ramírez-Puebla, S.T. *et al.* (2013) Gut and root microbiota commonalities. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2–9
- Zhang, T. *et al.* (2016) Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen. *Nat. Plants* 2, 16153
- Wang, M. *et al.* (2016) Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nat. Plants* 2, 16151
- Wang, B. *et al.* (2017) *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* microRNA-like RNA 1 (*Pst*-miR1), an important pathogenicity factor of *Pst*, impairs wheat resistance to *Pst* by suppressing the wheat pathogenesis-related 2 gene. *New Phytol.* 215, 338–350
- Wang, M. *et al.* (2017) Botrytis small RNA Bc-siR37 suppresses plant defense genes by cross-kingdom RNAi. *RNA Biol.* 14, 421–428
- Bulgarelli, D. *et al.* (2013) Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 807–838
- Shade, A. *et al.* (2017) Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Curr. Opin. Microbiol.* 37, 15–22
- Tian, T. *et al.* (2020) The role of rhizodeposits in shaping rhizomicrobiome. *Environ. Microbiol. Rep.* 12, 160–172
- Hassani, M.A. *et al.* (2018) Microbial interactions within the plant holobiont. *Microbiome* 6, 58
- Dini-Andreote, F. and Raaijmakers, J.M. (2018) Embracing community ecology in plant microbiome research. *Trends Plant Sci.* 23, 467–469
- Zilber-Rosenberg, I. and Rosenberg, E. (2008) Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 723–735
- Santos-Medellin, C. *et al.* (2017) Drought stress results in a compartment-specific restructuring of the rice root-associated microbiomes. *mBio* 8, mBio.00764-17
- Tardif, S. *et al.* (2016) The willow microbiome is influenced by soil petroleum-hydrocarbon concentration with plant compartment-specific effects. *Front. Microbiol.* 7, 1363
- Yergeau, E. *et al.* (2014) Microbial expression profiles in the rhizosphere of willows depend on soil contamination. *ISME J.* 8, 344–358
- Zhalnina, K. *et al.* (2018) Dynamic root exudate chemistry and microbial substrate preferences drive patterns in rhizosphere microbial community assembly. *Nat. Microbiol.* 3, 470–480
- Redmond, J.W. *et al.* (1986) Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. *Nature* 323, 632–635
- Rossen, L. *et al.* (1985) The *nodD* gene of *Rhizobium leguminosarum* is autoregulatory and in the presence of plant exudate induces the *nodA,B,C* genes. *EMBO J.* 4, 3369–3373
- Weiberg, A. *et al.* (2015) Conversations between kingdoms: small RNAs. *Curr. Opin. Biotechnol.* 32, 207–215
- Lee, R.C. *et al.* (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854
- Wightman, B. *et al.* (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855–862

### Outstanding Questions

Are rhizospheric bacteria and fungi able to incorporate plant miRNAs, conveyed or not by extracellular vesicles? If so, can microbial genes be modulated by plant miRNAs? What genes are targeted? To what effect?

Are members of the rhizospheric microbiota capable of producing EVs? If so, do they contain sRNAs, miRNAs, and/or miRNAs? What is the destination of these vesicles: the host plant and/or other members of the community?

Given that miRNA-sized sRNAs exist in bacteria, what are the bacterial mechanisms of RNAi, aside from the CRISPR-mediated system?

To which extent can plant/microbial miRNAs have a role in shaping the rhizospheric microbiota and its associated functions? What roles do plant miRNA have in microbial transcriptomics? Can they affect community activity and/or composition?

Do the secreted miRNAs vary depending on environmental conditions, such as abiotic stresses, to modulate the surrounding organisms accordingly? What are the selective mechanisms involved in miRNA sorting in EVs?

How can we use this potential novel interkingdom communication channel to develop holobiont engineering tools, such as miPEPs? How can these modifications be rendered durable and what are the implications for their long-term use?

31. Wahid, F. *et al.* (2010) MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim. Biophys. Acta BBA Mol. Cell Res.* 1803, 1231–1243
32. Reinhart, B.J. (2002) MicroRNAs in plants. *Genes Dev.* 16, 1616–1626
33. Lee, H.-C. *et al.* (2010) Diverse pathways generate microRNA-like RNAs and Dicer-independent small interfering RNAs in fungi. *Mol. Cell* 38, 803–814
34. Zhao, T. *et al.* (2007) A complex system of small RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genes Dev.* 21, 1190–1203
35. Molnár, A. *et al.* (2007) miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature* 447, 1126–1129
36. Cui, J. *et al.* (2014) Prediction and validation of potential pathogenic microRNAs involved in *Phytophthora infestans* infection. *Mol. Biol. Rep.* 41, 1879–1889
37. Kang, S.-M. *et al.* (2013) Identification of microRNA-size, small RNAs in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* 67, 609–613
38. Lee, H.-J. and Hong, S.-H. (2012) Analysis of microRNA-size, small RNAs in *Streptococcus mutans* by deep sequencing. *FEMS Microbiol. Lett.* 326, 131–136
39. Nelson, J.W. and Breaker, R.R. (2017) The lost language of the RNA world. *Sci. Signal.* 10, eaam8812
40. Choi, J.-W. *et al.* (2017) Tiny RNAs and their voyage via extracellular vesicles: secretion of bacterial small RNA and eukaryotic microRNA. *Exp. Biol. Med.* 242, 1475–1481
41. Gabriel, A.F. *et al.* (2019) Si vis pacem para bellum: a prospective in silico analysis of miRNA-based plant defenses against fungal infections. *Plant Sci.* 288, 110241
42. Blenkiron, C. *et al.* (2016) Uropathogenic *Escherichia coli* releases extracellular vesicles that are associated with RNA. *PLoS One* 11, e0160440
43. Koepfen, K. *et al.* (2016) A novel mechanism of host-pathogen interaction through sRNA in bacterial outer membrane vesicles. *PLoS Pathog.* 12, e1005672
44. Buck, A.H. *et al.* (2014) Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. *Nat. Commun.* 5, 5488
45. Weiberg, A. *et al.* (2013) Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science* 342, 118–123
46. Zhu, K. *et al.* (2017) Plant microRNAs in larval food regulate honeybee caste development. *PLoS Genet.* 13, e1006946
47. Shahid, S. *et al.* (2018) MicroRNAs from the parasitic plant *Cuscuta campestris* target host messenger RNAs. *Nature* 553, 82–85
48. Mu, J. *et al.* (2014) Interspecies communication between plant and mouse gut host cells through edible plant derived exosome-like nanoparticles. *Mol. Nutr. Food Res.* 58, 1561–1573
49. Gröll, M.P. *et al.* (2018) Small extracellular particles with big potential for horizontal gene transfer: membrane vesicles and gene transfer agents. *FEMS Microbiol. Lett.* 365, fry192
50. Soler, N. and Forterre, P. (2020) Vesiduction: the fourth way of HGT. *Environ. Microbiol.* 22, 2457–2460
51. Bitto, N.J. *et al.* (2017) Bacterial membrane vesicles transport their DNA cargo into host cells. *Sci. Rep.* 7, 7072
52. Breakfield, N.W. *et al.* (2012) High-resolution experimental and computational profiling of tissue-specific known and novel miRNAs in *Arabidopsis*. *Genome Res.* 22, 163–176
53. Dessaux, Y. *et al.* (2016) Engineering the rhizosphere. *Trends Plant Sci.* 21, 266–278
54. Bettenfeld, P. *et al.* (2020) Woody plant declines. What's wrong with the microbiome? *Trends Plant Sci.* 25, 381–394
55. Lapsansky, E.R. *et al.* (2016) Soil memory as a potential mechanism for encouraging sustainable plant health and productivity. *Curr. Opin. Biotechnol.* 38, 137–142
56. Vorholt, J.A. *et al.* (2017) Establishing causality: opportunities of synthetic communities for plant microbiome research. *Cell Host Microbe* 22, 142–155
57. Huang, C.-Y. *et al.* (2019) Small RNAs – big players in plant-microbe interactions. *Cell Host Microbe* 26, 173–182
58. Cai, Q. *et al.* (2018) Cross-kingdom RNA trafficking and environmental RNAi — nature's blueprint for modern crop protection strategies. *Curr. Opin. Microbiol.* 46, 58–64
59. Zhang, H. *et al.* (2013) Feasibility, limitation and possible solutions of RNAi-based technology for insect pest control: RNAi-based technology in insect pest control. *Insect Sci.* 20, 15–30
60. Dalakouras, A. *et al.* (2016) Induction of silencing in plants by high-pressure spraying of *in vitro*-synthesized small RNAs. *Front. Plant Sci.* 7, 1327
61. Lauressergues, D. *et al.* (2015) Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides. *Nature* 520, 90–93
62. Couzigou, J.-M. *et al.* (2015) miRNA-encoded peptides (miPEPs): a new tool to analyze the roles of miRNAs in plant biology. *RNA Biol.* 12, 1178–1180
63. Couzigou, J.-M. *et al.* (2017) Positive gene regulation by a natural protective miRNA enables arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Cell Host Microbe* 21, 106–112
64. Shabalina, S. and Koonin, E. (2008) Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends Ecol. Evol.* 23, 578–587
65. Borges, F. and Martienssen, R.A. (2015) The expanding world of small RNAs in plants. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 727–741
66. Zhao, C. *et al.* (2017) Salmonella small RNA fragment Sal-1 facilitates bacterial survival in infected cells via suppressing iNOS induction in a microRNA manner. *Sci. Rep.* 7, 16979
67. Carrier, M.-C. *et al.* (2018) Broadening the definition of bacterial small RNAs: characteristics and mechanisms of action. *Annu. Rev. Microbiol.* 72, 141–161
68. Zhou, J. *et al.* (2012) Identification of microRNA-like RNAs in a plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* by high-throughput sequencing. *Mol. Gen. Genomics.* 287, 275–282
69. Fahlgren, N. *et al.* (2013) *Phytophthora* have distinct endogenous small RNA populations that include short interfering and microRNAs. *PLoS One* 8, e77181
70. Rosenberg, E. and Zilber-Rosenberg, I. (2016) Microbes drive evolution of animals and plants: the hologenome concept. *mBio* 7, e01395-15
71. Ren, B. *et al.* (2019) Rhizobial tRNA-derived small RNAs are signal molecules regulating plant nodulation. *Science* 365, 919–922
72. Cai, Q. *et al.* (2018) Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science* 360, 1126–1129

### 3.7 Hypothèse générale

Au vu de la revue de littérature présentée dans cette introduction de thèse, ainsi que des arguments stipulés dans notre papier d'opinion, il est très probable que les **miARNs** fassent partie des **molécules signal** utilisées dans la **communication entre la plante et son microbiote rhizosphérique**. Ces miARNs seraient capables de moduler la composition et l'activité du microbiote. En parallèle, nous avons formulé une hypothèse supplémentaire qui stipule que les miPEPs pourraient être utilisés *in planta* pour finement modifier le microbiote de la rhizosphère.

### 3.8 Structure et objectifs de la thèse

- ❖ *Chapitre 1* – découverte et exploration du rôle des microARNs dans la rhizosphère  
Dans ce premier chapitre, nous explorons le rôle des miARNs de plantes détectés par séquençage dans la rhizosphère de deux plantes modèles, *Arabidopsis thaliana* et *Brachypodium distachyon*. Notre hypothèse étant que ces miARNs sont incorporés par les microorganismes du sol afin d'y réguler des gènes cibles, nous avons réalisé un isolement de cellules bactériennes de la rhizosphère, puis un séquençage petits ARNs sur ces échantillons. La découverte de miARNs de plantes dans les bactéries de la rhizosphère nous a confortés dans la direction de nos travaux. Après avoir fait pousser des *A. thaliana* mutantes, affectées dans leur biosynthèse de petits ARNs, nous avons réalisé un séquençage 16S et ITS de leurs racines et rhizosphère, afin d'analyser la composition de leur microbiote. La perturbation des petits ARNs *in planta* avait fortement transformé le microbiote de ces plantes, suggérant que ces petits ARNs avaient un rôle à jouer dans la régulation de celui-ci. En parallèle, nous avons mis au point un outil de prédiction des cibles de miARNs de plantes dans des génomes bactériens. Nous avons alors ajouté un mélange de miARNs rhizosphériques synthétiques à des cultures bactériennes pour évaluer l'impact de ces derniers sur la transcriptomique bactérienne. L'expression de nombreux gènes bactériens a été affectée dont quelques-uns qui étaient prédits par notre outil. Ce premier chapitre expose les premiers résultats de découverte des miARNs dans la rhizosphère et de décryptage de leurs rôles dans le microbiote.

Les miARNs retrouvés dans la rhizosphère semblent moduler la composition et l'activité du microbiote rhizosphérique. Dans ce sens, les miPEPs pourraient être

un outil très pertinent pour finement réguler le microbiote de plantes d'intérêt.

❖ *Chapitre 2* - Modification de la composition et de l'activité du microbiote rhizosphérique de *Arabidopsis thaliana* après application du miPEP159a, b et c

Dans ce deuxième chapitre, nous changeons d'approche pour explorer le rôle des miARNs de plantes dans le microbiote de la rhizosphère. Nos premiers résultats reposaient sur l'utilisation de plantes mutantes, dont les effets sont pléiotropiques, et sur l'ajout de miARNs synthétiques dans des cultures bactériennes. L'application de miPEPs permet d'augmenter spécifiquement la production *in planta* du miARN associé. Ainsi, nous avons pu évaluer l'effet du changement quantitatif d'un seul miARN sur la composition et l'activité du microbiote de la rhizosphère. A travers le séquençage 16S et ITS des racines et de la rhizosphère d'*A. thaliana* traitées au miPEP159a, b ou c, nous avons démontré que l'application d'un miPEP modifie la structure du microbiote et l'abondance de souches microbiennes spécifiques. A la suite, nous avons voulu investiguer l'impact d'un miPEP sur la transcriptomique de bactéries de la rhizosphère de plantes traitées. Dans un système *in vitro*, nous avons traité *A. thaliana* avec le miPEP159c, puis inoculé avec *Variovorax paradoxus* EPS et finalement, nous avons quantifié l'expression de quelques gènes cibles de cette souche. Nos résultats de PCR quantitative (qPCR) ont montré qu'un miPEP, *via* l'augmentation quantitative d'un miARN rhizosphérique, peut altérer l'expression de gènes bactériens dans la rhizosphère, soit en surexprimant soit en réprimant le gène cible. Cette deuxième partie propose une approche alternative pour étudier l'effet des miARNs sur le microbiote des plantes et ouvre la possibilité d'utiliser les miPEPs en ingénierie du microbiote, afin de moduler une activité microbienne spécifique dans la rhizosphère.



# DÉCOUVERTE ET EXPLORATION DU RÔLE DES MICROARNs DANS LA RHIZOSPHERE

---

## 1 Présentation de l'article

### *Plant miRNAs in the rhizosphere target microbial genes*

Authors : Harriet Middleton<sup>1,2</sup>, Cécile Monard<sup>1</sup>, Virginie Daburon<sup>1</sup>, Emmanuel Clostres<sup>1</sup>, Jessica Dozois<sup>2</sup>, Julien Tremblay<sup>3</sup>, Étienne Yergeau<sup>2,\*</sup> and Abdelhak El Amrani<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>ECOBIO, CNRS UMR 6553, Université de Rennes, Campus Beaulieu, Rennes, France

<sup>2</sup>Institut National de la Recherche Scientifique, Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Laval, Québec, Canada

<sup>3</sup>National Research Council Canada, Energy, Mining and Environment, Montréal, Québec, Canada

\* Corresponding authors : abdelhak.elamrani@univ-rennes1.fr and Etienne.Yergeau@inrs.ca

Abstract MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that control target gene expression, through sequence complementarity. Their roles in plants vary from regulating developmental processes to responding to abiotic and biotic stresses. Recently, small RNAs have been shown to play important roles in cross-kingdom communication, notably in plant-pathogen relationships. Plant miRNAs were even shown to regulate gene expression in the gut microbiota. Thus, we hypothesised that the same process happens in the rhizosphere which contributes to shaping plant-associated microbial communities. To explore these questions, we performed small RNA sequencing in search of miRNAs in the rhizosphere of evolutionarily distant plants, *Arabidopsis thaliana* and *Brachypodium distachyon*. This revealed the presence of specific and shared rhizospheric plant miRNAs, which were all absent in unplanted soils. A subset of these miRNAs were also detected

inside rhizospheric bacteria, but were missing in bacteria from unplanted soils, suggesting bacterial uptake of surrounding plant miRNAs. Furthermore, an *in silico* analysis indicated potential targets of these rhizospheric miRNAs in plant-associated bacterial genomes. To examine the function of these miRNAs, *A. thaliana* mutants, affected in their miRNA and/or siRNA (small interfering RNA) biosynthesis, were grown. Their rhizospheric microbial communities were significantly disrupted in comparison with wild-type plants. Additionally, confronting synthetic rhizospheric miRNAs with bacterial cultures resulted in modulation of gene expression, suggesting a functional role of plant miRNAs in regulating microbial activity, in the rhizosphere. This work makes an important contribution to the field of rhizospheric plant-microbe interactions and offers some significant insights into the potential of plant miRNAs for microbiota engineering.

## 2 Introduction

The rhizosphere, defined as the portion of soil around the roots under the influence of plants, is a melting pot of soil microorganisms : from the typical trio of bacteria, fungi and archaea, to protists and nematodes. As the interface between plant and soil, the rhizosphere is the stage of many crucial plant-microbiota interactions. The rhizospheric microbiota plays many essential roles in maintaining plant health, such as provision of nutrients, defence against pathogenic invaders and protection during abiotic stresses [108]. Given the importance of these microbial communities in growing robust plants, many studies have examined the parameters that govern the composition and function of these communities, with the hope of optimising our agriculture through microbiota engineering [53]. The main factors that influence the dynamics of these microbial communities are either from the environment, from the plant or from the microorganisms themselves [109]; [27]. These same factors are involved in the establishment and functioning of the rhizospheric microbiota, however, the plant component is consistently emphasised in the search for microbial engineering techniques. Mainly formed by the existing soil microorganisms and marginally by the seed-borne microbiota [110]; [111]; [112], the root microbiota is influenced by factors depending on the compartment, *i.e.* endosphere, rhizoplane or rhizosphere, creating corresponding sub-microbiotas. The rhizospheric microbiota is then finely tuned by rhizodeposits, especially root exudates, depending on the plant species, genotype, root morphology, developmental stage and environmental factors, but it is also heavily dependent on the biogeography of soil microorganisms [109].



Roots exudates are of diverse nature such as sugars, peptides, amino acids, nucleic acids, nucleotides, fatty acids or secondary metabolites [113]. Although many studies have clarified the role of these exudates in shaping the rhizomicrobiome, very few have focused on root-secreted nucleic acids. Yet, it is known that plants excrete extracellular DNA (exDNA) *via* their border cells, which are released from the root tip and are a great proportion of rhizodeposits [114]. This exDNA forms a matrix that functions as a trap surrounding the root mucilage to attract and immobilise pathogens [115], somewhat shaping the microbiota. Likewise, we hypothesised that small RNAs, notably microRNAs (miRNAs), are exuded through the roots, forming a supplementary class of rhizodeposits. These regulatory approx. 21nt non-coding RNAs are found in *Arabidopsis* roots and over half of them are expressed in a compartment-specific manner [116]. Interestingly, whilst no previous studies provided evidence of miRNA secretion in the rhizosphere, a large number of miRNAs are enriched at the root tip, in the early meristematic zone [116]. This coincides perfectly with the fact that the root tip is a hotspot for active bacteria and is probably a region where plants concentrate their selective power [117], potentially through root-secreted miRNAs.

Throughout the last decade, small RNAs have been increasingly investigated in the context of plant-microbe interactions. Several studies have concluded that plants export small RNAs into pathogens : for example, cotton plants were shown to send miRNAs to the fungal pathogen *Verticillium dahliae* in order to silence virulence genes [100] and *Arabidopsis thaliana* delivered small RNAs *via* vesicles to the attacking *Botrytis cinerea*, inhibiting virulence [118]. The reverse is also true, pathogens are able to produce miRNAs or miRNA-like RNAs (milRNA) to counteract the defence of plants : for example, the fungal pathogen *Puccinia striiformis* produces a milRNA capable of silencing the pathogenesis-related 2 gene in wheat [88]. These small RNAs mediate cross-kingdom communication and are often the result of the famous arms' race between plants and fungal pathogens [74].

Research in plant-microbe interactions has tended to focus on pathogens, whereas studies in the animal kingdom have demonstrated that miRNAs play essential roles in shaping the microbiota as a whole. This is the case regarding human and murine intestinal miRNAs which regulate gut bacterial gene expression and growth, thus shaping the gut microbiota [119]. Interestingly, miRNAs from edible plants, conveyed in exosome-like nanoparticles, were shown to be preferentially uptaken by gut bacteria and able to regulate bacterial gene expression [120]. Regarding the role of miRNAs in the gut microbiota and

the commonalities between the intestine and the rhizosphere [121], it seems reasonable that root-secreted miRNAs might be one of the important factors that shape the biodiversity and activity of this interacting rhizomicrobiome [107]. In this paper, we explored this hypothesis, knowing that the existence of such miRNAs in the rhizosphere, prior to this study, was unheard of.

Here, we present an initial study that leveraged small RNA sequencing to characterise the relationship between *Arabidopsis thaliana* and *Brachypodium distachyon*'s rhizosphere and their respective microbiota. This led us to further explore their function in regard to surrounding microorganisms, through microbial community analyses of small RNA - lacking plants and transcriptomics of bacteria confronted to synthetic miRNAs. With these results, we demonstrate that plants may use miRNAs, in their rhizosphere, to modulate the composition and/or activity of surrounding microbes. A greater understanding of the interactions at play in the plant holobiont will, in turn, advance our abilities to grow plants in coherence with their microbial environment.

### 3 Matériel et méthodes

#### *Detection of plant miRNAs in the rhizosphere*

*Arabidopsis thaliana* (Col-0) and *Brachypodium distachyon* (Bd21-3) were planted in triplicates and grown for a month, alongside unplanted soils. The rhizospheres and control soils were sampled and flash-frozen with liquid nitrogen. RNA was then extracted from 2g of soil using MOBIO RNA Power soil kit, eluted in 100  $\mu$ L, following the manufacturer's guidelines. RNA quality was inspected with Nanodrop and 1% agarose gel and was then sent for sequencing on an Illumina HiSeq 2500 in single read mode (1x50bp) at the Centre d'expertise et de services Génome Québec (Montreal, Canada). Reads were trimmed using Trimmomatic [122] (v0.39) to remove the sequencing adapters with the following Illumina clip settings :5 :10 :4 and to remove the 5' and 3' flanking sequences containing bases having quality scores below 3 and 30, respectively. Common contaminants, such as Illumina adapters and PhiX spike-in sequences, were removed using BBDuk (BBMap v38.11, <https://github.com/BioInfoTools/BBMap>), with key parameters : k=20 and minkmerhits=1. Remaining sequences were then filtered by size (nrc tools v1.3.2) such that reads having a length between 18 and 27 nucleotides were selected. Selected reads were mapped against either *A. thaliana* (TAIR10/GCA\_000001735.1) or *B. distachyon* (bd21/GCF\_000005505.1) reference genomes, which are the same as those used in miR-

Base [123], using BWA-aln [124] with the following parameters : mismatch=1 and seed=5. Using BEDTools v.2.29.2 [125] with -F 0.95 argument, a number of reads aligned inside miRNA coordinates were determined, meaning that at least 95% of each read had to belong inside the miRNA coordinates to be considered a valid hit. These assigned miRNAs which were mapped against the reference database were kept for abundance estimation across samples.

A differential analysis was performed using DESeq2 [126] to compare the abundances of each miRNA between two conditions (unplanted soil VS rhizosphere). The code and data for this analysis are available on GitHub. For each miRNA, raw counts were normalised by calculating a pseudo-reference across all samples (geometric mean) and dividing counts of each sample by the pseudo-reference resulting in a ratio. For each sample, the median of ratios was considered as a normalisation factor or size factor. Normalised counts were calculated by dividing raw counts by the size factor. Our data set was composed of many zeros, so the geometric mean was calculated using a zero-tolerant variant of the formula to estimate size factors. A parametric fit along with a two-sided Wald test, using manually adjusted *P*-values < 0.05 (Benjamini-Hochberg), provided a robust analysis of differentially abundant miRNAs.

#### *Detection of plant miRNAs in rhizospheric bacteria*

*A. thaliana* were grown for a month, then the rhizosphere was sampled by shaking off the loose soil and retaining the remnant soil around the roots. Bacteria were isolated from 5 g of rhizospheric soil, using a density gradient. Samples were added to 30 mL of 0.2% sodium hexametaphosphate and rotated on a spinning wheel for 2 h. Samples were then centrifuged at 18 *g* for 1 min at 10°C, the supernatants were pooled two-by-two and centrifuged at 2824*g* for 20 min at 10°C. The microbe-containing pellet was resuspended in 10 mL of 0,8% NaCl and samples were again pooled by two. The resuspended solution was then transferred onto 10mL of sterile Nycodenz and was centrifuged at 3220 *g* for 40 min. The bacterial layer was collected and a volume of 0,8% NaCl sufficient for a total of 35mL was added. This solution was centrifuged at 3220 *g* for 15 min at 10°C. Finally, the pellet was resuspended in 1 mL of NaCl 0.8% to wash the residual Nycodenz away and centrifuged at 1700 *g* for 5 min at 10°C. The final pellet was resuspended in 100 µL TE buffer and kept at -20°C. RNA was extracted from this bacterial solution using a modified Griffiths' protocol, as follows : the 100 µL were transferred into a MP Biomedicals™ Lysing Matrix E tube with 250 µL of warmed 10% CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) - 0.7 M NaCl, followed by 250 µL of 240 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

(pH 8.0) and 500  $\mu$ L of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25 :24 :1) (pH 8.0). Samples were then bead-beaten using TissueLyser II (QIAGEN) at 30 Hz for 3 min. The tubes were centrifuged at 16000  $g$  for 10 min at 4°C and the supernatant was transferred into a new tube. One volume of chloroform-isoamyl alcohol (24 :1) was added to the supernatant and centrifuged again at 16000 $g$  for 10 min at 4°C. The supernatant was collected and 2 volumes of 30% PEG 6000-1.6 M NaCl was added and the tube was inverted to mix and was left at 4°C for at least 2 h. The tubes were then centrifuged at 18000  $g$  for 30 min at 4°C to precipitate RNA. The RNA pellet was then washed with 500  $\mu$ L of 70% ethanol and centrifuged at 18000  $g$  for 10 min at 4°C. The pellet was then air dried and resuspended in 50  $\mu$ L of RNase-free water. RNA quality and quantity was verified using a 1% agarose gel and Nanodrop, and then sent for sequencing on an Illumina NovaSeq 6000 using paired-end 100 bp with size-selected library. Eight bacterial samples were processed from the rhizosphere and six were processed for unplanted soils. Sequencing results were processed as stated above with the rhizospheric miRNAs. To confirm that miRNAs found in the rhizospheric bacteria originated from the plant and not the bacteria, miRNA sequences were searched for on the + and - strands of 3,837 bacterial genomes [127], of which 1,160 bacteria were isolated from plants. These miRNA sequences were also searched for in the genome of *A. thaliana* TAIR10.1 in which they were confirmed at their corresponding position. DESeq2 was used, as described above, to identify differentially abundant miRNAs between bacteria isolated from the rhizosphere and bacteria isolated from unplanted soil, as described above. A second method, using edgeR, resulted in the same conclusions as with DESeq2, validating the method.

#### *Mutant Arabidopsis thaliana description*

Five *A. thaliana* mutants were grown in a mix of soil and sand (2 :1) for a month, in individual pots. Mutants were provided by Hervé Vaucheret and Taline Elmayer (IJPB, INRAE, Versailles, France). *RTL1* mutant over-expresses RTL1 protein which results in a suppression of siRNA pathway without affecting miRNAs [128]. *RTL1myc* over-expresses RTL1 protein flagged with Myc epitope, rendering RTL1 less active, so siRNA pathway is less suppressed than with *RTL1* mutant. *Agol-27* mutant has AGO protein function partially impaired and is completely post-transcription gene silencing (PTGS) deficient [129]; [130]. *Dcl1-2* mutant has total loss of function of DCL1 protein resulting in low levels of miRNA and developmental problems [131]. *Hen1-4* mutant is miRNA defective, but is also affected in some siRNA - PTGS [129]. HEN1 methylates siRNA and miRNA to maintain their levels and size, but also to protect them from uridylation and subsequent

degradation [132].

*DNA extraction, sequencing and qPCR*

*A. thaliana* mutants ( $n = 4$ ) and wild-type plants ( $n = 2$ ) were grown for a month and sampled as follows : the soil easily detached from the root system was referred to as “distant rhizosphere” and the root, rhizoplane and close rhizosphere communities were named “root and close rhizosphere” samples. DNA was extracted from the distant rhizosphere using a modified Griffiths’ protocol that co-extracts DNA and RNA (as described above) and from the root and close rhizosphere using NucleoSpin Plant II kit (Macherey-Nagel). DNA was sent for 16S rRNA (341F : 5’- CCTACGGGNGGCWGCAG- 3’ and 534R : 5’- ATTACCGCGGCTGCTGGCA – 3’) and ITS (ITS9F : 5’- GAACGCAGCRAAIIGYGA – 3’ and ITS4R : 5’- TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3’) sequencing on an Illumina MiSeq in paired-end mode (2x250 bp) at the Centre d’expertise et de services Génome Québec (Montreal, Canada). In parallel, 16S rRNA gene and ITS were quantified by qPCR, using the same primers as for sequencing. It should be noted that amplification of the ITS2 region with these primers (ITS9/ITS4) does not exclude plant ITS [133]. To counteract this, a ratio of fungal Amplicon Sequence Variants (ASVs) over non-fungal ASVs, found in each sample, was calculated and applied to the number of ITS copies quantified by qPCR. Within each well was 0.1  $\mu$ L of each primer (10  $\mu$ M), 4  $\mu$ L LightCycler® 480 SYBR Green I Master (final volume 6  $\mu$ L PCR mix) and 2  $\mu$ L of DNA (25 ng. $\mu$ L<sup>-1</sup>). Quantification of distant rhizosphere samples were performed with additional 0,67 mg.mL<sup>-1</sup> BSA. 16S gene was quantified with the following program in 40 cycles : pre-incubation (95°C- 4 min) / amplification (95°C – 30 s; 49°C – 1 min; 72°C – 1 min) / 72°C-10 min/ melting curve (95°C – 5 s; 49°C – 1 min; 97°C – continuous 5 measures/ °C) / cooling (40°C – 30s). Whereas ITS was quantified with 34 cycles of the program : pre-incubation (95°C- 5 min) / amplification (95°C – 15 s; 60°C – 30 s; 72°C – 30 s; 80°C – 5 s) / melting curve (65°C à 95°C – 0.5°C/5 s, continuous) / cooling (40°C – 30 s). At the last step of amplification, a single measurement was performed and then continuously during the melting curve step. A minimum of 3 technical replicates was quantified. A number of copies of 16S or ITS was determined in comparison with a standard curve using serial dilutions of plasmids with cloned fragments ( $R^2 = 0,994$  and  $R^2 = 0,9987$  for root and close rhizosphere samples 16S and ITS, respectively, and  $R^2=0,998$  and  $R^2 = 0,9882$  for distant rhizosphere samples 16S and ITS).

*Amplicon sequences processing*

Amplicon sequencing data was processed with AmpliconTagger [134]. Briefly, conta-

minants and unpaired reads were removed and remaining sequences were trimmed to remove adaptors and primers. Reads were then filtered for quality control such that reads having at least one N or having average phred score quality less than 20 were left out. For 16S analysis, a total of 3,776,292 reads passed the quality control and 1,230,944 sequences were successfully processed to generate ASVs (DADA2 [135]). For ITS analysis, 3,547,108 reads passed quality control and 824,610 sequences made it into ASVs. For both 16S and ITS data types, ASVs were filtered for chimaeras using DADA2's internal removeBimeraDeNovo (method = 'consensus') workflow followed by VSEARCH's [136] UCHIME *de novo*. Each remaining ASV was assigned a taxonomic lineage by using the RDP classifier with the SILVA [137] R138 and UNITE (version : *sh-qiime-release-s-10.05.2021*) databases for 16S and ITS data types respectively. ASVs assigned to bacterial/archaeal and fungal microorganisms were kept and rendered into ASV abundance tables. These tables were transformed, using qPCR data measuring 16S and ITS copies in each sample, into "absolute" abundance tables of ASVs which were used for downstream analyses.

#### *Microbial communities analyses*

Analyses of ASVs composing the microbial communities were performed using the R package "phyloseq" v 1.32.0 [138]. The R code and data used to generate the figures related to microbial analyses are available on GitHub. After checking the rarefaction curves (Extended Data Figure 1.7), all samples seemed sufficiently sequenced. However, to study alpha-diversity, it is recommended to rarefy data. All reads were rarefied to the lowest number of reads found in a sample (see our GitHub for more details on the rarefaction process). To assess the diversity within samples, the number of observed ASVs, Shannon's and Simpson's indices were calculated. Significance of differences in alpha-diversity between mutants was tested using a linear model, whilst checking the normal distribution of residuals and using wild-type (WT) samples as a reference. If residuals did not follow a normal distribution, a general linear model (GLM) with gamma distribution and "log" or "link" scale were used. All tests performed were, by default, two-sided. The effect of miRNA/siRNA mutation in *A. thaliana* on the structure of microbial communities was determined on the abundance table (*i.e.* abundance was however adjusted by 16S/ITS copy number determined by qPCR as described earlier in the methodology), using ordinations of Bray-Curtis distances (based on ASV abundance, ordination not shown) and Weighted UniFrac distances (abundance and phylogeny). These distances were represented within a Principal Coordinate Analysis (PCoA), where each sample's microbiota is illustrated by a point and the closer two points are, the more similar their microbiota is. Interpreta-

tion of two main axes was considered meaningful by using the broken-stick model (vegan package - rda and screeplot functions). The Adonis function (Permutational Multivariate Analysis of Variance Using Distance Matrices) was used to determine the statistical impact of miRNA/siRNA mutations on the microbiota structure, alongside checking group dispersion (betadisper function) and pairwise tests (pairwise.adonis function).

*In silico analysis of miRNA targets*

To predict potential plant miRNA targets in bacterial genomes, we implemented a workflow [139] named *mirnarget 1.0 : miRNA target finder* (available on GitHub), which was inspired from the plant miRNA target finder, *psRNAtarget* [140]; [141]; [142]. This tool is based on specific pairing patterns between plant miRNA and target [65] and implements SSEARCH36 (from the fasta36 v36.3.8 package [143]) which uses the Smith-Waterman local alignment algorithm, resulting in optimal alignments. Multiple targets for each miRNA can be identified. Based on the *psRNAtarget* rules for miRNA-target recognition, an e-value was calculated for each alignment and only those with an e-value inferior or equal to 5 were retained. To compare potential targets of plant miRNAs in different bacterial genomes, we created two groups of genomes : *A. thaliana* rhizospheric bacteria (ARA) and non plant-associated bacteria (NPA). We used genomes from 140 ARA and 169 NPA bacteria described in Levy, *et al.*, 2018. The NPA group was randomly re-sampled to retrieve only 140 bacteria, for a homogeneous comparison. The position of the targeted regions were noted with respect to the neighbouring coding sequences (CDS) (Suppl. Info. Figure 1.18) : the target sequence could be inside a CDS, at the 5' or 3' flanking regions (FLR) or in other short/very short inter-CDS regions, overlapping CDSs or elsewhere, further away from any CDS. Targets in the latter category were positioned at a distance superior to 100 nt from the 5' end or at a distance superior to 350nt from the 3' end of the CDS. These distances were chosen as they correspond to the longest UTRs that are implicated in gene regulation. Targets in this category were discarded from the analysis, because it was considered that a miRNA in that area would not affect mRNA translation. The annotation of targeted regions and extraction of the closest CDSs were carried out with our tool “align2cdsRegions”, available on GitHub. Sequences of targeted CDSs were retrieved using the *getfasta* tool from BEDTools [125] (v2.30.0) and GO (Gene Ontology) terms were attributed using InterProScan [144] (v5.59-91.0), on Galaxy [145]. For each domain of GO (*i.e.* Biological Processes, Cellular Component, Molecular Function) and for each targeted CDS, a GO ancestor and their description were associated and a level of hierarchical ontology was attributed, as described in Manjang, *et al.*, 2020

[146].

*Bacterial growth and miRNA treatment*

*Variovorax paradoxus* EPS was grown in 5% yeast extract (YE), at 30°C with 250 rpm shaking. *Bacillus mycoides* YL123 was grown in tryptic soy broth (TSB), at 25°C with 250 rpm shaking. Bacterial stocks were plated on YE or TSB and single colonies were selected for liquid culture overnight ( $n = 3$ ), in 20mL YE or TSB. In the morning, cultures were normalised to reach the same number of bacterial cells per mL. The volume of the cultures was varied to mimic natural differences in rhizosphere volume. Bacterial cultures were left to grow until the exponential phase was reached, which was determined previously (4-5 h for both strains). Optical density was then measured to check that the maximum number of cells/mL for RNA extraction was not exceeded (109 cells/mL). At this point, 1 µg of the miRNA mix or scrambled mix was applied to the cultures and gently mixed (15 µL of each miRNA solution diluted at 10 µM). Total concentration of miRNAs ranged between 65 nM-104 nM for *B. mycoides* and 45 nM-85 nM for *V. paradoxus*. The same cultures were sampled after 20 min and 120 min of incubation, in order to evaluate the evolution of gene expression in a same biological sample in response to a short and long confrontation with miRNAs. The miRNA mix was composed of 6 rhizospheric miRNAs : miR159a, miR159b, miR159c, miR161.1, miR158a and miR165b. The scrambled mix was composed of 6 RNA sequences with the same nucleic acids as the respective miRNAs but in a random order. These sequences are detailed in Suppl. Info. Table 1.19. To resemble mature plant miRNAs found in the rhizosphere, these synthetic miRNAs were single-stranded with a 3' methyl group. They were synthesised by Integrated DNA Technologies (IDT).

*RNA extraction for bacterial transcriptomics*

After incubation, 1 mL of every culture was sampled and centrifuged at 5000 rpm for 5 min. The bacterial pellet was resuspended in 100 µL of a lysozyme solution : 1 mg.mL<sup>-1</sup> for *V. paradoxus* (Gram -) and 3 mg.mL<sup>-1</sup> for *B. mycoides* (Gram +). After vortexing the resuspension, the samples were left to incubate for 15 min at room temperature. The following steps used solutions from the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). The guanidine-thiocyanate-based buffer RLT was added to the samples for further lysis (600 µL) and vortexed for 10 s. For *B. mycoides* samples, an additional step was necessary : the 700 µL were transferred to a sterile 2 mL Safe-Lock tube containing 100 mg glass beads (0.1 mm diameter) and 100 mg zirconia/silica beads (0.5 mm diameter). Beads were resuspended by pipetting then cells were disrupted using Fast Prep for 50 s (5 m/s), followed by 5



min on ice and another 50 s of Fast Prep. Tubes were centrifuged at 10 000g for 1 min and supernatant was transferred to a new tube. The next steps were common to both strains. An equal volume of 70% ethanol was added to the lysed samples and mixed by pipetting. The lysate was transferred to an RNeasy spin column (pink column) in a 2 mL collection tube and centrifuged at 10 000 rpm for 30 s, then the flow-through was discarded. Columns were first washed with 700  $\mu$ L of the RW1 wash buffer, followed by 500  $\mu$ L RPE buffer and again with 500  $\mu$ L RPE buffer. Collection tube was changed and the column was centrifuged for 1 min at maximum speed to dry the membrane off. To elute RNA, columns were placed in new 1.5 mL tubes and 30  $\mu$ L of RNase-free water was added before centrifugation. The 30  $\mu$ L were then reloaded and centrifuged one last time.

#### *RNA-seq & sequence analysis*

Total RNA was sent for sequencing at the Centre d'expertise et de services Génome Québec (Montreal, Canada), where ribosomal RNAs were depleted and messenger RNAs were quantified. RNA-seq raw reads were processed with ShotgunMG [147]. Reads were trimmed and filtered for quality (Trimmomatic v.39) and mapped (BWA v0.7.17) against their respective reference genome. The genome of *B. mycooides* YL123 originated from our lab, was sequenced, processed and submitted to the NCBI through the Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) under the assembly accession GCA\_024297165.1 on GenBank. The *V. paradoxus* EPS genome was published with accession number NC\_014931 [148]. BedTools v2.23.0 was used to generate read count files from each .bam file that were then merged to generate a raw count matrix. The latter file was used as entry data for a differential gene expression analysis using DESeq2 (Bioconductor, version 1.36.0). For each strain and each time point, gene expression of samples treated with synthetic miRNAs was compared to those treated with scrambled synthetic miRNAs. The code used for data analysis is on GitHub.

*Data availability* Sequence data generated from this study are available on the NCBI portal under accession PRJNA836586.

## 4 Résultats

### **Plant miRNAs are present in the rhizosphere of two plants species**

The potential presence of plant miRNAs in the rhizosphere was investigated by extracting rhizospheric RNA and performing small RNA sequencing. Two plant species were used in this experiment : the dicotyledon model, *Arabidopsis thaliana* and the monoco-

tyledon model, *Brachypodium distachyon*. An average of 34,119,348 and 33,766,319 raw sequences per sample (Extended Data Table ??) were obtained from the rhizospheres of *A. thaliana* and *B. distachyon*, respectively, and processed with the bioinformatic pipeline described in *Material and Methods*. After size filtration, an average of 18,351,294 (*A. thaliana*) and 18,468,688 (*B. distachyon*) sequences remained. The great majority of annotated miRNAs were present in higher proportions in the rhizosphere than in unplanted soils. In many cases, the miRNA sequence was present in the rhizosphere and completely absent in the unplanted soil samples. Amongst the annotated miRNAs, many were represented by a small number of reads, however they were consistently in higher numbers in the rhizosphere than in unplanted soil. To further confirm this result, the DESeq2 function was used and raw data was normalised within the function to compare differentially abundant miRNAs between rhizosphere and unplanted soil samples. In *A. thaliana* samples, 141 ath-miRNAs (mapped on *A. thaliana*'s genome) were detected, of which 29 were significantly more abundant in the rhizosphere compared to unplanted soil (Figure 1.1 - A). The most abundant miRNAs in the rhizosphere were ath-miR158a-3p, ath-miR161.1 and various members of the miR159 family. In *B. distachyon* samples, 20 bdi-miRNAs (mapped on *B. distachyon*'s genome) out of 105 miRNAs were significantly more abundant in the rhizosphere compared to unplanted soil (Figure 1.1 - B). Particularly, bdi-miR159b-3p was highly present, along with bdi-miR7757-5p and members of the bdi-miR396 and bdi-miR167 families. Normalised counts of the significantly abundant miRNAs, detected in the rhizosphere of these two plants, were higher in comparison with the counts from unplanted samples (Extended Data Figure 1.8 - A ;B), confirming that the majority of plant miRNAs detected were in the rhizosphere samples, with the exception of ath-miR5026. Amongst these significantly abundant rhizospheric miRNAs, nine were common to both *A. thaliana* and *B. distachyon*, and undetected in unplanted soils, suggesting a potential conserved core of miRNAs present in the rhizosphere : miR159b-3p, miR166a-b-c-d-e, miR167d and miR396a-b (1-2 mismatches). We independently replicated this experiment in a different laboratory using the same plant species but different growth substrate and RNA extraction method, and retrieved highly coherent results, *e.g.* the same top *A. thaliana* rhizospheric miRNAs (miR158a, miR161.1, miR159a-b-c, miR165b) were identified (Extended Data Figure 1.8 - D).

### ***A. thaliana* miRNAs are internalised in soil bacteria**

Bacterial cells were isolated from the rhizosphere of 1 month-old *A. thaliana*, washed and their RNA content was extracted and sequenced to identify potentially internalised

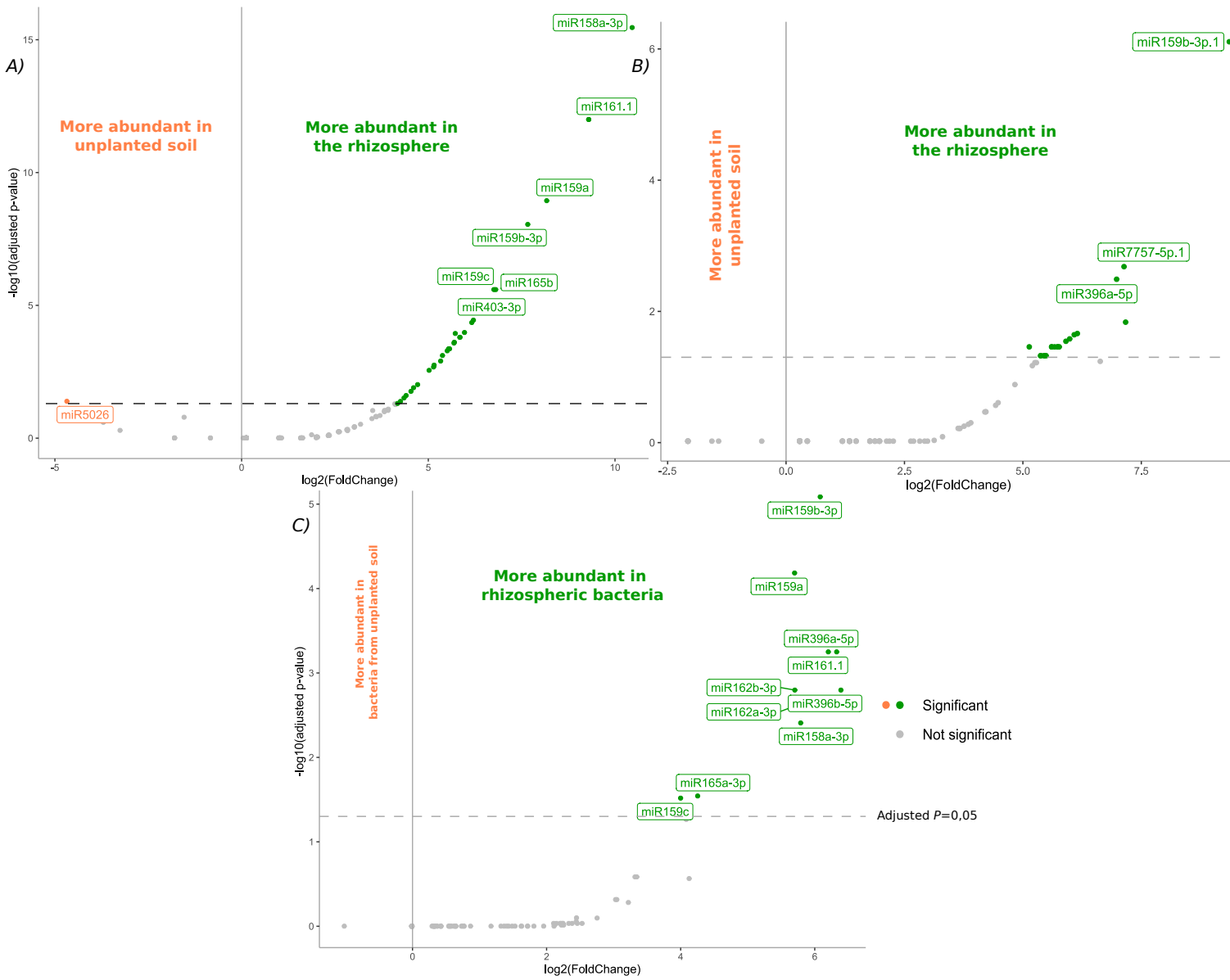


FIGURE 1.1 – *Arabidopsis thaliana* miRNAs (A) and *Brachypodium distachyon* miRNAs (B) identified in their respective rhizospheres. Differentially abundant miRNAs found in the rhizosphere of each plant and unplanted soil, resulting from DESeq2 analysis. In *A. thaliana*'s rhizosphere, twenty-nine miRNAs were significantly more abundant than in unplanted soil (points on the right). Whereas twenty miRNAs were significantly more abundant in the rhizosphere of *B. distachyon* than in unplanted soil. *A. thaliana* miRNAs were also identified in bacteria isolated from rhizospheric and unplanted soil samples (C). All detected miRNAs are represented; however, many had the same Fold Change and P-value, meaning their dots are stacked. Statistical analysis was performed using a Wald test, with a parametric fit. P-values were adjusted using the Benjamini & Hochberg method (*A. thaliana* :  $n = 3$ ; *B. distachyon* :  $n = 2$  rhizosphere samples,  $n = 3$  unplanted soil samples; Bacteria : from the rhizosphere,  $n = 8$ , and unplanted soil,  $n = 6$ ).

plant miRNAs. Sequences were processed and filtered (Extended Data Table 1.14), then the intra-bacterial putative miRNAs were mapped against *A. thaliana* TAIR10.1 genome, identifying a total of 97 ath-miRNAs. These miRNAs were mainly detected in bacteria isolated from the rhizosphere and 10 ath-miRNAs were significantly more abundant in rhizospheric bacteria compared with bacteria from unplanted soil (Figure 1.1 - C and Extended Data Figure 1.8 - C). To confirm the plant origin of these miRNAs, their sequences were searched for in 3,837 soil bacterial genomes [127], of which 1,160 were of bacteria isolated from plants. No matches were found, confirming the detected miRNAs were likely not produced by the bacteria themselves.

### **Disruption of small RNA biosynthesis in *A. thaliana* affects rhizospheric microbial communities**

To investigate the role of plant small RNAs on the rhizospheric microbiota, *A. thaliana* mutants, with disturbed miRNA and/or siRNA biosynthesis pathways, were grown and their rhizospheric microbial communities analysed by 16S rRNA gene and ITS region amplicons sequencing. These mutants are described in *Material and Methods*. To homogenise our results across samples and to reveal more realistic quantitative information, reads were normalised using the number of copies per sample, of 16S rRNA gene or ITS amplicons, measured by qPCR (Extended Data Figure 1.9 - C). First, the general composition of the root and rhizospheric microbial communities was explored by comparing the taxonomic profiles of mutants and wild-type (WT) plants. At the phylum level, bacterial communities were quite similar between samples (Extended Data Figure 1.9 - A), however, WT plants harboured a lower phyla diversity in their root and rhizospheric communities. The fungal taxonomic profiles varied more across mutants and WT plants (Extended Data Figure 1.9 - B). Notably, root and rhizospheric communities from *dcl1-2* and *RLL1* mutants were distinguishable due to their high proportions of Chytrids, in comparison with other mutants and WT plants. This observation was extended to the distant rhizosphere of *RLL1* mutants. To visualise the similarities of these mutants and WT rhizospheric communities, a Principal Coordinate Analysis (PCoA) was performed, using a weighted UniFrac distance matrix, which takes into account the abundance of each Amplicon Sequence Variant (ASV). Some observations were common to both bacterial and fungal communities (Figure 1.2) : firstly, PERMANOVA tests indicated that plant type, *i.e.* mutants or WT, explained a significant part of the variance seen in these microbial communities ( $P < 0.05$  for bacteria in roots and close rhizosphere;  $P < 0.001$  for other analyses). Secondly, *ago1-27* and *RLL1myc* mutants' communities were more simi-

lar to unplanted soil communities than those of WT plants. Alpha-diversity indices, of which the number of observed ASVs, were established across our samples and revealed that bacterial diversity was significantly greater in mutant roots and close rhizospheres, compared with WT (Figure 1.3 - A). There was also a significantly higher number of observed fungal ASVs in the distant rhizospheres of mutants compared with WT (Figure 1.3 - B).

### **Plant rhizospheric miRNAs potentially target bacterial genes**

*In silico* analyses were performed to seek out potential plant miRNA targets in bacterial genomes, using our bioinformatic workflow, which is based on the rules known in plant miRNA-target systems, largely based on the *psRNAtarget* [141] online tool. A first global examination of the 428 known ath-miRNAs resulted in 89,229,696 potential target sequences within the 3,837 bacterial genomes described by Levy, *et al.*, in 2018. Amongst these bacteria, those which were isolated from the rhizosphere of *A. thaliana* were selected to create the “*ARA*” group. Within these genomes, sequences potentially targeted by the 10 ath-miRNAs found in the rhizospheric bacteria (Figure 1.1 - C) were sought. 70,048 sequences were predicted to be targeted by one or more of these intra-bacterial ath-miRNAs (Extended Data Table 1.15). As described in *Material and Methods*, target regions were positioned relative to the nearest coding DNA sequence (CDS), and targets found too far from any CDS were discarded due to their insignificant effect on mRNA translation. When these far away targets were removed, these 10 ath-miRNAs were still predicted to target 39,389 sequences, in the *ARA* group. Interestingly, 35,809 potential targets were also identified in the non-plant-associated (*NPA*) group, composed of 140 bacterial genomes. These targeted CDSs were categorised within three ontology domains, concerning the function of the gene product (biological process, molecular function) and the cellular component in which the gene product was functional (Extended Data Figure 1.10c). The most targeted biological processes, in *ARA* bacterial genomes, were related to the regulation of metabolic and biosynthetic processes, nucleobase-containing compound metabolism, transmembrane transport, signal transduction and many more. The products of these targeted genes were mostly related to anion, nucleic acid and nucleoside phosphate binding, but also catalytic activities on RNA and DNA, and more. These products are mostly active in the cytoplasm, in membrane protein complexes, in the plasma membrane and in various organelles. When comparing these functional annotations of targets in *ARA* and *NPA* groups, some tendencies were identified (Extended Data Figure 1.11). Certain biological processes are predicted to be more targeted in the *ARA* group than *NPA*

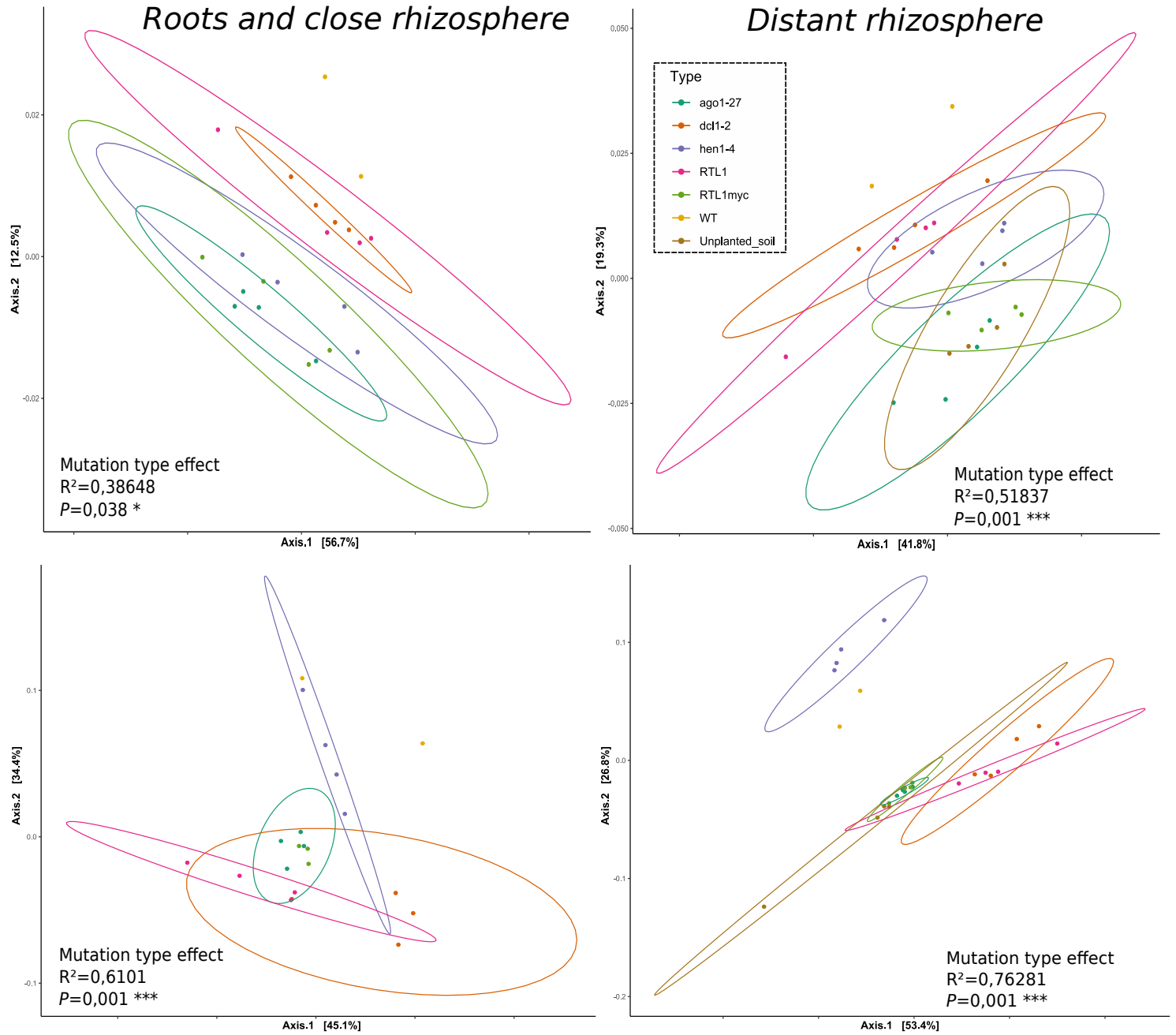


FIGURE 1.2 – Principal Coordinate Analysis (PCoA) ordination, using a Weighted UniFrac distance matrix, of root and rhizospheric bacterial (A) and fungal (B) communities. Statistical analysis was performed using a PERMANOVA test on the distance matrices (adonis function) :  $P<0.05$  \*,  $P<0.01$  \*\*,  $P<0.001$  \*\*\*.

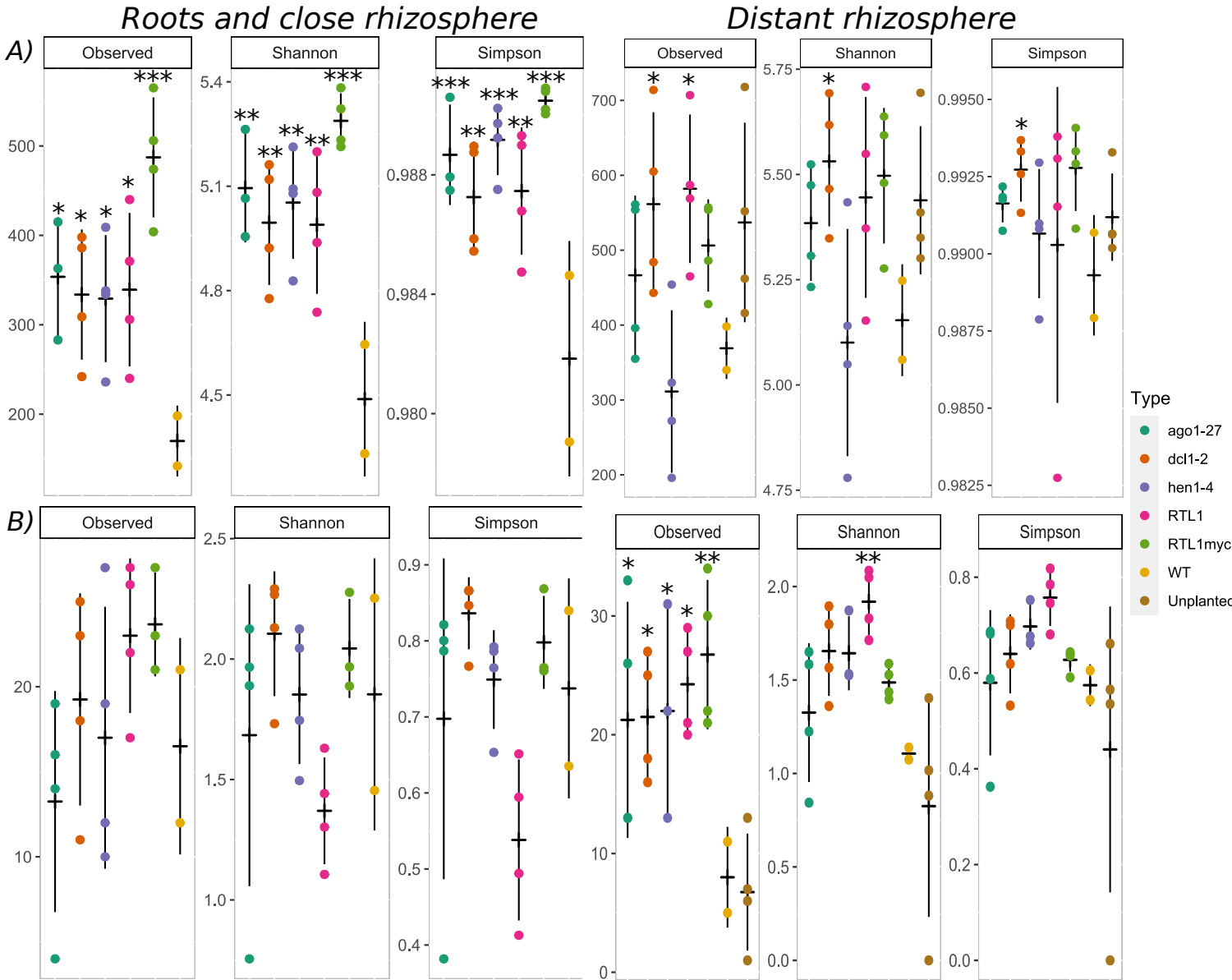


FIGURE 1.3 – Alpha diversity of root and rhizospheric bacterial (A) and fungal (B) communities : observed number of ASVs, Shannon’s index and Simpson’s index. The centre line represents the mean. Statistical analysis was performed using a linear model or a general linear model, if residuals were not normal ( $P < 0.05$  \*,  $P < 0.01$  \*\*,  $P < 0.001$  \*\*\*).

group, such as cell importation, cellular nitrogen compound and carbohydrate catabolism and monosaccharide metabolism. Molecular functions were also differentially targeted in these two groups. Some functions were further targeted in *NPA* groups, such as dioxygenase activity, efflux and siderophore transmembrane transportation, whereas hydrolase activity (on glycosyl bonds), organic acid and carbohydrate transmembrane transporter activities were predicted to be more targeted in *ARA* genomes.

### **Synthetic plant miRNAs modulate bacterial gene expression**

Two bacterial strains were confronted with a mixture of six synthetic miRNAs, the most represented in both *A. thaliana*'s rhizosphere and associated bacteria : miR159a, miR159b, miR159c, miR161.1, miR158a and miR165b. The Gram positive bacterial strain tested was *Bacillus mycooides* YL123, a bacterium isolated from wheat roots [149]. The Gram negative bacterial strain tested was *Variovorax paradoxus* EPS, a root-associated plant growth promoting bacterium [148], which belongs to the *Variovorax* genus, which is involved in regulating the effect of a whole microbial community on plant growth parameters [150]. *B. mycooides* did not respond to the treatment : no gene was differentially expressed following incubation with the synthetic miRNAs (Extended Data Figure 1.12). In contrast, *V. paradoxus* showed important changes in response to the miRNA confrontation. After 20 min of incubation, the expression of 79 genes was significantly lower in the miRNA-treated cultures and the expression of 44 genes was significantly increased ( $P_{adj} < 0.05$ ). After 120 min of incubation, the expression of 24 genes was significantly lower in the miRNA-treated cultures and the expression of 104 genes was significantly increased. The top 25 differentially expressed genes (DEGs), either increased or decreased in response to the miRNA treatment at the two sampling times, are displayed in Extended Data Tables 1.16 and 1.17. Volcano and MA plots showing DEGs (Figure 1.4 and Extended Data Figure 1.13) reveal that many genes were repressed after 20 min following the addition of the synthetic miRNAs to the bacterial culture, whereas after 120 min, more genes presented an increased expression than decreased. Only one gene was differentially expressed at both time points, a gene coding for a methionine synthase (VARPA\_RS01000), which was overexpressed in response to miRNA treatment (Figure 1.5). However, some DEGs belonged to Clusters of Orthologous Genes (COGs) common to both time points, coding for similar gene products within the same functional category. Seven COGs had DEGs after 20min and 120min incubation, mainly related to metabolism, especially lipid metabolism, and transcription functions (Table 1.6). Interestingly, many of these DEGs were first inhibited by the miRNA mix at 20min post-inoculation



and then over-expressed after 120min.

### **Few predicted targets were actually differentially expressed *in vitro***

For further investigation into the mechanisms behind bacterial genes targeted by plant miRNAs, we compared the DEGs from the previous experiment with target genes predicted by our tool, to estimate if similar rules apply to both bacterial and plant systems. The 6 miRNAs used in the previous transcriptomic experiment were predicted to target 237 sequences in the EPS genome. Amongst these, 100 targets were positioned in the “OTHER” category, meaning too far from any CDS, so they were removed from the following analysis, resulting in 137 potential targets. These predicted targets were compared to significantly DEGs in EPS ( $P_{\text{adj}} < 0.05$ ), in response to the 6 synthetic miRNAs. Amongst the 123 DEGs at 20 min, only two were *in silico* predicted as targets : VARPA\_RS05960 , coding for a L-iditol 2-dehydrogenase, and VARPA\_RS26385, coding for a phosphatidate cytidyltransferase (Figure 1.5). Only two genes were predicted as targets amongst the 128 DEGs at 120min : VARPA\_RS00680, coding for a hypothetical protein, and VARPA\_RS22555, coding for a non-ribosomal peptide synthetase (Figure 1.5). Interestingly, our bioinformatic tool shows that whilst VARPA\_RS05960 and VARPA\_RS00680 were targeted by only one miRNA, miR165b, VARPA\_RS22555 was targeted by two miRNAs, miR158a-3p and miR159c, and VARPA\_RS26385 was targeted by the three miRNAs, miR159a, b and c.

## **5 Discussion**

Taken together, the results presented here suggest that a hitherto undetected mechanism can contribute to shaping the rhizospheric microbiota. We showed the presence of specific plant miRNAs in the rhizosphere of two model species and their potential uptake by bacteria, as a selection of those miRNAs were found in rhizobacteria. We then demonstrated that a consortium of synthetic rhizospheric miRNAs modulates the gene expression of an essential plant-associated bacterium. Accordingly, plants mutated in small RNA pathways harboured altered microbial communities in their rhizosphere.

We detected plant miRNAs in the rhizospheres of two phylogenetically distant plants, *Arabidopsis thaliana* and *Brachypodium distachyon*. In plants, miRNAs are well known to intervene in development, in response to abiotic and biotic stresses, and during symbiotic or parasitic processes [151]. Whilst miRNAs have been investigated in most plant tissues and in response to various biotic and abiotic conditions, such as microbial infec-

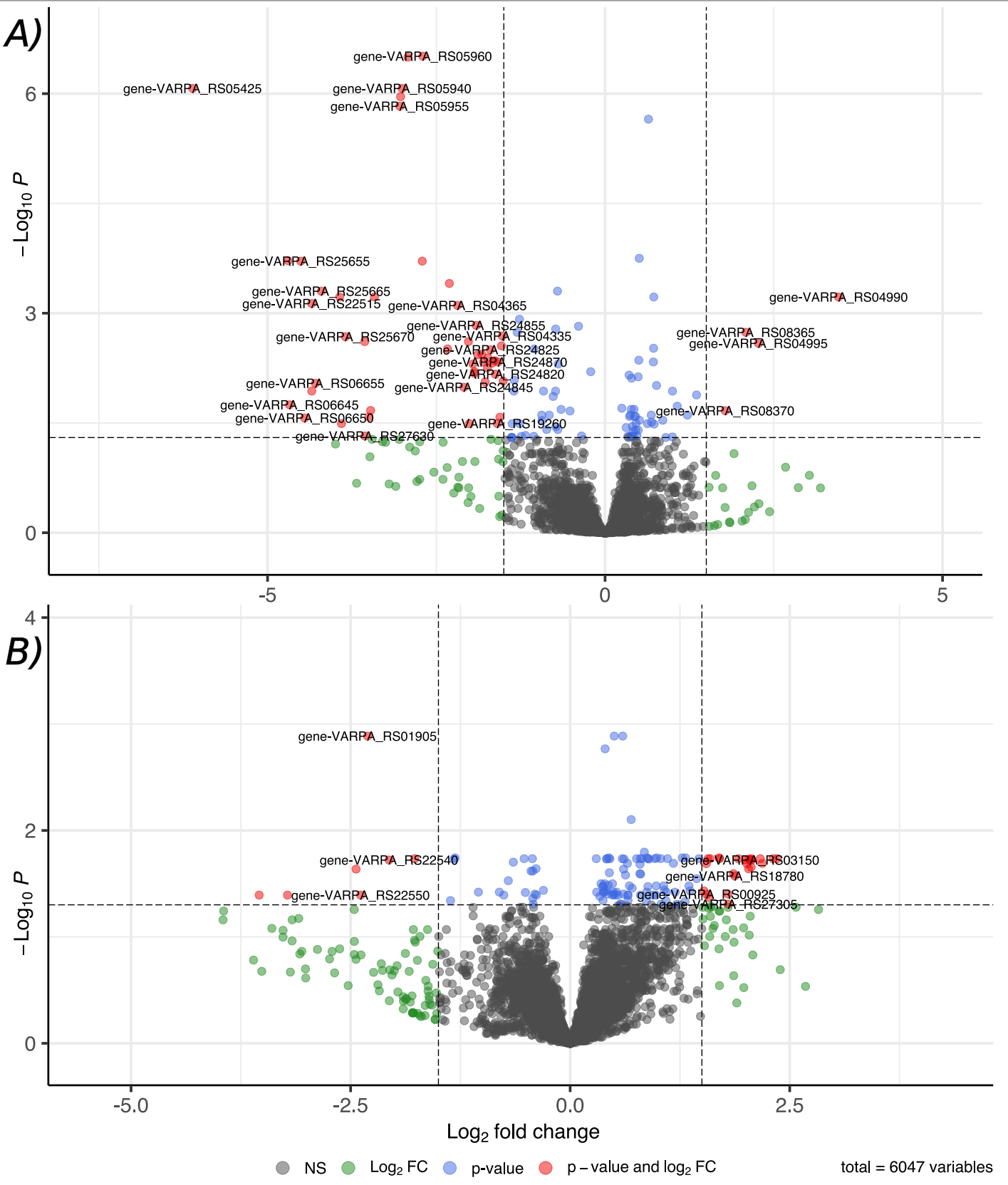


FIGURE 1.4 – Differentially expressed genes in *Variovorax paradoxus* EPS after 20 min (A) and 120 min (B) of incubation with six synthetic rhizospheric miRNAs (miR158a, miR159a, miR159b, miR159c, miR161.1, miR165b). Fold change threshold is |1.5| and  $P$ -value was adjusted with Benjamini-Hochberg and the threshold is 0.05.

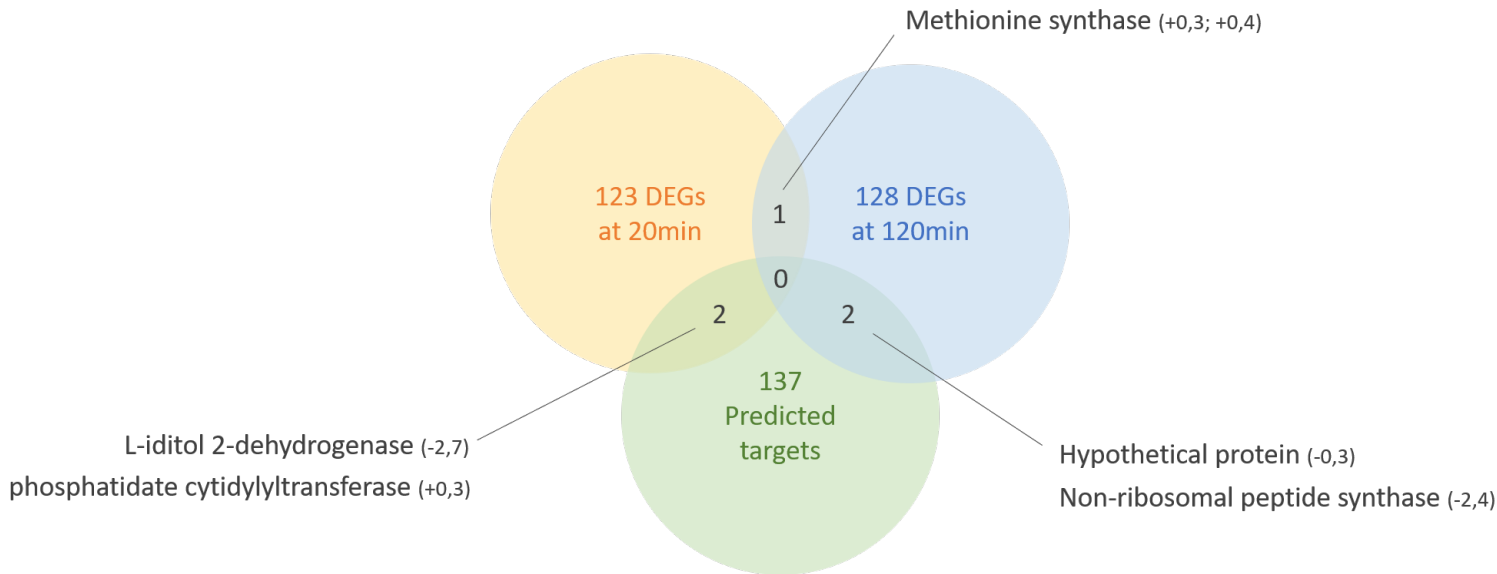


FIGURE 1.5 – Common genes (based on VARPA locus) both predicted as potential targets, in *Variovorax paradoxus* EPS genome, and differentially expressed after 20 min or 120 min of incubation with six rhizospheric miRNAs. Numbers in parentheses are the log2FoldChange values corresponding to differential expression at 20 min or 120 min. DEGs = Differentially Expressed Genes ( $P_{adj} < 0.05$ ).

tions, drought or salinity, this is the first time the rhizosphere has been scanned for their presence. In comparison with the diversity of miRNAs found in plant tissues, only a select few were found in abundance in the rhizosphere, which may indicate a selection process *in planta*. Interestingly, in roots, miRNAs have specific expression patterns, some being exclusively produced in certain cell types or root zones [116]. By comparing the major miRNAs found in the rhizosphere of *A. thaliana* with those previously found in roots [116], all of them were previously detected in roots but these rhizospheric miRNAs did not seem to be specifically localised in a certain cell type. A majority of our rhizospheric miRNAs, including the two most abundant, ath-miR158a and ath-miR161.1, were found to be highly enriched in the early meristematic zone [116]. Many root exudates, such as exDNA, soluble compounds and mucilage, are produced and secreted, by border cells, in this region of the root tip [25]. Thus, it is possible that these rhizospheric miRNAs are secreted by roots in the early meristematic zone, at the root tip. Another interesting finding, in both *A. thaliana* and *B. distachyon*, is the identity of these rhizospheric miRNAs : many are part of the miR159 family, which is extensively studied, due to its importance in numerous spheres of plant life. Members of the miR159 family are highly conserved throughout the plant kingdom and target a family of genes encoding MYB transcription factors, regulating plant development, flowering and response to abiotic and biotic stresses















COG accession number	log2FC at 20min	log2FC at 120min	Gene product	Functional category
COG0183	 -4,69 (VARPA_RS25660) -1,67 (VARPA_RS04385)	 0,52 (VARPA_RS10780)	Acetyl-CoA acetyltransferase	Lipid metabolism
COG0318	 -1,35 (VARPA_RS04355)	 -0,52 (VARPA_RS22025)	Acyl-CoA synthetases (AMP-forming)/AMP-acid ligases II	Lipid metabolism / Secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism
COG0583	 -3,4 (VARPA_RS22520)	 0,35 (VARPA_RS11995)	LysR transcription factor	Transcription
COG1028	 -2,7 (VARPA_RS05960)	 0,97 (VARPA_RS03770)	Dehydrogenases	Secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism / General function prediction only
COG1410	 <b>0,38</b> (VARPA_RS01000)	 <b>0,43</b> (VARPA_RS01000)	Methionine synthase I, cobalamin-binding domain	Amino acid transport and metabolism
COG1960	 -1,93 (VARPA_RS04375) -1,82 (VARPA_RS04380) -0,82 (VARPA_RS17425)	 0,93 (VARPA_RS11970)	Acyl-CoA dehydrogenases	Lipid metabolism
COG2814	 0,38 (VARPA_RS15715)	 -0,42 (VARPA_RS29615)	Arabinose efflux permease	Carbohydrate transport and metabolism

FIGURE 1.6 – Common Clusters of Orthologous Genes (COGs) with differentially expressed genes in both time points, showing which functional categories of *V. paradoxus* EPS are affected by the presence of rhizospheric miRNAs. Log2FC is the log2-transformed fold change, representing change in gene expression in miRNA-treated cultures in comparison with the control cultures treated with scrambled miRNAs. The values in bold are related to an identical gene. Orange and green arrows represent the decrease and increase induced by the miRNA treatment, respectively.

[152]. The fact that such phylogenetically distant species have a set of common rhizospheric miRNAs, some of which being essential to many aspects of plant biology, suggests that the secretion of these miRNAs may be a conserved trait across plants.

Given our increasing knowledge about small RNAs' function in plant-microbe interactions, it seems relevant that rhizospheric miRNAs may equally be involved. Interactions *via* small RNAs, including miRNAs, with fungal partners have been covered by previous studies [118]; [74]; [153]; [88]; [100], but miRNA-based interplay with bacterial partners has been neglected. By sequencing the RNA content of bacteria isolated from the rhizosphere, we identified 10 ath-miRNAs, which were absent from bacteria isolated from unplanted soils, suggesting that bacteria are capable of uptaking surrounding miRNAs, in the rhizosphere. The incorporation of eukaryote miRNAs in bacteria is consistent with their ability to absorb environmental nucleic acids, such as extracellular DNA, through natural competence. Competent bacteria use their type IV pili to bind and pull extracellular double-stranded DNA through their membrane or peptidoglycan layer [154]. Although not all bacteria have natural competence, most rhizospheric bacteria do encode type IV pili in their genome (Yergeau, *et al.* unpublished). In the same way that some bacteria secrete small RNAs in outer membrane vesicles [155], it is proposed that bacteria may internalise external DNA *via* vesiduction [156], *i.e.* membrane fusion of a vesicle containing DNA or RNA. In the case of transporting miRNAs, many questions remain unanswered : In vesicles, are miRNAs conveyed on their own or are they bound to argonaute proteins, as in the RNA-Induced Silencing Complex (RISC) ? Are miRNAs secreted in the rhizosphere as such and internalised by naturally competent bacteria ? These intriguing questions were outside the scope of the current study.

To explore the impact of plant miRNAs on the rhizospheric microbiota, we examined the microbial communities' composition of *A. thaliana* mutants affected in the biosynthesis of miRNA and/or siRNA. Based on 16S rRNA and ITS amplicon sequencing, we observed disrupted microbial communities in roots and rhizosphere of mutants compared with wild-type plants, suggesting an important role of small RNAs in constituting microbial communities. For instance, microbial communities in the roots and rhizosphere of *ago1-27* and *RTL1myc* mutants resembled more those of an unplanted soil than those of wild-type (WT) samples. This suggests these mutations lead to a certain dysbiosis in the roots and rhizosphere microbiota. Bacterial communities from mutants *dcl1-2* and *RTL1*, impaired in either miRNA or siRNA pathways, were the most similar to WT which could reveal some compensatory mechanism when one type of small RNA is missing, to maintain their

regulatory role. Previous research has shown that in absence of siRNA, miRNA levels are increased, because they compete for HEN1 methylation [157]. On the contrary, fungal communities from these two mutants were the most distinct from WT, with increased proportions of Chytrids, notably from the *Olpidium* genus. Amongst all mutations, the *hen1-4* mutation least affected fungal communities, which could be explained by the fact that some miRNA families are not impacted by the lack of methylation [158] and could be maintained in these plants.

Bacterial and fungal diversities were significantly higher in mutated plants, in both roots and close rhizosphere and in distant rhizosphere, in comparison with WT communities. Microbial diversity usually varies in inverse proportion to plant selection, *i.e.* microbial diversity diminishes from bulk soil, to the rhizosphere, and finally, to the endosphere, as the selection strength increases [159]. A high diversity in the roots and rhizosphere of mutants could reflect a weaker selection from these plants, which may be directly or indirectly orchestrated by plant miRNAs and/or siRNAs. As demonstrated in a previous study on the gut microbiota [120], plant miRNAs may have an indirect effect on the microbiota, by impacting the secretion of bacterial metabolites, which, in turn, modifies the growth of surrounding microbes. Anyhow, the mutations addressed in this work are pleiotropic. In order to gain robustness, these results should be supplemented by data which would express a direct link between the miRNAs in the rhizosphere of these mutants and the changes observed in the microbiota. However, we can confirm that disrupting the biosynthesis of small RNAs *in planta* modifies its rhizospheric microbiota.

During our investigation on the impact of plant miRNAs on bacterial transcriptomics, it appeared that *Bacillus mycooides*, a Gram-positive bacterium, did not respond to the treatment like *Variovorax paradoxus* did, a Gram-negative bacterium. Both Gram-positive and Gram-negative bacteria are able to stabilise sRNA-mRNA interactions *via* chaperone proteins, in the form of RNA-binding Hfq proteins or others such as ProQ or CsrA proteins. Similarly to RISC, these chaperones protect sRNAs and improve the establishment of sRNA-mRNA duplexes. Conversely, there are only a handful of examples of the role of chaperones in sRNA-mediated interactions within Gram-positive bacteria [160]; [161]. This ambiguity may partially explain why the two bacteria had very different transcriptomic responses when challenged with synthetic miRNAs. This differential response between *B. mycooides* and *V. paradoxus* could be explained by other factors. On the one hand, this could suggest that the thick peptidoglycan layer of Gram-positive bacteria makes miRNA entry impossible. On the other hand, maybe these bacteria were not competent during

our experiment, as it has been shown that some *Bacillus* strains only become competent in response to stress [162], which was not the case in these conditions. Another explanation involves plant vesicles, potentially containing RISC proteins, to deliver and enable miRNA entry into bacteria. The lack of these structures in our experiment could explain the absence of DEGs in *B. mycoides* cultures in response to miRNA treatment. However, the *Variovorax* strain did respond to the miRNA treatment, resulting in over a hundred DEGs at both sampling points.

The expression patterns of *V. paradoxus* genes varied between the two time points : after a short incubation period (20 min), most DEGs were repressed by the miRNA treatment, on the contrary, after an extended incubation period (120 min), most DEGs were overexpressed. When analysing DEGs from gene clusters that are both differentially expressed at 20 min and 120 min, it appears that most of them were first repressed and then overexpressed. This could suggest a certain functional compensatory mechanism, in which functions that were repressed by miRNAs would be compensated by other similar genes to restore the lost function. It is also interesting to note that repressed genes after a short incubation period have higher fold changes than those after a longer period, which could indicate a stronger effect of the miRNA treatment, only minutes after the start of incubation. Concerning the function of these DEGs, a majority of them were related to metabolism (carbohydrates, lipids, amino acids...) and transcription. This could mean that in response to surrounding plant miRNAs, bacteria will undergo important shifts in their manner of processing nutrients, by rewiring the transcribed genes, in order to compete or cooperate with the host plant.

In order to understand the mechanisms behind bacterial gene silencing by plant miRNAs, we compared the DEGs from our transcriptomics experiment with our *in silico* predicted target genes. Whilst mechanisms behind miRNA-based interference in plants seem to be consensual, the way eukaryotic miRNAs target and repress bacterial genes has to be determined. Plant miRNAs inhibit target gene expression *via* mRNA cleavage or translation repression, through near perfect sequence complementarity [68]. Hypotheses from previous research were based on the assumption that eukaryotic miRNAs target bacterial genes in the same manner, through sequence complementarity, and were somewhat confirmed through *in vitro* and *in vivo* experiments [119]; [120]. For this study, the search of plant miRNA targets in bacterial genomes was automated using the established rules for plant miRNA targeting, used in *psRNAtarget* [141]. Our predictions suggest that the 10 ath-miRNAs internalised in rhizobacteria target many genes, in both *A. thaliana* rhi-

zospheric bacteria and non-plant-associated bacteria. However, very few predicted targets were actually differentially expressed in our *in vitro* conditions. In our case, only 4 out of 251 actually differentially expressed genes were predicted to be targeted by at least one of the six synthetic miRNAs used in the treatment. This low predictability rate could be explained by three possibilities : (i) plant miRNAs do not target bacterial genes in the same way they target plant genes ; most if not all scoring schemes between miRNA and their targets have been developed in the context of miRNA *versus* plant genome interactions. It is possible that the interaction between miRNA and bacterial genomes follow different rules. (ii) the observed DEGs result from a cascade of translational shifts originating from a select few targeted genes and/or (iii) target genes are translationally repressed, which would be undetectable with transcriptomics. This translational repression is, at least in plants, less common than mRNA cleavage [68]. It should also be noted that some miRNAs protect targets from repression, notably in the case of arbuscular mycorrhizal fungi symbiosis [102], in which case the target gene would not be differentially expressed. It is also possible that some of the DEGs observed in *V. paradoxus* result from miRNA side effects such as the production of secondary siRNAs, resulting from the slicing of target genes, which in turn can silence other target genes [163]. Notably, miR165b and miR161.1 from our experimental miRNA mix are considered siRNA-triggering miRNAs [163], meaning their effect can be much broader than their target gene. This would explain a higher number of DEGs compared with the number of predicted miRNA targets, especially seeing that two out of the four DEGs were predicted to be targeted by miR165b. Another “side effect” of miRNAs could exist when transcriptional factors are targeted, such as COG0583, corresponding to the LysR family, which was strongly repressed after 20 min incubation with miRNAs, then overexpressed after 120 min. Even though very few targets were actually differentially expressed in response to the addition of miRNAs to the culture, our study showed that plant miRNAs strongly affect transcriptomics of an important plant-associated bacterium, *V. paradoxus*, but not *B. mycooides*, indicating a selective gene-silencing mechanism in the rhizosphere.

There are still many unanswered questions concerning the function of rhizospheric plant miRNAs and their impact on the rhizomicrobiome. Future work is required to understand the active or passive processes explaining the presence of plant miRNAs in the rhizosphere. Further investigation is necessary to comprehend more deeply the effect of rhizospheric miRNAs on the composition and especially the activity of the rhizospheric microbiota. This work focused solely on potential plant-microbe interactions in the rhi-



zosphere, due to the novel nature of this microbial regulation mechanism, however, it is also possible that these rhizospheric miRNAs target surrounding plants, as described by Betti, *et al* [164]. Nevertheless, for the first time, we detected plant miRNAs in the rhizosphere and showed that they were also found inside rhizospheric bacterial cells, affecting gene expression in some bacteria, thereby providing a mechanism to shape the rhizosphere microbiota. Our study suggests a completely novel way that plants shape their rhizospheric microbiota, challenging the current paradigm of rhizosphere microbial assembly. This knowledge will be essential for future efforts to engineer the plant microbiota.

## 6 Remerciements

We want to thank Hervé Vaucheret and Taline Elmayan (IJPB, INRAE, Versailles, France) for sharing their *Arabidopsis* mutant seeds with us. We also thank Christophe Penno for the helpful discussion. Also, thank you to Paul M. Orwin for providing the *Variovorax paradoxus* EPS strain. This work was financially supported by a CNRS MITI (Mission pour les Initiatives Transverses et Interdisciplinaires 2020-2021) and a IEA (International Emerging Actions) grant (France), the French region of Brittany, a CRSNG and a FRQNT grant (Canada). We acknowledge the National Research Council Canada's New Beginnings Initiative funds awarded to JT and EY. We acknowledge Compute Canada for access to the Graham compute cluster.

## 7 Extended Data

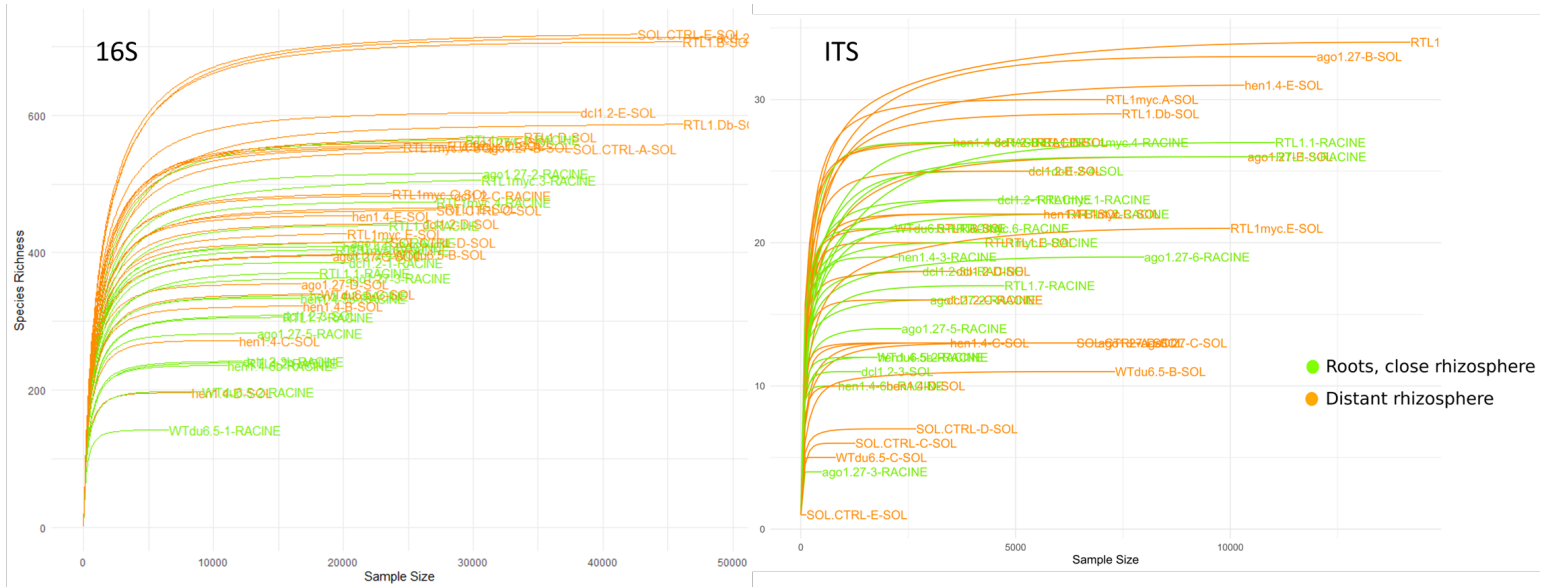


FIGURE 1.7 – Rarefaction curves of bacterial and archaeal reads (16S) and fungal reads (ITS).



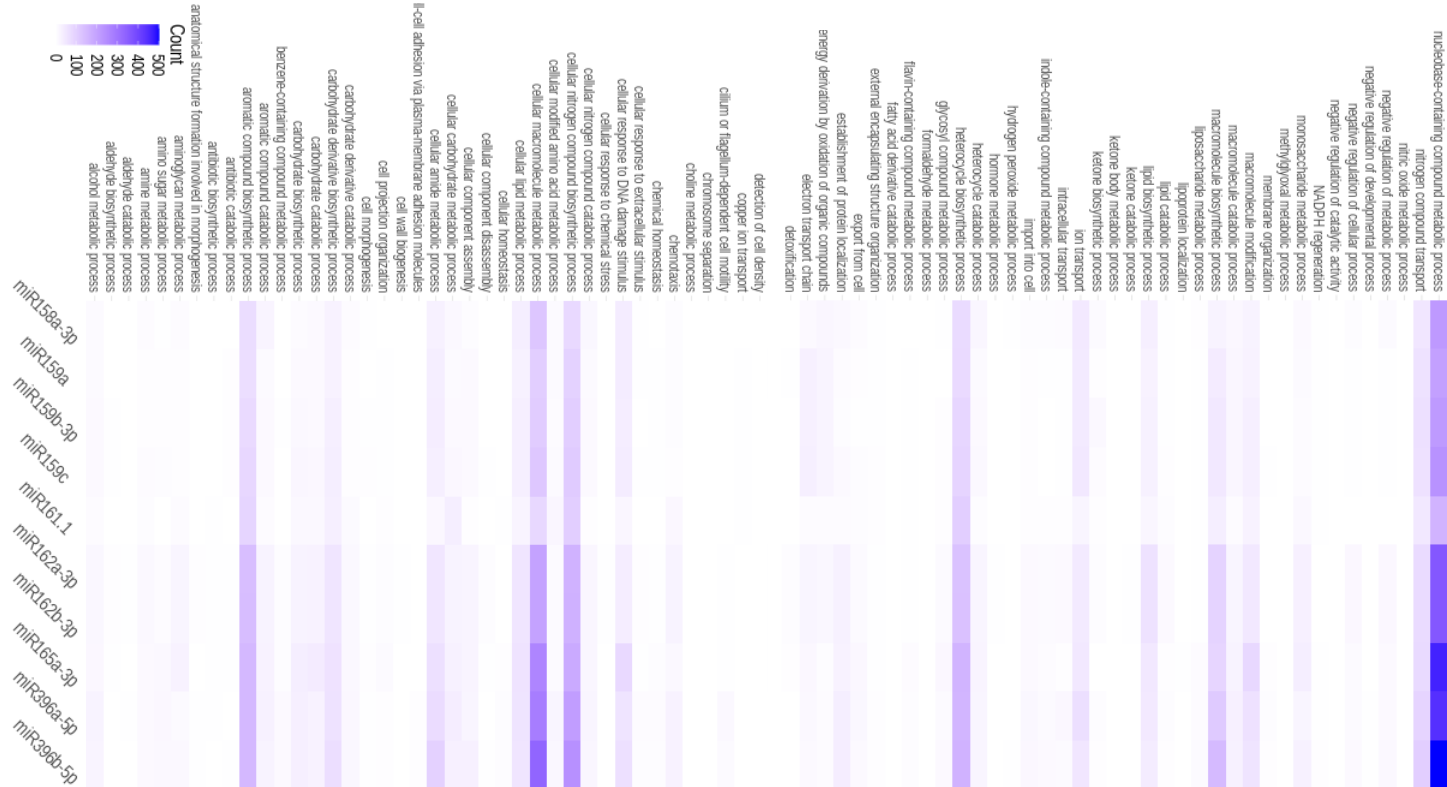
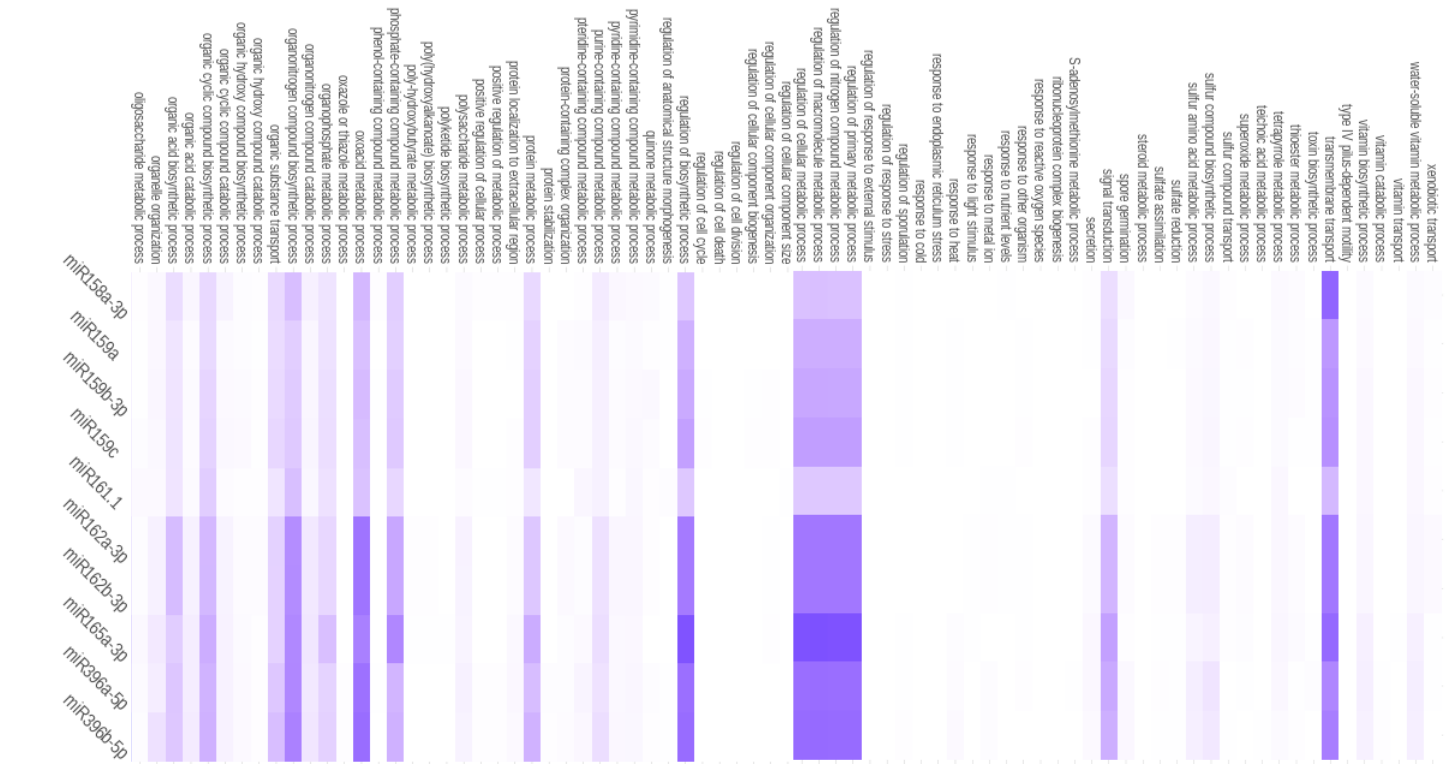
FIGURE 1.8 – Abundance of miRNAs across samples. Normalised counts of the 30 ath-miRNAs significantly differentially abundant in the rhizosphere or in unplanted soil (A), of the 20 bdi-miRNAs (B) and of the 10 ath-miRNAs significantly differentially abundant in rhizospheric bacteria *versus* bacteria isolated from unplanted soils (C). Mean counts per million (CPM) of the most abundant miRNAs found in the close ( $n = 5$ ) and distant ( $n = 5$ ) rhizosphere of *Arabidopsis thaliana* and unplanted soils ( $n = 3$ ), resulting from the replication of our rhizospheric miRNAs experiment in our canadian laboratory (D). The latter data was not processed through DESeq2 as two “unplanted” samples had zero reads, which cannot be computed.

### Roots and close rhizosphere

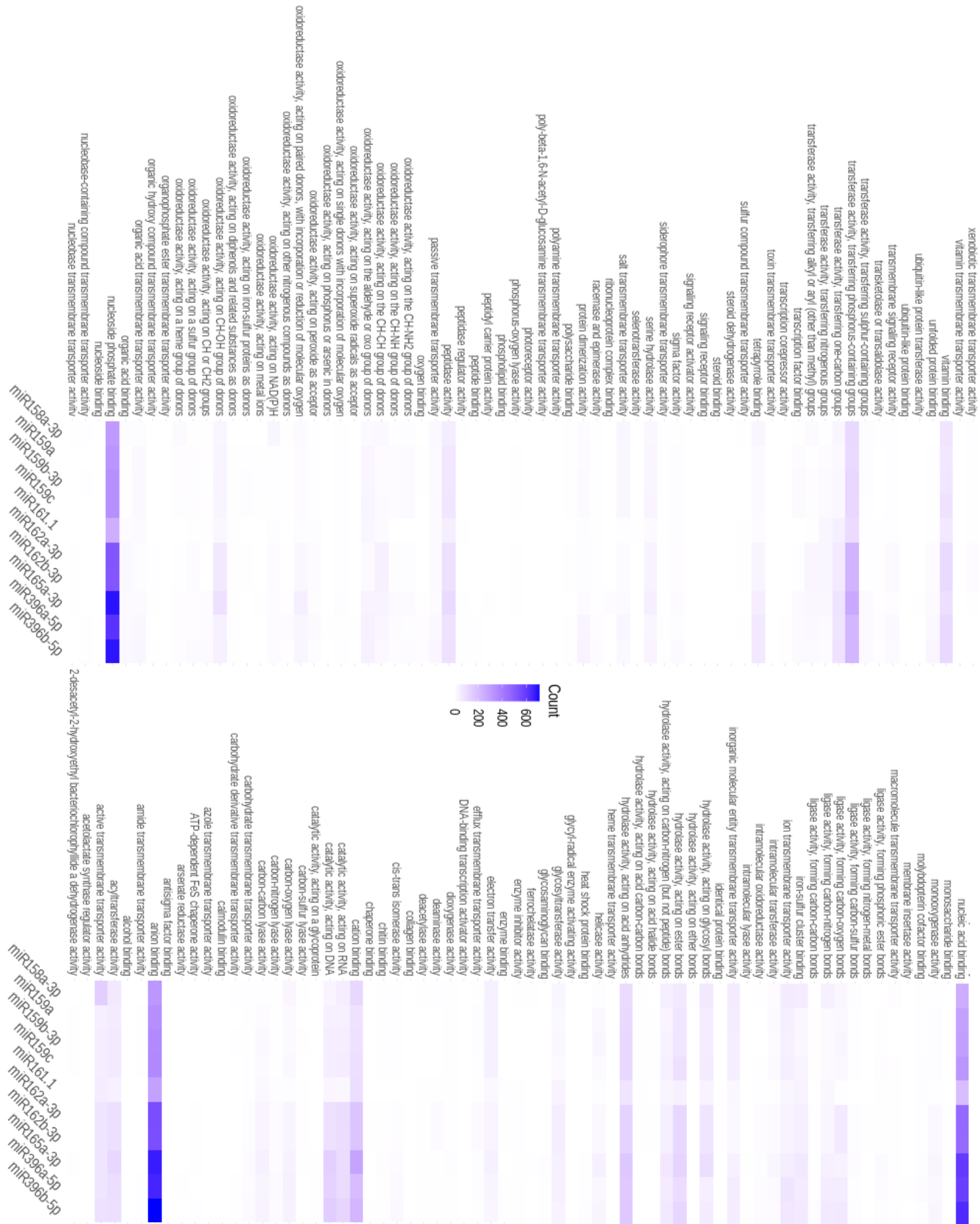
### Distant rhizosphere



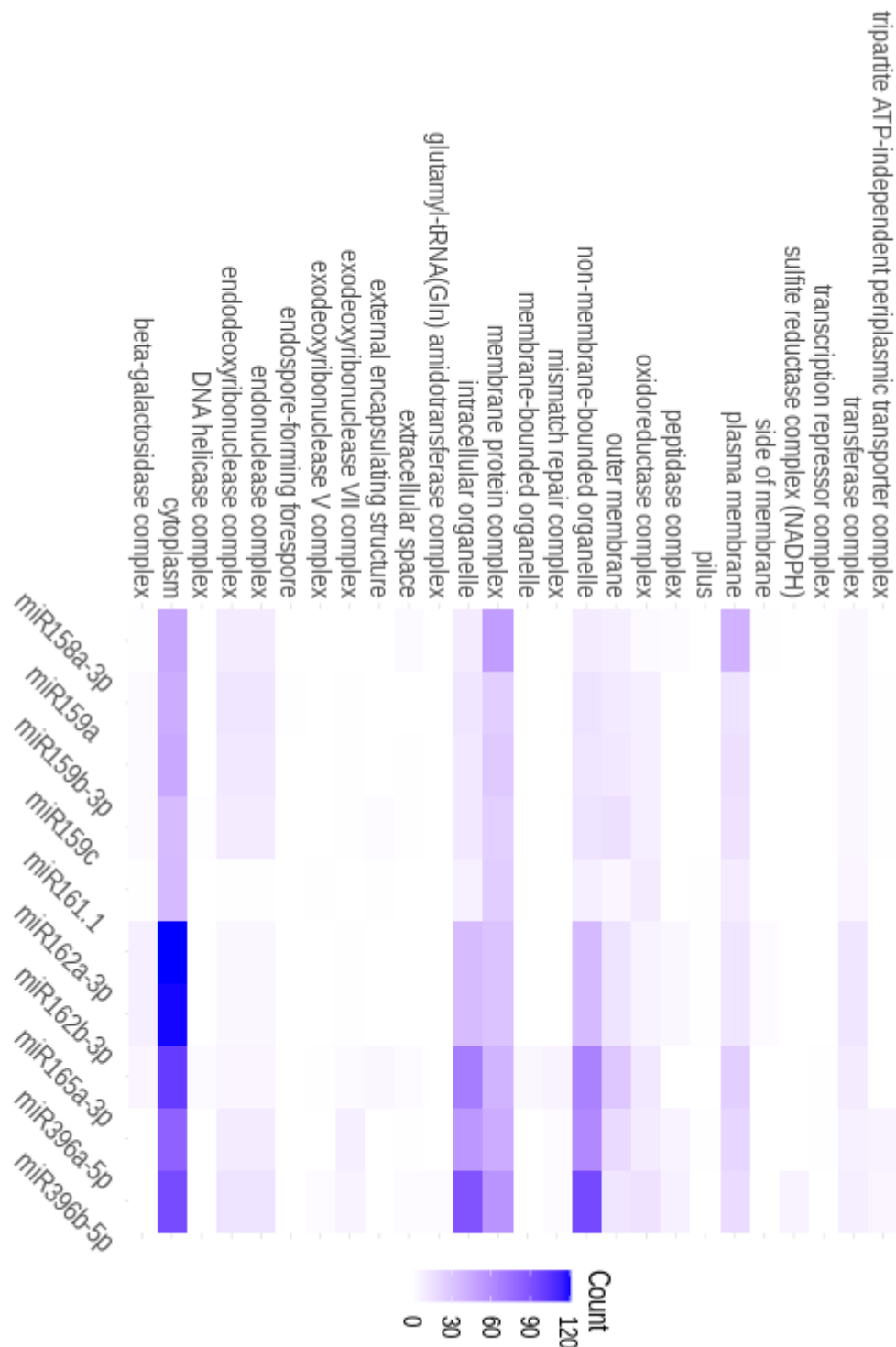
FIGURE 1.9 – Taxonomic profiles of bacterial (A) and fungal (B) communities in the roots and rhizosphere of mutant and wild-type *Arabidopsis thaliana*. Relative abundance of major bacterial phyla and all fungal phyla present across samples. Number of 16S rRNA gene and ITS amplicon copies (C) quantified by qPCR in roots and close rhizosphere (“root samples”) and distant rhizosphere samples (“soil samples”).



(a) Biological Processes



(b) Molecular Functions



(c) Cellular Components

FIGURE 1.10 – Gene ontology of coding sequences in 140 genomes of *Arabidopsis*-associated rhizobacteria, targeted by 10 ath-miRNAs found in rhizobacteria. Annotations are related to the function of the targeted gene product, at a specific ontology level for each domain (A) biological processes (level 4), (B) molecular function (level 3), and the localisation of the active product, (C) cellular component (level 3).



FIGURE 1.11 – Comparison of the number of predicted targets in ARA and NPA groups, by comparing means two-by-two, using Welch two sample t-test or Wilcoxon test ( $P < 0.05$  \*,  $P < 0.01$  \*\*,  $P < 0.001$  \*\*\*). The three ontology domains are represented, related to the activity of the gene product, (A) biological processes, (B) molecular function, and the localisation of the active product, (C) cellular component.



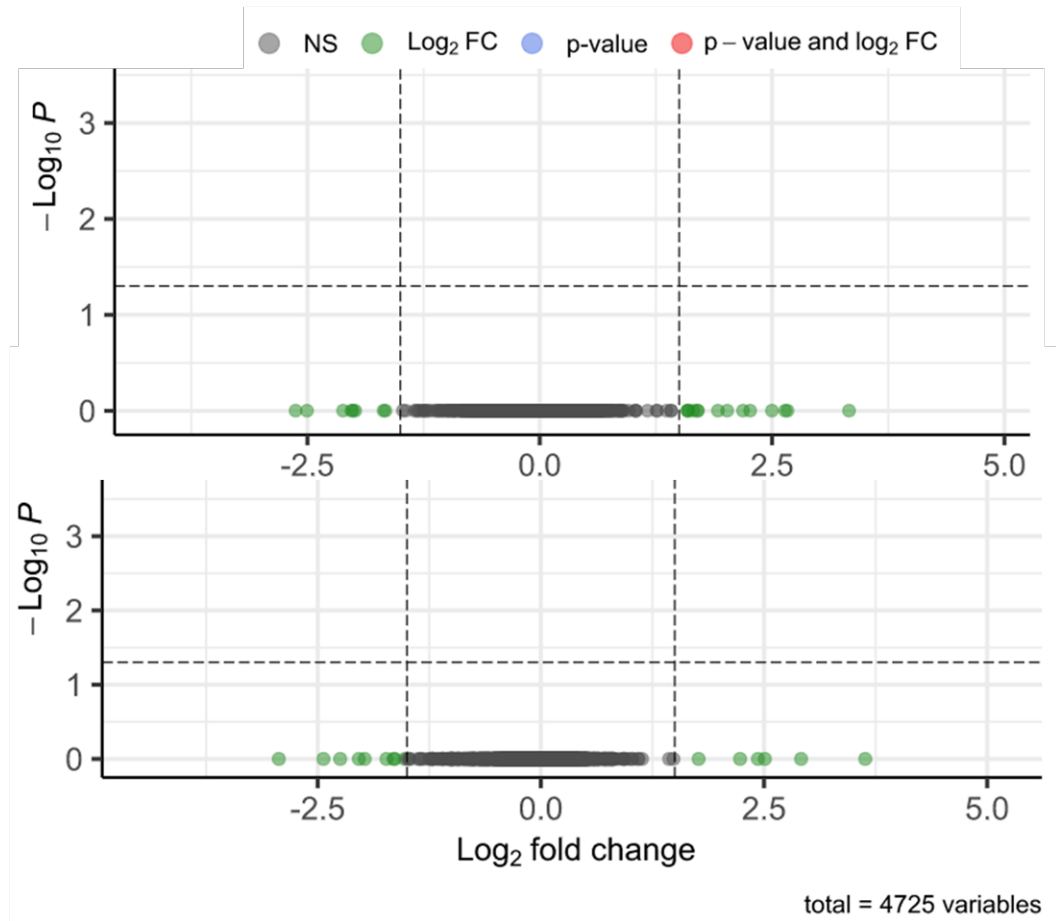


FIGURE 1.12 – Differentially expressed genes in *Bacillus mycoides* after 20 min and 120 min of incubation with 6 synthetic rhizospheric miRNAs (miR158a, miR159a, miR159b, miR159c, miR161.1, miR165b). Fold change threshold is  $|1.5|$  and  $P$ -value was adjusted with Benjamini-Hochberg and the threshold is 0.05.

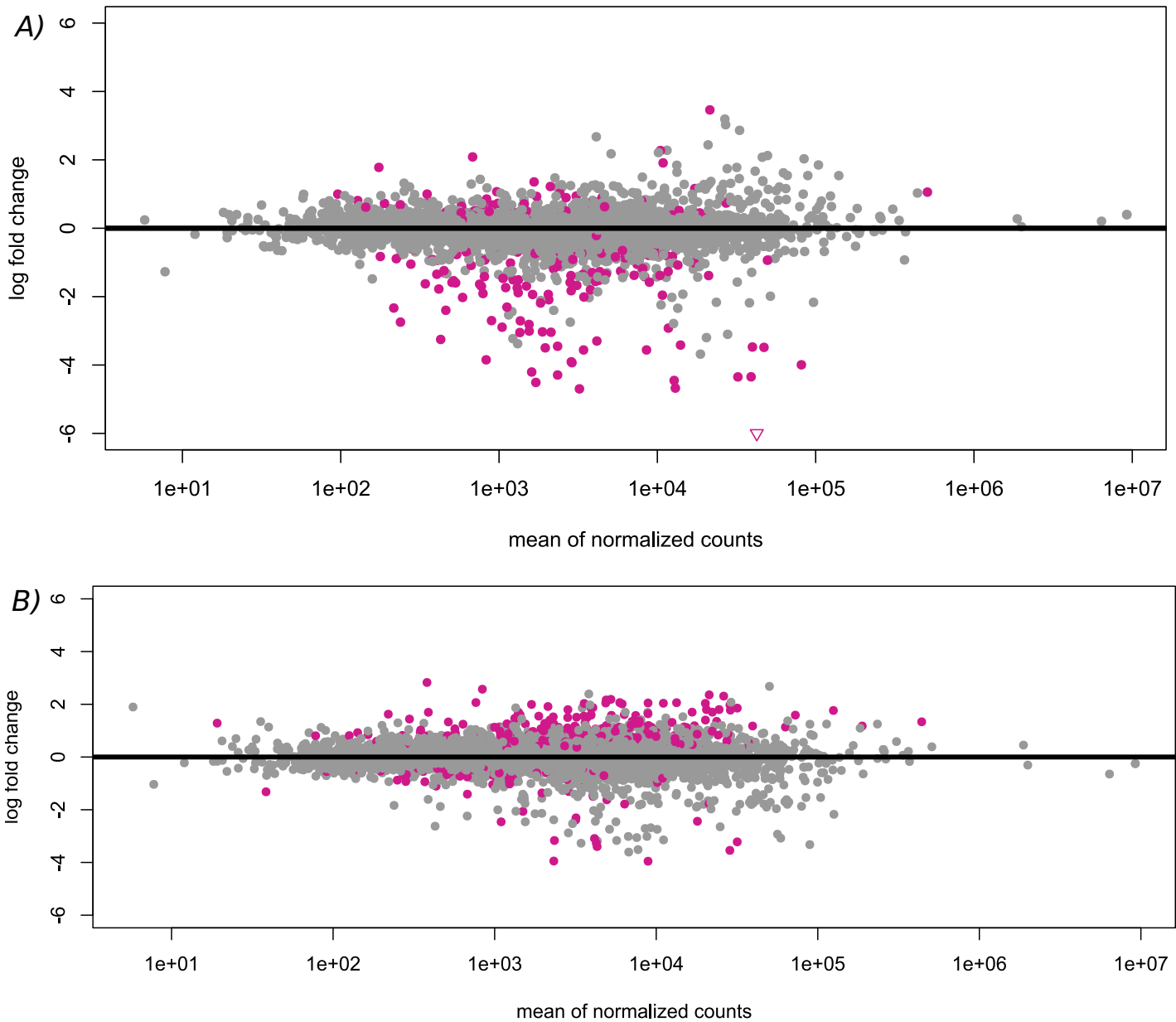


FIGURE 1.13 – MA plots of differentially expressed genes from *Variovorax paradoxus* EPS cultures treated with 6 synthetic miRNAs or with 6 scrambled synthetic miRNAs, for 20 min (A) and 120 min (B). The y-axis shows the log fold change between miRNA treatment and the scrambled treatment, against the mean of normalized counts on the x-axis. Transcripts, represented by each point, coloured in pink have a  $P_{adj} < 0.05$ .

Sample	rawFragments	survivingFragments	survivingFragments%	passedSizeSelect	mapped	mapped%
<i>Brachypodium</i> Rhizosphere 1	30941049	27145431	87.73%	15452991	2374652	15%
<i>Brachypodium</i> Rhizosphere 2	33599073	31927245	95.02%	16520631	2317622	14%
Unplanted soil 1	29965050	27498938	91.77%	16215802	1892261	11%
Unplanted soil 2	37624335	35339650	93.93%	23389639	3026977	12%
Unplanted soil 3	36702092	34896778	95.08%	20764377	2566492	12%
<i>Arabidopsis</i> Rhizosphere 1	42080347	40379065	95.96%	21383109	2721628	12%
<i>Arabidopsis</i> Rhizosphere 2	37701865	36130657	95.83%	19039572	2500634	13%
<i>Arabidopsis</i> Rhizosphere 3	20642399	19660998	95.25%	9315269	1490261	15%
Unplanted soil 1	29965050	27498938	91.77%	16215802	1230711	7%
Unplanted soil 2	37624335	35339650	93.93%	23389639	1959935	8%
Unplanted soil 3	36702092	34896778	95.08%	20764377	1701043	8%
Bacteria Rhizosphere 1	14768383	14359515	97.23%	1260549	154399	12%
Bacteria Rhizosphere 2	22201918	21463143	96.67%	3188385	343548	10%
Bacteria Rhizosphere 3	37989430	35073127	92.32%	5801888	558355	9%
Bacteria Rhizosphere 4	15739371	14884917	94.57%	1407357	211177	15%
Bacteria Rhizosphere 5	34783980	32949183	94.73%	5609537	773884	13%
Bacteria Rhizosphere 6	39968454	38090819	95.30%	6211275	1081063	17%
Bacteria Rhizosphere 7	36489363	35134083	96.29%	4786297	680164	14%
Bacteria Rhizosphere 8	16570402	15505129	93.57%	1671976	252763	15%
Bacteria Unplanted Soil 1	21369364	19770954	92.52%	1744625	214602	12%
Bacteria Unplanted Soil 2	16938392	16275644	96.09%	1824461	154234	8%
Bacteria Unplanted Soil 3	17351898	16888206	97.33%	2158889	280552	12%
Bacteria Unplanted Soil 4	17499765	16749512	95.71%	2186658	247935	11%
Bacteria Unplanted Soil 5	18805021	17792355	94.61%	1736292	226279	13%
Bacteria Unplanted Soil 6	16693347	15390661	92.20%	1369427	17755	12%

FIGURE 1.14 – Number of sequences retrieved after each filtration step and mapped against the reference genome (either *Arabidopsis thaliana* or *Brachypodium distachyon*). Samples were *A. thaliana* or *B. distachyon* rhizospheric samples, unplanted soil samples or from bacteria isolated from the rhizosphere of *A. thaliana* or from unplanted soils.

<b>miRNA</b>	<b>number of targets</b>
miR165a-3p	10531
miR396b-5p	7488
miR162b-3p	7416
miR162a-3p	7415
miR396a-5p	7174
miR159c	6779
miR159b-3p	6506
miR159a	6369
miR158a-3p	6092
miR161.1	4278
<b>Total number of targets</b>	<b>70048</b>
<b>Mean number per miRNA</b>	<b>7004,8</b>
<b>Mean number per genome</b>	<b>500,34</b>

FIGURE 1.15 – Number of sequences in 140 *Arabidopsis thaliana* rhizospheric bacterial genomes potentially targeted by the 10 ath-miRNAs found in rhizospheric bacteria.

Gene Locus	log2FoldChange	Gene Annotation	COG Functional category
VARPA_RS04990	3,460207698	3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate (DAHP) synthase	Amino acid transport and metabolism
VARPA_RS04995	2,272778534	Uncharacterized conserved protein	Function unknown
VARPA_RS08365	2,085704277	NULL	NULL
VARPA_RS01850	1,354853826	2-keto-4-pentenoate hydratase/2-oxohepta-3-ene-1,7-dioic acid hydratase (catechol pathway)	Secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism
VARPA_RS03015	1,220381857	Phosphoglycerate dehydrogenase and related dehydrogenases	Amino acid transport and metabolism
VARPA_RS18845	1,06891899	NULL	NULL
VARPA_RS09945	0,998778586	NULL	NULL
VARPA_RS01415	0,998217614	Amidases related to nicotinamidase	Secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism
VARPA_RS01860	0,900114209	Uncharacterized protein conserved in bacteria	Function unknown
VARPA_RS09940	0,854582396	NULL	NULL
VARPA_RS23070	0,762227752	Predicted peroxiredoxins	General function prediction only
VARPA_RS10025	0,726059033	NULL	NULL
VARPA_RS08085	0,721980201	Uncharacterized protein conserved in bacteria	Function unknown
VARPA_RS21455	0,718808748	Permeases of the drug/metabolite transporter (DMT) superfamily	Carbohydrate transport and metabolism / Amino acid transport and metabolism / General function prediction only
VARPA_RS08080	0,715822965	Uncharacterized protein conserved in bacteria	Function unknown
VARPA_RS09985	0,688690925	NULL	NULL
VARPA_RS18975	0,683866601	ABC-type branched-chain amino acid transport systems, periplasmic component	Amino acid transport and metabolism
VARPA_RS02995	0,642603324	Response regulators consisting of a CheY-like receiver domain and a winged-helix DNA-binding domain	Signal transduction mechanisms / Transcription
VARPA_RS21450	0,62807404	Methylated DNA-protein cysteine methyltransferase	DNA replication, recombination, and repair
VARPA_RS04640	0,509375977	Muconolactone delta-isomerase	Secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism
VARPA_RS05485	0,506560536	Uncharacterized conserved protein	Function unknown
VARPA_RS20600	0,50017896	Predicted transcriptional regulators	Transcription
VARPA_RS19000	0,491557514	Choline dehydrogenase and related flavoproteins	Amino acid transport and metabolism
VARPA_RS04645	0,49044189	Amidases related to nicotinamidase	Secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism
VARPA_RS19030	0,474062958	Uncharacterized protein conserved in bacteria	Function unknown
VARPA_RS05425	-6,111502334	Indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase, alpha and beta subunits	Energy production and conversion
VARPA_RS25660	-4,697652283	Acetyl-CoA acetyltransferase	Lipid metabolism
VARPA_RS06645	-4,674793196	HGG motif-containing thioesterase, possibly involved in aromatic compounds catabolism	Secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism
VARPA_RS25655	-4,509186656	Uncharacterized protein conserved in bacteria	Function unknown
VARPA_RS06650	-4,451356676	Enoyl-CoA hydratase/carnithine racemase	Lipid metabolism
VARPA_RS22515	-4,34779253	Xanthine/uracil/vitamin C permease	Nucleotide transport and metabolism
VARPA_RS06640	-4,345153529	Coenzyme F390 synthetase	Coenzyme metabolism
VARPA_RS06655	-4,291483164	Carbonic anhydrases/acetyltransferases, isoleucine patch superfamily	General function prediction only
VARPA_RS25665	-4,204511287	Acyl CoA:acetate/3-ketoacid CoA transferase, beta subunit	Lipid metabolism
VARPA_RS25650	-3,931702177	Uncharacterized protein conserved in bacteria	Function unknown
VARPA_RS27625	-3,905250083	Type VI protein secretion system component Hcp (secreted cytotoxin)	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
VARPA_RS25670	-3,847887475	Acyl CoA:acetate/3-ketoacid CoA transferase, alpha subunit	Lipid metabolism
VARPA_RS06660	-3,560196319	Transcriptional regulator	Transcription
VARPA_RS27630	-3,559017567	Predicted component of the type VI protein secretion system	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
VARPA_RS27605	-3,497881576	ATP-binding subunits of Clp protease and DnaK/DnaJ chaperones	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
VARPA_RS22525	-3,473197286	Xanthine dehydrogenase, molybdopterin-binding subunit B	Nucleotide transport and metabolism
VARPA_RS22520	-3,416567523	Transcriptional regulator	Transcription
VARPA_RS05955	-3,041622355	Mannitol-1-phosphate/altronate dehydrogenases	Carbohydrate transport and metabolism
VARPA_RS05950	-3,02977799	ABC-type sugar transport systems, ATPase components	Carbohydrate transport and metabolism
VARPA_RS05940	-3,006585101	ABC-type sugar transport systems, permease components	Carbohydrate transport and metabolism
VARPA_RS05935	-2,920648816	ABC-type sugar transport system, periplasmic component	Carbohydrate transport and metabolism
VARPA_RS06665	-2,708607167	Short-chain dehydrogenases of various substrate specificities	General function prediction only
VARPA_RS05960	-2,701149727	Dehydrogenases with different specificities (related to short-chain alcohol dehydrogenases)	Secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism / General function prediction only
VARPA_RS24860	-2,333020189	Type III secretory pathway, component EscS	Intracellular trafficking and secretion
VARPA_RS04360	-2,306627624	Uncharacterized protein conserved in bacteria	Function unknown

FIGURE 1.16 – Top 25 genes with increased or decreased expression in *Variovorax paradoxus* EPS culture after 20 min of incubation with six synthetic rhizospheric miRNAs (miR158a, miR159a, miR159b, miR159c, miR161.1, miR165b). Adjusted *P*-value < 0.05.

## Découverte et exploration du rôle des microARNs dans la rhizosphère

Gene Locus	log2FoldChange	Gene Annotation	COG Functional Category
VARPA_RS18770	2,35795184	Acetyl-CoA carboxylase, carboxyltransferase component (subunits alpha and beta)	Lipid metabolism
VARPA_RS18765	2,310373236	Acetyl/propionyl-CoA carboxylase, alpha subunit	Lipid metabolism
VARPA_RS03125	2,187924475	Anthranilate/para-aminobenzoate synthases component I	Amino acid transport and metabolism / Coenzyme metabolism
VARPA_RS03140	2,164520761	Threonine aldolase	Amino acid transport and metabolism
VARPA_RS10355	2,066704641	NULL	NULL
VARPA_RS31390	2,06404175	Putative periplasmic protein kinase ArgK and related GTPases of G3E family	Amino acid transport and metabolism
VARPA_RS18760	2,061124419	Biotin synthase and related enzymes	Coenzyme metabolism
VARPA_RS03150	2,048990157	Anthranilate phosphoribosyltransferase	Amino acid transport and metabolism
VARPA_RS18785	2,034646056	Methylmalonyl-CoA mutase, N-terminal domain/subunit	Lipid metabolism
VARPA_RS03135	2,031586194	Anthranilate/para-aminobenzoate synthases component II	Amino acid transport and metabolism / Coenzyme metabolism
VARPA_RS18755	2,013998103	NULL	NULL
VARPA_RS03145	1,994466602	Putative threonine efflux protein	Amino acid transport and metabolism
VARPA_RS03160	1,915044649	Uracil DNA glycosylase	DNA replication, recombination, and repair
VARPA_RS18780	1,87437957	NULL	NULL
VARPA_RS03155	1,859545095	Indole-3-glycerol phosphate synthase	Amino acid transport and metabolism
VARPA_RS27305	1,799910431	Glutamate dehydrogenase/leucine dehydrogenase	Amino acid transport and metabolism
VARPA_RS26920	1,797676176	L-asparaginase/archaeal Glu-tRNA <sup>Gln</sup> amidotransferase subunit D	Amino acid transport and metabolism / Translation, ribosomal structure and biogenesis
VARPA_RS18565	1,701456894	Acyl-coenzyme A synthetases/AMP-(fatty) acid ligases	Lipid metabolism
VARPA_RS18750	1,696583494	Transcriptional regulators	Transcription
VARPA_RS00930	1,59325236	ABC-type amino acid transport/signal transduction systems, periplasmic component/domain	Amino acid transport and metabolism / Signal transduction mechanisms
VARPA_RS18790	1,581533417	Transcriptional regulators	Transcription
VARPA_RS00935	1,569991579	ABC-type amino acid transport system, permease component	Amino acid transport and metabolism
VARPA_RS00925	1,551736827	Transcriptional regulator	Transcription
VARPA_RS00960	1,549769649	N-formylglutamate amidohydrolase	Amino acid transport and metabolism
VARPA_RS00955	1,522602641	Cytosine deaminase and related metal-dependent hydrolases	Nucleotide transport and metabolism / General function prediction only
VARPA_RS01580	-3,541438285	ABC-type Fe <sup>3+</sup> transport system, periplasmic component	Inorganic ion transport and metabolism
VARPA_RS28710	-3,218881534	Putative translation initiation inhibitor, yjgF family	Translation, ribosomal structure and biogenesis
VARPA_RS22555	-2,437876466	Non-ribosomal peptide synthetase modules and related proteins	Secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism
VARPA_RS22550	-2,386943144	Glycosyl transferases, related to UDP-glucuronosyltransferase	Carbohydrate transport and metabolism / Signal transduction mechanisms
VARPA_RS01905	-2,307555419	NULL	NULL
VARPA_RS22540	-2,063073013	Predicted glycosyltransferases	General function prediction only
VARPA_RS28715	-1,770803958	Transcriptional regulator containing an amidase domain and an AraC-type DNA-binding HTH domain	Transcription
VARPA_RS11860	-1,362890779	O-Methyltransferase involved in polyketide biosynthesis	Secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism
VARPA_RS17375	-1,319902906	ABC-type branched-chain amino acid transport systems, ATPase component	Amino acid transport and metabolism
VARPA_RS07155	-1,044383227	NULL	NULL
VARPA_RS30710	-0,806120683	NULL	NULL
VARPA_RS28720	-0,756332952	NULL	NULL
VARPA_RS13805	-0,647552341	NULL	NULL
VARPA_RS22025	-0,523822703	Acyl-CoA synthetases (AMP-forming)/AMP-acid ligases II	Lipid metabolism / Secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism
VARPA_RS27705	-0,510202019	NULL	NULL
VARPA_RS14455	-0,445501949	Uncharacterized protein conserved in bacteria	Function unknown
VARPA_RS03560	-0,430463719	NULL	NULL
VARPA_RS14615	-0,426269097	Pirin-related protein	General function prediction only
VARPA_RS13405	-0,42463725	Nitroreductase	Energy production and conversion
VARPA_RS29615	-0,420665322	Arabinose efflux permease	Carbohydrate transport and metabolism
VARPA_RS08005	-0,402520102	2-polypropenyl-6-methoxyphenol hydroxylase and related FAD-dependent oxidoreductases	Coenzyme metabolism / Energy production and conversion
VARPA_RS13585	-0,388496	Uncharacterized conserved protein	Function unknown
VARPA_RS21545	-0,384485396	NULL	NULL
VARPA_RS00680	-0,30466649	NULL	NULL

FIGURE 1.17 – Top 25 genes with increased or decreased expression in *Variovorax paradoxus* EPS culture after 120 min of incubation with six synthetic rhizospheric miRNAs (miR158a, miR159a, miR159b, miR159c, miR161.1, miR165b). Adjusted *P*-value < 0.05.

## 8 Supplementary Information

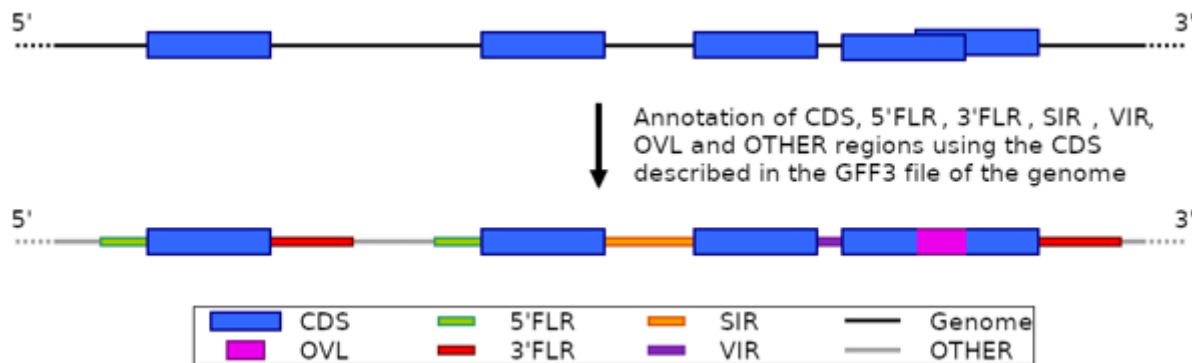


FIGURE 1.18 – CDS : coding sequence; 5'FLR : 100 nt from the 5' CDS extremity; 3'FLR : 350nt from 3' CDS extremity; SIR : short inter-CDS region, not identifiable as 5'UTR or 3'UTR, when the length of the CDS is inferior to the sum of the 5'FLR and 3'FLR; OVL : CDS overlap; VIR : very short inter-CDS region, when the distance between CDSs < 20 bp; OTHER : all other cases.

ath-miR158a-3p	UCCCAAUGUAGACAAAGCA
ath-miR159a	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA
ath-miR159b-3p	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUU
ath-miR159c	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCCU
ath-miR161.1	UGAAAGUGACUACAUCGGGGU
ath-miR165b	UCGGACCAGGCUUCAUCCCC
sc-ath-miR158a-3p	CAACAAGAUGACAAUGUCAC
sc-ath-miR159a	AGGGAAGUAUUGUCGUGACUU
sc-ath-miR159b-3p	UGGGGACUGUAUCUAGUUAG
sc-ath-miR159c	CAGGCCUUGGUGUUAUAUGAG
sc-ath-miR161.1	CUGCAGCUAGUUGGGUAAAGA
sc-ath-miR165b	CUCCACCGAGGUCCUCCACGU

FIGURE 1.19 – Sequences of the synthetic miRNAs from *Arabidopsis thaliana*'s rhizosphere (“ath-miR”) and the synthetic scrambled miRNAs (“sc-ath-miR”). These RNA sequences were synthesised as single strands with an additional methyl group at the 3' end.



# TRANSITION

---

Au travers du **Chapitre 1**, nous avons déterminé que les plantes possèdent des miARNs dans leur rhizosphère, puis nous avons débuté une investigation du rôle de ces miARNs, en supposant que ces derniers étaient impliqués dans les interactions plante-microorganismes. Cette hypothèse a été rapidement favorisée, après la détection de miARNs rhizosphériques de plantes, dans des bactéries isolées de la rhizosphère, contrairement aux bactéries de sol sans plantes. Grâce à l'utilisation de plantes mutantes, avec une biosynthèse des petits ARNs affectée, nous avons réalisé l'impact structurant des petits ARNs de plantes sur la composition taxonomique du microbiote racinaire et rhizosphérique. Puis, nous avons réalisé une expérience de confrontation de miARNs synthétiques, imitant ceux de la rhizosphère, et de cultures de bactéries associées aux racines. Nos résultats ont montré un effet important des miARNs sur la transcriptomique bactérienne, en comparaison avec les miARNs scrambled contrôles. Cet ensemble de résultats a mis en évidence que les miARNs rhizosphériques de plantes ont un rôle de modulation du microbiote des racines et de la rhizosphère, à la fois taxonomiquement et fonctionnellement.

Dans ce **Chapitre 2**, nous avons opté pour une approche *in planta*, plus réaliste que les expériences de confrontations *in vitro*, et surtout plus précise que les mutations pléiotropiques utilisées précédemment. Pour confirmer le rôle des miARNs de plantes comme modulateurs du microbiote rhizosphérique, nous avons amplifié la production *in planta* d'un miARN rhizosphérique grâce à l'application du miPEP correspondant. Dans cette optique, nous avons sélectionné trois miARNs/miPEPs : le miR159a, le miR159b et le miR159c, tous abondamment présents dans la rhizosphère d'*Arabidopsis thaliana*, ainsi que dans les bactéries isolées de cette dernière. Dans ce Chapitre, nous nous sommes intéressés à l'effet d'un miARN seul, amplifié par miPEP, sur les communautés microbiennes rhizosphériques, mais aussi à son effet sur la transcriptomique d'une bactérie inoculée de manière axénique sur les racines d'*A. thaliana*.



# MODIFICATION DE LA COMPOSITION ET DE L'ACTIVITÉ DU MICROBIOTE RHIZOSPHERIQUE DE *Arabidopsis* *thaliana* APRÈS APPLICATION DU MIPEP159A, B ET C

---

## 1 Présentation de l'article

*Arabidopsis* root -associated microbial communities change following overexpression of miRNA159a, b, c using miRNA-encoded peptides (miPEPs)

Authors : Harriet Middleton<sup>1,2</sup>, Étienne Yergeau<sup>2</sup>, Emmanuel Clostres<sup>1</sup>, Julien Tremblay<sup>3</sup>, Cécile Monard<sup>1</sup> and Abdelhak El Amrani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ECOBIO, CNRS UMR 6553, Université de Rennes, Campus Beaulieu, Rennes, France

<sup>2</sup>Institut National de la Recherche Scientifique, Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Laval, Québec, Canada

<sup>3</sup>National Research Council Canada, Energy, Mining and Environment, Montréal, Québec, Canada

### Abstract

Recently, microRNAs (miRNAs) have been identified as mediators of cross-kingdom interactions in the rhizosphere. By excreting specific miRNAs through their roots and targeting microbial genes, plants can modulate very finely the activity of their rhizospheric microbiota. Many microbial engineering tools are based on signal molecules used by plants and microbes. This novel signalling channel offers a new perspective on ways to en-

gineer the rhizospheric microbiota, notably through miRNA-encoded peptides (miPEPs). These small peptides specifically increase the production of their corresponding miRNA, boosting the silencing of the targeted gene. Application of synthetic miPEPs on plant leaves or in the soil has shown to be effective to modulate given plant genes. Given the recent discovery of the role of plant miRNAs in modulating the rhizospheric microbiota, it seems reasonable to explore the use of miPEPs to create a plant-driven microbial engineering tool. In this paper, we explored the impact of miPEPs on the composition and activity of *Arabidopsis* root and rhizospheric microbial communities. In our experiments, we used miPEPs associated with three members of the miR159 family, which were the most detected in the rhizosphere : miPEP159a, 159b and 159c. miPEPs were applied at the base of *Arabidopsis* plants. The composition of the microbial communities was assessed through bacterial 16S and fungal ITS sequencing. We found that the application of miPEPs did not completely shift the microbiota, but rather finely modulated the abundance of certain ASVs. Knowing plant miRNAs can target and silence bacterial genes, we established an experiment to investigate the effect of miPEP-application on bacterial gene expression in the rhizosphere. Using *Arabidopsis thaliana* and the bacterium, *Variovorax paradoxus* EPS, we measured the expression of potentially targeted genes, two hours after the application of miPEP159c, by quantitative PCR. After confirming the increase of miRNA production attributed to the miPEP application, we did find out that the expression of two-in-three predicted targeted genes was in fact repressed. These bacterial genes produced a transcription regulator from the LysR family and a phosphatidate cytidyltransferase, respectively. In parallel, we found that the expression of another predicted targeted gene, an alpha-2-macroglobulin, was induced by the miPEP treatment. These exploratory experiments show the great potential of synthetic miPEPs to modulate specific microbial functions in the rhizosphere, without disrupting the whole microbiota or resorting to genetically modified plants.

## 2 Introduction

Plant microRNAs (miRNAs) discovered in the rhizosphere lead to microbial gene silencing [165]. Although the root and rhizospheric microbial communities are impacted in mutants of *Arabidopsis thaliana* that are deficient in miRNAs and/or small interfering RNAs (siRNAs), it was not clear if this was through a direct or indirect effect of miRNAs, as plant small RNAs have many important roles across plant tissues. Individual bacteria

can also be affected by synthetic miRNAs [165], but it is not sure how this would translate *in planta* and at the community level. Here, we sought to analyse the effects of specific miRNAs at the community level, without affecting the whole plant.

miRNA-encoded peptides (miPEPs) are a good tool for modulating specific plant miRNAs [166]; [167]. These peptides are encoded in the primary transcripts, the pri-miRNAs, of miRNAs and are involved in a positive auto-regulatory loop, in which a miPEP increases the transcription of its corresponding pri-miRNA [167]. In fact, recently, it was discovered that there are three types of pri-miRNAs : long, short and alternatively spliced (AS) transcripts [98]. The long transcripts are processed in the nucleus and produce the mature miRNAs, whereas the short and AS transcripts are exported into the cytoplasm where they are translated into miPEPs. These miPEPs then re-enter the nucleus to activate the transcription of their pri-miRNA. miPEPs have been proposed as an innovative tool for fundamental research and applied agronomy [166], to modulate the transcription of plant target genes without requiring genetic modifications. miPEPs, through an increased host miRNA expression, have never been used to modulate microbial activity, so it is not sure how much of an effect they will have.

Modulating the abundance of a single rhizospheric miRNA could directly and indirectly modulate the microbial communities. It could directly inhibit the expression of the target gene in the target bacterium, leading to a change in this bacterium's activity and abundance. However, this could also result in a more global effect on the activity, but also on the taxonomic composition of the microbiota. Indeed, microbes interact with each other, and changes in the abundance of a targeted bacterium could impact other non-targeted microorganisms. Also, even if a miRNA targets a single gene, it will impact other genes in related pathways, resulting in a cascade of transcriptional reactions. miRNAs also often target transcription factors [168], and can lead to the production of secondary siRNA [163]. In line with this, we found that a mix of the six most abundant plant miRNAs found in the rhizosphere modifies the expression of numerous bacterial genes [165], well beyond the target genes predicted *in silico*.

Our aim is to confirm the role of miRNAs in structuring the root and rhizospheric microbiota, through an *in planta* miPEP-based approach. We first analysed the root and rhizospheric microbiota composition of *A. thaliana* plants treated with miPEP159a, miPEP159b or miPEP159c, through 16S and ITS sequencing. These miPEPs were selected as their corresponding miRNAs were previously shown to be highly abundant in the rhizosphere of *A. thaliana* and contributed to transcriptomic shifts in *Variovorax paradoxus*

EPS, an essential root-bacteria [150], when added to the bacterial culture [165]. In a second phase, we designed an *in vitro* axenic experiment, in which roots of *A. thaliana* were inoculated with *V. paradoxus* EPS, and treated with miPEP159c. After searching for potential miR159c target genes in the strain genome, we identified changes in the expression of these predicted targets using qPCR. Here, we provide evidence that the root and rhizospheric microbial communities can be modulated by a single miRNA increase, through miPEP application.

### 3 Matériel et méthodes

#### *Growing plants & miPEP treatment*

*Arabidopsis thaliana* col-0 were sowed on a mix of potting soil and sifted sand (<2.2mm) (ratio 2 :1), in a semi-automated greenhouse. After germination, seedlings were transferred into individual pots (3cm diameter, 5cm depth) that were moved to a growth chamber to allow a better control of the environmental conditions : 16h of daylight, 8h of darkness, at 20°C. When the plants reached the 6-leaf stage, the miPEP treatments started. Plants and bare soils (16 replicates/condition) were treated with 500µL of water (control condition) or a miPEP solution (20µM of miPEP159a, miPEP159b or miPEP159c), applied at the base of the crown, 3 times a week, for a duration slightly over 3 weeks, for a total of 10 applications. After each treatment, the trays in the chamber were moved around to diminish any border effect. It should be noted that these treatments were the only source of hydration for these plants, to avoid any dilution effect. However, at the end of the experiment, it was clear that the conditions were too dry for some plants.

#### *Sampling & DNA-RNA extraction*

Once the treatments were over, each individual pot was spilled on a sieve and the aerial part was separated from the root system. The roots of two plants were pooled together and briefly rinsed in 10mL of PBS (1X). The roots and the attached soil (“close rhizosphere”) were then separated from the rinsing solution, using a funnel and a sterile compress, and were subsequently dried using absorbent paper. The rinsing solution, containing the “distant rhizosphere”, and the dried “roots and close rhizosphere” were flash frozen in liquid nitrogen and were then stored at -80°C. DNA and RNA were co-extracted from the distant rhizosphere samples, using a protocol based on Griffiths, *et al.* [169], optimised for nucleic acid extraction from soils detailed in our previous paper [165]. DNA from roots and close rhizosphere was extracted using the NucleoSpin® Plant II mini kit (MACHEREY-

NAGEL, Düren, Germany). RNA from these samples was isolated using the Griffiths-based protocol. The integrity and quantity of the extracted DNA and RNA was estimated using Nanodrop and by running a 1% agarose gel.

*Amplicon sequencing & processing* DNA was sent to the Centre d'expertise et de services Génome Québec (Montreal, Canada) for the sequencing of 16S rRNA and ITS, on an Illumina MiSeq in pair-ended mode (2x250). In parallel, 16S and ITS copies were quantified by qPCR, as described previously [165], to assess more accurately the composition of our samples' microbial communities. Amplicons were processed with AmpliconTagger [134] as described previously [165].

#### *Microbial data analysis*

The analysis of microbial communities was performed in R with the *phyloseq* package v 1.32.0 [138]. The entire code and data used to create our figures and further explanation concerning the statistical analysis are available on GitHub. The rarefaction curves suggested that our samples were sufficiently sequenced Figures (2.8 and 2.9). The finest level of assigned taxonomy was the genus. Alpha-diversity indices were calculated after rarefying all reads to the lowest number of reads in a sample. These indices were statistically analysed in comparison to the control group, using a linear model, after having checked the assumptions concerning the residuals. The impact of the miPEP treatments on the microbial communities was assessed using a Weighted UniFrac distance matrix, to compare the similarities between the microbiota of each of our samples. These similarities were represented using a Principal Coordinates Analysis (PCoA), in which similarity of communities is represented by a short distance between samples. The axes of a PCoA were interpreted only if the broken-stick model allowed it. The *adonis* function was used to evaluate if the miPEP treatment had a significant impact on the composition of the microbiota, followed by a group dispersion test (*betadisper* function) and a pairwise test (*pairwise.adonis* function) to see which groups were significantly different. The DESeq2 [126] package was used to identify enriched or depleted ASVs in the samples with regards to their miPEP treatment. Due to the high dispersion of reads per ASV between samples, log2 fold changes were shrunken using the *ashr* package [170] for better data visualisation.

#### *Target prediction*

Potential targets of miRNA159c in the genome of *Variovorax paradoxus* EPS were identified using the online *psRNAtarget* tool. On the server, the ath-miRNA159c sequence (UUUGGAUUGAAGGGAGCUCCU), obtained from mirbase, and the accession number of the EPS genome (CP002417.1) [148] were uploaded for analysis, with the default pa-

rameters of the Schema V2 of the 2017 release [141].

*Arabidopsis culture in vitro*

Approximately 50 *Arabidopsis thaliana* col-0 seeds were surface-sterilised by soaking them in 70% ethanol for 5 minutes, followed by 20 minutes in 0.5% sodium hypochlorite. Seeds were then rinsed six times with sterile distilled water and resuspended in 1mL of water, which was poured onto a petri dish, with some culture medium, to let the water evaporate under sterile conditions. The petri dish was sealed with parafilm and placed at 4°C for 3 days, for the stratification process, allowing a synchronous germination. The culture medium was composed of 1.2g of Hoagland's No. 2 basal salt mixture (Sigma-Aldrich, reference H2395), 8g of agar 'suitable for plant cell culture' (Sigma-Aldrich, ref. A8678) and 500mL of milliQ water. The pH of the medium was adjusted with HCl to 5.8-5.9, before adding the final 250mL of water, resulting in 750mL of medium. The solution was autoclaved and poured into square petri dishes for plant culture. When hardened, around 2cm of solid medium was cut out, creating a ridge where the surface-sterilised seeds were positioned (10-15 seeds/dish). Petri dishes with these positioned seeds were sealed with microtape and placed vertically in a growth chamber, with 16h of daylight at 21°C, 8h of darkness at 19°C, with 25% relative humidity.

*miPEP treatment*

Twenty days after the seeds were placed in the growth chamber, the seedlings had developed at least 6 leaves and were ready to be treated. The miPEP treatment consisted in applying 100µL of a 10µM solution to each plant, starting at the tip of the root to the base (bottom-to-top). A second treatment was applied 24h later, before the microbial inoculation. There were three conditions : miPEP159c treatment, a scrambled version of miPEP159c and a water control, each treatment was applied to 7 petri dishes (real replicates), containing 10-15 plants each (pseudo-replicates). The use of a scrambled control as well as a solvent control (*i.e.* water) was to ensure that any "miPEP-effect" was indeed due to its action on the plant and not *via* some nutritive or anti-microbial effect of the peptide.

*Bacterial growth and inoculation* *Variovorax paradoxus* EPS was first inoculated, from a -20°C stock, on a yeast extract petri dish (5g/L) to check that colonies are homogenous. A single colony was transferred into a liquid culture of yeast extract to grow overnight at 30°C and 110rpm. The overnight culture's optical density was measured at 600nm to estimate the number of bacterial cells added to each plant : at OD = 1, the estimated cellular concentration is 3,33.109 CFU/mL. 100µL (with OD = 0,418 *i.e.* 1,39.108 cells)



of the overnight culture was directly applied to each plant, from the tip to the base of the root, one hour after the second miPEP treatment.

*Sampling* Two hours after the bacterial inoculation, the plants and rhizospheres were sampled. The rhizosphere samples were isolated using a sterile spatula by extracting small squares of medium around the tip of the roots. Whole plants were gently extracted from the medium, by pulling on the aerial system. Samples were flash-frozen in liquid nitrogen and ground shortly after, using a sterile mortar and pestle. The resulting fine powder was stored at -80°C.

*RNA extraction* The NucleoSpin<sup>®</sup> RNA kit (MACHEREY-NAGEL, Düren, Germany) was used to extract RNA from 100mg of previously ground powder, with some changes to the manufacturer's protocol. During the cell lysis, 400µL of RA1 solution were used instead of 350µL, followed by 400µL of ethanol to adjust the RNA binding conditions. The following steps remained the same, up until the elution, where only 30µL of water was used and left to incubate on the column before centrifugation, resulting in better yields. DNase reaction was performed on-column during the protocol.

#### *RT-qPCR*

Retrotranscription was performed using 50ng of total RNA, more or less diluted to start the reaction with 12µL of RNA, to which was added 1µL dNTPs (10mM) and 1µL of random primers (200ng), followed by a 5-minute incubation at 65°C. Samples were then placed on ice for 1min. Sequentially, 4µL of 5X First-Strand Buffer, 1µL of DTT (0,1M) and 1µL of SuperScript<sup>™</sup> Reverse Transcriptase (200U/µL, Invitrogen) were mixed in by pipetting and the samples incubated for 5min at 25°C, followed by 1h at 60°C and 15min at 70°C. Samples were then placed on ice and 100µL of RNase-free water was added to the 25µL of newly synthesised cDNA. Quantitative PCR was performed using a reaction mix composed of 5µL of iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, ref. 1725124), 0.6µL of primer mix (10µM, forward & reverse) and 3.4µL of RNase-free water, to which 1µL of cDNA was added. All measurements were performed using three technical replicates, in 384-well plates, on a Roche LightCycler<sup>®</sup> 340 thermocycler. The qPCR was programmed as follows : a first step of polymerase activation and DNA denaturation at 95°C for 5 min; then the cycle commenced with further denaturation at 95°C for 10 sec, an annealing step at T<sub>m</sub> for 20 sec and an extension step at 72°C for 30 sec; after 40 cycles, a final melting curve was produced : from 65°C to 97°C, with 5 acquisitions per °C. The melting temperature (T<sub>m</sub>) for each primer set was adjusted to optimise the amplification specificity and their efficiency was validated beforehand and can be found

with primer sequences in *Table S1*. Using a dilution range of a cDNA mixture, each primer set's efficiency was calculated using the slope of the  $x=\log(\text{dilution})$ ;  $y=Ct$ , in the following equation :  $(10^{( - 1/(\text{slope}))} - 1) * 100$ , which should be in the 90-110% range. A melting curve was produced at the end of each qPCR program to ensure that a single gene was amplified. In some cases, the amplicon was verified by gel electrophoresis.

### *Data Analysis*

After RNA extraction and RT, two samples were discarded from further analysis due to experimental mishaps, resulting in 6 real replicates in the “miPEP” and “water” conditions and 7 replicates in the “scrambled” condition (see “miPEP treatment” paragraph). Quantification of pri-miR159c only succeeded in 6 out of 7 “scrambled” replicates and 5 out of 6 “water” replicates. Bacterial genes, *i.e.* Lys R, phosphatidate and alpha-macroglobulin, were quantified relative to RecA and GyrA reference genes, whereas the plant pri-miRNA159c was quantified relative to a plant reference gene, cyclophilin. The number of PCR cycles necessary for the fluorescence to emerge from the background noise is referred to as the “*Ct*”. Noise was automatically determined by the LightCycler 480 software and *Cts* were calculated with the Abs Quant/2nd Derivative Max - high confidence mode. A coefficient of variation (CV) was calculated for the three technical replicates and a threshold of 2% was applied : extreme technical replicates were excluded, if this limit was exceeded. The remaining technical replicates were averaged to create the *Ct* value for each sample. The analysis of pri-miR159c expression was done using the Pfaffl method, which takes into account the efficiency of each primer set [171]. This method calculates a relative expression ratio based on the difference of *Cts* of a gene of interest in a sample *versus* a calibrator, and in comparison with a reference gene. The analysis of bacterial genes relied on two reference genes, which called for a slightly modified version of the Pfaffl method. To calculate a relative expression ratio, we had to normalise our qPCR data using the geometric mean of both reference genes, as described by Vandesompele, *et al* [172]. In both cases, we averaged the samples treated with water to create a calibrator. Statistical analyses were performed on the resulting relative expression ratios, comparing group-to-group, using a Welch Two Sample t-test or a Wilcoxon rank sum exact test, depending on if the data was normal.

## 4 Résultats

### Root and rhizospheric microbial communities are affected by plant miPEP treatment

To investigate the impact of miPEP plant treatment on root and rhizospheric microbial communities, a PCoA ordination was drawn from a Weighted UniFrac distance matrix, based on absolute quantities of ASVs (Amplicon Sequence Variants). All of our analyses were also performed on “unplanted soil” samples to compare the effect of miPEPs on root-associated microbial communities and those from the soil. Although the miPEP treatments did not provoke a considerable cluster separation on the PCoA, they did have a statistical effect on the microbiota structure. In root and close rhizosphere samples, the bacterial community structure was significantly affected by miPEP treatments ( $P=0.003$ , Figure 2.1), more so than the fungal community ( $P=0.032$ , Figure 2.1). Pairwise tests showed that there was a significant difference between the root and rhizospheric bacterial communities of the control plants *versus* those of plants treated with any of the three miPEPs (miPEP159a  $P_{\text{adj}} = 0.006$ ; miPEP159b  $P_{\text{adj}} = 0.024$ ; miPEP159c  $P_{\text{adj}} = 0.024$ ). Similar results were obtained concerning the fungal communities, except that those from the root and rhizosphere of miPEP159a-treated plants were not significantly different to those of control plants (miPEP159b  $P_{\text{adj}} = 0.03$ ; miPEP159c  $P_{\text{adj}} = 0.03$ ). The miPEP treatments had a considerable impact on the bacterial communities of the unplanted soils ( $P<0.001$ , Figure 2.10), whereas little to no effect was observed on the fungal communities.

Fungal ITS and bacterial 16S rRNA gene copies were quantified, showing that miPEP applications increase the number of fungal and bacterial individuals in unplanted soils, but not in roots and rhizosphere samples (Figure 2.11). In fact, in the latter samples, the number of fungal ITS copies was decreased by certain miPEPs. The most abundant phyla and genera were present in similar proportions in bacterial communities, and with slightly more variability in fungal communities, notably concerning the *Chytridiomycota* phylum (Figure 2.2 and 2.3).

To measure the global diversity of these communities, we calculated three metrics : the species richness, *i.e.* the number of ASVs; the Simpson index and the Shannon index. Interestingly the alpha-diversity of the bacterial communities were less affected by the miPEP treatment, than the fungal communities. Bacterial diversity did not change in the roots and close rhizospheres of miPEP-treated plants, but it did decrease, in response

to miPEP159a, in the unplanted soils (Figure 2.4 - A). On the contrary, the diversity of fungal communities was only impacted in roots and close rhizosphere samples, in which all three miPEPs increased the fungal diversity (Figure 2.4 -B).

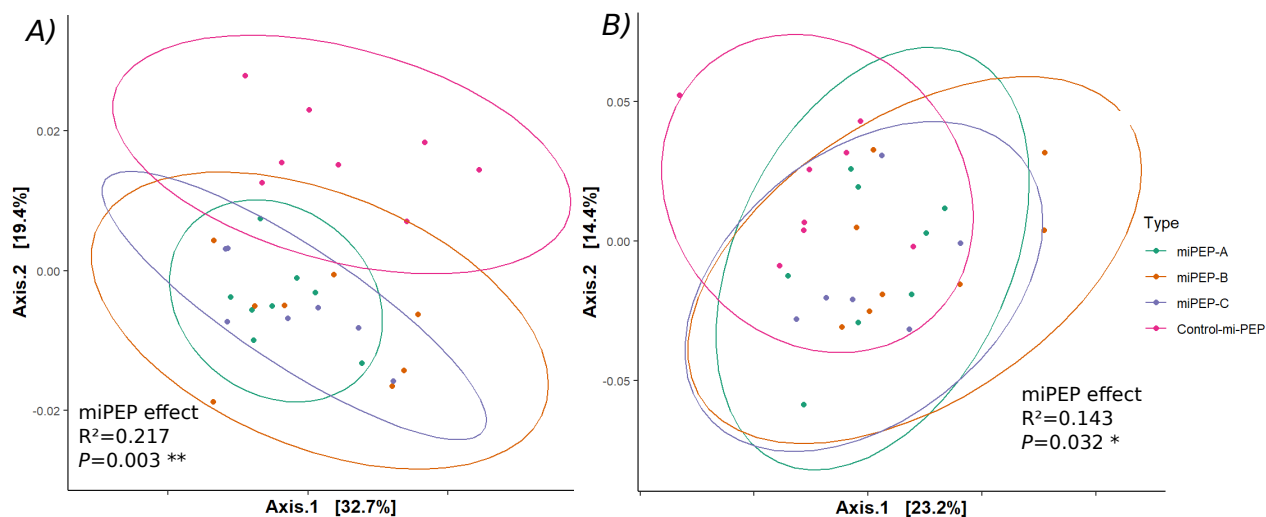


FIGURE 2.1 – Principal Coordinate Analysis (PCoA) ordination, using a Weighted UniFrac distance matrix, of root and rhizospheric bacterial (A) and fungal (B) communities. Cluster ellipses represent a 95% confidence level. Use of a broken-stick model showed that both axes from the ITS PCoA are interpretable, whereas only the first axis of the 16S PCoA is interpretable. Statistical analysis was performed using a PERMANOVA test on the distance matrices (adonis function) :  $P < 0.05$  \*,  $P < 0.01$  \*\*. Pairwise tests are described in the “Results” section.

### miPEP plant treatment alters the abundance of specific microbial ASVs in roots and rhizosphere

Using the DESeq2 [126] package, we identified specific ASVs that were enriched or depleted in samples treated with a miPEP *versus* control samples. This analysis relies on a raw ASV table and a calculation of a negative binomial GLM for each ASV, using “treatment” as the main factor and the control samples as the reference group. This analysis resulted in a large number of differentially abundant (DA) ASVs. Often, an ASV is present in one treatment and virtually absent from the control, or vice-versa, resulting in high  $|\log_2\text{FoldChanges}|$ , which were then shrunk for better visualisation (Figure 2.5 and 2.6).

In root and close rhizosphere samples, with a  $P_{\text{adj}} < 0.001$ , there were 55, 69 and 59 DA bacterial ASVs following the miPEP159a, miPEP159b and miPEP159c treatments, respectively. Thus, only the top 50 most DA ASVs were retained. These ASVs were mainly related to the *Proteobacteria* phylum. Bacterial ASVs responded differently to the miPEP treatments, either positively or negatively, with some ASVs responding only to one of the 3

*Modification de la composition et de l'activité du microbiote rhizosphérique de Arabidopsis thaliana après application du miPEP159a, b et c*

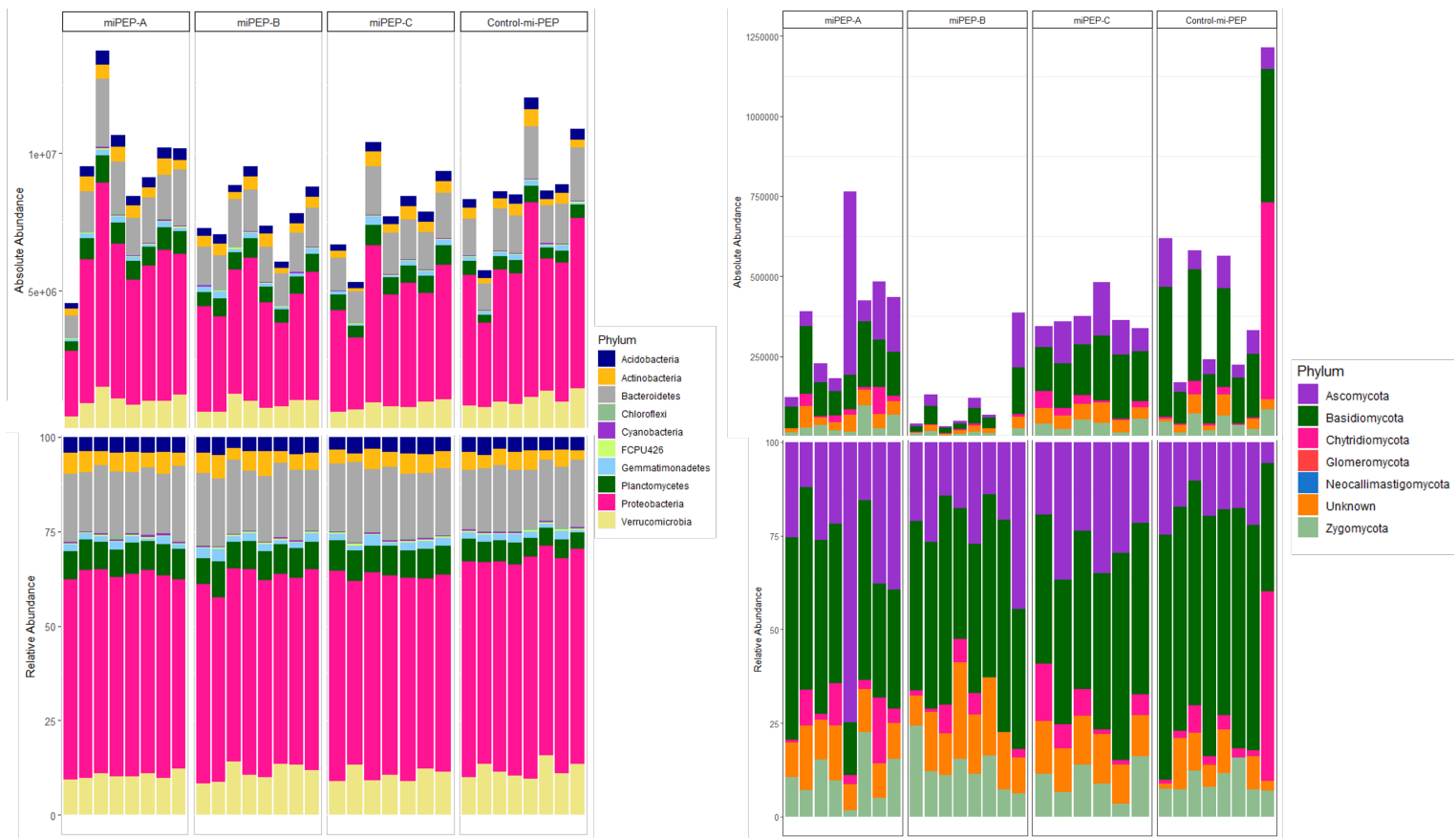


FIGURE 2.2 – Absolute (top) and relative abundance (bottom) of the ten most abundant bacterial phyla (left) and the most abundant fungal phyla (right) in the roots and close rhizosphere of *Arabidopsis thaliana* treated with miPEP159a, miPEP159b, miPEP159c or water (“control-miPEP”).

*Modification de la composition et de l'activité du microbiote rhizosphérique de Arabidopsis thaliana après application du miPEP159a, b et c*

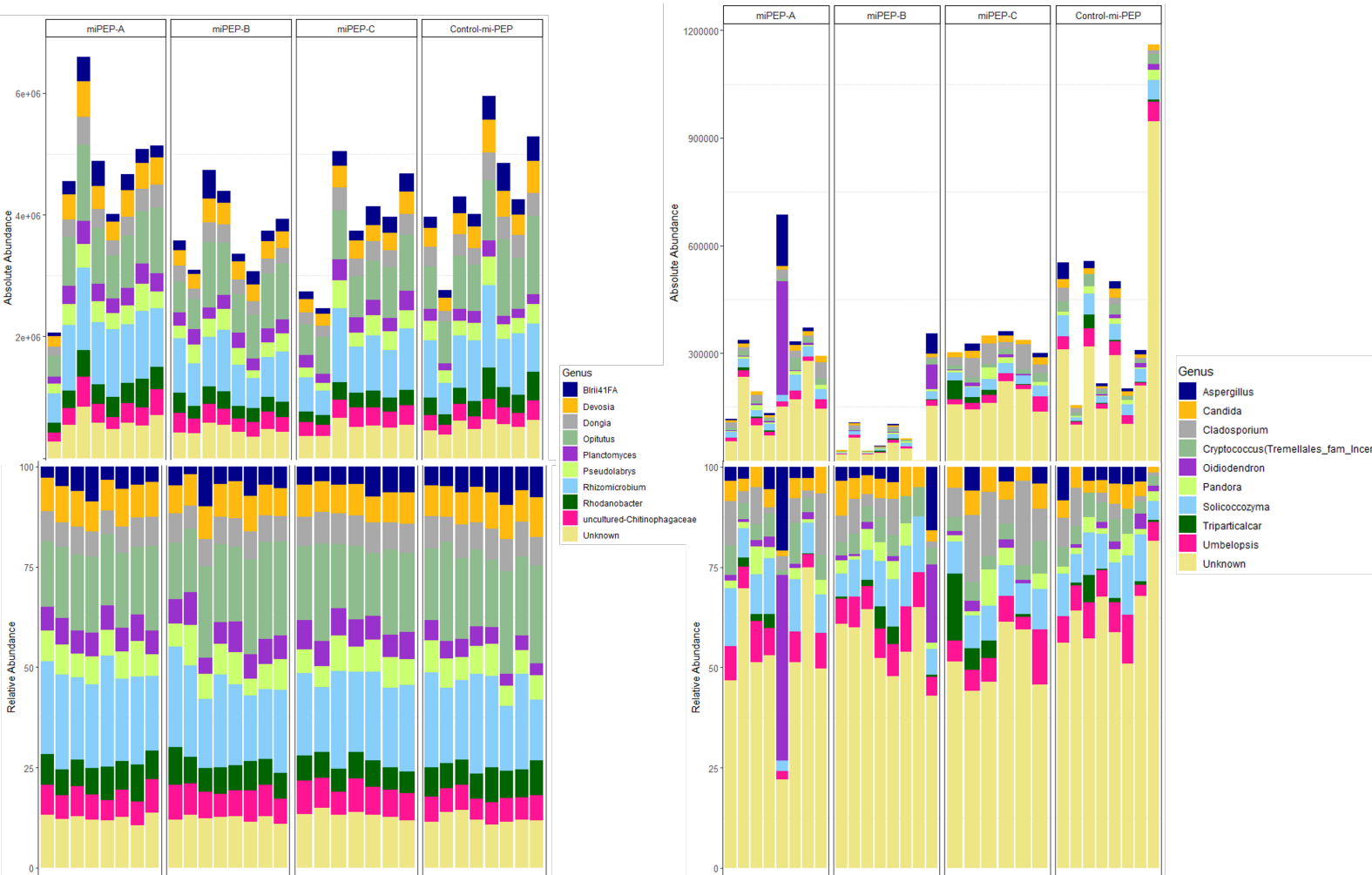


FIGURE 2.3 – Absolute (top) and relative abundance (bottom) of the ten most abundant bacterial (left) and fungal (right) genera in the roots and close rhizosphere of *Arabidopsis thaliana* treated with miPEP159a, miPEP159b, miPEP159c or water (“control miPEP”).

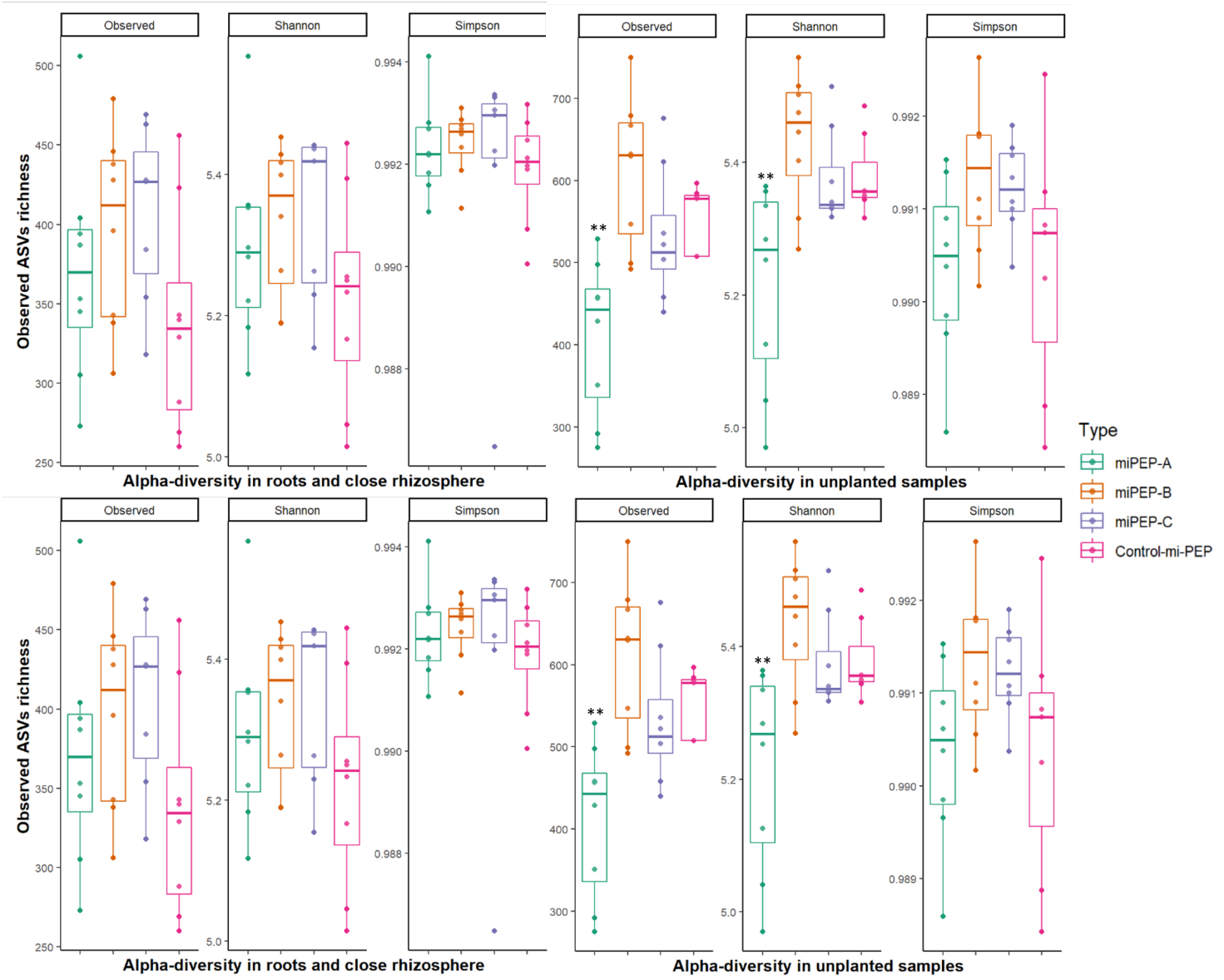


FIGURE 2.4 – Alpha-diversity in bacterial (A) and fungal (B) communities from roots and close rhizosphere and unplanted soils, which were treated with miEP159a, miPEP159b or miPEP159c. Controls were treated with only water (*i.e.* solvent in which miPEPs were dissolved). Three measurements were performed : species richness, Shannon and Simpson indices. Statistical analysis was performed using a linear model (n=8) and “control-miPEP” as the reference group.  $P < 0.05$  : \* ;  $P < 0.01$  : \*\* ;  $P < 0.001$  \*\*\*.

miPEPs (Figure 2.5). For example, an ASV from the Omnitrophica phylum was enriched solely in the miPEP-159a treated samples, *Tepidisphaeraceae* ASVs were enriched only in miPEP-159b treated samples and a *Variibacter* ASV was depleted only in miPEP-159c treated samples. However, certain commonalities were observed between the three miPEP-treated groups : all were depleted in an *Opitutus*, a *Rhizobium* and a *Burkholderia s.l.* ASV, and were enriched in a *Granulicella* and a *Pseudolabrys* ASV.

Analysis of fungal DA ASVs in roots and close rhizosphere resulted in 28, 24 and 20 ASVs modulated by the miPEP159a, miPEP159b and miPEP159c treatments, respectively. These ASVs mainly belonged to the *Ascomycota* phylum. Fungal ASVs corresponding to the *Hyaloscypha*, *Bambusaria* and *Peziza* genera were enriched in all three miPEP-treated groups (Figure 2.6). Whereas ASVs belonging to *Solicoccozyma*, *Candida*, *Triparticalcar*, *Oidiodendron* and *Bambusaria* were depleted in these three conditions. Some specificities were identified, for example, miPEP-159b treatment increased the abundance of an *Apiotrichum* and a *Dissophora* ASV, whereas miPEP-159a treatment increased a *Mortierella* and a *Leucosporidium* ASV.

The application of miPEP159a, miPEP159b or miPEP159c at the crown of *Arabidopsis thaliana* provoked specific changes in the composition of root and rhizospheric microbial communities. As a whole, these miPEPs had a positive effect on fungal diversity, whereas miPEPs had a stronger and more specific role in changing the abundance of particular bacterial ASVs. Next, we investigated the impact of miPEPs on the activity of a rhizospheric Betaproteobacteria.

### **miPEP treatment on *Arabidopsis thaliana* changes the gene expression of a root-associated bacterium**

A simple model, composed of *Arabidopsis thaliana* and the Betaproteobacteria *Variovorax paradoxus* EPS, was used to explore this hypothesis, as *Variovorax* is shown to be a pivotal genus in the root microbiome [150] and was previously shown to be affected in its transcription following exposure to synthetic plant miRNAs [165]. Using the online *psRNAtarget* [141] tool, the bacterial genes potentially targeted by miR159Cc were identified in the *V. paradoxus* EPS strain genome and three were selected for *in vivo* quantification (Figure 2.12). We grew axenic *A. thaliana* plants *in vitro*, and after a period of priming (*i.e.* two miPEP159c treatments, over 24h) and the root inoculation of *V. paradoxus* EPS, the whole plants were sampled, along with their "rhizosphere", to quantify the expression of these bacterial target genes. In parallel, the pri-miR159c was quantified in plant tissues which confirmed the effect of miPEP159c on the increase of miR159c production (Figure



*Modification de la composition et de l'activité du microbiote rhizosphérique de Arabidopsis thaliana après application du miPEP159a, b et c*

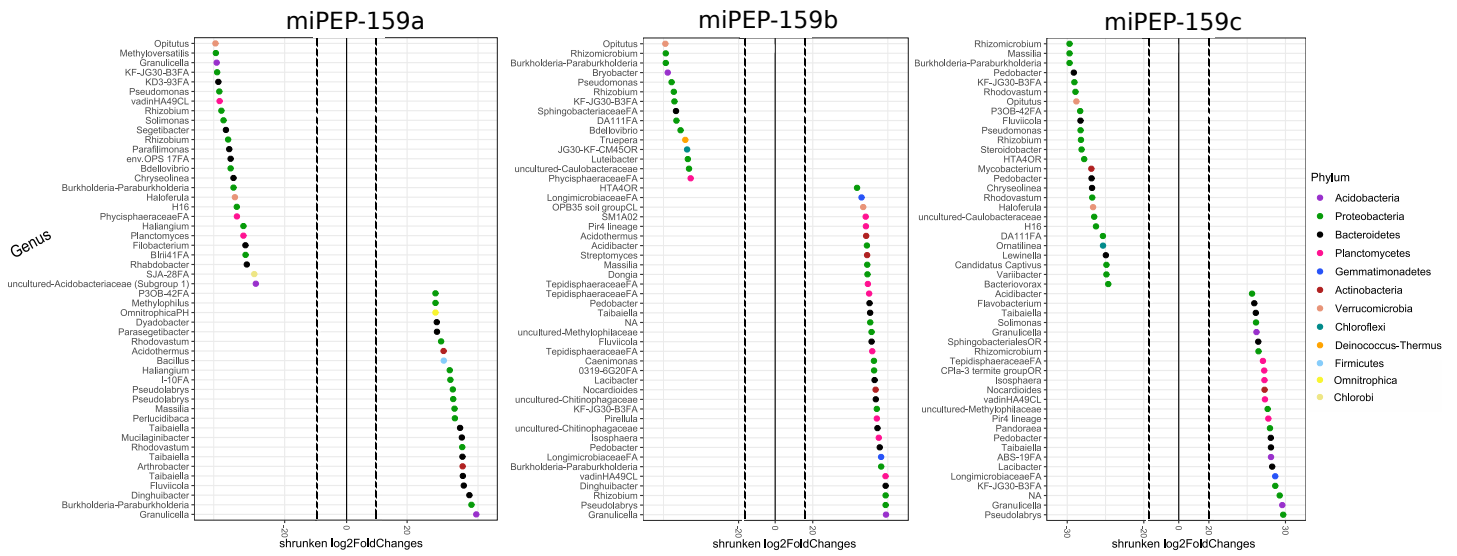


FIGURE 2.5 – Bacterial ASVs enriched (left) or depleted (right) in the roots and close rhizosphere of miPEP-treated *Arabidopsis thaliana*, in comparison with control plants (treated with water). These bacterial ASVs are the top 50 most significantly differentially abundant ASVs, with  $P_{adj} < 0.001$ . The width of the figures was shortened, without affecting any data points, which is represented by the hatched lines. The y-axis represents the genera to which these ASVs belong. ASVs that were not assigned to a genus are noted “NA”.

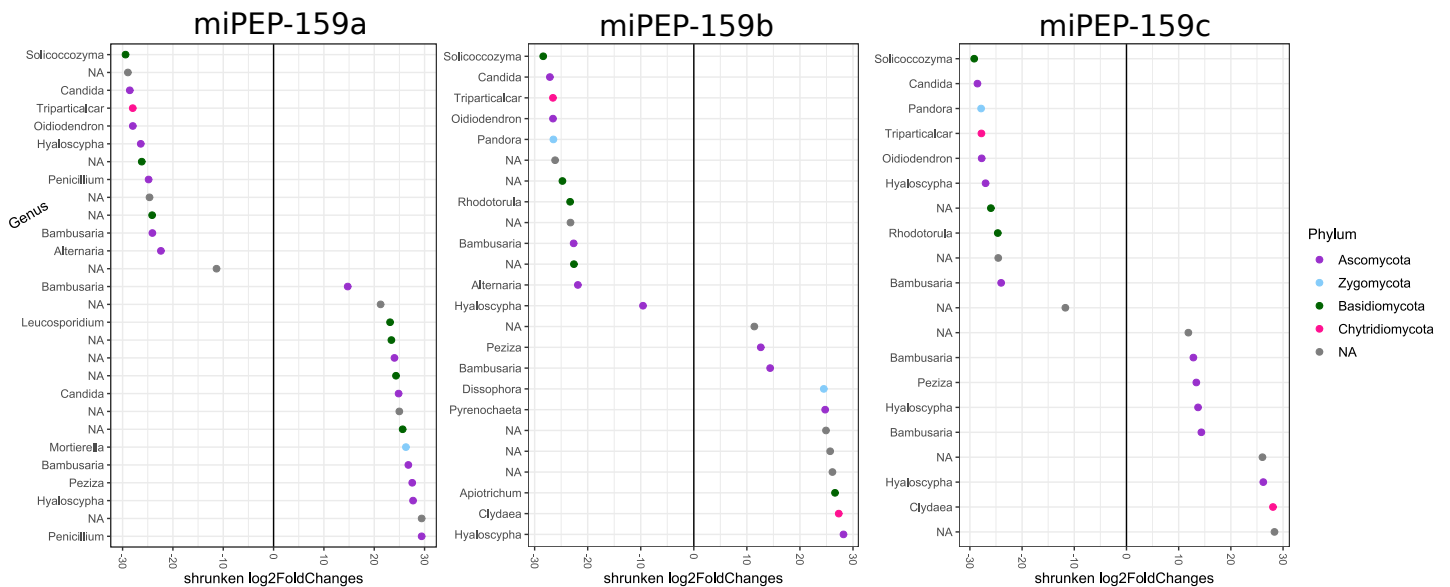


FIGURE 2.6 – Fungal ASVs enriched (left) or depleted (right) in the roots and close rhizosphere of miPEP-treated *Arabidopsis thaliana*, in comparison with control plants (treated with water). These fungal ASVs are the most significantly differentially abundant ASVs (28 ASVs for miPEP-A, 24 for miPEP-B and out of 20 for miPEP-C, with  $P_{adj} < 0.001$ ). The y-axis represents the genera to which these ASVs belong. ASVs that were not assigned to a genus are noted “NA”.

2.7 - A). Amongst the three potentially targeted bacterial genes, the expression of LysR and phosphatidate genes was decreased by a factor 2.69 and 2.16, respectively, in response to the miPEP treatment in comparison with the water control ( $P= 0.008658$ , Figure 2.7 B-C). In contrast, the expression of alpha-2 macroglobulin increased by a factor 1.30 in response to miPEP treatment, in comparison with the water control ( $P = 0.05196$ , Figure 2.7 - D). These gene variations were not observed with the scrambled control (scrambled vs water NS), suggesting a true effect of miPEP159c. Overall, the application of miPEP159c on *A. thaliana* modulated the expression of the predicted *V. paradoxus* target genes in the rhizosphere, either decreasing or increasing their expression.

## 5 Discussion

In this study, we investigated the impact of miPEP treatments on the composition and activity of root and rhizospheric microbial communities. First, we analysed *in situ*, through 16S and ITS sequencing, the composition of microbial communities from the roots and rhizosphere of *Arabidopsis thaliana* plants treated with either miPEP159a, miPEP159b or miPEP159c. Secondly, in an *in vitro* system, we quantified the effect of miPEP159c, applied on *A. thaliana* plantlets, on the expression of target genes, in a rhizosphere-inoculated bacterium, *Variovorax paradoxus* EPS.

Our first major finding reveals that applying miPEPs, through watering, to *A. thaliana* affects the structure of the root and rhizospheric microbiota. These results confirm those of our previous study [165], this time using a more precise approach, theoretically modulating the expression of a single miRNA at the time. Here, we show that the root and rhizospheric microbial communities were significantly affected by a miPEP treatment. Others have shown that various host miRNAs are involved in shaping the microbiota, but never a unique miRNA has been shown to have such a global effect. Intestinal miRNAs were shown to impact the composition of the gut microbiota and the growth of specific bacterial strains [119]. Another study presented evidence of plant exosome-like nanoparticles, containing proteins and 106 miRNAs, modulating the gut microbiota [120]. This same study also demonstrated that some bacterial strains preferentially uptake these exosomes and that the contained RNAs affected bacterial gene expression and activity [120]. Results from our previous *in vitro* experiment also revealed differential response to plant miRNAs amongst bacterial strains : *V. paradoxus* transcripts were significantly modulated by a mix of synthetic miRNAs, whereas *Bacillus mycoides* was unaffected [165].

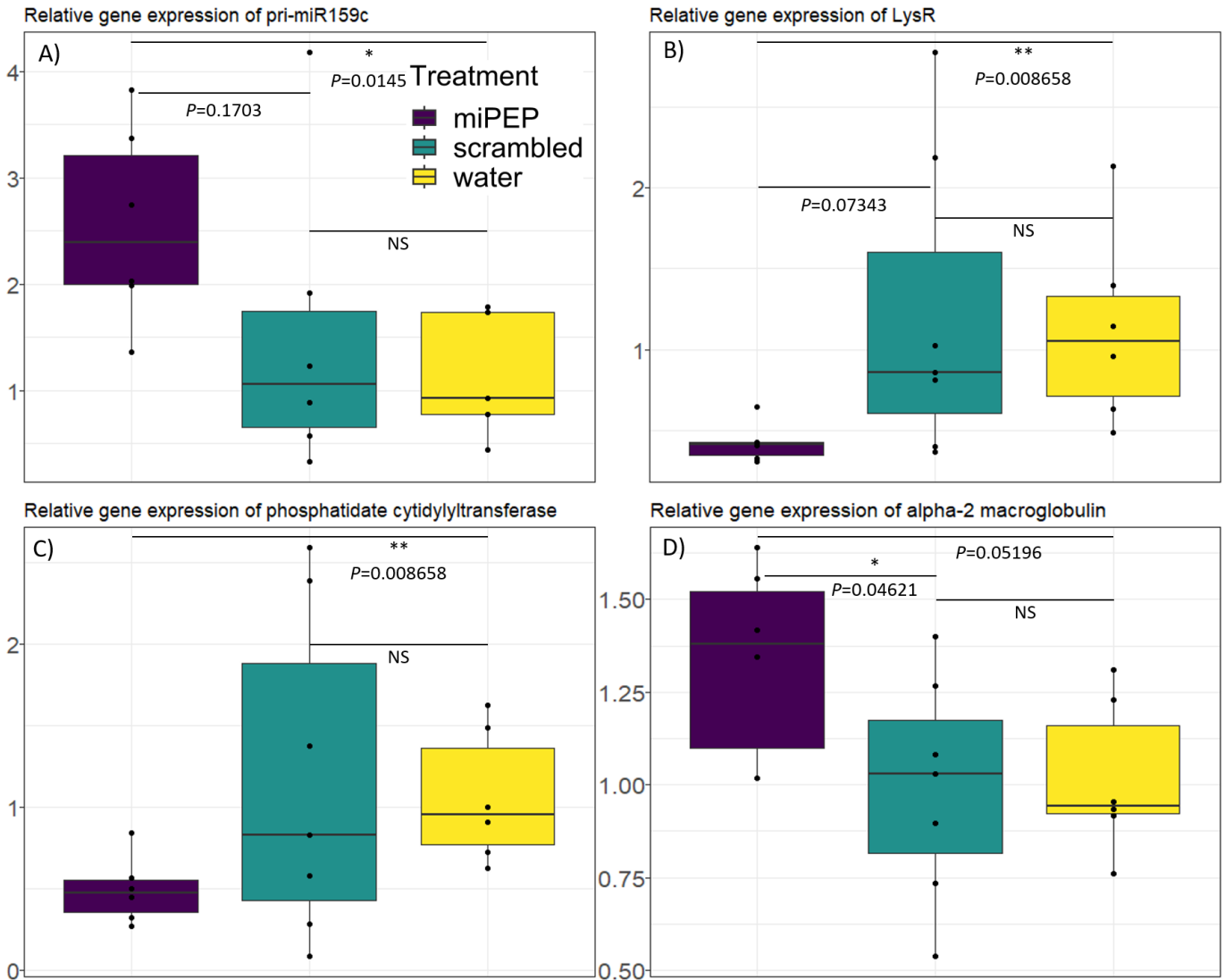


FIGURE 2.7 – Plant and bacterial gene response to miPEP159c root-treatment. Relative quantification of plant pri-miR159c in reference to cyclophilin (A), and of three target bacterial genes encoding the transcription factor LysR (B), the phosphatidate cytidyltransferase (C) and the alpha-2 macroglobulin (D), relative to two bacterial reference genes, RecA and GyrA. Results from plants treated with miPEP159c were compared to those from plants treated with a scrambled miPEP159c and from plants treated with water. Statistical analysis compared miPEP-treated plants to each control group using a Welch Two Sample t-test or a Wilcoxon rank sum exact test ( $n= 5-7$ ).

Even though microbial response to plant miRNAs seems to be strain-specific, the whole community responds in accordance. A similar outcome was described in a study in which mice with an induced autoimmune disease were cured by oral intake of miR-30d [173]. This miRNA upregulated a beta-galactosidase gene in the commensal *Akkermansia muciniphila*, expanding their population and subsequently increasing regulatory T cells, which eliminated the disease. Hence, a single miRNA modulated the activity and relative abundance of a bacterial strain, having important consequences for the host. To our knowledge, this is the first report of a single miRNA-miPEP affecting the composition of microbial communities.

As miPEPs are part of precise mechanisms, we investigated the fine changes in the microbiota by looking for enriched or depleted ASVs in response to the peptide treatments. From 10-13% bacterial up to 34-41% fungal ASVs were differentially abundant ( $P < 0.001$ ) in miPEP-treated samples and these changes resulted in a significantly altered microbiota. First, we investigated the lowest taxonomic level available for each of these ASVs : the genus. Regarding the commonalities amongst the three miPEP-treatments, the enriched bacterial ASVs belonging to the *Pseudolabrys* genus are particularly interesting. Only one species, *P. taiwanensis*, has been validated in this genus [174] and was previously found to increase in response to nitrogen treatment, suggesting its involvement in denitrification [175]; [176]. Maybe its enrichment in miPEP-treated samples is related to the nitrogen cycle, however soil nutrients were not measured in this experiment. In the future, miPEPs could be used to specifically modulate beneficial or detrimental ASVs. For example, miPEP-C could be a good candidate, as its treatment increased the abundance of ASVs belonging to beneficial genera like *Flavobacterium* [177] and decreased those of bacterial predators such as *Bacteriovorax*, a single-species genus known for preying Gram-negative bacteria [178]. Many fungal DA ASVs belonged to major genera such as *Candida*, *Hyaloscypha*, *Solicocozyma*, *Oidiiodendron* and *Penicillium*. Although, it may be far-fetched to speculate on the function of an ASV based on its genus, it is interesting to note that many of these fungal ASVs belonged to genera with many plant-growth promoting fungi (PGPF) [179]; [180]. To identify potential miPEPs of interest and their microbial target, it would require a taxonomic assignment more precise than the genus, to specifically enrich or deplete bacterial or fungal species.

Several studies show the effect that miPEP-regulated plant miRNAs can have on the interactions between plants and their root endophytes [181], for example, in *Medicago truncatula*, miR171b enables root colonisation by arbuscular mycorrhizal fungi, which

is increased by the application of miPEP171b [102]. Another study shows that miPEP application can stimulate nodulation in soybean through miPEP172c [182], indirectly modulating the plant's interaction with rhizobia. The changes observed here at the community level are, however, difficult to explain via an effect on a single gene, activated by the miPEP treatment. First, we showed that synthetic miRNAs affect the expression of many genes of a single isolate, well beyond the targets predicted by sequence homology [165]. We hypothesised that this could have been due to an effect of the miRNA on transcriptional regulators or secondary gene silencing. Second, microbes interact with each other [183], which could explain the results at the community level, even though a unique member would be targeted by a rhizospheric miRNA. Finally, a miPEP will also have an impact in planta, which could result in physiological variations, such as a change in root exudates, modifying the interactions between the plant and its microbiota.

Beyond the effect of miPEPs on the composition of root and rhizospheric microbial communities, it is expected that a miPEP will increase the production of their corresponding miRNA, affecting the expression of the target bacterial gene. However, further investigation is needed to clarify how eukaryotic miRNAs and bacterial mRNAs interact. The only reports exploring the role of eukaryotic miRNAs on bacteria estimated that these interactions happen based on sequence complementarity [119]; [120]. Hence, we searched for potential targets of miR159c in *Variovorax paradoxus* EPS using this interaction model and the parameters known in plant miRNA-mRNA interactions. Our *in vitro* experiment confronting miPEP159c-treated plants with *V. paradoxus* EPS, revealed that two out of the three potentially targeted genes tested were indeed decreased by the miPEP treatment, whereas the third target gene was increased, in comparison with scrambled- and water-treated plants. In plants, expression of target genes is decreased in response to the targeting miRNA, through mRNA cleavage or translation inhibition [68], but RNA interference in bacteria is less strict. Bacteria produce different kinds of non-coding small RNAs, some of which have similar regulatory functions as eukaryotic miRNAs, but they can either inhibit or induce expression of target mRNAs [119]; [82]. Whilst the increase in alpha2-macroglobulin expression may be due to secondary effects of the inhibition of other target genes, like the LysR transcription factor or the phosphatidate cytidyltransferase, it is not impossible that plant miRNAs stimulate the transcription of bacterial target genes, through unknown mechanisms. Amongst the uncertainties, it is not known if eukaryotic miRNAs require their own protein machinery, the RNA-inducing silencing complex (RISC), or if they use a bacterial silencing pathway. With the setup used in

this study, both options were feasible as plant miRNAs may be conveyed in extracellular vesicles, in the rhizosphere, along with their RISC proteins.

Finding better microbial engineering techniques is crucial for the development of a more sustainable agriculture, as many of the current strategies rely on microbial inoculants, which pose many issues. The exploitation of miPEPs could be a great alternative to these problematic techniques, as they are specific to a miRNA and a target, are active locally on a plant and do not require genetically modified organisms. Identification of miPEPs able to modulate the composition and/or activity of plant microbiota would facilitate the development of a novel microbial engineering strategy, i.e. the development of a precision tool to enhance the function of already present microbes and their subsequent effect on the host plant.

For the first time, miPEPs were used to increase miRNA production *in planta*, targeting microbial genes, *in fine*, modulating the composition and activity of the root and rhizospheric microbiota. Specifically, miPEP159a, 159b and 159c changed the composition of bacteria and fungi in the roots and rhizosphere of *Arabidopsis*. The application of miPEP159c, increasing miR159c synthesis, resulted in the repression of two predicted target genes in *Variovorax* and in the increase of another predicted target gene. The insights gained from this study could help with the conception of new microbial engineering tools, *via* species- and gene-specific targets, with minimal impact on the surrounding environment, to enhance plant health and productivity, through the use of miPEPs.

## 6 Remerciements

We want to thank Jean-Philippe Combiér for his precious advice and for providing the miPEPs. We are also grateful towards Paul M. Orwin for providing the *Variovorax paradoxus* EPS strain.

## 7 Extended Data

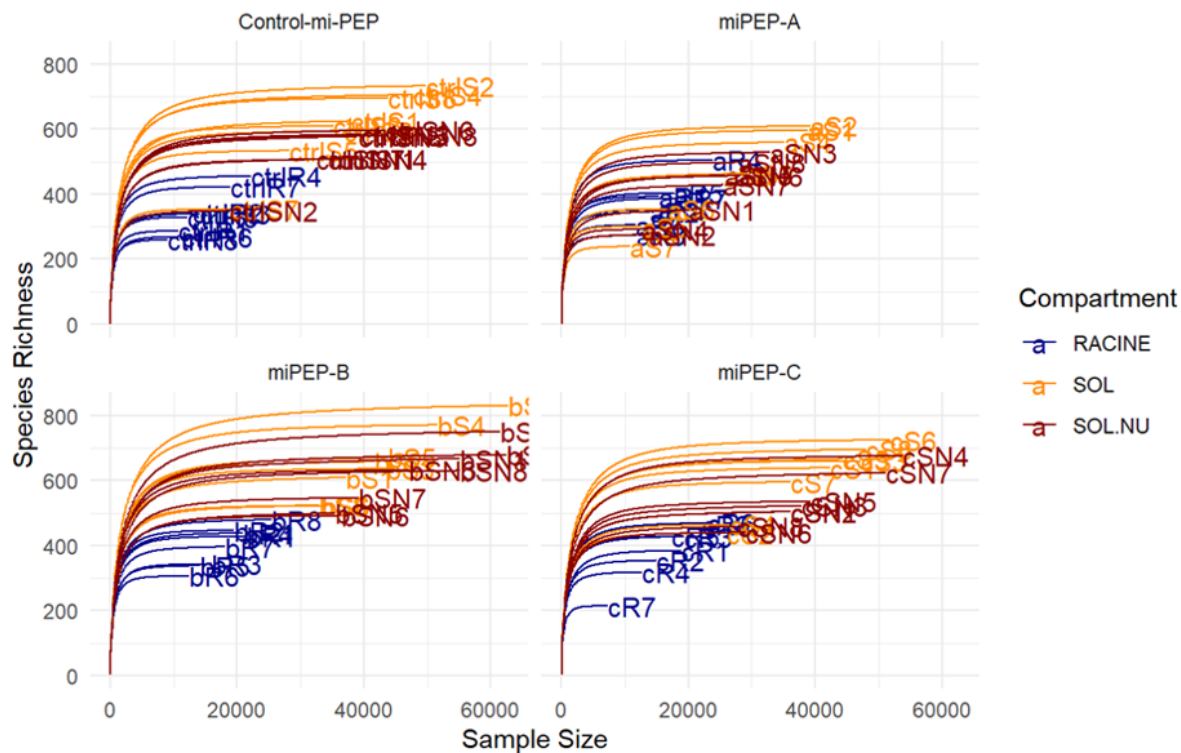


FIGURE 2.8 – Rarefaction curves of bacterial 16S rRNA sequencing.

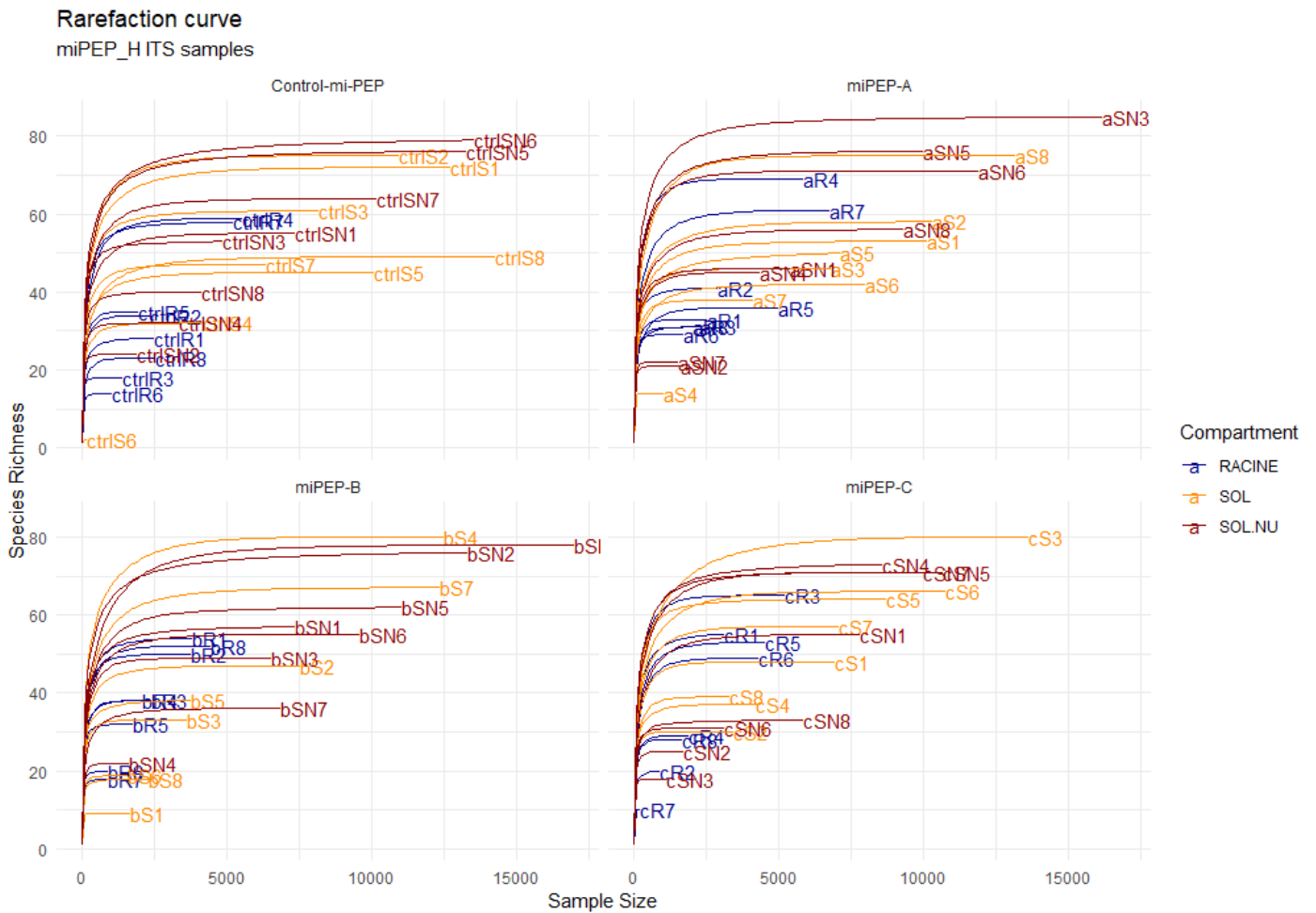


FIGURE 2.9 – Rarefaction curves of fungal ITS sequencing.



Modification de la composition et de l'activité du microbiote rhizosphérique de *Arabidopsis thaliana* après application du *miPEP159a, b et c*

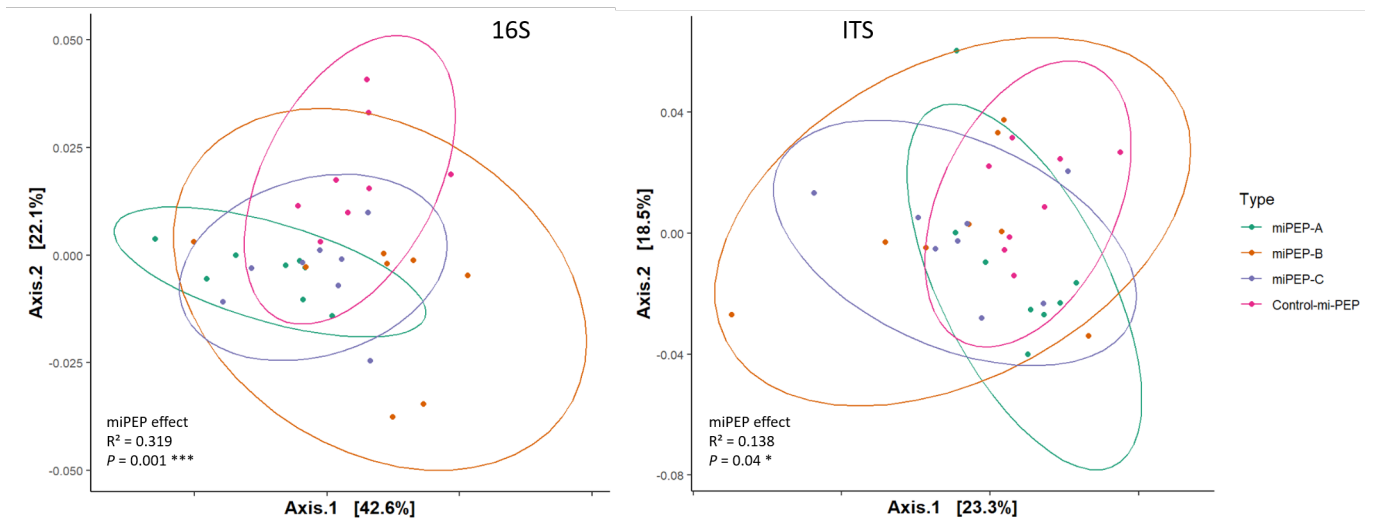


FIGURE 2.10 – Principal Coordinate Analysis (PCoA) ordination, using a Weighted UniFrac distance matrix, of unplanted soil microbial communities. Cluster ellipses represent a 95% confidence level. Use of a broken-stick model showed that only the first axis of the 16S and ITS PCoAs are interpretable. Statistical analysis was performed using a PERMANOVA test on the distance matrices (adonis function) :  $P < 0.05$  \*,  $P < 0.001$  \*\*\*. Pairwise tests show a difference of bacterial communities (16S) between miPEP-A and control groups ( $P = 0.006$ ), between miPEP-B and control groups ( $P = 0.042$ ) and between miPEP-C and control groups ( $P = 0.012$ ). No inter-group differences were established in fungal communities (ITS).

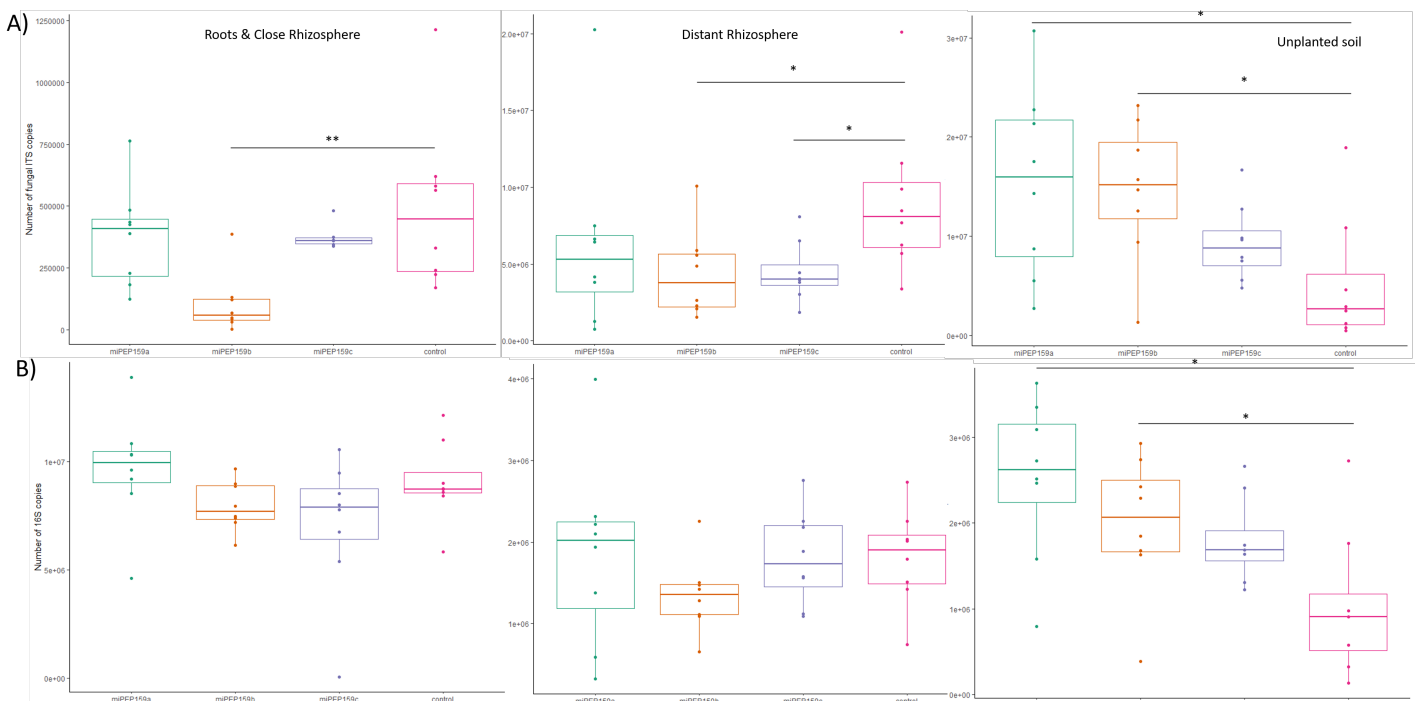


FIGURE 2.11 – Number of fungal ITS copies (A) and bacterial 16S copies (B) quantified by qPCR. Statistical analyses were performed using the Wilcoxon test ( $n = 8$ ).  $P < 0.05$  : \*;  $P < 0.01$  : \*\*.

Predicted targets in EPS of *ath-miR159c* from *psRNAtarget*

VARPA\_RS07415 = MG2 domain-containing protein  
 Uncharacterized conserved protein YfaS, **alpha-2-macroglobulin family**  
 => *Endopeptidase inhibitor activity*

```
miRNA 21 UCCUCGAGGGAAGUUAGGUUU 1
          . . . . .
Target  GCCGGCUUCCUCAAUCCGA
```

VARPA\_RS01560 = **LysR family** transcriptional regulator  
 => *DNA-binding transcriptional regulator*

```
miRNA 21 UCCUCGAGGGAAGUUAGGUUU 1
          . . . . .
Target  UUCAGCUUUCUUCAGUCCAG
```

VARPA\_RS26385 = **phosphatidate** cytidyltransferase, CDP-diglyceride synthetase  
 => *transferase activity, transferring phosphorus-containing groups*

```
miRNA 21 UCCUCGAGGGAAGUUAGGUUU 1
          : . . . . . : . . . . . :
Target  ACGGGCUCUAUUCGAUCUACA
```

FIGURE 2.12 – The three selected genes from the *V. paradoxus* EPS genome predicted to be targets of *ath-miR159c*. VARPA is the identifier of *Variovorax paradoxus* EPS genes, followed by the product name and its molecular function. The sequence alignment diagrams were obtained on *psRNAtarget*, using default parameters.

Amplified gene	Amplicon size	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'	Tm	Reference
pri-miR159c	178bp	AGTCCTTTTCTTCTTCTTAAT	CGTCTTCTCGTAAATAACAACATT	53°C	Allen, <i>et al.</i> , 2010
cyclophilin	62bp	TGGACCAGGTGTACTTTCAATGG	CCACTGTCTGCAATTACGACTTTG	53°C	Allen, <i>et al.</i> , 2010
LysR	96bp	GTAGGTGAAGCGGGTGAGG	TCAAGGTGAAAGCCACGTC	53°C	from EPS genome
phosphatidate	90bp	TTCATCAGCCTGGCCTACAC	CGGGGCAGTACTTCCTGATC	54°C	from EPS genome
alpha-macroglobulin	82bp	CAGGCTGGTGATCTGAAGGG	AATGAGGGAACGAAACGGGTC	53°C	from EPS genome
RecA	99bp	CCCTTCTTGATGGTGCCGAT	TGATGTTTCGGTTCGCCTGAA	57°C	from EPS genome
GyrA	93bp	CCGAACCTCTGCTTGATGGT	CAGAGATCGACGACCTGCTC	57°C	from EPS genome

FIGURE 2.13 – Primers used for qPCR in *Arabidopsis thaliana* and *Variovorax paradoxus* EPS. Most primers were designed based on the EPS genome, except for plant gene primers, which were already available in Allen, *et al.*, 2010 [184].

# DISCUSSION GÉNÉRALE

---

Le monde animal et le monde végétal ont parfois des ressemblances insoupçonnées. Les intestins et la rhizosphère sont tous les deux peuplés de nombreux microorganismes possédant des fonctions similaires. Ces deux microbiotes sont en partie acquis verticalement, par la mère, puis offrent à leur hôte des capacités métaboliques supérieures, un meilleur accès à certains nutriments et une protection contre les pathogènes [121]. Ainsi, lorsqu'une équipe de Harvard découvre que les miARNs de l'hôte pouvaient changer l'expression de gènes du microbiote intestinal [119], l'hypothèse d'une transposition de cette idée au système plante est apparue. Celle-ci a été confortée davantage lorsqu'une autre équipe démontre que les miARNs de plante, ingérés par un animal, ont également la capacité de modifier l'expression de gènes microbiens dans l'intestin [120]. Ainsi, l'hypothèse générale de cette thèse est la suivante (Figure 3.1) : les plantes seraient capables de relâcher des miARNs dans leur rhizosphère afin de moduler l'activité voire la composition du microbiote rhizosphérique [107]. Au cours de ce travail de doctorat, nous avons pu confirmer cette hypothèse : (i) des miARNs spécifiques sont présents dans la rhizosphère de deux espèces végétales, (ii) ces miARNs rhizosphériques modulent l'expression de gènes bactériens et (iii) une perturbation de la biosynthèse de ces miARNs, par mutation ou par application de miPEPs, entraîne un changement taxonomique au sein des communautés microbiennes entourant les racines.

## 1 miARNs dans la rhizosphère

L'entièreté du travail réalisé dans cette thèse repose sur notre découverte des miARNs dans la rhizosphère. La détection de miARNs dans la rhizosphère de *Arabidopsis thaliana*, une plante modèle dicotylédone, et *Brachypodium distachyon*, une plante modèle monocotylédone a ouvert la voie à tant d'autres questions. Bien que les miARNs soient fortement investigués dans les autres compartiments de la plante, la rhizosphère ne l'avait jamais été auparavant. La présence de miARNs de plantes dans la rhizosphère a été détectée

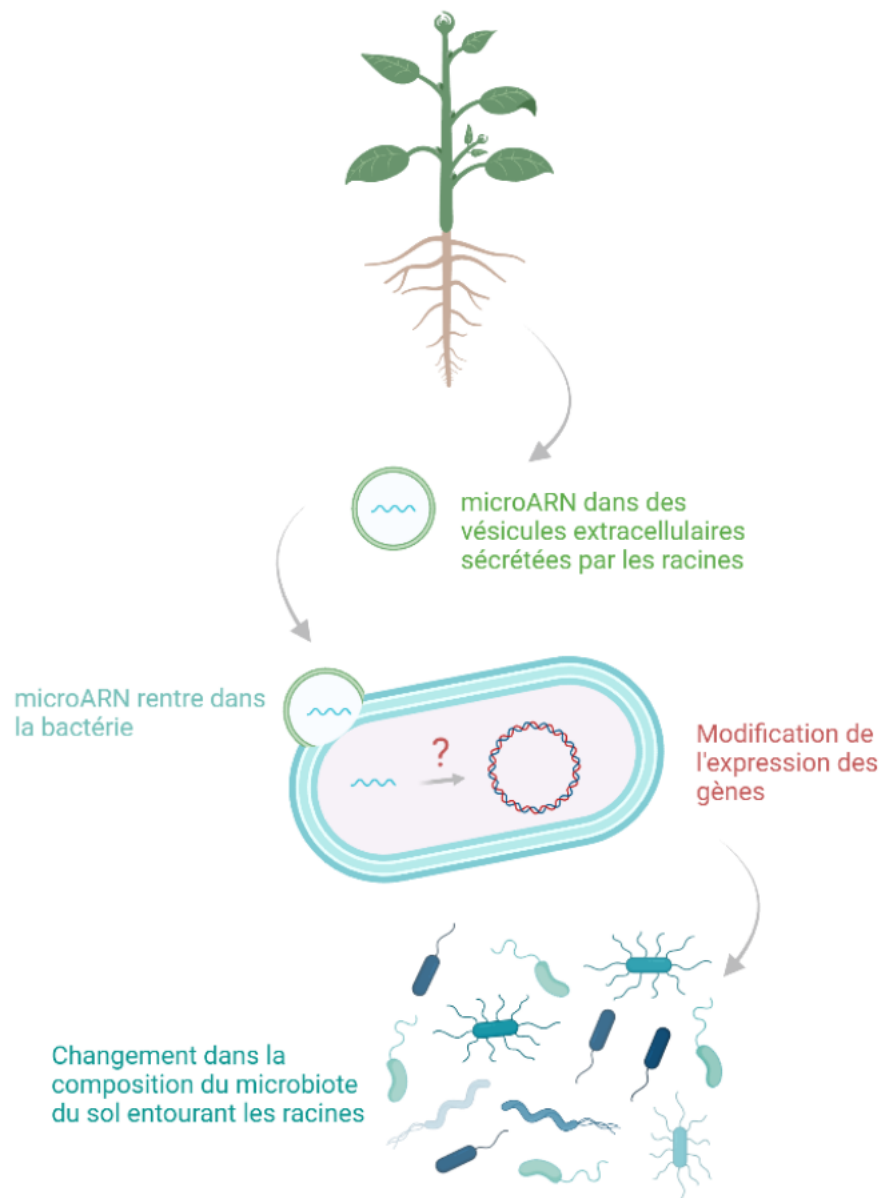


FIGURE 3.1 – Hypothèse générale schématisée : les plantes relâchent des miARNs dans leur rhizosphère qui vont affecter l'expression de gènes microbiens et, *in fine*, la composition du microbiote. Figure générée sur BioRender.

---

par séquençage des petits ARNs, en comparaison avec les petits ARNs trouvés dans des sols sans plantes (**Chapitre 1, Figure 1**). Les séquences codant ces miARNs ont ensuite été retrouvées dans les génomes respectifs d'*A. thaliana* et *B. distachyon*, suggérant que ces miARNs rhizosphériques provenaient probablement des racines de la plante correspondante. De plus, dans le sol sans plantes, le nombre de séquences, identifiées comme miARN, était très bas, le plus souvent nul.

Pour explorer ces séquences, nous avons réalisé une analyse d'expression différentielle entre deux conditions : la rhizosphère et le sol sans plantes. Nous nous sommes alors intéressés seulement aux miARNs qui étaient significativement plus abondants dans la rhizosphère. Nous avons ainsi identifié 29 miARNs dans la rhizosphère d'*A. thaliana* et 20 dans la rhizosphère de *B. distachyon*. Face à la diversité de miARNs connus chez ces deux plantes, on peut aisément supposer que ces miARNs rhizosphériques ont fait l'objet d'une sélection en amont de leur sécrétion dans le sol. Comme discuté dans le **Chapitre 1**, tous les miARNs rhizosphériques détectés chez *A. thaliana* ont été précédemment identifiés dans les racines de celle-ci, par une autre équipe [116]. Leur expression dans la racine n'était pas spécifique à certains tissus (Figure 3.2), mais la majorité des miARNs que nous avons détectés dans la rhizosphère avaient été décrits comme enrichis dans la zone méristématique, à la pointe de la racine [116]. Vu que de nombreux composés sont sécrétés dans cette zone racinaire [25], il est probable que les miARNs trouvés dans la rhizosphère aient été exsudés à cet endroit.

La première question issue de la mise en évidence de miARNs de plantes dans la rhizosphère concerne le transport de ces derniers. Il se peut que ces miARNs soient relâchés "nus" dans le sol, mais il est fortement possible que ceux-ci soient véhiculés dans des vésicules extracellulaires. Ces dernières permettraient un transport sécurisé des miARNs [185], protégés des RNAses environnementales, vers l'organisme ciblé. Ce véhicule serait particulièrement pertinent lorsque cet organisme cible est une bactérie ou un champignon, puisque l'échange de molécules, dont des petits ARNs, à travers des vésicules, entre bactéries, mais aussi entre champignons et plantes, est fréquent. Ces échanges se font par contact physique, comme à travers des hyphes, mais n'ont jamais été montrés dans la rhizosphère. D'ailleurs, il a été montré que les plantes peuvent produire des vésicules contenant des petits ARNs qui sont incorporés par des champignons, par exemple, d'*A. thaliana* vers *Botrytis cinerea* [118]. Une telle structure permettrait aussi le transport des protéines nécessaires au fonctionnement des miARNs, comme celles qui constituent le RNA-Induced Silencing Complex (RISC), dont la protéine Argonaute (AGO). La livrai-

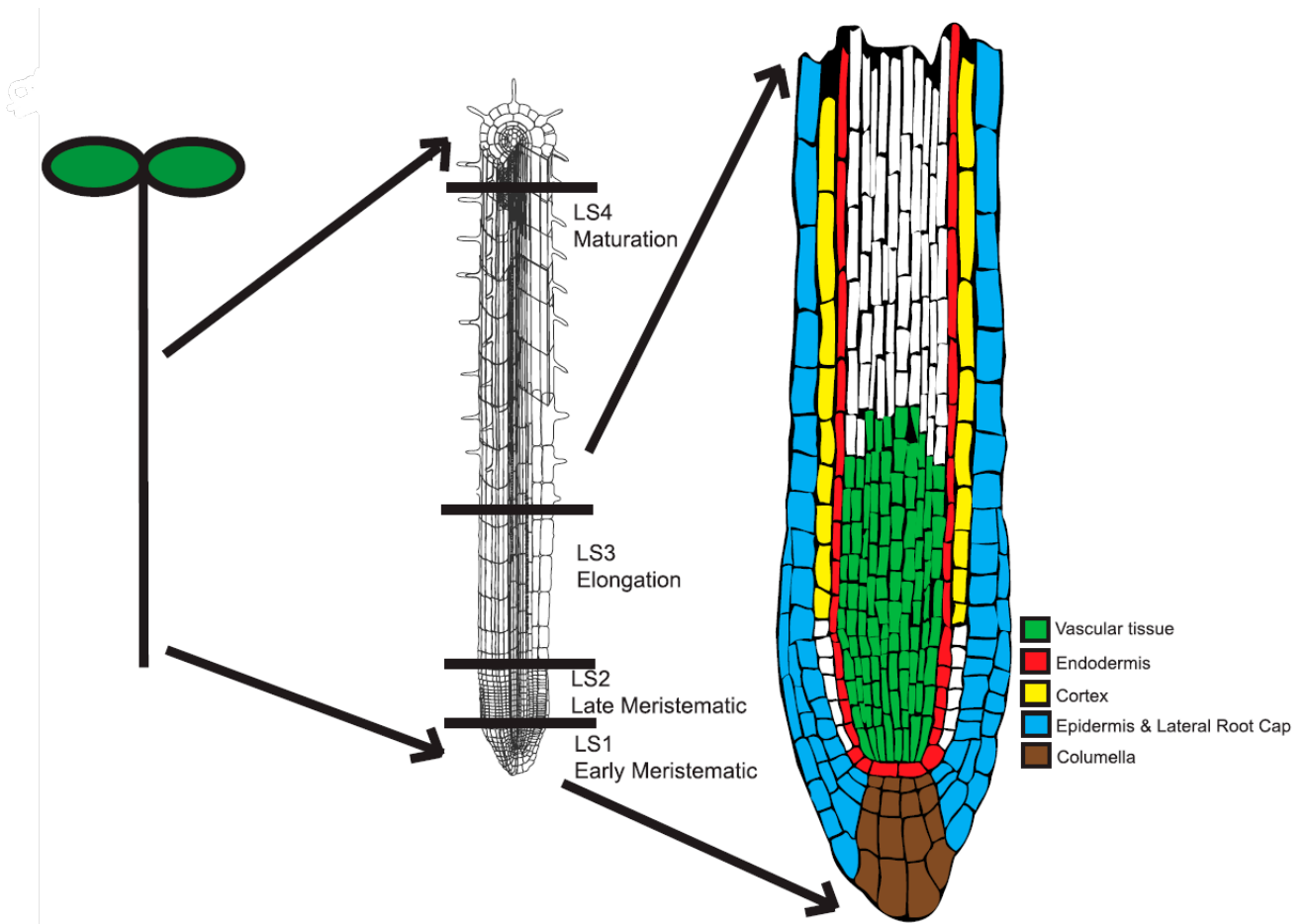


FIGURE 3.2 – Zones déterminées dans l'étude Breakfield, *et al.*, 2012 [116] pour caractériser l'expression des miARNs au sein de la racine d'*Arabidopsis*. La majorité des miARNs découverts dans la rhizosphère sont enrichis dans la pointe de la racine, appelée "LS1 Early Meristematic" sur la figure.

---

son de miARNs accompagnés du nécessaire protéique serait une façon très commode pour la plante de moduler l'expression de gènes d'intérêt chez les organismes avec lesquels elle interagit, dans son environnement.

Dans les tissus précédemment étudiés, les miARNs participent à de nombreux processus biologiques pour diverses fonctions liées à la reproduction, au développement, à la nutrition et la tolérance aux stress biotiques et abiotiques, mais également aux interactions symbiotiques [151]. Dans la rhizosphère, leur fonction est totalement inconnue. Nous pouvons émettre quelques hypothèses concernant ces fonctions. La plante pourrait utiliser des miARNs pour inhiber des fonctions microbiennes qui lui sont délétères, comme des gènes de virulence, ou pour stimuler des fonctions microbiennes qui lui sont bénéfiques, comme l'ACC désaminase, ou pour maintenir une symbiose déjà engagée.

Au vu de la littérature grandissante sur les petits ARNs non-codants comme médiateurs des interactions inter-règnes, au sein de l'holobionte, nous avons construit notre hypothèse de travail comme suit : les miARNs rhizosphériques seraient des médiateurs de la communication plante-microorganisme dans le sol. Plus précisément, nous avons supposé que ces miARNs contribueraient à réguler la composition et l'activité du microbiote rhizosphérique [165]. Cependant, d'autres rôles restent possibles, notamment la communication entre plantes. En effet, une étude a établi que lors de l'interaction entre la plante parasite *Cuscuta campestris* et son hôte, la cuscute envoie *via* son haustorium des miARNs vers la plante hôte, affectant l'expression de gènes cibles [186]. De même, une étude récente a démontré que des plantes dans une relation non-parasitaire et sans nécessité de liaison physique pouvaient communiquer à travers des miARNs [164]. Ce rôle des miARNs rhizosphériques est assez probable, mais ne fut pas l'objet de notre étude.

Tout comme l'expression de miARNs dans les tissus de la plante varie selon les conditions environnementales et selon l'étape de développement de la plante, il paraît évident que la composition des miARNs retrouvés dans la rhizosphère varie selon ces mêmes conditions. Selon les besoins de la plante, elle mobiliserait des fonctions microbiennes différentes *via* l'exsudation de miARNs différents. Ainsi, il serait très intéressant d'analyser le miRNAome rhizosphérique, qui se définit par l'ensemble des miARNs sécrétés dans la rhizosphère, dans des conditions de stress abiotiques, par exemple, afin d'identifier les miARNs et les cibles visées par la plante, dans ces circonstances.

Dans notre étude de la composition en miARNs de la rhizosphère de deux plantes phylogénétiquement éloignées, il est apparu qu'un certain nombre de miARNs était partagé par *Arabidopsis* et *Brachypodium*. Ce "core miRNAome" suggère une importance

---

fonctionnelle, conservée à travers l'évolution des espèces. Dans cette idée, il serait intéressant de réaliser une étude du miRNAome rhizosphérique de plusieurs espèces à travers la diversité végétale afin de caractériser ce core, essentiel à la biologie des plantes. Une fois les miARNs rhizosphériques identifiés, ils pourraient être comparés aux miARNs exprimés dans les tissus racinaires pour voir s'ils sont enrichis dans une zone particulière, comme observé pour *A. thaliana* [116]. Par la suite, la compréhension de leur production et de leur sécrétion serait un objectif captivant, nécessitant probablement des approches d'imagerie et de plantes génétiquement modifiées.

## 2 Échanges inter-règnes de petits ARNs & mécanismes de ciblage

L'étude de l'échange de petits ARNs non-codants entre individus, souvent entre un hôte et son microbiote, n'est apparue que récemment. Le tableau suivant, tiré de notre article d'Opinion [165] sur l'intérêt des miARNs de plantes comme régulateurs du microbiote, propose une synthèse des articles sur ce sujet.

Le plus ancien article publié sur l'échange de petits ARNs entre un hôte et son microbiote date de 2016 et conclut que les mammifères produisent des miARNs dans leurs intestins, véhiculés dans des vésicules extracellulaires, qui régulent la croissance et l'expression de gènes bactériens [119]. En 2018, une autre étude montre que les miARNs de plantes, encapsulés dans des nanoparticules "exosome-like", régulent l'expression d'un gène de *Lactobacillus*, dans les intestins [120]. Ces études pionnières démontrent qu'un hôte eucaryote peut moduler son microbiote intestinal *via* des petits ARNs, souvent sécrétés dans des transporteurs de type vésicules extracellulaires. Cela ouvre un tout nouveau champ de recherche, car les mécanismes d'interférence par l'ARN sont étudiés à la fois chez les eucaryotes et chez les procaryotes, mais jamais à l'intersection de ces deux domaines du vivant. Ainsi, les mécanismes habituels connus chez les eucaryotes ne sont pas forcément transposables chez les bactéries, et vice-versa. Dans les cas des miARNs, chez les eucaryotes, ceux-ci ciblent des séquences plus ou moins complémentaires, selon que ce soit chez un organisme végétal ou animal, ce qui a pour effet une inhibition post-transcriptionnelle du gène ciblé. Chez les plantes, les miARNs régulent l'expression du gène cible par inhibition de la traduction ou par clivage de l'ARNm, qui est d'une complémentarité quasi-parfaite avec le miARN en question [68]. L'inhibition de la traduction serait le résultat d'un encombrement stérique de la région 5'-UTR ou de la région codante,



Host	Interacting organism	sRNA mobility	sRNA exchanged	sRNA vehicle	Targeted genes	Effect
Human and mouse	Gut microbiota [ <i>Fusobacterium nucleatum</i> (Fn), <i>Escherichia coli</i> etc.]	From mammalian host to bacteria	miRNA	EVs	dnaK operon, 16S rRNA and rpoB (in Fn); RNase P, rutA, yegH, and fucO (in <i>E. coli</i> )	Regulation of bacterial growth
	Gut microbiota	From mammalian host to bacteria	miRNA	EVs	$\beta$ -galactosidase, AMUC_RS06985	Upregulation of target gene, enrichment of <i>Akkermansia muciniphila</i> , increasing regulatory T cells and ameliorating multiple sclerosis
Ginger ( <i>Zingiber officinale</i> )	Gut microbiota ( <i>Lactobacillaceae</i> )	From plant to bacteria	miRNA	Exosome-like nanoparticles	Monoxygenase ycnE	Regulation of bacterial growth and increase in indole-3-carboxaldehyde (3A)
Ginger, grapefruit ( <i>Citrus paradisi</i> ), carrot ( <i>Daucus carota</i> ), grape ( <i>Vitis vinifera</i> )	Murine gut cells	From plant to mice	miRNA	Exosome-like nanoparticles	?	Induction of anti-inflammation gene expression
Soybean ( <i>Glycine max</i> )	Rhizobia bacteria	From bacteria to plant	tRNA-derived small RNA fragments (tRFs)	?	Orthologs of <i>Arabidopsis</i> genes involved in root hair/plant development	Positive regulation of rhizobial infection and nodulation formation in soybean
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	From plant to fungal pathogen	sRNA	EVs	Vesicle-trafficking pathway, vacuolar protein sorting	Decrease in fungal virulence
Cotton plant ( <i>Gossypium sp.</i> )	<i>Verticillium dahliae</i>	From plant to fungal pathogen	miRNA	?	Virulence genes: Ca <sup>2+</sup> -dependent cysteine protease and an isotrichodermin C-15 hydroxylase	Silencing fungal virulence genes
Wheat ( <i>Triticum aestivum</i> )	<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i> ( <i>Pst</i> )	From fungal pathogen to plant	miRNA	?	Pathogenesis-related 2 (PR2)	Suppression of plant defenses
<i>A. thaliana</i> and <i>Nicotiana benthamiana</i>	Parasitic plant <i>Cuscuta campestris</i>	From parasitic plant to host plant	miRNA	?	TIR1, AFB2, and AFB3 (auxin receptors), BIK1 (kinase receptor), SEOR1 (phloem protein), and HSFB4 (transcriptional repressor)	mRNA cleavage and secondary siRNA production

FIGURE 3.3 – Synthèse de littérature basée sur l'étude d'échanges de petits ARNs non-codants entre un hôte et son microbiote ou entre deux individus du même règne, mais d'espèces distinctes. Dans l'ordre de haut en bas, les références sont les suivantes : Liu, *et al.*, 2016 [119]; 2019 [173]; Teng, *et al.*, 2018 [120]; Mu, *et al.*, 2014 [187]; Ren, *et al.*, 2019 [85]; Cai, *et al.*, 2018 [118]; Zhang, *et al.*, 2016 [100]; Wang, *et al.*, 2017 [88]; et Shahid, *et al.*, 2018 [186].

---

par le complexe RISC auquel est associé le miARN, empêchant le recrutement ou le mouvement du ribosome [188]. Les bactéries produisent des petits ARNs non-codants avec des fonctions similaires aux miARNs, et qui sont parfois appelés miRNA-size RNA ou msRNA [79]. En revanche, les petits ARNs bactériens peuvent soit augmenter la stabilité de leur cible et donc sa traduction, soit diminuer sa stabilité et réduire sa traduction [155]. L'inhibition des cibles peut être provoquée de plusieurs façons : l'encombrement stérique de la région Shine-Dalgarno, le recrutement d'une RNase, l'arrêt prématuré de l'élongation de l'ARNm ou le réarrangement de la région 5'-UTR, perturbant le chargement du ribosome [155]. Ces différences de mécanismes entre les eucaryotes et les procaryotes interrogent sur la façon dont un miARN d'origine eucaryote peut provoquer des changements post-transcriptionnels chez une bactérie : ce miARN aura-t-il une action similaire à son organisme d'origine ou d'arrivée ?

Cette question est particulièrement pertinente lorsque l'on cherche les cibles d'un miARN dans un organisme externe au règne d'origine. Dans l'étude de Liu, *et al.* [119], les auteurs confrontent les séquences nucléotidiques des bactéries d'intérêt à la base de données miRBase, qui regroupe les séquences de miARNs de multiples espèces [189]. Ainsi, ils trouvent de nombreuses cibles bactériennes potentielles, à la fois sur le brin sens et sur le brin antisens, suggérant que leurs miARNs pourraient se fixer sur l'ARN ou l'ADN [119]. Dans l'étude de Teng, *et al.* [120], les auteurs cherchent, par des alignements BLAST, des complémentarités de base avec uniquement la "seed sequence" du miARN. La seed region est une séquence en 5' des miARNs chez les plantes (2 - 13 nt, [65]) et chez les animaux (1-8 nt, [190]). Cette séquence permet une liaison à haute affinité entre le miARN et l'ARNm, améliorant l'efficacité du ciblage, du moins chez les animaux et algues vertes [190] ; [191], ce qui n'est pas forcément applicable aux plantes terrestres [192]. Il est difficile de trouver un consensus concernant la "seed region" chez les plantes. En revanche, il est certain qu'une certaine complémentarité de séquence est nécessaire pour l'efficacité des miARNs de plantes. Et le degré de complémentarité n'est pas liée au mécanisme d'inhibition utilisé par le miARN, par clivage de l'ARNm ou répression de la traduction, contrairement à une idée généralement admise [68]. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes basés sur l'outil *psRNAtarget* [141] et les paramètres proposés par défaut : seulement 2 mésappariements sont tolérés dans la "seed region" qui s'étend sur la séquence 2-13 nt et ont une pénalité plus sévère qu'ailleurs dans la séquence [65] ; [141]. Ces mésappariements ne comprennent pas les G :U dits "wobble base pair" qui ont une stabilité proche des paires de base Watson-Crick. Donc nos prédictions de cible de miARNs de plantes dans

---

des génomes bactériens se reposent sur une complémentarité de la séquence au complet, en pénalisant davantage les mésappariements dans la “seed region”. Par la suite, ces mécanismes de ciblage entre un miARN de plante et un ARNm bactérien sont discutés à la lumière de nos résultats sur l’impact des miARNs rhizosphériques sur l’expression des gènes bactériens.

### 3 Effets des miARNs rhizosphériques sur l’activité du microbiote

Afin d’explorer le rôle fonctionnel des miARNs rhizosphériques sur le microbiote, nous avons mis en place une expérimentation *in vitro* de confrontation d’une culture de *Variovorax paradoxus* EPS, une bactérie associée aux racines d’*Arabidopsis*, et d’un mélange de six miARNs issus de la rhizosphère d’*A. thaliana* (miR158a, miR159a, miR159b, miR159c, miR161.1, miR165b). En confrontant *in silico* les séquences de ces miARNs avec le génome de *V. paradoxus* EPS, nous avons identifié 137 cibles potentielles (**Chapitre 1, Figure 5**). Les résultats RNA-seq de la confrontation *in vitro* ont montré que plus d’une centaine de gènes de *V. paradoxus* étaient différentiellement exprimés en réponse à ce mélange de six miARNs, après 20 min et 120 min d’incubation. Cependant, seulement quatre gènes différentiellement exprimés avaient bien été prédits par notre outil de recherche des cibles des miARNs. Même si l’identification de mécanismes précis de ciblage n’était pas notre objectif principal, ces résultats démontrent que la complémentarité de séquences entre un miARN de plante et un ARNm bactérien peut suffire pour que l’expression de ce dernier soit altérée. Bien entendu, un grand nombre de cibles prédites n’a pas été différentiellement exprimé en réponse au mélange de miARNs. Comme discuté dans le **Chapitre 1**, cela peut être dû à des règles différentes d’appariement entre un couple miARN : ARNm de plantes *versus* un couple miARN de plante : ARNm bactérien, puisque notre outil de prédiction se base sur les schémas connus chez les plantes. Lorsque les schémas d’appariement entre un miARN végétal et un ARNm bactérien seront connus, notre outil pourra être mis à jour et nos prédictions pourront être plus précises. Dans ce cas, peut-être qu’un plus grand nombre de cibles prédites seront effectivement différentiellement exprimées.

A l’inverse, de nombreux gènes différentiellement exprimés n’étaient pas considérés comme des gènes cibles. Cela peut aisément s’expliquer par les cascades réactionnelles qui peuvent découler du changement d’expression d’un seul gène ciblé. En effet, chez les animaux [193] et chez les plantes [194], beaucoup de gènes ciblés codent pour des facteurs

---

de transcription. Ainsi, lorsqu'un tel gène est ciblé par un miARN, l'expression d'une myriade d'autres gènes peut être chamboulée. De plus, chez les plantes, le clivage d'un ARNm, causé par le ciblage d'un miARN, peut provoquer la production de siARNs (small interfering RNAs) secondaires : les miRNA-dependent transacting siRNAs (tasiRNAs) aussi appelés phased siRNAs [195]; [163]. Ainsi, un miARN peut réguler des grandes familles de gènes avec un nombre limité de gènes cibles. Ce mécanisme a été reporté uniquement chez les plantes, mais si les miARNs de plantes peuvent cibler des ARNm bactériens, il est possible qu'une production de siARNs secondaires soit provoquée dans les cellules bactériennes par des miARNs de plantes.

A la lumière de nos résultats, plusieurs perspectives et pistes d'amélioration peuvent être amenées à la discussion. Nous avons fait le choix d'utiliser un seul algorithme de base, celui de *psRNAtarget*, un outil de référence pour la recherche de cibles de miARNs chez les plantes [141]. Afin d'augmenter la précision et le 'recall' des résultats, une stratégie serait de combiner ces résultats avec d'autres outils de prédiction comme *Targetfinder* ou *Tapirhybrid* [196]. Pour mieux caractériser le rôle des miARNs rhizosphériques, il serait intéressant de répéter l'expérience de confrontation de cultures de *V. paradoxus* EPS avec les six miARNs rhizosphériques, mais individuellement. Cette expérience (**Chapitre 1, Figure 4**) de RNA-seq a démontré que l'expression de plus d'une centaine de gènes a été modulée par ce mélange de miARNs, suggérant que les cibles sont des régulateurs de la transcription ou qu'il-y-a du silençage secondaire. Mais il serait pertinent de confirmer ou non l'effet prédit d'un seul miARN à la fois, car il n'est pas impossible que le mélange de miARNs ait eu un effet synergique sur la transcriptomique bactérienne.

Toutefois, l'approche utilisant un mélange de miARNs permet de réaliser une sélection de miARNs d'intérêt avant de préciser l'effet de chacun de ces miARNs sur leurs cibles potentielles. Dans le **Chapitre 1**, le gène VARPA\_RS26385, qui code pour une phosphatidate cytidyltransferase, est différentiellement exprimé en réponse au mélange de six miARNs et est supposément ciblé par les trois miARNs de la famille miR159 (miR159a, miR159b et miR159c). Dans le **Chapitre 2**, l'effet du miR159c sur ce gène cible a été confirmé par PCR quantitative (qPCR). Cette méthode pourrait être appliquée aux autres gènes différentiellement exprimés et prédits comme cibles. Parmi ces derniers, deux sont supposément ciblés par le même miARN, le miR165b. Une proposition serait donc de confronter une culture bactérienne de *V. paradoxus* avec le miR165b et de vérifier, par qPCR, le changement d'expression de ces deux gènes cibles.

En effet, dans le **Chapitre 2**, nous avons pu confirmer le rôle des miARNs rhizo-

---

sphériques sur l'activité microbienne, en utilisant une approche *in planta*, à travers les miPEPs. Un des aspects les plus intéressants dans l'utilisation de miPEPs pour moduler le microbiote est la spécificité du peptide à augmenter la production d'un seul miARN et donc de cibler des gènes microbiens d'intérêt. Ainsi, nous avons mis en place un système expérimental pour étudier l'effet de l'application de miPEPs *in planta* sur l'expression de gènes bactériens dans la rhizosphère. Des plantules d'*A. thaliana* ont été cultivées *in vitro*, en conditions axéniques, en présence de seulement *V. paradoxus* EPS. Avant l'inoculation, les plantes sont traitées à deux reprises avec le miPEP159c à 24h d'intervalle. Deux heures après l'inoculation bactérienne, les plantes et la rhizosphère sont échantillonnées et l'ARN est extrait. Se faisant, nous avons pu quantifier l'expression de trois gènes prédits *in silico* comme cibles dans le génome de *V. paradoxus* EPS (**Chapitre 2, Figure 8**). L'expression de ces cibles est normalisée par rapport à deux gènes de référence bactériens et est comparée à un contrôle, constitué de plantes traitées avec le scrambled miPEP159c ou seulement de l'eau. Deux de ces gènes, codants pour le facteur de transcription LysR et le phosphatidate cytidylyltransférase, étaient moins exprimés dans la rhizosphère de plantes traitées au miPEP159c, suggérant que le miR159c ciblait bel et bien ces gènes bactériens. Cependant, le troisième gène prédit, codant pour une alpha-2 macroglobuline, était davantage exprimé dans ces conditions, en comparaison aux contrôles. Cela peut paraître étonnant dans un contexte eucaryote, car les miARNs sont connus pour réprimer l'expression de leur cible, mais chez les procaryotes, cette règle est plus souple. Comme discuté dans le **Chapitre 2**, les petits ARNs bactériens peuvent augmenter ou diminuer l'expression de leur cible [155].

En parallèle, une quantification du pri-miARN159c a été réalisée pour confirmer sa sur-expression en réponse au miPEP159c. En revanche, le miR159c mature aurait pu être quantifié dans la rhizosphère pour rendre encore plus robuste cette analyse.

La stratégie utilisée ici pour confirmer ou chercher des gènes affectés par les miARNs présente des limites, car elle se base uniquement sur un type de régulation. Cette stratégie part du postulat qu'un miARN va affecter la quantité d'ARNm dans un échantillon, or la régulation peut être au niveau traductionnel et ne se verra donc pas par RNA-seq. Chez les plantes, cette régulation traductionnelle est moins fréquente que le clivage d'ARNm [68], mais reste une possibilité chez les bactéries, où les petits ARNs peuvent affecter la stabilité ou la traduction d'un transcrit [155].

Dans cette étude de mesure de l'impact des miARNs rhizosphériques sur la transcription microbienne, nous nous sommes concentrés sur l'activité bactérienne et non pas

---

fongique. Un large faisceau d'évidence pointe vers la forte probabilité que les plantes et les champignons de la rhizosphère pourraient communiquer à travers les miARNs. Premièrement, l'étude des communautés à l'échelle taxonomique, présentée ci-après, montre un effet important des miARNs sur la diversité et la structure des communautés fongiques. Deuxièmement, les champignons étant des organismes eucaryotes, il est très probable que les miARNs rhizosphériques aient un impact direct sur leur activité génétique. Par ailleurs, les échanges de petits ARNs entre la plante et les champignons, notamment à travers des vésicules extracellulaires, sont complètement admis, même si cela n'a pas encore été démontré dans la rhizosphère. Beaucoup d'études ont montré une certaine "course aux armements" entre la plante et les champignons pathogènes, comme *B. cinerea* ou *Verticillium dahliae* : ces derniers sont capables de supprimer la défense de la plante par envoi de petits ARNs [153] ; [75], mais les plantes peuvent contre-attaquer avec leurs propres petits ARNs pour inhiber les gènes de virulence fongiques [118]. Aussi, il n'est pas impossible que des miARNs rhizosphériques soient impliqués dans la mise en place de symbioses mycorhiziennes.

*In planta*, plusieurs miARNs ont été caractérisés comme stimulateurs de ces symbioses avec des champignons mycorhiziens à arbuscules, soit en modulant la colonisation [197] soit en favorisant l'instauration de la symbiose [102].

Tous ces éléments suggèrent que les miARNs de plantes affectent probablement des gènes fongiques. Cependant, pour ces travaux de thèse, il a fallu faire des choix et concentrer nos efforts sur certains aspects de cette exploration des miARNs de la rhizosphère. Ainsi, l'aspect plus novateur du ciblage de gènes procaryotes par un miARN eucaryote nous a poussé à axer nos expériences sur les bactéries. L'étude de l'impact des miARNs rhizosphériques sur les champignons serait très pertinente à réaliser.

Dans cette perspective d'étude, certaines améliorations pourraient être amenées à notre approche. L'ajout d'une méthode complémentaire au séquençage petits ARNs, comme la microscopie, renforcerait nos résultats et permettrait de confirmer visuellement l'entrée des miARNs de plantes dans le microorganisme étudié. L'utilisation de miARNs fluorescents de synthèse et/ou de microorganismes fluorescents produit un résultat visuel assez convaincant [119]. Par ailleurs, dans l'expérience de confrontation *in vitro*, nos contrôles étaient des miARNs synthétiques dits "scrambled", c'est-à-dire possédant la même séquence nucléotidique mais dans le désordre. Mais certains suggèrent que l'approche la plus robuste pour éliminer l'effet d'un miARN contrôle serait d'utiliser des contrôles dont la séquence est identique au miARN de traitement, mais la "seed region" est mutée [198].

---

Pour conclure, nous avons démontré que les miARNs rhizosphériques peuvent cibler des ARNm bactériens et affecter leur expression, selon des règles qui nous sont encore inconnues. Pour la première fois, nous montrons que l'application *in planta* d'un miPEP peut affecter le changement de l'expression d'un gène d'une bactérie rhizosphérique. En modifiant l'activité du microbiote rhizosphérique, les miARNs pourraient permettre aux plantes de mieux tolérer des stress. L'étude du miRNAome rhizosphérique dans des contextes différents, par exemple, lors d'un stress abiotique, pourrait nous aider à comprendre le rôle de ces miARNs envers le microbiote et notamment les fonctions microbiennes ciblées.

## 4 Les miARNs structurent les communautés microbiennes dans la rhizosphère

Le microbiote de la rhizosphère joue des rôles similaires à ceux du microbiote intestinal, permettant une bonne absorption des nutriments et une défense contre des pathogènes, par exemple. Tout au long de la vie d'une plante, la composition et l'activité de ce microbiote évoluent, en fonction des facteurs environnementaux. De nombreux signaux sont sécrétés par les racines de la plante pour attirer ou repousser certains microorganismes (Figure 3.4). Il s'agit principalement d'exométabolites, de cellules bordantes et de mucilage [25], comme décrit dans l'**Introduction**. À noter, les microorganismes eux-mêmes interviennent dans l'assemblage du microbiote de la rhizosphère, notamment à travers le quorum sensing [27].

Notre hypothèse était que les miARNs, récemment découverts dans la rhizosphère, pouvaient moduler la composition et l'activité du microbiote rhizosphérique. Pour étudier l'impact de ces petits ARNs sur la taxonomie du microbiote, nous avons cultivé des *A. thaliana* mutantes avec une biosynthèse des miARNs et/ou siARNs affectée. Grâce au séquençage 16S/ITS, nous avons pu conclure que ces mutations provoquaient un changement important de la composition du microbiote et de la diversité microbienne des racines et de la rhizosphère (**Chapitre 1, Figure 2 et 3**). Toutefois, cette expérience ne nous a pas permis de réellement conclure sur l'effet direct de miARNs rhizosphériques sur le microbiote. De telles mutations pléiotropiques provoquent de nombreux changements *in planta*, qui indirectement pourraient moduler la quantité ou la qualité de certains exsudats racinaires et donc modifier la composition du microbiote. Pour pallier ce biais et confirmer le rôle structurant des miARNs rhizosphériques sur le microbiote, nous avons utilisé une approche plus précise, *in planta, via* les miPEPs.

Pour rappel, un miPEP engendre la sur-expression du transcrite primaire et donc la

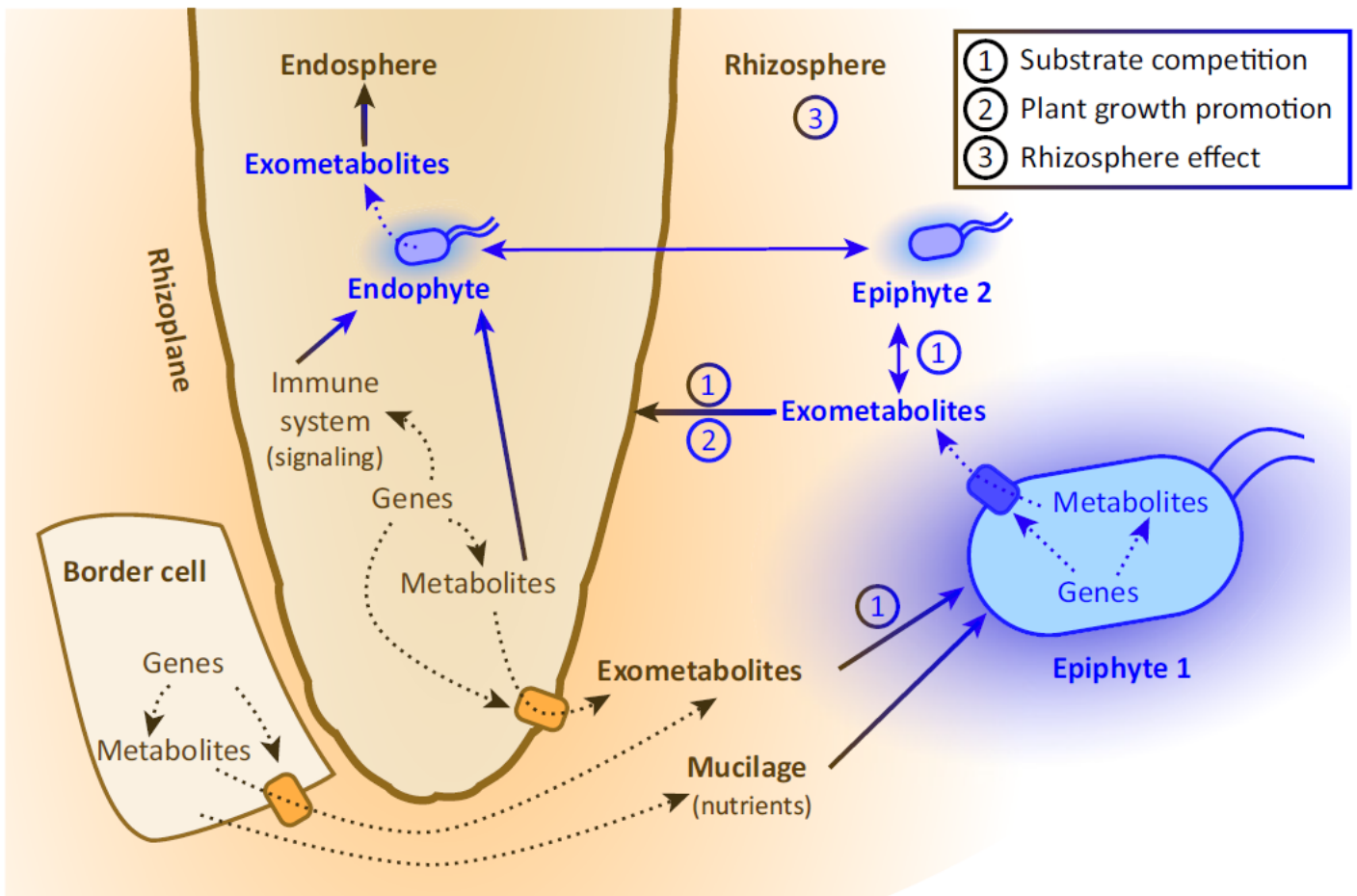


FIGURE 3.4 – Exsudats sécrétés dans la rhizosphère par les racines, les cellules bordantes et les microorganismes. Ces exométabolites peuvent servir de signal ou simplement d'élément nutritif. Les types d'interactions représentées sont (1) la compétition pour les nutriments, (2) la promotion de croissance de la plante par les composés microbiens et (3) l'effet rhizosphère. Figure tirée de Sasse, *et al.*, 2018 [25].



---

production du miARN auquel il est associé [167]. Ces petits peptides, naturellement produits par la plante, peuvent également être synthétisés industriellement. Ces miPEPs sont ensuite appliqués directement sur la plante, à des concentrations variables entre 1  $\mu\text{M}$  et 20  $\mu\text{M}$ , lors de pratiques expérimentales. Il est recommandé d'appliquer le miPEP là où son miARN est actif, car il a récemment été démontré que les miPEPs n'ont probablement qu'un rôle local, et non systémique. Du moins, le miPEP165b, après son internalisation dans les tissus racinaires, n'est pas capable d'entrer dans le cylindre central de la racine et donc de migrer vers le système aérien [199].

Dans le but de confirmer le rôle des miARNs rhizosphériques sur le microbiote, *in vivo* et *in planta*, nous avons utilisé des miPEPs/miARNs d'intérêt. De ce fait, nous nous sommes intéressés à la famille des miR159 chez *A. thaliana*. En effet, trois de leurs membres, les miARN159a, miARN159b et miARN159c, ont été retrouvés dans la rhizosphère d'*A. thaliana*. De plus, la séquence de leurs miPEPs respectifs est connue donc aisément synthétisable. Ceux-ci semblent être de bons candidats pour étudier l'effet de miARNs spécifiques, à travers leur sur-expression par l'application de miPEPs, sur le microbiote de la rhizosphère. Même si ces miARNs sont actifs dans divers tissus *in planta*, nous voulons amplifier leur production dans les racines pour qu'ils soient davantage sécrétés dans la rhizosphère. Ainsi, les miPEP159a, miPEP159b et miPEP159c ont été ajoutés dans l'eau d'arrosage qui était administrée au niveau du collet pour imbiber les racines.

Dans un premier temps, nous avons étudié la composition du microbiote rhizosphérique en réponse au traitement miPEP. Dans ce cas, les plantes ont été traitées trois fois par semaine, pendant trois semaines, soit un traitement "long terme". Après échantillonnage et analyse des amplicons 16S et ITS, il s'est avéré que chaque traitement miPEP a eu un effet significatif sur la structure des communautés bactériennes et fongiques des racines et de la rhizosphère d'*A. thaliana* (**Chapitre 2, Figure 1**). L'abondance de nombreux Amplicon Sequence Variants (ASVs) a été augmentée ou diminuée suite au traitement miPEP, en comparaison avec leur abondance dans les plantes contrôles (traitées seulement à l'eau). Il est intéressant de noter que plusieurs ASVs enrichis par le traitement miPEP appartiennent à des genres bactériens ou fongiques, qui regroupent de nombreuses espèces dites "PGP", c'est-à-dire "plant growth promoting" ou capables de promouvoir la croissance des plantes. Cependant, notre analyse des amplicons 16S et ITS ne permet pas d'avoir une taxonomie plus précise que le niveau du genre, donc cette idée est seulement spéculative. Cette approche purement taxonomique met en évidence que même la variation quantitative d'un seul miARN dans la rhizosphère peut provoquer des changements

---

subtils de la communauté microbienne. Les mécanismes potentiels enclenchés de manière plus ou moins directe, par la présence de miPEPs, sont examinés dans la discussion du **Chapitre 2**.

Nous avons donc montré que les miARNs rhizosphériques modulaient la taxonomie du microbiote, cependant cette modulation est probablement indirecte. Le rôle connu d'un miARN est de changer l'expression d'un gène cible. Indirectement, le changement d'expression d'un gène microbien peut tout à fait favoriser ou inhiber la présence de microorganismes environnants. Imaginons par exemple qu'un miARN de plante cible un gène lié au quorum sensing, cela aurait un effet important sur la communauté bactérienne. Dans ce sens, nous avons voulu déterminer l'impact de miARNs de plantes sur l'expression de gènes bactériens. Une expérience *in vitro* confrontant des miARNs rhizosphériques de synthèse avec une culture de *V. paradoxus* a mis en évidence une variation importante de l'expression de certains gènes bactériens (**Chapitre 1, Figure 4**). Parmi eux, quelques-uns avaient été prédits *in silico* comme cibles d'un ou plusieurs des miARNs ajoutés à la culture. Bien que chez les plantes, les miARNs aient un rôle uniquement répressif du gène cible, chez les bactéries, un miARN peut diminuer ou augmenter l'expression de sa cible [155]; [119]; [120]. Ainsi, nous avons mis en évidence que des miARNs détectés dans la rhizosphère impactaient directement l'expression de gènes bactériens. Cette expérience *in vitro* a montré des variations génétiques chez *V. paradoxus*, mais pas chez *Bacillus mycoides*, une bactérie Gram +. Cette différence de réponse selon les souches bactériennes pourrait expliquer en partie les changements taxonomiques observés à l'échelle de la communauté, chez les plantes mutantes ou traitées avec un miPEP. Cela est discuté davantage dans le **Chapitre 1** et mérite d'être développé dans de futures expériences.

Ici, nous avons mis en évidence que les miARNs sécrétés par les plantes dans la rhizosphère avaient un rôle structurant sur les communautés bactériennes et fongiques, d'un point de vue taxonomique. A travers deux approches, les plantes mutantes et l'application de miPEPs, nous avons montré que les petits ARNs de plantes sont essentiels à la structuration des communautés microbiennes, mais que même l'augmentation quantitative d'un seul miARN peut modifier le microbiote des racines et de la rhizosphère. Comme discuté précédemment, l'exploration du miRNAome rhizosphérique dans des contextes différents, comme lors d'un stress abiotique, pourrait apporter des informations clés quant aux miARNs sécrétés et aux fonctions et aux taxons microbiens ciblés. Certainement, que ce miRNAome varie selon les contextes pour permettre à la plante de s'entourer des microorganismes les plus bénéfiques pour tolérer les conditions affrontées.

---

## 5 Ingénierie du microbiote basée sur les miARNs et les miPEPs

Les résultats principaux de cette thèse démontrent une nouvelle voie de régulation du microbiote des plantes à travers les miARNs et les miPEPs. Cette étude ne fait qu'effleurer ce nouveau mode de communication et ouvre la voie à de nombreuses questions (**Questions en suspens**). Celles-ci concernent notamment les mécanismes précis de production, sécrétion et transport des miARNs dans la rhizosphère, et de leur interférence chez les microorganismes du sol. Les perspectives de recherche sont innombrables et pourront se servir de méthodes diverses pour apporter des réponses à ces questions : plantes avec des constructions génétiques pour localiser la production de miARNs rhizosphériques ; imagerie confocale pour suivre le transport et l'incorporation des miARNs dans les microorganismes ; extraction et séquençage de vésicules extracellulaires dans la rhizosphère ; Western Blot pour identifier la présence de protéines du RISC dans ces vésicules ; etc... Ajouté à cela, des expériences de pointe en biologie moléculaire seront nécessaires pour comprendre les mécanismes d'interférence par les miARNs de plantes chez les bactéries.

Même si ces travaux amènent de nombreuses questions très fondamentales et mécanistiques, nous pouvons d'ores-et-déjà réfléchir aux applications potentielles de la découverte de ces nouveaux régulateurs du microbiote. De par leur effet exclusif sur des gènes et des espèces microbiennes spécifiques, les miARNs représentent un réel intérêt dans le domaine de l'ingénierie du microbiote. Comme discuté dans l'**Introduction**, de multiples applications utilisant les miARNs existent déjà, permettant le silençage guidé de gènes cibles, par une modification génétique de l'hôte (HIGS) ou l'application directe de miARNs synthétiques (SIGS). Les miPEPs n'ont été découverts qu'en 2015 [167], mais ces peptides ont déjà fait l'objet de nombreuses études portant sur l'augmentation de la taille des racines ou des inflorescences, du nombre de nodules ou de racines adventives, ou d'un avancement de la floraison [181].

Même si peu d'études se sont intéressées au rôle des miPEPs dans le cadre des interactions plante-microorganismes, ces travaux de thèse ouvrent la voie vers l'usage des miPEPs pour moduler le microbiote des plantes. Pour se faire, on pourrait caractériser les cibles potentielles des miARNs rhizosphériques, afin de trouver des cibles fonctionnelles et/ou taxonomiques d'intérêt. A noter que celles-ci pourraient être inhibées ou stimulées, selon des mécanismes qui sont encore à définir. On pourrait également s'intéresser à des

---

miARNs déjà connus, ciblant des gènes d'intérêt, notamment dans le cas où les cibles sont des gènes de virulence. Par exemple, chez plusieurs espèces végétales d'intérêt agricole, des miARNs ciblant des gènes de virulence de virus phytopathogènes ont été identifiés. *In silico*, plusieurs miARNs ont été identifiés chez la canne à sucre, ciblant le génome du sugarcane bacilliform virus (SCBV) [200] ou chez le manioc, ciblant le génome d'un *Begomovirus* [201]. Une fois caractérisés et synthétisés, les miPEPs associés à ces miARNs pourraient être appliqués sur des plantes infectées comme un traitement local et hautement spécifique. Dans cette idée, une banque de miPEPs, classés par espèce végétale et par espèce microbienne ciblée, pourrait être réalisée et mise à disposition selon les besoins précis du moment.

Il s'agit là de perspectives assez lointaines dans le temps, car nécessitant beaucoup d'investissement en recherche fondamentale pour établir ces connaissances. L'agriculture de précision, très moderne et à la pointe de la technologie, peut paraître une solution alléchante. Mais pour la majorité des cultivateurs et cultivatrices, ces méthodes technologiques restent hors de portée. D'ailleurs, toutes les questions liées à l'agriculture doivent être placées dans un contexte socio-économique et géopolitique : une solution agronomique unique ne peut exister. En sciences du végétal, les questions de productivité sont souvent mises en avant, mais en réalité, ce n'est pas la croissance des plantes qui est problématique, mais bien notre répartition et notre capacité d'utilisation de ces ressources végétales. A l'échelle mondiale, 14% des produits agricoles sont perdus par an, avant leur mise sur le marché, puis 17% supplémentaires une fois sur les étals [202]. En revanche, les changements globaux et la perte de biodiversité affectent sévèrement la santé de nos sols et de nos plantes et donc les services systémiques associés [203]. Ainsi, des solutions pour rendre nos cultures résilientes à ces changements sont nécessaires. Cependant, ces solutions ne sont probablement pas d'ordre technologique, mais politique.

La Révolution Verte était un ensemble de politiques fortes mises en place durant les années 1960 - 1990 pour transformer le système agricole en encourageant l'utilisation de variétés céréalières modernes, plus productives. Ces variétés ont contribué à une augmentation de la productivité de nombreuses céréales, comme le blé, le riz et le maïs [204]. Ces politiques ont permis de globalement diminuer le prix de la nourriture et donc d'augmenter l'apport calorique moyen [204]. Cependant, ces retombées bénéfiques n'ont pas profité à tout le monde et certaines conséquences négatives persistent jusqu'à aujourd'hui. Tout d'abord, les politiques productivistes ont poussé à la production intensive de seulement quelques espèces végétales, avec un recours quasi systématique aux intrants

---

chimiques, et l'expansion des terres agricoles sur des sols non adaptés [205]. Aujourd'hui, les conséquences environnementales de l'agriculture intensive sont bien connues et encore une fois, ces conséquences seront plus difficiles pour certaines régions de la planète. En effet, l'intensification de l'agriculture et l'expansion des cultures va affecter plus sévèrement la biodiversité en Amérique du sud et centrale, en Afrique Sub-Saharienne, en Inde et en Chine [206]. Mais la Révolution Verte a également provoqué des disparités socio-économiques dans des zones plus reculées, moins adaptées aux politiques productivistes, comme en Afrique Sub-Saharienne [204]. Par exemple, aucune variété moderne de sorgho, de millet ou de manioc n'existait, alors que ce sont des cultures essentielles en Afrique [205]. De plus, les cultivatrices ont proportionnellement moins perçu les bénéfices de cette Révolution que les cultivateurs [207], alors qu'il est admis que les femmes ont la même efficacité, à moyen de production égal, que les hommes [208].

Aujourd'hui, notre combat ne se limite pas qu'à la productivité de nos cultures, mais nous devons aussi prendre en compte les changements globaux et la transformation de nos sociétés. A l'échelle globale et locale, nous devons repenser notre système d'agriculture afin de fournir une nourriture saine et suffisante, malgré un environnement impacté par des décennies de production intensive. A l'inverse de la Révolution Verte, qui a démontré qu'une solution universelle n'est pas envisageable, l'idée est de déterminer localement les meilleures solutions à adopter, basées sur des savoirs régionaux, voire ancestraux. Par exemple, en France, la diversification des cultures, avec davantage de légumineuses et d'oléagineux, aurait un impact positif sur la biodiversité et sur notre alimentation. Cette transition nécessite des changements systémiques à tous les niveaux de la société, de la graine à l'assiette. Tout comme l'agriculture biologique qui a pris de l'ampleur sur l'agriculture dite "conventionnelle", il existe un spectre de pratiques entre les deux, comme l'agriculture raisonnée ou même l'agriculture de précision. Cette dernière vise à satisfaire des critères de productivité et de durabilité économique et écologiques, en se servant des nouvelles technologies, comme la télédétection ou la modélisation d'aide à la décision. Dans cette optique, les miPEPs et les miARNs représentent une solution de précision, notamment pour rendre nos cultures plus résilientes aux conditions environnementales, qui pourraient s'aggraver dans les années à venir. Les miARNs et leurs miPEPs correspondants pourraient être proposés comme une solution complémentaire aux autres techniques agricoles, afin d'avoir un ensemble d'outils diversifiés à notre portée, pour répondre à des besoins spécifiques. Ainsi, l'objectif ultime de la recherche fondamentale sur les miARNs "stimulateurs" du microbiote des plantes serait de concevoir une nouvelle technologie, de

---

haute précision avec un faible impact sur l'environnement.

# CONCLUSION

---

Les recherches effectuées au cours de cette thèse ont mis en évidence une nouvelle voie de communication inter-règne au sein de l'holobionte-plante. Il a été démontré que deux plantes phylogénétiquement éloignées, *Arabidopsis thaliana* et *Brachypodium distachyon*, sécrètent des miARNs spécifiques dans leur rhizosphère respective. L'implication de ces miARNs au sein du microbiote rhizosphérique a été supposée, puis confirmée au fil des expériences, *in vitro* et *in vivo*. Les miARNs rhizosphériques impactent à la fois la composition et l'activité des communautés microbiennes qui entourent les racines. Dans cette idée, les miPEPs ont été utilisés pour moduler les quantités de miARNs relâchés dans la rhizosphère, afin d'étudier plus finement le rôle de certains miARNs et de leurs cibles. Celles-ci ont pu être prédites en réalisant un alignement de séquences entre des gènes bactériens et des miARNs de plantes, mais les règles strictes d'interaction entre un miARN végétal et un ARNm bactérien ne sont pas encore connues. De ce fait, parfois l'expression du gène ciblé est réprimée par le miARN, parfois elle est stimulée.

*In fine*, ces travaux de thèse ont ouvert la porte à de nombreuses perspectives d'études pour déchiffrer l'utilisation des miARNs, dans la communication entre la plante et son microbiote rhizosphérique. L'existence de cette nouvelle voie d'interactions inter-règne dans la rhizosphère initie de nouvelles questions dont quelques-unes sont proposées dans l'encadré **Questions en suspens**. Les réponses à ces interrogations traceront le chemin pour élaborer des miPEPs capables de réguler très spécifiquement la composition taxonomique et les fonctions du microbiote des plantes. Face aux changements globaux et pour rendre nos cultures plus résilientes, les miARNs et les miPEPs pourraient être une solution complémentaire aux transformations systémiques nécessaires.

---

### Questions en suspens

- \* Quels sont les mécanismes d'interaction entre un miARN de plante et un ARNm bactérien ?
- \* Comment sont transportés les miARNs de plantes dans la rhizosphère ? S'il s'agit de vésicules extracellulaires, les protéines du complexe RISC sont-elles véhiculées avec les miARNs ?
- \* L'entrée des miARNs à l'intérieur des cellules bactériennes se fait-elle à nu ou *via* une endocytose, avec des vésicules ?
- \* Quels miARNs sont essentiels pour la régulation du microbiote ? Quelles fonctions microbiennes sont ciblées ?
- \* Les miARNs rhizosphériques sont-ils sélectionnés en amont ? Et en quelle quantité sont-ils sécrétés dans la rhizosphère ?
- \* Existe-t'il un "core" miARNs rhizosphériques commun à toutes les plantes ?
- \* Comment la composition de miARNs rhizosphériques varie en réponse à divers stress environnementaux ?
- \* Les miARNs rhizosphériques ciblent-ils des gènes fongiques ?
- \* Est-ce-que d'autres petits ARNs de plantes ont des rôles similaires dans le microbiote, par exemple, les siARNs ?
- \* Dans le sens opposé, est-ce-que les bactéries ou les champignons envoient des petits ARNs vers la plante hôte, à travers la rhizosphère ? Si oui, par quels moyens ? Pour cibler quelles fonctions ?



# BIBLIOGRAPHIE

---

1. WALTER, M. R., BUICK, R. & DUNLOP, J. S. R., Stromatolites 3,400–3,500 Myr Old from the North Pole Area, Western Australia, *Nature* **284**, 443-445, ISSN : 0028-0836, 1476-4687, <http://www.nature.com/articles/284443a0> (avr. 1980).
2. CAMPBELL, N. *et al.*, *Biologie* 9<sup>e</sup> éd., 1400 p., ISBN : 978-2-7613-5065-5 (Pearson France, 12 juill. 2012).
3. FRANCIS, I., HOLSTERS, M. & VEREECKE, D., The Gram-positive Side of Plant–Microbe Interactions, *Environmental Microbiology* **12**, 1-12, ISSN : 14622912, 14622920, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1462-2920.2009.01989.x> (jan. 2010).
4. SCHULZ, H. N. *et al.*, Dense Populations of a Giant Sulfur Bacterium in Namibian Shelf Sediments, *Science* **284**, 493-495, ISSN : 0036-8075, 1095-9203, <https://www.science.org/doi/10.1126/science.284.5413.493> (16 avr. 1999).
5. CARON, D. A., WORDEN, A. Z., COUNTWAY, P. D., DEMIR, E. & HEIDELBERG, K. B., Protists Are Microbes Too : A Perspective, *The ISME Journal* **3**, 4-12, ISSN : 1751-7362, 1751-7370, <http://www.nature.com/articles/ismej2008101> (jan. 2009).
6. BRUNDRETT, M. C. & TEDERSOO, L., Evolutionary History of Mycorrhizal Symbioses and Global Host Plant Diversity, *New Phytologist* **220**, 1108-1115, ISSN : 0028646X, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nph.14976> (déc. 2018).
7. COSME, M., FERNÁNDEZ, I., VAN DER HEIJDEN, M. G. & PIETERSE, C. M., Non-Mycorrhizal Plants : The Exceptions That Prove the Rule, *Trends in Plant Science* **23**, 577-587, ISSN : 13601385, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138518300888> (juill. 2018).
8. LEUNG, T. L. F. & POULIN, R., PARASITISM, COMMENSALISM, AND MUTUALISM : EXPLORING THE MANY SHADES OF SYMBIOSES, *Vie Milieu* (2008).

- 
9. BIZZELL, E., *Plants and the Bacteria at the Root of It All* <https://asm.org/Articles/2018/April/plants-and-the-bacteria-at-the-root-of-it-all>.
  10. BENEZECH, C., DOUDEMMENT, M. & GOURION, B., Legumes Tolerance to Rhizobia Is Not Always Observed and Not Always Deserved, *Cellular Microbiology* **22**, ISSN : 1462-5814, 1462-5822, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cmi.13124> (jan. 2020).
  11. THE INTEGRATIVE HMP (iHMP) RESEARCH NETWORK CONSORTIUM, The Integrative Human Microbiome Project, *Nature* **569**, 641-648, ISSN : 0028-0836, 1476-4687, <http://www.nature.com/articles/s41586-019-1238-8> (mai 2019).
  12. SENDER, R., FUCHS, S. & MILO, R., Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body, *PLOS Biology* **14**, e1002533, ISSN : 1545-7885, <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.1002533> (19 août 2016).
  13. GILBERT, J. A. *et al.*, Current Understanding of the Human Microbiome, *Nature Medicine* **24**, 392-400, ISSN : 1078-8956, 1546-170X, <http://www.nature.com/articles/nm.4517> (avr. 2018).
  14. SHADE, A., JACQUES, M.-A. & BARRET, M., Ecological Patterns of Seed Microbiome Diversity, Transmission, and Assembly, *Current Opinion in Microbiology* **37**, 15-22, ISSN : 13695274, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527416301576> (juin 2017).
  15. HASSANI, M. A., DURÁN, P. & HACQUARD, S., Microbial Interactions within the Plant Holobiont, *Microbiome* **6**, 58, ISSN : 2049-2618, <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-018-0445-0> (déc. 2018).
  16. BULGARELLI, D., SCHLAEPPI, K., SPAEPEN, S., van THEMAAT, E. V. L. & SCHULZE-LEFERT, P., Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants, *Annual Review of Plant Biology* **64**, 807-838, ISSN : 1543-5008, 1545-2123, <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-arplant-050312-120106> (29 avr. 2013).
  17. BODENHAUSEN, N., HORTON, M. W. & BERGELSON, J., Bacterial Communities Associated with the Leaves and the Roots of Arabidopsis Thaliana, *PLoS ONE* **8** (éd. IBEKWE, A. M.) e56329, ISSN : 1932-6203, <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0056329> (15 fév. 2013).

- 
18. REBOLLEDA-GÓMEZ, M. *et al.*, Gazing into the Anthosphere : Considering How Microbes Influence Floral Evolution, *New Phytologist* **224**, 1012-1020, ISSN : 0028-646X, 1469-8137, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nph.16137> (nov. 2019).
  19. LUNDBERG, D. S. *et al.*, Defining the Core Arabidopsis Thaliana Root Microbiome, *Nature* **488**, 86-90, ISSN : 0028-0836, 1476-4687, <http://www.nature.com/articles/nature11237> (août 2012).
  20. CHEN, M., ARATO, M., BORGHİ, L., NOURI, E. & REINHARDT, D., Beneficial Services of Arbuscular Mycorrhizal Fungi – From Ecology to Application, *Frontiers in Plant Science* **9**, 1270, ISSN : 1664-462X, <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2018.01270/full> (4 sept. 2018).
  21. BULGARELLI, D. *et al.*, Revealing Structure and Assembly Cues for Arabidopsis Root-Inhabiting Bacterial Microbiota, *Nature* **488**, 91-95, ISSN : 0028-0836, 1476-4687, <http://www.nature.com/articles/nature11336> (août 2012).
  22. VANDENKOORNHUYSE, P., QUASER, A., DUHAMEL, M., LE VAN, A. & DUFRESNE, A., The Importance of the Microbiome of the Plant Holobiont, *New Phytologist* **206**, 1196-1206, ISSN : 0028646X, <http://doi.wiley.com/10.1111/nph.13312> (juin 2015).
  23. TEDERSOO, L. & BRUNDRETT, M. C., in *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis* (éd. TEDERSOO, L.) 407-467 (Springer International Publishing, Cham, 2017), ISBN : 978-3-319-56362-6 978-3-319-56363-3, [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-56363-3\\_19](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-56363-3_19).
  24. BERENDSEN, R. L., PIETERSE, C. M. & BAKKER, P. A., The Rhizosphere Microbiome and Plant Health, *Trends in Plant Science* **17**, 478-486, ISSN : 13601385, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138512000799> (août 2012).
  25. SASSE, J., MARTINOIA, E. & NORTHEN, T., Feed Your Friends : Do Plant Exudates Shape the Root Microbiome?, *Trends in Plant Science* **23**, 25-41, ISSN : 13601385, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138517301991> (jan. 2018).

- 
26. PHILIPPOT, L., RAAIJMAKERS, J. M., LEMANCEAU, P. & van der PUTTEN, W. H., Going Back to the Roots : The Microbial Ecology of the Rhizosphere, *Nature Reviews Microbiology* **11**, 789-799, ISSN : 1740-1526, 1740-1534, <http://www.nature.com/articles/nrmicro3109> (nov. 2013).
  27. VENTURI, V. & KEEL, C., Signaling in the Rhizosphere, *Trends in Plant Science* **21**, 187-198, ISSN : 13601385, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138516000066> (mars 2016).
  28. BUKHAT, S. *et al.*, Communication of Plants with Microbial World : Exploring the Regulatory Networks for PGPR Mediated Defense Signaling, *Microbiological Research* **238**, 126486, ISSN : 09445013, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944501320303542> (sept. 2020).
  29. BAETZ, U. & MARTINOIA, E., Root Exudates : The Hidden Part of Plant Defense, *Trends in Plant Science* **19**, 90-98, ISSN : 13601385, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138513002598> (fév. 2014).
  30. HELMAN, Y. & CHERNIN, L., Silencing the Mob : Disrupting Quorum Sensing as a Means to Fight Plant Disease : Quorum Quenching as a Means to Fight Plant Disease, *Molecular Plant Pathology* **16**, 316-329, ISSN : 14646722, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mpp.12180> (avr. 2015).
  31. PEL, M. J. C. & PIETERSE, C. M. J., Microbial Recognition and Evasion of Host Immunity, *Journal of Experimental Botany* **64**, 1237-1248, ISSN : 1460-2431, 0022-0957, <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/ers262> (mars 2013).
  32. HEMKEMEYER, M., SCHWALB, S. A., HEINZE, S., JOERGENSEN, R. G. & WICHERN, F., Functions of Elements in Soil Microorganisms, *Microbiological Research* **252**, 126832, ISSN : 09445013, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944501321001385> (nov. 2021).
  33. AISLABIE, J. & DESLIPPE, J. R., Soil Microbes and Their Contribution to Soil Services, *Ecosystem services in New Zealand—conditions and trends. Manaaki Whenua Press, Lincoln, New Zealand* **1**, 143-161 (2013).
  34. RILLIG, M. C. & MUMMEY, D. L., Mycorrhizas and Soil Structure, *New Phytologist* **171**, 41-53, ISSN : 0028-646X, 1469-8137, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.2006.01750.x> (juill. 2006).

- 
35. SHENG, Y. *et al.*, Latest Eco-Friendly Approaches for Pesticides Decontamination Using Microorganisms and Consortia Microalgae : A Comprehensive Insights, Challenges, and Perspectives, *Chemosphere* **308**, 136183, ISSN : 00456535, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653522026765> (déc. 2022).
  36. SUI, X., WANG, X., LI, Y. & JI, H., Remediation of Petroleum-Contaminated Soils with Microbial and Microbial Combined Methods : Advances, Mechanisms, and Challenges, *Sustainability* **13**, 9267, ISSN : 2071-1050, <https://www.mdpi.com/2071-1050/13/16/9267> (18 août 2021).
  37. JIN, Y., LUAN, Y., NING, Y. & WANG, L., Effects and Mechanisms of Microbial Remediation of Heavy Metals in Soil : A Critical Review, *Applied Sciences* **8**, 1336, ISSN : 2076-3417, <http://www.mdpi.com/2076-3417/8/8/1336> (10 août 2018).
  38. WALL, D. H., NIELSEN, U. N. & SIX, J., Soil Biodiversity and Human Health, *Nature* **528**, 69-76, ISSN : 0028-0836, 1476-4687, <http://www.nature.com/articles/nature15744> (déc. 2015).
  39. KUMAR, A. & VERMA, J. P., Does Plant—Microbe Interaction Confer Stress Tolerance in Plants : A Review ?, *Microbiological Research* **207**, 41-52, ISSN : 09445013, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944501317307954> (mars 2018).
  40. LUGTENBERG, B. & KAMILOVA, F., Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria, *Annual Review of Microbiology* **63**, 541-556, ISSN : 0066-4227, 1545-3251, <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918> (1<sup>er</sup> oct. 2009).
  41. BASHIR, I. *et al.*, Phyllosphere Microbiome : Diversity and Functions, *Microbiological Research* **254**, 126888, ISSN : 09445013, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944501321001944> (jan. 2022).
  42. BEGUM, N. *et al.*, Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Plant Growth Regulation : Implications in Abiotic Stress Tolerance, *Frontiers in Plant Science* **10**, 1068, ISSN : 1664-462X, <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2019.01068/full> (19 sept. 2019).
  43. De la FUENTE CANTÓ, C. *et al.*, An Extended Root Phenotype : The Rhizosphere, Its Formation and Impacts on Plant Fitness, *The Plant Journal* **103**, 951-964, ISSN :

- 
- 0960-7412, 1365-313X, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tpj.14781> (août 2020).
44. Van der HEIJDEN, M. G. A. *et al.*, Mycorrhizal Fungal Diversity Determines Plant Biodiversity, Ecosystem Variability and Productivity, *Nature* **396**, 69-72, ISSN : 0028-0836, 1476-4687, <https://www.nature.com/articles/23932> (nov. 1998).
  45. NGAPO, T. M. *et al.*, Historical Indigenous Food Preparation Using Produce of the Three Sisters Intercropping System, *Foods* **10**, 524, ISSN : 2304-8158, <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/3/524> (3 mars 2021).
  46. BASHAN, Y., Inoculants of Plant Growth-Promoting Bacteria for Use in Agriculture, *Biotechnology Advances* **16**, 729-770, ISSN : 07349750, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975098000032> (juill. 1998).
  47. NOBBE, F. & HILTNER, L. *brev.* 570 (1896).
  48. XU, Z. *et al.*, Relating Bacterial Dynamics and Functions to Gaseous Emissions during Composting of Kitchen and Garden Wastes, *Science of The Total Environment* **767**, 144210, ISSN : 00489697, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004896972037741X> (mai 2021).
  49. BRUNT, A. & WALSH, J., "Broken" Tulips and Tulip Breaking Virus, *Microbiology Today* **32**, 68-70 (mai 2005).
  50. JAMBON, I., THIJS, S., WEYENS, N. & VANGRONSVELD, J., Harnessing Plant-Bacteria-Fungi Interactions to Improve Plant Growth and Degradation of Organic Pollutants, *Journal of Plant Interactions* **13**, 119-130, ISSN : 1742-9145, 1742-9153, <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17429145.2018.1441450> (jan. 2018).
  51. QUIZA, L., ST-ARNAUD, M. & YERGEAU, E., Harnessing Phytomicrobiome Signaling for Rhizosphere Microbiome Engineering, *Frontiers in Plant Science* **6**, ISSN : 1664-462X, <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2015.00507/abstract> (14 juill. 2015).
  52. FRENCH, E., KAPLAN, I., IYER-PASCUZZI, A., NAKATSU, C. H. & ENDERS, L., Emerging Strategies for Precision Microbiome Management in Diverse Agroecosystems, *Nature Plants* **7**, 256-267, ISSN : 2055-0278, <https://www.nature.com/articles/s41477-020-00830-9> (8 mars 2021).

- 
53. AGOUSSAR, A. & YERGEAU, E., Engineering the Plant Microbiota in the Context of the Theory of Ecological Communities, *Current Opinion in Biotechnology* **70**, 220-225, ISSN : 09581669, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166921000938> (août 2021).
  54. DINI-ANDREOTE, F. & RAAIJMAKERS, J. M., Embracing Community Ecology in Plant Microbiome Research, *Trends in Plant Science* **23**, 467-469, ISSN : 13601385, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138518300815> (juin 2018).
  55. CORREA-GARCIA, S., CONSTANT, P. & YERGEAU, E., The Forecasting Power of the Microbiome, *Trends in Microbiology*, S0966842X22003213, ISSN : 0966842X, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X22003213> (déc. 2022).
  56. BORDENSTEIN, S. R. & THEIS, K. R., Host Biology in Light of the Microbiome : Ten Principles of Holobionts and Hologenomes, *PLOS Biology* **13** (éd. WALDOR, M. K.) e1002226, ISSN : 1545-7885, <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.1002226> (18 août 2015).
  57. ROSENBERG, E. & ZILBER-ROSENBERG, I., The Hologenome Concept of Evolution after 10 Years, *Microbiome* **6**, 78, ISSN : 2049-2618, <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-018-0457-9> (déc. 2018).
  58. BAEDKE, J., FÁBREGAS-TEJEDA, A. & NIEVES DELGADO, A., The Holobiont Concept before Margulis, *Journal of Experimental Zoology Part B : Molecular and Developmental Evolution* **334**, 149-155, ISSN : 1552-5007, 1552-5015, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jez.b.22931> (mai 2020).
  59. ZILBER-ROSENBERG, I. & ROSENBERG, E., Role of Microorganisms in the Evolution of Animals and Plants : The Hologenome Theory of Evolution, *FEMS Microbiology Reviews* **32**, 723-735, ISSN : 1574-6976, <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x> (août 2008).
  60. DOUGLAS, A. E. & WERREN, J. H., Holes in the Hologenome : Why Host-Microbe Symbioses Are Not Holobionts, *mBio* **7**, e02099-15, /mbio/7/2/e02099-15.atom, ISSN : 2150-7511, <https://mbio.asm.org/content/7/2/e02099-15> (4 mai 2016).

- 
61. SIMON, J.-C., MARCHESI, J. R., MOUGEL, C. & SELOSSE, M.-A., Host-Microbiota Interactions : From Holobiont Theory to Analysis, *Microbiome* **7**, 5, ISSN : 2049-2618, <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-019-0619-4> (déc. 2019).
  62. NELSON, J. W. & BREAKER, R. R., The Lost Language of the RNA World, *Science Signaling* **10**, eaam8812, ISSN : 1945-0877, 1937-9145, <https://stke.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/scisignal.aam8812> (13 juin 2017).
  63. WASEEM, M., LIU, Y. & XIA, R., Long Non-Coding RNAs, the Dark Matter : An Emerging Regulatory Component in Plants, *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 86, ISSN : 1422-0067, <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/1/86> (23 déc. 2020).
  64. YE, C.-Y., CHEN, L., LIU, C., ZHU, Q.-H. & FAN, L., Widespread Noncoding Circular RNAs in Plants, *New Phytologist* **208**, 88-95, ISSN : 0028-646X, 1469-8137, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nph.13585> (oct. 2015).
  65. AXTELL, M. J., Classification and Comparison of Small RNAs from Plants, *Annual Review of Plant Biology* **64**, 137-159, ISSN : 1543-5008, 1545-2123, <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-arplant-050312-120043> (29 avr. 2013).
  66. BORGES, F. & MARTIENSSSEN, R. A., The Expanding World of Small RNAs in Plants, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **16**, 727-741, ISSN : 1471-0072, 1471-0080, <http://www.nature.com/articles/nrm4085> (déc. 2015).
  67. MENCIA, R., GONZALO, L., TOSSOLINI, I. & MANAVELLA, P. A., Keeping up with the miRNAs : Current Paradigms of the Biogenesis Pathway, *Journal of Experimental Botany* (éd. ORT, D.) erac322, ISSN : 0022-0957, 1460-2431, <https://academic.oup.com/jxb/advance-article/doi/10.1093/jxb/erac322/6663637> (12 août 2022).
  68. YU, Y., JIA, T. & CHEN, X., The ‘How’ and ‘Where’ of Plant microRNAs, *New Phytologist* **216**, 1002-1017, ISSN : 0028646X, <http://doi.wiley.com/10.1111/nph.14834> (déc. 2017).
  69. LIU, W.-w., MENG, J., CUI, J. & LUAN, Y.-s., Characterization and Function of MicroRNAs in Plants, *Frontiers in Plant Science* **8**, 2200, ISSN : 1664-462X,



- 
- <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.02200/full>  
(22 déc. 2017).
70. IKI, T., YOSHIKAWA, M., MESHI, T. & ISHIKAWA, M., Cyclophilin 40 Facilitates HSP90-mediated RISC Assembly in Plants : HSP90 Cochaperones in RISC Assembly, *The EMBO Journal* **31**, 267-278, ISSN : 02614189, <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/emboj.2011.395> (18 jan. 2012).
  71. CARRIER, M.-C., LALAOUNA, D. & MASSÉ, E., Broadening the Definition of Bacterial Small RNAs : Characteristics and Mechanisms of Action, *Annual Review of Microbiology* **72**, 141-161, ISSN : 0066-4227, 1545-3251, <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-micro-090817-062607> (8 sept. 2018).
  72. LAYTON, E., FAIRHURST, A.-M., GRIFFITHS-JONES, S., GRENCIS, R. K. & ROBERTS, I. S., Regulatory RNAs : A Universal Language for Inter-Domain Communication, *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 8919, ISSN : 1422-0067, <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/23/8919> (24 nov. 2020).
  73. HOLMQVIST, E. & WAGNER, E. G. H., Impact of Bacterial sRNAs in Stress Responses, *Biochemical Society Transactions* **45**, 1203-1212, ISSN : 0300-5127, 1470-8752, <https://portlandpress.com/biochemsoctrans/article/45/6/1203/66544/Impact-of-bacterial-sRNAs-in-stress-responses> (15 déc. 2017).
  74. WANG, M. *et al.*, Bidirectional Cross-Kingdom RNAi and Fungal Uptake of External RNAs Confer Plant Protection, *Nature Plants* **2**, 16151, ISSN : 2055-0278, <http://www.nature.com/articles/nplants2016151> (oct. 2016).
  75. WEIBERG, A. *et al.*, Fungal Small RNAs Suppress Plant Immunity by Hijacking Host RNA Interference Pathways, *Science* **342**, 118-123, ISSN : 0036-8075, 1095-9203, <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1239705> (4 oct. 2013).
  76. WONG-BAJRACHARYA, J. *et al.*, The Ectomycorrhizal Fungus *Pisolithus Microcarpus* Encodes a microRNA Involved in Cross-Kingdom Gene Silencing during Symbiosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **119**, e2103527119, ISSN : 0027-8424, 1091-6490, <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.2103527119> (18 jan. 2022).

- 
77. BOUTET, E., DJERROUD, S. & PERREAULT, J., Small RNAs beyond Model Organisms : Have We Only Scratched the Surface?, *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 4448, ISSN : 1422-0067, <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/8/4448> (18 avr. 2022).
78. KANG, S.-M., CHOI, J.-W., LEE, Y., HONG, S.-H. & LEE, H.-J., Identification of microRNA-Size, Small RNAs in Escherichia Coli, *Current Microbiology* **67**, 609-613, ISSN : 0343-8651, 1432-0991, <http://link.springer.com/10.1007/s00284-013-0411-9> (nov. 2013).
79. LEE, H.-J. & HONG, S.-H., Analysis of microRNA-size, Small RNAs in Streptococcus Mutans by Deep Sequencing, *FEMS Microbiology Letters* **326**, 131-136, ISSN : 03781097, <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2011.02441.x> (jan. 2012).
80. ZHAO, X., WANG, X., LI, F., DAHLGREN, R. A. & WANG, H., Identification of microRNA-size sRNAs Related to Salt Tolerance in Spirulina Platensis, *Plant Molecular Biology Reporter* **34**, 539-555, ISSN : 0735-9640, 1572-9818, <http://link.springer.com/10.1007/s11105-015-0938-y> (juin 2016).
81. ZHAO, C. *et al.*, Salmonella Small RNA Fragment Sal-1 Facilitates Bacterial Survival in Infected Cells via Suppressing iNOS Induction in a microRNA Manner, *Scientific Reports* **7**, 16979, ISSN : 2045-2322, <http://www.nature.com/articles/s41598-017-17205-4> (déc. 2017).
82. CHOI, J.-W., KIM, S.-C., HONG, S.-H. & LEE, H.-J., Secretable Small RNAs via Outer Membrane Vesicles in Periodontal Pathogens, *Journal of Dental Research* **96**, 458-466, ISSN : 0022-0345, 1544-0591, <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0022034516685071> (avr. 2017).
83. FAN, R. *et al.*, Porphyromonas Gingivalis Outer Membrane Vesicles Promote Apoptosis via msRNA-Regulated DNA Methylation in Periodontitis, *Microbiology Spectrum* **11** (éd. ATACK, J. M.) avec la coll. de LAM, L. N. K., e03288-22, ISSN : 2165-0497, <https://journals.asm.org/doi/10.1128/spectrum.03288-22> (14 fév. 2023).
84. SABERI, F., KAMALI, M., NAJAFI, A., YAZDANPARAST, A. & MOGHADDAM, M. M., Natural Antisense RNAs as mRNA Regulatory Elements in Bacteria : A Review on Function and Applications, *Cellular & Molecular Biology Letters* **21**, 6, ISSN : 1425-

- 
- 8153, 1689-1392, <http://cmbl.biomedcentral.com/articles/10.1186/s11658-016-0007-z> (déc. 2016).
85. REN, B., WANG, X., DUAN, J. & MA, J., Rhizobial tRNA-derived Small RNAs Are Signal Molecules Regulating Plant Nodulation, *Science* **365**, 919-922, ISSN : 0036-8075, 1095-9203, <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aav8907> (30 août 2019).
86. LEE, H.-C. *et al.*, Diverse Pathways Generate MicroRNA-like RNAs and Dicer-Independent Small Interfering RNAs in Fungi, *Molecular Cell* **38**, 803-814, ISSN : 10972765, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276510002820> (juin 2010).
87. ZHOU, J. *et al.*, Identification of microRNA-like RNAs in a Plant Pathogenic Fungus *Sclerotinia Sclerotiorum* by High-Throughput Sequencing, *Molecular Genetics and Genomics* **287**, 275-282, ISSN : 1617-4615, 1617-4623, <http://link.springer.com/10.1007/s00438-012-0678-8> (avr. 2012).
88. WANG, B. *et al.*, *Puccinia Striiformis* f. Sp. *Triticum* microRNA-like RNA 1 (*Pst*-milR1), an Important Pathogenicity Factor of *Pst*, Impairs Wheat Resistance to *Pst* by Suppressing the Wheat Pathogenesis-Related 2 Gene, *New Phytologist* **215**, 338-350, ISSN : 0028646X, <http://doi.wiley.com/10.1111/nph.14577> (juill. 2017).
89. JIN, Y. *et al.*, A Fungal milRNA Mediates Epigenetic Repression of a Virulence Gene in *Verticillium Dahliae*, *Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences* **374**, 20180309, ISSN : 0962-8436, 1471-2970, <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2018.0309> (4 mars 2019).
90. MATHUR, M., NAIR, A. & KADDOO, N., Plant-Pathogen Interactions : MicroRNA-mediated Trans-Kingdom Gene Regulation in Fungi and Their Host Plants, *Genomics* **112**, 3021-3035, ISSN : 08887543, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0888754319307980> (sept. 2020).
91. BABSKI, J. *et al.*, Small Regulatory RNAs in Archaea, *RNA Biology* **11**, 484-493, ISSN : 1547-6286, 1555-8584, <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/rna.28452> (mai 2014).

- 
92. DUNKER, F. *et al.*, Oomycete Small RNAs Bind to the Plant RNA-induced Silencing Complex for Virulence, *eLife* **9**, e56096, ISSN : 2050-084X, <https://elifesciences.org/articles/56096> (22 mai 2020).
93. GONZALEZ, E. *et al.*, Trees, Fungi and Bacteria : Tripartite Metatranscriptomics of a Root Microbiome Responding to Soil Contamination, *Microbiome* **6**, 53, ISSN : 2049-2618, <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-018-0432-5> (déc. 2018).
94. PANDE, P. M., AZARBAD, H., TREMBLAY, J., ST-ARNAUD, M. & YERGEAU, E., Metatranscriptomic Response of the Wheat Holobiont to Decreasing Soil Water Content, *ISME Communications* **3**, 30, ISSN : 2730-6151, <https://www.nature.com/articles/s43705-023-00235-7> (15 avr. 2023).
95. LEGÜE, M. & CALIXTO, A., RNA Language in Caenorhabditis Elegans and Bacteria Interspecies Communication and Memory, *Current Opinion in Systems Biology* **13**, 16-22, ISSN : 24523100, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452310018300660> (fév. 2019).
96. LEITÃO, A. L., COSTA, M. C., GABRIEL, A. F. & ENGUITA, F. J., Interspecies Communication in Holobionts by Non-Coding RNA Exchange, *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 2333, ISSN : 1422-0067, <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/7/2333> (27 mars 2020).
97. LAURESSERGUES, D. *et al.*, Primary Transcripts of microRNAs Encode Regulatory Peptides, *Nature* **520**, 90-93, ISSN : 0028-0836, 1476-4687, <http://www.nature.com/articles/nature14346> (2 avr. 2015).
98. LAURESSERGUES, D. *et al.*, Characterization of Plant microRNA-encoded Peptides (miPEPs) Reveals Molecular Mechanisms from the Translation to Activity and Specificity, *Cell Reports* **38**, 110339, ISSN : 22111247, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124722000559> (fév. 2022).
99. ZHANG, B., MicroRNA : A New Target for Improving Plant Tolerance to Abiotic Stress, *Journal of Experimental Botany* **66**, 1749-1761, ISSN : 1460-2431, 0022-0957, <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/erv013> (avr. 2015).

- 
100. ZHANG, T. *et al.*, Cotton Plants Export microRNAs to Inhibit Virulence Gene Expression in a Fungal Pathogen, *Nature Plants* **2**, 16153, ISSN : 2055-0278, <http://www.nature.com/articles/nplants2016153> (oct. 2016).
  101. SHARMA, A., BADOLA, P. K., BHATIA, C., SHARMA, D. & TRIVEDI, P. K., *miRNA-encoded Peptide, miPEP858, Regulates Plant Growth and Development in Arabidopsis* preprint (Plant Biology, 20 mai 2019), <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/642561>.
  102. COUZIGOU, J.-M. *et al.*, Positive Gene Regulation by a Natural Protective miRNA Enables Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis, *Cell Host & Microbe* **21**, 106-112, ISSN : 19313128, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312816304905> (jan. 2017).
  103. CAI, Q., HE, B., KOGEL, K.-H. & JIN, H., Cross-Kingdom RNA Trafficking and Environmental RNAi — Nature’s Blueprint for Modern Crop Protection Strategies, *Current Opinion in Microbiology* **46**, 58-64, ISSN : 13695274, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527418300043> (déc. 2018).
  104. GUALTIERI, C., LEONETTI, P. & MACOVEI, A., Plant miRNA Cross-Kingdom Transfer Targeting Parasitic and Mutualistic Organisms as a Tool to Advance Modern Agriculture, *Frontiers in Plant Science* **11**, 930, ISSN : 1664-462X, <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2020.00930/full> (23 juin 2020).
  105. WANI, S. H. *et al.*, miRNA Applications for Engineering Abiotic Stress Tolerance in Plants, *Biologia* **75**, 1063-1081, ISSN : 0006-3088, 1336-9563, <http://link.springer.com/10.2478/s11756-019-00397-7> (juill. 2020).
  106. GUPTA, O. P., SHARMA, P., GUPTA, R. K. & SHARMA, I., MicroRNA Mediated Regulation of Metal Toxicity in Plants : Present Status and Future Perspectives, *Plant Molecular Biology* **84**, 1-18, ISSN : 0167-4412, 1573-5028, <http://link.springer.com/10.1007/s11103-013-0120-6> (jan. 2014).
  107. MIDDLETON, H., YERGEAU, É., MONARD, C., COMBIER, J.-P. & EL AMRANI, A., Rhizospheric Plant–Microbe Interactions : miRNAs as a Key Mediator, *Trends in Plant Science* **26**, 132-141, ISSN : 13601385, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138520302727> (fév. 2021).

- 
108. QU, Q. *et al.*, Rhizosphere Microbiome Assembly and Its Impact on Plant Growth, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **68**, 5024-5038, ISSN : 0021-8561, 1520-5118, <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.0c00073> (6 mai 2020).
109. BRUNEL, C. *et al.*, Towards Unraveling Macroecological Patterns in Rhizosphere Microbiomes, *Trends in Plant Science* **25**, 1017-1029, ISSN : 13601385, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138520301485> (oct. 2020).
110. GUO, J. *et al.*, Seed-borne, Endospheric and Rhizospheric Core Microbiota as Predictors of Plant Functional Traits across Rice Cultivars Are Dominated by Deterministic Processes, *New Phytologist* **230**, 2047-2060, ISSN : 0028-646X, 1469-8137, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nph.17297> (juin 2021).
111. ROCHEFORT, A. *et al.*, Transmission of Seed and Soil Microbiota to Seedling, *mSystems* **6** (éd. FODOR, A.) e00446-21, ISSN : 2379-5077, <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mSystems.00446-21> (29 juin 2021).
112. SHAO, J. *et al.*, Rhizosphere Microbiome Assembly Involves Seed-Borne Bacteria in Compensatory Phosphate Solubilization, *Soil Biology and Biochemistry* **159**, 108273, ISSN : 00380717, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071721001462> (août 2021).
113. TIAN, T., REVERDY, A., SHE, Q., SUN, B. & CHAI, Y., The Role of Rhizodeposits in Shaping Rhizomicrobiome, *Environmental Microbiology Reports* **12**, 160-172, ISSN : 1758-2229, 1758-2229, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1758-2229.12816> (avr. 2020).
114. DRIOUICH, A., FOLLET-GUEYE, M.-L., VICRÉ-GIBOUIN, M. & HAWES, M., Root Border Cells and Secretions as Critical Elements in Plant Host Defense, *Current Opinion in Plant Biology* **16**, 489-495, ISSN : 13695266, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369526613000939> (août 2013).
115. HAWES, M. C., CURLANGO-RIVERA, G., XIONG, Z. & KESSLER, J. O., Roles of Root Border Cells in Plant Defense and Regulation of Rhizosphere Microbial Populations by Extracellular DNA 'Trapping', *Plant and Soil* **355**, 1-16, ISSN : 1573-5036, <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1218-3> (1<sup>er</sup> juin 2012).
116. BREAKFIELD, N. W. *et al.*, High-Resolution Experimental and Computational Profiling of Tissue-Specific Known and Novel miRNAs in Arabidopsis, *Genome Re-*

- 
- search* **22**, 163-176, ISSN : 1088-9051, <http://genome.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gr.123547.111> (1<sup>er</sup> jan. 2012).
117. DEANGELIS, K. M. *et al.*, Selective Progressive Response of Soil Microbial Community to Wild Oat Roots, *The ISME Journal* **3**, 168-178, ISSN : 1751-7362, 1751-7370, <http://www.nature.com/articles/ismej2008103> (fév. 2009).
118. CAI, Q. *et al.*, Plants Send Small RNAs in Extracellular Vesicles to Fungal Pathogen to Silence Virulence Genes, *Science* **360**, 1126-1129, ISSN : 0036-8075, 1095-9203, <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aar4142> (8 juin 2018).
119. LIU, S. *et al.*, The Host Shapes the Gut Microbiota via Fecal MicroRNA, *Cell Host & Microbe* **19**, 32-43, ISSN : 19313128, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312815004977> (jan. 2016).
120. TENG, Y. *et al.*, Plant-Derived Exosomal MicroRNAs Shape the Gut Microbiota, *Cell Host & Microbe* **24**, 637-652.e8, ISSN : 19313128, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312818305237> (nov. 2018).
121. RAMÍREZ-PUEBLA, S. T. *et al.*, Gut and Root Microbiota Commonalities, *Applied and Environmental Microbiology* **79**, 2-9, ISSN : 0099-2240, 1098-5336, <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.02553-12> (1<sup>er</sup> jan. 2013).
122. BOLGER, A. M., LOHSE, M. & USADEL, B., Trimmomatic : A Flexible Trimmer for Illumina Sequence Data, *Bioinformatics (Oxford, England)* **30**, 2114-2120, ISSN : 1367-4811, pmid : 24695404 (1<sup>er</sup> août 2014).
123. GRIFFITHS-JONES, S., GROCOCK, R. J., van DONGEN, S., BATEMAN, A. & ENRIGHT, A. J., miRBase : microRNA Sequences, Targets and Gene Nomenclature, *Nucleic Acids Research* **34**, D140-144, ISSN : 1362-4962, pmid : 16381832 (Database issue 1<sup>er</sup> jan. 2006).
124. LI, H. & DURBIN, R., Fast and Accurate Short Read Alignment with Burrows-Wheeler Transform, *Bioinformatics (Oxford, England)* **25**, 1754-1760, ISSN : 1367-4811, pmid : 19451168 (15 juill. 2009).
125. QUINLAN, A. R., BEDTools : The Swiss-Army Tool for Genome Feature Analysis, *Current Protocols in Bioinformatics* **47**, ISSN : 1934-3396, 1934-340X, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471250953.bi1112s47> (sept. 2014).

- 
126. LOVE, M. I., HUBER, W. & ANDERS, S., Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-seq Data with DESeq2, *Genome Biology* **15**, 550, ISSN : 1474-760X, <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-014-0550-8> (déc. 2014).
127. LEVY, A. *et al.*, Genomic Features of Bacterial Adaptation Topplants, *Nature Genetics* **50**, 138-150, ISSN : 1061-4036, 1546-1718, <https://www.nature.com/articles/s41588-017-0012-9> (jan. 2018).
128. SHAMANDI, N. *et al.*, Plants Encode a General siRNA Suppressor That Is Induced and Suppressed by Viruses, *PLOS Biology* **13** (éd. MARTIENSSEN, R. A.) e1002326, ISSN : 1545-7885, <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.1002326> (22 déc. 2015).
129. BOUTET, S. *et al.*, Arabidopsis HEN1, *Current Biology* **13**, 843-848, ISSN : 09609822, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982203002938> (mai 2003).
130. MOREL, J.-B. *et al.*, Fertile Hypomorphic ARGONAUTE ( *Ago1* ) Mutants Impaired in Post-Transcriptional Gene Silencing and Virus Resistance, *The Plant Cell* **14**, 629-639, ISSN : 1040-4651, 1532-298X, <http://www.plantcell.org/lookup/doi/10.1105/tpc.010358> (mars 2002).
131. XIE, Z., KASSCHAU, K. D. & CARRINGTON, J. C., Negative Feedback Regulation of Dicer-Like1 in Arabidopsis by microRNA-Guided mRNA Degradation, *Current Biology* **13**, 784-789, ISSN : 09609822, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982203002811> (avr. 2003).
132. LI, J., YANG, Z., YU, B., LIU, J. & CHEN, X., Methylation Protects miRNAs and siRNAs from a 3'-End Uridylation Activity in Arabidopsis, *Current Biology* **15**, 1501-1507, ISSN : 09609822, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982205007736> (août 2005).
133. ALMARIO, J. *et al.*, Root-Associated Fungal Microbiota of Nonmycorrhizal *Arabidopsis* and Its Contribution to Plant Phosphorus Nutrition, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, E9403-E9412, ISSN : 0027-8424, 1091-6490, <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1710455114> (31 oct. 2017).



- 
134. TREMBLAY, J. & YERGEAU, E., Systematic Processing of Ribosomal RNA Gene Amplicon Sequencing Data, *GigaScience* **8**, giz146, ISSN : 2047-217X, <https://academic.oup.com/gigascience/article/doi/10.1093/gigascience/giz146/5670612> (1<sup>er</sup> déc. 2019).
135. CALLAHAN, B. J. *et al.*, DADA2 : High-resolution Sample Inference from Illumina Amplicon Data, *Nature Methods* **13**, 581-583, ISSN : 1548-7105, pmid : 27214047 (juill. 2016).
136. ROGNES, T., FLOURI, T., NICHOLS, B., QUINCE, C. & MAHÉ, F., VSEARCH : A Versatile Open Source Tool for Metagenomics, *PeerJ* **4**, e2584, ISSN : 2167-8359, pmid : 27781170 (2016).
137. QUAST, C. *et al.*, The SILVA Ribosomal RNA Gene Database Project : Improved Data Processing and Web-Based Tools, *Nucleic Acids Research* **41**, D590-596, ISSN : 1362-4962, pmid : 23193283 (Database issue jan. 2013).
138. MCMURDIE, P. J. & HOLMES, S., Phyloseq : An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data, *PLoS ONE* **8** (éd. WATSON, M.) e61217, ISSN : 1932-6203, <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0061217> (22 avr. 2013).
139. PENNO, C., TREMBLAY, J., O'CONNELL MOTHERWAY, M., DABURON, V. & EL AMRANI, A., in *Methods in Molecular Biology* (Humana New York, NY, USA, 2023).
140. DAI, X. & ZHAO, P. X., psRNATarget : A Plant Small RNA Target Analysis Server, *Nucleic Acids Research* **39**, W155-159, ISSN : 1362-4962, pmid : 21622958 (Web Server issue juill. 2011).
141. DAI, X., ZHUANG, Z. & ZHAO, P. X., psRNATarget : A Plant Small RNA Target Analysis Server (2017 Release), *Nucleic Acids Research* **46**, W49-W54, ISSN : 0305-1048, 1362-4962, <https://academic.oup.com/nar/article/46/W1/W49/4990032> (2 juill. 2018).
142. FAHLGREN, N. & CARRINGTON, J. C., miRNA Target Prediction in Plants, *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* **592**, 51-57, ISSN : 1940-6029, pmid : 19802588 (2010).

- 
143. PEARSON, W. R., Finding Protein and Nucleotide Similarities with FASTA, *Current Protocols in Bioinformatics* **53**, ISSN : 1934-3396, 1934-340X, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471250953.bi0309s53> (mars 2016).
144. JONES, P. *et al.*, InterProScan 5 : Genome-Scale Protein Function Classification, *Bioinformatics* **30**, 1236-1240, ISSN : 1367-4811, 1367-4803, <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/30/9/1236/237988> (1<sup>er</sup> mai 2014).
145. THE GALAXY COMMUNITY *et al.*, The Galaxy Platform for Accessible, Reproducible and Collaborative Biomedical Analyses : 2022 Update, *Nucleic Acids Research* **50**, W345-W351, ISSN : 0305-1048, 1362-4962, <https://academic.oup.com/nar/article/50/W1/W345/6572001> (5 juill. 2022).
146. MANJANG, K., TRIPATHI, S., YLI-HARJA, O., DEHMER, M. & EMMERT-STREIB, F., Graph-Based Exploitation of Gene Ontology Using GOxploreR for Scrutinizing Biological Significance, *Scientific Reports* **10**, 16672, ISSN : 2045-2322, <https://www.nature.com/articles/s41598-020-73326-3> (7 oct. 2020).
147. TREMBLAY, J., SCHREIBER, L. & GREER, C. W., High-Resolution Shotgun Metagenomics : The More Data, the Better?, *Briefings in Bioinformatics* **23**, bbac443, ISSN : 1477-4054, <https://doi.org/10.1093/bib/bbac443> (1<sup>er</sup> nov. 2022).
148. HAN, J.-I. *et al.*, Genome of the Root-Associated Plant Growth-Promoting Bacterium *Variovorax paradoxus* Strain EPS, *Genome Announcements* **1**, e00843-13, ISSN : 2169-8287, <https://journals.asm.org/doi/10.1128/genomeA.00843-13> (31 oct. 2013).
149. AGOUSSAR, A., AZARBAD, H., TREMBLAY, J. & YERGEAU, É., The Resistance of the Wheat Microbial Community to Water Stress Is More Influenced by Plant Compartment than Reduced Water Availability, *FEMS Microbiology Ecology* **97**, fiab149, ISSN : 1574-6941, <https://academic.oup.com/femsec/article/doi/10.1093/femsec/fiab149/6427345> (4 déc. 2021).
150. FINKEL, O. M. *et al.*, A Single Bacterial Genus Maintains Root Growth in a Complex Microbiome, *Nature* **587**, 103-108, ISSN : 0028-0836, 1476-4687, <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2778-7> (5 nov. 2020).
151. SONG, X., LI, Y., CAO, X. & QI, Y., MicroRNAs and Their Regulatory Roles in Plant–Environment Interactions, *Annual Review of Plant Biology* **70**, 489-525,

- 
- ISSN : 1543-5008, 1545-2123, <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-arplant-050718-100334> (29 avr. 2019).
152. MILLAR, A. A., LOHE, A. & WONG, G., Biology and Function of miR159 in Plants, *Plants* **8**, 255, ISSN : 2223-7747, <https://www.mdpi.com/2223-7747/8/8/255> (30 juill. 2019).
153. WANG, M., WEIBERG, A., DELLOTA, E., YAMANE, D. & JIN, H., Botrytis Small RNA *Bc* -siR37 Suppresses Plant Defense Genes by Cross-Kingdom RNAi, *RNA Biology* **14**, 421-428, ISSN : 1547-6286, 1555-8584, <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15476286.2017.1291112> (3 avr. 2017).
154. ELLISON, C. K. *et al.*, Retraction of DNA-bound Type IV Competence Pili Initiates DNA Uptake during Natural Transformation in *Vibrio Cholerae*, *Nature Microbiology* **3**, 773-780, ISSN : 2058-5276, <http://www.nature.com/articles/s41564-018-0174-y> (juill. 2018).
155. CHOI, J.-W., UM, J.-H., CHO, J.-H. & LEE, H.-J., Tiny RNAs and Their Voyage via Extracellular Vesicles : Secretion of Bacterial Small RNA and Eukaryotic microRNA, *Experimental Biology and Medicine* **242**, 1475-1481, ISSN : 1535-3702, 1535-3699, <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1535370217723166> (sept. 2017).
156. SOLER, N. & FORTERRE, P., Vesiduction : The Fourth Way of HGT, *Environmental Microbiology* **22**, 2457-2460, ISSN : 1462-2912, 1462-2920, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1462-2920.15056> (juill. 2020).
157. YU, B. *et al.*, siRNAs Compete with miRNAs for Methylation by HEN1 in Arabidopsis, *Nucleic Acids Research* **38**, 5844-5850, ISSN : 1362-4962, 0305-1048, <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkq348> (sept. 2010).
158. ZHAI, J. *et al.*, Plant MicroRNAs Display Differential 3' Truncation and Tailing Modifications That Are ARGONAUTE1 Dependent and Conserved Across Species, *The Plant Cell* **25**, 2417-2428, ISSN : 1040-4651, 1532-298X, <http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.113.114603> (1<sup>er</sup> juill. 2013).
159. SÁNCHEZ-CAÑIZARES, C., JORRÍN, B., POOLE, P. S. & TKACZ, A., Understanding the Holobiont : The Interdependence of Plants and Their Microbiome, *Current*

- 
- Opinion in Microbiology* **38**, 188-196, ISSN : 13695274, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527417300425> (août 2017).
160. MÜLLER, P., GIMPEL, M., WILDENHAIN, T. & BRANTL, S., A New Role for CsrA : Promotion of Complex Formation between an sRNA and Its mRNA Target in *Bacillus Subtilis*, *RNA Biology* **16**, 972-987, ISSN : 1547-6286, 1555-8584, <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15476286.2019.1605811> (3 juill. 2019).
161. NIELSEN, J. S. *et al.*, Defining a Role for Hfq in Gram-positive Bacteria : Evidence for Hfq-dependent Antisense Regulation in *Listeria Monocytogenes*, *Nucleic Acids Research* **38**, 907-919, ISSN : 0305-1048, 1362-4962, <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkp1081> (jan. 2010).
162. CLAVERYS, J.-P., MARTIN, B. & POLARD, P., The Genetic Transformation Machinery : Composition, Localization, and Mechanism, *FEMS Microbiology Reviews* **33**, 643-656, ISSN : 1574-6976, <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2009.00164.x> (mai 2009).
163. MANAVELLA, P. A., KOENIG, D. & WEIGEL, D., Plant Secondary siRNA Production Determined by microRNA-duplex Structure, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 2461-2466, ISSN : 0027-8424, 1091-6490, <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1200169109> (14 fév. 2012).
164. BETTI, F. *et al.*, Exogenous miRNAs Induce Post-Transcriptional Gene Silencing in Plants, *Nature Plants* **7**, 1379-1388, ISSN : 2055-0278, <https://www.nature.com/articles/s41477-021-01005-w> (oct. 2021).
165. MIDDLETON, H. *et al.*, *Plants Release miRNAs in the Rhizosphere, Targeting Microbial Genes* preprint (Plant Biology, 28 juill. 2022), <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2022.07.26.501597>.
166. COUZIGOU, J.-M., LAURESSERGUES, D., BÉCARD, G. & COMBIER, J.-P., miRNA-encoded Peptides (miPEPs) : A New Tool to Analyze the Roles of miRNAs in Plant Biology, *RNA Biology* **12**, 1178-1180, ISSN : 1547-6286, 1555-8584, <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15476286.2015.1094601> (2 nov. 2015).

- 
167. LAURESSERGUES, D. *et al.*, Primary Transcripts of microRNAs Encode Regulatory Peptides, *Nature* **520**, 90-93, ISSN : 0028-0836, 1476-4687, <http://www.nature.com/articles/nature14346> (avr. 2015).
168. TANG, J. & CHU, C., MicroRNAs in Crop Improvement : Fine-Tuners for Complex Traits, *Nature Plants* **3**, 17077, ISSN : 2055-0278, <https://www.nature.com/articles/nplants201777> (30 juin 2017).
169. GRIFFITHS, R. I., WHITELEY, A. S., O'DONNELL, A. G. & BAILEY, M. J., Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA- and rRNA-Based Microbial Community Composition, *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 5488-5491, ISSN : 0099-2240, 1098-5336, <https://AEM.asm.org/content/66/12/5488> (1<sup>er</sup> déc. 2000).
170. STEPHENS, M., False Discovery Rates : A New Deal, *Biostatistics*, kxw041, ISSN : 1465-4644, 1468-4357, <https://academic.oup.com/biostatistics/article-lookup/doi/10.1093/biostatistics/kxw041> (17 oct. 2016).
171. PFAFFL, M. W., A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR, *Nucleic Acids Research* **29**, 45e-45, ISSN : 13624962, <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/29.9.e45> (1<sup>er</sup> mai 2001).
172. VANDESOMPELE, J., PRETER, K. D., ROY, N. V. & PAEPE, A. D., Accurate Normalization of Real-Time Quantitative RT-PCR Data by Geometric Averaging of Multiple Internal Control Genes, *Genome Biology* **3** (18 juin 2002).
173. LIU, S. *et al.*, Oral Administration of miR-30d from Feces of MS Patients Suppresses MS-like Symptoms in Mice by Expanding Akkermansia Muciniphila, *Cell Host & Microbe* **26**, 779-794.e8, ISSN : 19313128, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312819305323> (déc. 2019).
174. KÄMPFER, P. *et al.*, Pseudolabrys Taiwanensis Gen. Nov., Sp. Nov., an Alphaproteobacterium Isolated from Soil, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**, 2469-2472, ISSN : 1466-5026, 1466-5034, <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.64124-0> (1<sup>er</sup> oct. 2006).

- 
175. EO, J. & PARK, K.-C., Long-Term Effects of Imbalanced Fertilization on the Composition and Diversity of Soil Bacterial Community, *Agriculture, Ecosystems & Environment* **231**, 176-182, ISSN : 01678809, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016788091630353X> (sept. 2016).
176. JIA, W., YANG, Y., YANG, L. & GAO, Y., High-Efficient Nitrogen Removal and Its Microbiological Mechanism of a Novel Carbon Self-Sufficient Constructed Wetland, *Science of The Total Environment* **775**, 145901, ISSN : 00489697, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969721009682> (juin 2021).
177. MENON, R. R., KUMARI, S., VIVER, T. & RAMESHKUMAR, N., Flavobacterium Pokkali Sp. Nov., a Novel Plant Growth Promoting Native Rhizobacteria Isolated from Pokkali Rice Grown in Coastal Saline Affected Agricultural Regions of Southern India, Kerala, *Microbiological Research* **240**, 126533, ISSN : 09445013, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944501320304018> (nov. 2020).
178. CHEN, H., YOUNG, S., BERHANE, T.-K. & WILLIAMS, H. N., Predatory Bacteriovorax Communities Ordered by Various Prey Species, *PLoS ONE* **7** (éd. BERTILSSON, S.) e34174, ISSN : 1932-6203, <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0034174> (26 mars 2012).
179. HOSSAIN, M. M., SULTANA, F. & HYAKUMACHI, M., Role of Ethylene Signalling in Growth and Systemic Resistance Induction by the Plant Growth-Promoting Fungus *Penicillium Viridicatum* in Arabidopsis, *Journal of Phytopathology* **165**, 432-441, ISSN : 09311785, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jph.12577> (août 2017).
180. NAZNIN, H. A. *et al.*, Systemic Resistance Induced by Volatile Organic Compounds Emitted by Plant Growth-Promoting Fungi in Arabidopsis Thaliana, *PLoS ONE* **9** (éd. YANG, C.-H.) e86882, ISSN : 1932-6203, <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0086882> (27 jan. 2014).
181. YADAV, A., SANYAL, I., RAI, S. P. & LATA, C., An Overview on miRNA-encoded Peptides in Plant Biology Research, *Genomics* **113**, 2385-2391, ISSN : 08887543, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0888754321001865> (juill. 2021).

- 
182. COUZIGOU, J.-M., ANDRÉ, O., GUILLOTIN, B., ALEXANDRE, M. & COMBIER, J.-P., Use of Micro RNA -encoded Peptide Mi PEP 172c to Stimulate Nodulation in Soybean, *New Phytologist* **211**, 379-381, ISSN : 0028-646X, 1469-8137, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/nph.13991> (juill. 2016).
183. DEVEAU, A. *et al.*, Bacterial–Fungal Interactions : Ecology, Mechanisms and Challenges, *FEMS Microbiology Reviews* **42**, 335-352, ISSN : 1574-6976, <https://academic.oup.com/femsre/article/42/3/335/4875924> (1<sup>er</sup> mai 2018).
184. ALLEN, R. S. *et al.*, MicroR159 Regulation of Most Conserved Targets in Arabidopsis Has Negligible Phenotypic Effects, *Silence* **1**, 18, ISSN : 1758-907X, <http://silencejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1758-907X-1-18> (2010).
185. KOEPPEN, K. *et al.*, A Novel Mechanism of Host-Pathogen Interaction through sRNA in Bacterial Outer Membrane Vesicles, *PLOS Pathogens* **12** (éd. WHITELEY, M.) e1005672, ISSN : 1553-7374, <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1005672> (13 juin 2016).
186. SHAHID, S. *et al.*, MicroRNAs from the Parasitic Plant *Cuscuta Campestris* Target Host Messenger RNAs, *Nature* **553**, 82-85, ISSN : 0028-0836, 1476-4687, <http://www.nature.com/articles/nature25027> (jan. 2018).
187. MU, J. *et al.*, Interspecies Communication between Plant and Mouse Gut Host Cells through Edible Plant Derived Exosome-like Nanoparticles, *Molecular Nutrition & Food Research* **58**, 1561-1573, ISSN : 1613-4125, 1613-4133, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mnfr.201300729> (juill. 2014).
188. IWAKAWA, H.-o. & TOMARI, Y., Molecular Insights into microRNA-Mediated Translational Repression in Plants, *Molecular Cell* **52**, 591-601, ISSN : 10972765, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276513007995> (nov. 2013).
189. KOZOMARA, A., BIRGAOANU, M. & GRIFFITHS-JONES, S., miRBase : From microRNA Sequences to Function, *Nucleic Acids Research* **47**, D155-D162, ISSN : 0305-1048, 1362-4962, <https://academic.oup.com/nar/article/47/D1/D155/5179337> (8 jan. 2019).
190. MCGEARY, S. E. *et al.*, The Biochemical Basis of microRNA Targeting Efficacy, *Science* **366**, eaav1741, ISSN : 0036-8075, 1095-9203, <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aav1741> (20 déc. 2019).

- 
191. YAMASAKI, T. *et al.*, Complementarity to an miRNA Seed Region Is Sufficient to Induce Moderate Repression of a Target Transcript in the Unicellular Green Alga *Chlamydomonas Reinhardtii*, *The Plant Journal* **76**, 1045-1056, ISSN : 09607412, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tpj.12354> (déc. 2013).
192. LIU, Q., WANG, F. & AXTELL, M. J., Analysis of Complementarity Requirements for Plant MicroRNA Targeting Using a *Nicotiana Benthiana* Quantitative Transient Assay, *The Plant Cell* **26**, 741-753, ISSN : 1532-298X, 1040-4651, <https://academic.oup.com/plcell/article/26/2/741/6097966> (26 mars 2014).
193. ENRIGHT, A. J. *et al.*, MicroRNA Targets in Drosophila, *Genome Biology* (2003).
194. WANG, X.-J., REYES, J. L., CHUA, N.-H. & GAASTERLAND, T., Prediction and Identification of Arabidopsis Thaliana microRNAs and Their mRNA Targets, *Genome Biology* (2004).
195. ALLEN, E., XIE, Z., GUSTAFSON, A. M. & CARRINGTON, J. C., microRNA-Directed Phasing during Trans-Acting siRNA Biogenesis in Plants, *Cell* **121**, 207-221, ISSN : 00928674, <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867405003454> (avr. 2005).
196. SRIVASTAVA, P. K., MOTURU, T., PANDEY, P., BALDWIN, I. T. & PANDEY, S. P., A Comparison of Performance of Plant miRNA Target Prediction Tools and the Characterization of Features for Genome-Wide Target Prediction, *BMC Genomics* **15**, 348, ISSN : 1471-2164, <http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-15-348> (2014).
197. LAURESSERGUES, D. *et al.*, The microRNA miR171h Modulates Arbuscular Mycorrhizal Colonization of Medicago Truncatula by Targeting NSP2, *The Plant Journal* **72**, 512-522, ISSN : 1365-313X, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-313X.2012.05099.x> (2012).
198. FERREIRA, S. S. & REIS, R. S., Using CRISPR/Cas to Enhance Gene Expression for Crop Trait Improvement by Editing miRNA Targets, *Journal of Experimental Botany* **74** (éd. MANAVELLA, P.) 2208-2212, ISSN : 0022-0957, 1460-2431, <https://academic.oup.com/jxb/article/74/7/2208/6982856> (9 avr. 2023).
199. ORMANCEY, M. *et al.*, Internalization of miPEP165a into Arabidopsis Roots Depends on Both Passive Diffusion and Endocytosis-Associated Processes, *Interna-*



- 
- tional Journal of Molecular Sciences* **21**, 2266, ISSN : 1422-0067, <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/7/2266> (25 mars 2020).
200. ASHRAF, M. A. *et al.*, In Silico Identification of Sugarcane (*Saccharum Officinarum* L.) Genome Encoded microRNAs Targeting Sugarcane Bacilliform Virus, *PLOS ONE* **17** (éd. RAMESH, S. V.) e0261807, ISSN : 1932-6203, <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0261807> (20 jan. 2022).
201. ASHRAF, M. A., ALI, B., BROWN, J. K., SHAHID, I. & YU, N., In Silico Identification of Cassava Genome-Encoded MicroRNAs with Predicted Potential for Targeting the ICMV-Kerala Begomoviral Pathogen of Cassava, *Viruses* **15**, 486, ISSN : 1999-4915, <https://www.mdpi.com/1999-4915/15/2/486> (9 fév. 2023).
202. *Moving Forward on Food Loss and Waste Reduction* (éd. FAO) *The State of Food and Agriculture* **2019**, 156 p., ISBN : 978-92-5-131789-1 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2019).
203. DELGADO-BAQUERIZO, M. *et al.*, A Global Atlas of the Dominant Bacteria Found in Soil, *Science* **359**, 320-325, ISSN : 0036-8075, 1095-9203, <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aap9516> (19 jan. 2018).
204. EVENSON, R. E. & GOLLIN, D., Assessing the Impact of the Green Revolution, 1960 to 2000, *Science* **300**, 758-762, ISSN : 0036-8075, 1095-9203, <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1078710> (2 mai 2003).
205. PINGALI, P. L., Green Revolution : Impacts, Limits, and the Path Ahead, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 12302-12308, ISSN : 0027-8424, 1091-6490, <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0912953109> (31 juill. 2012).
206. ZABEL, F. *et al.*, Global Impacts of Future Cropland Expansion and Intensification on Agricultural Markets and Biodiversity, *Nature Communications* **10**, 2844, ISSN : 2041-1723, <https://www.nature.com/articles/s41467-019-10775-z> (28 juin 2019).
207. DOSS, C. R., Twenty-Five Years of Research on Women Farmers in Africa : Lessons and Implications for Agricultural Research Institutions.
208. *Women in Agriculture : Closing the Gender Gap for Development* (éd. FAO) *The State of Food and Agriculture* **2010/11**, 147 p., ISBN : 978-92-5-106768-0 (FAO, Rome, 2011).

# TABLE DES FIGURES

---

1	Sélection d'une diversité de protistes. . . . .	14
2	Transmission verticale et horizontale du microbiote des plantes. . . . .	19
3	Sphères microbiennes dans les compartiments de la plante. . . . .	20
4	Représentation des différents compartiments autour des racines, notamment le rhizoplan, la rhizosphère et l'endosphère. . . . .	22
5	Diversité des molécules signal utilisées dans les interactions plante-microorganismes, mais également microorganisme-microorganisme, dans la rhizosphère. . . . .	25
6	Réaction immunitaire des légumineuses en réponse aux Rhizobia. . . . .	27
7	Cycle de l'azote dans le sol, associé aux microorganismes et aux plantes . . . . .	29
8	Phénotype étendu des racines. . . . .	35
9	Ingénierie du microbiote basée sur la plante, le microbiote ou l'holobionte. . . . .	39
10	Classification des petits ARNs non-codants chez les plantes. . . . .	43
11	Biosynthèse des miARNs de plantes . . . . .	45
12	Ressemblance des miARNs eucaryotes et des msARNs bactériens. . . . .	52
13	Biosynthèse des miPEPs. . . . .	54
1.1	Identification of miRNAs in the rhizosphere and rhizobacteria. . . . .	83
1.2	PCoA microbial communities of mutants. . . . .	86
1.3	Alpha-diversity of microbial communities in mutants' roots and rhizosphere. . . . .	87
1.4	Differentially expressed genes in Variovorax, a volcano plot. . . . .	90
1.5	Number of differentially expressed genes that were predicted to be targets. . . . .	91
1.6	Common Clusters of Orthologous Genes (COGs) with differentially expressed genes . . . . .	92
1.7	Rarefaction curves of bacterial and archeal reads (16S) and fungal reads (ITS). . . . .	98
1.8	Abundance of miRNAs across samples. . . . .	99
1.9	Taxonomic profiles of bacterial and fungal communities of mutants. . . . .	100
1.10	Gene ontology of predicted rhizospheric miRNA targets in bacterial genomes. . . . .	103
1.11	Comparison of predicted targets between ARA and NPA bacterial genomes. . . . .	104
1.12	Differentially expressed genes in Bacillus mycoides. . . . .	105

---

1.13	Differentially expressed genes in <i>Bacillus mycoides</i> . . . . .	106
1.14	Number of sequences obtained in the rhizosphere and isolated bacteria. . .	107
1.15	Number of sequences targeted by rhizospheric miRNAs in bacterial genomes.	108
1.16	Differentially expressed genes in <i>Variovorax</i> after 20 min incubation. . . . .	109
1.17	Differentially expressed genes in <i>Variovorax</i> after 120 min incubation. . . .	110
1.18	Definition of genomic regions investigated for miRNA targeting. . . . .	111
1.19	Synthetic miRNA and scrambled miRNA sequences. . . . .	112
2.1	PCoA of microbial communities in roots and rhizosphere. . . . .	124
2.2	Profiles of bacterial and fungal phyla. . . . .	125
2.3	Profiles of bacterial and fungal genera. . . . .	126
2.4	Alpha-diversity of microbial communities in roots and rhizosphere. . . . .	127
2.5	Bacterial ASVs enriched or depleted in the roots and rhizosphere. . . . .	129
2.6	Fungal ASVs enriched or depleted in the roots and rhizosphere. . . . .	129
2.7	Quantification of gene expression of genes, targeted by miR159c. . . . .	131
2.8	Rarefaction curves of bacterial 16S rRNA sequencing. . . . .	135
2.9	Rarefaction curves of fungal ITS sequencing. . . . .	136
2.10	PCoA of unplanted soil microbial communities. . . . .	137
2.11	Number of ITS and 16S copies quantified by qPCR. . . . .	137
2.12	Predicted targets in <i>Variovorax</i> genome of miR159c. . . . .	138
2.13	Primer sequences used for gene expression quantification. . . . .	138
3.1	Schéma de l'hypothèse générale. . . . .	140
3.2	Schéma des tissus racinaires. . . . .	142
3.3	Synthèse des échanges de petits ARNs inter-espèces. . . . .	145
3.4	Echanges moléculaires entre la plante et les microorganismes du sol. . . . .	152







**Titre :** Implication des miARNs dans la communication plante-microbiote rhizosphérique

**Mot clés :** microARN ; plant-microorganisme ; rhizosphère ; miPEP

**Résumé :** Ici, grâce au séquençage petits ARNs, nous avons découvert la présence de miARNs dans la rhizosphère d'*Arabidopsis thaliana* et *Brachypodium distachyon*. A travers le séquençage 16S/ITS des communautés microbiennes des racines et de la rhizosphère de plantes mutantes, affectées dans la biosynthèse des petits ARNs, nous avons observé le rôle structurant de ces derniers sur le microbiote. Nous avons d'ailleurs confirmé ce rôle en utilisant une approche plus fine, à base de miRNA-encodés peptides (miPEPs), qui permettent d'augmenter la production spécifique d'un miARN *in planta*. Cette méthodologie a démontré l'impact que peut avoir un unique miARN rhizosphérique sur la composition du microbiote. Afin d'évaluer le mé-

canisme moléculaire derrière ce shift taxonomique, nous avons mis au point un outil de prédiction des cibles de miARNs de plantes dans des génomes bactériens. La confirmation biologique de certains gènes cibles a été faite, d'abord en explorant le transcriptome, en confrontant une culture bactérienne à un mélange de miARNs synthétiques, imitant ceux de la rhizosphère ; puis, de façon plus fine, en appliquant le miPEP159c sur des plantules d'*A. thaliana*, parallèlement inoculées avec *Variovorax paradoxus* EPS et en quantifiant les gènes cibles par qPCR. L'ensemble de ces résultats démontre que les miARNs de plantes retrouvés dans la rhizosphère ont un rôle de modulation de la composition et de l'activité du microbiote racinaire et rhizosphérique.

**Title:** Involvement of miRNAs in plant-rhizosphere microbiota communication

**Keywords:** microRNA; plant-microbe; rhizosphere; miPEP

**Abstract:** Here, thanks to small RNA sequencing, we have discovered the presence of miRNAs in the rhizosphere of *Arabidopsis thaliana* and *Brachypodium distachyon*. Through 16S/ITS sequencing of root and rhizosphere microbial communities of mutant plants, affected in the biosynthesis of small RNAs, we have observed the structuring role of the latter on the microbiota. We also confirmed this role using a more refined approach based on miRNA-encodés peptides (miPEPs), which make it possible to increase the specific production of a miRNA *in planta*. This methodology demonstrated the impact that a single rhizospheric miRNA can have on the composition of the microbiota. In or-

der to assess the molecular mechanism behind this taxonomic shift, we developed a tool for predicting the targets of plant miRNAs in bacterial genomes. Biological confirmation of some target genes was done, first by exploring the transcriptome, by confronting a bacterial culture with a mixture of synthetic miRNAs, mimicking those of the rhizosphere; then, in a more refined way, by applying miPEP159c on *A. thaliana* seedlings, in parallel inoculated with *Variovorax paradoxus* EPS and by quantifying the target genes by qPCR. All these results demonstrate that plant miRNAs found in the rhizosphere have a role in modulating the composition and activity of the root and rhizosphere microbiota.