



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE

2011-2012

MASTER FAGE
Biologie et Ecologie pour la Forêt,
l'Agronomie et l'Environnement

Spécialité
BIPE

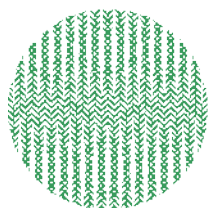
Rôles d'effecteurs symbiotiques de
Laccaria bicolor

Théophile Kazmierczak

Mémoire de stage, soutenu à Nancy le 05/09/2012

Encadré par : Claire Veneault-Fourrey

Laboratoire des interactions arbres-microorganismes (IAM)
Equipe « Ecogénomique des interactions » INRA Champenoux



INRA

Institut National de la Recherche Agronomique

Remerciements

Merci à Claire Veneault-Fourrey pour m'avoir encadré et formé pendant toute la durée de ce stage. Et surtout pour être allé plus loin que son rôle d'encadrant en m'aidant à orienter la suite de mon projet.

Je tenais également à remercier Yohann Daguerre pour sa disponibilité et les discussions que nous avons pu avoir sur le sujet.

Et bien sur tous les membres de l'équipe «écogénomique des interactions» qui ont tous participé à terminer ma formation scientifique.

Liste des abbreviations:

MiSSP : Mycorhizal Induced Small Secreted Protein

ADNc : ADN complémentaires

SP : Peptide signal, séquence de la protéine dans sa partie Nterminale qui va induire la sécrétion de cette dernière. Le peptide signal est ensuite clivé.

PAL: Phénylalanine Amonia Lyase

Ralf: Rapid Alkalinization factor

aa : Acides aminés

MAP Kinase : Mitogen Activated Protein kinase, protéines responsable de la transduction d'un signal cellulaire

PIP : Phosphatidylinositol X-phosphate, constituant des membranes cellulaire

2IP : N6(2-isoentenyl-adenine)

TDZ : Thidiazuron

Liste des figures:

Figure 1: Résumé des trois niveaux de contrôle de la symbiose ectomycorhizienne

Figure 2: Résumé des constructions réalisées pour l'expression transitoire *in planta* et le test d'interactions protéiques *in vivo*

Figure 3: Principe du DivIVA pour l'étude des interactants protéiques

Figure 4: Expression transitoire *in planta* de MiSSP13 et MiSSP22

Figure 5 : Localisation subcellulaire de SP+MiSSP8 :GFP

Figure 6 : Colocalisation de SP+MiSSP17 :GFP avec un marqueur mCherry possédant un motif d'adressage au reticulum endoplasmique

Figure 7 : Pourcentage de fixation de MiSSP8 :GFP et de la Green Fluorescent Protein sur différents substrats polyssacharidiques

Tableau 1 : Gènes d'intérêts identifiés par double hybride comme interactants potentiels de MiSSP8

Tableau 2 : Pourcentage de bactéries présentant une interaction positive *in vivo*

Tableau 3 : Données récapitulatives des expériences de transformations de peupliers

Sommaire

Introduction	1
Matériel et méthode	5
Matériel biologique	5
Constructions génétiques	5
Expression des effecteurs <i>in planta</i>	6
Western Blot	8
Validation des interactants de MiSSP8	8
Résultats	12
Localisation subcellulaire de MiSSP8, MiSSP13, MiSSP17 et MiSSP22	12
MiSSP8, effecteur apoplastique interagit avec des protéines végétales	15
MiSSP8 se fixe sur la cellulose	16
Expression <i>in planta</i> de MiSSP8 et MiSSP17	17
Discussion	19
MiSSP13 et MiSSP22 sont ils des effecteurs	19
MiSSP17, un effecteur cytoplasmique	20
MiSSP8, un effecteur apoplastique	22
Conclusion	24
Bibliographie	25

Introduction :

Les interactions symbiotiques entre plantes et micro-organismes constituent un maillon essentiel du fonctionnement d'un écosystème. Elles permettent aux plantes d'améliorer leur croissance ou d'assurer de meilleures conditions de vie dans leur environnement. Pour exemple, la quasi-totalité des arbres forestiers sont en symbiose avec des champignons ectomycorhiziens qui améliorent l'acquisition de nutriments dans les sols, essentiellement l'azote. Ces interactions symbiotiques rhizosphériques participent pour une forte part aux flux de carbone et azote dans les écosystèmes forestiers (Smith et Read, 2008).

Parmi ces interactions le modèle moléculaire *Populus trichocarpa* en interaction avec *Laccaria bicolor* est utilisé pour comprendre les mécanismes impliqués dans la mise en place de la symbiose ectomycorhizienne. L'intérêt du modèle utilisé en laboratoire est double. Tout d'abord la disponibilité des génomes des deux partenaires permet l'identification de gènes candidats par des outils de bioinformatique. Les MiSSPs (*Mycorrhizal Induced Small Secreted Protein*) étudiés lors de ce stage ont été mis en évidence chez *Laccaria bicolor* grâce à la disponibilité du génome et l'analyse de l'expression de ces gènes. L'une de ces protéines a récemment été caractérisée au sein du laboratoire (Plett et *al.*, 2011). De plus le partenaire végétal choisi dans ce modèle est une espèce modèle en biologie végétale forestière et qui, en plus d'avoir vu son génome séquencé, est utilisé de manière routinière au sein des laboratoires.

Une symbiose est considérée comme une association à bénéfices réciproques. Parmi ces interactions, les chercheurs distinguent les associations mycorhiziennes, qui s'établissent entre un microorganisme fongique et les racines d'un arbre (eg. *Laccaria bicolor* – *Pinus silvestris*) et les symbioses fixatrices d'azote qui associent une bactérie du sol du genre *Rhizobium* et les racines d'une plante de type légumineuse. Des structures d'échanges spécifiques de la symbiose vont apparaître lors du contact. Par exemple l'interaction rhizobium-légumineuse va induire la formation de nodosités très caractéristiques et qui, une fois mature, vont être le site de fixation de l'azote atmosphérique notamment grâce à des enzymes spécifiques comme la nitrogénase. Dans le cas d'une ectomycorhize, le champignon va se développer autour des cellules racinaires corticales pour former le réseau de Hartig, interface d'échange nutritionnel entre la plante et son symbionte. Ce réseau est spécifique de la symbiose ectomycorhizienne, le champignon ne pénètre pas la cellule végétale contrairement à l'autre grand type de symbiose fongique dite endomycorhizienne où le champignon va rentrer dans la cellule végétale et développer des arbuscules ou des vésicules, organes d'échanges entre la cellule et le champignon. Toutes ces interactions symbiotiques sont dites biotrophes, car elles s'établissent sur un tissu végétal vivant.

La symbiose ectomycorhizienne constitue une adaptation de l'arbre à une contrainte environnementale limitant sa croissance, cette contrainte étant provoquée par des nutriments biodisponibles en quantité limitée. En particulier, l'azote et le phosphore présents sous formes non assimilables par la plante et que le partenaire fongique arrive à mobiliser (Chalot et Brun., 1998). La mise en place de l'interaction va induire une modification de l'architecture racinaire en réponse à la perception de signaux diffusibles par le symbionte comme des homologues d'hormones végétales et d'autres molécules qui vont altérer l'homeostasie hormonale de la plante et induire l'émergence de nombreuses racines latérales (Fig1b). Des flux de nutriments entre les deux partenaires se mettent en place et sont régulés par des transporteurs fongiques ou végétaux (Fig1a). Enfin, un dernier niveau de contrôle a récemment été identifié. Celui-ci implique des petites protéines sécrétées et induites au moment de la mycorhization (MiSSP), on parle aussi d'effecteurs (Fig1c). Ces derniers sont particulièrement étudiés du côté des agents phytopathogènes car ils régulent notamment les mécanismes de défense de la plante pour permettre la prolifération du microorganisme. Du côté des symbioses, très peu d'effecteurs ont été caractérisés. De plus la différence de diversité d'effecteurs potentiels dans les génomes de deux champignons ectomycorhiziens, *Tuber melanosporum* et *Laccaria bicolor* (Martin et al., 2008 ; Martin et al., 2011), nous indique que l'importance relative de cette voie dans le contrôle de la symbiose diffère en fonction des organismes impliqués dans l'interaction (Veneault-Fourrey et Martin., 2011). Ces résultats suggèrent l'existence de deux stratégies de mise en place de la symbiose entre *Tuber melanosporum*, pauvre en effecteur, et *Laccaria bicolor*, riche en effecteurs. La disponibilité prochaine de génomes d'autres champignons ectomycorhiziens, ainsi que des données de l'expression des petites protéines sécrétées régulées par la symbiose, pourra nous permettre de dégager un cas général quant à l'utilisation de ces effecteurs chez les champignons ectomycorhiziens.

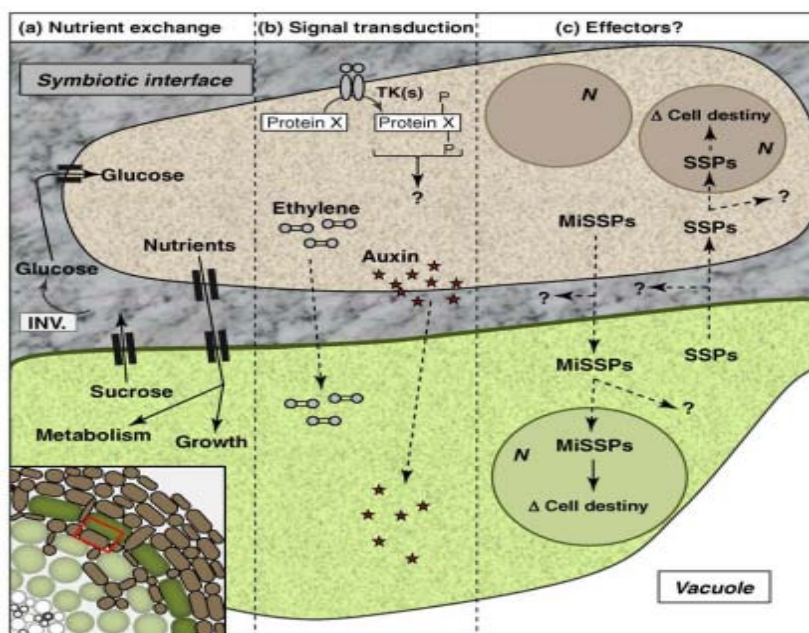


Figure 1: Résumé des trois niveaux de contrôle de la symbiose ectomycorhizienne (Plett et Martin, 2011)

Cette notion d'effecteur, récente chez les organismes mutualistes, est mieux définie chez les phytopathologistes. Un effecteur est une petite protéine (<300aa) sécrétée par le microorganisme pour altérer le métabolisme et/ou l'immunité de la plante en faveur de l'interaction (Hogenhout et al., 2009). Cette protéine est sécrétée vers le domaine apoplastique où elle peut être prise en charge par la cellule végétale pour y être transloquée et obtenir alors une localisation symplasmique. On classe souvent les effecteurs selon leur localisation végétale (apoplastique vs cytoplasmique). Chez les effecteurs fongiques, les mécanismes impliqués dans l'entrée ou non de ces protéines dans la cellule végétale sont mal connus. Certains auteurs pensent qu'un motif particulier de la séquence, de type RxLR découvert chez des oomycètes, induit la fixation de la molécule sur les PIP (Phosphatidylinositol X-phosphate) de la membrane puis l'entrée dans la cellule (Tyler et al., 2006). Néanmoins cette hypothèse est encore soumise à controverse car un tel motif ne se retrouve pas chez tous les effecteurs cytoplasmiques ou sont très dégénérés. D'autres motifs inconnus pourraient aussi induire l'internalisation de la protéine dans la cellule végétale (Morgan et Kamoun, 2007). Ces effecteurs peuvent agir à différents niveaux clés des mécanismes cellulaires aboutissant à la mise en place des réponses. Par exemple, en altérant la transduction du signal cellulaire, par action sur les MAP Kinase, ou en agissant plus ou moins directement sur l'expression de ces gènes de défense (Ellis et al., 2007). La recherche des cibles végétales de ces effecteurs est une première étape vers la compréhension du ou des mécanismes cellulaires altérés par ces derniers, et de comprendre ce qui favorise l'interaction.

Du côté des symbioses, on constate une diminution de l'expression des gènes de défense de la plante au moment des étapes précoces de l'interaction (Heller et al. 2008). En effet, durant ces temps initiaux la plante ne distingue pas un contact avec un microorganisme pathogène d'un contact avec un symbionte, ce résultat s'explique par la présence de PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) chez les microorganismes symbiotiques (Ziamoudis et al., 2012). Il est alors nécessaire pour ces derniers de posséder des systèmes pour empêcher la mise en place des mécanismes de défense, ce qui pose l'hypothèse de l'existence d'effecteurs symbiotiques.

En effet, la plante est capable de mettre en place un premier niveau de défense lors de la reconnaissance par des récepteurs spécifiques de molécules très conservées entre les grands groupes de microorganismes (Chitine chez les champignons, flageline chez les bactéries etc...) et considérées comme des PAMPs. L'une des hypothèses est que c'est pour contourner ce premier niveau de défense que les effecteurs existent chez les symbiontes. L'existence d'effecteurs symbiotiques a été validée très récemment, par un travail sur MiSSP7 de *Laccaria bicolor*. Les MiSSPs sont des protéines de petites tailles (<300aa) et dont l'expression est fortement induite au moment de la mycorhization, cette famille contient tous les candidats d'effecteurs symbiotiques. Parmi eux, MiSSP7 est le gène le plus exprimé au moment de l'interaction, c'est ce qui a amené les auteurs à travailler plus spécifiquement sur celui-ci. Il a été démontré que MiSSP7 était indispensable à la mycorhization et possédait

une localisation végétale nucléaire au sein des cellules racinaires (Plett et al. 2011). Récemment il a été démontré que MiSSP7 interagissait avec la voie de l'acide jasmonique (Plett et al., non publié). Ces résultats sont en adéquation avec la définition d'un effecteur.

Un projet de recherche a récemment appuyé l'hypothèse sur le rôle des effecteurs symbiotiques dans le maintien du mode de vie biotrophe (Kloppholz et al 2011). En effet les auteurs ont exprimé l'effecteur symbiotique SP7 de *Glomus intraradices* dans un champignon pathogène hémibiotrophe. *Magnaporthe oryzae* qui possède une période de vie biotrophe puis une transition vers la nécrotrophie va avoir lieu. L'expression de cet effecteur va provoquer, chez cette espèce, un rallongement de la période biotrophe. De plus, ce même effecteur entre en interaction avec un facteur de transcription répondant à la voie de l'éthylène.

Ces expériences suggèrent que des effecteurs de champignons mutualistes contribuent à la suppression des réponses de défenses en altérant l'équilibre hormonal de la plante hôte (Da Cunha et al., 2007) de façon similaire aux effecteurs d'agents pathogènes. Les agents pathogènes présentent une forte diversification de leurs effecteurs pour échapper à la reconnaissance par la plante hôte, mais la fonction de ces derniers est conservée. Il est intéressant de noter que malgré la grande diversité d'effecteurs ceux-ci vont toujours ciblés les mêmes grandes fonctions de la plante, indiquant que la sélection diversifiante ne s'opère pas sur la fonction de ces effecteurs mais sur la structure de ceux-ci pour éviter d'être reconnu (Mukhtar et al, 2011).

Ce stage se concentre sur 4 protéines MiSSP du champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor* (MiSSP8, MiSSP17, MiSSP22, MiSSP13) codant potentiellement des petites protéines sécrétées et dont l'expression est induite lors de la mycorhization (Martin et al., 2008). L'objectif de ce stage est de répondre à trois problématiques:

i-Déterminer si les protéines MiSSP possèdent une localisation végétale particulière, cytoplasmique ou apoplastique.

ii-Obtenir des plants de peupliers surexprimants de manière stable les gènes MiSSP8 et MiSSP17.

iii-Etudier les interactants protéiques et non protéiques de MiSSP8 et dégager des hypothèses sur la fonction biologique MiSSP8.

Matériel et méthode

Matériel biologique

Le cultivar de peuplier utilisé est 717-1B4 (*Populus tremula* x *Populus alba*) cultivé *in vitro* sur milieu MS (Annexe) en tube de culture individuel. Ce cultivar est utilisé pour l'expression stable de gènes d'intérêt.

Les tabacs *Nicotiana benthamiana* sont cultivés sur terreau sous 16 heures de photopériode à 22°C et 80% d'humidité, mis en pot au stade 3 feuilles sur du terreau de rempotage. L'apparition de fleurs rend le tabac non sensible à l'agrotransformation, ainsi il convient de retirer le bourgeon terminal lorsque le plant possède 4 ou 5 feuilles pleinement étalées. Ces plants sont arrosés quotidiennement.

Les souches d'agrobactéries (*A.tumefaciens*) C58 et GV3101 (dérive de C58 curée de son plasmide Ti d'origine, complétée de pMP90; Hellens et al, 2000 ; Koncz et al, 1996) sont utilisées, ces dernières sont maintenues sur milieu YEB (Annexe) solide, ou LB (Annexe) solide, contenant la Rifampicine à 100 µg.mL⁻¹ et Gentamicine à 10 µg.mL⁻¹. Ce milieu est également complété de l'antibiotique de sélection adéquat lorsque cela est nécessaire. Ces souches sont incubées à 28°C.

La souche d'*Escherichia coli* DH5α ([://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes](http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes)) est utilisée pour multiplier les plasmides. Cette dernière est mise en culture sur milieu LB solide complété des antibiotiques de sélection adéquat. Cette souche est incubée à 37°C. La souche BL21([://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes](http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes)) va être utilisée pour les expérimentations de DivIVa afin d'identifier les interactants protéiques de MiSSP8.

L'ensemble des cultures bactériennes obtenues sont conservées à 4°C et repiquées tous les mois afin de conserver une culture fraîche. Des stocks dans du glycérol à 30% sont également réalisés et stockés à -80°C.

Constructions génétiques

Toutes les constructions sont réalisées par clonage de type GATEWAY, dont le principe est expliqué en annexe, à partir de produits de PCR obtenus avec des amorces spécifiques des gènes d'intérêts. Les constructions réalisées sont résumées figure 2. Ces vecteurs ont été envoyés à séquencer (MWG) afin de s'assurer de l'intégrité des séquences insérées.

Les ADNc des différentes protéines MiSSP ont été amplifiées à partir d'ADNc d'ectomycorhizes de *Populus trichocarpa* avec *Laccaria bicolor* âgées de 2 mois.

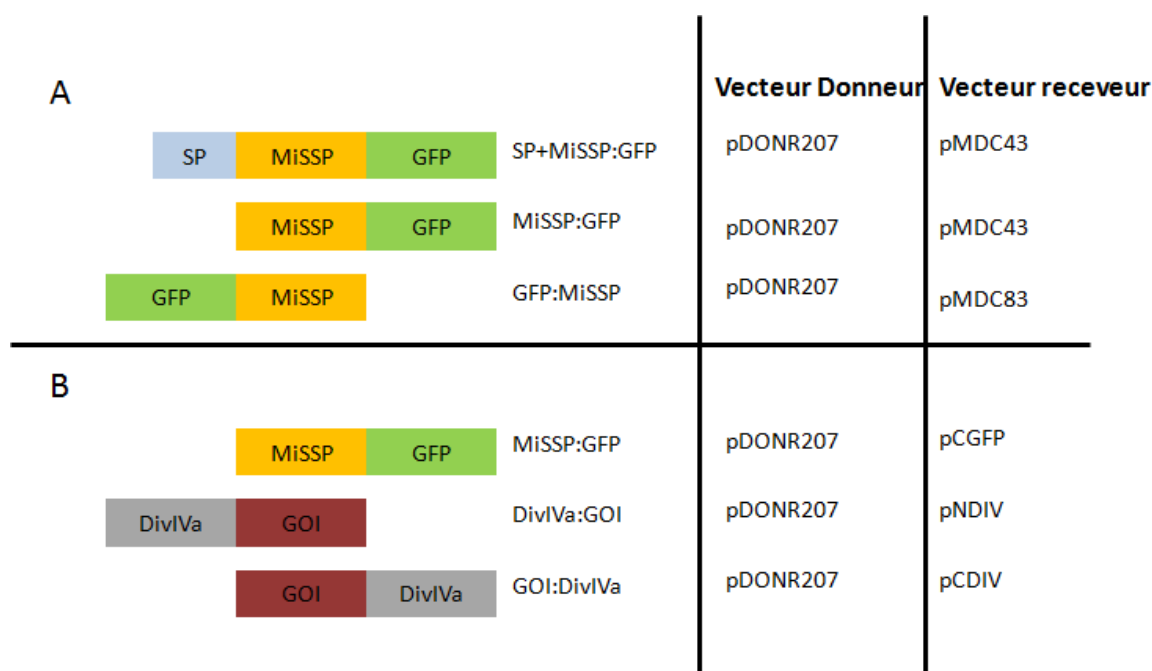


Figure 2: Résumé des constructions utilisées pour l'expression transitoire *in planta* (A) et pour le test d'interaction protéique *in vivo* (B) pour cette dernière les plasmides receveurs sont décrits par la publication de référence (Edwards et al., 2009). GOI : Gène d'intérêt ; MISSP : Mycorhizal Induced Small Secreted Protein ; GFP : Green Fluorescent Protein; SP: Signal Peptide.

Expression des effecteurs in planta

Expression stable chez le peuplier :

Les constructions d'intérêt (Figure 2) sont insérées dans la souche d'agrobactérie *Agrobacterium tumefaciens* C58 utilisée pour l'expression stable chez le peuplier.

L'ensemble des manipulations présentées doivent être réalisées dans des conditions stériles à l'aide de matériel préalablement stérilisé.

Premier jour: Préculture

Etaler en stries denses la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* (C58) sur milieu LB contenant les antibiotiques de sélection appropriés (rifampicine à 100 µg.mL⁻¹, kanamycine à 50 µg.mL⁻¹ et gentamycine à 10 µg.mL⁻¹) pendant 48-72 heure à 24°C. Préparer 2 boîtes de Pétri pour chaque construction.

Premier jour : Préparation du matériel végétal

Prélever stérilement des entre-nœuds de 0,8cm de long sur des plants cultivés *in vitro* âgés de 2 mois. Fendre ces explants sur la moitié de leur longueur et les déposer sur des boîtes de Pétri contenant du milieu M1 pour 48-72 heures à l'obscurité et à 24°C (20 explants par boîte pour une centaine d'explants par expérience de transformation).

Quatrième jour : Trempage

A partir des précultures d'agrobactéries, préparer une suspension dans 100mL de milieu MS30 (Annexe) ajustée à une DO600nm de 0,3. Prélever les explants et les déposer dans cette même suspension, 50 explants pour 100mL de suspension. Mettre le tout sous agitation (125 tours/mn) pendant 16H à 24°C et à l'obscurité.

Cinquième jour : Coculture

Eliminer stérilement la suspension bactérienne dans un conteneur stérile en retenant les explants à l'aide d'une spatule préalablement stérilisée. Récupérer les explants et les placer sur du papier stérile afin de les tamponner légèrement pour éliminer un maximum de milieu de culture et de bactéries. Placer ensuite ces explants sur milieu M1 pendant 2 journées pleines à 24°C et à l'obscurité.

Septième jour : Décontamination

Récupérer les explants et les placer dans un erlenmeyer stérile puis ajouter 100mL d'eau distillée stérile. Placer le tout sous agitation (125 tours/minutes pendant 5 à 10 minutes). Vider le liquide en retenant les explants afin de recommencer ces lavages 5 à 7 fois le but étant d'éliminer un maximum de bactéries possible. Cette étape constitue un point clé dans le protocole pour éviter toute contamination d'agrobactéries. Une fois lavés, les explants sont récupérés, tamponnés sur du papier stérile et placés sur du milieu M2 pendant 3 semaines à l'obscurité.

Quatrième semaine : Sélection/Régénération

S'assurer que les explants ont bien doublé de volume et les repiquer sur du milieu M2 contenant les antibiotiques de sélection à 24°C à l'obscurité afin de sélectionner uniquement les cals ayant subi un événement de transformation. Exciser les cals verts au fur et à mesure de leur apparition et les déposer sur du milieu M3. Dans l'idéal des cals doivent être retirés tous les 2 jours. Une fois ceux-ci hérissés de bourgeons, les repiquer sur du milieu M3 dont la concentration en TDZ (Thidiazuron) a été divisée par 10. Prélever les bourgeons allongés en pousses et les repiquer sur du milieu MS afin de permettre leur enracinement et leur elongation. Lorsque la croissance en hauteur de ces derniers est limitée par la hauteur de la boîte de pétri ces plantules sont placées sur le même milieu MS en tube de culture individuel.

Les milieux doivent être changés tous les 15 jours et les boîtes manipulées avec précaution du fait de la faible concentration en agar de ces derniers. Les cals excisés doivent être déposés de manière à être en contact avec le milieu en l'enfonçant légèrement dans la gélose. Ces milieux doivent être changés tous les 15 jours, remplacés par un milieu frais préparé de préférence le jour même ou la veille. Ces mêmes milieux doivent être stockés à l'obscurité à 4°C en attendant d'être utilisés.

Expression transitoire dans des feuilles de tabac :

Les constructions d'intérêt sont insérées dans la souche d'agrobactérie *Agrobacterium tumefaciens* GV3101.

A partir d'une culture liquide (3mL) sur une nuit de l'agrobactérie transformée contenant la construction d'intérêt, ajuster la DO_{600nm} entre 0,5 et 1 dans la solution d'infiltration (Annexe). Incuber pendant 2 heures à 28°C sous 80rpm pour armer les agrobactéries.

Infiltrer ces suspensions dans des feuilles de tabacs, sur la face inférieure, à l'aide d'une seringue sans aiguille. Trois répétitions biologiques sont réalisées sur des tabacs âgés de 4 à 6 semaines, sur trois feuilles pleinement étalées. Les observations sont réalisées 36 à 48 heures après infiltration au microscope confocal (Nikon-Bio-Rad) ou apotome (Microscope inverse Axio observer.Z1).

Western-blot

Extraction des protéines totales :

Prélever 2 disques foliaires sur des feuilles de tabac infiltrées, les broyer dans l'azote liquide et récupérer le broyat dans un tube eppendorf de 1,5mL avec 200 µL de tampon de Laemmli (Annexe). Vortexer le tout et centrifuger 10 minutes à 13000 rpm puis reprendre le surnageant afin de le placer au bain marie bouillant à 95°C pendant 5 minutes. Déposer 25 µL sur gel de polyacrylamide 12% et laisser migrer une heure à 130V. Transférer sur membrane PVDF à l'aide du transblot[®] (Invitrogen). La révélation est réalisée grâce à un anticorps primaire de lapin anti-GFP tandis que l'anticorps secondaire anti-lapin, biotinylé est obtenu chez une chèvre. Le protocole utilisé est fourni par le kit (« Opti 4CN » de Biorad).

Validation des interactants de MiSSP8

Les bactéries *E.coli* BL21 sont cotransformées avec le plasmide contenant la construction MiSSP :GFP et le plasmide contenant GOI :Div ou Div :GOI.

Les gènes identifiés par double hybride (Becker, stage M1) sont présentés tableau 2. Le gène Pt-USPF n'a pu être inclus dans l'expérimentation car il a présenté des difficultés à être cloné. Les vecteurs de destination de ce dernier ont été obtenus à la fin de ce stage.

Le gène Pt-Ralf possède un peptide signal prédit par bioinformatique (SignalP), pour cette raison deux constructions ont été réalisées, en présence ou en absence de ce peptide signal.

Tableau 1 : Gènes d'intérêts identifiés par double hybride comme interactants potentiels de MiSSP8 (Becker, Stage M1) et utilisés pour le test d'interaction protéique *in vivo* (DivIVA)

Gene ID	Protein ID	Description	Nom
XM_002326066.1	POPTR_0019s14190	"Universal Stress Protein Family"	Pt-USPF
XM_002320982.1	POPTR_0014s12630	"Rapid Alkalinization factor"	Pt-Ralf
XM_002328754.1	POPTR_0004s23520 alias Pt-ATFP8.1	Similaire aux « GTP-binding protein »	Pt-ATFP
EF147646.1	POPTR_0008s03950	Similar to plasma membrane intrinsic protein	Pt-Aquaporine
XM_001885041.1	252734	Similaire a la protein CAP64	Lb-CAP64

Identification des interactants protéiques *in vivo* :

La matrice de PCR utilisée est l'ADNc d'ectomycorhizes ou les colonies de levures ayant démontrées les interactions par double hybride. L'ADNc d'ectomycorhize a été préférentiellement utilisée pour amplifier les gènes les plus grands. Le vecteur donneur utilisé est le pDONR222 tandis que les vecteurs de destination sont ; pNDIV (Edwards et al., 2009, Protéine Div fusionnée à l'interactant dans sa partie N-ter), pCDIV (Edwards et al., 2009, Protéine Div fusionnée à l'interactant dans sa partie C-ter) et pCGFP (Edwards et al., 2009, GFP fusionnée à la protéine MiSSP dans sa partie C-ter). Ces vecteurs ont été envoyés à séquencer (MWG) afin de s'assurer de l'intégrité des séquences insérées. Des bactéries *E.Coli* de la souche BL21 ont été co-transformées avec les deux vecteurs, l'un contenant la protéine DivIVA fusionnée à l'interactant potentiel et l'autre contenant la GFP fusionnée à MiSSP8.

Le principe de la technique est présenté figure 3.

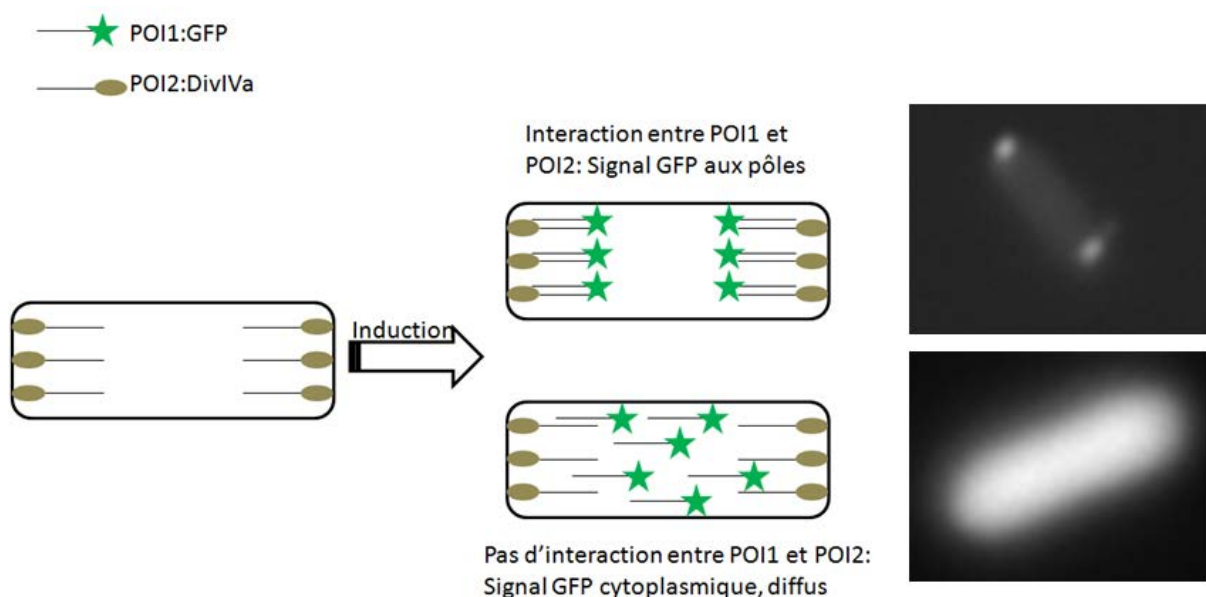


Figure 3: Principe du DivIVA pour l'étude des interactants protéiques. POI=Protein of Interest; GFP=Green Fluorescent Protein. La construction POI :GFP est sous contrôle d'un promoteur inducible par l'arabinose, tandis que DivIVA :POI ou POI :DivIVA est exprimé constitutivement. L'interaction entre les deux POI va entraîner une localisation du signal GFP au niveau des pôles, ou d'un pôle, dans le cas contraire le signal GFP est diffus.

A partir d'une culture fraîche d'une colonie co-transformée le protocole suivant est réalisé :

Placer une colonie de BL21 cotransformée, préalablement vérifiée par PCR à l'aide d'amorces spécifiques des gènes, dans 2mL de milieu LB complété des antibiotiques adéquats (Chloramphénicol à $15\mu\text{g.mL}^{-1}$ et Ampiciline à $50\mu\text{g.mL}^{-1}$) pour une nuit à 37°C sous 120rpm. Prélever 500 μL de cette préculture et placer dans 8mL de milieu LB complété des mêmes antibiotiques pendant 45 minutes à 37°C . Ajouter 0,8mL d'arabinose à 2% et laisser incuber 20 minutes. Placer 1 à 2 μL de cette culture entre lame et lamelle et laisser reposer avant d'observer sous microscope. Un témoin positif et un témoin négatif vont nous permettre de déterminer le temps optimal pour l'observation. En effet, si l'induction est trop forte des corps d'inclusion se forment et migrent vers les pôles, ce faux positif doit pouvoir être discriminé grâce au témoin négatif. Nos observations sont menées entre 20 minutes et 35 minutes après l'induction par l'arabinose.

Test de fixation sur des composés polysaccharidiques :

Incuber 5mg du composé polysaccharidique à tester dans 800 μL de Buffer A (20mM Tris pH8 ; 500mM NaCl) avec 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de la suspension de MiSSP8 :GFP. Laisser incuber le mélange pendant 3 heures sous faible agitation à température ambiante. Empêcher tant que possible la formation de dépôts. Centrifuger le mélange à 13 000g pendant 5 minutes et récupérer le surnageant dans un nouveau tube, s'assurer que ce surnageant est dépourvu de toute trace de suspension. Lorsque cela est nécessaire prélever dans un nouveau tube l'interface entre le culot et le surnageant, de cette manière on s'assurera de la pureté du surnageant. Le culot quant à lui est conservé tel quel. La fluorescence à 512nm est mesurée grâce à un fluorimètre (InfiniteM200Pro) après excitation à 460nm. Le témoin utilisé est la

protéine fluorescente incubée dans le buffer A, il a été vérifié que ce tampon n'émet pas dans la longueur d'onde testée. Les polyssacharides considérés dans ce travail sont, la cellulose, la chitine, le chitosane, le xylane et le curdlane. Nous avons préalablement vérifié que ces composés n'émettent pas dans la longueur d'onde testée.

La fluorescence est mesurée avant l'incubation (F0) et sur le surnageant après incubation 3 heure avec le composé (F3). Nous allons estimer le pourcentage de fixation (F%) à partir des valeurs de F0 et F3. $F\% = (1 - (F3/F0)) * 100$. Les tests de fixation de la protéine GFP nous permettent d'estimer le pourcentage de fixation non spécifique et va servir de témoin. Les valeurs de fixations de MiSSP8 :GFP seront comparées aux valeurs de fixations de la GFP.

Surnageants et culots sont ensuite conservés à -20°C au maximum quelques jours. Les culots sont conservés sur du long terme dans du tampon de Laemmli (200µL) tandis que les surnageants vont dans un premier temps être précipités à l'acétone avant d'être conservés à -20°C dans 20µL de tampon de Laemmli. La présence de la protéine fluorescente pourra être confirmée par Western Blot à l'aide d'anticorps anti-GFP dans chacune des deux fractions.

Pour chaque test, trois répétitions biologiques seront réalisées.

Résultats :

Localisation subcellulaire *in planta* de MiSSP8, MiSSP13, MiSSP17 et MiSSP22

Afin de déterminer la localisation subcellulaire de quatre effecteurs potentiels et de les classer entre effecteurs cytoplasmiques et apoplastiques, nous avons exprimé transitoirement dans des feuilles de tabac les trois constructions présentées figure 2A (Matériel et méthode). Pour l'ensemble des constructions dépourvues de peptide signal (séquence en N terminale de la protéine qui après reconnaissance est clivée et provoque la sécrétion de la protéine clivée) nous observons une localisation nucléocytoplasmique. Cette localisation identique pour toutes les protéines testées nous indique qu'aucune d'entre elles ne possède un motif d'adressage à un organe particulier. De plus cette localisation nucléocytoplasmique est également observée dans le cas de la protéine fluorescente verte exprimée dans ce même système. Dans notre cas le signal cytoplasmique est lié à l'expression de notre protéine chimérique dans le cytosol, sous le contrôle d'un promoteur 2x35S. Le signal nucléaire observé est, quant à lui, lié à la fusion GFP qui entraîne la protéine dans le noyau (Schornack et al., 2009). La localisation de la protéine exprimée avec son peptide signal va nous indiquer : i) si cette séquence est reconnue et provoque la sécrétion de la protéine par la cellule végétale et ii) si, lorsque la sécrétion est effective, la protéine peut-être réinternalisée dans la cellule végétale.

L'ajout du peptide signal prédit par des outils de bioinformatiques en N-terminal de la protéine fusion n'induit pas de modification de localisation pour MiSSP13 et MiSSP22 qui conservent la localisation cytoplasmique et nucléaire (Figure 4A). Nous avons confirmé le signal cytoplasmique par expérimentation de plasmolyses afin de discriminer la membrane plasmique et le tonoplaste, permettant de laisser apparaître une partie du cytoplasme (Figure 4B). Nous pouvons conclure que le peptide signal de ces deux protéines n'est pas reconnu par la cellule végétale. Une mise à jour du logiciel SignalP a été utilisable dans le même temps que ces expériences de localisation. Cette mise à jour ne prédit pas de sécrétion pour MiSSP13 mais un signal de sécrétion est prédit sur MiSSP22. La sécrétion de MiSSP22 prédite par bioinformatique n'est pas confirmée par nos expérimentations. Cette séquence en partie N-terminale de la protéine que nous supposons être un peptide signal ne possède pas de motifs d'adressages particuliers, en effet la protéine possède la même localisation en présence et en absence de cette séquence.

MiSSP13 et MiSSP22 ne possèdent pas de sécrétion effective dans notre système d'expression *in planta*. Ainsi, la localisation nucléocytoplasmique observée n'est que le reflet de l'expression d'une protéine chimérique, fusionnée à la GFP, dont l'expression est sous le contrôle d'un double promoteur 35S (Schornack et al., 2009).

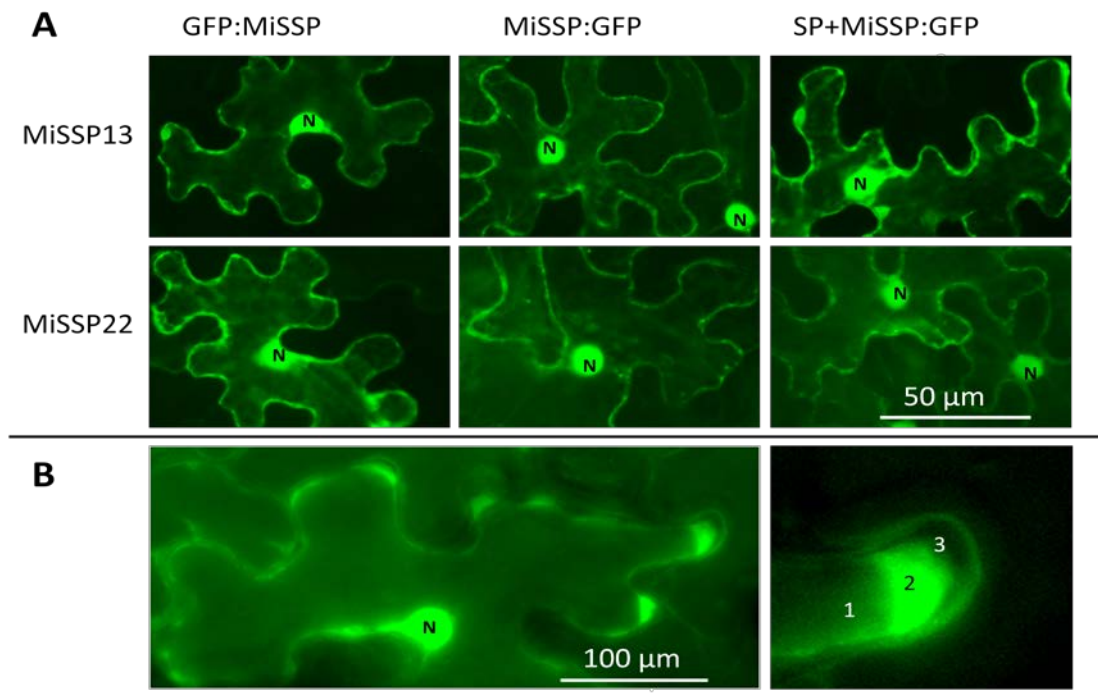


Figure 4: Expression transitoire de MiSSP13 et MiSSP22 fusionnées à la GFP (1A) et localisation de MiSSP13:GFP après plasmolyse (1B); N : Noyau 1 : Vacuole ; 2 : Cytoplasme ; 3 : Apoplasme. Les données de plasmolyses pour les autres constructions ne sont pas montrées.

A l'inverse l'ajout du signal de sécrétion sur MiSSP8 va modifier sa localisation, nous indiquant que le peptide signal prédit est fonctionnel. Des observations de cette même construction sur des feuilles ayant subi une plasmolyse et co-transformées avec une aquaporine (PIP2A) membranaire fusionnée à la protéine fluorescente mCherry (Nelson et al., 2007) nous permet d'affirmer que ce signal est membranaire et apoplastique (Figure 5). L'intensité du signal pariétal ne doit pas être comparée au signal membranaire, en effet il est admis que le pH acide de ce compartiment va impacter la stabilité de la protéine GFP rendue alors plus labile (Zheng et al., 2004). Aucune conclusion quantitative sur la localisation de MiSSP8 ne peut être tirée du fait de ce biais. Nous pouvons conclure que MiSSP8 est un effecteur apoplastique, du fait du signal pariétal. La localisation membranaire observée est en accord avec cette conclusion puisque cet organel est la limite entre le compartiment apoplastique et le compartiment cytoplasmique.

L'absence de signal cytoplasmique pour cette même construction nous indique qu'une fois sécrétée MiSSP8 ne sera pas reinternalisée dans la cellule végétale.

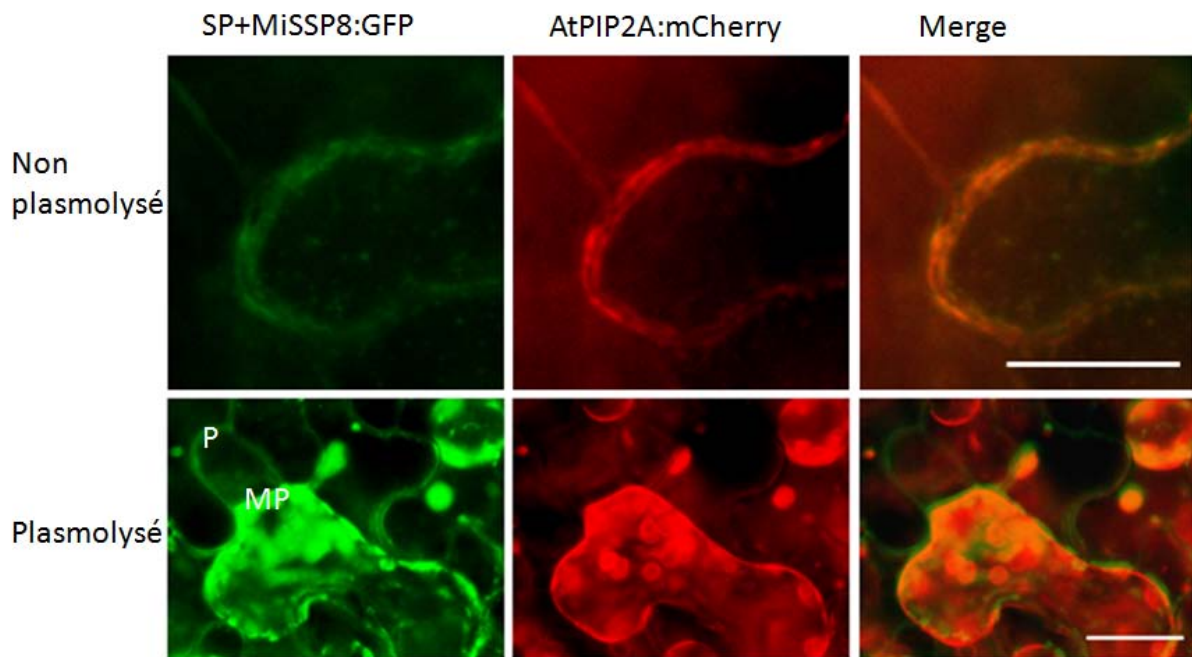


Figure 5: Localisation subcellulaire de SP+MiSSP8:GFP en condition plasmolysée (NaCl 2-4%) et non plasmolysée dans des feuilles de tabac. La barre d'échelle représente 25 μ m. MP; membrane plasmique, P; paroi

L'ajout du peptide signal de MiSSP17 va induire une localisation vésiculaire et au niveau du réticulum endoplasmique, ce signal reflète très certainement le début des étapes de sécrétion de la protéine par la voie de sécrétion classique. En effet MiSSP17 exprimé sans son peptide signal natif ne montre pas de localisation réticulaire, ce qui nous indique qu'il n'y a pas sur cette protéine de motif d'adressage à cet organite. Ce signal lié au réticulum endoplasmique a été confirmé par l'expression de la protéine fluorescente mCherry adressée au réticulum. Le sens du transit de ces vésicules n'a pu être déterminé, ces dernières fusionnent avec la membrane plasmique ou émanent de l'endocytose de la protéine fusion. Des expérimentations de colocalisation avec une protéine mCherry adressée aux vésicules golgiennes ne nous a pas permis de conclure, néanmoins la présence de la protéine fusion au niveau du réticulum endoplasmique alors que la séquence est dépourvue d'un signal d'adressage à cet organite irait dans le sens d'une sécrétion (Figure 6a). Un signal cytoplasmique et nucléaire est observé dans certaines cellules, cet élément nous indique que MiSSP17 est localisé dans le cytoplasme après sa sécrétion. MiSSP17 est donc internalisé dans la cellule (Figure 6b).

La sécrétion de MiSSP17 a été démontrée dans notre système, de plus MiSSP17 peut être considéré comme un effecteur cytoplasmique du fait de son internalisation dans la cellule végétale après sa sécrétion.

Ces expérimentations nous ont également permis de visualiser la sécrétion de MiSSP17 mais également son internalisation dans la cellule végétale. Enfin MiSSP13 et MiSSP22 sont localisées dans le cytoplasme dans nos expérimentations, nous n'avons pas mis en évidence la sécrétion de ces deux effecteurs. Enfin nous avons déterminé MiSSP8 comme étant un

effecteur apoplastique. Nous supposons que la fonction biologique de MiSSP8 dans le tissu végétal est liée à cette localisation et que les cibles protéiques et non protéiques de cet effecteur sont à chercher dans ce compartiment.

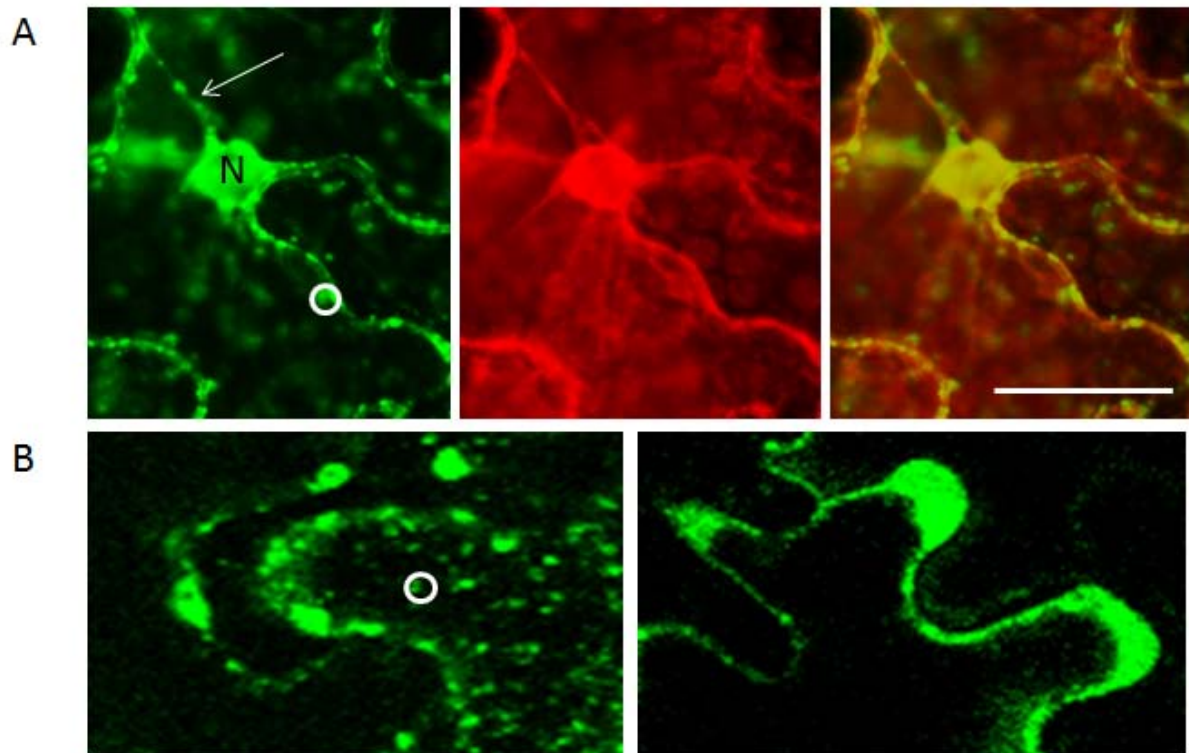


Figure 6:co-localisation de SP+MiSSP17:GFP avec le reticulum endoplasmique (flèche blanche). La barre d'échelle représente 50µm Plus tardivement ces vésicules fusionnent avec la membrane plasmique (rond blanc, B - Gauche) puis le signal MiSSP17 :GFP devient cytoplasmique (B – Droite). N : Noyau

Malheureusement, les western blot réalisés au laboratoire ne nous permettent de confirmer que le signal observé pour MiSSP17 et MiSSP22 est bien lié à la présence de la protéine chimérique. Nous ne détectons pas, non plus, sur ces échantillons la présence de la protéine GFP seule. Ces contrôles doivent être refais prochainement.

MiSSP8, effecteur apoplastique, interagit avec des protéines végétales

Des interactants potentiels de MiSSP8 ont été identifiés dans le laboratoire par la technique de double hybride en levure (Becquer, Stage de Master1). Cette technique est connue pour aboutir à l'identification de nombreux faux positifs. Nous avons cherché par une autre technique, le test *in-vivo* d'interaction protéique (Edwards et al., 2009), à confirmer l'ensemble des interactions identifiées précédemment. Cette technique permet de rester dans un système *in-vivo* pour tester des interactions protéine-protéine.

Tableau 2: Pourcentage de bactéries présentant une interaction positive entre MiSSP8:GFP et le gène testé fusionné à la protéine Div en Cter ou Nter. Pt = *Populus trichocarpa* ; Lb = *Laccaria bicolor*

GOI	Fusion en N-ter	Fusion en C-ter
	% positif	% positif
Pt.Aquaporine	47,6	56,9
Lb.CAP64-Like	42,8	20,4
Pt.Ralf-SP	64,9	53,7
Pt.Ralf+SP	51,9	55,9
Pt.ATFP8	12	10

La publication de référence sur cette technique décrit qu'une interaction est considérée comme positive lorsque qu'au moins 50% des bactéries présentent un profil positif (Localisation de la fluorescence au niveau des pôles ou d'un pôle). De cette manière nous pouvons affirmer que MiSSP8 interagit avec une protéine Ralf (Tableau2), en présence ou non du peptide signal de celle-ci et quel que soit le type de fusion (N ou Cterminale). L'aquaporine candidate apparait comme un interactant potentiel, même si nos résultats ne nous permettent de l'affirmer. Il serait intéressant de recommencer l'expérimentation tant les résultats présentés sont à la limite d'une interaction positive, en effet ces résultats divergent en fonction de la fusion réalisée. A l'inverse la protéine ATFP présente des résultats qui nous permettent d'affirmer que dans notre système l'interaction MiSSP8-ATFP n'est pas confirmée et ne recouvre pas le résultat du double hybride.

Le test d'interaction protéique *in vivo* est décrit comme ayant un très bon taux de recouvrement avec le double hybride (Edwards et al., 2009). Dans notre cas deux candidats (Ralf-SP et Ralf+SP) ont été confirmés tandis qu'un autre (Aquaporine) présente des résultats à confirmer. A l'inverse, deux autres candidats (ATFP et CAP64) ne sont pas confirmés comme étant des interactants de MiSSP8 par notre technique. Nous pouvons envisager de confirmer cette interaction par d'autres expérimentations.

MiSSP8, effecteur apoplastique, se fixe sur la cellulose

Des tests de fixation de la protéine MiSSP8 : GFP produite en système hétérologue (*Escherichia coli*) sur divers composés pariétaux ont été réalisés afin de déterminer si MiSSP8 se lie à ces éléments dont certains sont considérés comme des PAMPS. Le principe consiste à mettre en contact le composé à tester insoluble avec la protéine. Puis nous séparons la fraction soluble, contenant la protéine non fixée, et la fraction insoluble, contenant le composé et les protéines fixées. Nous allons mesurer la fluorescence dans le surnageant contenant les protéines non fixées et comparer cette valeur avec un témoin sans fixation (Figure 7).

Nous constatons une fixation résiduelle de la protéine fluorescente verte sur les composés à tester, cette fixation est de l'ordre de 10% à 20% et ne représente pas une fixation

spécifique de la GFP sur ces polysaccharides, cette valeur représente une fixation résiduelle liée à la forte quantité de protéine mise en contact avec le composé. La protéine fusion MiSSP8 : GFP présente des valeurs de fixations significativement différentes au témoin de fixation de la GFP pour la cellulose et la chitine. Nous pouvons considérer que MiSSP8 se fixe spécifiquement sur ces composés tandis que les fixations observées sur le curdlane, chitosane et le xylane n'apparaissent pas comme spécifique car non significativement différente à la fixation de la GFP.

La cellulose et la chitine sont des ligands très probables pour MiSSP8 :GFP, à l'inverse les autres composés (Xylane, curdlane et chitosane) n'apparaissent pas comme capable de fixer MiSSP8 :GFP.

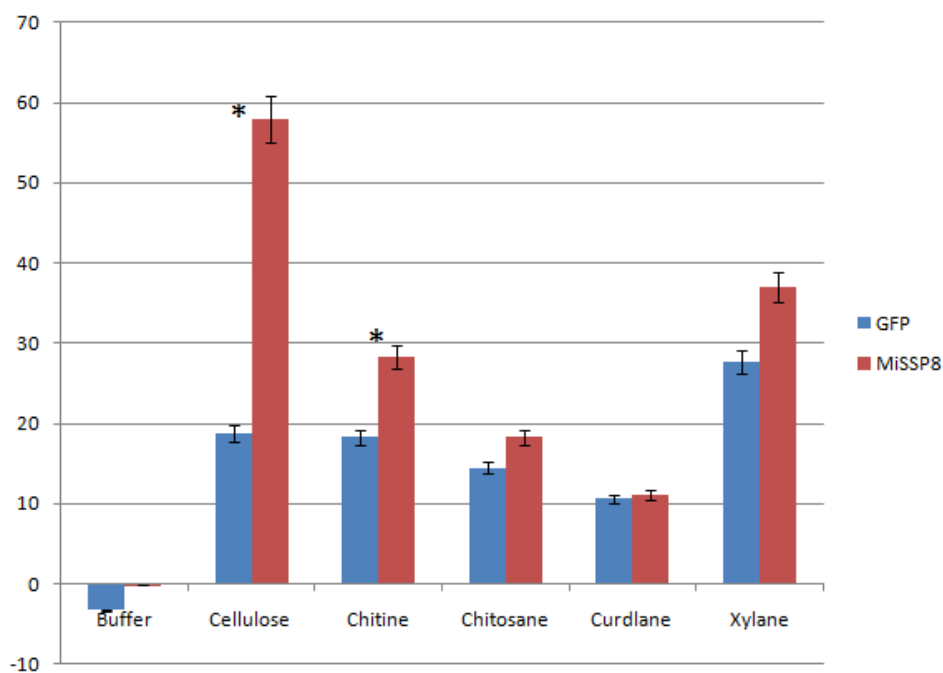


Figure 7: Pourcentage de fixation de MiSSP8 et de la Green Fluorescent Protein sur différents substrats polysaccharidiques. * indique les différences significatives (5%) entre la fixation de la GFP et MiSSP8 (Test de Student)

Expression *in planta* des effecteurs MiSSP17 et MiSSP8

Des mutants de peupliers surexprimants MiSSP8 et MiSSP17 ont été obtenus, le but étant de déterminer le rôle de ces protéines sur le métabolisme, le développement de la plante et en particulier sur leur système immunitaire.

Tableau 3: Données récapitulatives des expériences de transformations de peuplier

Construction	Nombre d'explants	Nombre de cals total	Nombre de cals transformés	Nombre de cals régénérés (Nombre de plantules)	Nombre de plantules enracinées
GFP :MiSSP8	50	86	81	0	
MiSSP8 :GFP	50	156	143	0	
GFP :MiSSP17	50	119	108	0	
MiSSP17 :GFP	50	115	105	0	
SP+MiSSP17 :GFP	50	58	55	10 (15)	2
SP+MiSSP8 :GFP	50	45	40	18 (24)	8

Les données présentées tableau 3 indiquent que l'enracinement est une étape limitante du protocole, en effet lors du passage sur milieu MS permettant cette étape nous avons eu des reprises de croissance d'agrobactéries. Cette reprise est liée à l'absence d'antibiotiques dans ce dernier milieu de régénération. En effet durant les étapes précédentes nous avons utilisé la céfotaxime qui est un antibiotique bactériostatique. Dans notre cas, une fois cet antibiotique retiré les bactéries encore présentes ont repris la croissance et contaminé nos plants.

Une première expérimentation de transformation a été menée très tôt dans le stage, cette dernière n'a pas donné le moindre bourgeon. Ce résultat nous indique que le protocole est extrêmement sensible. Par la suite nous avons choisi d'utiliser des solutions d'hormones végétales et vitamines fraîches, n'ayant pas subi de cycles « congélation-décongélation », et cette nouvelle expérimentation a donné des résultats avec cals régénérant des plantules. Il est fort probable que l'échec de cette première expérimentation est lié à ces solutions mais aucun élément ne peut le prouver.

De plus, le faible nombre de cals obtenus lors de la deuxième expérience de transformation (SP+MiSSP8 :GFP et SP+MiSSP17 :GFP) s'explique par un changement dans la méthode de collecte de ces derniers. En effet les cals doivent normalement être excisés des explants régulièrement, idéalement tous les deux jours, car au bout de 3 jours ces derniers vont dépérir si ils ne sont pas retirés de l'explant. Ce changement de la fréquence de collecte était lié à un impératif du laboratoire imposé contre notre volonté.

Des plants surexprimants MiSSP8 et MiSSP17 ont été obtenus et amènent de nouvelles perspectives sur la caractérisation de ces effecteurs.

Discussion :

MiSSP13 et MiSSP22 sont ils des effecteurs ?

Pour être reconnu comme un effecteur, une protéine doit répondre à trois critères ; i) être sécrétée ii) être de petite taille et iii) participer à la mise en place d'une interaction biotique. MiSSP13 et MiSSP22 ont été identifiées comme des effecteurs par des outils de bioinformatique en se basant sur la taille, la prédiction d'un peptide signal et les niveaux d'expression dans les étapes précoces de la symbiose. Ces niveaux sont censés refléter l'importance de ces gènes dans l'interaction et nous permettent d'établir une liste de gènes candidats. Les expérimentations menées au laboratoire doivent confirmer les prédictions bioinformatiques afin de pouvoir classer ces deux gènes comme codant des effecteurs. En absence de toute preuve biologique il convient de parler « d'effecteurs potentiels ».

Nos travaux d'expression transitoire sur feuilles de tabacs ne nous ont pas permis de mettre en évidence une sécrétion pour ces deux effecteurs. Le signal peptide de ces protéines n'est pas reconnu par la cellule végétale et ne sont pas sécrétés par la voie de sécrétion classique (via le reticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi). Ces résultats sont en accord avec une expérience menée au laboratoire dans le même temps et qui montre que, dans un système levure, ces effecteurs ne sont pas sécrétés par cette voie de sécrétion (Daguerre et al., non publié).

La sécrétion de ces effecteurs avait été supposée grâce à l'algorithme *SignalP v2.0*, La version 4.0 récemment rendue publique ne prédit plus de signal de sécrétion sur MiSSP13. Nos résultats et ceux conjointement menés au laboratoire sur la sécrétion de MiSSP13 sont en accord avec cette nouvelle mise à jour de l'algorithme. MiSSP22, quant à lui, conserve un peptide signal prédit mais la prédiction est peu sûre ($C_{max} = 0,470$).

Néanmoins l'absence de peptide signal sur ces protéines n'est pas la preuve d'une absence de sécrétion. En effet d'autres systèmes de sécrétion, dont les mécanismes restent inconnus (Nickel et Rabouille, 2009) inconnus peuvent intervenir, également ces protéines de petites tailles pourraient diffuser à travers les membranes. Pourtant nos connaissances sur les effecteurs bactériens nous indiquent qu'un système de sécrétion est privilégié dans de nombreux cas. Il s'agit du système de sécrétion de type III (T3SS) qui est utilisé dans une grande majorité des cas d'effecteurs bactériens (Büttner et Yang He, 2009 ; Lewis et al., 2009). Si les effecteurs fongiques évoluent de la même manière nous pouvons supposer qu'un système de sécrétion préférentiel est également utilisé, dans notre cas la voie classique concerne deux des effecteurs étudiés. Mais nous ne pouvons démontrer cette hypothèse sans connaître les autres voies de sécrétions utilisées par les champignons.

Nous pouvons également supposer que ces deux effecteurs ne sont pas sécrétés par le champignon et vont en fait agir sur le champignon. Nous serions en présence de MiSP (Mycorhizal Induced Secreted Protein).

Il convient maintenant de confirmer l'une ou l'autre de ces hypothèses. La première chose serait de réaliser une extraction du fluide apoplastique lors d'un contact symbiotique. A partir de ces extraits nous pourrions chercher la présence de MiSSP13 et MiSSP22 par western-blotting. Il peut être envisagé d'utiliser cet extrait pour réaliser une électrophorèse en deux dimensions afin d'identifier le sécrétome de *Laccaria bicolor*. Ce type d'expérimentation est déjà menée sur des espèces pathogènes (Bolton et al., 2008).

Enfin nous pouvons également supposer que ces deux protéines candidates ne sont tout simplement pas des effecteurs. En effet, un travail mené au laboratoire grâce à des mutants de *Laccaria bicolor* RNAi pour ces gènes a démontré que MiSSP13 et MiSSP22 ne sont pas indispensables à la mise en place de la symbiose. Mais nous pouvons penser qu'il existe une redondance fonctionnelle pour ces gènes, ainsi la mutation serait compensée par d'autres gènes.

Aucune expérimentation biologique ne peut attester que MiSSP13 et MiSSP22 sont des effecteurs. En particulier au regard des résultats de mycorhization de mutants RNAi pour ces gènes. Néanmoins le rôle de ces gènes dans la symbiose est appuyé par leur niveau d'expression lors du contact. Aucune hypothèse ne peut être faite quant au(x) rôle(s) de ces derniers lors de la symbiose.

MiSSP17, un effecteur cytoplasmique

Les expérimentations menées sur des feuilles de tabacs nous permettent de confirmer la sécrétion de cette protéine, la sécrétion a également été confirmée par une autre expérimentation menée en parallèle au laboratoire par Yohann Daguerre sur des levures (Daguerre et al., non publié). Nous pouvons également affirmer que MiSSP17 est reinternalisé dans la cellule végétale après sa sécrétion et localise alors dans le cytoplasme. Il convient de conserver une vision critique sur ces résultats puisque l'organe utilisé (La feuille) est différent de l'organe naturel mis en contact avec ces protéines (les racines). Il serait intéressant de mener le même type d'expérimentations et observations sur des racines transformées transitoirement en utilisant *Agrobacterium rhizogenes*. Ce stage a également permis l'obtention de peupliers transgéniques exprimant de manière stable MiSSP17, il serait intéressant de réaliser des observations de localisation directement sur des racines de ces peupliers puisque l'expression du transgène est constitutive dans l'ensemble des tissus de la plante.

MiSSP17 ayant été identifié comme cytoplasmique il est envisagé d'identifier les mécanismes impliqués dans l'internalisation de cet effecteur dans la cellule végétale. En particulier identifier un motif dans la séquence de la protéine qui serait impliqué dans cet

évènement. Un tel motif a été identifié chez les effecteurs d'oomycètes, le motif RxLR (Tyler et al., 2006). Il participe à la fixation de l'effecteur sur un composé membranaire, le phosphatidylinositol-phosphate (PIP), permettant ainsi la pénétration lors des mouvements membranaires. L'entrée de la protéine lors de ces mouvements semble également régit par la structure ou la charge de la protéine, la présence d'un motif RxLR n'est pas une condition suffisante pour être en présence d'un effecteur cytoplasmique. Il convient d'identifier un motif avec une fonction similaire chez MiSSP17. Dans un premier temps en identifiant le ou les composés membranaires impliqués sur lesquels se fixe MiSSP17, en particulier les PIP déjà impliqués chez les effecteurs d'oomycètes pourraient être des candidats privilégiés. Une fois identifiés, les mêmes expérimentations de fixation peuvent être menées avec des protéines tronquées d'une partie plus au moins grande en région C-terminale, jusqu'à la perte de la fixation. L'analyse de la partie manquante pourra alors nous permettre d'identifier la région dans laquelle se trouve ce motif pour l'étudier en détail. Sur le long terme, et si d'autres travaux dans d'autres systèmes impliquant des effecteurs fongiques sont menés, une séquence consensus pourrait être identifiée. L'objectif sur le long terme étant d'identifier les effecteurs, fongiques, cytoplasmiques par analyse de séquence.

L'obtention de mutants de peupliers surexprimants MiSSP17 va nous permettre d'approfondir nos connaissances sur la fonction biologique de ce dernier. Dans un premier temps il conviendrait de réaliser des tests de mycorhization complétée entre la souche de *L.bicolor* RNAi pour MiSSP17 et des peupliers surexprimants ce gène. Les mutants de *L.bicolor* sont affectés pour la mycorhization et nous allons ainsi déterminer si la présence de la protéine exprimée constitutivement dans le tissu végétal va rétablir le phénotype de mycorhization. L'analyse du transcriptome de ces peupliers mutants est également envisagée afin de déterminer les gènes du peuplier régulés par la présence de MiSSP17. Nous pourrions également comparer le transcriptome du contact entre la souche RNAi de *L.bicolor* avec un peuplier sauvage ou un peuplier surexprimant MiSSP17 afin de déterminer les gènes de peuplier régulés par MiSSP17 lors de la mycorhization.

Enfin nous envisageons également de nous concentrer sur les réponses de défense de ces peupliers mutants. Une phénylalanine ammonia-lyase (PAL) a été découverte comme interagissant de MiSSP17 par double hybride (Daguerre et al, non publié), or cette enzyme est impliquée dans la réponse des plantes à des éliciteurs généraux par la synthèse de peptides antimicrobiens et l'épaississement pariétal (Gilberti et al., 2011). Deux analyses sont alors envisagées : i) déterminer l'impact de l'expression de MiSSP17 dans le tissu végétal sur la résistance de la plante à d'autres agents pathogènes. Si le rôle de MiSSP17 est de diminuer l'activité de la PAL il est fort probable que la résistance de la plante aux pathogènes se trouvent affectée. Il suffirait pour le confirmer mesurer la virulence de pathogènes biotrophes ou hémibiotrophes sur ces plants (Bolton et al., 2009). ii) Analyser l'expression des gènes de défense chez les peupliers exprimant MiSSP17

MiSSP8, un effecteur apoplastique

Nos travaux sur feuilles de tabacs ont démontré que MiSSP8 est un effecteur apoplastique. Cette information nous a amenée à tester la fixation de cette protéine sur des composés membranaires ou pariétaux naturellement présents dans cet espace. Ainsi, nous savons désormais que MiSSP8 se fixe sur un composé végétal, la cellulose qui forme les parois, et un composé fongique, la chitine. Nous pouvons tirer deux conclusions suite à ce travail, tout d'abord le rôle de MiSSP8 dans la mycorhization est double. Il interviendrait à la fois sur le micro-organisme, comme l'indique sa fixation sur la chitine, mais également sur la plante, comme l'indique sa fixation sur la cellulose. La deuxième conclusion que nous pouvons tirer concerne les rôles biologiques de ces interactions. La chitine est un composé de la paroi fongique, cet élément est un PAMP (Eckardt, 2008). Il peut donc être reconnu par la plante comme signal d'une infection fongique et induire la mise en place des mécanismes de défense. La fixation de MiSSP8 sur ce composé pourrait empêcher la reconnaissance de la chitine et donc l'induction des défenses de la plante. Une autre hypothèse serait que la fixation de MiSSP8 pourrait intervenir pour protéger le micro-organisme contre des peptides antimicrobiens utilisés par la plante, en particulier les chitinases. Le meilleur moyen de discriminer l'une des deux hypothèses serait d'étudier la résistance d'un champignon n'exprimant pas MiSSP8 en contact avec des composés antimicrobiens ciblant la chitine. La fixation de MiSSP8 sur la cellulose pourrait empêcher la reconnaissance de l'invasion. En effet lors de tout contact avec un micro-organisme, la prolifération de ce dernier dans le tissu végétal va libérer des petits débris cellulotiques. Ces composés vont être reconnus par la plante comme signal d'une infection et induire l'expression des gènes de défense (Tsuda et Katagiri, 2010). La fixation de MiSSP8 sur ces composés pourrait empêcher la mise en place de ces mécanismes. Il convient de confirmer cette hypothèse par l'analyse du transcriptome de peupliers sauvages, ou exprimant MiSSP8 en contact avec une souche de *L.bicolor* sauvage ou « Knock Down » pour MiSSP8.

Les interactants non protéiques identifiés nous indiquent que MiSSP8 pourrait avoir un rôle plus général dans les interactions plantes-microorganismes, nous pourrions envisager d'exprimer cette protéine dans un champignon biotrophe (eg : *Ustilago Maydis*) ou hémibiotrophe (eg : *Magnaporthe oryzae*) afin d'observer l'impact de cette protéine sur la biotrophie et l'établissement de l'interaction. Il serait intéressant de mesurer la résistance des peupliers surexprimants MiSSP8 avec des agents pathogènes fongiques, ou non, afin d'observer si l'expression de cet effecteur dans le tissu végétal va diminuer la résistance de la plante aux infections.

Parmi les interactants protéiques de MiSSP8 identifiés par double hybride, certains ont été confirmé par le DivIVA. Deux interactants végétaux ont été identifiés et pour lesquels nous pouvons poser quelques hypothèses quant au rôle de l'interaction. Une protéine Ralf intervient dans l'alcalinisation du milieu extracellulaire, cette protéine possède une

localisation apoplastique (Escobar et al., 2003) tout comme notre effecteur. Il est connu que lors d'un contact avec un agent pathogène une alcalinisation du milieu extracellulaire a lieu comme réponse précoce à l'interaction (Félix et al., 1993). Ce phénomène va induire l'expression de gènes de défenses qui vont permettre la synthèse de composés de défense comme les phytoalexines (Gilberti et al., 2012). Empêcher cette réaction est une stratégie employée par certains pathogènes, on peut alors supposer que le rôle de cette interaction MiSSP8-Ralf est d'empêcher l'alcalinisation. D'autres Ralf vont intervenir dans l'inhibition de la croissance racinaire chez la tomate (Pierce et al., 2001). Ainsi, il est possible que l'interaction MiSSP8-Ralf participe également à la régulation de l'architecture racinaire observée lors d'un contact symbiotique. Il conviendrait de réaliser l'analyse fonctionnelle du gène Ralf impliqué, notamment observer l'impact d'une mutation lors d'un contact mycorhizien afin de s'assurer de l'implication de ce dernier dans la mise en place de la symbiose. Il serait également intéressant de comparer le phénotype racinaire de ce mutant en dehors d'un contact mycorhizien et de le comparer avec le phénotype d'une plante sauvage lors d'un contact symbiotique. Si les deux phénotypes sont identiques nous pourrions supposer que l'interaction MiSSP8-Ralf va dans le sens d'une inactivation de la protéine Ralf. Toujours à partir de mutants de peupliers pour ce gène Ralf, nous pouvons analyser : i) la résistance de ces plants à des pathogènes ; ii) l'effet de ces mutations sur l'architecture racinaire.

Le deuxième interactant identifié est une aquaporine, il est connu que les aquaporines interviennent dans les échanges nutritionnels entre les deux partenaires, notamment en transportant de l'azote (Maurel et Plassard, 2011), l'interaction avec MiSSP8 pourrait favoriser ces échanges et donc favoriser la symbiose. Le rôle des aquaporines est principalement de réguler les flux d'eau au sein du tissu. Or lors du contact mycorhizien l'invasion du tissu végétal va induire une modification de l'homéostasie hydrique du tissu, en plus d'une régulation génétique sur l'expression de ces aquaporines. L'interaction avec MiSSP8 pourrait participer à réguler de manière post-traductionnelle l'activité de cette aquaporine. Il serait intéressant de mesurer cette activité en présence ou non de MiSSP8. Il peut être envisagé de déterminer la localisation subcellulaire de cette aquaporine, en effet on distingue les aquaporines en fonction de leur localisation, tonoplastique ou dans la membrane plasmique. Une localisation membranaire de cette aquaporine serait en adéquation avec la localisation de MiSSP8 elle aussi membranaire. Enfin, il est connu que les plants mycorhizés possèdent une meilleure tolérance à la sécheresse (Uehlein et al., 2006), on peut imaginer que l'interaction MiSSP8-Aquaporine participe à cette meilleure tolérance au stress hydrique.

D'autres expérimentations doivent être menées pour confirmer les interactions identifiées de MiSSP8 et écarter certains candidats, la technique du « pull-down » (REF) est envisagée. Les résultats présentés dans ce rapport ne constituent que des résultats préliminaires et méritent d'être confirmés.

L'ensemble des connaissances rassemblées sur cet effecteur confirme son rôle fondamental dans la symbiose, nous sommes en présence d'un effecteur apoplastique. En plus de ces connaissances des pistes ont été émises quant au rôle de cette protéine dans la mise en place de la symbiose, il s'agit du candidat pour lequel nous possédons le plus de connaissance et sera la cible privilégiée d'un travail de thèse mené au laboratoire pour les années universitaires à venir.

Conclusion

A l'issue de ce stage les objectifs annoncés ont été remplis. Ce travail participe à la caractérisation fonctionnelle de ces effecteurs et les connaissances et outils mis en place lors de ce stage seront utilisés dans le cadre d'une thèse qui sera menée au laboratoire. De nouvelles techniques sont envisagées pour choisir entre les différentes hypothèses émises lors de ce stage et pousser plus loin nos connaissances sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la mise en place de la symbiose ectomycorhizienne.

Bibliographie

- Bolton, M. D. *et al.* **The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species.** *Molecular Microbiology* **69**, 119–136 (2008).
- Buttner, D. & He, S. Y. **Type III Protein Secretion in Plant Pathogenic Bacteria.** *PLANT PHYSIOLOGY* **150**, 1656–1664 (2009).
- Chalot, M. & Brun, A. **Physiology of organic nitrogen acquisition by ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas.** *FEMS Microbiol. Rev.* **22**, 21–44 (1998).
- Da Cunha, L., Sreerekha, M.-V. & Mackey, D. **Defense suppression by virulence effectors of bacterial phytopathogens.** *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 349–357 (2007).
- Eckardt, N. A. **Chitin Signaling in Plants: Insights into the Perception of Fungal Pathogens and Rhizobacterial Symbionts.** *THE PLANT CELL ONLINE* **20**, 241–243 (2008).
- Edwards, A. N. *et al.* **An in vivo imaging-based assay for detecting protein interactions over a wide range of binding affinities.** *Analytical Biochemistry* **395**, 166–177 (2009).
- Ellis, J. G., Dodds, P. N. & Lawrence, G. J. **The role of secreted proteins in diseases of plants caused by rust, powdery mildew and smut fungi.** *Current Opinion in Microbiology* **10**, 326–331 (2007).
- Escobar, N. M. **High-Throughput Viral Expression of cDNA-Green Fluorescent Protein Fusions Reveals Novel Subcellular Addresses and Identifies Unique Proteins That Interact with Plasmodesmata.** *THE PLANT CELL ONLINE* **15**, 1507–1523 (2003).
- Hellens, R., Mullineaux, P. & Klee, H. **Technical Focus: A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors.** *Trends in Plant Science* **5**, 446–451 (2000).
- Felix, G., Regenass, M. & Boller, T. **Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state.** *The Plant Journal* **4**, 307–316 (1993).
- Giberti, S., Berteaux, C. M., Narayana, R., Maffei, M. E. & Forlani, G. **Two phenylalanine ammonia lyase isoforms are involved in the elicitor-induced response of rice to the fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*.** *Journal of Plant Physiology* **169**, 249–254 (2012).
- Hogenhout, S. A., Van der Hoorn, R. A. L., Terauchi, R. & Kamoun, S. **Emerging Concepts in Effector Biology of Plant-Associated Organisms.** *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**, 115–122 (2009).
- Kloppholz, S., Kuhn, H. & Requena, N. **A Secreted Fungal Effector of *Glomus intraradices* Promotes Symbiotic Biotrophy.** *Current Biology* **21**, 1204–1209 (2011).
- Koncz, C. & Schell, J. **The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector.** *MGG Molecular & General Genetics* **204**, 383–396 (1986).
- Lewis, J. D., Guttman, D. S. & Desveaux, D. **The targeting of plant cellular systems by injected type III effector proteins.** *Seminars in Cell & Developmental Biology* **20**, 1055–1063 (2009).
- Martin, F. *et al.* **The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis.** *Nature* **452**, 88–92 (2008).
- Martin, F. *et al.* **Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis.** *Nature* **464**, 1033–1038 (2010).
- Maurel, C. & Plassard, C. **Aquaporins: for more than water at the plant-fungus interface?** *New Phytologist* **190**, 815–817 (2011).
- Morgan, W. & Kamoun, S. **RXL effector of plant pathogenic oomycetes.** *Current Opinion in Microbiology* **10**, 332–338 (2007).
- Mukhtar, M. S. *et al.* **Independently Evolved Virulence Effectors Converge onto Hubs in a Plant Immune System Network.** *Science* **333**, 596–601 (2011).
- Nelson, B. K., Cai, X. & Nebenführ, A. **A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants.** *The Plant Journal* **51**, 1126–1136 (2007).
- Nickel W. Rabouille C, **Mechanisms of regulated unconventional protein secretion.** *Nature reviews Mol Bio Cell* **10**, 148–155 (2009)
- Plett, J. M. *et al.* **A Secreted Effector Protein of *Laccaria bicolor* Is Required for Symbiosis Development.** *Current Biology* **21**, 1197–1203 (2011).
- Pearce, G. **RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 12843–12847 (2001).
- S.e. Smith, D. J. R. **Mycorrhizal Symbiosis.** *New Phytologist* **137**, 563–568 (1997).
- Schornack, S. *et al.* **Protein mislocalization in plant cells using a GFP-binding chromobody.** *The Plant Journal* **60**, 744–754 (2009).
- Tyler, B. M. **Phytophthora Genome Sequences Uncover Evolutionary Origins and Mechanisms of Pathogenesis.** *Science* **313**, 1261–1266 (2006).
- Uehlein, N. *et al.* **Arbuscular mycorrhizal symbiosis and plant aquaporin expression.** *Phytochemistry* **68**, 122–129 (2007).
- Veneault-Fourrey, C. & Martin, F. **Mutualistic interactions on a knife-edge between saprotrophy and pathogenesis.** *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 444–450 (2011).
- Zheng, H., Kunst, L., Hawes, C. & Moore, I. **A GFP-based assay reveals a role for RHD3 in transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus.** *The Plant Journal* **37**, 398–414 (2003).
- Tsuda K, Katagiri F. **Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity.** *Current Opinion in Plant Biology* **13(4):459-465**(2010)
- E. coli genotypes - OpenWetWare. at <http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes>

Annexes

Obtention des vecteurs d'expression par Gateway cloning :

Le système « Gateway » commercialisé par Invitrogen permet l'insertion d'une séquence d'intérêt dans un vecteur de destination par recombinaisons sites spécifiques. Les vecteurs pMDC43 et pMDC83 vont être utilisés afin de réaliser des fusions GFP en Cter ou Nter de nos protéines d'intérêt.

Premier jour : clonage du produit PCR par BP cloning

-A partir d'ADNc d'ectomycorhizes, réaliser une PCR avec des amorces spécifiques des gènes d'intérêts bordés de sites AttB1 et AttB2 (Annexe Tableau 1) et en utilisant la Phusion DNA polymérase (Finnzymes) en mélangeant 4µL de 5xPhusion HF Buffer, 0,4µL de dNTPs à 10mM, 1µL de chaque primer et 0,2µL de Phusion DNA polymerase, le tout complété à 20µL de volume réaction avec de l'eau. Le programme PCR utilisé est le suivant :

Température	Durée	Nombre de cycles
95°C	5m	1
95°C	30s	38
52°C	30s	
72°C	3m	
72°C	7m	1
10°C	-	-

Figure 1: Programme PCR sur matrice d'ADNc

-Certaines constructions ont été amplifiées par PCR sur colonies de levures, pour ces cas une colonie de levure est placée dans 20µL de soude à 20mM puis vortexée et enfin placée à 95°C pendant 20 minutes le tout afin de lyser les bactéries. 6 µL de ce mélange va ensuite être prélevé et utilisé pour une PCR sur colonie à l'aide des amorces spécifiques du gène, bordées des sites AttB1 ou AttB2 en ajoutant les réactif suivants ; 20µL de mix PCR, 28µL d'eau et 0,5µL de chaque primer. Le programme PCR utilisé est le suivant :

Température	Durée	Nombre de cycles
98°C	30s	1
98°C	10s	35
55°C	30s	
72°C	30s/1kb	
72°C	10m	1
10°C	-	-

Figure 2: Programme de PCR sur colonie de levures

-Les produits de PCR ainsi obtenus sont purifiés selon le protocole QIAgen

-Grâce à la BP clonase II, l'amplification est insérée dans un vecteur donneur à partir de 45ng du produit de PCR préalablement amplifié, mélanger avec 75ng de vecteur donneur et compléter à 4 µL avec du TE Buffer à pH8. Ajouter 1 µL d'enzyme et incubé 3 heures à 25°C puis ajouter 0,5 µL de proteinase K et incubé à 37°C pendant au moins 10 minutes afin de stopper la réaction.



Figure 3: Réaction de BP clonase d'après invitrogen

-Transformer des bactéries *E.coli* (DH5alpha) chimiocompétentes avec ce plasmide, étaler sur milieu sélectif (LB complété de l'antibiotique adéquat) pour une nuit à 37°C.

Deuxième jour : Vérification par PCR des bactéries transformées

-Des colonies apparaissent sur le milieu de culture, la présence de la construction est vérifiée par PCR sur colonies à l'aide des amorces spécifiques des gènes ou par les amorces universelles M13F-R en vérifiant alors que la taille des produits de PCR correspondent à la prédiction.

-Placer une colonie ainsi vérifiée en culture dans 5 mL de milieu LB liquide complété de l'antibiotique adéquat pour une nuit à 37°C à 200rpm

Troisième jour : extraction des plasmides et clonage de la construction par LR cloning

-Réaliser une extraction de plasmide à partir de la culture bactérienne liquide en se référant au protocole du fabricant (Qiaprep® Spin, Qiagen)

-Grâce à la LR clonase, le fragment contenu dans le plasmide donneur est transféré par recombinaison dans le plasmide de destination. On réalise la réaction de LR en mélangeant 45ng de pDONR (Destination vector), 75nG de vecteur d'entrée (Entry clone) complété à 4µL avec du Buffer TE puis ajouter 1µL de LR clonaseII puis incubé 3 heure à 25°C. Ajouter 0,5µL de protéinase K et incubé 10 minutes à 37°C afin d'arrêter la réaction.



Figure 4: Réaction de LR clonase d'après invitrogen

- Transformer des bactéries *E.coli* (DH5alpha) chimiocompétentes avec 1,5µL de ce produit et laisser le mélange pendant 15 minutes dans la glace puis réaliser un choc thermique à 42°C pendant 60s. Ajouter ensuite 400µL de milieu LB liquide et laisser le tout 1 heure à 37°C sous agitation. Étaler 100µL à 200µL de cette culture sur milieu sélectif (LB complété de l'antibiotique adéquat) pour une nuit à 37°C.

Quatrième jour : Extraction des plasmides et transformation des agrobactéries

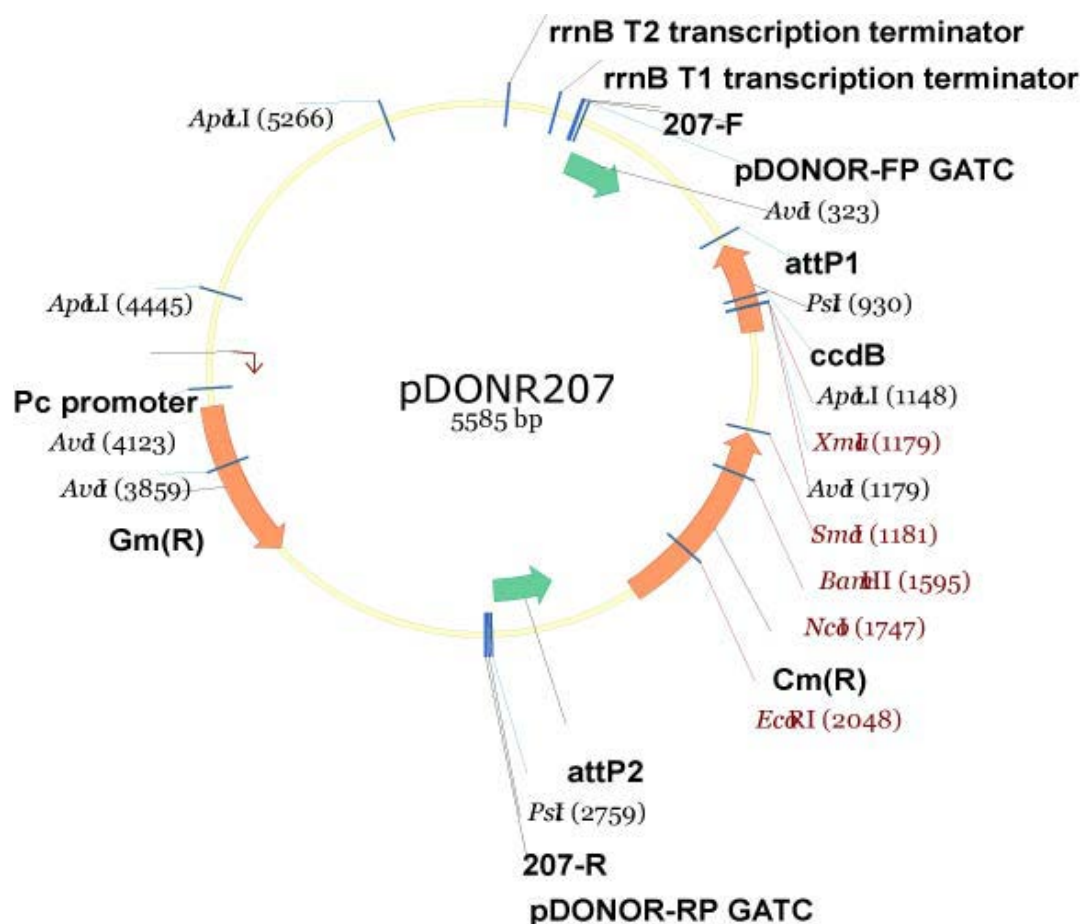
-Réaliser une extraction de plasmides à partir de la culture précédente en se référant au protocole du fournisseur (Qiaprep® Spin, Qiagen)

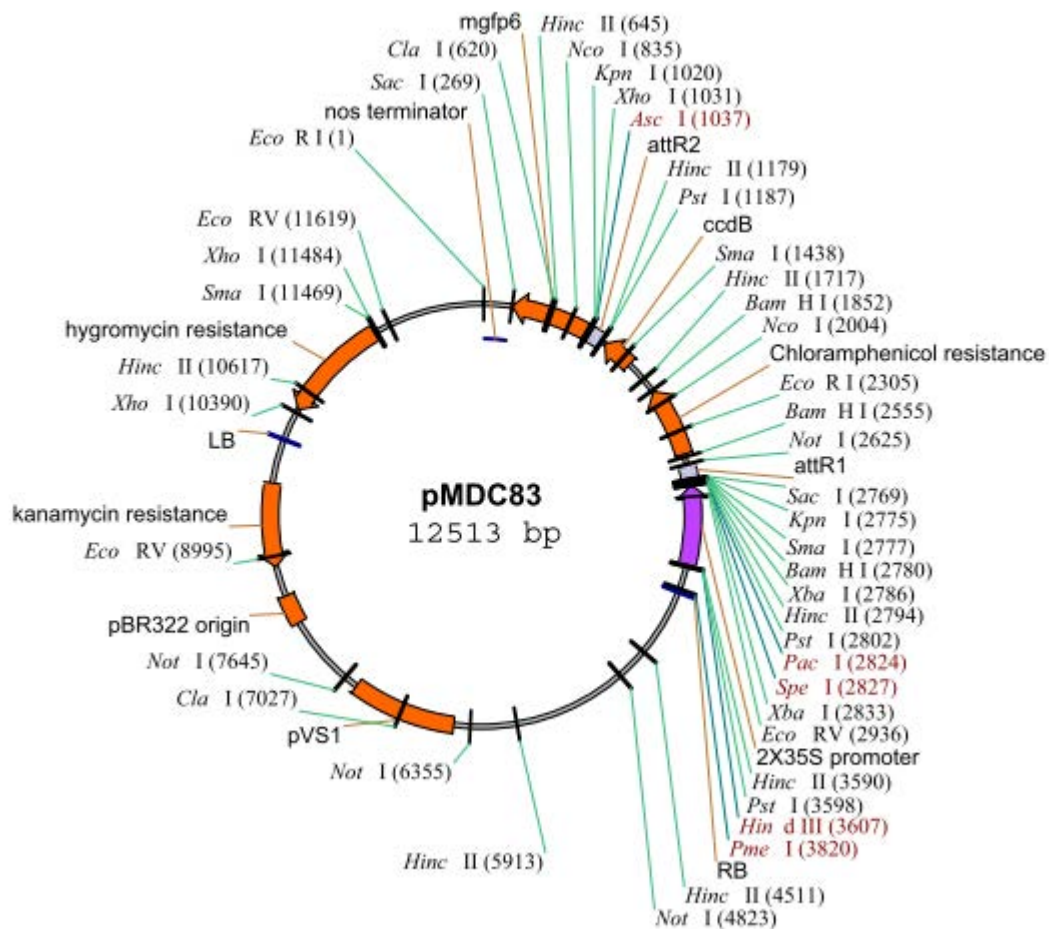
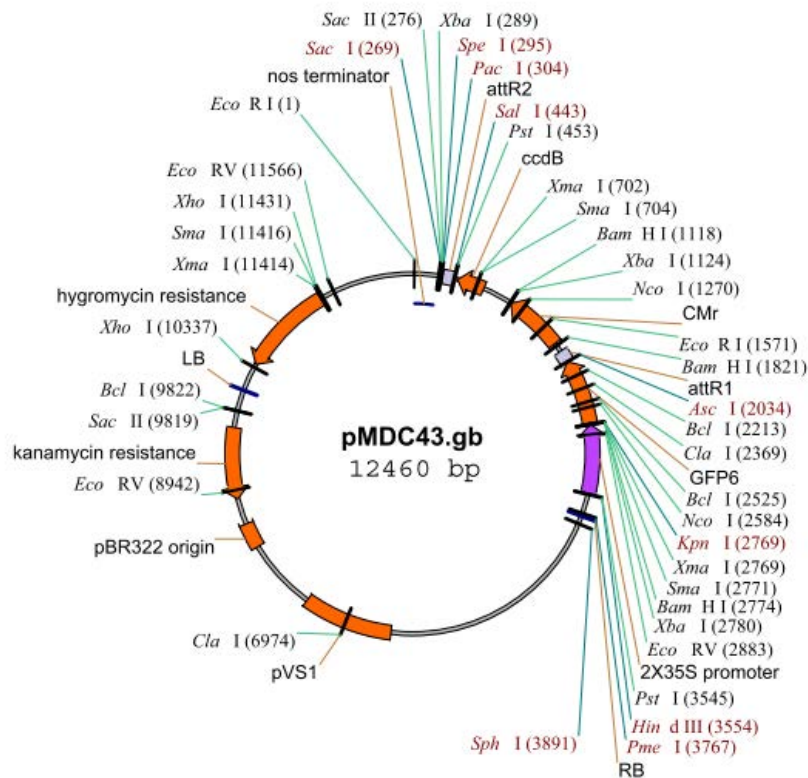
-A partir de la solution plasmidique obtenue, transformer la souche d'agrobactérie GV3101 (expression transitoire en feuilles de tabac) ou C58 (expression stable dans peuplier cultivar 717-1B4) et étaler sur milieu YEB ou LB complété des antibiotiques adéquat (Rifampicine 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, gentimycine 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, Kanamycine 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)

Cinquième jour : Vérification par PCR des bactéries transformées

-Réaliser une PCR sur colonie à l'aide d'amorces spécifiques du gène ou d'amorces universelles afin de confirmer la présence de l'insert.

-Les colonies sont repiquées tous les mois afin de conserver une culture fraîche à 4°C, un stock est également conservée dans du glycérol 30% à -80°C.





Expression transitoire de gènes d'effecteurs fongiques dans des feuilles de tabacs (*Nicotiana Benthamiana*) par agroinfiltration :

Souche bactérienne

La souche d'agrobactérie (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 est maintenue en culture fraîche sur du milieu YEB complété de rifampicine ($100\mu\text{g.mL}^{-1}$) et gentamycine ($10\mu\text{g.mL}^{-1}$) conservée à 4°C ou mise en culture à 28°C pendant 48h pour repartir d'une culture fraîche. La résistance à la rifampicine est contenue dans le génome tandis que la résistance à la gentamycine est contenue dans le plasmide Ti. La souche DH5alpha d'*E.coli* est utilisée pour multiplier les plasmides contenant les constructions d'intérêt, mise en culture sur milieu LB complété des antibiotiques adéquat, à 37°C sur la nuit pour repartir d'une culture fraîche.

Culture de tabacs

Des graines de tabac (*Nicotiana benthamiana*) sont semées sur plaque, lorsque ceux-ci atteignent le stade 3 feuilles l'ensemble est éclaircie afin de conserver les plants les plus avancés puis transféré en pots individuels, généralement 2 à 3 semaines après la date de semis. Après 3 semaines supplémentaires les plants auront 3 à 4 feuilles pleinement étalées qui seront utilisées pour l'infiltration. L'ensemble de la culture est réalisée en chambre phytotronique avec une photopériode de 16H à 20°C pour une humidité relative de 80%. Le tout est arrosé quotidiennement et entretenu en retirant les bourgeons lorsque ceux-ci apparaissent afin de maximiser le développement foliaire et d'augmenter la fenêtre de temps pendant laquelle les plants sont utilisables pour l'agroinfiltration.

Clonage des constructions d'intérêt

Le clonage des constructions d'intérêt est réalisé par « Gateway Cloning » en se référant au manuel d'utilisation, cette technique repose sur deux étapes :

- BP Cloning : va permettre grâce à la BP clonase II l'insertion d'un produit PCR dans un vecteur d'entrée
- LR Cloning : va permettre l'insertion de la construction d'intérêt dans un vecteur d'expression

Le vecteur obtenu en produit de ces réactions sera inséré dans la souche d'agrobactérie GV3101 en vue de l'infiltration.

Infiltration des feuilles de tabacs

- La veille de l'infiltration, faire une préculture liquide des agrobactéries modifiées dans 5mL de milieu LB complété de rifampicine $100\mu\text{g.mL}^{-1}$, gentamycine $10\mu\text{g.mL}^{-1}$ et kanamycine $50\mu\text{g.mL}^{-1}$.
- Le lendemain matin, centrifuger à 8000g afin de récupérer un culot bactérien.
- Placer ce culot dans un double volume de la solution d'infiltration (10mM MgCl_2 + 10mM MES pH 5,6 + 200 μM AS) ajuster la DO_{600nm} à 0,5 lorsque cela est nécessaire, et placer le tout pendant 2 heures à 28°C sous faible agitation (80 rpm) afin d'armer les agrobactéries

-Infiltrer la solution sur la face inférieure des feuilles de tabacs pleinement étalée en maintenant la feuille entre l'extrémité de la seringue dépourvue de son aiguille et un doigt afin de s'assurer de la pénétration de la solution dans le tissu foliaire. Trois répétitions biologiques sont réalisées.

-Les tabacs sont remis dans les mêmes conditions de culture que précédemment mais sous serre.

Observations

-36 à 48 heures après infiltration des petits fragments de 0,5cm² à 1cm² de feuilles infiltrées sont excisés, le plus proche de la zone infiltrée en évitant les vaisseaux afin d'avoir un échantillon le plus fin et homogène possible. Placer cet échantillon sous vide afin de permettre la pénétration d'eau dans les tissus pour améliorer l'observation, puis entre lame et lamelle et sous microscope avec un filtre d'excitation centré sur la spectre de la GFP ou de la mCherry selon les besoins. Dans le cas d'expérimentations de plasmolyses, l'eau est remplacée par une solution de NaCl à 2 ou 4%.

Tableau 1: Liste des amorces utilisées pour le clonage dans les vecteurs divIVa

Nom de l'amorce	Séquence
PtUSPF-AttB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAACTCAAAACAACCATAC
PtUSPF-AttB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAGCATCTTTCAGCTCATCATC
PtRalf+SP-AttB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCCAATTCCTACCGCTATC
PtRalf-AttB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAGTACGGCAGCGAGTAATAGCAC
PtRalf-SP-AttB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAGTGAAGACCACAACCTCAAC
PtATFP8-AttB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAGCAACGAATATGATTATC
PtATFP8-AttB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCACCACAGCAGTTGTTCTTC
PtAquap-AttB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCAAAGGATACTGAAGTG
PtAquap-AttB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGACATTCGGGTTGCTCCTGAATG
LbCAP64-AttB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGGTTCCCTGTCCCCTTCC
LbCAP64-AttB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCGTCGCGAAAATCCCAATGATC
LbHP+SP-AttB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTCTCTCCATTTGACAATG
LbHP-AttB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCCAAGTATCACGTTCTCGC
LbHP-SP-AttB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGGATTCATTGCCTGAC
M8-SPatgAttB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGTCCCCAACTGTGATAAATTC
M8-STOPAttB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAATCACTATCGCGCCTCC
M8+SPAttB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGTCCCCAACTGTGATAAATTC

Milieux de cultures :

Milieu YEB (100mL)	
Extrait de viande	0,5g
Peptone	0,5g
Saccharose	0,5g
Extrait de levure	0,5g
MgSO ₄	0,03g
Agar	2,0g

Milieu LB (100mL)	
Tryptone	10g
Extrait de levure	5g
NaCl	1g
Agar	12g
Ajuster le pH à 7,5	
Ajouter les antibiotiques aux concentrations voulues	

Milieu M1 (100mL)	
Macroéléments	10mL
Microéléments	0,1mL
Fer	1mL
Myo-inositol	1mL
MES	1mL
Saccharose	3g
Agar	0,7g
Ajuster le pH à 5,8	
Après autoclavage ajouter stérilement :	
Vitamines	1mL
L-Glutamine	1mL
2-IP	100μL
ANA	100μL

Milieu MS30 (100mL)	
Macroéléments	10mL
Microéléments	0,1mL
Fer	1mL
Myo-inositol	1mL
MES	1mL
Saccharose	3g
Ajuster le pH à 5,8	

Solution stock de gentamicine (5mL)	
Gentamicine	100mg
Stériliser par filtration (0,2µm)	

Milieu M2 (100mL)	
Macroéléments	10mL
Microéléments	0,1mL
Fer	1mL
Myo-inositol	1mL
MES	1mL
Saccharose	3g
Agar	0,7g
Ajuster le pH à 5,8	
Après autoclavage ajouter stérilement :	
Vitamines	1mL
L-Glutamine	1mL
2-IP	100µL
ANA	100µL
Carbénicilline	100µL
Céfotaxime	200µL
Kanamycine (Si nécessaire) =Antibiotique de sélection	100µL

Solution stock fer (500mL)	
Acide acétique ethylendiaminetetra fer (III) sel de sodium 2g	
Autoclaver 20 minutes à 120°C	

Solution stock de Rifampicine (400microL)	
Rifampicine	20mg
Méthanol	400microL

Solution stock de vitamines (500mL)	
Acide nicotinique	50mg
Pyridoxine	50mg
Thiamine	50mg
Pantothenate de calcium	50mg
L-cysteine	50mg
Biotine	5mL
Stériliser par filtration (0,2µM)	

Solution stock de myo-inositol (500mL)	
Myo-inositol	5g
Autoclaver 20 minutes à 120°C	

Solution stock de L-glutamine (500mL)	
L-glutamine	10g
Stériliser par filtration (0,2µm)	

Solution stock de MES (200mL)	
Acide 2-(N-Morpholino) ethanesulfonique	5g
Autoclaver 20 minutes à 120°C	

Solution stock d'ANA (50mL)	
Acide acétique a-naphtaleine	93mg
NaOH 1N	750µL
Eau distillée stérile	Compléter à 50mL
Stériliser par filtration (0,2µm)	

Solution stock de Zip (50mL)	
N6-(2-isopentenyl)adenine	50,8mg
NaOH 1N	10 gouttes
Eau distillée stérile	Compléter à 50mL
Stériliser par filtration (0,2microm)	

Solution de TDZ n°1 (2mL)	
Thidiazuron	55mg
Diméthyl sulfoxyde (DMSO)	2mL

Solution stock de TDZ (20mL)	
Solution TDZ n°1	200μL
Eau stérile	19,8mL
Stériliser par filtration (0,2μm)	

Solution stock de kanamycine (5mL)	
Kanamycine	250mg
Stériliser par filtration (0,2μm)	

Solution stock de céfotaxime (2mL)	
Céfotaxime	500mg
Stériliser par filtration (0,2μm)	

Solution stock de carbénicilline (2mL)	
Carbénicilline	1g
Stériliser par filtration (0,2microm)	

Milieu M3 (100mL)	
Macroéléments	10mL
Microéléments	0,1mL
Fer	1mL
Myo-inositol	1mL
MES	1mL
Saccharose	3g
Agar	0,7g
Ajuster le pH à 5,8 Après autoclavage ajouter stérilement :	
Vitamines	1mL
L-Glutamine	1mL
Carbénicilline	100µL
Céfotaxime	200µL
Kanamycine	100µL
TDZ	50µL ou 5µL

Milieu MS (1L)	
Macroéléments	50mL
Microéléments	100mL
Fer	1mL
Myo-inositol	100mg
L-Glutamine	200mg
Saccharose	20g
Agar	7g
Vitamines	10g
Ajuster le pH à 5,8	

La symbiose ectomycorhizienne constitue une adaptation de la plante à une faible biodisponibilité des nutriments dans les sols forestiers. Cette association à bénéfices réciproques permet à la plante une meilleure nutrition minérale et hydrique et d'acquérir une meilleure résistance aux agents pathogènes. Dans le cadre de l'interaction entre le champignon *Laccaria bicolor* et le peuplier, des protéines fongiques MiSSPs (Mycorrhizal Induced Small Secreted Protein) ont été identifiées. Récemment MiSSP7 a été caractérisé comme un effecteur, capable d'altérer l'équilibre hormonal de la plante.

Lors de ce stage, j'ai participé à la caractérisation d'autres protéines MiSSPs supposées effectrices. A la suite de ce travail MiSSP8 apparait comme un effecteur apoplastique, se fixant à la cellulose et la chitine. De plus, MiSSP8 interagit avec une protéine sécrétée de peuplier RALF (Rapid Alkalinization Factors). Cette protéine apparait comme un effecteur très probable. L'entrée de MiSSP17 dans la cellule végétale a été démontrée permettant de considérer cet effecteur potentiel comme cytoplasmique. Les expérimentations menées en parallèle sur MiSSP13 et MiSSP22 ne nous permettent pas de considérer ces protéines comme des effecteurs. Ce stage a également permis d'obtenir des peupliers transgéniques exprimant les protéines fongiques MiSSP8 ou MiSSP17, amenant de nouvelles perspectives de travaux sur ces protéines.