

RP-SCREEN :



M2 PHP

Characterization of cell surface **receptors** involved in the recognition of **phytocytokines** through the use of a novel high-throughput cell **screening** method employing CRISPRa

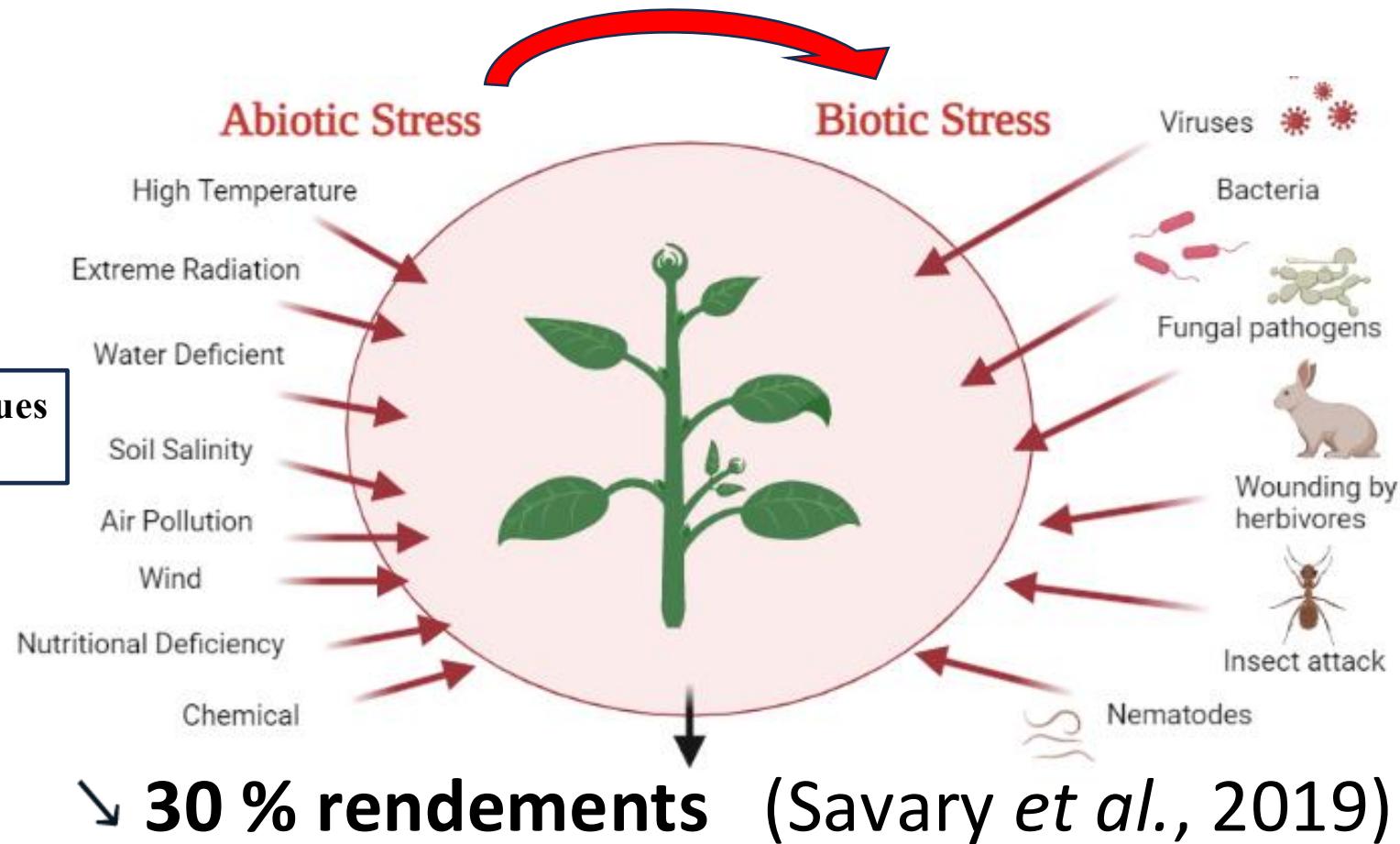


Valentin Goupille
Encadré par **Tristan Boureau**

Projet ANR

Contexte du Projet

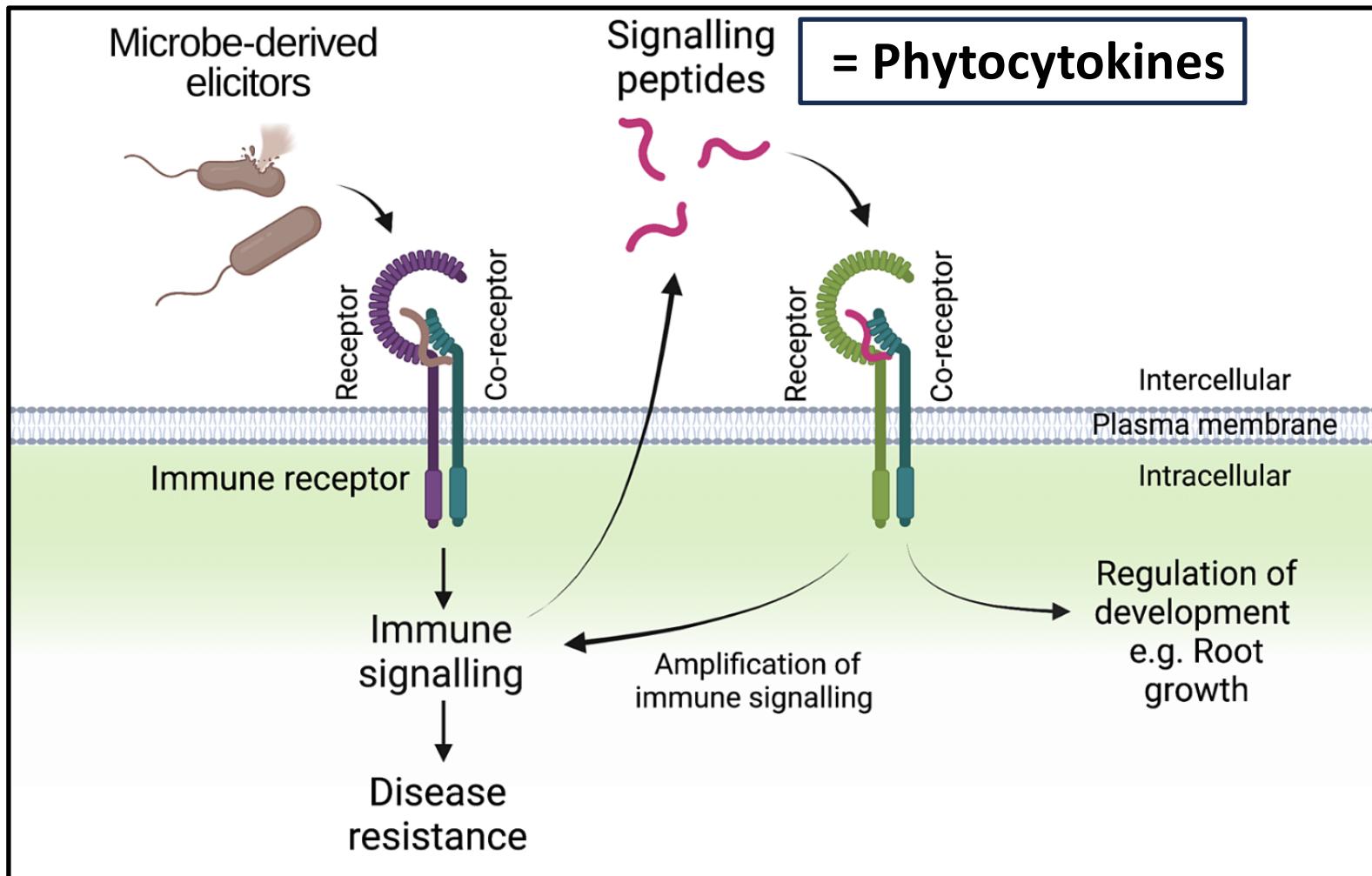
Exposition des plantes à différents stress :



(Adapté de Sciencevivid)

=> Défi majeur pour la suffisance alimentaire à l'échelle mondiale

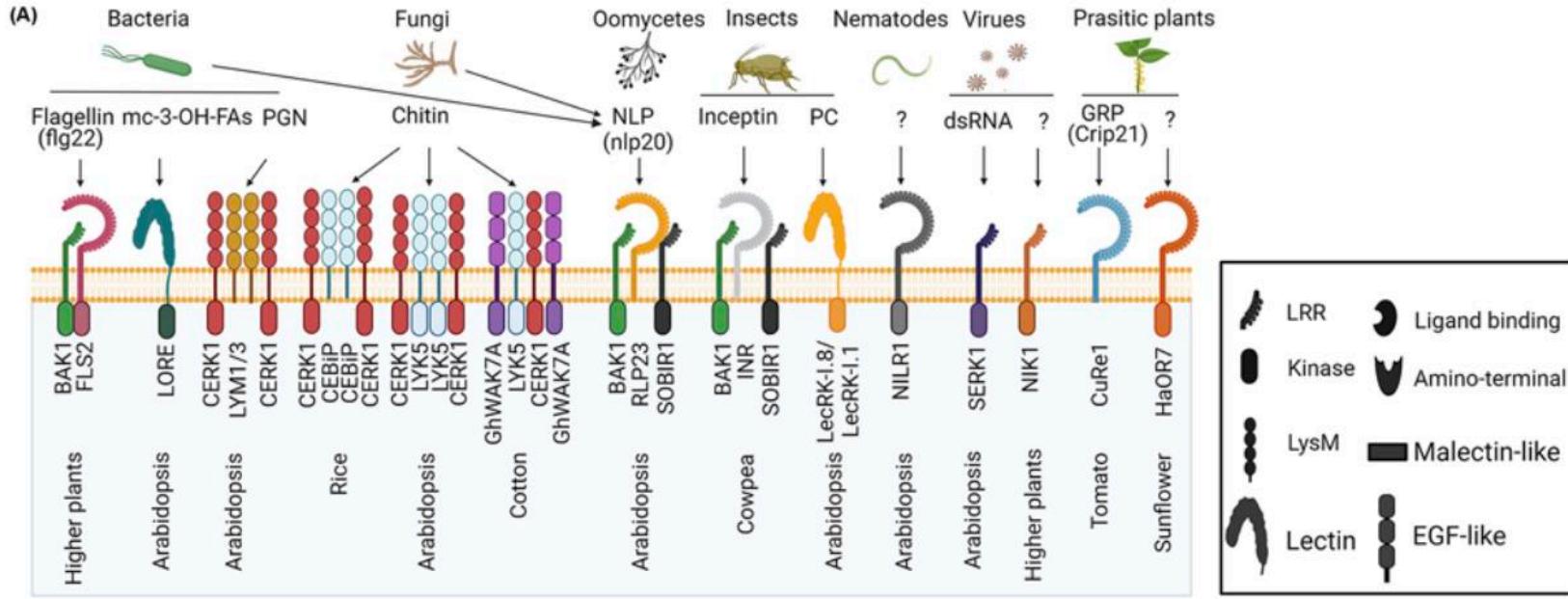
Contexte du Projet



(Zipfel, 2022)

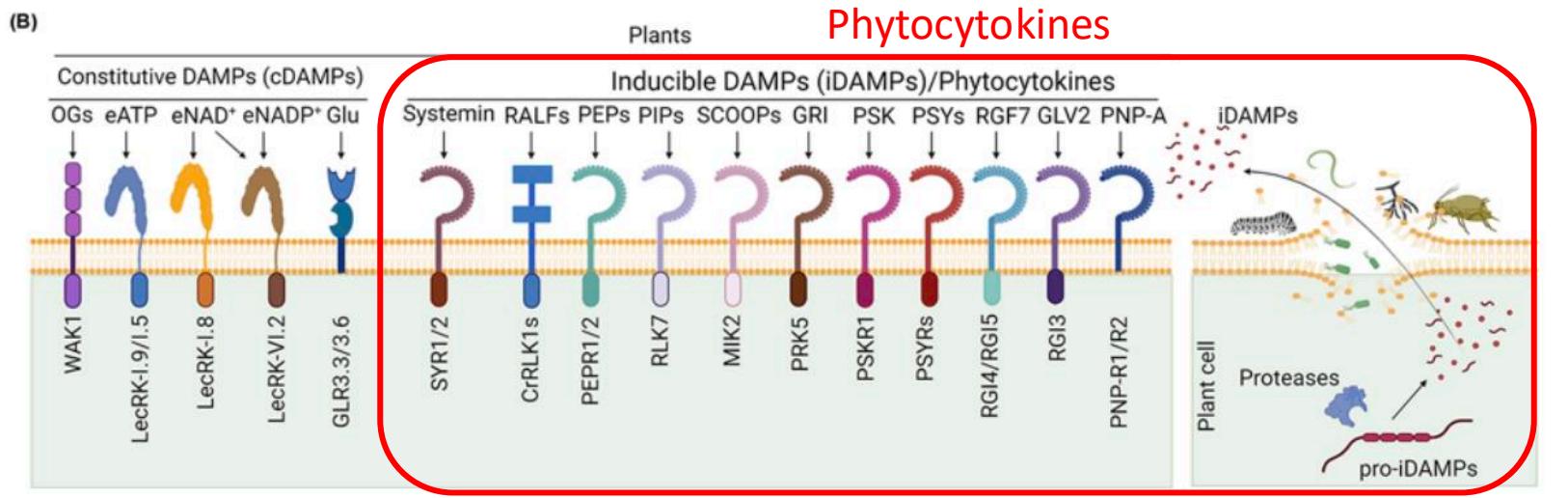
Implication de récepteurs de surface cellulaire dans la perception de molécules exogènes ou endogènes contrôlant la défense et le développement des plantes

Contexte du Projet

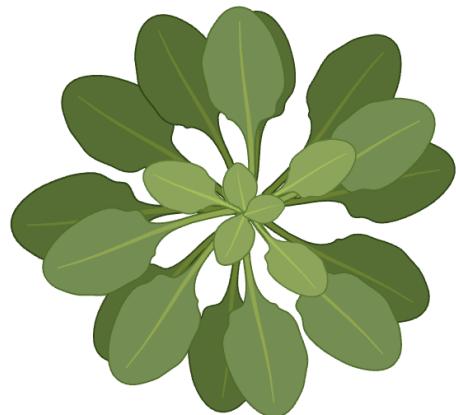


Perceptions des MAMPs et des DAMPs par les récepteurs apparentés

(Ge et al, 2022)



Contexte du Projet



Arabidopsis thaliana



2020-2024

Caractérisation de peptides sécrétés impliqués dans la réponse à divers stress biotiques (oomycète, nématodes, champignon)



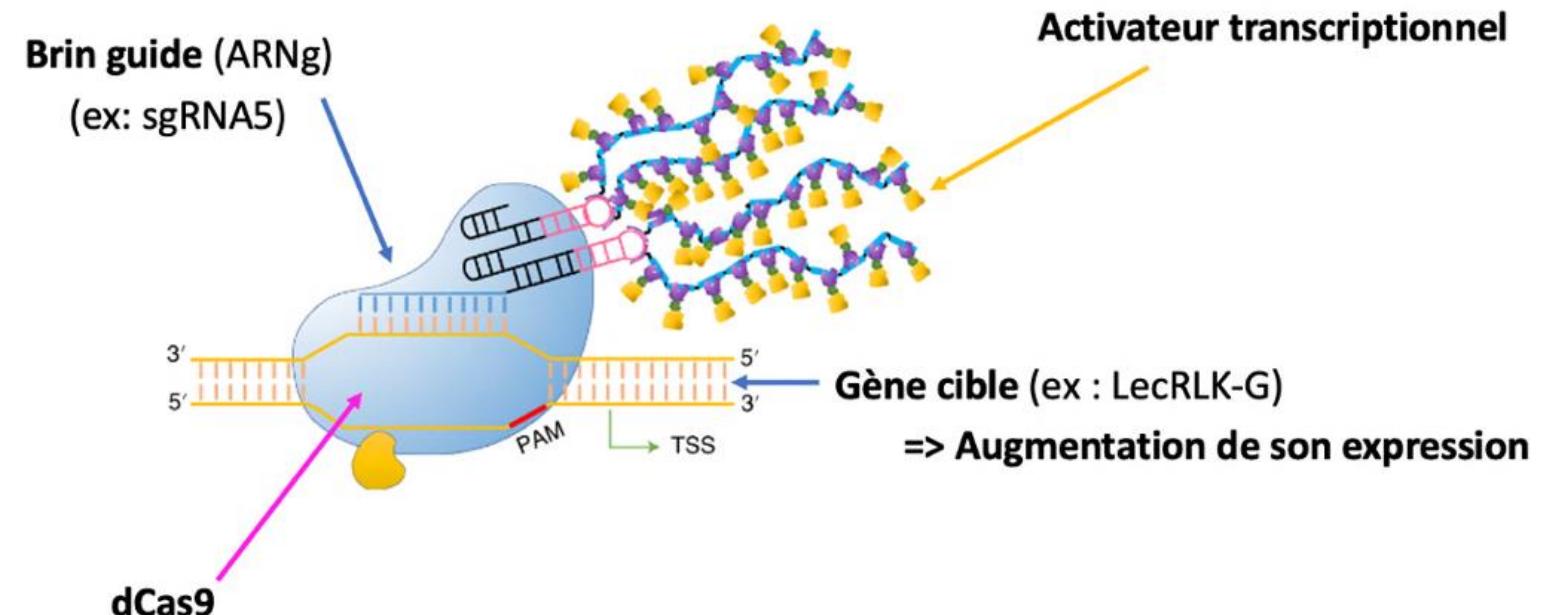
=> ***Quels sont les récepteurs membranaires impliqués dans la perception de ces phytocytokines ??***

Utilisation de CRISPRa chez les plantes...

Système CRISPR-ACT3.0 :

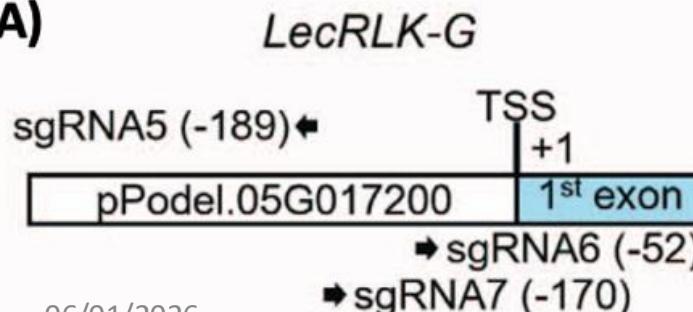
- ↗ x2 à x 350

(Pan *et al*, 2021) (Ding *et al*, 2022)



Exemple : Récepteur LecRLK
chez le peuplier (Yao *et al*, 2023)

A)



06/01/2026

B)



Développement d'une nouvelle approche pour le criblage haut débit de récepteurs de phytocytokines

Contexte du Projet

Une nouvelle approche pour identifier des récepteurs de surface cellulaire chez l'Homme...

- Pooled extracellular receptor-ligand interaction screening using **CRISPR activation** (*Chong et al, 2018*)
 - via **utilisation de ligands fluorescents**
- Identification of orphan ligand-receptor relationships using a cell-based **CRISPRa** enrichment screening platform (*Siepe et al, 2022*)
 - via **utilisation de ligands biotinylés**
 - => identification de 12 récepteurs-ligands en testant 20 ligands

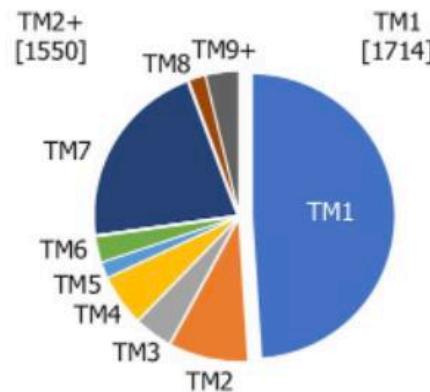
Contexte du Projet

A) Construction d'une bibliothèque de brins guides (ARNg) ciblant des récepteurs membranaires

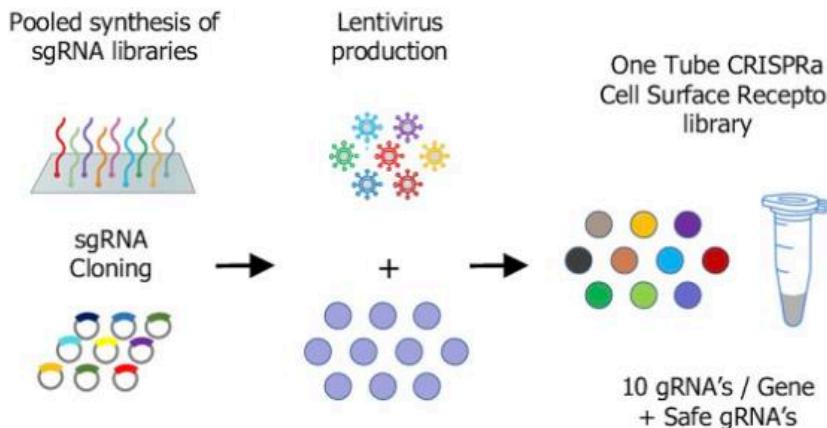
+ de 3200 récepteurs ciblés

10 ARNg / récepteur ciblé

Library Design

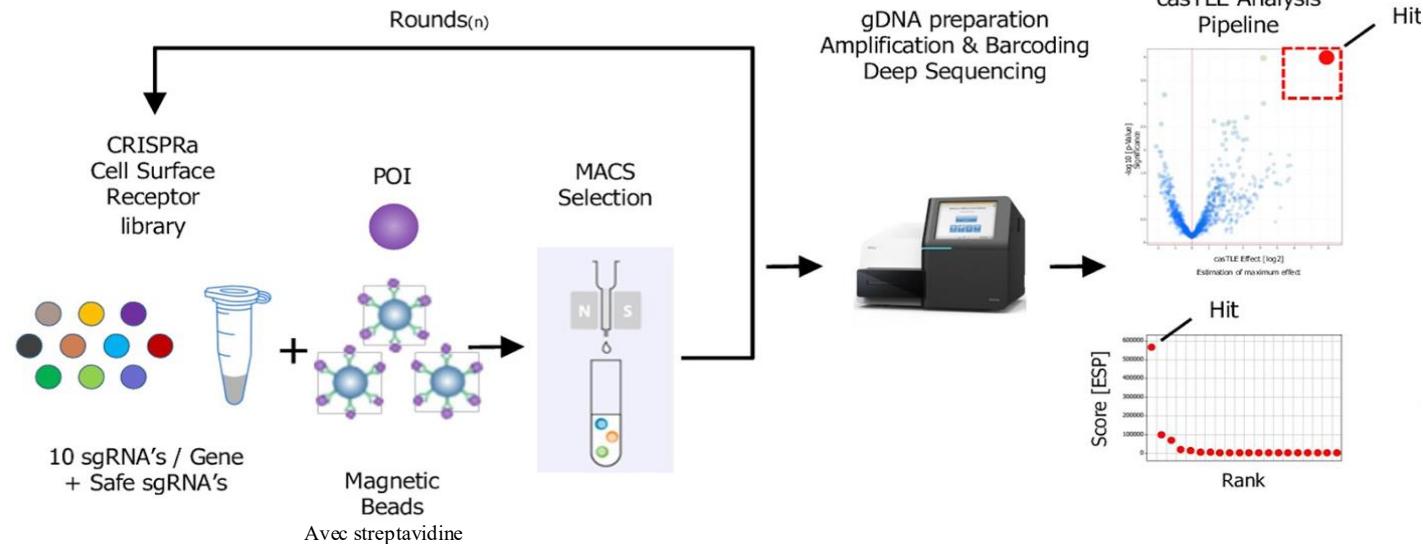


B) Formation d'une population cellulaire surexprimant les différents récepteurs membranaires



Une nouvelle approche pour identifier des récepteurs de surface cellulaire chez l'Homme...

C) Tri cellulaire et détection des récepteurs candidats



Liaison : Biotine-----streptavidine-bille magnétique

Plateforme de criblage de récepteurs ligand via enrichissement par CRISPRa

(Siepe *et al*, 2022)

- **Objectif de RP-SCREEN:**

- **Adaptation du protocole de Siepe *et al, 2022* :**

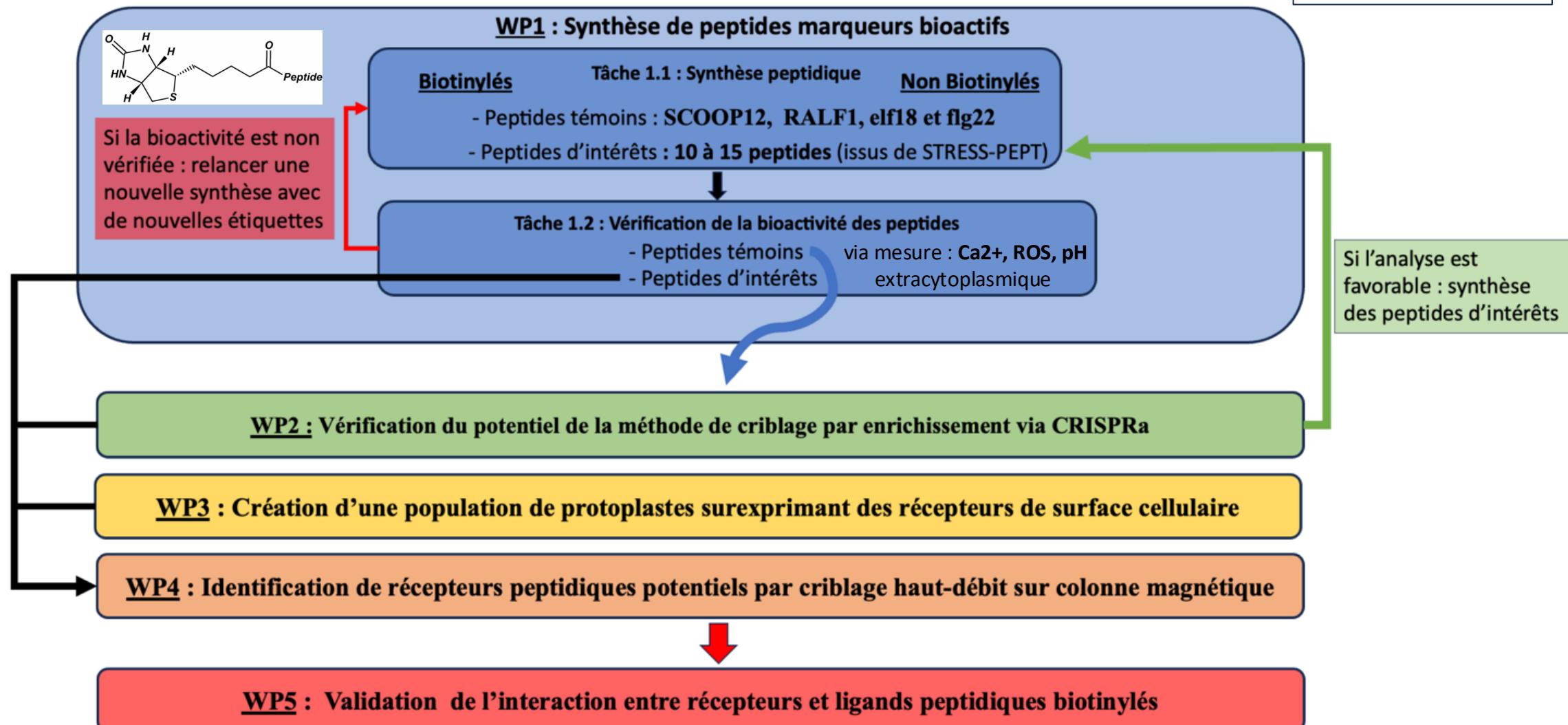
- Homme → Plantes**

- **Criblage CRISPRa + utilisation de peptides biotinylés**

- => Identification de récepteurs de phytocytokines**

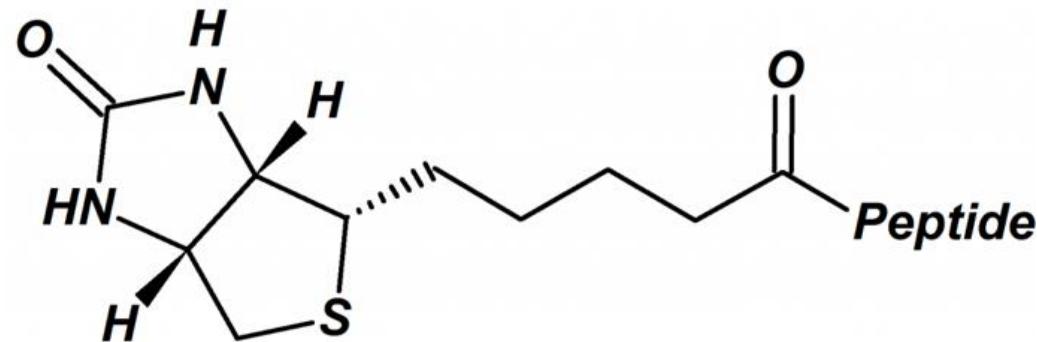
Organigramme général du projet RP-SCREEN

Durée du projet :
4 ans



WP1 : Synthèse des peptides marqueurs bioactifs

Peptide biotinylés



PEPSCAN

ISA

Synthèse des peptides témoins

Vérification de la bioactivité des peptides témoins

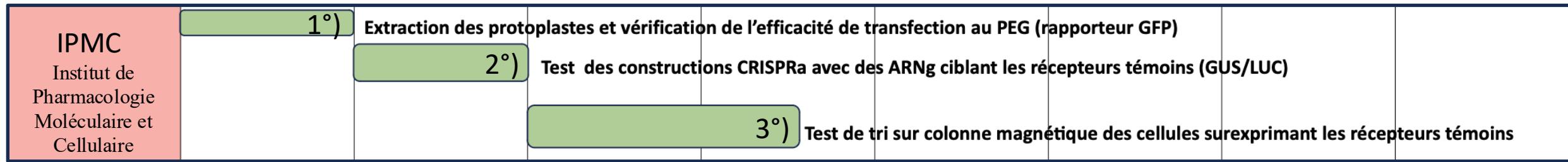
Synthèse des peptides d'intérêts

Vérification de la bioactivité des peptides d'intérêts

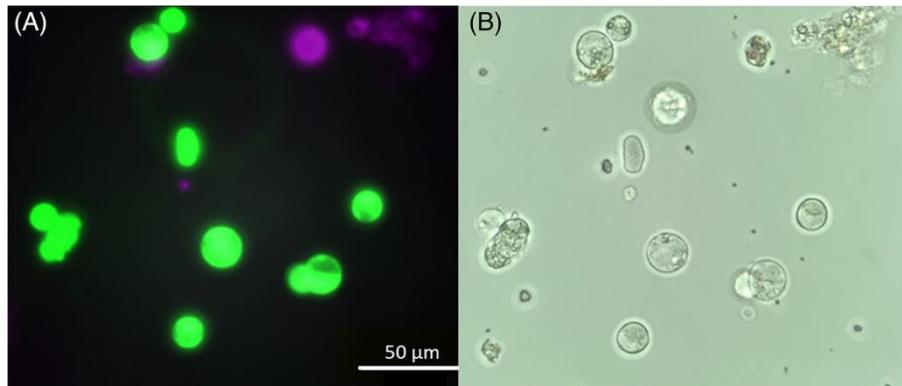
(Institut Sophia
Agrobiotech)

WP2 : Vérification du potentiel de la méthode de criblage CRISPRa

=> via l'étude de récepteurs-ligands témoins

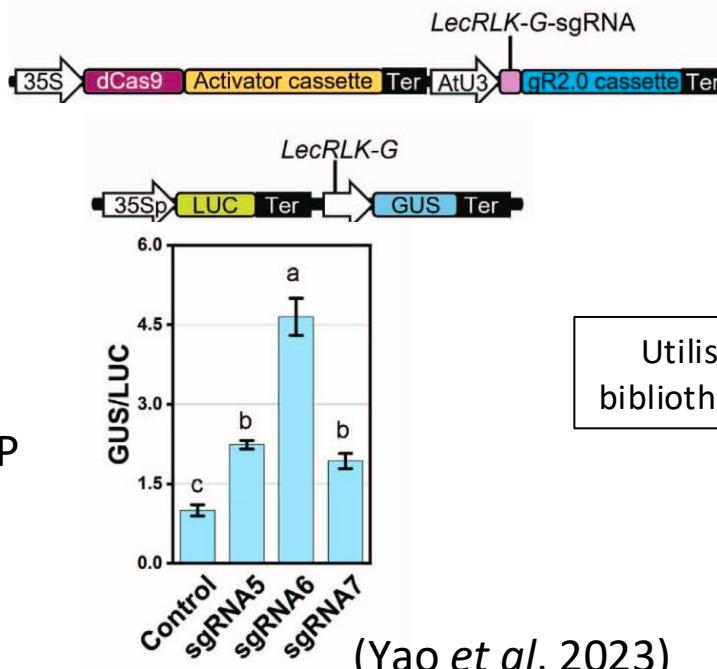


1°)



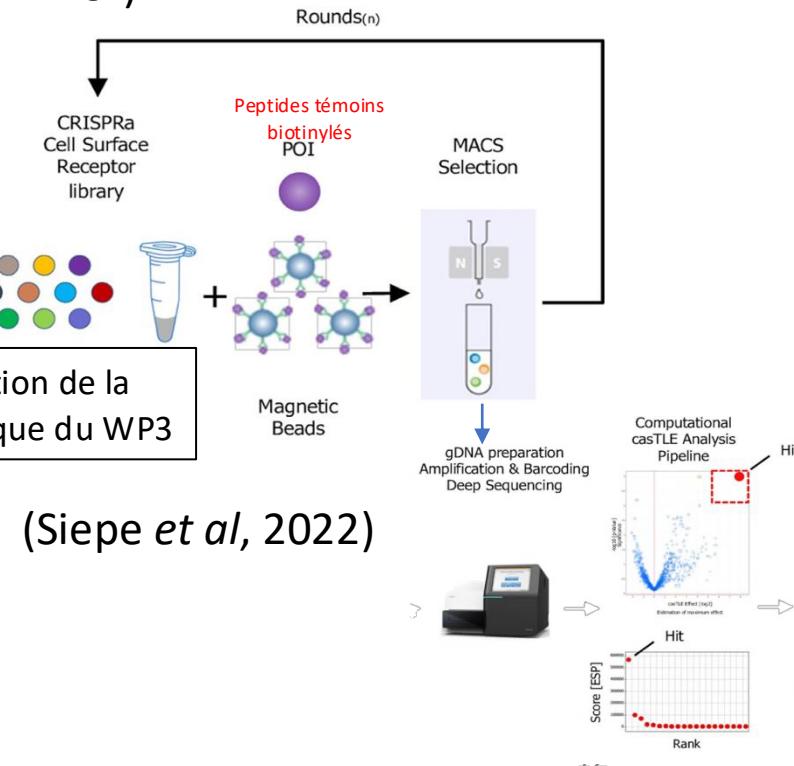
Protoplaste exprimant de manière transitoire la GFP
(Antoniadi *et al*, 2021)

2°)



Utilisation de la bibliothèque du WP3

3°)



- plateforme de criblage CRISPR (CRISPR SCREEN)
- plateforme d'analyse des biomolécules (PAB)

Développement d'une nouvelle approche pour le criblage haut débit de récepteurs de phytocytokines

WP3 : Création d'une population de protoplastes surexprimant des récepteurs membranaires

IPMC

1°) Création d'une bibliothèque d'ARNg et génération des constructions

2°) Transfection de protoplastes

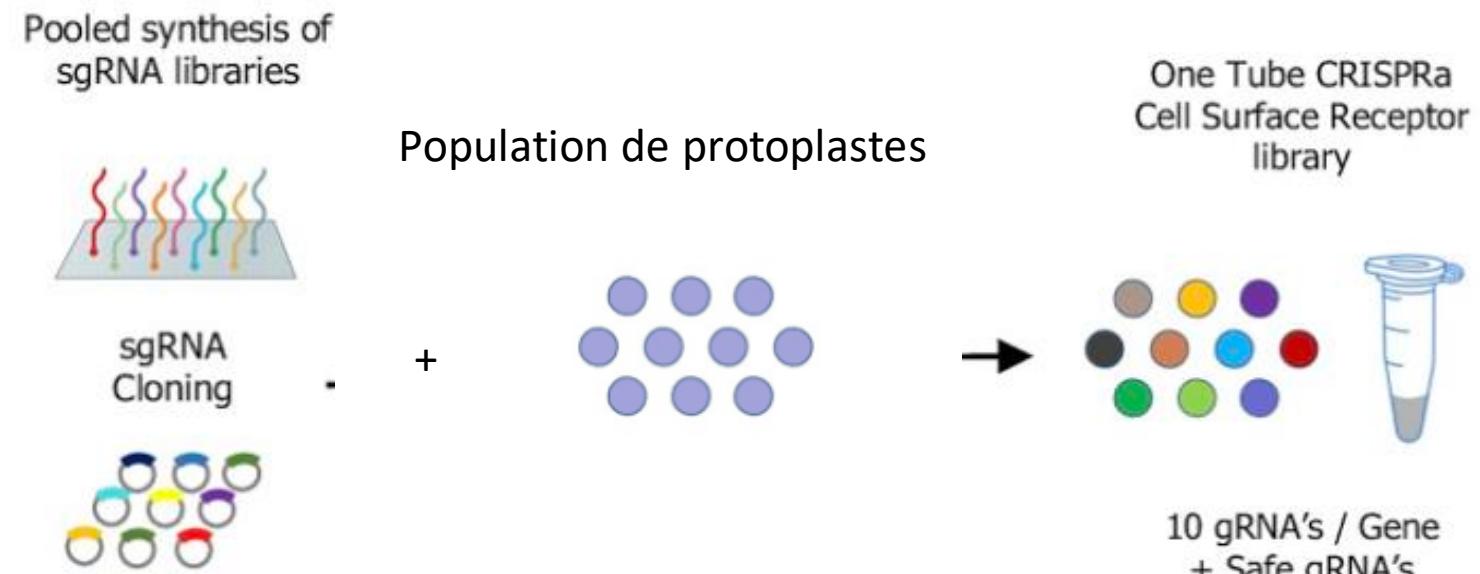
1°)

- Logiciel **CHOPCHOP**

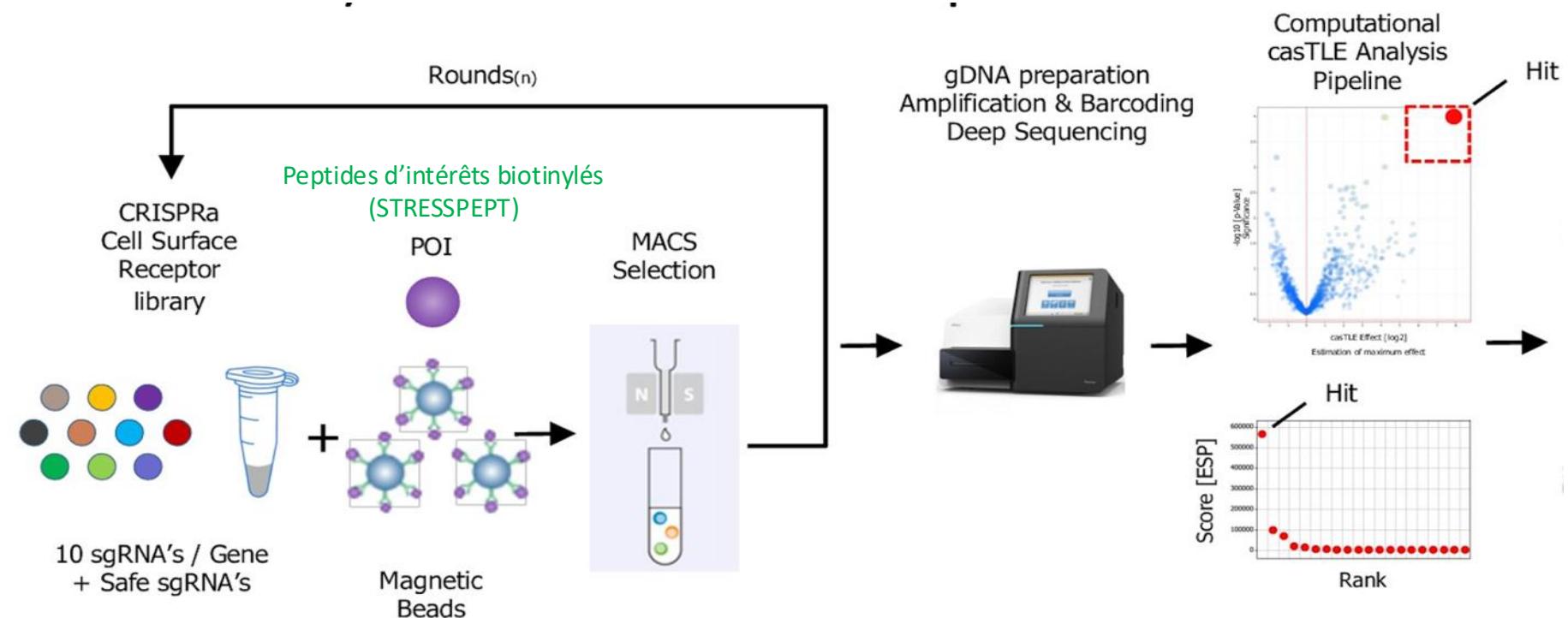
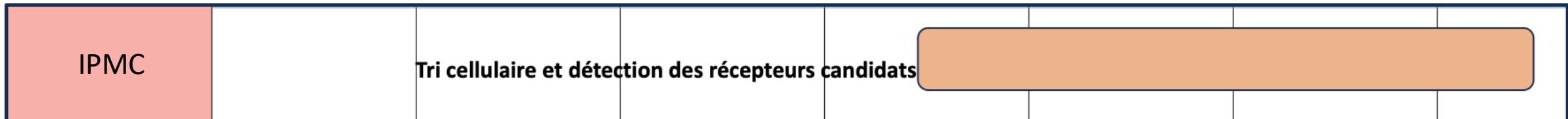
- RK et RLP

- LRR-RLK (226 membres)
- LRR-RLP (59 membres)
- + autres familles

10 ARNg / gène



WP4 : Identification de récepteurs peptidiques potentiels par criblage haut-débit



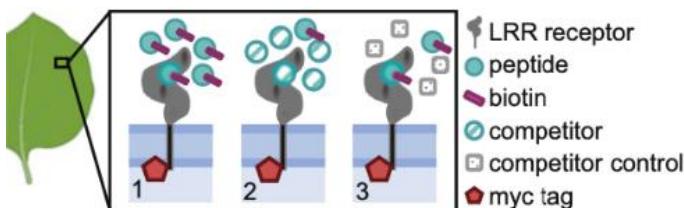
(Siepe *et al*, 2022)

WP5 : Validation des stratégies de criblage par la vérification fonctionnelle des récepteurs

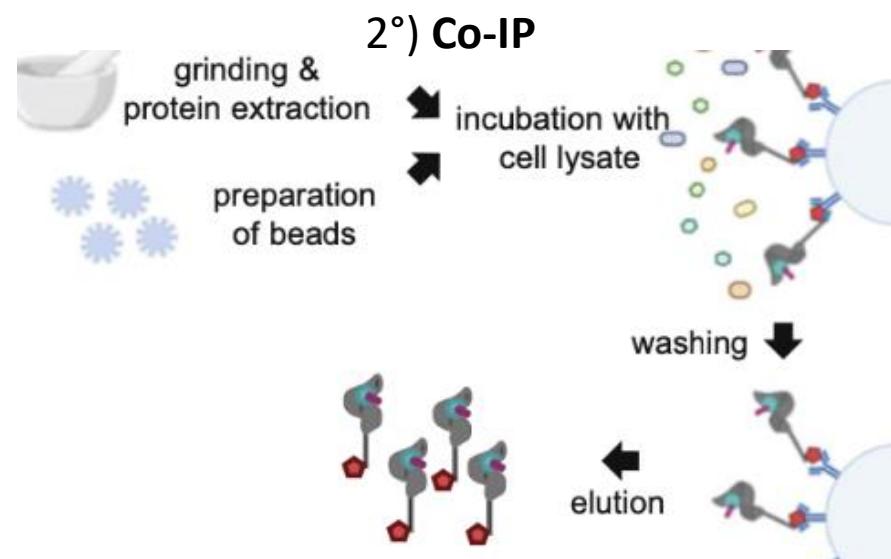
Institut Sophia
Agrobiotech
ISA

Validation de l'interaction entre récepteurs et ligands peptidiques biotinylés

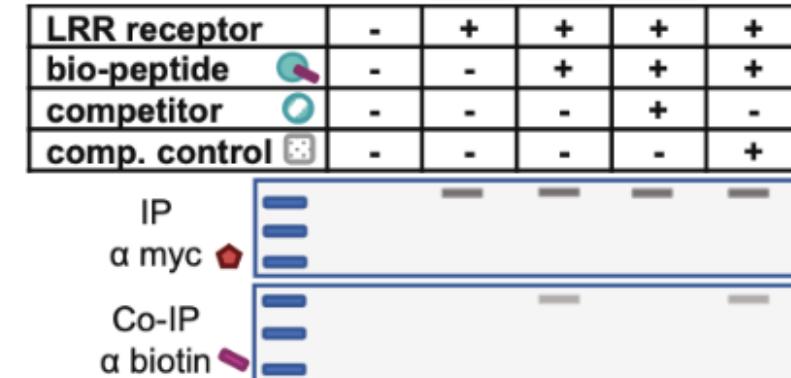
1°) Transformation transitoire de
Nicotinia tabacum
+ application du peptide biotinylé



Récepteur avec une étiquette myc

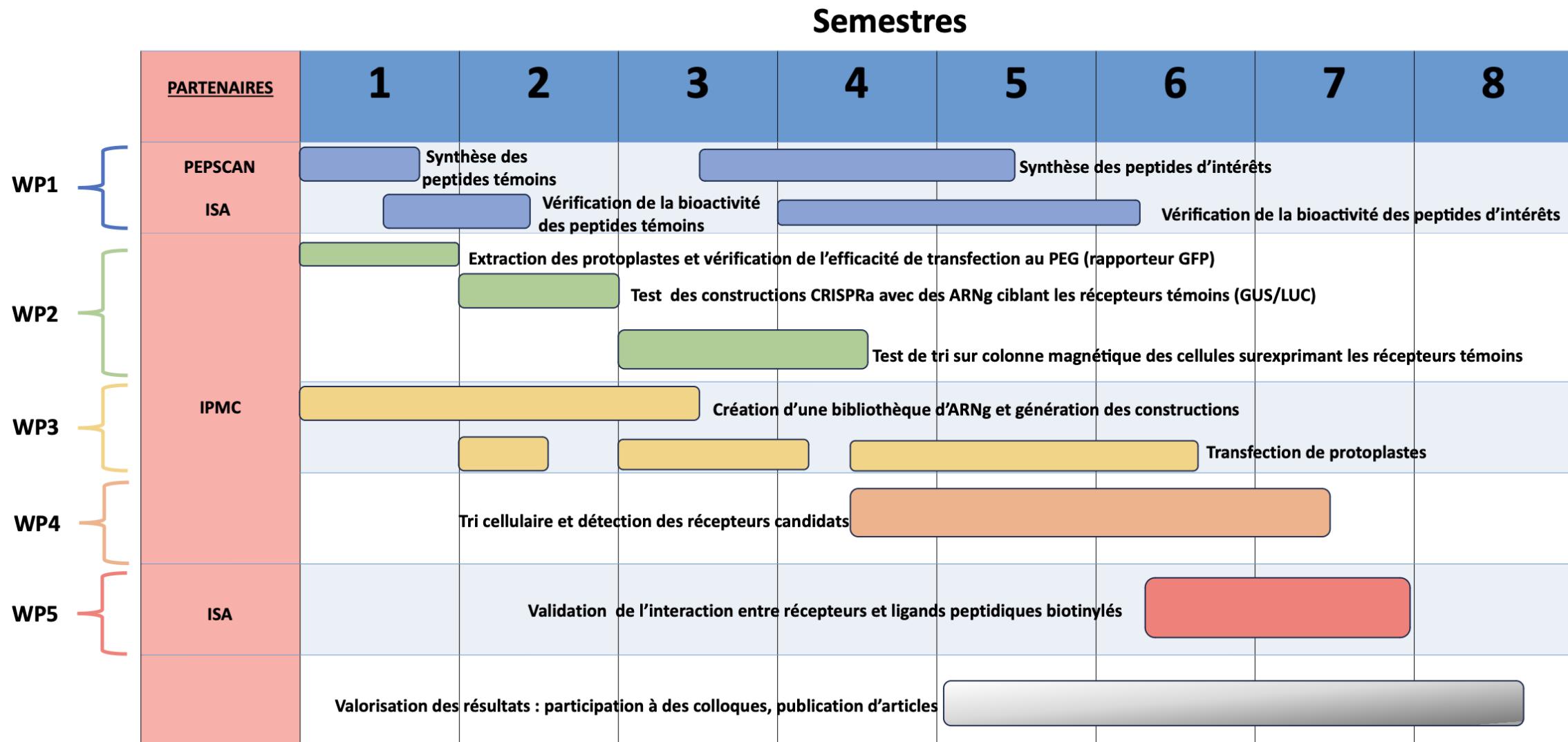


3°) Western blot



(Burggraf and Albert, 2024)

Diagramme de Gantt présentant le planning des différents WP et tâches du projet RP-SCREEN



Résultats attendus / Valorisation :

- **Caractérisation *In vivo* des Interactions Ligand-Récepteur :**

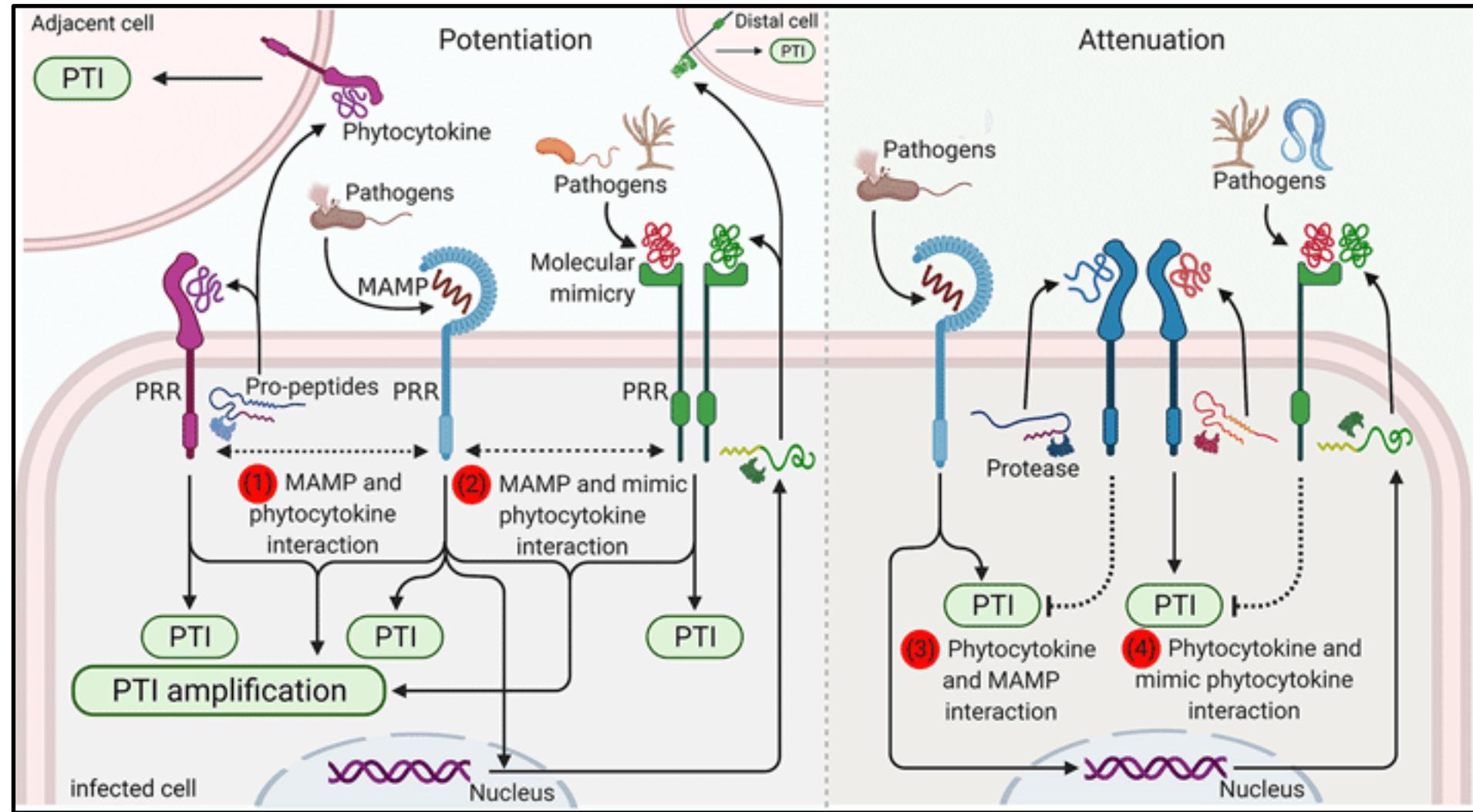
- Identification de nouveaux récepteurs membranaires impliqués dans la perception des phytocytokines (5)
- Amélioration connaissances en signalisation cellulaire, offrant des perspectives nouvelles sur la manière dont les plantes répondent aux stress environnementaux

- **Outil Précieux pour la Caractérisation des Récepteurs Membranaires :**

- La polyvalence de notre approche sera démontrée par son application réussie à d'autres molécules peptidiques, telles que les MAMPs et les étendant ainsi son utilité à la caractérisation de récepteurs-ligands dans divers contextes biologiques.
- Nouvelles possibilités dans la caractérisation haut débit de récepteurs membranaires chez différentes plantes d'intérêt agronomique.

En conclusion, les résultats attendus de ce projet, combinés aux retombées potentielles, confirment la pertinence et l'ampleur de notre démarche. Ces avancées contribueront non seulement à la connaissance fondamentale en biologie des plantes, mais offriront également des outils novateurs pour la communauté scientifique.

Contexte du Projet



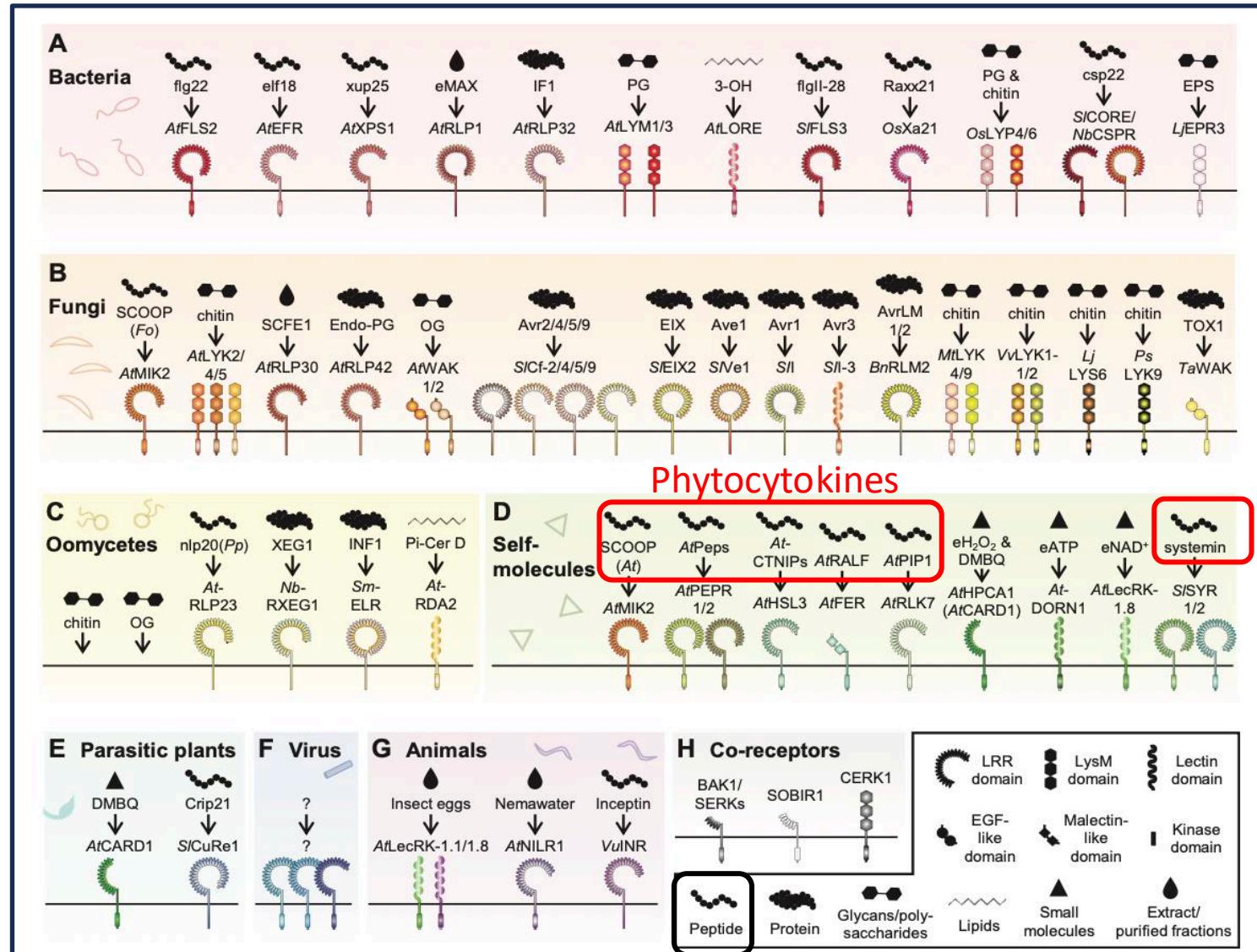
(Ge et al, 2022)

Potentiation mutuelle et/ou atténuation de l'immunité par les MAMPs et les DAMPs et des peptides issus des agents pathogènes imitant les phytocytokines.

Contexte du Projet

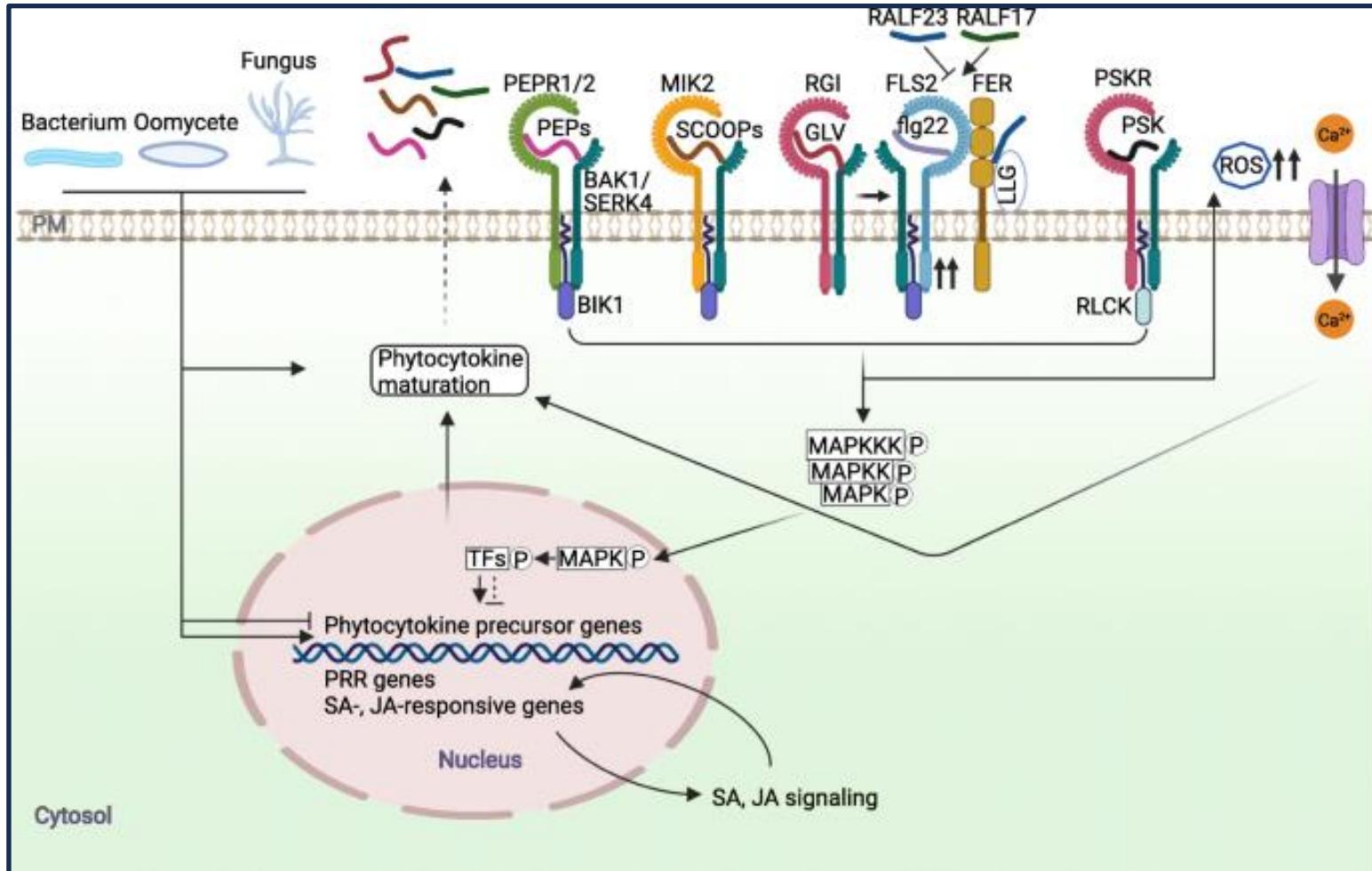
Récepteurs membranaires impliqués dans l'immunité des plantes

(Ngou *et al*, 2022)



Développement d'une nouvelle approche pour le criblage haut débit de récepteurs de phytocytokines

Contexte du Projet



(Hou et al, 2021)

Implication de récepteurs de surface cellulaire dans la perception de Phytocytokines

Partenaires :

Pepscan :

Principal fabricant de peptides personnalisées de haute qualité

Institut Sophia Agrobiotech (ISA) :

Les chercheurs de l'ISA ont une longue expérience dans l'analyse moléculaire et génétique des interactions plantes-pathogènes impliquant, en particulier, des peptides sécrétés et des petites protéines. L'ISA a participé dans le cadre de l'ANR STRESS-PEPT (2020-2024) à la caractérisation fonctionnelle des peptides d'intérêts pour lesquels nous chercherons à identifier les récepteurs dans notre projet RP-SCREEN. L'institut participera à la vérification de la bioactivité des peptides synthétique (WP1) et à la vérification fonctionnelle des récepteurs.

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC) :

L'institut dispose d'une **plateforme de criblage CRISPR** (CRISPR SCREEN) qui permet un soutien sur les technologies CRISPR/(d)Cas9 afin d'effectuer des expériences d'améliorer les stratégies de vectorisation des constructions ; et de réaliser des cibles d'expression via CRISPRa. Celui-ci dispose également d'une **plateforme d'analyse des biomolécules** (PAB) qui nous permettra de réaliser l'enrichissement cellulaire sur colonne magnétique.

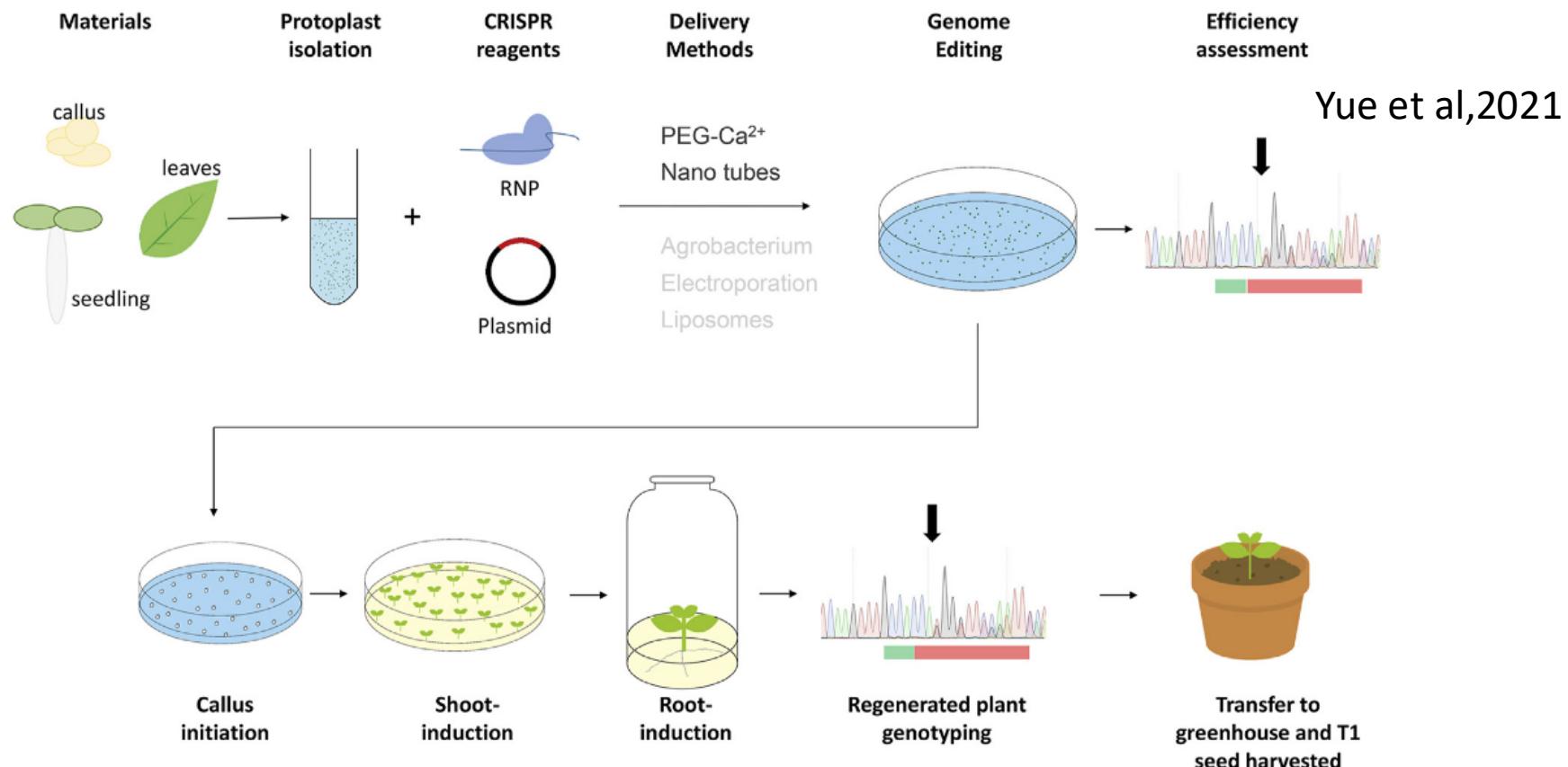
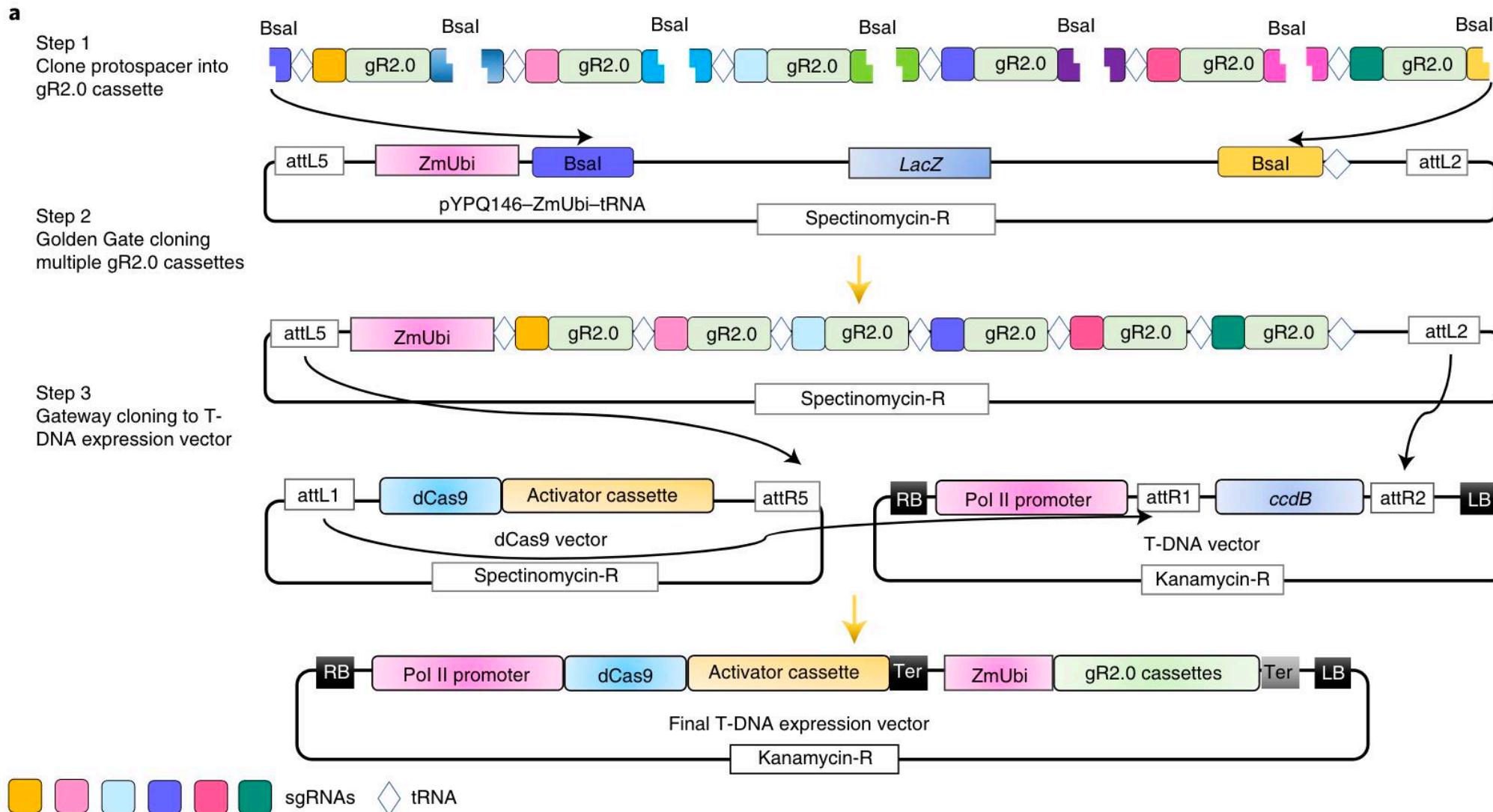
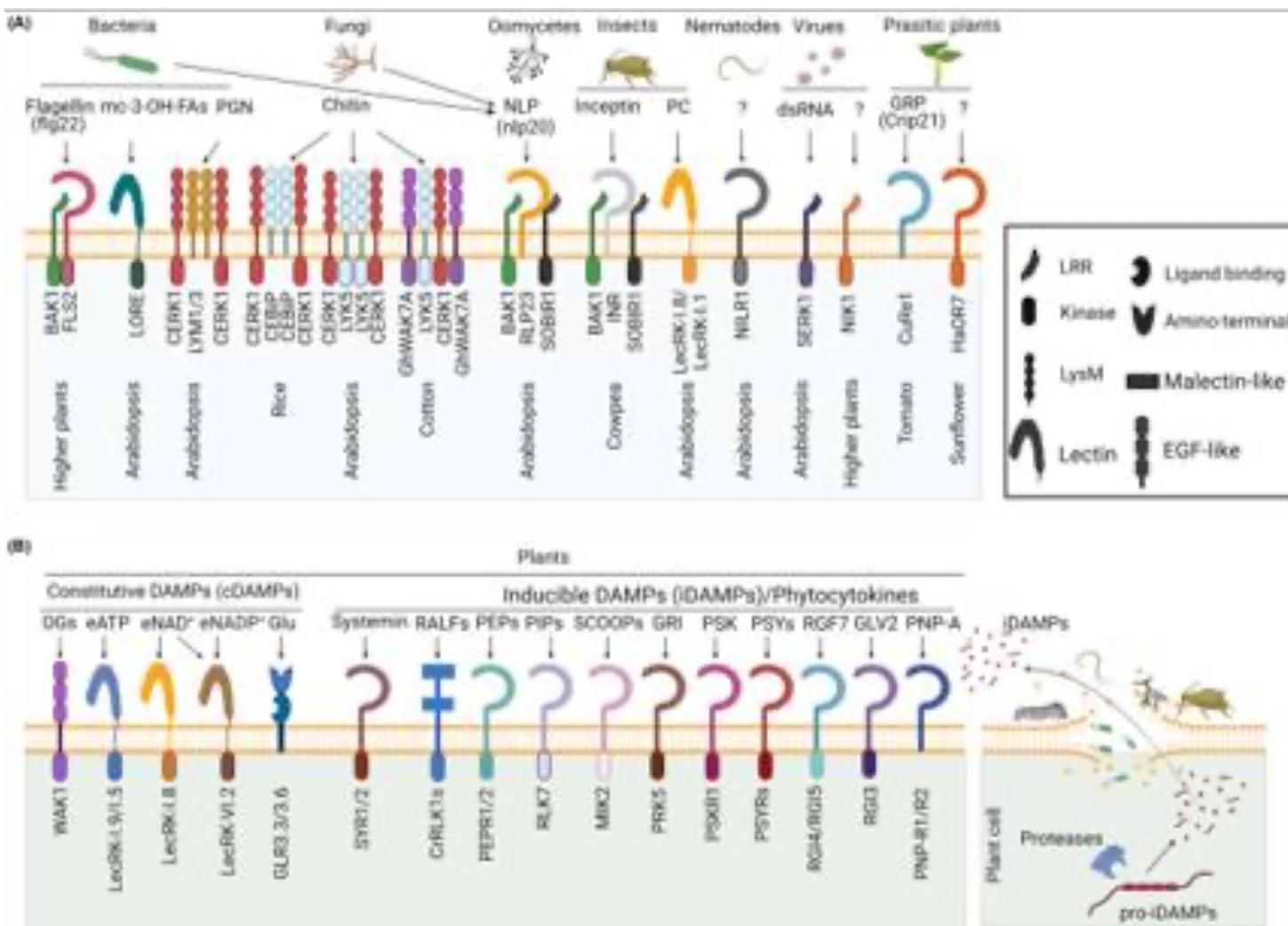
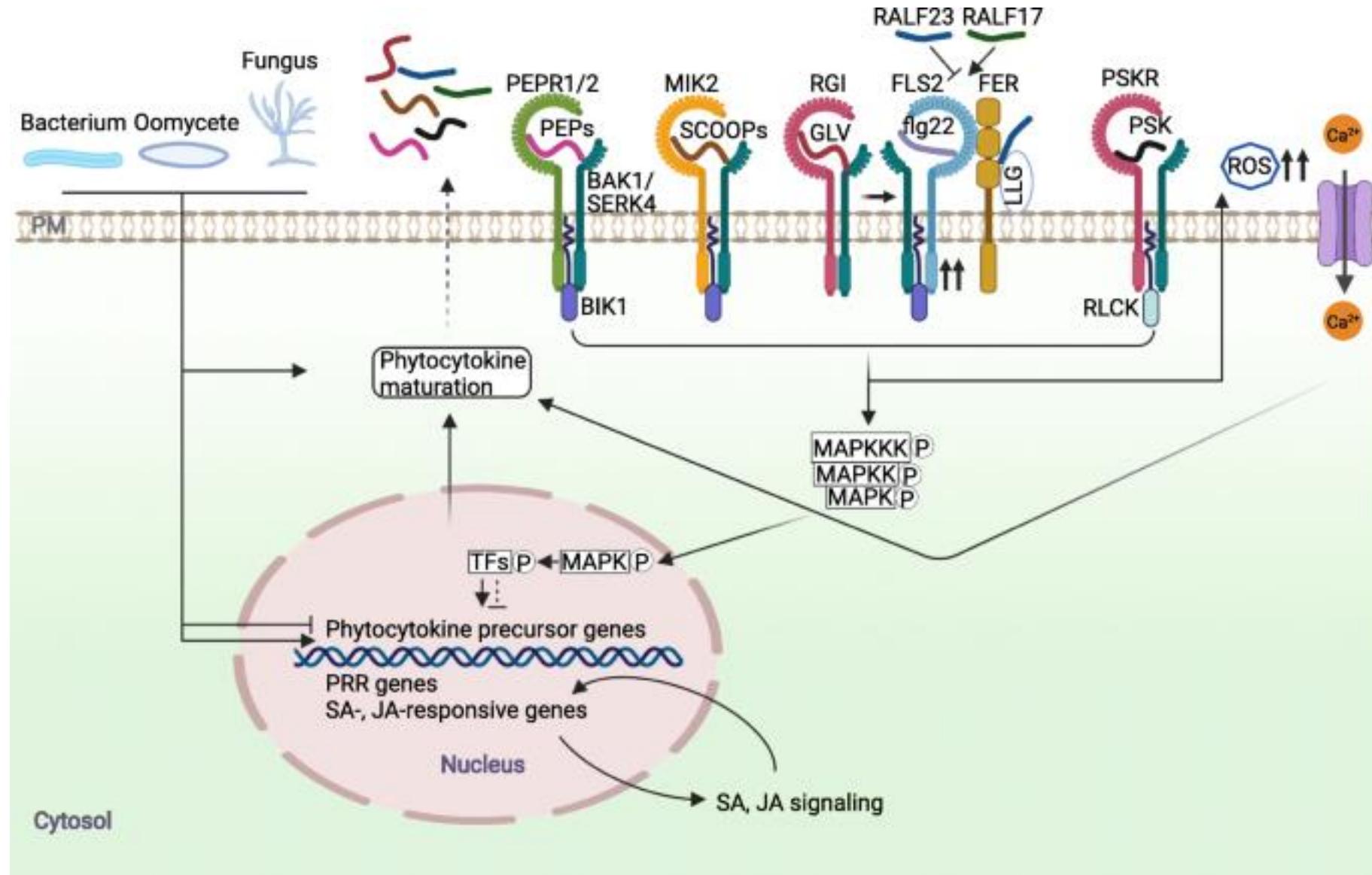


FIGURE 1 | Protoplast regeneration and CRISPR genome editing. **(A)** Protoplast regeneration-related articles according to taxonomy. These 779 protoplast regeneration articles were identified from Google scholar and NCBI (**Supplementary Table S1**). The taxonomy of the plant species follows the Angiosperm Phylogeny Group IV system and NCBI taxonomy. Major families are color coded as follows: purple; Asteraceae, light orange; Solanaceae, green; Brassicaceae, orange; Rutaceae, blue; Fabaceae, yellow-green; Poaceae. The names of the species reported in more than five articles are shown. The rest of the species are shown in grey. The information used to create this diagram is shown in **Supplementary Table S1**. **(B)** Schematic of tobacco protoplast regeneration. Delivery methods stated in grey are the methods used for protoplast transformation that can theoretically be applied in genome editing. The multiple peaks (black arrows in “Efficiency assessment” and “Progeny genotyping”) in the upstream of PAM (green boxes) are indicated. The target site (red boxes) is edited by CRISPR reagent.

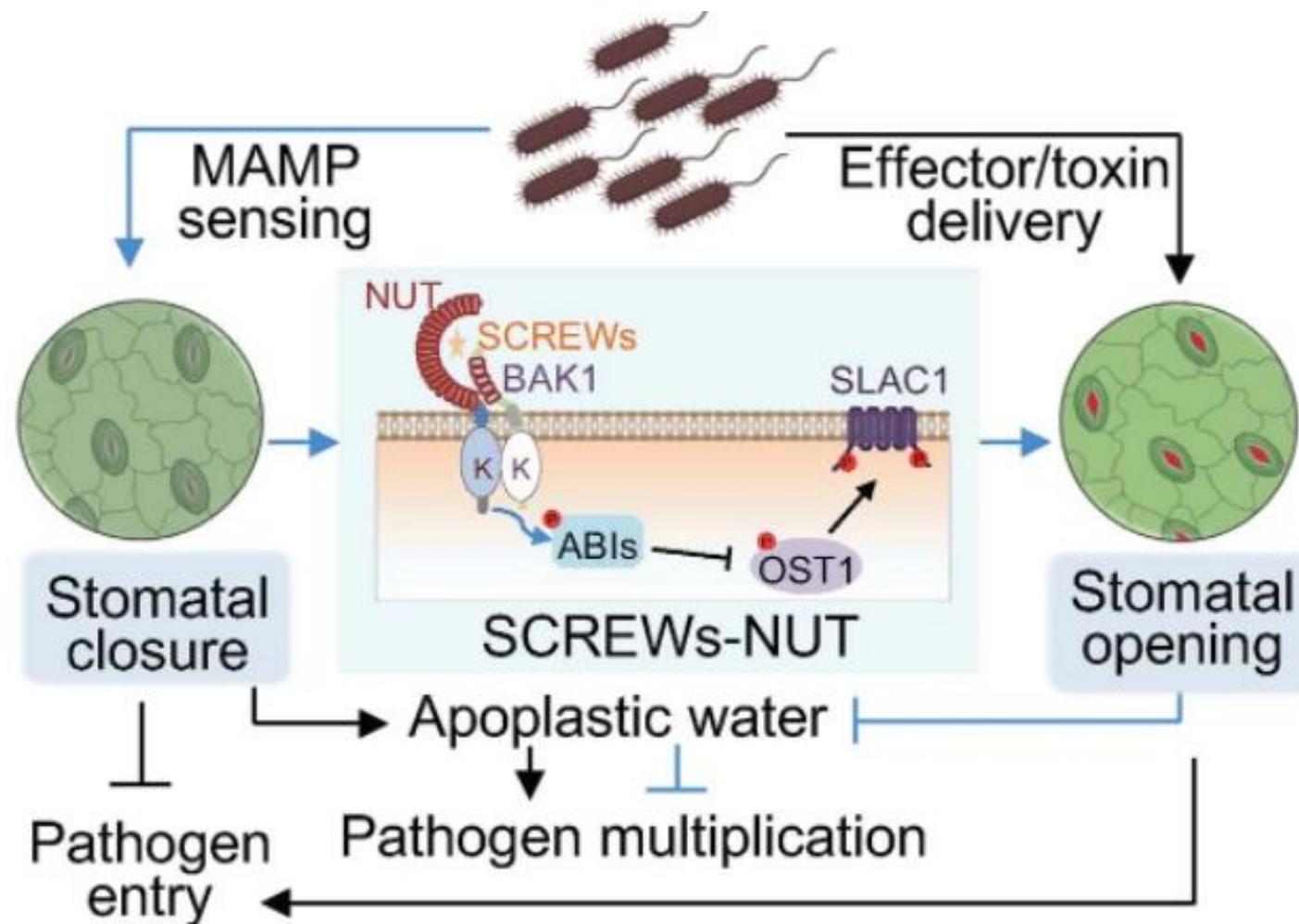


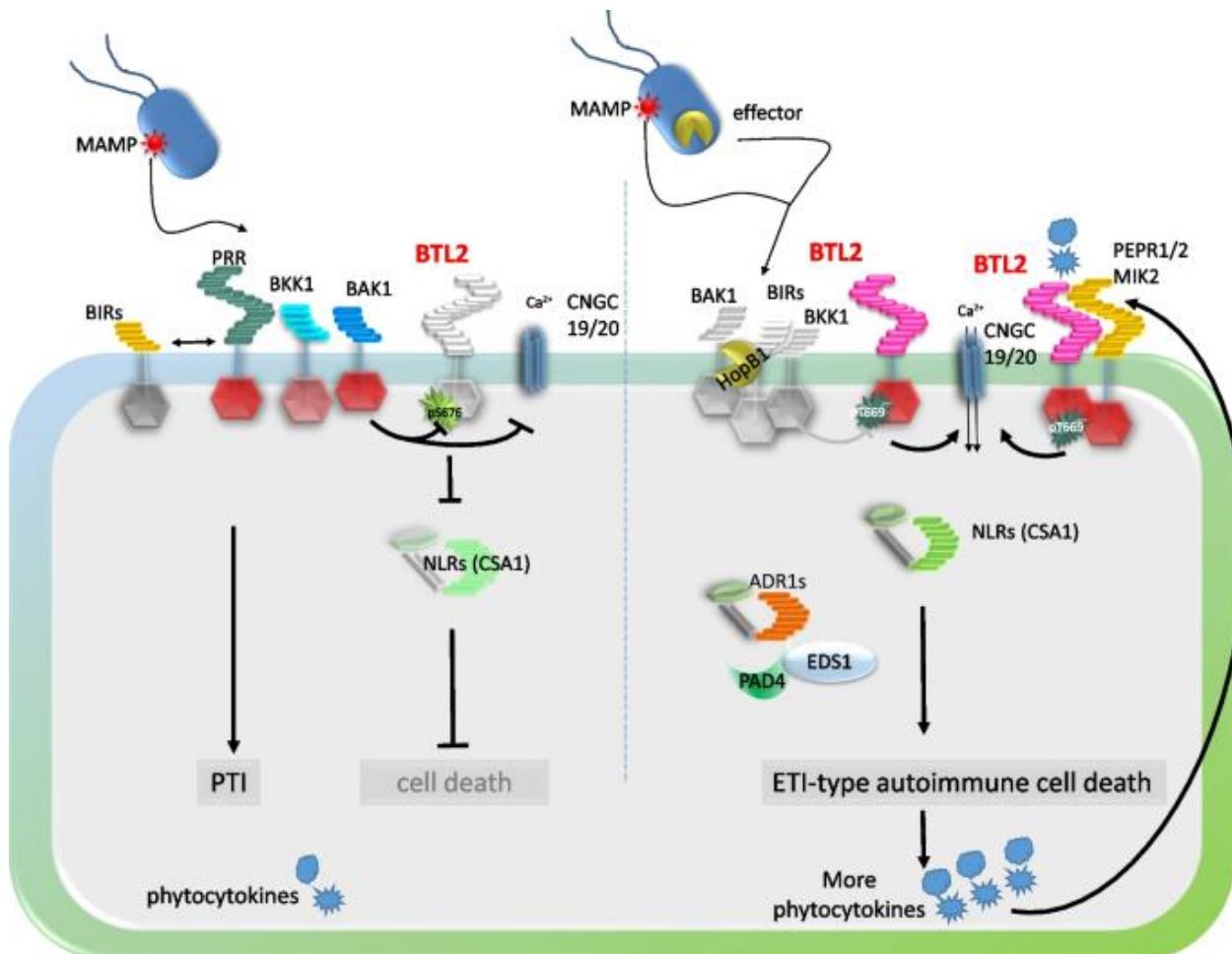


(Ge et al, 2022)



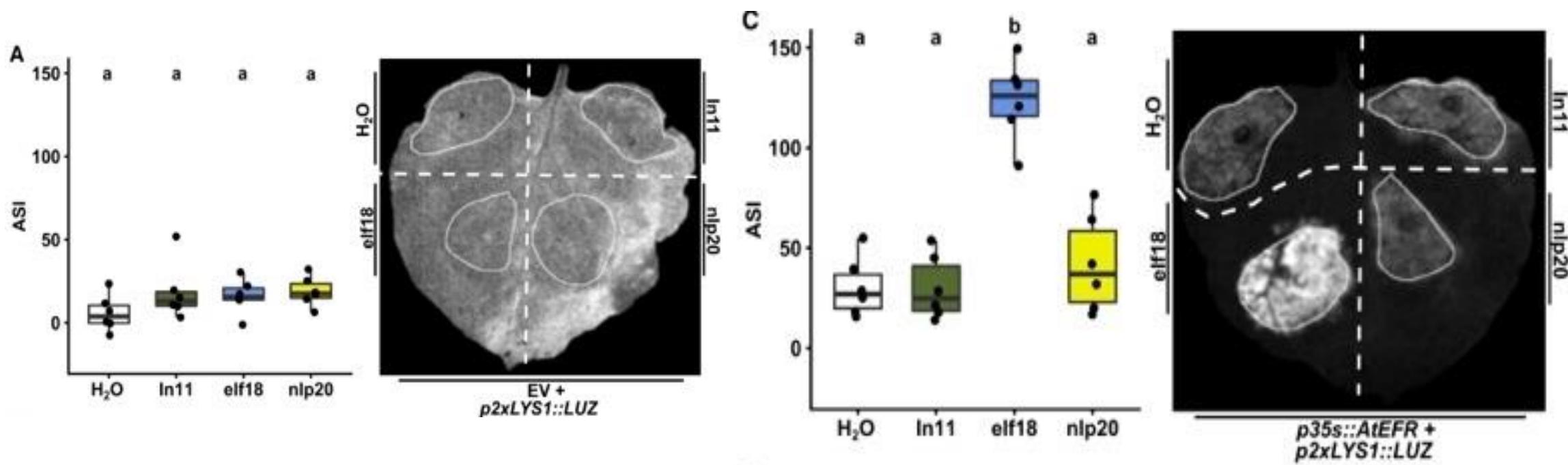
(Hou et al, 2021)



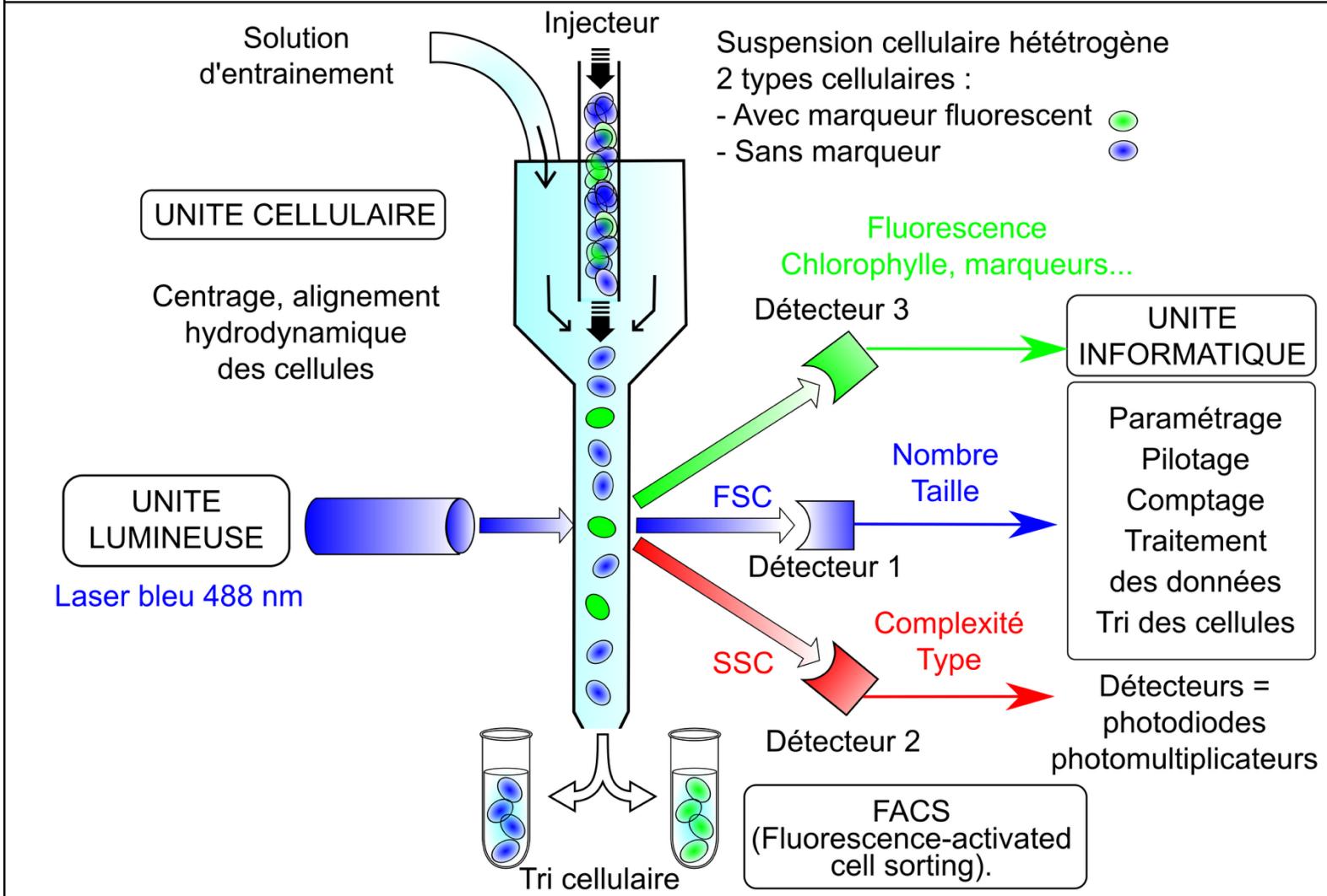


Tâche 5.1 : Validation de récepteurs immunitaires via l'utilisation d'un rapporteur bioluminescent spécifique de la PTI

Une première stratégie (Siepe et al., 2022)[\[VG1\]](#) sera utilisé uniquement pour caractérisé les récepteurs des peptides qui sont impliqués dans le déclenchement des réponses immunitaires. Celle-ci consiste en l'utilisation d'une construction rapportrice bioluminescente (*p2xLYS1:::LUZ*) qui s'exprime uniquement lorsque le récepteur exprimé de manière hétérologue perçoit le peptide d'intérêt et déclenchent l'activation immunitaire. Ce rapporteur minimise la quantité de travail, de réactifs et de temps nécessaire pour analyser la fonction des récepteurs membranaires et affiche une sensibilité robuste aux concentrations de PAMPs/peptides biologiquement pertinentes, ce qui le rend idéal pour les cibles à haut débit.



UNITES D'UN CYTOMETRE DE FLUX



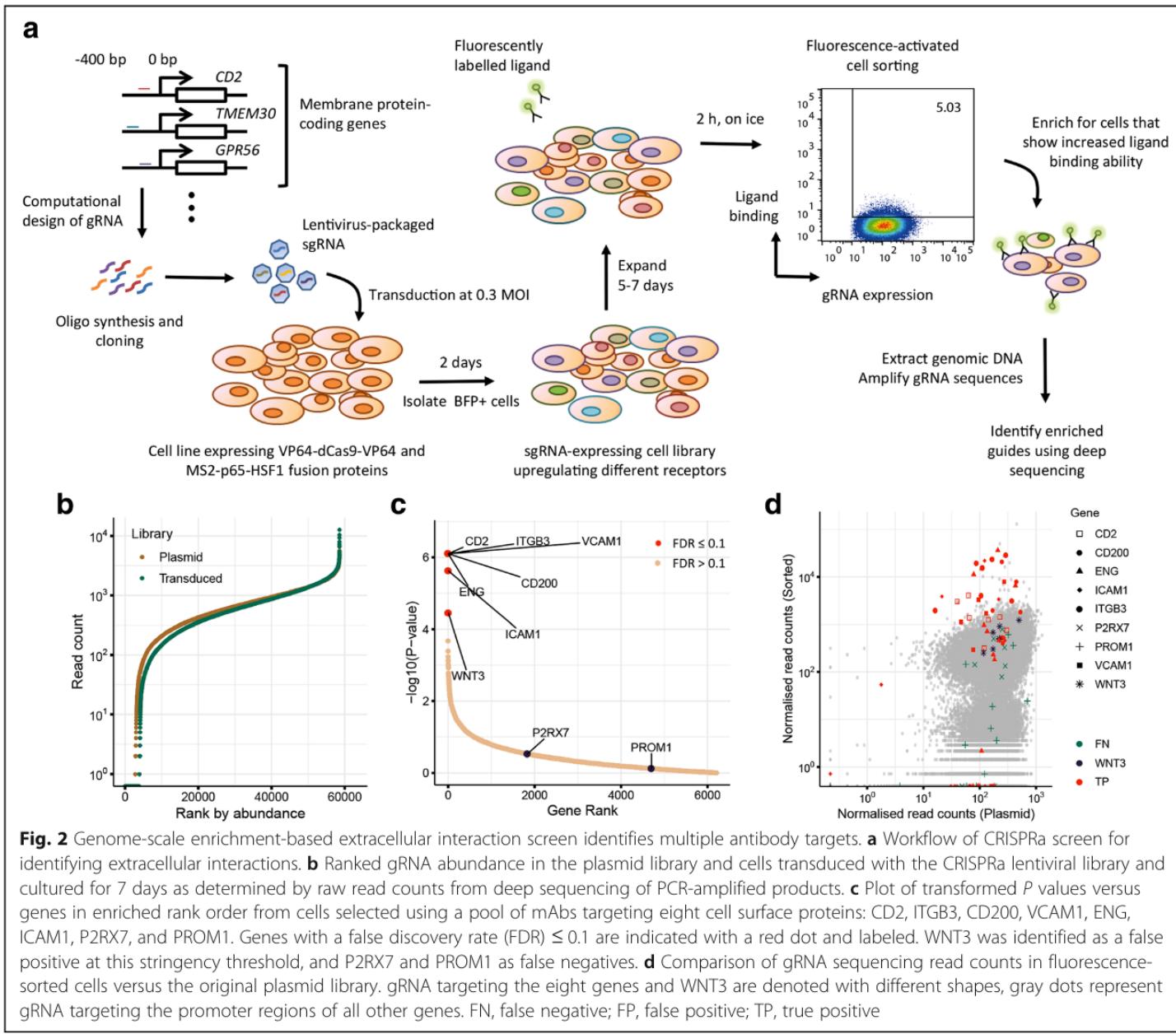


Fig. 2 Genome-scale enrichment-based extracellular interaction screen identifies multiple antibody targets. **a** Workflow of CRISPRa screen for identifying extracellular interactions. **b** Ranked gRNA abundance in the plasmid library and cells transduced with the CRISPRa lentiviral library and cultured for 7 days as determined by raw read counts from deep sequencing of PCR-amplified products. **c** Plot of transformed P values versus genes in enriched rank order from cells selected using a pool of mAbs targeting eight cell surface proteins: CD2, ITGB3, CD200, VCAM1, ENG, ICAM1, P2RX7, and PROM1. Genes with a false discovery rate (FDR) ≤ 0.1 are indicated with a red dot and labeled. WNT3 was identified as a false positive at this stringency threshold, and P2RX7 and PROM1 as false negatives. **d** Comparison of gRNA sequencing read counts in fluorescence-sorted cells versus the original plasmid library. gRNA targeting the eight genes and WNT3 are denoted with different shapes, gray dots represent gRNA targeting the promoter regions of all other genes. FN, false negative; FP, false positive; TP, true positive