	Master "Biologie végétale" 2 ^{ème} année Acquisition de la démarche scientifique – Projet de recherche	<i>Réservé à l'administration</i>
	Document de soumission	Edition 2023-2024

Coordonateur du projet / <i>Principal Investigator</i>	GOUPILLE, Valentin
Acronyme / <i>Acronym</i>	RP-SCREEN
Titre du projet	Utilisation d'une nouvelle technique de criblage cellulaire haut débit exploitant la CRISPRa pour la caractérisation de récepteurs de surface cellulaire participant à la détection des phytoctokines.
<i>Title of the proposal</i>	Characterization of cell surface receptors involved in the recognition of phytoctokines through the use of a novel high-throughput cell screening method employing CRISPRa.

Programme scientifique et technique. Description du projet /
Technical and scientific description of the activities

1. Problème posé / *Rationale*

Les peptides sécrétés (phytoctokines) jouent un rôle crucial dans les mécanismes de croissance et de défense des plantes. Récemment, plusieurs de ces peptides ont été identifiés comme des acteurs clés dans la réponse des plantes à divers bioagresseurs. Certaines de ces phytoctokines peuvent être détectés par la plante via des récepteurs localisés au niveau de la membrane cytoplasmique, déclenchant ainsi des réponses cellulaires. La caractérisation de la perception de ces ligands par les récepteurs se fait généralement par des approches génétiques ou biochimiques qui sont généralement assez longue à réaliser, pas toujours représentative des interactions se déroulant *in vivo* et ne permettent pas une exploration exhaustive de toute la diversité de récepteurs produits par la plante. Une nouvelle méthode de criblage cellulaire haut débit utilisant l'activation CRISPR (CRISPRa) a récemment été mise au point chez l'Homme et a permis l'identification de nombreuses interactions récepteurs-ligands. Ce programme de recherche fondamental vise à utiliser cette approche de criblage haut débit afin de caractériser divers récepteurs membranaires impliqués dans la perception de ces peptides sécrétés chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*.

2. Contexte et enjeux du projet / *Background, state of the art, issues and hypothesis*

Les bioagresseurs entraînent près de 30% de pertes de production agricole (Savary et al., 2019). La problématique des dommages causés aux cultures par le stress biotique devrait s'aggraver avec les changements climatiques à venir, représentant un défi majeur pour la suffisance alimentaire à l'échelle mondiale. Il devient donc essentiel de mieux comprendre précisément les mécanismes qui régissent le contrôle de la défense des plantes contre les agressions extérieures.

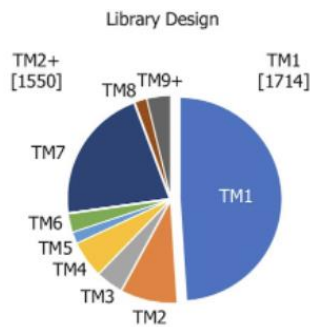
En réponse aux stress, les plantes produisent et sécrètent dans l'apoplasme une gamme de peptides de signalisation. Certains de ces petits peptides sécrétés (5 à 200 acides aminés) ont été initialement identifiés comme étant des régulateurs du développement des plantes, de la reproduction ou de la réponse au stress abiotique se sont révélées impliquées dans l'immunité des plantes. De même, certains peptides immunologiques jouent également un rôle dans d'autres processus physiologiques. Ces peptides peuvent être perçus par les cellules exprimant des récepteurs apparentés de manière autocrine, paracrine ou même systémique, modulant ainsi les réponses au stress ultérieures. Bon nombre de ces réponses se chevauchent avec celles déclenchées par les éliciteurs immunitaires ou modulent la signalisation immunitaire. De tels peptides ont ainsi été appelés phytocytokines, par analogie avec les cytokines métazoaires. Des phytocytokines distinctes peuvent potentialiser ou atténuer les réponses immunitaires (Rhodes and Zipfel, 2024).

Dans le cadre du projet ANR STRESS-PEPT (2020-2024), de nombreux peptides sécrétés ont été identifiés chez *Arabidopsis thaliana* en réponse à divers stress biotiques (champignon, oomycète, nématodes). La perception de ces petits peptides sécrétés se fait de la même manière que les DAMPs (motifs moléculaires associés aux dommages) et MAMPs (motifs moléculaires associés aux microbes), c'est-à-dire par l'intermédiaire de récepteurs membranaires de type récepteur (RLK) ou des protéines de type récepteur (RLP) (Ngou *et al.*, 2022). Les récepteurs impliqués dans la perception des phytocytokines issu du projet STRESS-PEPT restent pour le moment encore inconnus.

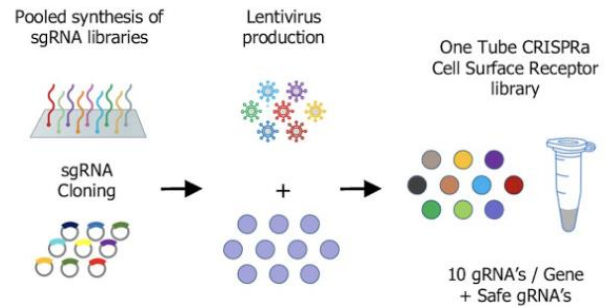
Un nombre relativement restreint de méthodes génétiques et biochimiques ont été employé pour identifier des récepteurs de surface cellulaire chez les plantes. La diversité naturelle au sein d'une espèce, la variation naturelle a été utilisée pour cartographier plusieurs récepteurs tel que RLP1 (Jehle *et al.*, 2013). Cette approche de génétique « directe » a été couronnée de succès, mais elle repose sur des ressources génomiques, une variation phénotypique génétiquement déterminée préexistante et, selon les espèces, peut être très coûteuse en termes de temps, de croissance des plantes et de génotypage. Des approches de génétique « inverse » via l'utilisation de mutants d'insertion de l'ADN-T a conduit à l'identification de plusieurs récepteurs de PAMPs tel que EFR, qui perçoit le PAMP bactérien elf18 (Zipfel *et al.*, 2006). De la même manière, la technologie CRISPR-Cas9 peut être utilisé pour créer des mutants Knock-Out. Toutefois, les approches génétiques sont limitées par la redondance fonctionnelle des récepteurs, des approches biochimiques peuvent aider à surmonter cette limitation. Un ligand marqué peut être utilisé pour purifier ses récepteurs. Cette approche repose sur une affinité élevée entre le ligand et le récepteur pour permettre la co-purification. Plusieurs PRR (Pattern recognition receptor) ont été identifiés à l'aide de ligands marqués, tel que PEPR1 qui a été identifié l'aide de ligands photoréticulables radiomarqués au 125I (Kaku *et al.*, 2006). Les ligands marqués ont été appliqués à des cultures cellulaires en suspension, réticulés aux récepteurs par la lumière UV, puis identifiés à partir de gels SDS-PAGE. Des approches similaires peuvent être appliquées à l'aide de billes marquées par des ligands pour purifier le récepteur (Petutschnig *et al.*, 2010). Une restriction de ces approches réside dans leur difficulté à identifier les récepteurs présents en faible quantité. Pour tenter de remédier à ce problème, une bibliothèque de cellules BY-2 du tabac a été générée en surexprimant les LRR-RK afin de les cribler avec des ligands marqués, ce qui a été utilisé avec succès pour identifier les récepteurs CEP et CIF (Shinohara and Matsubayashi, 2017). Ces banques de surexpression d'ADNc, sont toutefois gourmandes en ressources difficile à générer et à maintenir. L'approche peut également être entièrement adoptée *in vitro* avec l'utilisation d'ectodomaines récepteurs exprimés de manière recombinante pour identifier les interaction récepteurs-ligands. La filtration sur gel peut être utilisée pour séparer les ectodomaines LRR, et les peptides liés, d'un pool de peptides de bibliothèque, le peptide associé peut ensuite être identifié à l'aide de la spectrométrie de masse (Song *et al.*, 2016).

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

+ de 3200 récepteurs ciblés
10 ARNg / récepteur ciblé



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



C) Tri cellulaire et détection des récepteurs candidats

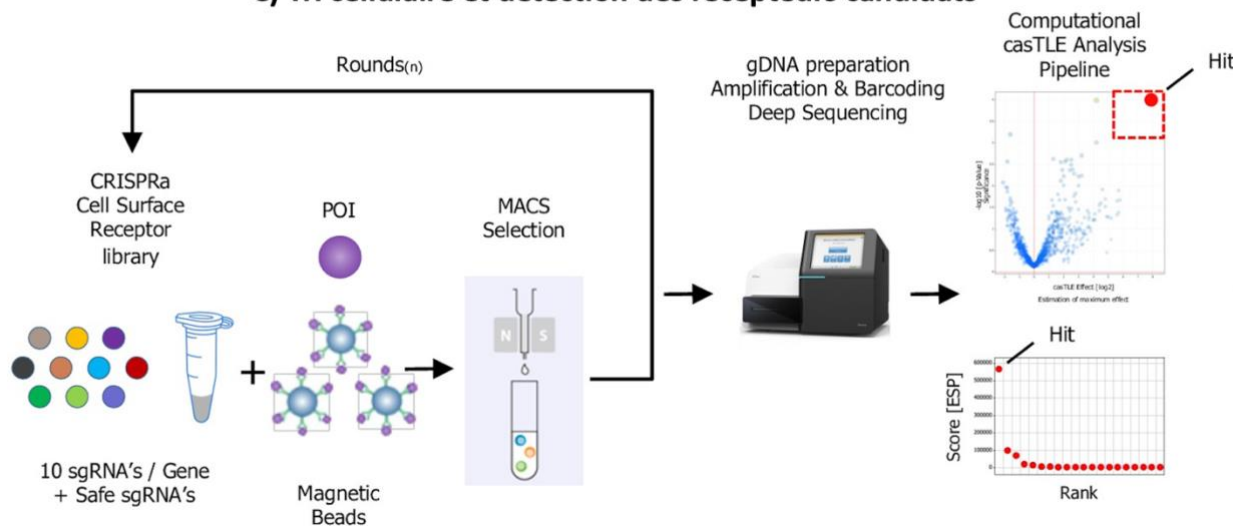


Figure 1 : Vue d'ensemble de la plateforme de criblage par enrichissement par activation CRISPR (CRISPRa) (adapté de Siepe *et al.*, 2022)

- Conception d'une bibliothèque de brins guides (ARNg) personnalisées et ciblant spécifiquement des récepteurs transmembranaires à passage unique (TM1) et transmembranaires à passes multiples (TM2+) (10 ARNg/cible)
- Les banques de brins guide ciblant des récepteurs membranaires sont ensuite clonées et infectées lentiviralement dans des cellules K562-SunCas9 à faible multiplicité d'infection (MOI).
- Une protéine/peptide d'intérêt (POI) est complexée à l'aide de billes magnétiques et criblée par rapport à une bibliothèque personnalisée de récepteurs de surface cellulaire CRISPRa, suivie de cycles consécutifs de sélection positive par tri cellulaire activé magnétiquement (MACS). Au cours de la dernière étape, Dans la dernière étape, l'ADN génomique est extrait du ou des cycles de bibliothèques enrichis en cibles sélectionnés, codé par code-barres, soumis à un séquençage approfondi et soumis à un séquençage approfondi et analysé à l'aide du cadre statistique casTLE pour identifier les récepteurs potentiels. Les résultats sont ensuite soumis à diverses méthodes de validation orthogonale.

De nouvelles méthodes de criblage haut débit se basant sur la technologie d'activation par CRISPR (CRISPRa) couplé à un tri cellulaire ont récemment été développées et ont permis d'identifier un grand nombre d'interaction récepteurs-ligands chez l'Homme (Chong *et al.*, 2018), (Siepe *et al.*, 2022). CRISPRa est un système basé sur des protéines Cas désactivées (dCas) couplées à des domaines activateurs (facteurs de transcriptions). Cet élément activateur à base de dCas9 va pouvoir s'associer à un brin guide (ARNg) servant à la fixation spécifique d'un gène cible par complémentarité de séquence. Le gène cible va pouvoir ainsi être surexprimé. Dans leur expérimentation, Siepe *et al.* ont utilisé des cribles d'activation CRISPR pour surexprimer de manière différentielle un grand nombre de récepteurs endogènes dans une population de cellules humaines. Le lot de cellules a été marquée avec des microbilles de streptavidine magnétique complexées avec un ligand d'appât biotinylée, puis trié à plusieurs reprises sur une colonne magnétique. L'idée étant que les cellules qui sont retenues le plus fortement dans la colonne magnétique sont celles qui surexpriment le récepteur impliqué dans la reconnaissance du ligand biotinylée. Les constructions introduites dans les cellules et codant pour les ARNg ont ensuite été séquencé pour identifier les régions promotrices ciblées par ces derniers et ainsi déterminé le récepteur impliqué dans la reconnaissance du ligand (figure 1) (Siepe *et al.*, 2022).

Un système de surexpression génique par CRISPRa à récemment été mise au point chez les plantes (CRISPR-Act3.0) (Pan *et al.*, 2021). Cette technologie a notamment été utilisé pour surexprimer des gènes de défenses tel que SLPR-1 chez la tomate (García-Murillo *et al.*, 2023) ou le récepteur de surface cellulaire LecRLK chez le peuplier (Cardi *et al.*, 2023) (figure 2). A l'heure actuelle, ce système CRISPR-Act3.0 n'a jamais été utilisé pour surexprimé différentiellement un grand nombre de récepteur de surface dans une population cellulaire végétale. Le couplage de cette méthode d'activation génique par CRISPRa avec une méthode de tri cellulaire pourrait se montrer d'une grande aide pour caractériser *in vivo* et de façon haut débit de nouveaux récepteurs de surface cellulaire impliqué dans la perception de ligands peptidiques chez les plantes.

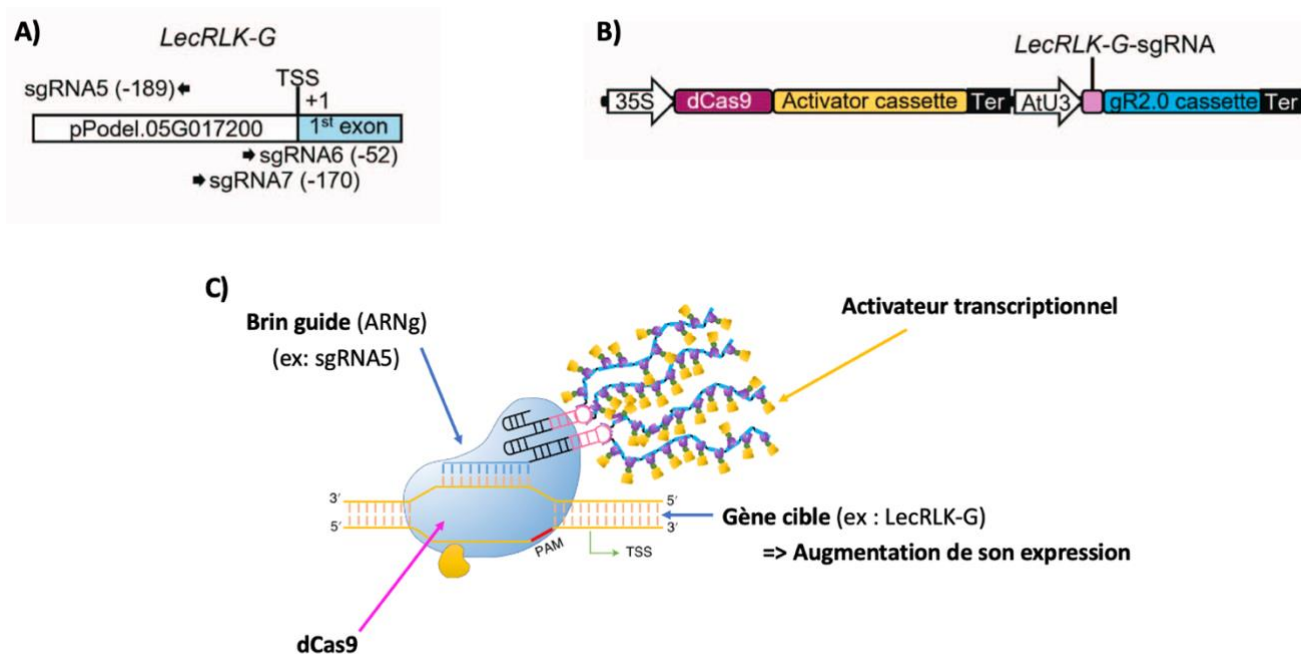


Figure 2 : Illustration schématique de la stratégie CRISPR-Act3.0 pour surexprimer un gène cible

- A) Représentation du gène cible (*LecRLK*) avec sa région promotrice en blanc reconnu par différents brins guides ayant des séquences complémentaires (sgRNA5 ; sgRNA6 ; sgRNA7)
- B) Construction CRISPRa qui est transfecté dans les cellules végétales pour surexprimer *LecRLK*
- C) Mécanisme de fixation et d'activation du système CRISPR-Act3.0

3. Objectifs et caractère ambitieux/novateur du projet / *Specific aims of the proposal, highlighting the originality and the novelty*

L'objectif principal de ce projet est d'identifier chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, de nouveaux récepteurs membranaires impliqués dans la reconnaissance de phytocytokines qui sont des acteurs clefs de la réponse des plantes face à divers bioagresseurs. La méthodologie innovante employée constitue le cœur du caractère ambitieux de cette recherche. Le projet se distingue par le développement d'un criblage cellulaire à haut débit qui a déjà montré son succès chez l'Homme. L'originalité de cette approche réside dans la combinaison synergique de deux technologies avancées : l'activation par CRISPR (CRISPRa) qui permet de surexprimer un grand nombre de récepteurs membranaires dans un pool de cellule et l'utilisation d'un tri cellulaire sur colonne magnétique pour identifier spécifiquement les cellules surexprimant un récepteur impliqué dans la perception du ligand d'intérêt. Cette alliance offre une méthode puissante et précise pour explorer les interactions ligand-récepteur *in vivo*, surpassant ainsi les limitations des méthodes conventionnelles. Cette approche révolutionnaire permettra d'interroger de manière exhaustive les récepteurs de surface cellulaire de plante, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes de reconnaissance des peptides sécrétés. En caractérisant de nouveaux récepteurs membranaires, cette recherche contribuera de manière significative à l'avancement des connaissances dans le domaine de la signalisation cellulaire et de la compréhension des réponses aux stress. Un deuxième objectif crucial de ce projet est de vérifier l'applicabilité de cette méthodologie novatrice à un large éventail de peptides sécrétés. Cette étape est fondamentale pour démontrer la polyvalence de l'approche et sa capacité à identifier des interactions spécifiques avec différents types de peptides. Ce projet permettra de valider l'utilisation de cette méthodologie pour le criblage de récepteur membranaires chez les plantes offrant ainsi un outil précieux pour de futures investigations dans le domaine de la reconnaissance de peptides sécrétés mais également d'autres molécules peptidiques pouvant être perçu par des récepteurs membranaires tels que des MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns), DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns). Les MAMPs, provenant souvent de micro-organismes pathogènes, et les DAMPs, libérés lors de dommages cellulaires, jouent également un rôle crucial dans la réponse immunitaire des plantes. Cette méthode pourra alors être utilisée pour la caractérisation haut-débit de récepteurs-ligands chez d'autres plantes d'intérêt agronomique.

4. Description des travaux : programme scientifique et technique / *Detailed description of the work. For each specific aim a proposed workplan should be described*

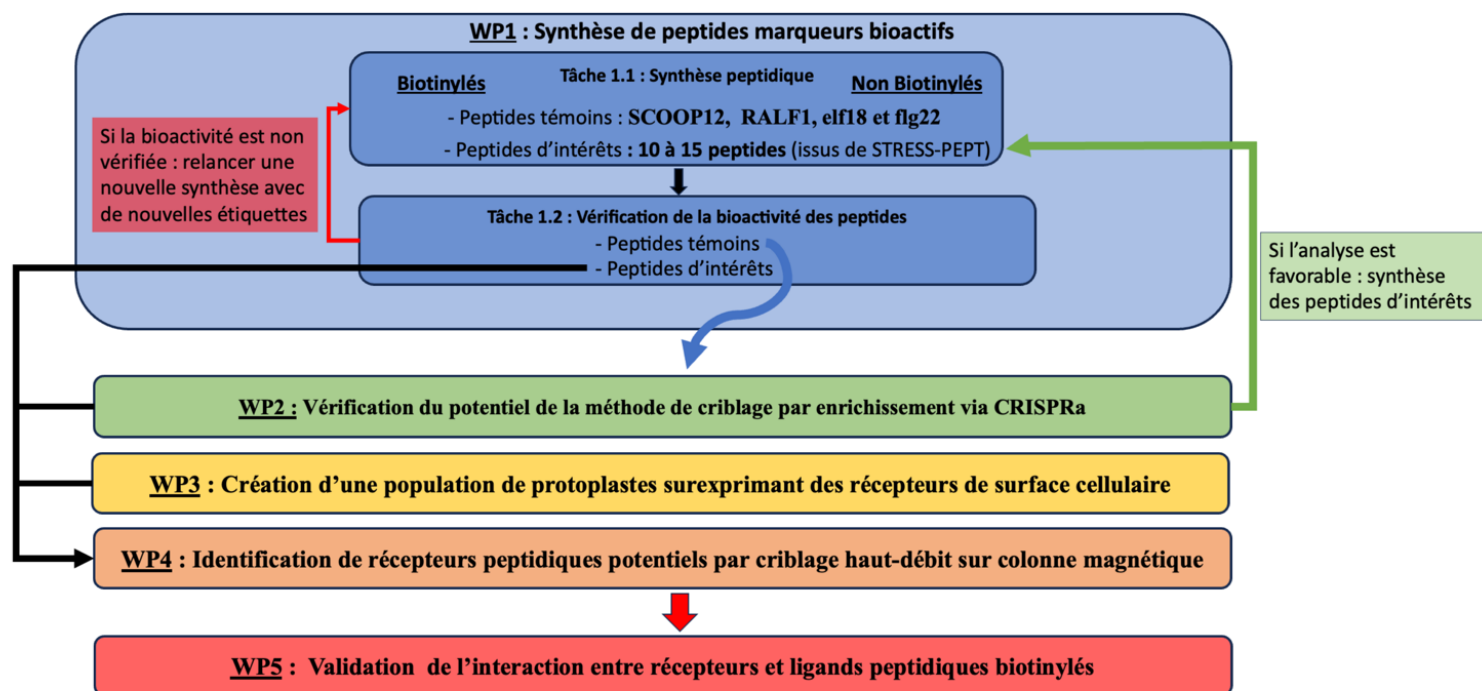


Figure 3 : Organigramme général du projet RP-SCREEN

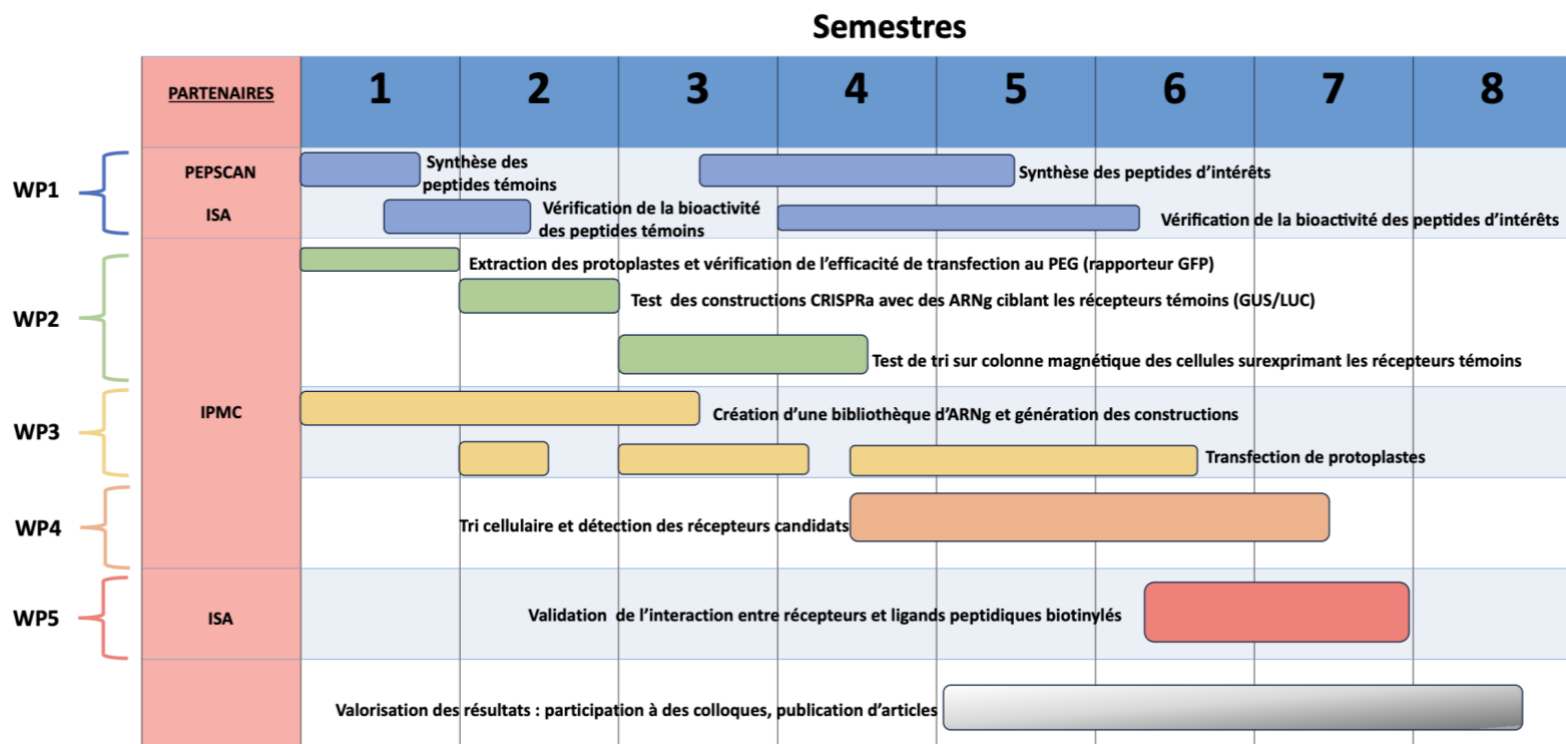


Figure 4 : Diagramme de Gantt présentant le planning des différents WP et tâches du projet RP-SCREEN avec les laboratoires partenaires

WP 1 : Synthèse des peptides marqueurs bioactifs

Tâche 1.1 : Synthèse peptidique

Partenaire : Pepscan

Objectif : Cette tâche consiste en la synthèse des différents peptides « marqueurs » (biotinylés ou fluorescents) nécessaire pour les approches de criblages utilisés dans les WP2 et WP4.

Pour ce travail nous ferons appel à l'entreprise Pepscan qui fabrique des peptides biotinylés de haute qualité. Le plus souvent, les étiquettes de biotine sont incorporés à l'extrémité N-terminale. Elles peuvent également être attachée à la chaîne latérale d'un résidu de lysine (Lys) ou à l'extrémité C-terminale du peptide. Pour chacun des peptides plusieurs forme avec des étiquettes différentes seront produites. (Siepe *et al.*, 2022), (Burggraf and Albert, 2024).

La première étape consistera à synthétiser de quatre peptides : SCOOP12, RALF1, elf18 et flg22 (ces deux derniers peptides sont des MAMPs) perçu par des récepteurs membranaires qui sont déjà bien caractérisé, respectivement : MIK2, FER4, EFR et FLS2 (Ngou *et al.*, 2023). Ces peptides vont nous servir pour la validation de la méthodologie de screening développé.

Selon les résultats obtenus dans la tâche 1.2, les peptides sécrétés par *Arabidopsis thaliana* identifiés avec le projet ANR STRESS-PEPT seront synthétisés (entre 10 et 15 peptides d'intérêt seront analysés).

Des peptides non marqués et d'autres peptides ayant des séquences aléatoires. Ceux-ci nous serviront de témoins pour les expériences suivantes.

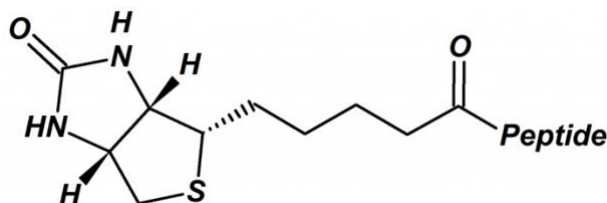


Figure 5 : Représentation d'un peptide marqué par un groupement biotine

Tâche 1.2 Vérification que le marquage n'affecte pas l'activité biologique des peptides

Partenaire : ISA

Objectif : Cette tâche permet de vérifier que le marquage effectué sur les peptides synthétisés n'entraîne pas une diminution voire une perte de totale de liaison avec le ou les récepteurs putatifs. Cette étape est essentielle, car une diminution de l'affinité avec les récepteurs entraverait la mise en œuvre du criblage par CRISPRa (WP2 et 4).

Afin de vérifier la reconnaissance des récepteurs membranaires, des jeunes plantules d'*Arabidopsis* seront complétées avec différents peptides synthétiques tels que SCOOP12, flg22, elf18 et RALF1, qu'ils soient biotinylés ou non. La liaison de ces peptides témoins aux récepteurs membranaires est connue pour déclencher des voies de signalisation, induisant notamment la production de ROS, de Ca²⁺ et pouvant entraîner une alcalinisation extracellulaire. La quantification de ces paramètres sera réalisée par des méthodes haut débit, facilitées par l'utilisation de rapporteurs luminescents tels que le luminol pour les ROS (Li *et al.*, 2024), (Rhodes and Zipfel, 2024),) et l'Aequorine pour le Ca²⁺ (Daubermann *et al.*, 2024). De plus, des capteurs physiques seront utilisés pour mesurer le pH (Wang *et al.*, 2024). Ces approches permettront de déterminer rapidement s'il y a une perte d'affinité envers ces récepteurs. Dans un second temps, en relation avec les résultats obtenus dans les WP1 et WP2 la bioactivité des peptides synthétiques d'intérêts (issu du projet STRESS-PEPT) sera vérifiée en examinant les réponses moléculaires mentionnées.

WP2 : Vérification du potentiel de la méthode de criblage par enrichissement via CRISPRa

Partenaire : IPMC (plateforme CRISPR SCREEN)

Objectif : Ce WP vise à examiner le potentiel de la méthode de transformation transitoire de protoplastes par CRISPRa et de vérifier que les peptides biotinylés peuvent servir d'outils pour discriminer les cellules exprimant différenciellement les récepteurs associés.

Pour le criblage, le choix s'est porté sur la génération de protoplastes (cellules dépourvus de leur paroi) transformé de façon transitoire (non intégré dans le génome) via l'utilisation de PEG. Cette méthode a été choisie car elle présente une efficacité de transfection supérieure à 90% (Yoo *et al.*, 2007), (Wu *et al.*, 2020). La première étape consistera donc à obtenir un grand nombre de protoplastes à partir de cellules mesophylliennes puis à vérifier l'efficacité de transfection en utilisant des plasmides contenant un rapporteur fluorescent (GFP).

Ensuite dans une autre expérience, nous nous intéresserons à la production de protoplastes qui surexprimeront les récepteurs membranaires témoins (MIK2, FER7, EFR, FLS2) via transfection de plasmides contenant le système CRISPRa. Le logiciel spécialisé CHOPCHOP nous aidera à concevoir les brins guides (ARNg) ciblant les gènes codant pour les récepteurs cibles que l'on cherche à surexprimer (Labun *et al.*, 2019). L'efficacité de surexpression par CRISPRa dépend beaucoup de la séquence du brin guide. Pour tester l'efficacité d'activation des ARNg, nous adopterons pour un système de rapporteur GUS/LUC. Nous clonerons ainsi le promoteur du gène d'intérêt (c'est-à-dire le gène à activer par CRISPRa : MIK2, FER7, EFR ou FLS2) dans la région amont du gène GUS, de sorte que l'expression de GUS soit contrôlée par le promoteur et affectée par l'efficacité des brins guides. Pendant ce temps, un LUC exprimé de manière constitutive sera utilisé comme référence. Des plasmides CRISPRa dépourvus des gènes codant pour des ARNg ou possédant des séquences brouillées (ne ciblant pas spécifiquement le gène rapporteur) seront utilisés en tant que témoins. Cette expérience nous permettra de déterminer l'efficacité de différents ARNg pour surexprimer le gène cible (Yao *et al.*, 2023). Les molécules de biotines possèdent une forte affinité avec la streptavidine qui peut elle-même être greffée à des microbilles magnétiques. Ces billes magnétiques peuvent être facilement séparées via l'utilisation d'une colonne magnétique. Ainsi, en utilisant les peptides témoins biotinylés (SCOOP12, flg22, efl18 et RALF1) nous vérifierons que ces peptides, complexés avec des microbilles de streptavidine peuvent servir d'appât pour trier spécifiquement les protoplastes surexprimant leurs récepteurs respectifs parmi la population de protoplasme issu de la bibliothèque conçue dans le WP3.

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

Partenaire : IPMC (plateforme CRISPR SCREEN)

Objectif : Ce WP consiste en la création d'une bibliothèque de brins guide (ARNg) ciblant les gènes récepteurs membranaires que l'on cherche à surexprimer par CRISPRa afin d'obtenir une population de protoplasme surexprimant des récepteurs membranaires.

Pour élaborer cette bibliothèque, nous concentrerons dans un premier temps nos efforts sur les familles des LRR-RLP et LRR-RLK, qui comptent respectivement 59 et 226 membres. Cette dernière représente la plus grande famille de récepteurs chez *Arabidopsis thaliana*. En fonction de l'avancée des travaux, cette méthode pourra éventuellement être étendue à d'autres familles de récepteurs (LysM ; Lectine ; Malectine ; EGF-like). Étant donné qu'il est impossible de vérifier quel est le brin guide le plus efficace pour surexprimer l'activité de chaque de ces gènes. Nous sélectionnerons grâce au logiciel CHOPCHOP 10 sgRNA par récepteur que l'on souhaite surexprimer (Siepe *et al.*, 2022).

Une fois cette bibliothèque de brins guides fabriquée ceux-ci seront clonés individuellement dans des plasmides contenant tous les éléments nécessaires pour la CRISPRa. Ces plasmides pourront ensuite être transfectés dans des protoplastes différents. Les différents lots de protoplastes transfectés seront rassemblés dans un unique tube et pourront être utilisés pour les WP2 et WP4.

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

Partenaire : IPMC (plateforme PAB)

Objectif : Ce WP a pour objectif d'identifier les récepteurs impliqués dans la reconnaissance des peptides sécrétés.

Pour caractériser les récepteurs potentiels de ces peptides nous utiliserons des populations de protoplastes (conçu dans le WP3) surexprimant de manière différentielle une collection de récepteurs de surfaces cellulaire d'intérêts. Le lot de cellules sera marqué avec des microbilles de streptavidine magnétique complexées avec un peptide d'appâts biotinylées dont la bioactivité a été vérifié dans le WP1, puis cette population de protoplastes sera trié à plusieurs reprises sur une colonne magnétique. L'idée étant que les cellules qui sont retenues le plus fortement dans la colonne magnétique sont celles qui surexpriment le récepteur impliqué dans la reconnaissance du ligand biotinylée. Le séquençage profond des plasmides dans la population triée va permettre d'identifier le/les récepteurs surexprimés dans les protoplastes et qui sont impliqués dans la reconnaissance du ligand peptidique. La tailles des bibliothèques de protoplastes testés pourront être réduit ou élargi à d'autres familles en fonction de l'efficacité de la méthode pour identifier des récepteurs peptidiques potentiels.

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

Partenaire : ISA

Objectif : Ce dernier Work-Package consiste à valider la pertinence de notre méthode de criblage cellulaire par CRISPRa en démontrant l'interaction directe entre les différents couples récepteurs-ligands identifiés dans le WP4.

Pour cela, nous utiliserons une stratégie se basant sur l'expression transitoire d'un récepteur membranaire d'intérêt dans *Nicotiana tabacum* (Burggraf and Albert, 2024). Des feuilles de plantes exprimant transitoirement un récepteur d'intérêt marqué (myc) seront infiltrées avec des peptides biotinylés. L'interaction entre le ligand et le récepteur est fixée de manière irréversible par l'infiltration d'un agent de réticulation. Par la suite, une co-immunoprécipitation et un Western-blot seront utilisés : le marqueur de biotine du peptide ligand réticulé au récepteur sera alors détecté par le conjugué streptavidine sur la membrane.

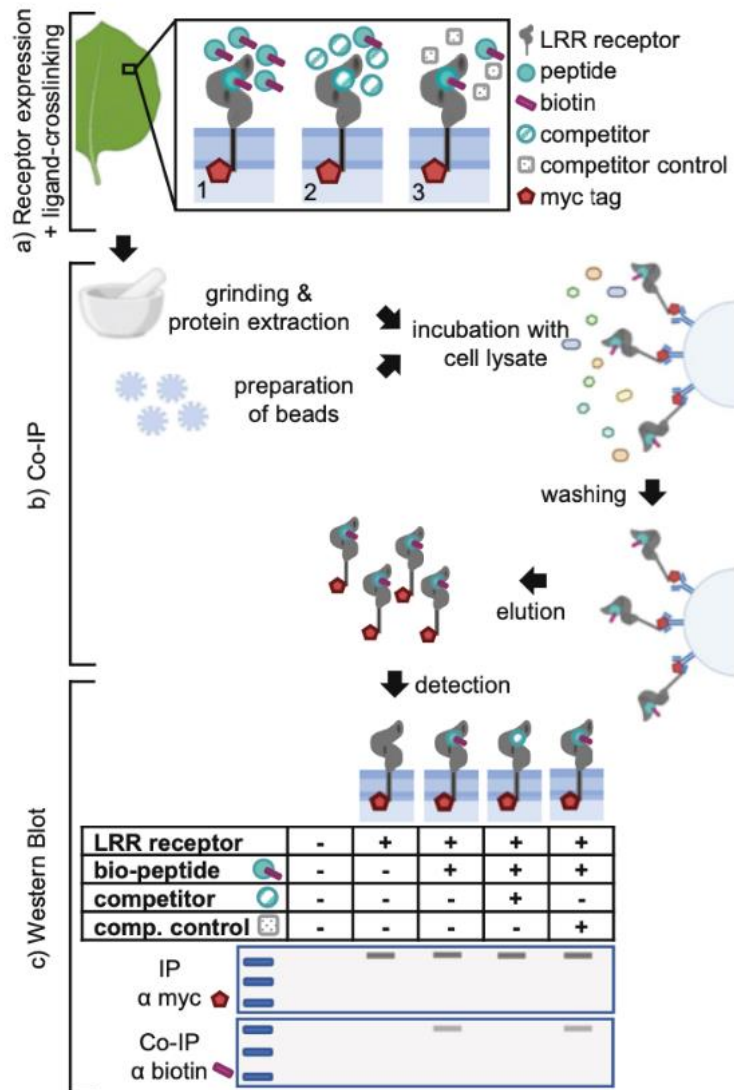


Figure 6 : Schéma des principales étapes de la réticulation in vivo des peptides biotinylés aux récepteurs de surface cellulaire.

- A) Expression transitoire du récepteur dans les feuilles de *N. benthamiana*. Infiltration de peptides biotinylés, concurrent et contrôle concurrent indiqués dans l'encadré noir. Les combinaisons testées sont le peptide biotinylé seul (1), le peptide avec un excès de compétiteur non marqué (2) et le contrôle compétiteur non spécifique (3).
- B) Illustration de la Co-IP. Après récolte du matériel végétal, les feuilles sont broyées et les protéines en sont extraites. Le lysat cellulaire est incubé avec les billes préparées pour se lier au récepteur marqué. Après lavage et élution, les récepteurs marqués et les peptides biotinylés sont détectés par Western blot.
- C) Le récepteur marqué peut être détecté dans tous les échantillons, à l'exception du contrôle vide. Le peptide biotinylé peut être détecté après liaison au récepteur dans les échantillons (1) et (3), le peptide biotinylé seul et en combinaison avec le contrôle concurrent, respectivement. Aucun peptide biotinylé ne peut être détecté dans l'échantillon (2) car il est spécifiquement concurrencé par le concurrent non marqué.

5. Organisation du partenariat / *Description of the collaborations*

Pepscan :

Pepscan est l'un des principaux fabricants de peptides personnalisés de haute qualité. La collaboration avec ce prestataire de concevoir les peptides biotinylés (WP1) essentiel pour notre criblage.

Institut Sophia Agrobiotech (ISA) :

UMR 1355 (INRAE, CNRS, Univ. Côte d'Azur)

400 route des Chappes, BP 167, F-06903 Sophia Antipolis.

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. Dans le cadre de projets collaboratifs financés par l'ANR (ANR AFINDIS 2006-2008 et ANR SCRIPS 2009-2012), B. Favery et H. Keller ont caractérisé le rôle des phytosulfokines (PSK) (4-5 aa) et de la signalisation CLV (peptide CLV3 avec un motif CLE de 13 aa) dans l'interaction d'*Arabidopsis* avec divers pathogènes ((Mosher *et al.*, 2013) ;(Rodiuc *et al.*, 2016);(Hanemian *et al.*, 2016). 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'ISA offre toutes les installations, y compris des plateformes pour la biologie cellulaire, moléculaire et la biochimie analytique, ainsi qu'une zone réservée avec 13 chambres de croissance pour la recherche transgénique. 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) :

660 route des lucioles, 06560 Sophia-Antipolis

Plateforme multisites localisées également sur le C3M et à Marseille (CIML & TAGC, AMU)

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 cribles 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.

6. Résultats escomptés et retombées attendues/valorisation / *Expected results and potential impact/data management*

Les résultats anticipés de ce projet s'annoncent comme des contributions majeures à la compréhension des mécanismes de reconnaissance des phytoctokines chez *Arabidopsis thaliana*, avec des implications significatives pour la réponse des plantes face à divers bioagresseurs. La méthodologie innovante, axée sur le criblage cellulaire à haut débit et la combinaison synergique de l'activation par CRISPRa et du tri cellulaire magnétique, promet des avancées substantielles.

Résultats Attendus :

- **Caractérisation *In vivo* des Interactions Ligand-Récepteur :**
 - Grâce à l'approche haut-débit mise en œuvre, nous prévoyons ainsi d'identifier de nouveaux récepteurs membranaires impliqués dans la perception des phytoctokines (au minimum 5), enrichissant ainsi la connaissance de la signalisation cellulaire chez les plantes.
- **Avancements dans la Compréhension des Réponses aux Stress :**
 - En caractérisant de nouveaux récepteurs membranaires, ce projet contribuera de manière significative à l'avancement des connaissances en signalisation cellulaire, offrant des perspectives nouvelles sur la manière dont les plantes répondent aux stress environnementaux.

Valorisation :

- **Publications Scientifiques :**
 - Les résultats novateurs de ce projet seront diffusés à travers des publications dans des revues scientifiques internationales à accès libre, évaluées par des pairs. Ces publications méthodologiques et de résultats renforceront la visibilité de notre approche novatrice.
- **Outil Précieux pour la Caractérisation des Récepteurs Membranaires :**
 - La méthodologie développée, validée à travers le criblage de divers peptides sécrétés, sera un outil précieux pour la communauté scientifique. 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. Elle ouvrira de 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.

Références / References :

- Burggraf R, Albert M.** 2024. In-vivo Cross-linking of Biotinylated Peptide Ligands to Cell Surface Receptors. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) **2731**, 217–230.
- Cardi T, Murovec J, Bakhsh A, et al.** 2023. CRISPR/Cas-mediated plant genome editing: outstanding challenges a decade after implementation. *Trends in Plant Science* **28**, 1144–1165.
- Chong Z-S, Ohnishi S, Yusa K, Wright GJ.** 2018. Pooled extracellular receptor-ligand interaction screening using CRISPR activation. *Genome Biology* **19**, 205.
- Daubermann AG, Dressano K, de Oliveira Ceciliato PH, Moura DS.** 2024. Acridinium-Based Chemiluminescent Receptor-Ligand Binding Assay for Protein/Peptide Hormones. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) **2731**, 253–263.
- García-Murillo L, Valencia-Lozano E, Priego-Ranero NA, Cabrera-Ponce JL, Duarte-Aké FP, Vizuet-de-Rueda JC, Rivera-Toro DM, Herrera-Ubaldo H, de Folter S, Alvarez-Venegas R.** 2023. CRISPRa-mediated transcriptional activation of the SIPR-1 gene in edited tomato plants. *Plant Science* **329**, 111617.
- Hanemian M, Barlet X, Sorin C, et al.** 2016. Arabidopsis CLAVATA1 and CLAVATA2 receptors contribute to *Ralstonia solanacearum* pathogenicity through a miR169-dependent pathway. *New Phytologist* **211**, 502–515.
- Jehle AK, Lipschis M, Albert M, Fallahzadeh-Mamaghani V, Fürst U, Mueller K, Felix G.** 2013. The Receptor-Like Protein ReMAX of Arabidopsis Detects the Microbe-Associated Molecular Pattern eMax from *Xanthomonas*[W]. *The Plant Cell* **25**, 2330–2340.
- Kaku H, Nishizawa Y, Ishii-Minami N, Akimoto-Tomiyama C, Dohmae N, Takio K, Minami E, Shibuya N.** 2006. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 11086–11091.
- Labun K, Montague TG, Krause M, Torres Cleuren YN, Tjeldnes H, Valen E.** 2019. CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucleic Acids Research* **47**, W171–W174.
- Li R, Schaller A, Stintzi A.** 2024. Quantitative Measurement of Pattern-Triggered ROS Burst as an Early Immune Response in Tomato. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) **2731**, 157–167.
- Mosher S, Seybold H, Rodriguez P, et al.** 2013. The tyrosine-sulfated peptide receptors PSKR1 and PSY1R modify the immunity of Arabidopsis to biotrophic and necrotrophic pathogens in an antagonistic manner. *The Plant Journal* **73**, 469–482.
- Ngou BPM, Heal R, Wyler M, Schmid MW, Jones JDG.** 2022. Concerted expansion and contraction of immune receptor gene repertoires in plant genomes. *Nature Plants* **8**, 1146–1152.
- Ngou BPM, Wyler M, Schmid MW, Kadota Y, Shirasu K.** 2023. *Evolutionary Trajectory of Pattern Recognition Receptors in Plants*. *Plant Biology*.
- Pan C, Wu X, Markel K, Malzahn AA, Kundagrami N, Sretenovic S, Zhang Y, Cheng Y, Shih PM, Qi Y.** 2021. CRISPR–Act3.0 for highly efficient multiplexed gene activation in plants. *Nature*

Plants **7**, 942–953.

Petutschnig EK, Jones AME, Serazetdinova L, Lipka U, Lipka V. 2010. The lysin motif receptor-like kinase (LysM-RLK) CERK1 is a major chitin-binding protein in *Arabidopsis thaliana* and subject to chitin-induced phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* **285**, 28902–28911.

Rhodes J, Zipfel C. 2024. Identification of Bioactive Phytocytokines Using Transcriptomic Data and Plant Bioassays. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) **2731**, 23–35.

Rodiuc N, Barlet X, Hok S, *et al.* 2016. Evolutionarily distant pathogens require the *Arabidopsis* phytosulfokine signalling pathway to establish disease. *Plant, Cell & Environment* **39**, 1396–1407.

Shinohara H, Matsubayashi Y. 2017. Photoaffinity Labeling of Plant Receptor Kinases. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) **1621**, 59–68.

Siepe DH, Henneberg LT, Wilson SC, Hess GT, Bassik MC, Zinn K, Garcia KC. 2022. Identification of orphan ligand-receptor relationships using a cell-based CRISPRa enrichment screening platform. (AC Kruse and JA Cooper, Eds.). *eLife* **11**, e81398.

Song W, Liu L, Wang J, *et al.* 2016. Signature motif-guided identification of receptors for peptide hormones essential for root meristem growth. *Cell Research* **26**, 674–685.

Wang X, Li R, Stintzi A, Schaller A. 2024. Automated Real-Time Monitoring of Extracellular pH to Assess Early Plant Defense Signaling. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) **2731**, 169–178.

Wu S, Zhu H, Liu J, Yang Q, Shao X, Bi F, Hu C, Huo H, Chen K, Yi G. 2020. Establishment of a PEG-mediated protoplast transformation system based on DNA and CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes for banana. *BMC Plant Biology* **20**, 425.

Yao T, Yuan G, Lu H, Liu Y, Zhang J, Tuskan GA, Muchero W, Chen J-G, Yang X. 2023. CRISPR/Cas9-based gene activation and base editing in *Populus*. *Horticulture Research* **10**, uhad085.

Yoo S-D, Cho Y-H, Sheen J. 2007. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocols* **2**, 1565–1572.

Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JDG, Boller T, Felix G. 2006. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* **125**, 749–760.

Résumé-Abstract

Bio-aggressors result in substantial losses in agricultural production, a challenge exacerbated by ongoing climate changes. A profound understanding of plant defense mechanisms is pivotal in addressing this global challenge. Signaling peptides, identified as phytocytokines, emitted in response to stress, play a central role in these processes. While the STRESS-PEPT project has identified peptides in *Arabidopsis thaliana*, the associated receptors remain currently unknown. Conventional genetic and biochemical approaches exhibit limitations, underscoring the need for innovative methodologies. Recently, high-throughput screening assisted by CRISPRa has proven successful in humans, yet its adaptation to plants remains limited. In RP-SCREEN, our proposal to employ CRISPR-Act3.0 technology in plants, enabling differential overexpression of receptors with cell sorting, represents a novel perspective to rapidly characterize surface receptors involved in the perception of peptides in plants.