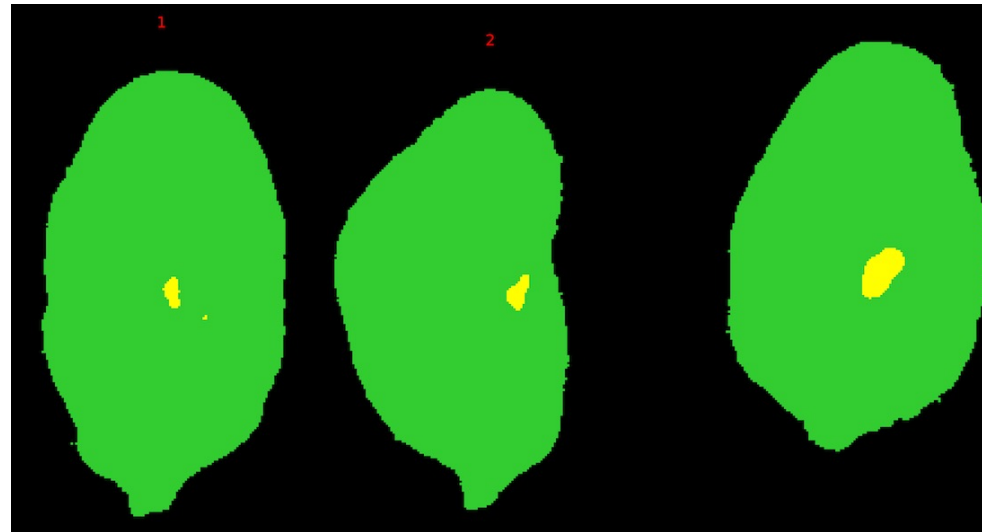


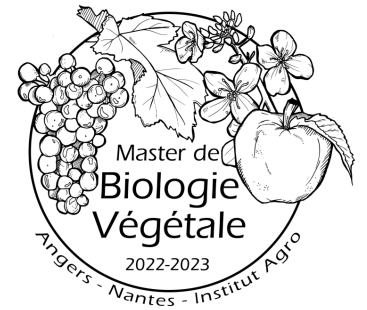
Phénotypage de la résistance d'*Arabidopsis thaliana* au champignon nécrotrophe *Alternaria brassicicola* chez des mutants de peptides sécrétés identifiés par transcriptomique



(Valentin. G)

Valentin Goupille

Sous la direction de P. Grappin & T. Guillemette
Tuteur, C. Véronési



Équipe FungiSem



- **Les stress biotiques causent 30 % de perte de rendements** (Savary *et al.*, 2019)
- Peptides sécrétés (phytohormones peptidiques de 5 à 200 acides aminées) (Gust *et al.*, 2017)
 - Signaux chimiques pour **communiquer avec d'autres cellules ou organismes**
- ⇒ Implication dans le **contrôle du développement** et des **défenses** (ex : famille SCOOP) (Guillou, 2022)





programme bioinformatique :

> 1300 gènes potentiels codant pour des phytocytokines chez *Arabidopsis thaliana*

RNA seq :

Alternaria brassicicola

Eumycète
nécrotrophe
symptômes sur feuille

=> 13 gènes candidats dans l'interactions avec *A. brassicicola* (rosettes de 5 semaines)

Sélection de mutants disponibles :

Fond génétique Col-0
ADN-T : 5'UTR ou codon
Homozygotes

12 mutants de 8 gènes

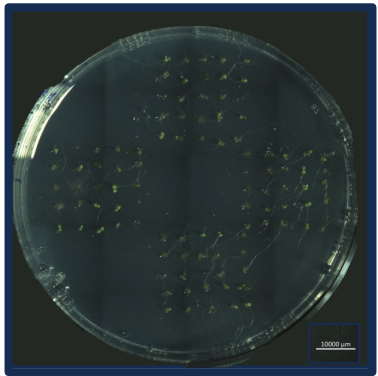
gènes	famille des gènes	mutants STRESS-PEPT
gène A	C-terminally Encoded Peptide (CEP)	lignée 31
gène B	non déterminé	lignée 34
gène C	Scorpion toxin-like knottin, Trypsin inhibitor	lignée 6 lignée 35 lignée 2' lignée 25
gène D	DUF538	lignée 12 lignée 32
gène E	non déterminé	lignée 1
gène F	EC51-like	lignée 33
gène G	Plant Defensin Family (L-like), LMW Cysteine-Rich (PDF, LCR)	lignée 6'
gène H	(Cysteine-rich, Antigen5, PR1 protein)-derived peptide (CAP)	lignée 13

Objectif : Phénotypage de la résistance d'*Arabidopsis thaliana* au champignon nécrotrophe *Alternaria brassicicola* chez des mutants de peptides identifiés par transcriptomique

Hypothèse :

La réponse à *A. brassicicola* diffère entre les stades précoces et tardifs du cycle de vie
(Ortega *et al.*, 2022)

**Inoculation de
graines**



(Valentin. G)

1°) Stade jeune plantule :

dépôt sur boîtes de pétri

- Suivi de la **germination**
- Observation des **symptômes**
(J+6 et J+7)

**Inoculation de
feuilles de rosettes**



(Valentin. G)

2°) Stade rosette :

- Suivi du **développement**
(5 semaines)
- Mesure de la **taille des nécroses**
(6 semaines)

<= *via analyse d'images*

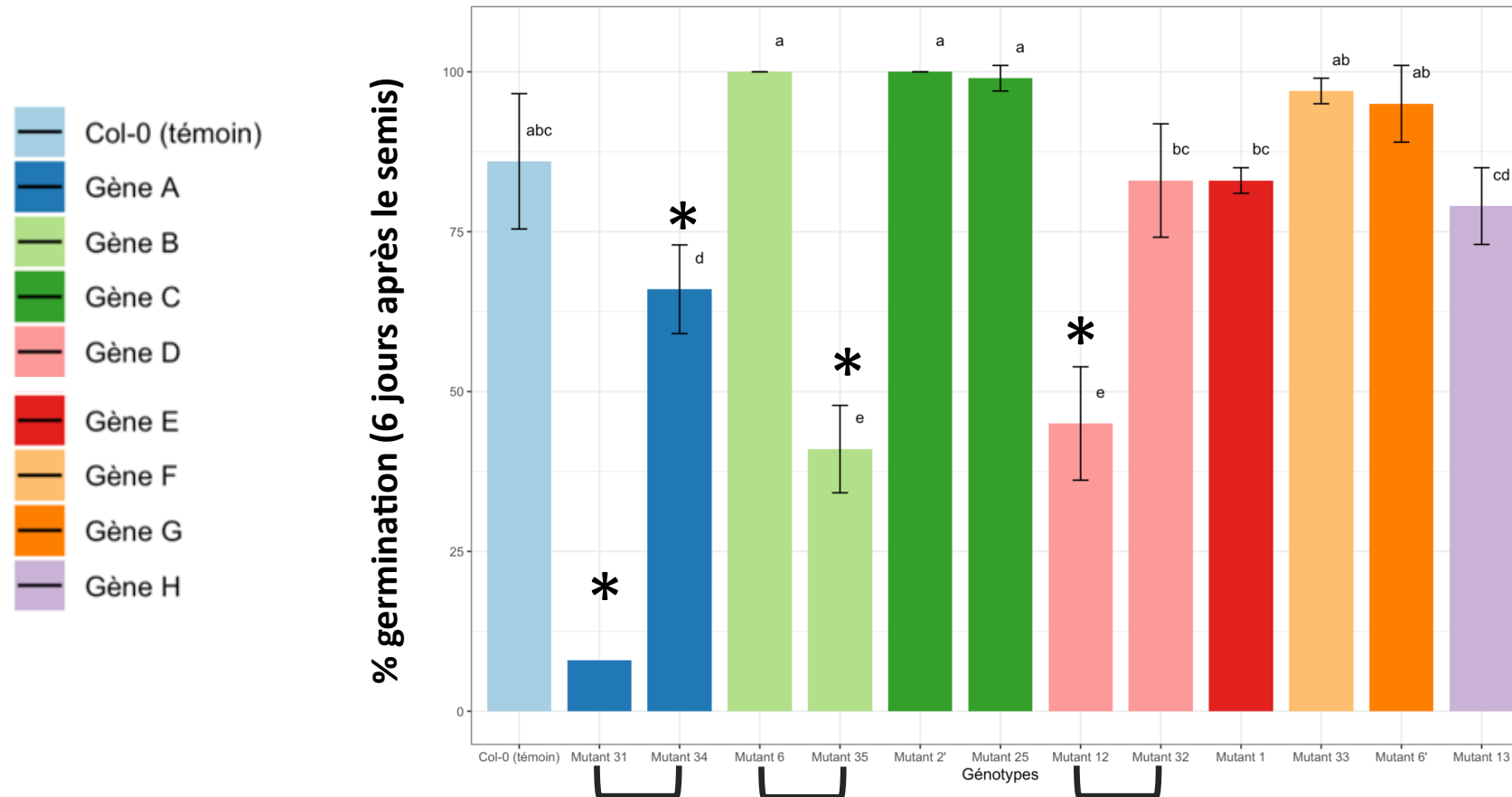
Liste des mutants d'*Arabidopsis thaliana* analysés :

Gènes	famille des gènes	mutants STRESS-PEPT
gène A	C-terminally Encoded Peptide [CEP]	lignée 31
		lignée 34
gène B	non déterminé	lignée 6
		lignée 35
gène C	Scorpion toxin-like knottin, Trypsin Inhibitor	lignée 2'
		lignée 25
gène D	DUF538	lignée 12
		lignée 32
gène E	non déterminé	lignée 1
gène F	ECS1-like	lignée 33
gène G	Plant Defensin Family (-Like), LMW Cysteine-Rich [PDF, LCR]	lignée 6'
gène H	(Cysteine-rich, Antigen5, PR1 protein)-derived peptide [CAP]	lignée 13

1°) Stade jeune plantule :

- Taux de germination des semences infectées
- Critères de mesure de la sensibilité des plantules
- Mesure de l'indice de sévérité des symptômes





1°) Stade jeune plantule : Taux de germination des semences infectées



Les mutants 31, 34, 35, 12 possèdent une germination maximale (Gmax) réduite

1°) Stade jeune plantule : Critères de mesure de la sensibilité des plantules

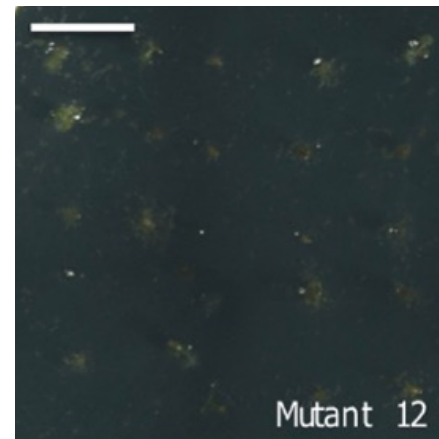
Echelle d'évaluation visuelle de l'intensité des symptômes (adapté de Barrit *et al*, 2022):

Illustration de plantules représentatives	Description visuelle de l'évaluation
	Note = 0 : Pas de colonisation mycélienne, ni de nécrose ; Plantule bien dressée
	Note = 1 : Début de colonisation fongique sur les cotylédons et hypocotyles (des petites taches nécrotiques sont visibles) ; Plantule généralement penchée
	Note = 2 : Colonisation mycélienne importante et/ou nécroses de tailles intermédiaires
	Note = 3 : Plantules très fortement nécrosées ou chlorosées

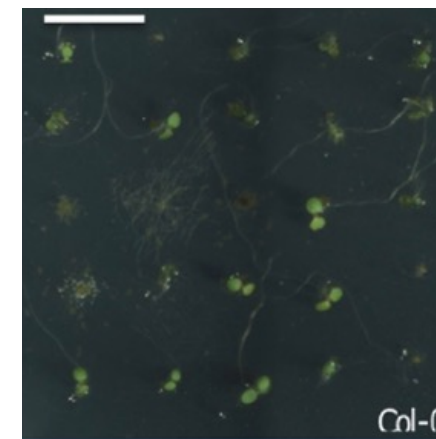
(Valentin. G)

$$\text{Indice moyen de sévérité des symptômes} = \frac{(N0 * 0 + N1 * 1 + N2 * 2 + N3 * 3)}{NT}$$

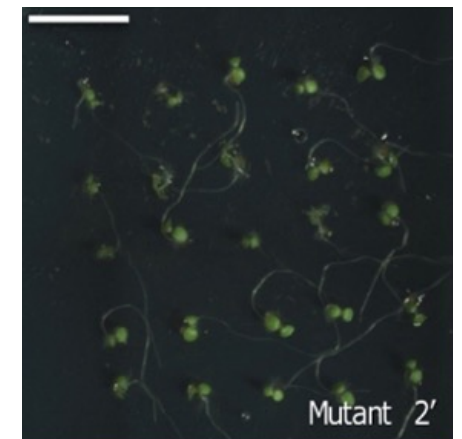
Exemple de plantules de différents génotypes à J+7 après le semi :



Mutant 12



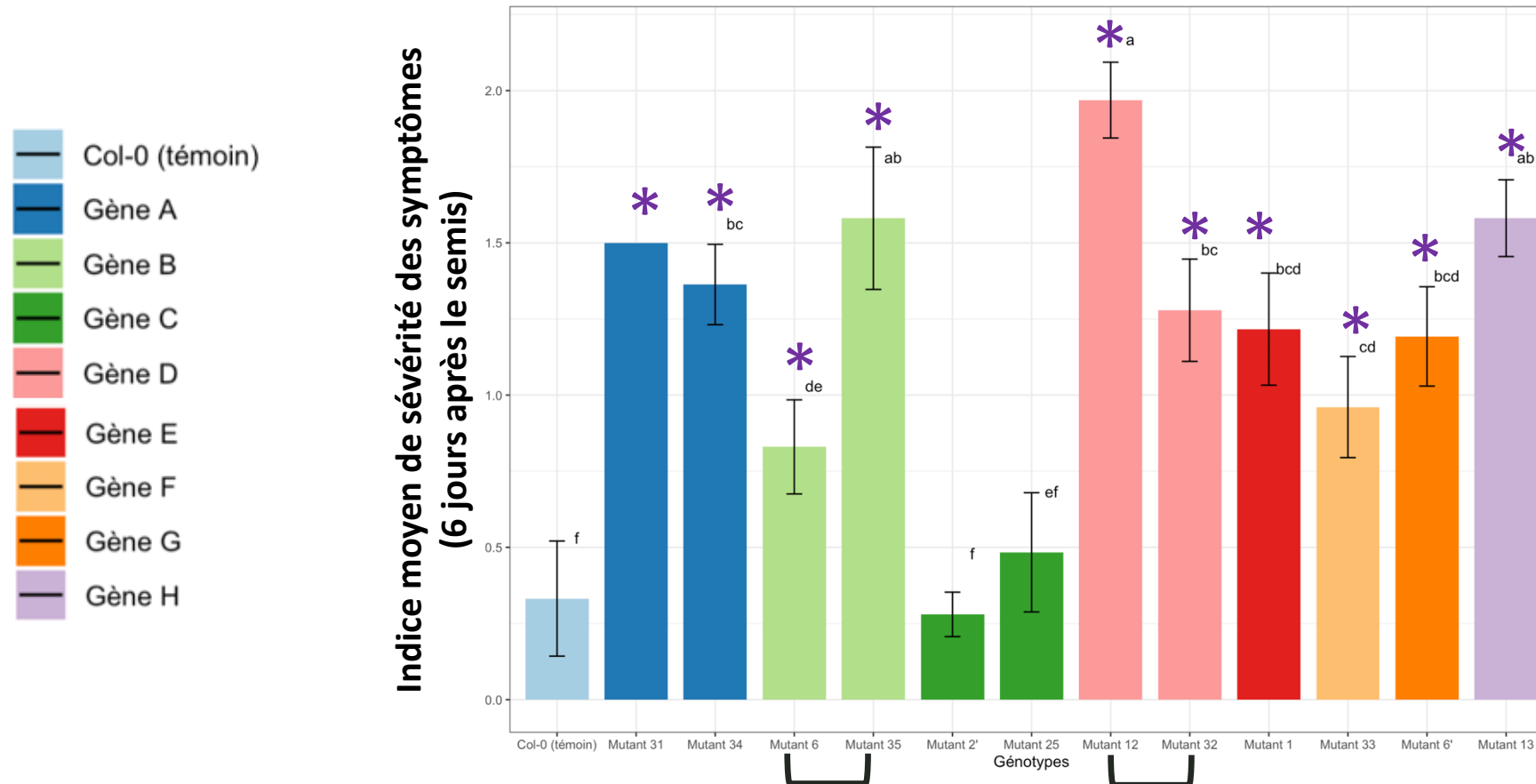
Col-0



Mutant 2'

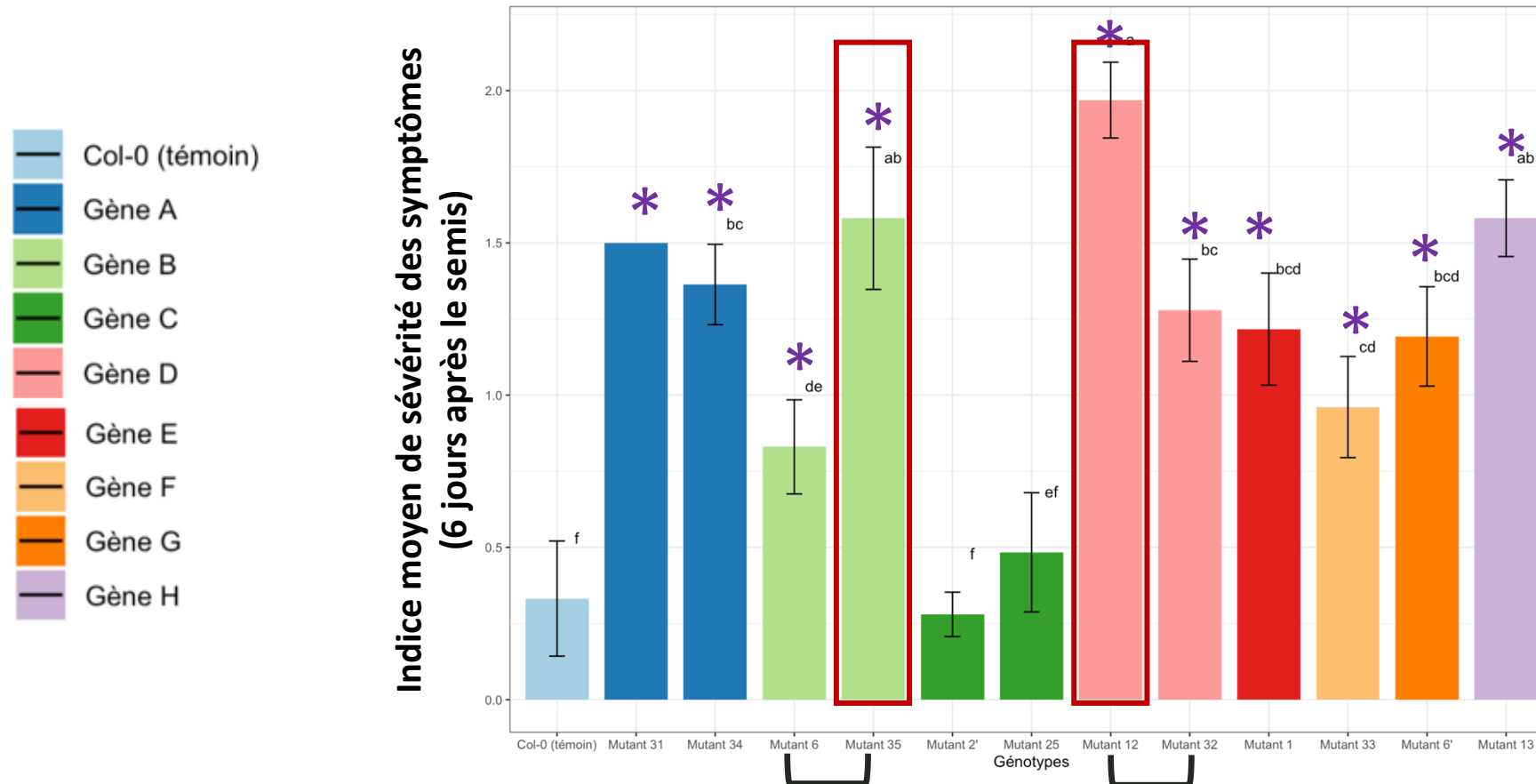
(Valentin. G)

1°) Stade jeune plantule : Mesure de l'indice de sévérité des symptômes



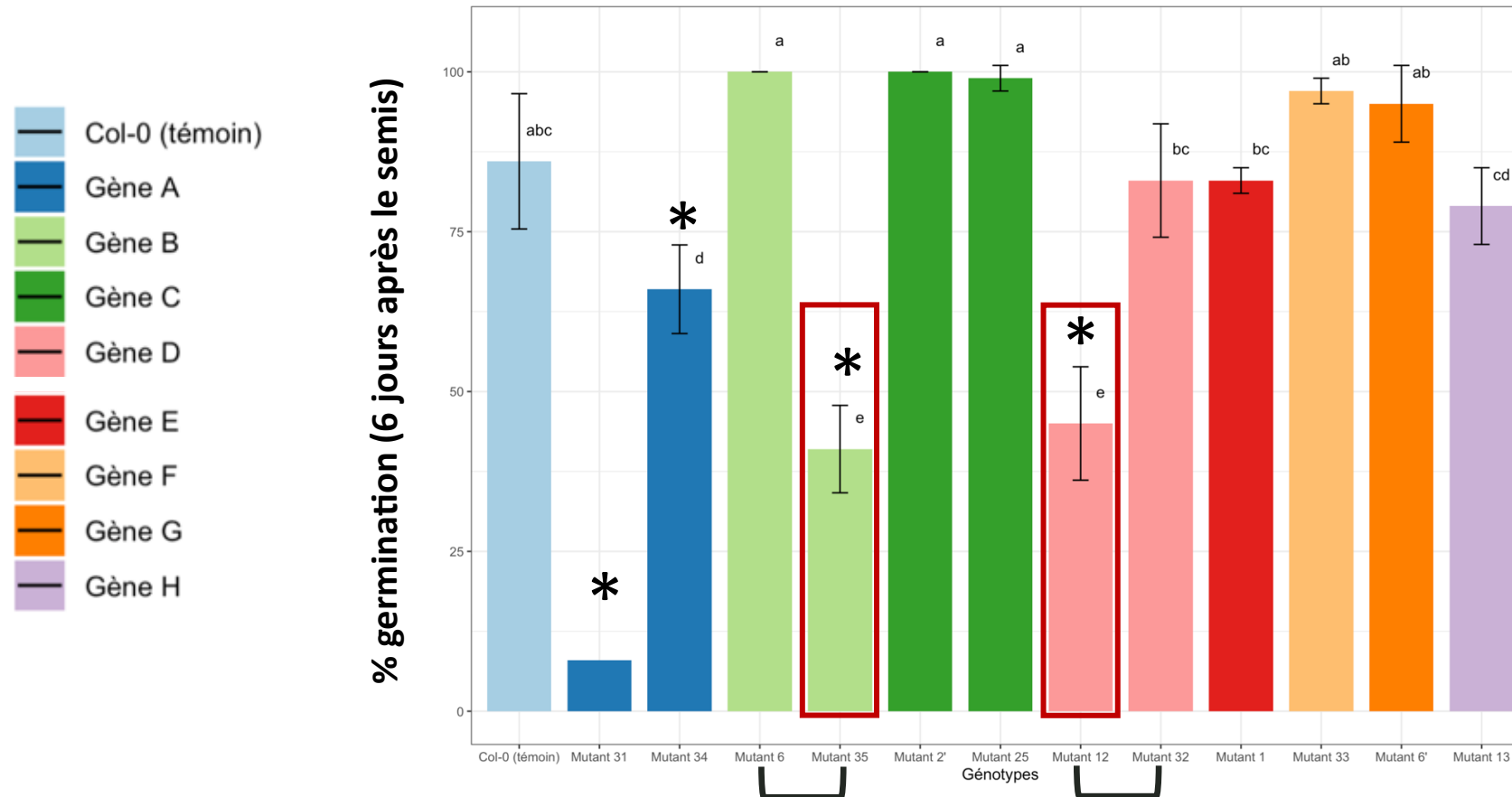
10 mutants sur 12 (soit 7 gènes sur 8) possèdent une sensibilité accrue à *A. brassicicola*

1°) Stade jeune plantule : Mesure de l'indice de sévérité des symptômes



10 mutants sur 12 (soit 7 gènes sur 8) possèdent une sensibilité accrue à *A. brassicicola*

1°) Stade jeune plantule : Taux de germination des semences infectées



Les mutants 31, 34, 35, 12 possèdent une germination maximale (Gmax) réduite

Liste des mutants d'*Arabidopsis thaliana* analysés :

Gènes	famille des gènes	mutants STRESS-PEPT
gène A	C-terminally Encoded Peptide [CEP]	lignée 31
		lignée 34
gène B	non déterminé	lignée 6
		lignée 35
gène C	Scorpion toxin-like knottin, Trypsin Inhibitor	lignée 2'
		lignée 25
gène D	DUF538	lignée 12
		lignée 32
gène E	non déterminé	lignée 1
gène F	ECS1-like	lignée 33
gène G	Plant Defensin Family (-Like), LMW Cysteine-Rich [PDF, LCR]	lignée 6'
gène H	(Cysteine-rich, Antigen5, PR1 protein)-derived peptide [CAP]	lignée 13

2°) Stade rosette :

- Mesure de la surface foliaire des plantes (5 semaines)
- Mesure de la surface des secteurs nécrosés (6 semaines)

2°) Stade rosette : Mesure de la surface foliaire des plantes (5 semaines)

Exemple de segmentation des surfaces foliaires (logiciel Ilastik) :

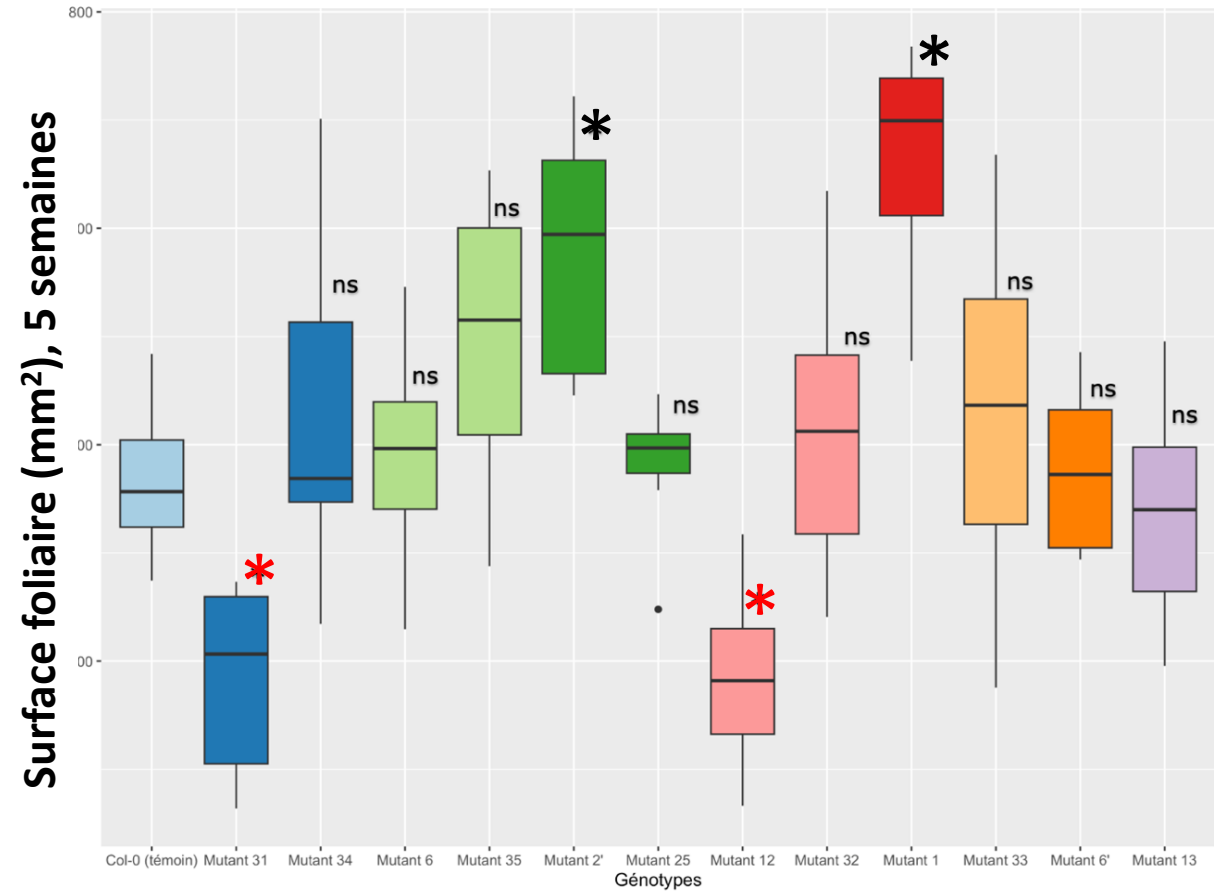


Mutant lignée 12

WT Col-0

Mutant lignée 2'
(Valentin. G)

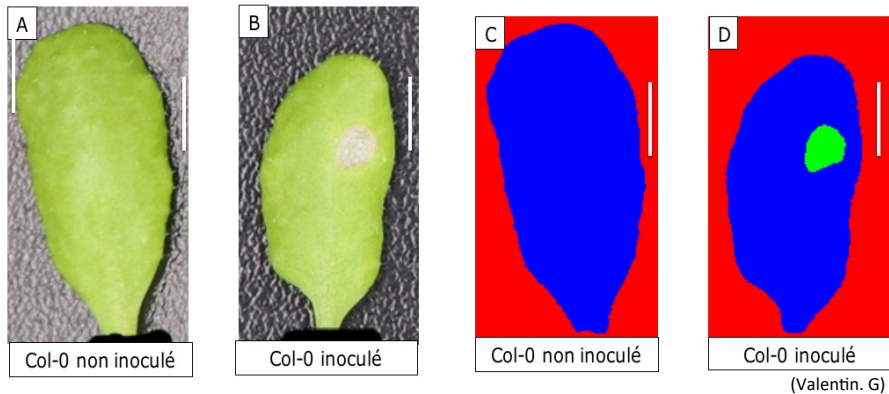
- 4 mutants possèdent une différence de développement avec WT :
 - lignées mutantes 31 et 12 ↘ *
 - lignées mutantes 2' et 1 ↗ *



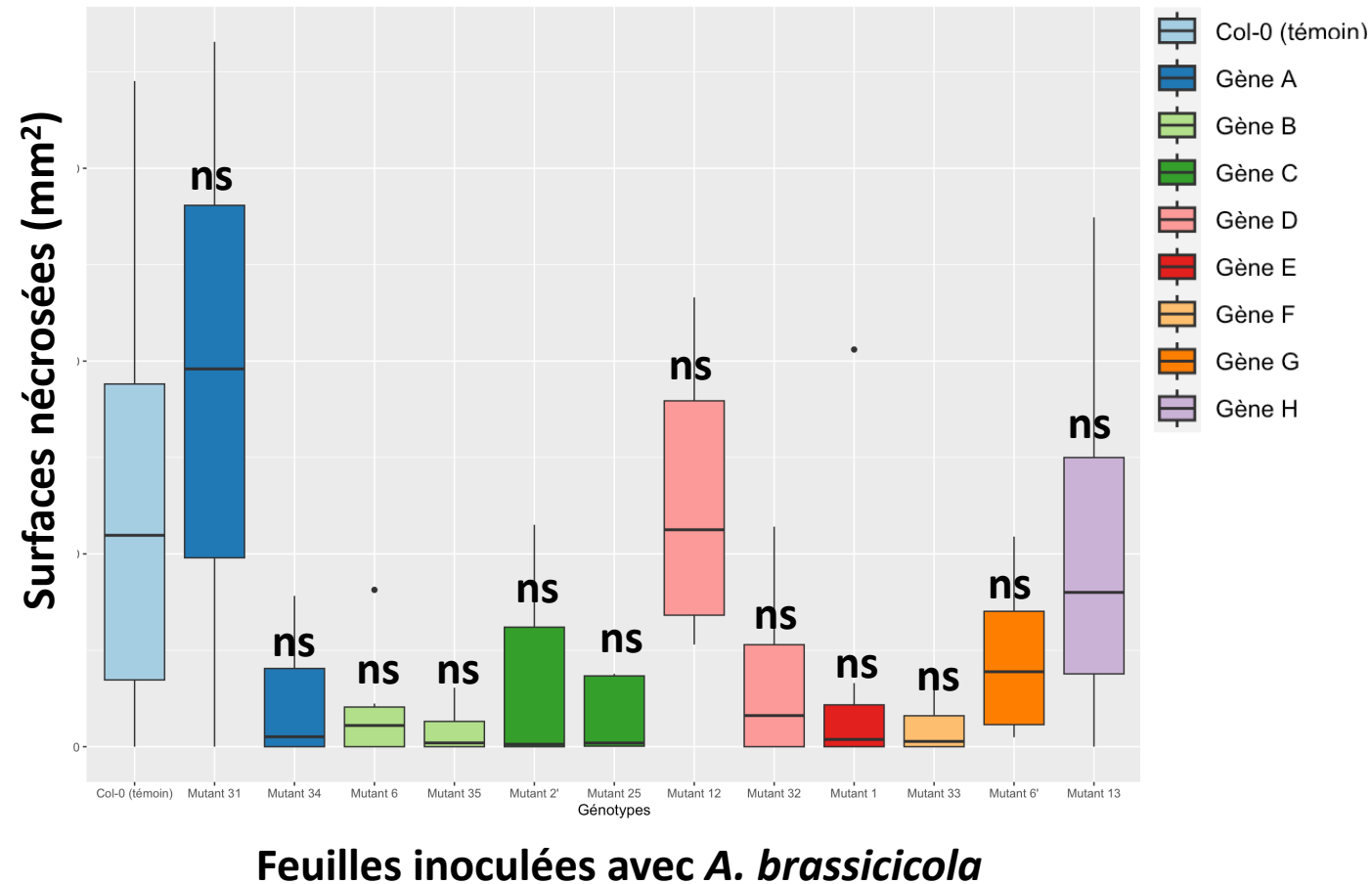
Estimé par segmentation (logiciel Ilastik)

2°) Stade rosette : Mesure de la surface des secteurs nécrosés (6 semaines)

Exemple de segmentation des surfaces foliaires saines et nécrosées (logiciel Ilastik)

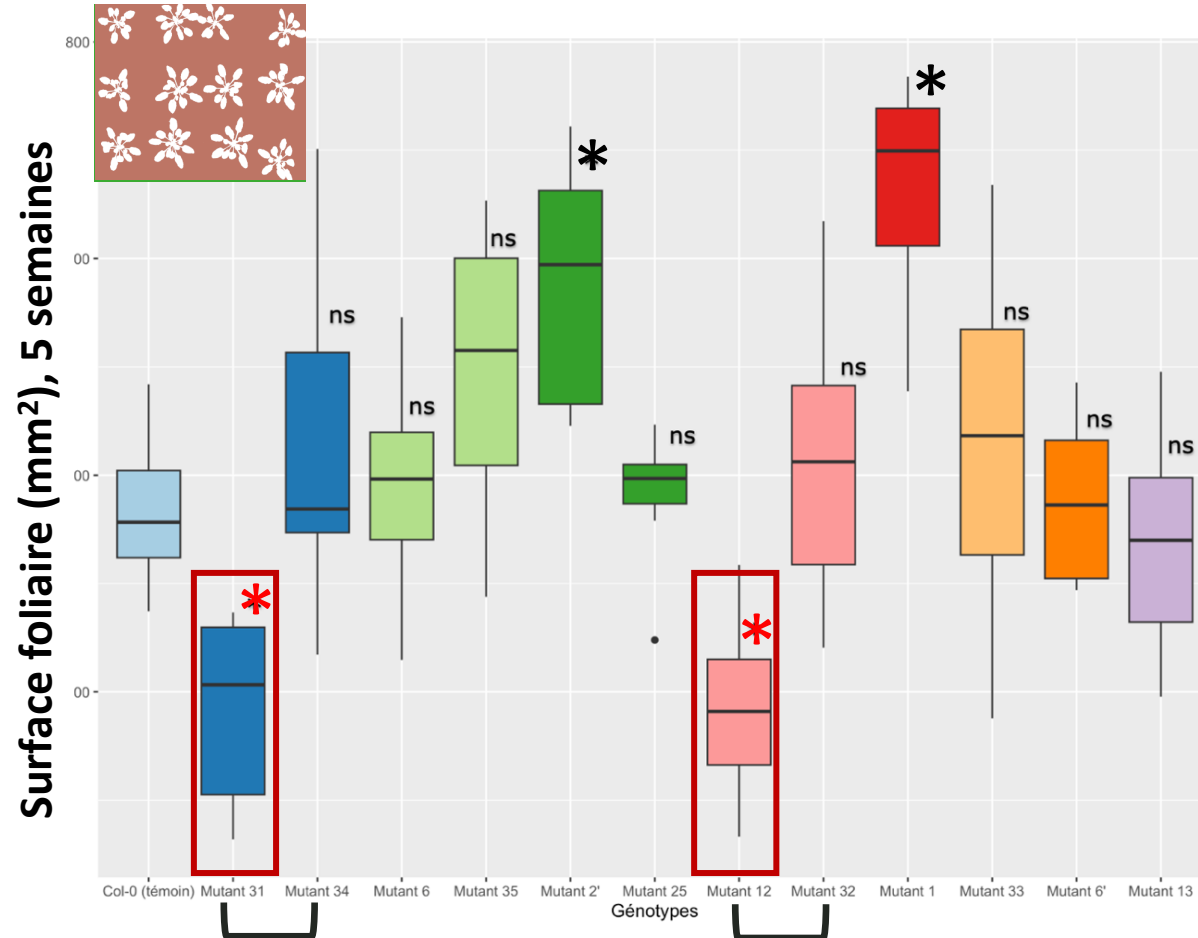


- Pas de symptôme sur les feuilles témoins non inoculées
- Peu de nécrose chez l'ensemble des génotypes et pas de différence significative avec WT
- Variabilité de sensibilité entre feuilles d'un même génotype (voir d'un même individu)
-> lien avec stade de développement

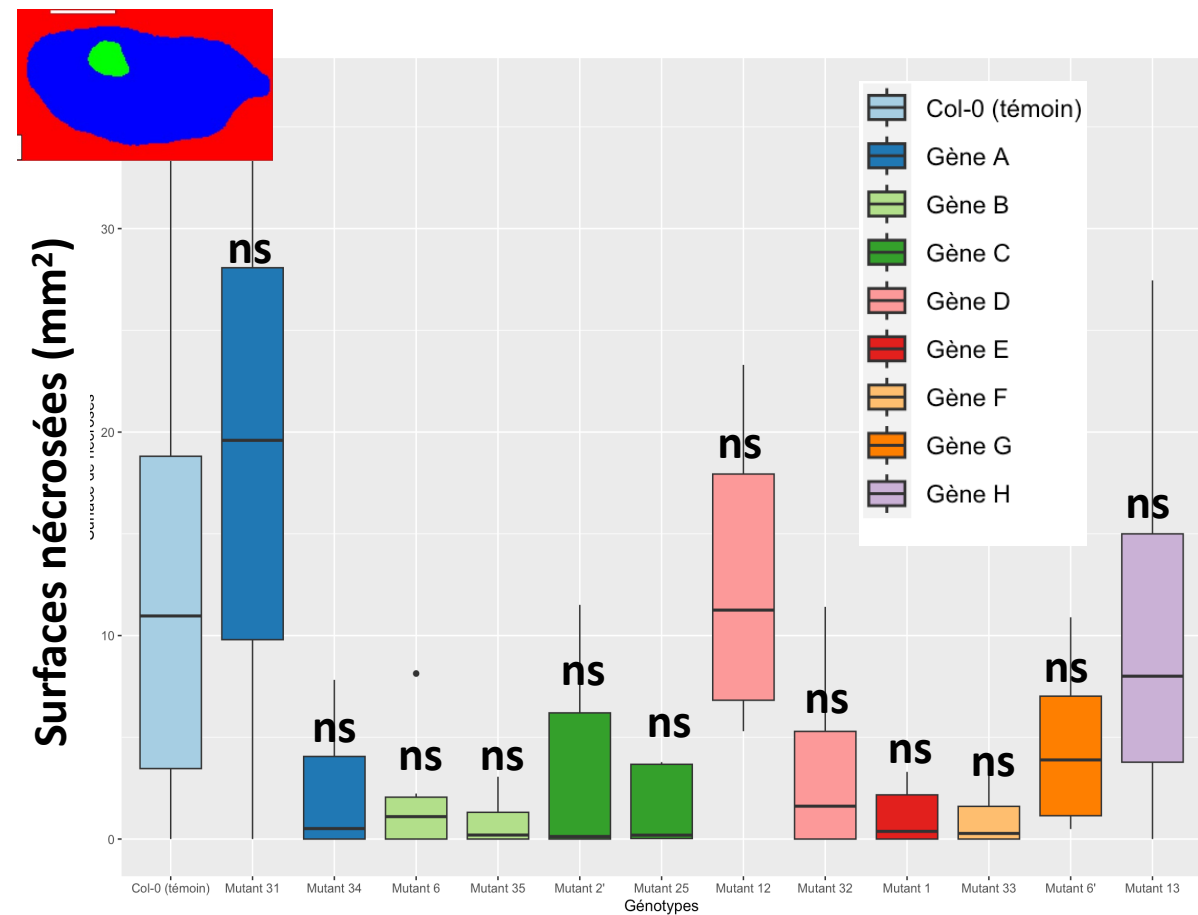


2°) Stade rosette :

Mesure de la surface foliaire des plantes (5 semaines)

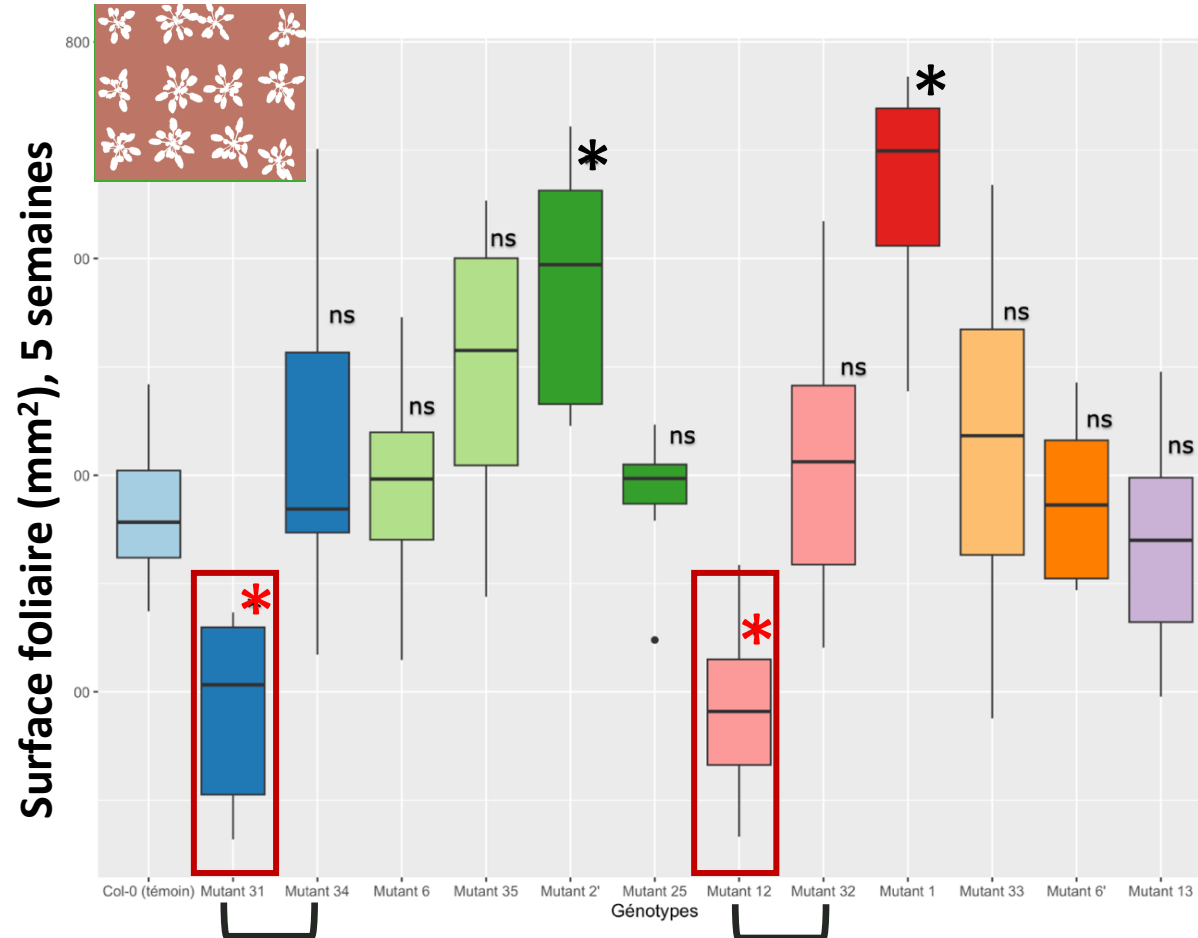


Mesure de la surface des secteurs nécrosés (6 semaines)

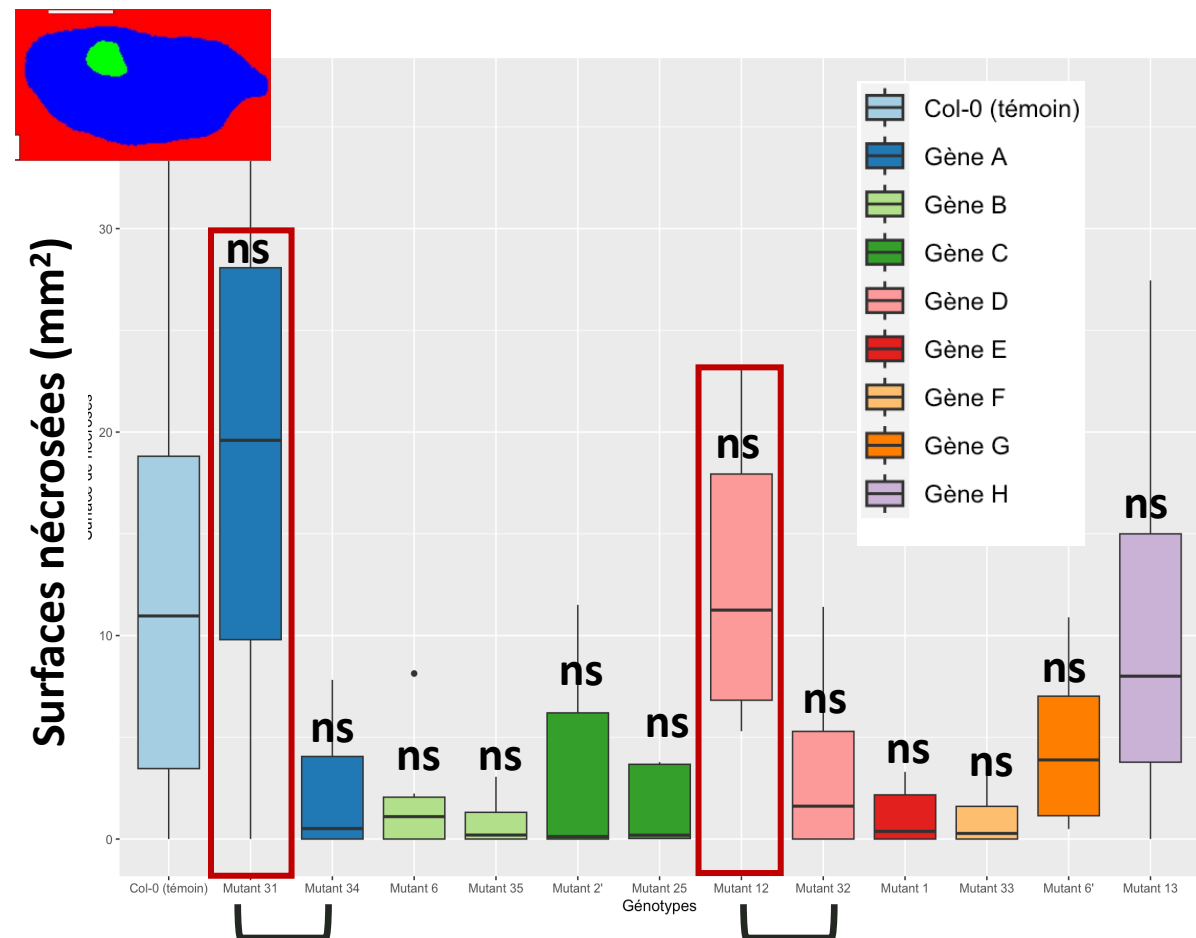


2°) Stade rosette :

Mesure de la surface foliaire des plantes (5 semaines)



Mesure de la surface des secteurs nécrosés (6 semaines)



Objectif : Phénotypage de la résistance d'*Arabidopsis thaliana* au champignon nécrotrophe *Alternaria brassicicola* chez des mutants de peptides sécrétés identifiés par transcriptomique

- **1°) Stade jeune plantule (6-7 jours) :**

- 10 mutants sur 12 (soit 7 gènes sur 8) possèdent une sensibilité accrue à *A. brassicicola* :

L'implication forte des familles de peptide dans l'interaction A thaliana / A. brassicicola a un stade post germinatif (à confirmer)

- 4 de ces 10 mutants une Gmax réduite en interaction avec *A. brassicicola*
- Modèle d'étude adapté
- Perspective : analyse d'images (Barrit *et al*, 2022) et ajout de témoins non inoculés pour étudier les phénotypes de germination

- **2°) Stade rosette (5-6 semaines) :**

- Succès des méthodes d'analyse d'images pour la croissance et les nécroses
- Difficulté du modèle
 - biais importants liés à la variabilité des phénotypes de croissance des mutants

Objectif : Phénotypage de la résistance d'*Arabidopsis thaliana* au champignon nécrotrophe *Alternaria brassicicola* chez des mutants de peptides sécrétés identifiés par transcriptomique

L'étude comparative des mutants sera poursuivie avec le pathosystème à un stade jeune plantule

- ⇒ **Résultats de l'expression des mutants...** (Knock-out, surexpressueur ??)
- ⇒ **Complémentation avec des peptides de synthèses** (osmo-priming...) :
 - interaction, développement d'*A. thaliana* et d'*A. brassicicola*

Barrit T, Campion C, Aligon S, Bourbeillon J, Rousseau D, Planchet E, Teulat B. 2022. A new in vitro monitoring system reveals a specific influence of Arabidopsis nitrogen nutrition on its susceptibility to *Alternaria brassicicola* at the seedling stage. *Plant Methods* **18**, 131.

Goyal RK, Mattoo AK. 2014. Multitasking antimicrobial peptides in plant development and host defense against biotic/abiotic stress. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology* **228**, 135–149.

Guillou M-C. 2022. Caractérisation fonctionnelle de peptides sécrétés SCOOP impliqués dans le contrôle des voies de défense et du développement chez *Arabidopsis*.

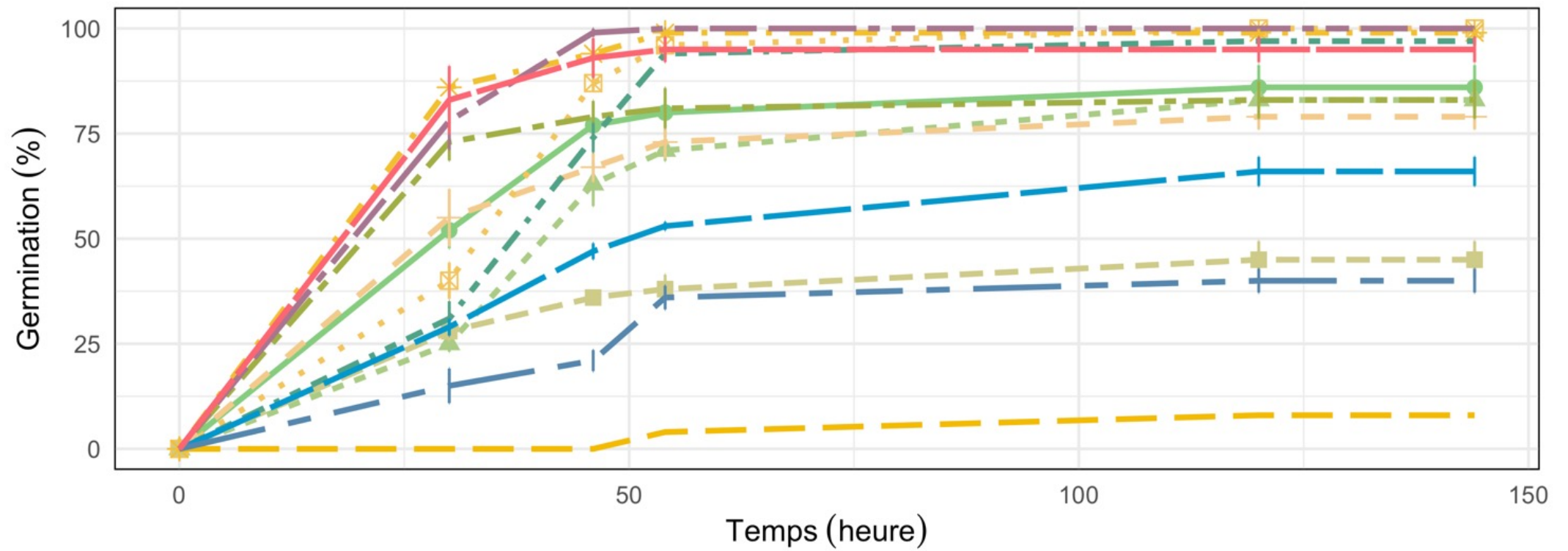
Gust AA, Pruitt R, Nürnberger T. 2017. Sensing Danger: Key to Activating Plant Immunity. *Trends in Plant Science* **22**, 779–791.

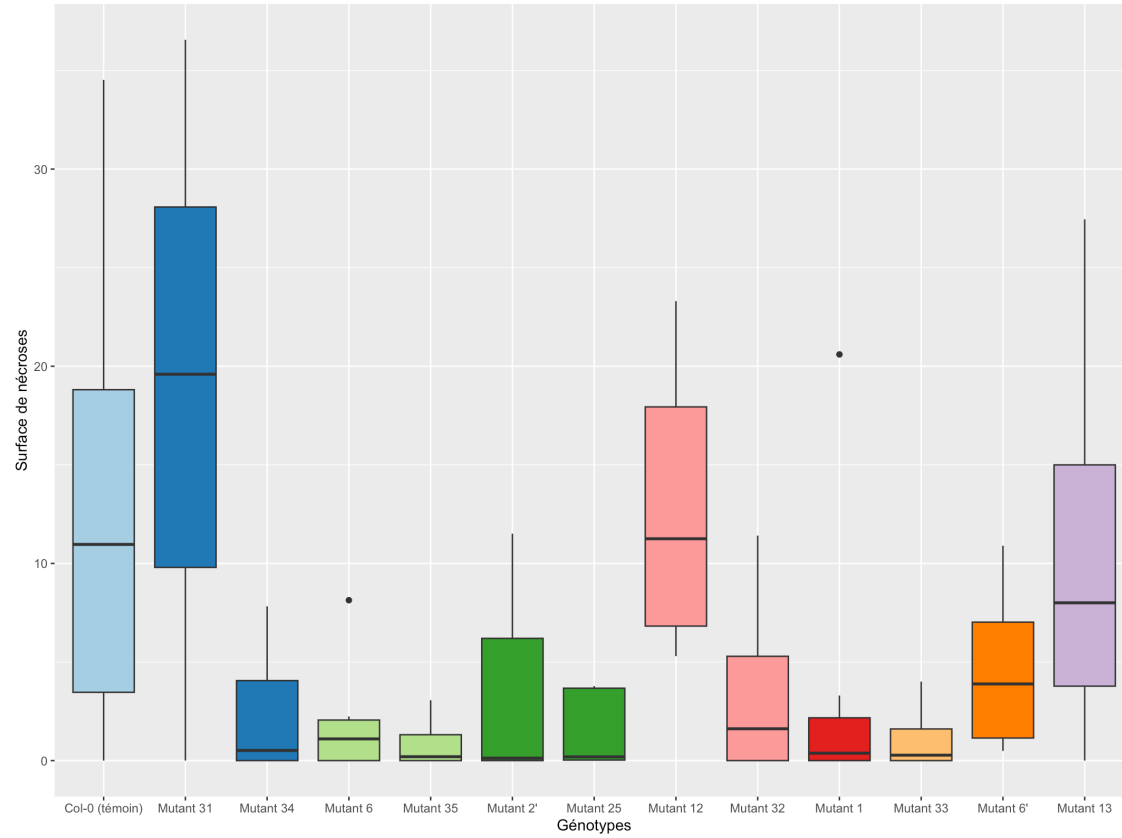
Ortega-Cuadros M, De Souza TL, Berruyer R, *et al.* 2022. Seed Transmission of Pathogens: Non-Canonical Immune Response in *Arabidopsis* Germinating Seeds Compared to Early Seedlings against the Necrotrophic Fungus *Alternaria brassicicola*. *Plants* **11**, 1708.

Savary S, Willocquet L, Pethybridge SJ, Esker P, McRoberts N, Nelson A. 2019. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution* **3**, 430–439.

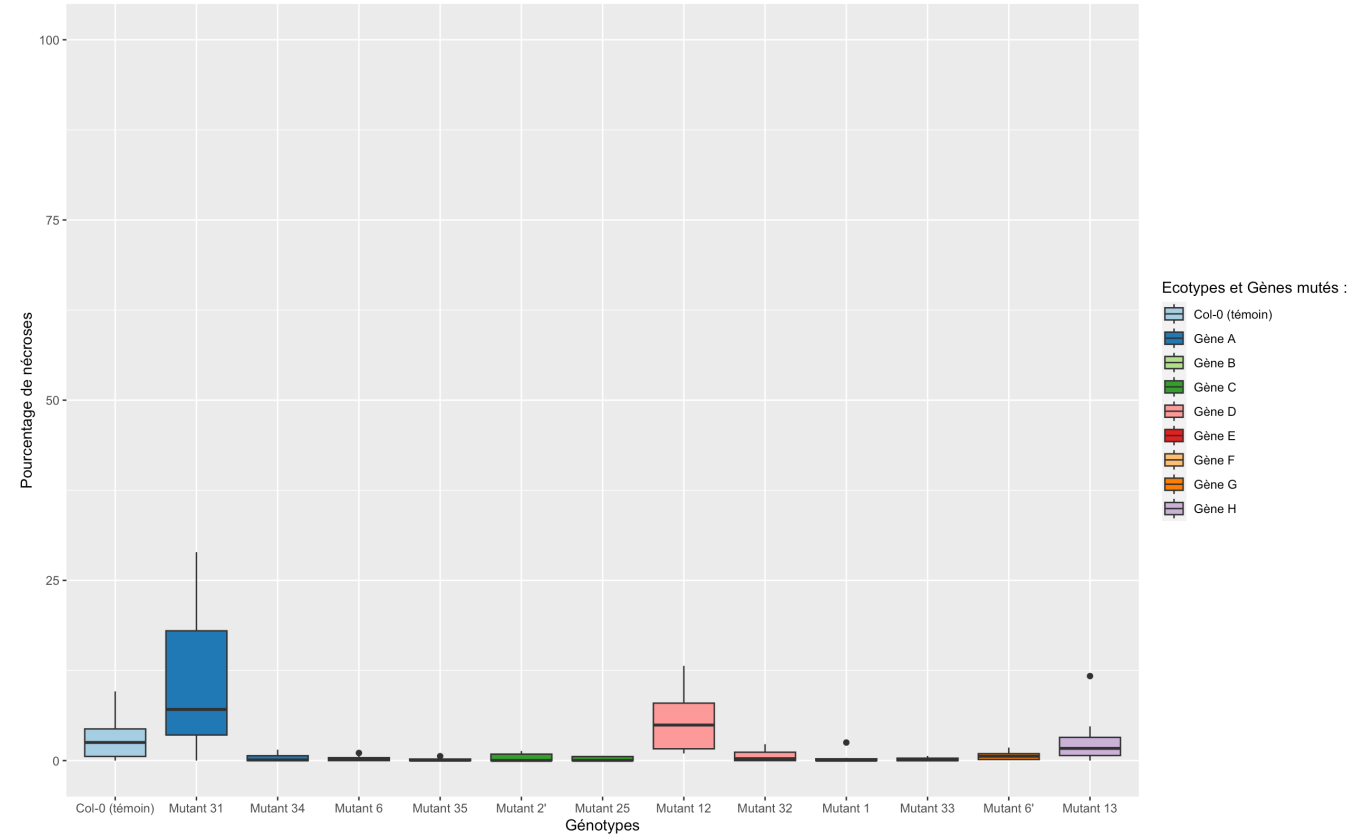
Génotypes :

● Col-0 (témoin)	+ Mutant 13	■ Mutant 31	■ Mutant 34	■ Mutant 6'
▲ Mutant 1	⊠ Mutant 2'	■ Mutant 32	■ Mutant 35	
■ Mutant 12	* Mutant 25	■ Mutant 33	■ Mutant 6	

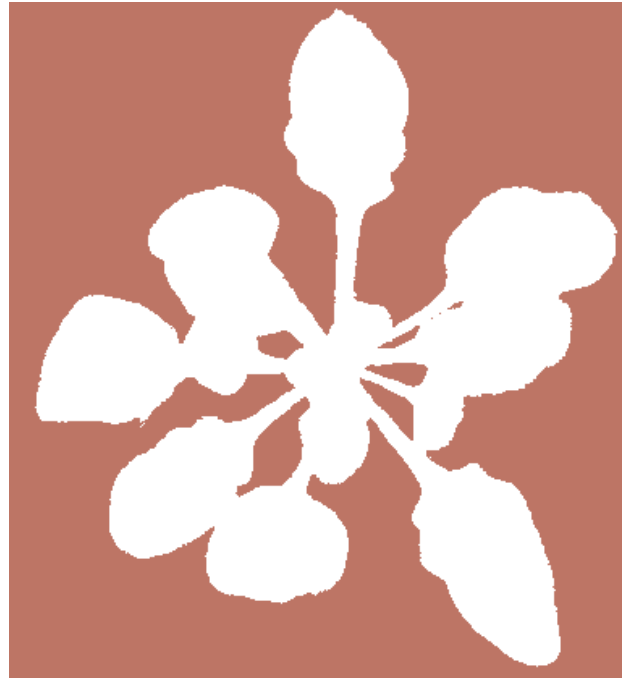




**Surfaces nécrosées (mm²) chez les feuilles
inoculées avec *A. brassicicola***

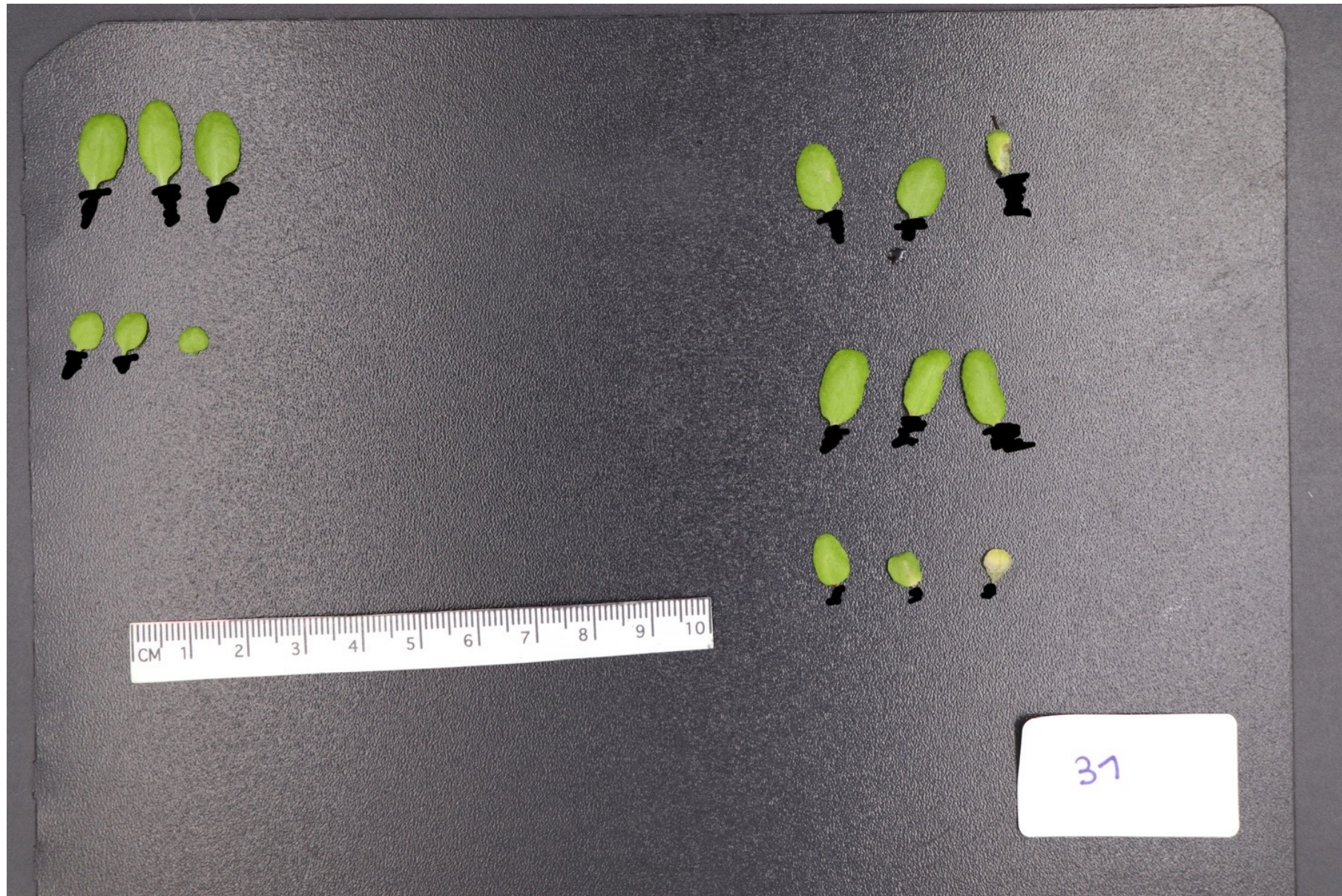


**Pourcentage de surfaces foliaires nécrosés chez
les feuilles inoculées avec *A. brassicicola***







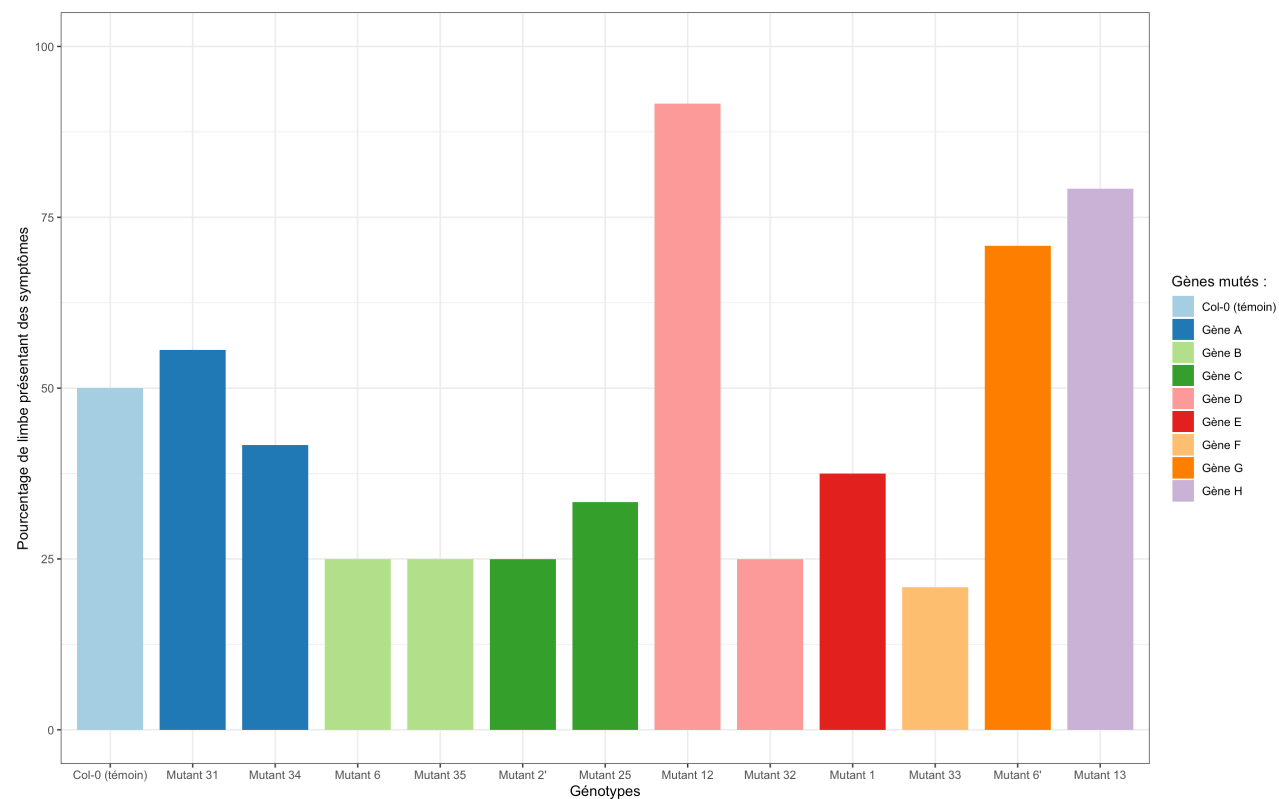






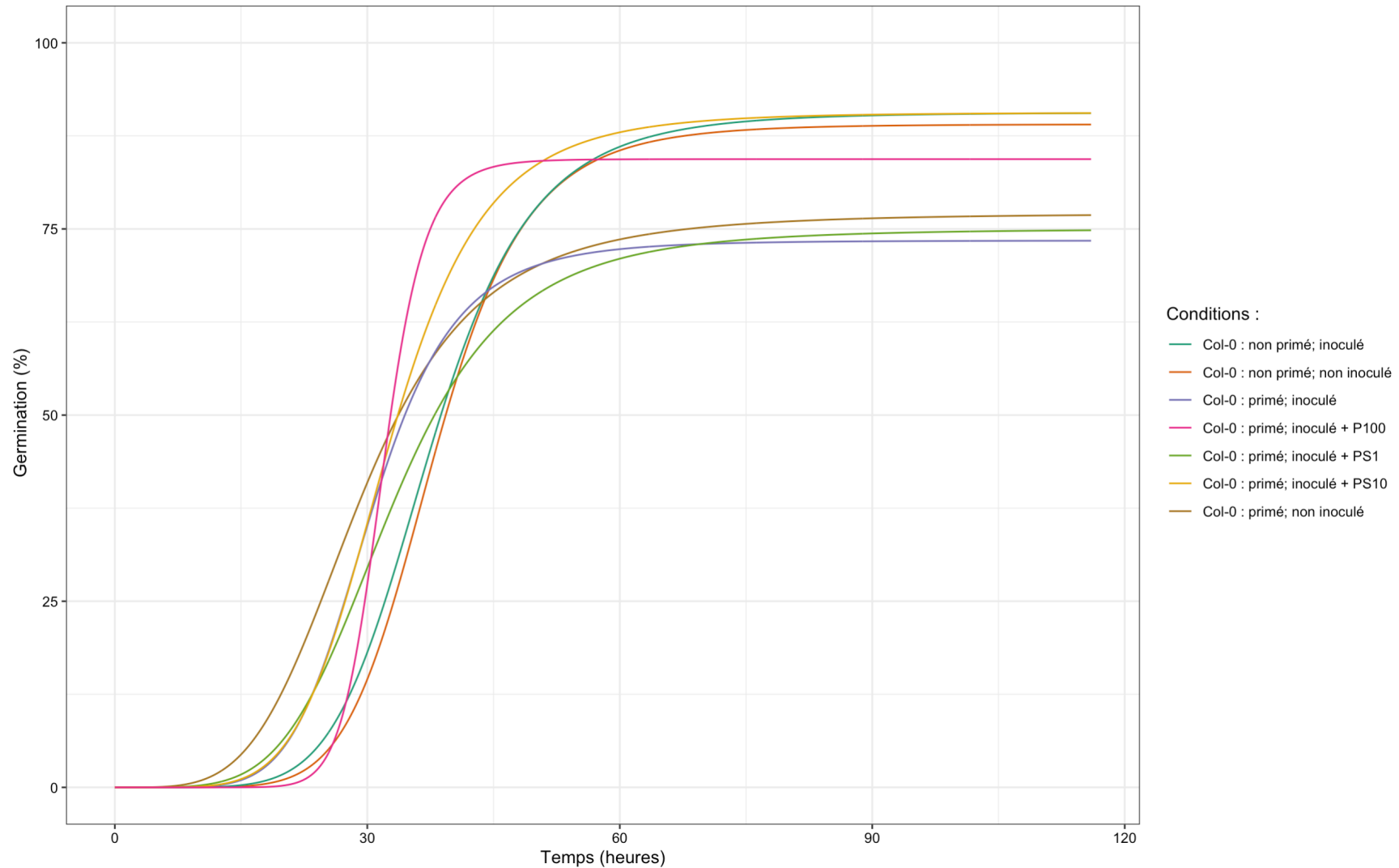


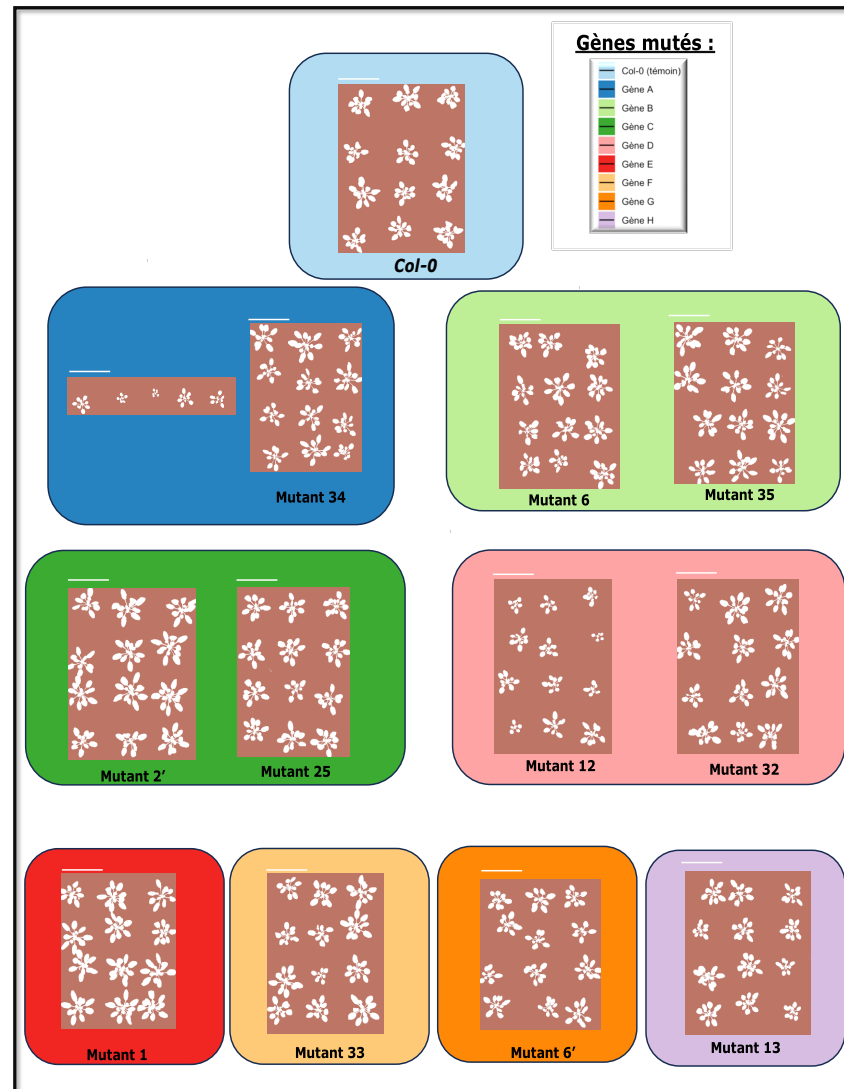




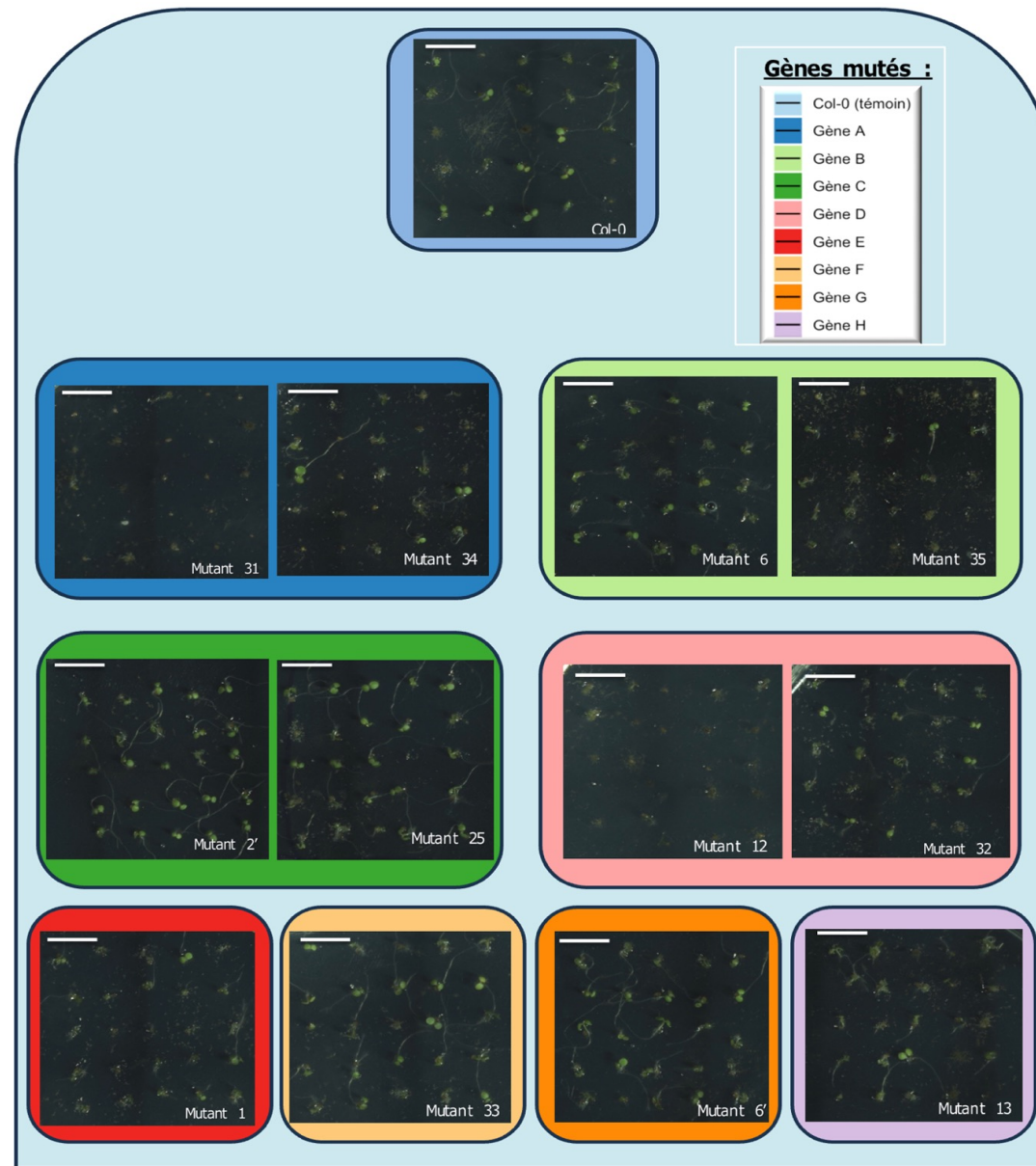
Pourcentage de feuilles inoculées avec Abra 43 présentant des nécroses

Osmo-priming





Annexe II : Comparaison visuelle des différents mutants de peptides sécrétés d'*Arabidopsis thaliana* 5 semaines après le semis (avant l'inoculation)



**pipeline bioinformatique :**

> 1300 gènes potentiels codant pour des
phyto cytokines chez *Arabidopsis thaliana*

→ plante modèle

RNA seq :***Alternaria brassicicola***

Eumycète
nécrotrophe
symptômes sur feuille

Hyaloperonospora arabidopsis

Oomycète
Biotrophe obligatoire
symptômes sur feuille

Phytophthora parasitica

Oomycète
Hémi-biotrophe
symptômes sur racines

Meloidogyne incognita

Nématode
Biotrophe
symptômes sur racines

- 28 gènes candidats codant des **peptides sécrétés** impliqués dans la réponse à des **stress biotiques**