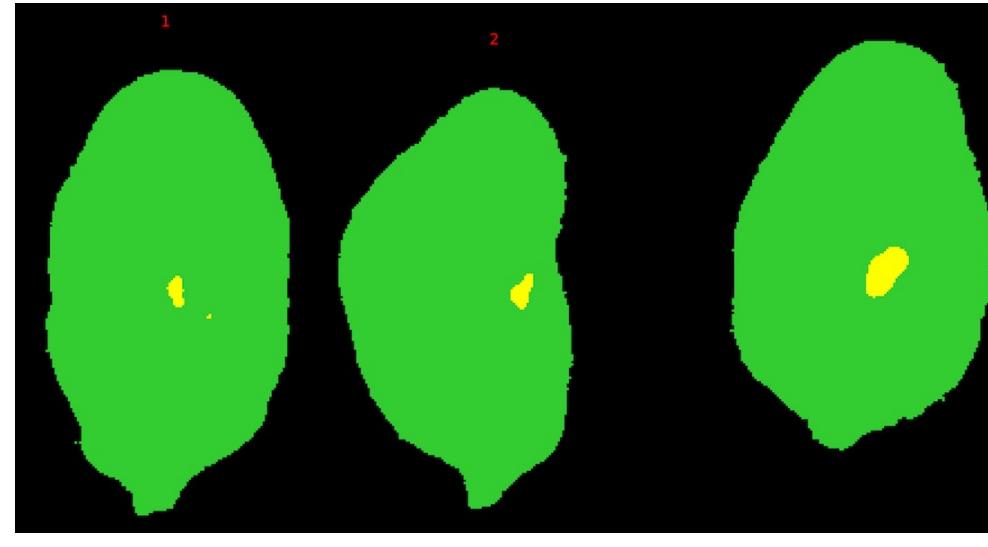


Phénotypage de la résistance d'*Arabidopsis thaliana* au champignon nécrotrophe *Alternaria brassicicola* chez des mutants de peptides sécrétés identifiés par transcriptomique



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 [CPE]	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 3
gène F	ECS1-like	lignée 33
gène G	Plant Defensin Family (-like), LMW Cysteine-Rich [POF, LCR]	lignée 6'
gène H	(Cysteine-rich, Antigen5, PR1 protein)-derived peptide [CAP]	lignée 13

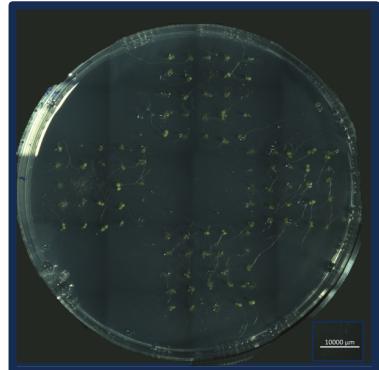


Objectif : Phénotypage de la résistance d'*Arabidopsis thaliana* au champignon nécrotrophe *Alternaria brassicicola* chez des mutants de peptides identifiés par transcriptomique

Hypothèse :

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

Inoculation de graines



1°) Stade jeune plantule :

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

(Valentin. G)

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 :

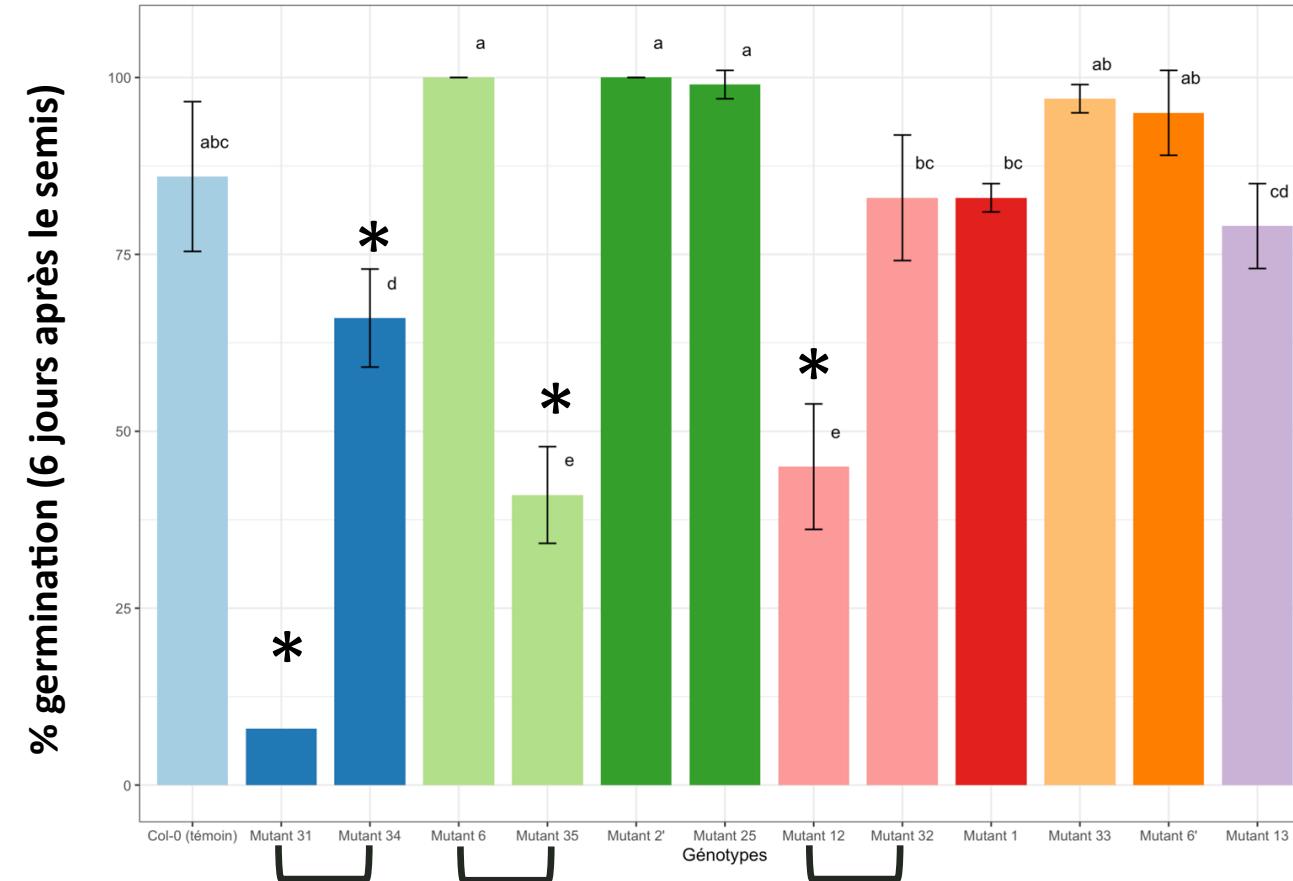
Gènes	famille des gènes	mutants STRESS-PEPT
gène A	C-terminally Encoded Peptide [CEP]	lignée 31
		lignée 34
gène B	non déterminé	lignée 6
		lignée 35
gène C	Scorpion toxin-like knottin, Trypsin Inhibitor	lignée 2'
		lignée 25
gène D	DUF538	lignée 12
		lignée 32
gène E	non déterminé	lignée 1
gène F	ECS1-like	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

- Col-0 (témoin)
- Gène A
- Gène B
- Gène C
- Gène D
- Gène E
- Gène F
- Gène G
- Gène H



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

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

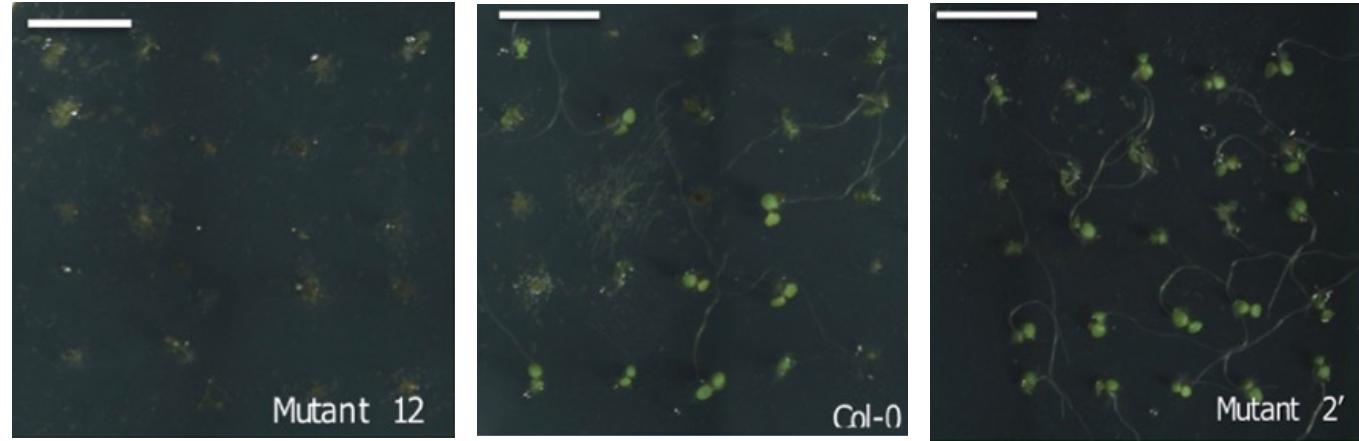
Echelle d'évaluation visuelle de l'intensité des symptômes (adapté de Barrit *et al*, 2022):

Illustration de plantules représentatives	Description visuelle de l'évaluation
	Note = 0 : Pas de colonisation mycéienne, 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 mycéienne importante et/ou nécroses de tailles intermédiaires
	Note = 3 : Plantules très fortement nécrosés ou chlorosés

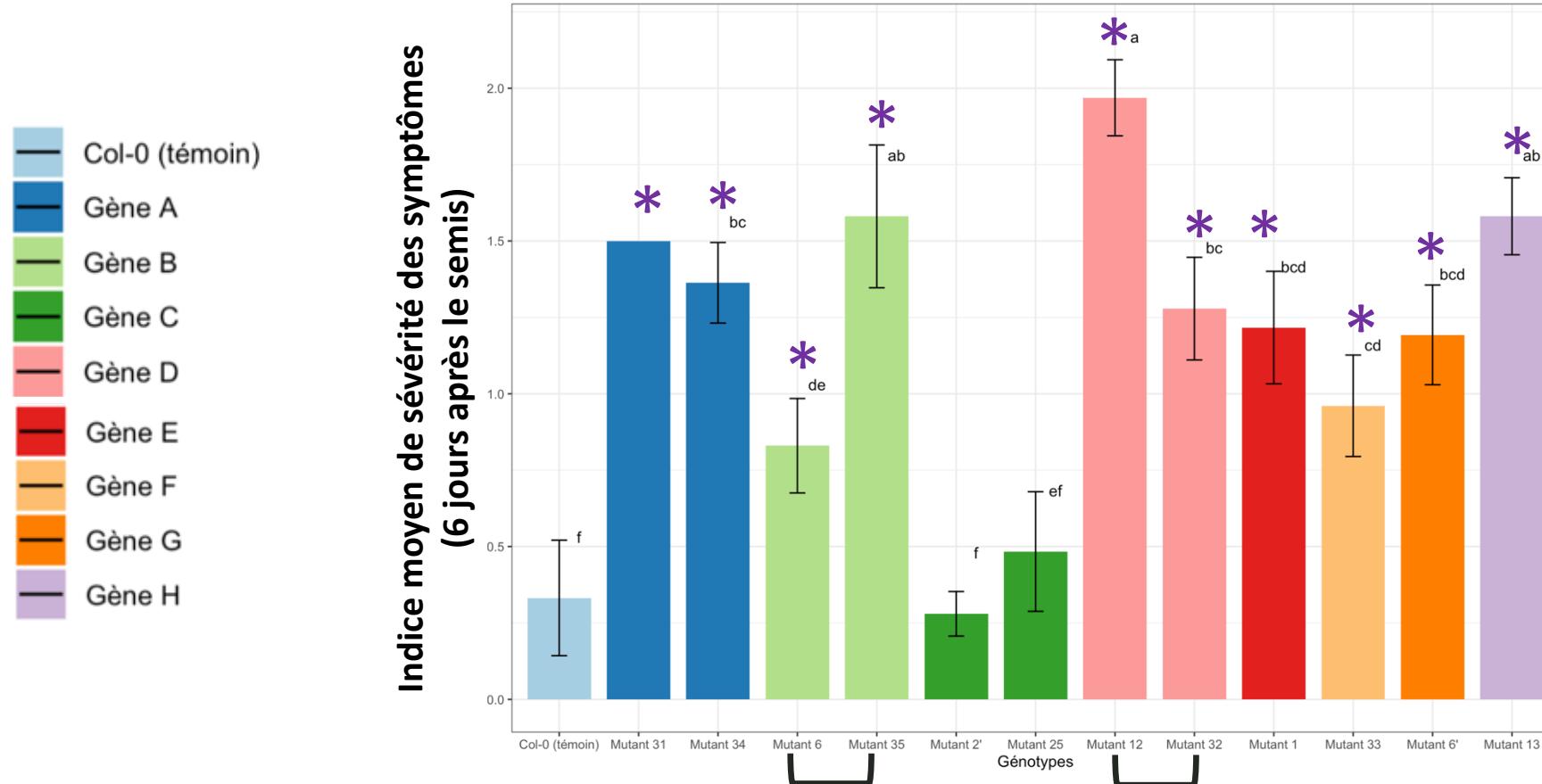
(Valentin. G)

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

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

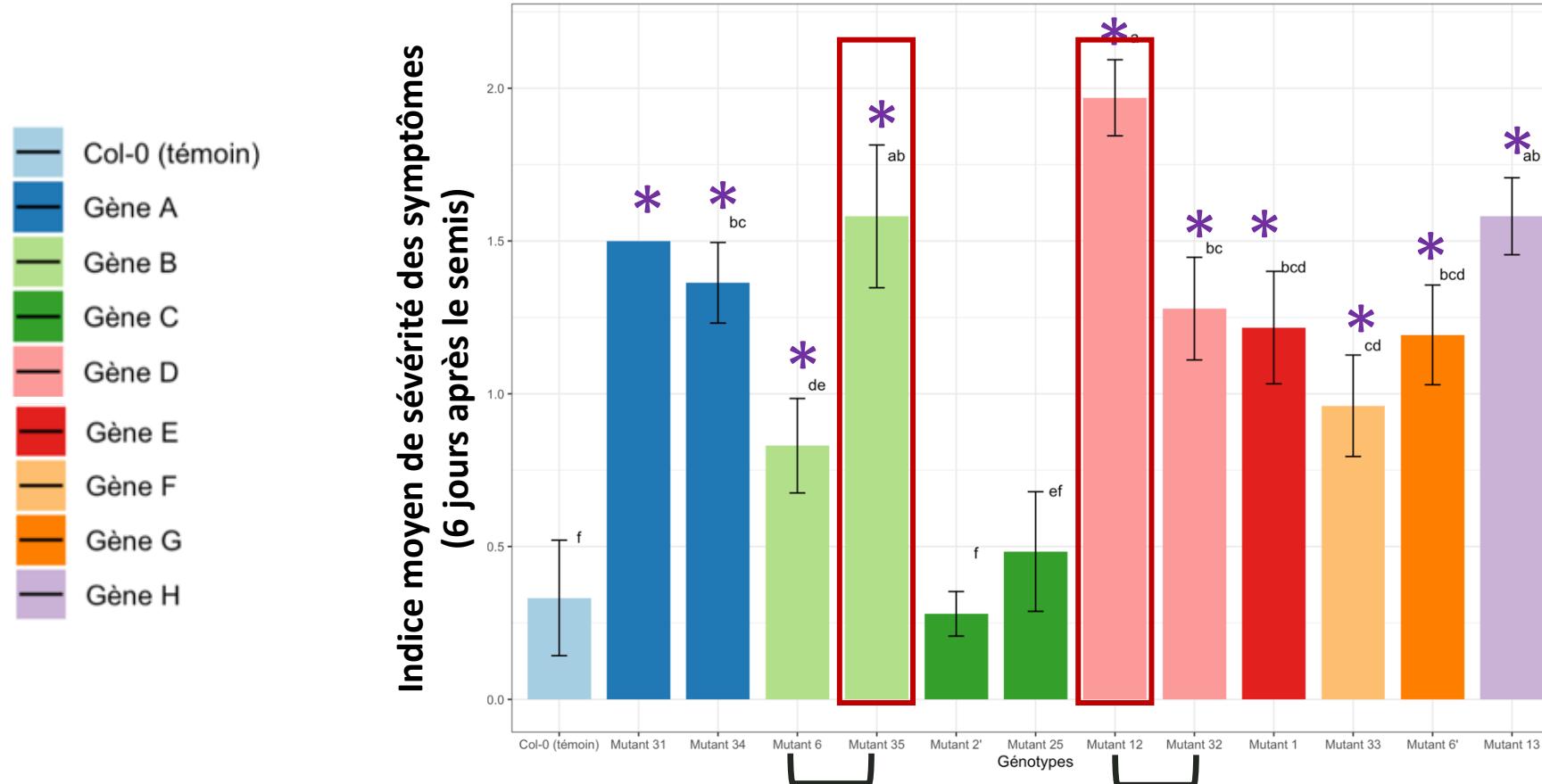


1°) Stade jeune plantule : Mesure de l'indice de sévérité des symptômes



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

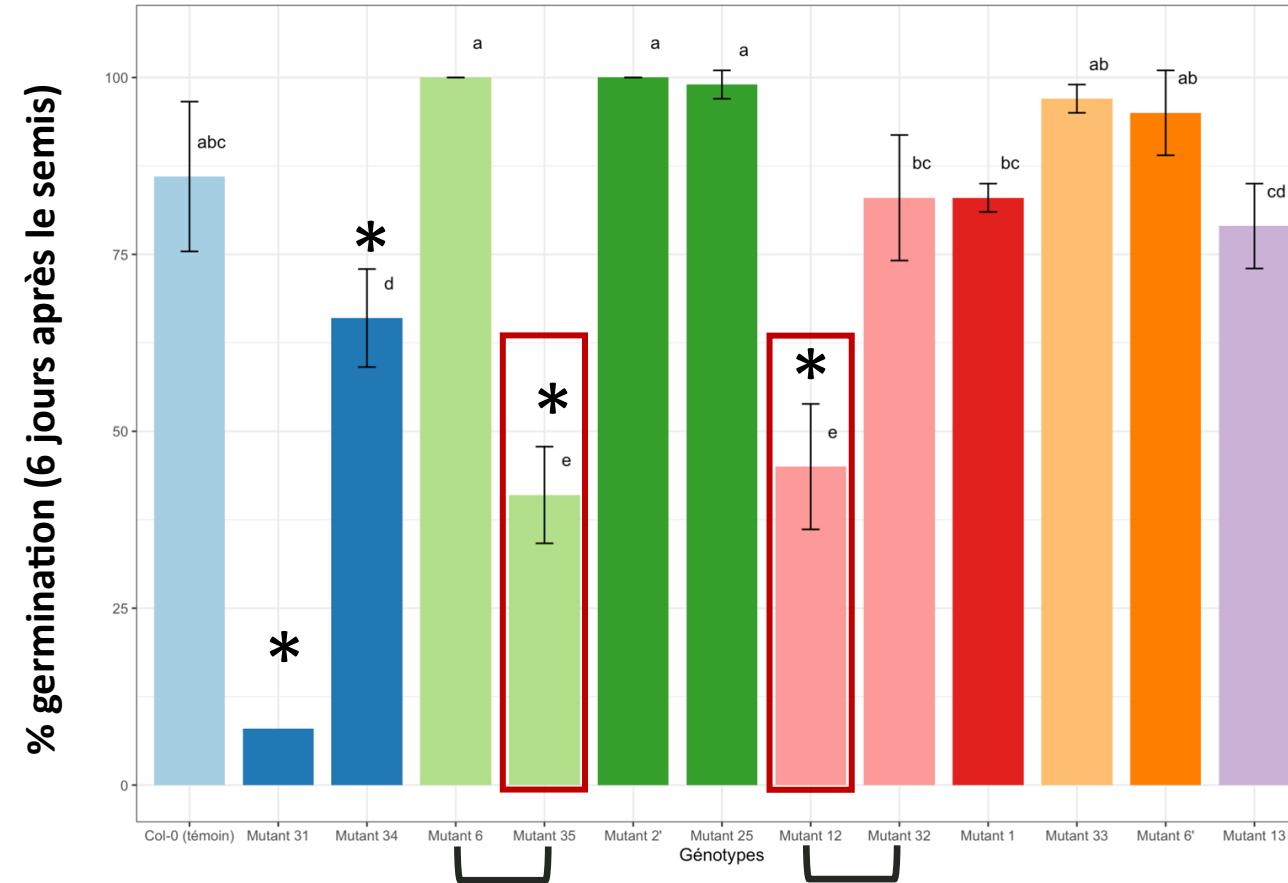
1°) Stade jeune plantule : Mesure de l'indice de sévérité des symptômes



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

- Col-0 (témoin)
- Gène A
- Gène B
- Gène C
- Gène D
- Gène E
- Gène F
- Gène G
- Gène H



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

Liste des mutants d'*Arabidopsis thaliana* analysés :

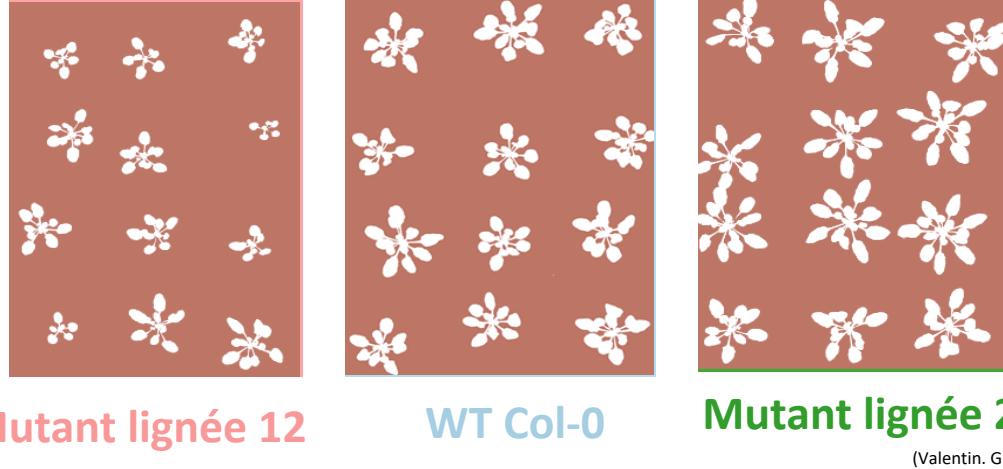
Gènes	famille des gènes	mutants STRESS-PEPT
gène A	C-terminally Encoded Peptide [CEP]	lignée 31
		lignée 34
gène B	non déterminé	lignée 6
		lignée 35
gène C	Scorpion toxin-like knottin, Trypsin Inhibitor	lignée 2'
		lignée 25
gène D	DUF538	lignée 12
		lignée 32
gène E	non déterminé	lignée 1
gène F	ECS1-like	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 :

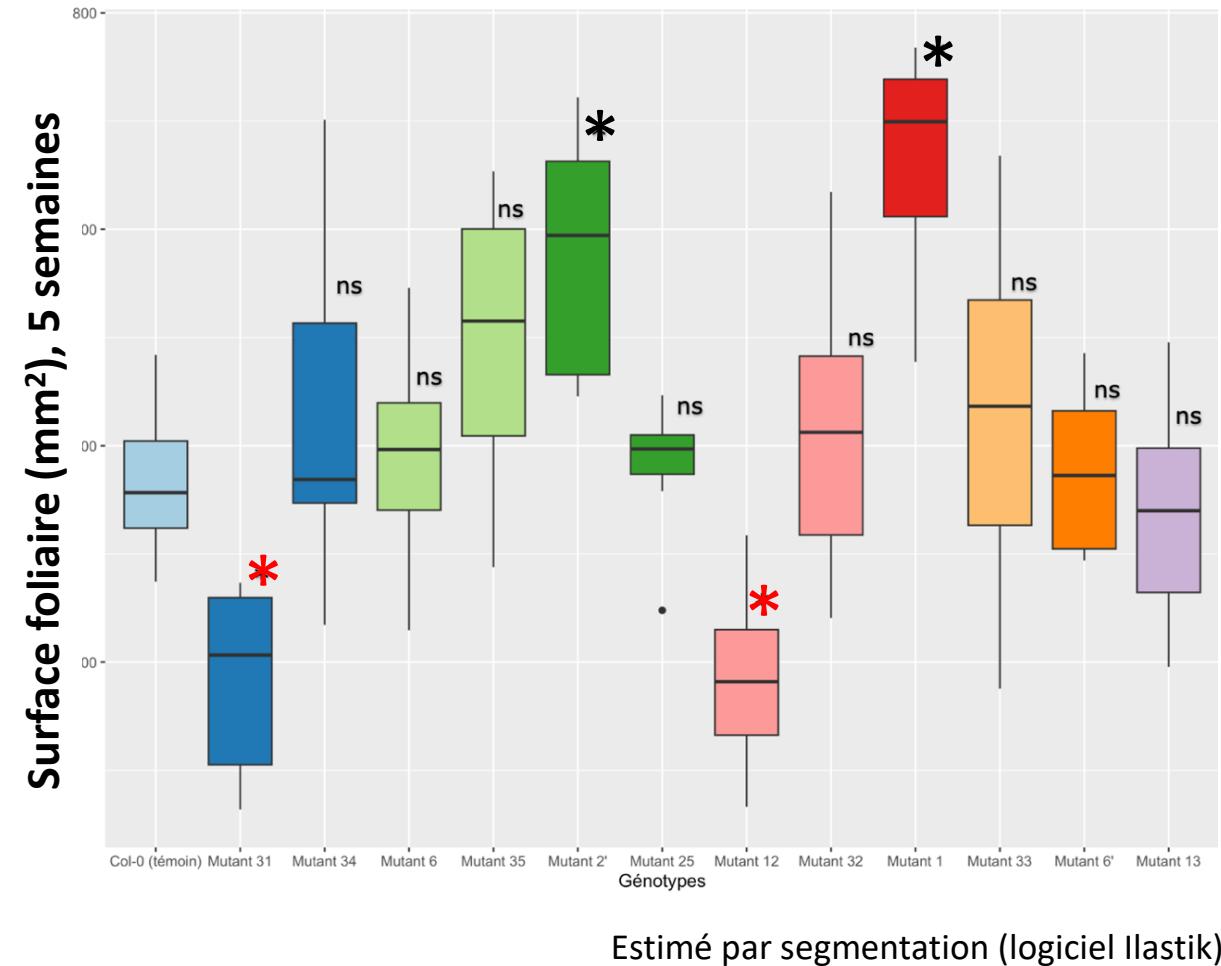
- Mesure de la surface foliaire des plantes (5 semaines)
- Mesure de la surface des secteurs nécrosés (6 semaines)

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

Exemple de segmentation des surfaces foliaires (logiciel Ilastik) :

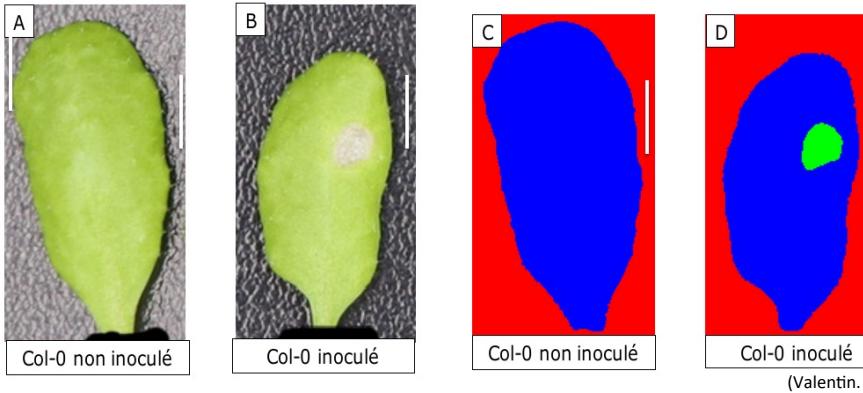


- 4 mutants possèdent une différence de développement avec WT :
 - lignées mutantes 31 et 12 ↘ *
 - lignées mutantes 2' et 1 ↗ *

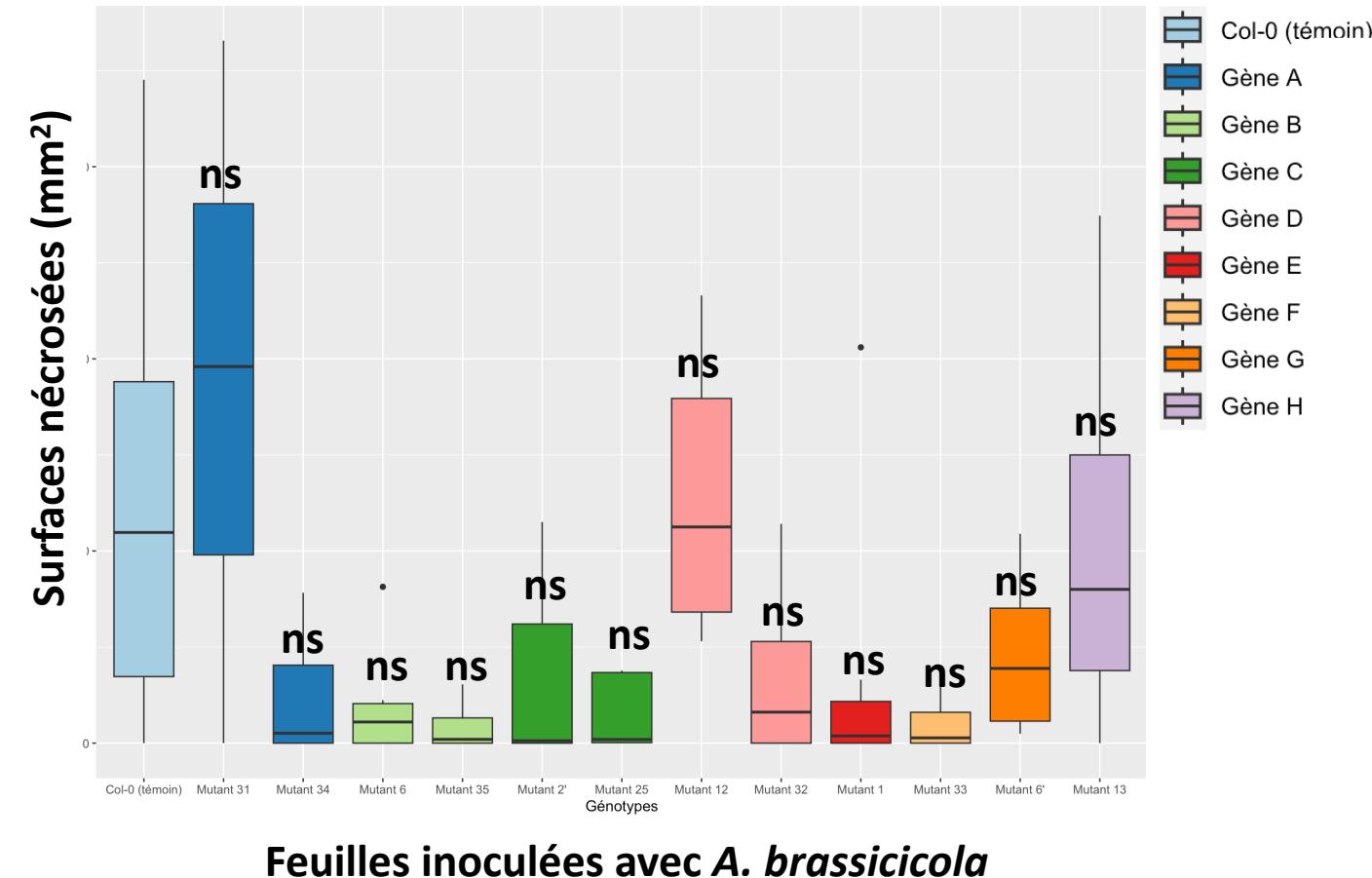


2°) Stade rosette : Mesure de la surface des secteurs nécrosés (6 semaines)

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

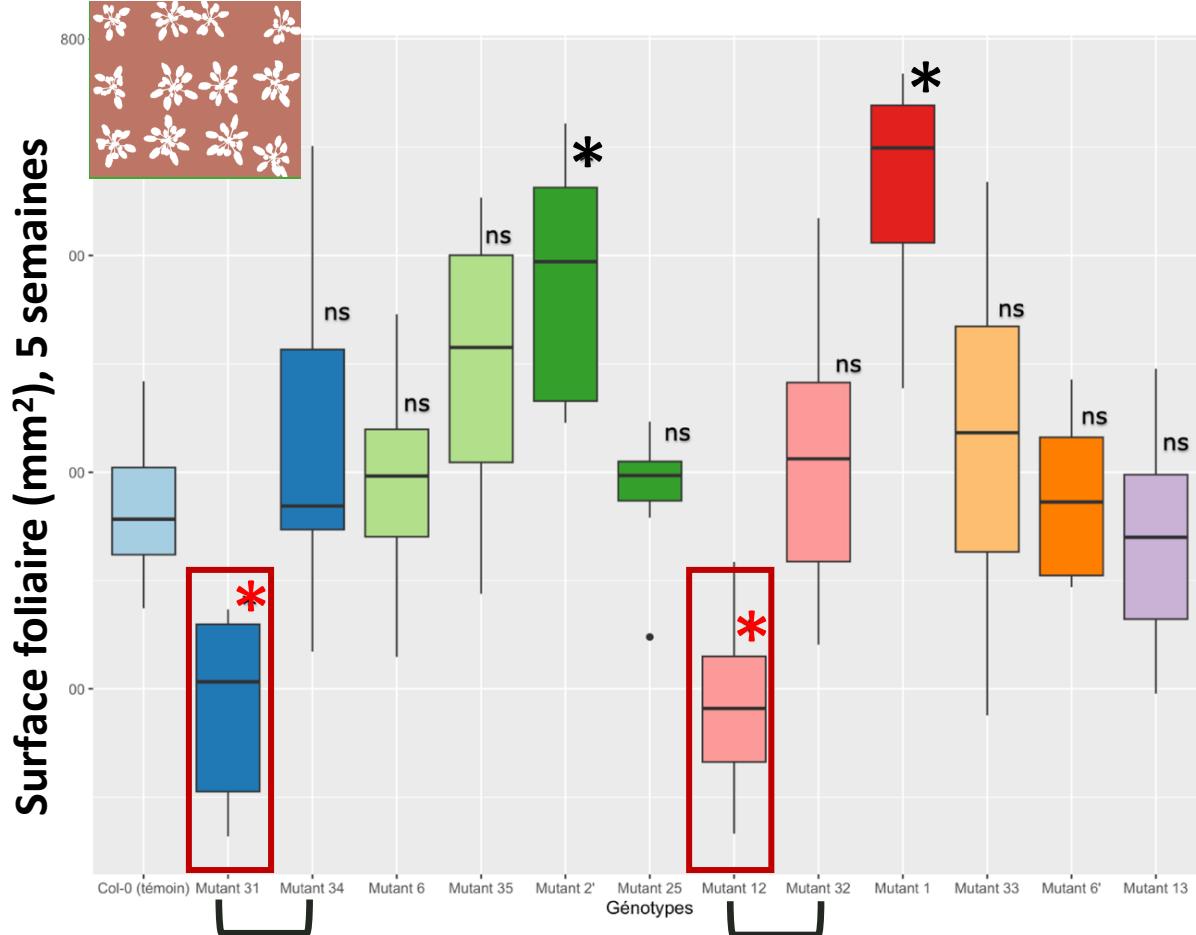


- Pas de symptôme sur les feuilles témoins non inoculées
- Peu de nécrose chez l'ensemble des génotypes et pas de différence significative avec WT
- Variabilité de sensibilité entre feuilles d'un même génotype (voir d'un même individu)
-> lien avec stade de développement

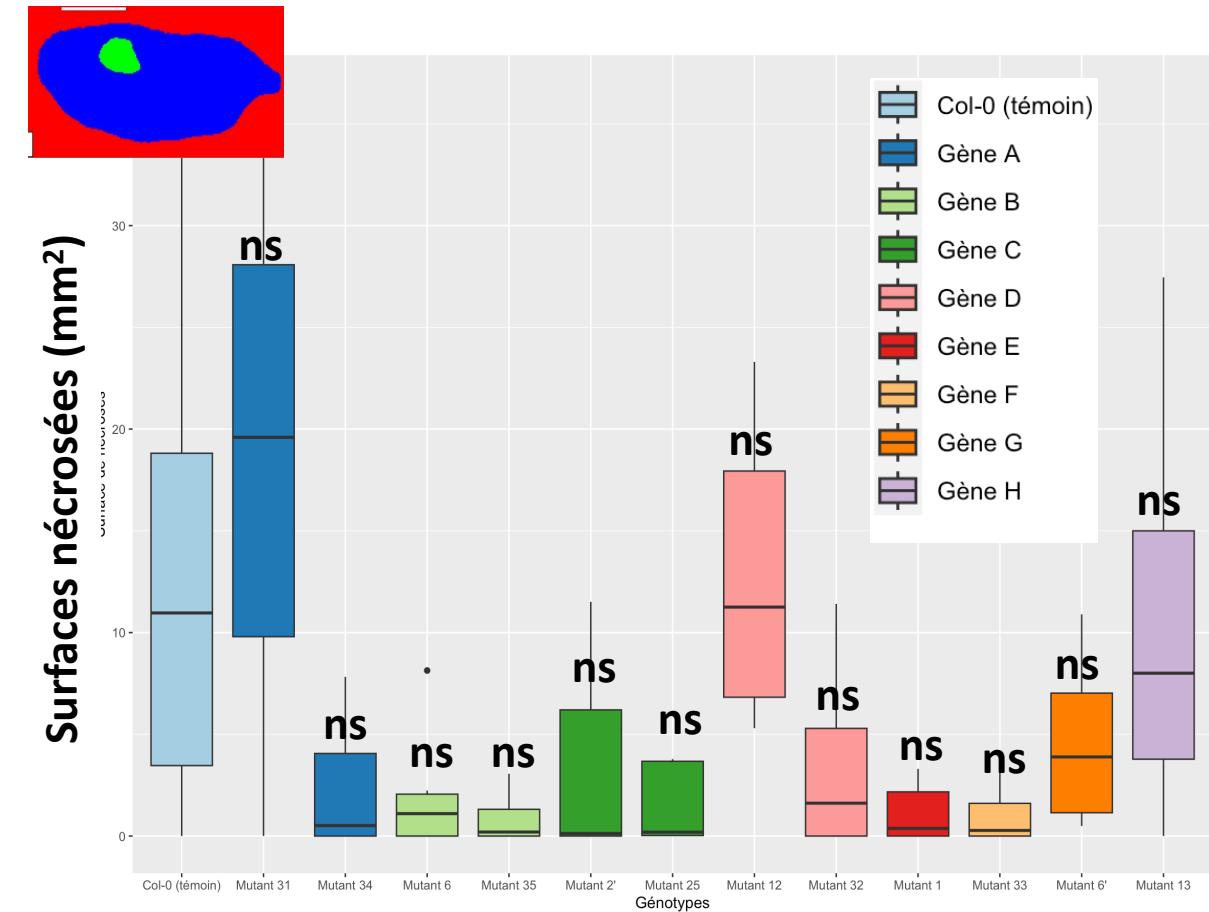


2°) Stade rosette :

Mesure de la surface foliaire des plantes (5 semaines)

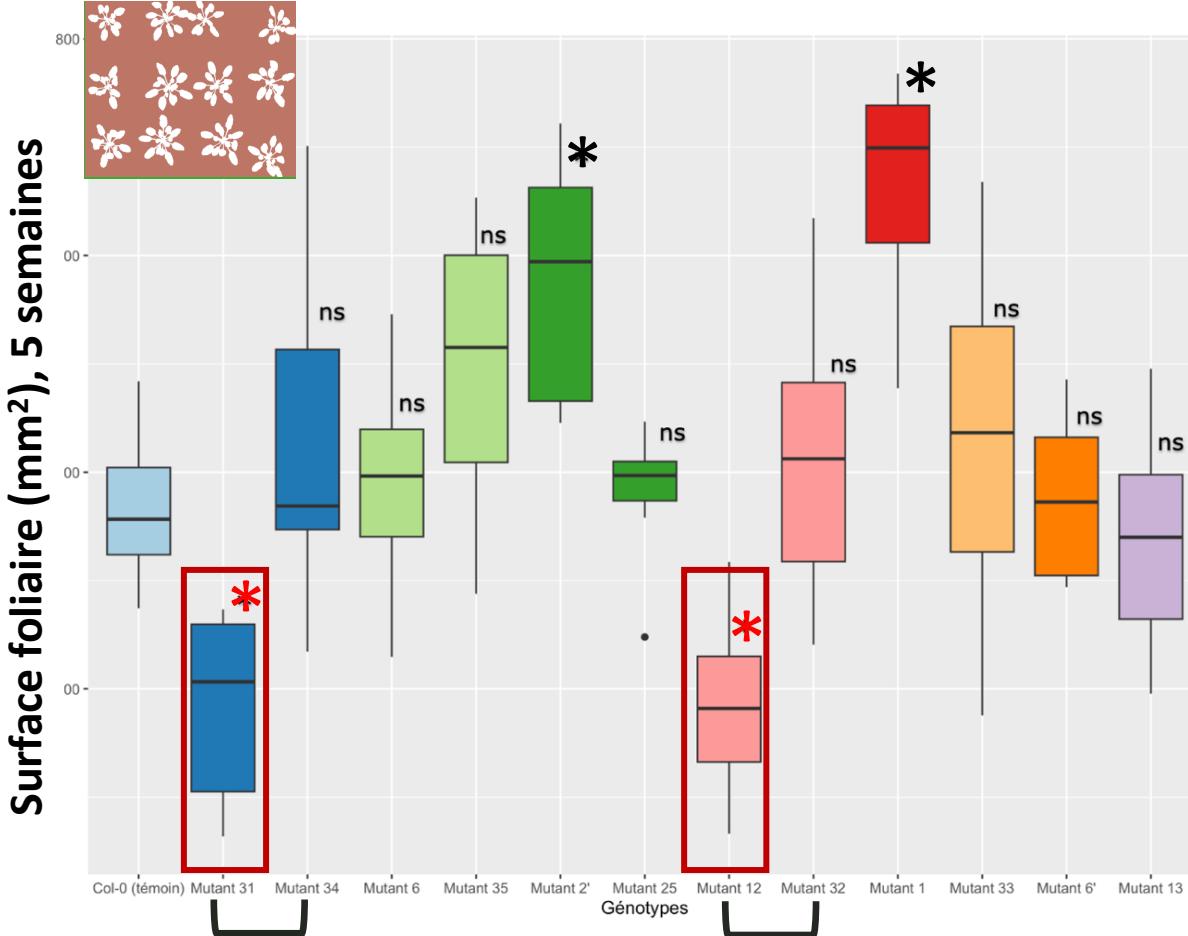


Mesure de la surface des secteurs nécrosés (6 semaines)

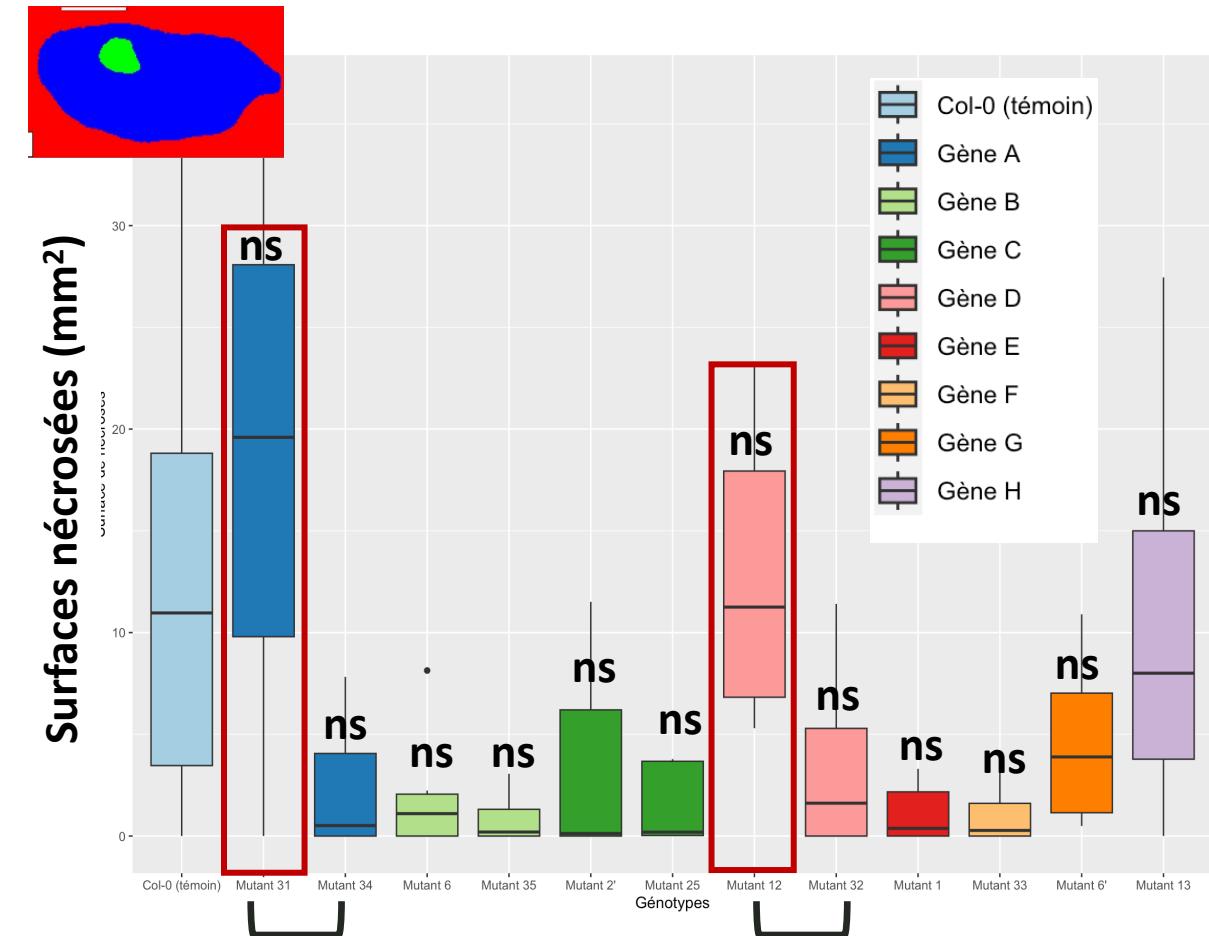


2°) Stade rosette :

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, surexpresseur ??)
- ⇒ 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.

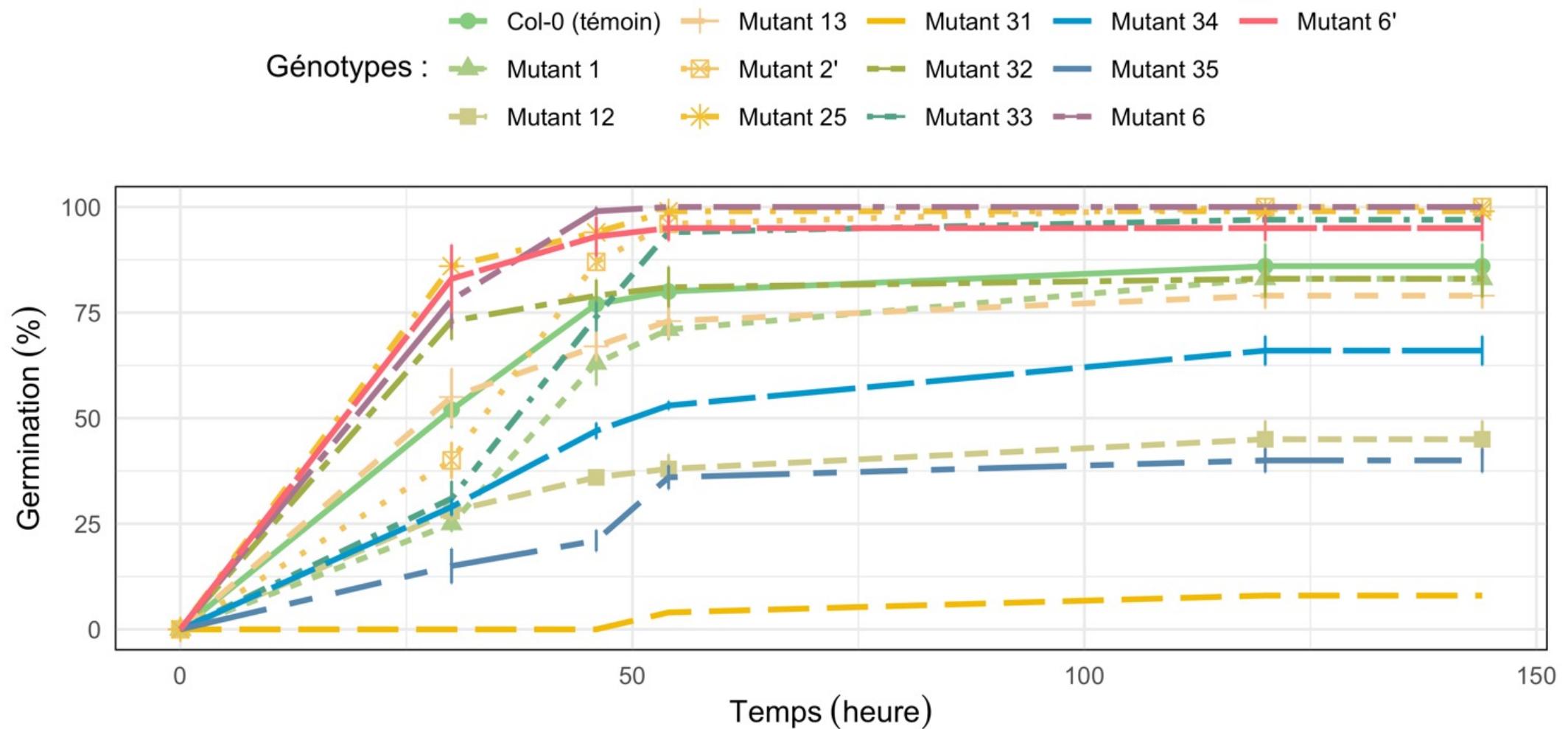
Goyal RK, Mattoo AK. 2014. Multitasking antimicrobial peptides in plant development and host defense against biotic/abiotic stress. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology* **228**, 135–149.

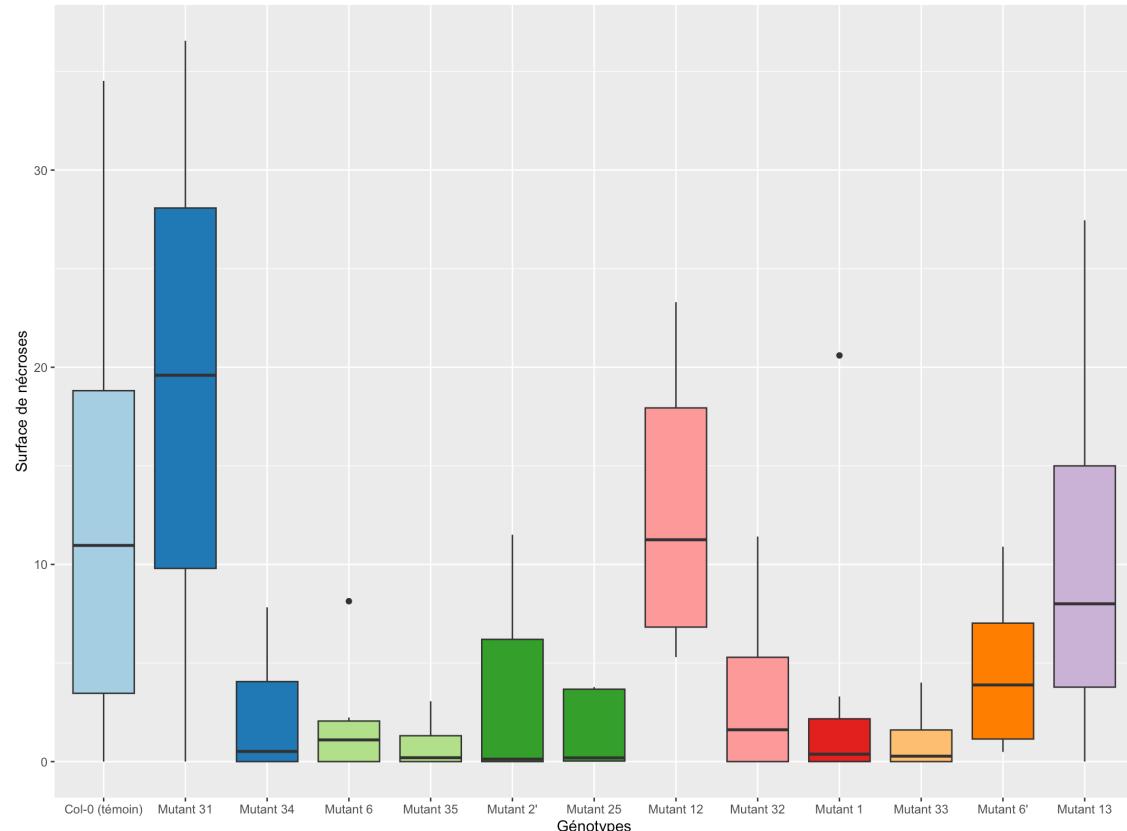
Guillou M-C. 2022. Caractérisation fonctionnelle de peptides sécrétés SCOOP impliqués dans le contrôle des voies de défense et du développement chez *Arabidopsis*.

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

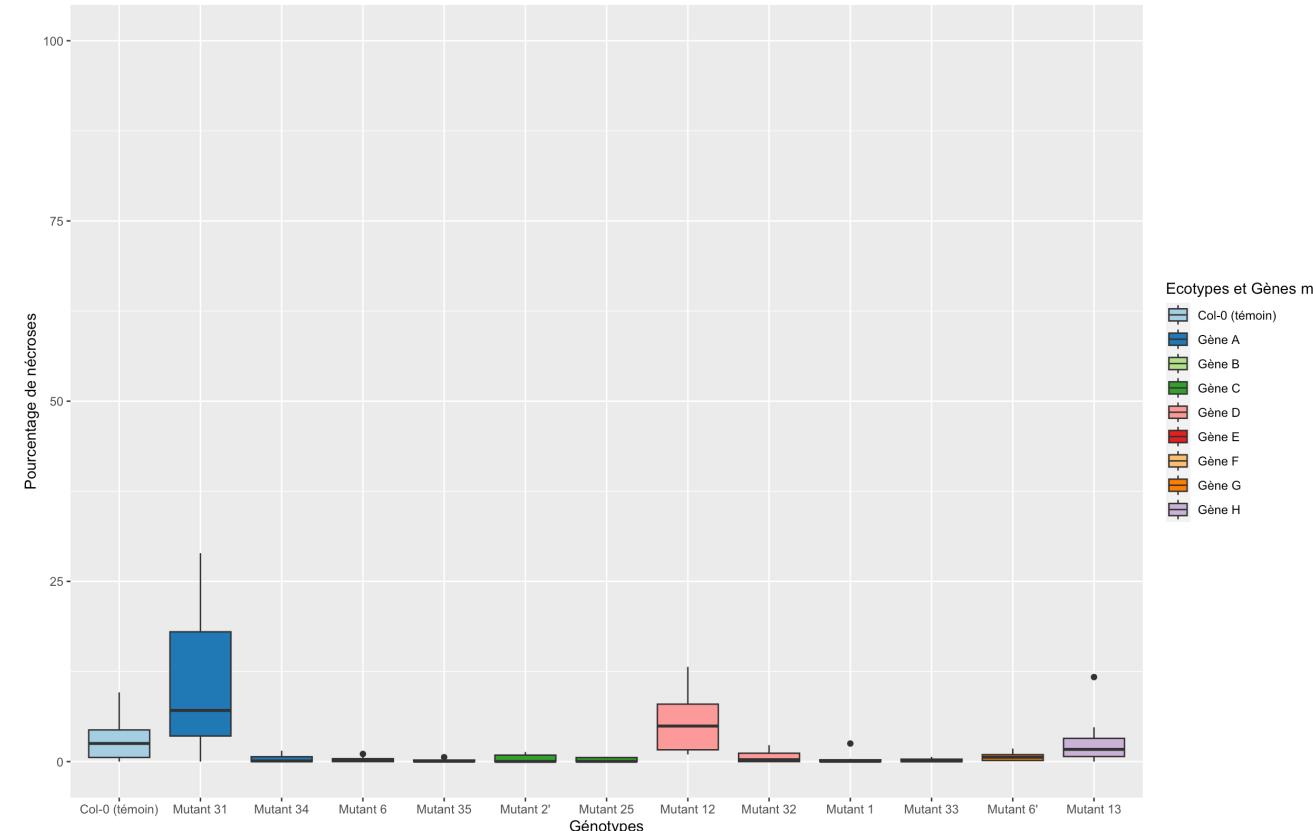
Ortega-Cuadros M, De Souza TL, Berruyer R, et al. 2022. Seed Transmission of Pathogens: Non-Canonical Immune Response in *Arabidopsis* Germinating Seeds Compared to Early Seedlings against the Necrotrophic Fungus *Alternaria brassicicola*. *Plants* **11**, 1708.

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.





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



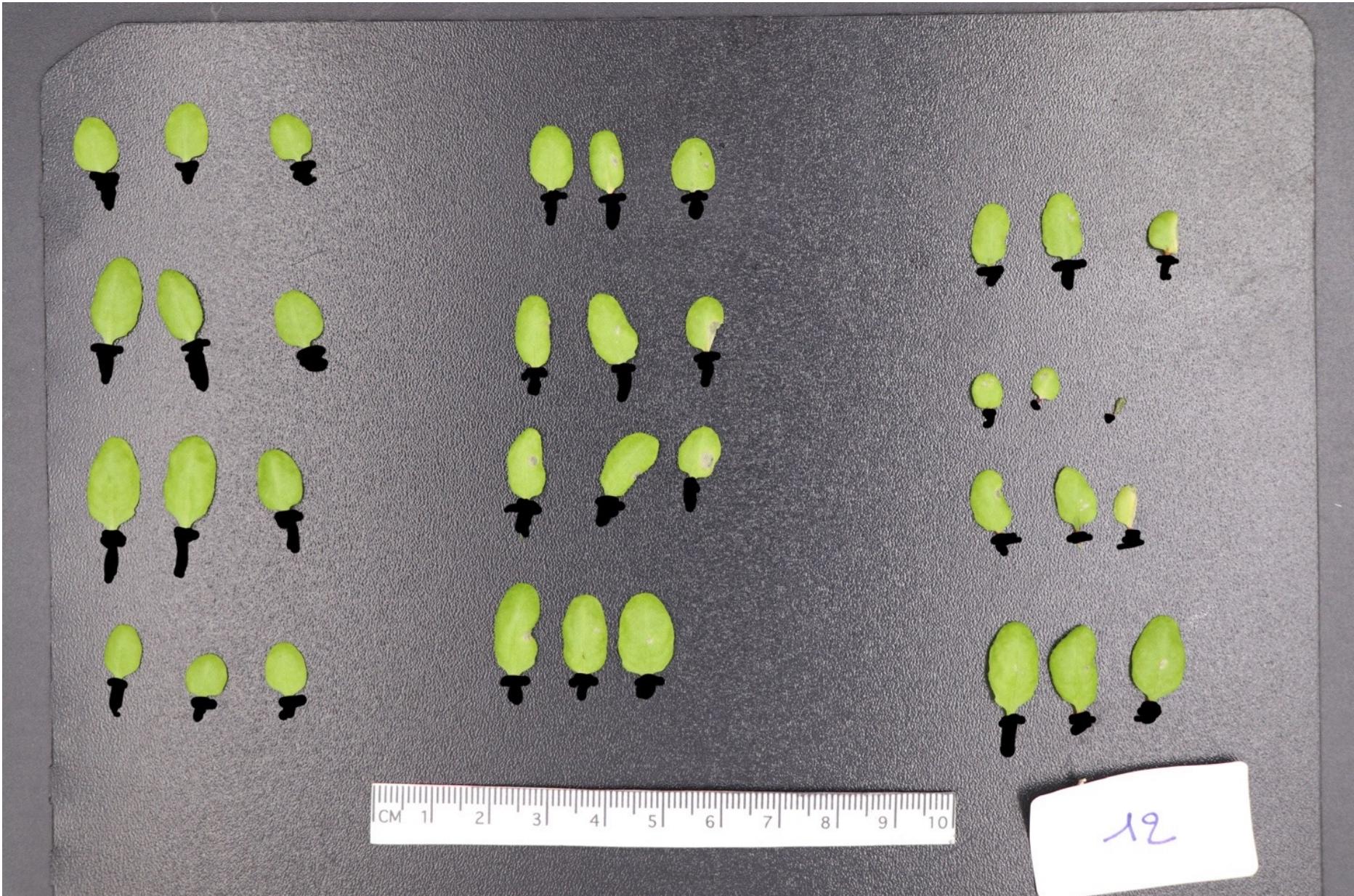
Pourcentage de surfaces foliaires nécrosés chez les feuilles inoculées avec *A. brassicicola*







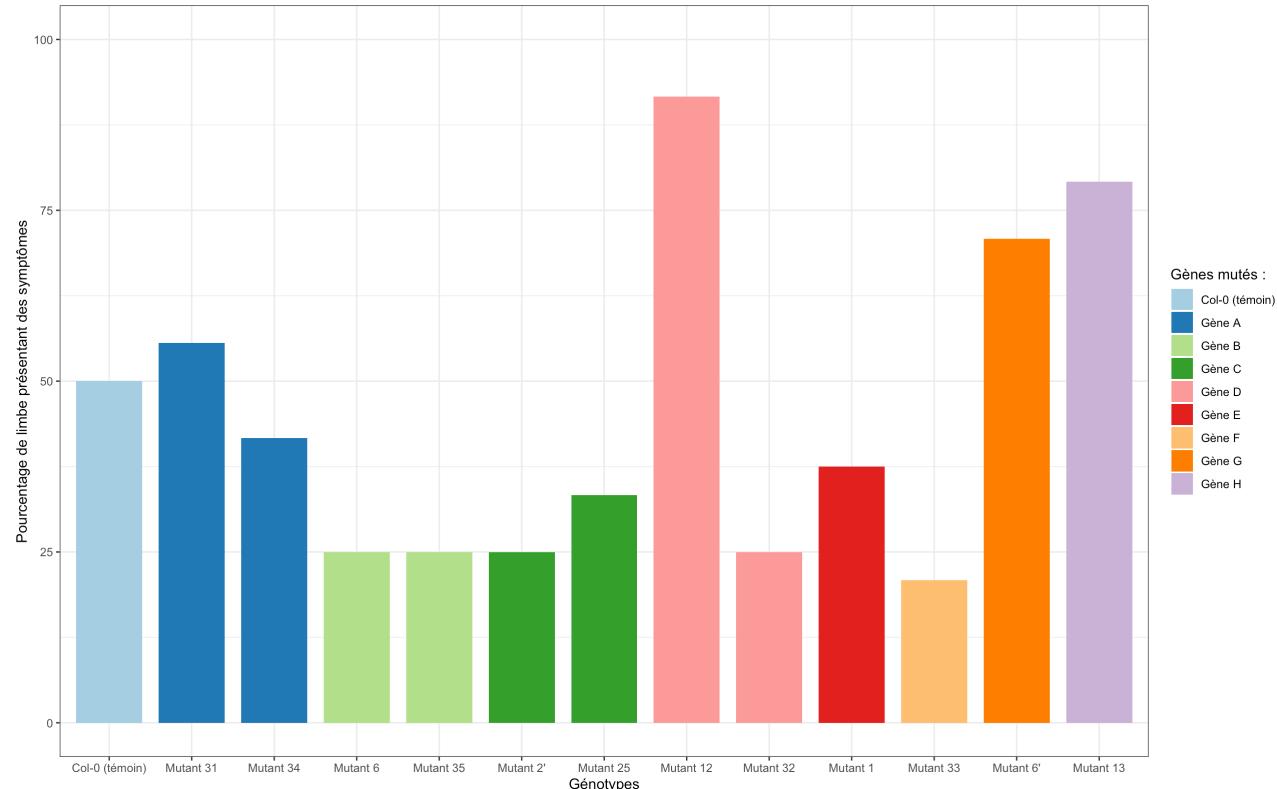








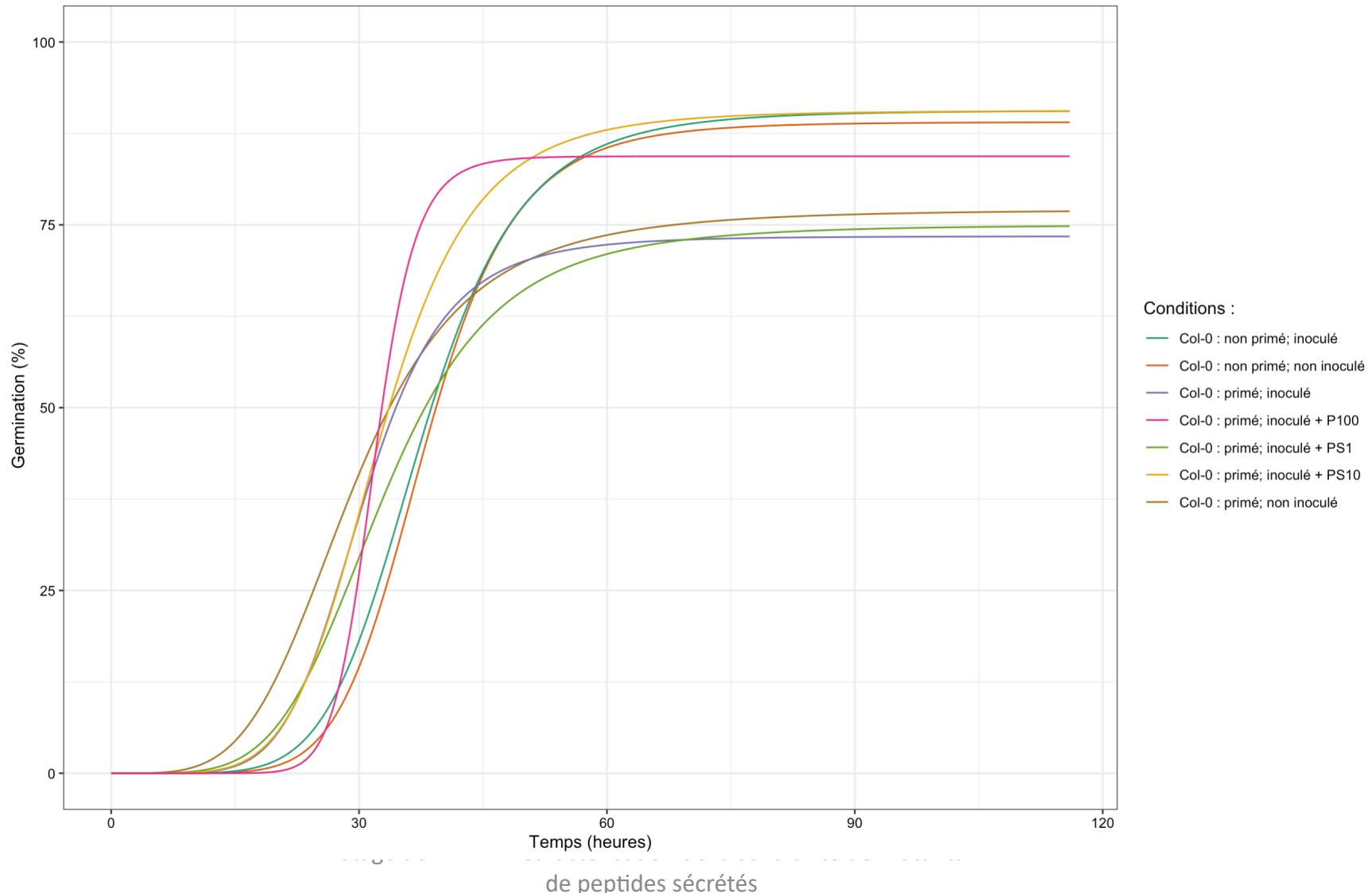


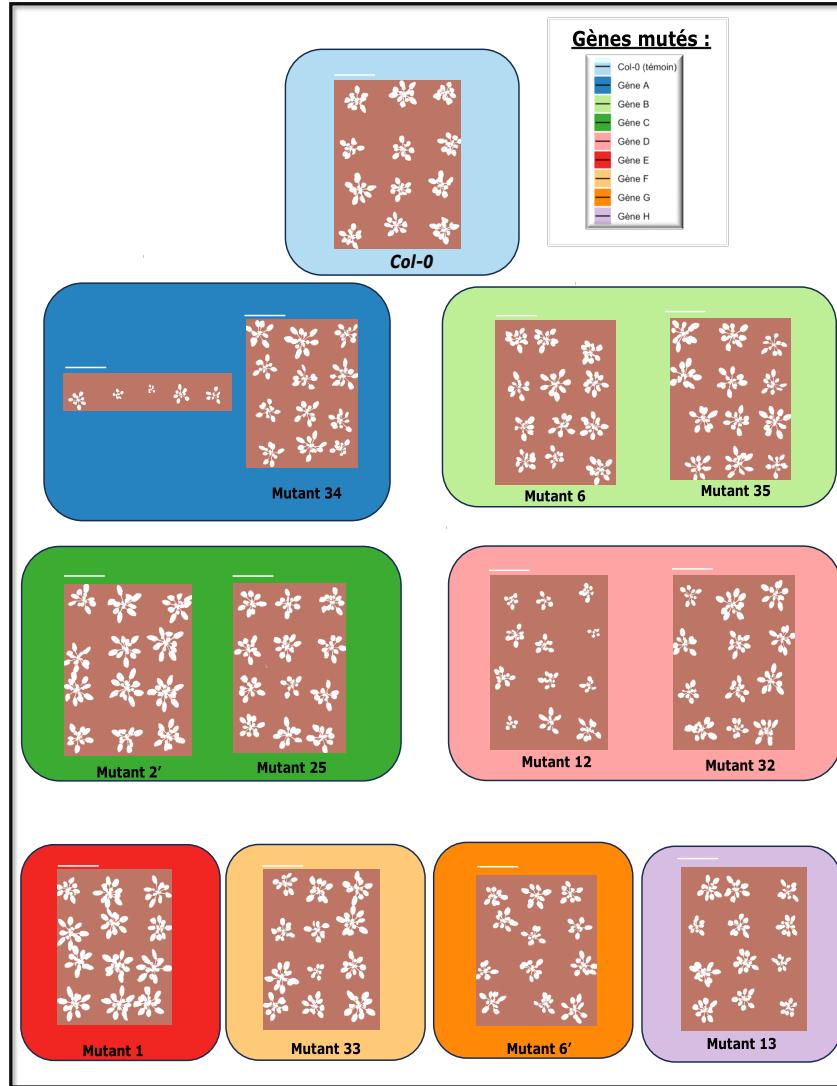


Pourcentage de feuilles inoculées avec Abra 43 présentant des nécroses

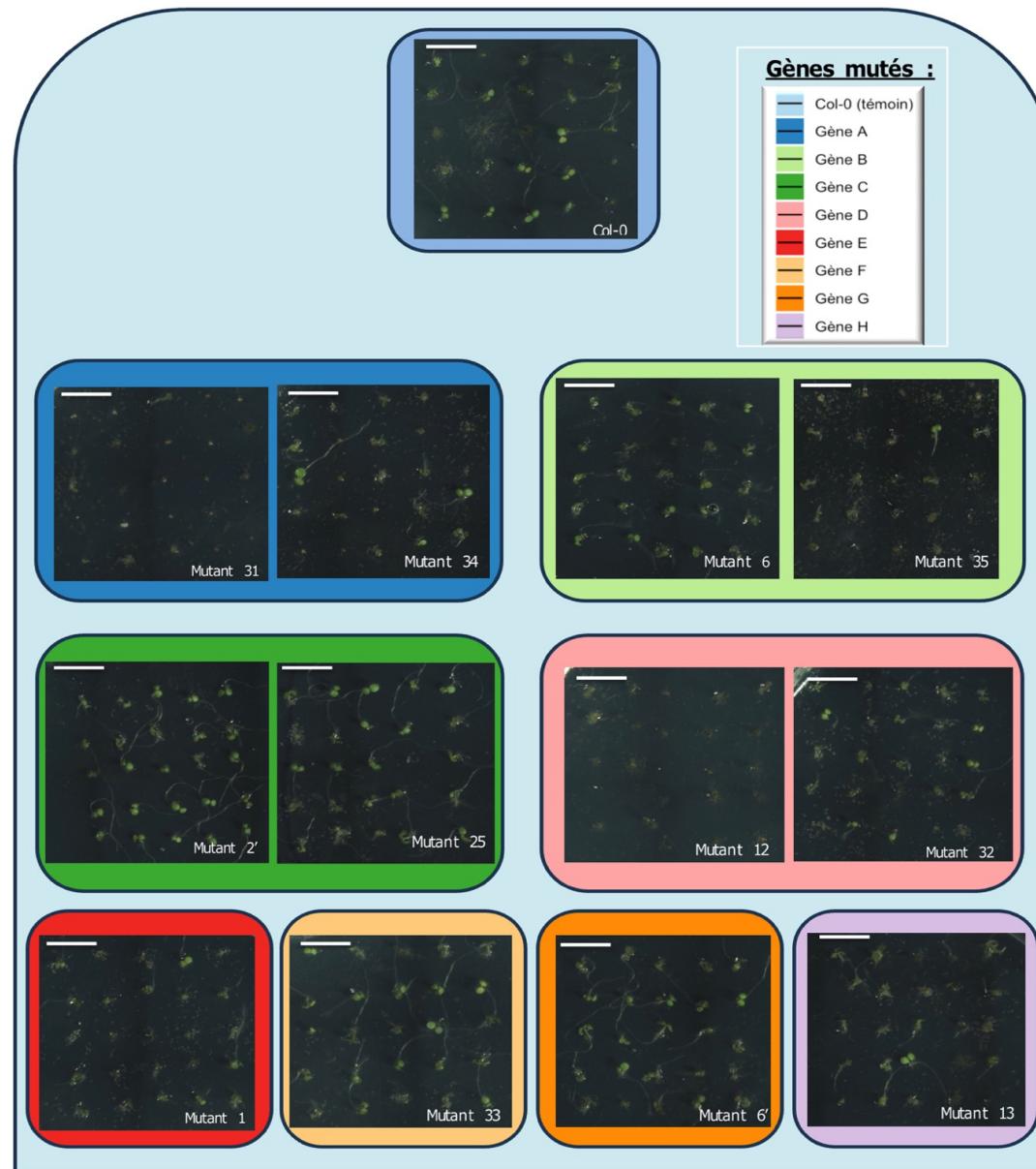
Stage de M1 BV : Caractérisation de la sensibilité de mutants
de peptides sécrétés

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 phytocytokines 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