

Année de l'AAP : 2008

Projet N° 0802-023 Achevé

Titre : Développement d'un système à haut débit pour l'analyse fonctionnelle de protéines effectrices de virulence de <i>Magnaporthe grisea</i>
--

Unité responsable du projet : BGPI (Biologie and Génétique des Interactions Plantes/Pathogènes) (CIRAD, INRA, Montpellier SupAgro)

Porteur de projet : Thomas Kroj (kroj(a)supagro.inra.fr)

Pays associé au projet : Chine

Unités de recherche du réseau scientifique d'Agropolis Fondation associés : LGDP

Sous-axes thématiques : BIP-2: Maladies et ravageurs des plantes, protection intégrée des cultures, écologie des populations, DSTI-1: Innovations agro-environnementales, agro-écosystèmes, gestion des ressources

Objectifs :

Le but de ce projet est de comprendre les bases moléculaires de la virulence des champignons phytopathogènes. Les agents pathogènes des plantes comme les bactéries, les oomycètes et les champignons secrètent au cours de l'infection de nombreuses protéines qui leur servent à manipuler les défenses de leurs hôtes et à exploiter leurs ressources. Ces protéines dites effectrices sont ainsi des éléments centraux de la virulence microbienne. Chez les bactéries, un certain type d'effecteurs (type III) est injecté directement dans les cellules hôtes. Chez les champignons, ce système n'existe pas. Cependant, certaines protéines secrétées semblent s'accumuler et agir à l'intérieur des cellules hôtes. Afin de comprendre dans quelle mesure et par quels mécanismes elles agissent comme effecteurs de virulence et contribuent à la pathogénie des champignons, le projet analysera les protéines que le champignon pathogène du riz *Magnaporthe grisea* secrète dans le tissu de la plante au cours de l'infection.

L'analyse fonctionnelle des protéines effectrices des champignons est fortement entravée par leur nombre considérable et par leur apparente redondance fonctionnelle. Les souches fongiques mutées pour les effecteurs individuels ne voient généralement pas leur virulence modifiée et il est nécessaire de développer des systèmes d'analyse fonctionnelle pour élucider leur rôle dans la virulence fongique et pour décrypter leur mode d'action.

Dans ce projet sera développé un système à haut débit pour l'analyse fonctionnelle des effecteurs fongiques candidats à partir des pathogènes du riz *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) et *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*). Cela permettra d'identifier les protéines effectrices de *Magnaporthe* ayant une forte incidence sur la virulence ou agissant comme des protéines d'virulence.

De multiples indications suggèrent que les effecteurs de virulence d'un organisme peuvent fonctionner chez d'autres espèces même sans parenté phylogénétique. Les effecteurs fongiques candidats seront ainsi analysés pour leur rôle dans la virulence en les exprimant sous la forme d'une fusion avec un signal de sécrétion de type III chez les bactéries *Xoo* et *Xoc*. Les effecteurs candidats de *Magnaporthe* seront ensuite ajoutés à l'arsenal des facteurs de virulence de *Xanthomonas*. Grâce aux essais de pathogénie, il sera possible d'étudier si cela se répercute (positivement ou négativement) sur la capacité de *Xanthomonas* à coloniser le tissu hôte et à provoquer des symptômes pathologiques.

Les protéines effectrices fongiques présentant des phénotypes intéressants lors de ces essais fonctionnels seront étudiées plus en détail, par exemple en les localisant au cours de l'infection, en mesurant leur contribution à la virulence fongique par génétique inverse, ou encore en identifiant

les processus végétaux qu'elles ciblent et les molécules végétales cibles avec lesquelles elles interagissent.

Actions menées et résultats obtenus

L'objectif du projet était le développement d'un système hétérologue d'analyse fonctionnelle de protéines effectrices fongiques candidates. Le projet initial consistait au développement d'un système basé sur l'utilisation de deux bactéries pathogènes du riz, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) et *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Xoc) pour l'identification des effecteurs de *Magnaporthe oryzae* jouant un rôle de virulence majeur ou agissant en tant que protéines d'avirulence (Avr).

Pour la mise au point du système, des fusions traductionnelles entre les parties N-terminales des protéines AvrBs2 ou AvrXa10 de *Xanthomonas* comprenant des signaux de sécrétion via le système de sécrétion de type III bactérien (T3SS), et des protéines Avr intracellulaire de *M. oryzae*, Avr-Pita, Avr-Pia, Avr-Pii, Avr-Pik, Avr-Pizt et AvrCO39 ont été exprimées dans Xoo et Xoc. Il était attendu que ces souches deviennent avirulentes une fois inoculées sur des variétés de riz porteuses des gènes de résistance correspondants, en raison de la reconnaissance spécifique et intracellulaire des protéines Avr fongiques injectées par Xoo ou Xoc. Cependant, bien que les protéines de fusion soient exprimées correctement dans Xoo, tel que nous l'avons démontré par des expériences de western blot, elles ne confèrent pas l'avirulence indiquant que les fusions ne sont pas fonctionnelles. Ceci pourrait être dû à des effecteurs endogènes de Xoo et de Xoc agissant comme des suppresseurs puissants de la défense de riz et supprimant la résistance induite par les protéines Avr de *M. oryzae*. En raison de ces résultats négatifs, le développement du système hétérologue basé sur l'utilisation de Xoo et Xoc n'a pas été poursuivi.

Un système in vitro permettant de déterminer la capacité d'effecteurs de pathogènes de traverser la membrane plasmique des plantes a été développé par le groupe du Prof Tyler. Des protéines de fusion recombinantes entre effecteurs soupçonnés être transférés dans les cellules hôtes et la GFP sont produites dans *E. coli* et ajoutées aux racines de plantes cultivées in vitro. Des effecteurs transloqués s'accumulent à l'intérieur des cellules de racines conduisant à une coloration du cytoplasme par fluorescence. Une collaboration avec le groupe du Prof Tyler a été établie afin d'identifier des effecteurs transloqués de *M. oryzae*. Trois de six effecteurs de *M. oryzae* testés ont montré une accumulation à l'intérieur des cellules des racines, ce qui suggère leur translocation dans les cellules hôtes lors d'une infection du riz. La translocation d'un de ces effecteurs nommé PWL2, dans des cellules hôtes a été récemment démontrée par imagerie cellulaire, confirmant ainsi les résultats du test in vitro.

Perspectives

A l'heure actuelle, d'autres effecteurs de *M. oryzae* sont testés pour la translocation dans le système in vitro et les motifs nécessaires et suffisants pour la translocation des effecteurs fongiques sont recherchés. En outre, des expériences complémentaires visant à confirmer la translocation des effecteurs par des approches indépendantes, en particulier par imagerie cellulaire, sont en cours.

Financement total par Agropolis Fondation : 36 452 € (équipement, frais de déplacement, support financier pour deux étudiants de master)

Catégorie(s) de soutien : soutiens divers (soutiens à des projets exploratoires, risqués et innovants)

Durée du projet : 15 octobre 2008 – 31 décembre 2010

Mots clés : riz – champignon – virulence – sécrétion – *Xanthomonas* – effecteur