



HAL
open science

Activité de virulence de l'effecteur AVR-Pita au cours de l'interaction entre le riz et *Magnaporthe oryzae*

Emma-Louise Jaffré

► **To cite this version:**

Emma-Louise Jaffré. Activité de virulence de l'effecteur AVR-Pita au cours de l'interaction entre le riz et *Magnaporthe oryzae*. *Phytopathologie et phytopharmacie*. 2021. hal-03951486

HAL Id: hal-03951486

<https://hal.inrae.fr/hal-03951486>

Submitted on 23 Jan 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial 4.0 International License



Université de Montpellier
Faculté des sciences
Master Biologie-Agrosciences



Parcours : Biologie des plantes
Année universitaire 2020-2021

Mémoire de stage M1 :

Activité de virulence de l'effecteur AVR-Pita au cours de l'interaction entre le riz et *Magnaporthe oryzae*

Emma-Louise JAFFRE

UMR Plant Health Institute Montpellier

Pôle ITEM – Equipe CIME

Thomas KROJ et Maël BAUDIN



**Plant Health
Institute
Montpellier**

Résumé :

Analyse fonctionnelle de l'AVR-Pita de *Magnaporthe oryzae*.

La pyriculariose du riz est une maladie fongique causée par *Magnaporthe oryzae* et provoquant d'importantes pertes de rendement chaque année. Au cours de l'infection, des effecteurs dont la métalloprotéase AVR-Pita sont sécrétés pour promouvoir la maladie. Contrairement à la plupart des effecteurs fongiques, AVR-Pita semble posséder une activité enzymatique et possède des similitudes avec les métalloprotéases M35. Il est peu caractérisé et semble être un contributeur de la virulence de *M. oryzae*. Cette étude vise à déterminer la localisation et la contribution de cet effecteur à la virulence du pathogène. Des études ont montré qu'il était accumulé dans une structure fongique associée (BIC) à la sécrétion de protéines pendant les stades précoces de l'infection. L'observation des cellules de la gaine de riz inoculée par *M. oryzae* exprimant SP_AVR1-CO39:eGFP et AVR-Pita::mCherry a pu confirmer son accumulation au niveau du BIC mais n'a pas permis de détecter de signal fluorescent lié à AVR-Pita dans la cellule végétale ce qui ne permet pas de conclure sur la possible translocation d'AVR-Pita vers la cellule hôte. L'agroinfiltration des construits AVR-Pita::mNeonGreen dans *N. benthamiana* n'a pas pu non plus démontrer la localisation subcellulaire d'AVR-Pita car aucun signal fluorescent n'a pu être décelé. Il semble que la protéine AVR-Pita soit très instable dans des cellules végétales. En ce qui concerne l'analyse phénotypique de mutants *avr-pita* chez *M. oryzae*, une trop forte variabilité dans les données n'a pas permis l'obtention d'un résultat clair pour conclure sur la contribution d'AVR-Pita à la virulence de *M. oryzae*. Nous hypothésons qu'AVR-Pita a une fonction redondante avec d'autres effecteurs, empêchant une visualisation simple de sa contribution. Cette étude a tout de même permis de calibrer le design expérimental et de générer de nombreux outils en vue d'une nouvelle analyse fonctionnelle de cet effecteur.

Mots clés : effecteur ; AVR-Pita ; virulence ; localisation ; microscopie confocale

Remerciements :

Je remercie Thomas KROJ pour m'avoir offert cette belle opportunité de formation et de découverte du monde des interactions plantes pathogènes. Je le remercie aussi pour avoir fait en sorte que mon accueil soit des plus agréables possibles et pour avoir toujours pris le temps pour m'expliquer les protocoles et des résultats obtenus.

Je remercie tout particulièrement Mael BAUDIN, pour son aide précieuse, sa patience et sa pédagogie qui m'ont permis d'acquérir des savoir-faire et de mener à bien mon sujet. Je le remercie également pour tout le temps qu'il m'accorde.

Je remercie également l'ensemble de l'équipe CIME pour m'avoir accueilli dans une bonne ambiance remplie de bienveillance et d'entraide.

Je remercie Véronique CHALVON et Isabelle MEUSNIER pour leur aide et leurs conseils avisés tout particulièrement pour la transformation de *M. oryzae*.

Je remercie Céline pour ses enzymes de restrictions et sa bonne humeur communicative.

Je remercie profondément tous les stagiaires du bureau 117, Anjara, Charris, Sarah, Bérénice, Lila et Romaric pour ces moments de détente et ces poses café bien mérités. De plus je remercie Lila pour son plasmide LO mNeonGreen et son aide lors des clonages Golden Gate Cloning.

Sommaire :

Introduction :	1
Pyriculariose du riz une maladie importante dans la culture céréalière.....	1
Interactions entre les plantes et leurs pathogènes	2
AVR-Pita un effecteur spécial	3
Problématique.....	4
Matériel et Méthode :	5
Matériel végétal, souche de <i>M. oryzae</i> et conditions de culture	5
Co-transformation des protoplastes de GUY11 :	5
Constructions plasmidiques	6
Localisation subcellulaire en système hétérologue dans <i>N. benthamiana</i> :	6
Inoculation de la gaine foliaire de riz :	6
Microscopie confocale :	7
Tests de phénotypage :	7
Résultats :	7
La translocation d'AVR-Pita::mCherry	7
La localisation subcellulaire d'AVR-Pita	9
Le phénotypage des mutants CRISPR AVR-Pita	10
Discussion :	11

Introduction :

Pyriculariose du riz une maladie importante dans la culture céréalière

Impact économique

Le riz est l'aliment de base dans plus de 39 pays (FAO, 1984), il y est utilisé comme apport calorique primaire par la moitié de la population mondiale. Entre les années 1966 et 2000 la production de riz a augmenté de 130 % grâce à l'utilisation des technologies de la révolution verte, avec l'utilisation de variétés à haut rendement et résistantes aux ravageurs et pathogènes. Cependant la monoculture intensive de variétés à haut rendement augmente le risque de pression de sélection des pathogènes résistants qui évoluent pour contourner les défenses mises en place par la plante. De plus, le changement climatique rend incertain les prévisions pour la culture du riz dû à la variabilité dans les précipitations (IPCC, 2014) mais aussi pour l'augmentation des maladies fongiques. En parallèle la population mondiale ne cesse pas d'augmenter avec un taux d'accroissement de 1.10 % par an, les prévisions indiquent que la population mondiale sera de 9.8 milliards en 2050 (Pelletier et al., 2017). Pour subvenir à la demande alimentaire, il est estimé qu'il faudrait augmenter les productions de 40 % d'ici 2030 (Khush, 2005). La pyriculariose du riz est à ce jour la maladie fongique des parties aériennes du riz qui pose le plus de problèmes dans l'agriculture céréalière (Dean et al., 2012). La pyriculariose est causée par un champignon filamenteux ascomycète caractérisé par un mode de vie hémibiotrophe, appelé *Magnaporthe oryzae*. Ce phytopathogène entraîne des dégâts sur le riz lorsqu'il est dans sa phase de reproduction asexuée. En outre, il a été observé que *M. oryzae* peut se développer sur d'autres céréales comme le blé, le millet ou encore l'orge et induire la pyriculariose. Cette maladie fongique induit des pertes de rendements conséquentes allant de 10 à 30 % (Dean et al., 2012) lorsque le collet ou la tige est attaquée, mais elle peut aller jusqu'à induire une perte totale de la culture si la panicule est touchée. La pyriculariose génère des pertes considérables se chiffrant en milliards de dollars pour l'agriculture mondiale. Il existe une très forte corrélation entre l'impact des phytopathogènes sur les cultures et les prix des céréales sur le marché mondial, notamment dans les zones de production intensive entre l'Afrique de l'Est et le Moyen-Orient où de nouvelles souches de pathogènes virulents se développent (Dodds and Rathjen, 2010). Cela fait que la pyriculariose du riz est un obstacle important dans la résolution du problème pour la sécurité alimentaire mondiale actuelle et futur, elle induit des pertes de denrées alimentaires qui pourraient nourrir 60 millions de personnes chaque année (Fernandez and Orth, 2018).

Cycle biologique du champignon

L'infection a une durée de 7 à 10 jours et début par la fixation puis la germination d'une spore asexuée à 3 cellules appelée conidie, sur une feuille de riz. Il en résulte la formation d'un tube germinatif polarisé dont l'extrémité s'enrichit en mélanine au niveau de la paroi : l'appressorium (Dean et al., 2012; Fernandez and Orth, 2018). L'appressorium possède une importante rigidité et imperméabilité ce qui permet d'appliquer une forte pression de turgescence (8 MPa) via l'hyphe de pénétration (peg) sur la paroi cellulaire afin de perforer celle-ci et pénétrer dans la cellule sans rentrer dans le cytoplasme. Cet hyphe de pénétration va se différencier en hyphe d'invasion (IH) primaire qui est entouré par la membrane extra-hyphe d'invasion (EIHM), qui correspond à la membrane plasmique de la cellule hôte (Fig. 1). Entre la EIHM et IH se trouve une matrice apoplasmique. L'IH primaire va se multiplier et se ramifier en plusieurs IH qui vont coloniser les cellules adjacentes puis l'ensemble du

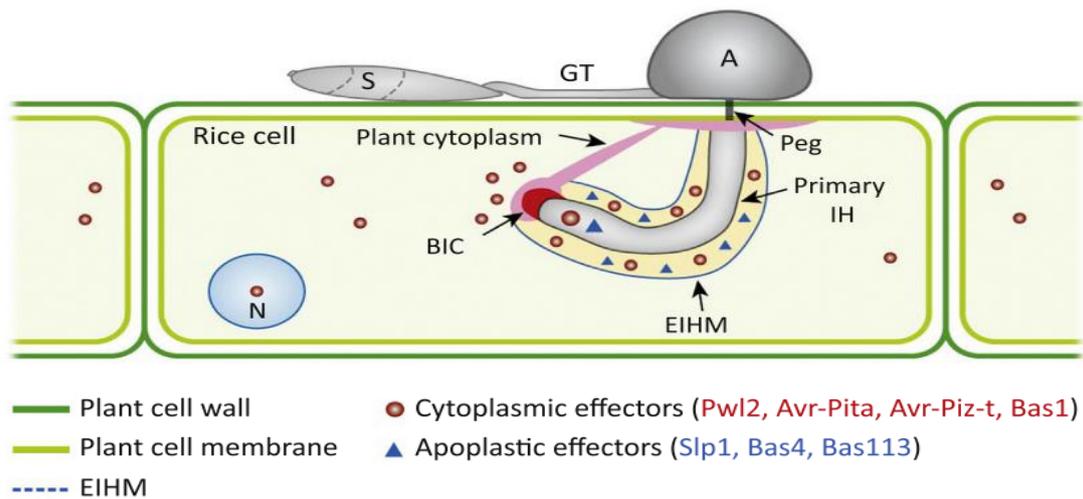


Figure 1 : Développement d'une conidiospore et sécrétion des effecteurs durant la phase de colonisation. Cette figure schématise les premières étapes de l'infection de la cellule hôte correspondant à la croissance biotrophique du champignon. S : spore ; A : appressorium ; Primary IH : Hyphe d'invasion primaire ; EIHM : membrane entourant l'hyphe d'invasion ; N : noyau. (Fernandez and Orth, 2018)

tissu, cellule à cellule, via les plasmodesmes de l'hôte (Fernandez and Orth, 2018). Cette phase de croissance intracellulaire dure 4 jours. Le champignon se développe de manière biotrophe et maintient les cellules de la plante en vie sans déclencher de symptômes apparents. Par la suite, il change de stratégie d'infection et commence à tuer activement les cellules végétales par la sécrétion de toxines et se développe sur du tissu morte. Cette phase d'infection dite nécrotrophe est suivie d'une phase de reproduction clonale caractérisée par la production de conidiospores qui émergent de lésions foliaires et permettent le développement de l'épidémie.

Interactions entre les plantes et leurs pathogènes

L'immunité innée végétale

Les plantes sont en interactions constantes avec leur environnement et notamment avec les microorganismes pathogènes qui les entourent, elles ont développé une immunité innée au cours de l'évolution. Cette immunité passe par la mise en place de mécanismes permettant de percevoir et de parer les attaques de leurs agresseurs. La capacité des plantes à reconnaître les phytopathogènes repose sur deux stratégies. La première stratégie est basée sur des récepteurs transmembranaires appelés PRRs (Pattern recognition receptors) capables de détecter des éliciteurs microbiens dans l'apoplasme (Fig. 2). Ces éliciteurs appelés PAMPs (Pathogen associated molecular patterns) peuvent être de nature très diverse tel que des protéines (flagelline) (Hayashi et al., 2001), des lipides, des composés glucidiques (chitine) (Wan et al., 2008) et des molécules de petites tailles (ATP). La reconnaissance des PAMPs induit le déclenchement de la réponse immunitaire non spécifique médiée par les PRRs aussi, connue sous le nom de PTI (PAMPs Triggered Immunity). La seconde stratégie développée par les plantes repose sur la détection cytoplasmique de protéines sécrétées par les pathogènes appelés effecteurs. Les récepteurs cytoplasmiques impliqués dans la reconnaissance des effecteurs sont pour la majorité du type NB-LRR (Nucleotide Binding Leucine-Rich Repeat). La reconnaissance des effecteurs par les protéines NB-LRR confère une résistance spécifique à des certains pathogènes et induit le déclenchement de la réponse immunitaire médiée par les effecteurs, aussi connue sous le nom de ETI (Effector Triggered Immunity).

L'ETI et la PTI induisent généralement une réponse similaire qui se matérialise sous la forme de rapide influx de calcium, d'un pic de production des espèces réactives de l'oxygène (ROS), de l'activation des cascades de phosphorylation par les protéines kinases, des dépôts de callose, l'expression des gènes PR (pathogenesis-related) et la production des composés antimicrobiens. Cependant l'ETI est capable d'induire une réponse hypersensible (HR) qui se caractérise par une mort cellulaire rapide et localisée à la suite d'une forte accumulation de ROS dans les cellules ciblées. La HR arrête la colonisation des pathogènes à mode vie biotrophes (Dodds and Rathjen, 2010; Bigeard et al., 2015).

Les effecteurs

La colonisation de l'hôte est un processus actif qui repose sur des facteurs de virulence produits par les agents pathogènes pour favoriser l'infection. Les phytopathogènes sécrètent des protéines appelées effecteurs qui représentent une classe importante de facteurs de virulence, ayant pour but de détourner et de manipuler le métabolisme cellulaire hôte à leur profit (Białas et al., 2017). Ces protéines agissent souvent directement sur des voies cellulaires végétales pour par exemple contourner les nombreux systèmes de défenses ou pour induire la sécrétion de nutriments dans l'apoplasme (Rodriguez-Moreno et al., 2018). Dans le cas des agents pathogènes hémibiotrophes ou nécrotrophes, les effecteurs peuvent induire la mort cellulaire dans le but de faciliter la colonisation

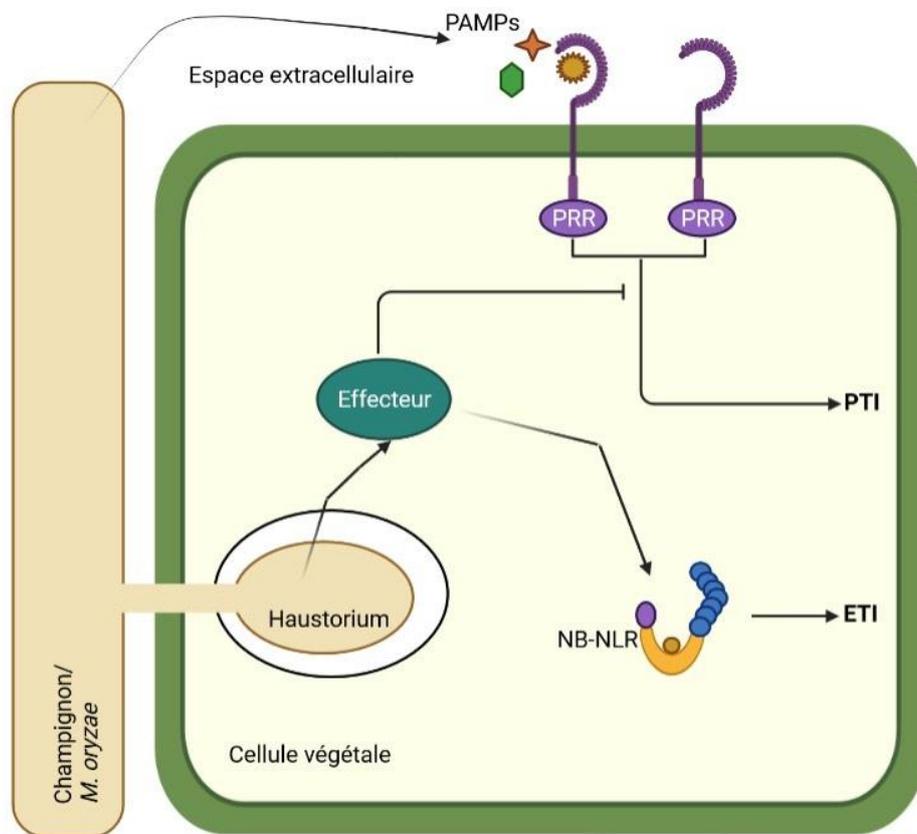


Figure 2 : Réponses immunitaires générales de la plante lors d’une interaction plante-champignon pathogène. Lors d’une interaction entre la plante et *M. oryzae*, la plante reconnaît par le biais de récepteurs transmembranaires des motifs moléculaires caractéristiques de champignons, ce qui induit une réponse immunitaire innée. Pour augmenter sa virulence le champignon sécrète des protéines, effecteurs, qui induisent une autre réponse immunitaire innée par le biais des récepteurs NB-LRR (Khang et al., 2010) ; figure reproduite sur Biorender.com)

lorsque ce dernier rentrera en phase nécrotrophe (Zhang et al., 2021). Les champignons pathogènes sécrètent une quantité pléthorique d'effecteurs qui sont pour la plupart des petites protéines riches en cystéine et sans homologues avec des protéines de fonctions connues. Peu d'effecteurs fongiques caractérisés possèdent des similitudes avec des enzymes et il n'a pas été démontré qu'une fonction enzymatique est nécessaire à leurs activités de virulence (Stergiopoulos and de Wit, 2009; Io Presti et al., 2015). Dans la plupart des cas, une redondance fonctionnelle entre les effecteurs ne permet pas d'apprécier la contribution d'un effecteur unique à la virulence d'un champignon pathogène. Ainsi, une analyse systématique de 78 effecteurs putatifs de *M. oryzae* a montré par mutagenèse de leur gène respectif qu'un seul d'entre eux avait une contribution à la virulence du champignon (Saitoh et al., 2012). Ainsi, on pense que beaucoup de voies cellulaires de l'hôte sont ciblées indépendamment et de manière redondante par plusieurs effecteurs fongiques. La perte d'un seul effecteur par mutation n'a donc seulement un faible effet qui n'est pas toujours mesurable.

Certains effecteurs fongiques, dit « apoplasmiques », agissent à l'extérieur des cellules végétales tandis que d'autres, dit « cytoplasmiques » sont transloqués et agissent à l'intérieur des cellules hôtes, dans le cytoplasme ou dans d'autres compartiments ciblant directement des voies cellulaires (Khang et al., 2010). Une analyse de microscopie à fluorescence d'effecteurs marqués a montré qu'il y avait bien deux classes d'effecteurs. Ces deux classes d'effecteurs sont sécrétées dans la matrice apoplasmique, il semblerait que les effecteurs cytoplasmiques sont accumulés dans au niveau du BIC (biotrophic interfacial complex) (Fernandez and Orth, 2018). Les mécanismes de translocation des effecteurs fongiques ne sont pas connus mais des travaux chez *M. oryzae* suggèrent que le BIC joue un rôle clé. Le BIC semble être l'interface entre la membrane extra hyphe d'invasion (EIHM), l'hyphe d'invasion (IH), la matrice apoplasmique et le cytoplasme végétal (Fernandez and Orth, 2018). Une étude a montré que les effecteurs intracellulaires possèderaient une séquence dans le promoteur et un peptide signal qui pourrait provoquer l'accumulation dans le BIC et la translocation (Khang et al., 2010; Io Presti and Kahmann, 2017). Une autre étude a montré qu'une délétion dans des gènes du complexe d'exocytose SEC5 et EXO70 et dans le gène du t-SNARE *Sso1* induit un défaut de développement du BIC et un défaut de pathogénicité (Fernandez and Orth, 2018).

Comme nous l'avons décrit dans la partie précédente, l'activité des effecteurs peut être détectée par le système immunitaire végétal qui va induire une HR. Dans ces cas-là, l'effecteur est considéré comme un facteur d'avirulence d'après la théorie gène pour gène de Flor (1971), car il empêche la propagation du pathogène.

AVR-Pita un effecteur spécial

L'effecteur AVR-Pita a été identifié premièrement comme un facteur d'avirulence de *M. oryzae* induisant une résistance chez les cultivars de riz possédant les loci *Pi-ta* ou *Pi-ta*². Malgré la forte pression de sélection induite par l'utilisation des loci de résistance *Pi-ta* et *Pi-ta*² dans les nouveaux cultivars résistants, AVR-Pita est conservé dans la plupart des isolats de *M. oryzae*. La présence du gène AVR-Pita dans différentes régions du génome chez différents isolats de *M. oryzae* et son association avec des éléments transposables suggère que ce gène a subi plusieurs translocations liées à des événements de perte et récupération (Chuma et al., 2011). Cela pourrait être une stratégie évolutive pour échapper à la reconnaissance immunitaire tout en conservant cet effecteur.

Le gène *AVR-Pita* se situerait dans la région télomérique du chromosome 3, comme plusieurs autres effecteurs, il possède des duplications situées à d'autres loci sur d'autres chromosomes (Orbach et al., 2000; Białas et al., 2017). La séquence d'AVR-Pita contient 223 résidus où l'on peut distinguer trois



Figure 3 : Structure de l'effecteur AVR-Pita. La structure d'AVR-Pita possède des similarités avec les métalloprotéases M35 au niveau de la protéine mature et du peptide signal.

parties différentes (Fig. 3) un peptide signal en position N-terminal, un pré-propeptide et un domaine portant le site catalytique et présentant des homologies avec des métalloprotéases dépendantes du zinc de la famille MEROPS (M35) (Orbach et al., 2000). Des métalloprotéases appartenant à diverses familles ont été identifiées chez différents microorganismes pathogènes, avec des fonctions différentes dans la contribution à la virulence. Chez les pathogènes fongiques, il existe deux types majoritaires de métalloprotéases les M35 (deuterolysine), dont les cibles restent à ce jour inconnues, et les M36 (fungalysin) qui ciblent et clivent les chitinases végétales de classe IV. Ces deux types de métalloprotéases possèdent un motif caractéristique « HEXXH » au niveau de leur site catalytique (Fig. 3). Ce motif comprenant deux résidus d'histidines se liant au zinc et un résidu catalytique du glutamate, est très souvent retrouvé chez les champignons (Zhang et al., 2021).

L'activité protéasique d'AVR-Pita n'a pas été démontrée à ce jour, bien que des mutations au niveau du motif caractéristique HEXXH du site catalytique, plus précisément sur le résidu de l'acide glutamique, induisent une perte de fonction d'avirulence de cet effecteur et empêcher l'activité métalloprotéase putative (Orbach et al., 2000; Pan et al., 2020). L'ensemble de ces observations laisse supposer une activité de virulence d'AVR-Pita fortement bénéfique au fitness du champignon. Cependant les fonctions de virulence d'AVR-Pita et la contribution la pathogénicité de *M. oryzae*, sont à ce jour méconnues (Orbach et al., 2000; Białas et al., 2017).

La localisation d'AVR-Pita au cours de l'infection n'a pas encore été formellement démontré cependant les données bibliographiques suggèrent qu'AVR-Pita est un effecteur cytoplasmique qui serait accumulé dans le BIC puis transloqué dans la cellule végétale (Jia et al., 2000; Khang et al., 2010). Il semblerait qu'AVR-Pita pourrait interagir au niveau des mitochondries avec COX11, une protéine d'assemblage du cytochrome c oxydase dans la chaîne mitochondriale de transport des électrons. AVR-Pita serait un effecteur cytoplasmique et contribuerait alors à inhiber l'accumulation des ROS et à la suppression de l'immunité innée de la plante (Han et al., 2021).

Problématique

Les changements climatiques et l'intensification des cultures favorisent l'émergence de nouvelles maladies fongiques et leurs pérennisations dans les systèmes agricoles actuels. Notre objectif général est de contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes de virulence chez les champignons pathogènes pour permettre à des études futures d'optimiser l'immunité des plantes.

Nous avons choisi de baser notre recherche sur un effecteur particulier du champignon *M. oryzae*, l'effecteur AVR-Pita qui possède des similarités avec les métalloprotéases (Fig. 4). Bien que de nombreuses études sont consacrées à AVR-Pita et à sa reconnaissance par le système immunitaire du riz les fonctions de virulence de cet effecteur sont encore méconnues. Nous avons étudié AVR-Pita sous deux angles, premièrement AVR-Pita agit-il dans la matrice apoplasmique ou dans le cytoplasme du riz ? Si AVR-Pita s'avère être un effecteur cytoplasmique dans quel compartiment subcellulaire est-il localisé ? Et secondement, quelle est la contribution d'AVR-Pita à la virulence de *M. oryzae* ?

Cette analyse représente une première étape pour étudier par la suite la fonction de virulence d'AVR-Pita et sa potentielle activité de métalloprotéase.

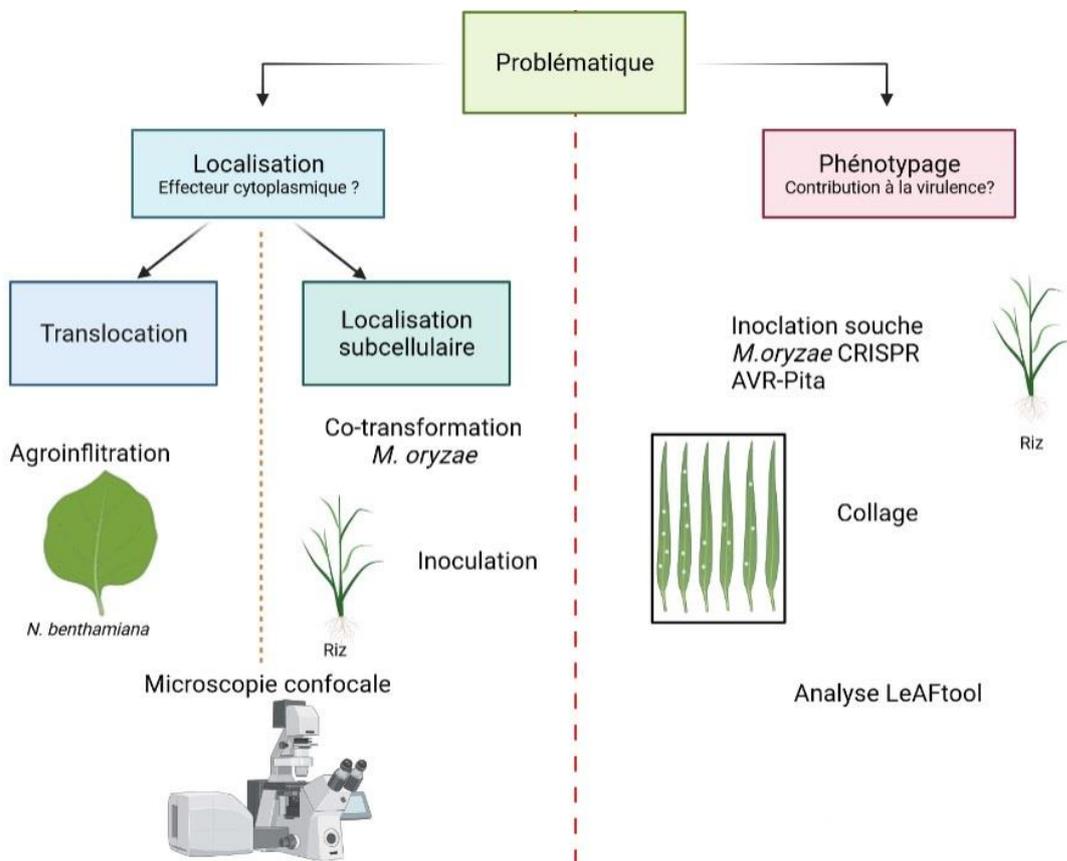


Figure 4 : Représentation schématique de la problématique expérimentale étudiée. La problématique est composée de deux parties distinctes. La première est focalisée sur la localisation d'AVR-Pita et sa résolution va produire d'observations cellulaires par microscopie confocale. La deuxième est focalisée sur le phénotypage des mutants *avr-pita* et sa résolution va induire l'utilisation d'une analyse LeAFtool.

Matériel et Méthode :

Matériel végétal, souche de *M. oryzae* et conditions de culture

Pour la localisation subcellulaire, des plantes *Nicotina benthamiana* âgés de 6 semaines ont été utilisés. Ils ont été cultivés sur terreux N2 UAB (HUNMINSTRAT NEUHAUS) avec solution nutritive (Ferty Equilibre 323 (15+10+15+2 et Ferveg 6)) en phytotron (22°C et cycle de 16h lumière / 8h obscurité).

Pour les tests de phénotypage, les graines de riz (*Oryza sativa*) ont été semées sur du terreau riz avec engrais retard puis ont été cultivées en serre (12h : lumière, 70% d'humidité et 27°C ; 12h : obscurité, 70% et 21°C) pendant 4 semaines avant inoculation. 12 variétés de riz ont été semées pour le phénotypage des souches AVR-Pita CRISPR, dont 11 sensibles à GUY11 avec un degrés sensibilité différent (Maratelli, CO39, Katy, Som Cau 70A, Chau, JC120, Kitaake, Nipponbare, Gotak Gatik, Reiho Kiyosawa, IR36) et 1 variété résistante possédant le locus de résistance Pita² capable de reconnaître l'allèle d'AVR-Pita porté par *M. oryzae* Guy11 (IRBL-ta2-Pi). 5 variétés de riz ont été semées pour le phénotypage des souches AVR-Pita::mCherry, dont 2 sensibles (CO39, LTH) et 3 résistantes pour AVR-Pita1 (K1, IRBLta-K1, IRBLta-CT2).

Pour l'observation de la translocation d'AVR-Pita, les graines de riz (*Oryza sativa*) de la variété Maratelli ont été semées sur du terreau riz avec engrais retard puis ont été cultivées sous serre (12h : lumière, 70% d'humidité et 27°C ; 12h : obscurité, 70% et 21°C) pendant 6 semaines avant inoculation.

Les souches de *M. oryzae* sont cultivées sur milieu riz avec un cycle jour/nuit de 12h à 25°C pour induire la production de conidiospores. Pour le phénotypage AVR-Pita CRISPR, 8 souches déjà générées ont été testées, dont 3 souches mutantes *avr-pita* knock-out CRISPR (CR1-11-1 ; CR1-5-6 ; CR1-8-5), 3 souches AVR-Pita CRISPR WT avec des insertions ectopiques (WT1-1-1 ; WT1-2-2 ; WT4-5-1) et 2 souches WT (GUY11 et T+2-1).

Co-transformation des protoplastes de GUY11 :

Pour exprimer en parallèle AVR-Pita (fusionné ou non à la mCherry) ou PWL2::mCherry et la eGFP une double transformation de protoplastes de *M. oryzae* a été réalisée. Les plasmides mCherry possèdent la sélection BASTA et le plasmide eGFP possède la sélection à l'hygromycine.

La co-transformation de *M. oryzae*, des protoplastes de Guy11 déjà généré au laboratoire ont été utilisés. Les plasmides portant les constructions mCherry (Fig. 5a) et eGFP ont été linéarisés puis ajoutés dans la suspension de protoplastes, avec du PEG400. Le milieu TB3 liquide a été ajouté à la solution de protoplastes et DNA linéarisé puis incubé une nuit à 26°C dans l'obscurité. Les protoplastes ont été ensuite centrifugés et incorporés dans du milieu Top Agar à 47°C pour réaliser la sélection BASTA. Puis le mélange a été coulé sur un milieu TNK1 contenant la sélection Hygromycine, et incubé dans une chambre de culture à l'obscurité et à 25°C pendant 7 jours. Les protoplastes régénérés et ayant produit du mycélium sont repiqués sur un deuxième milieu TNK2 (sélection hygro moins forte). Les champignons ont été par la suite repiqués sur un milieu riz pour induire la production spores. Un isolement monosporique a été réalisé, les spores ont d'abord germées sur un milieu agar 3% puis sous loupe binoculaire, une spore unique a été récupérée et transférée sur un milieu riz.

La vérification de la double transformation des souches GUY11 a été menée sur les deux construits. D'abord nous avons réalisé une observation des souches monospores transformées à la loupe binoculaire à fluorescence, et nous avons sélectionné celles ayant la plus forte intensité de fluorescence eGFP (Annexe 1). pRP27::SP_AVR1-CO39:eGFP est fortement exprimée dans le jeune

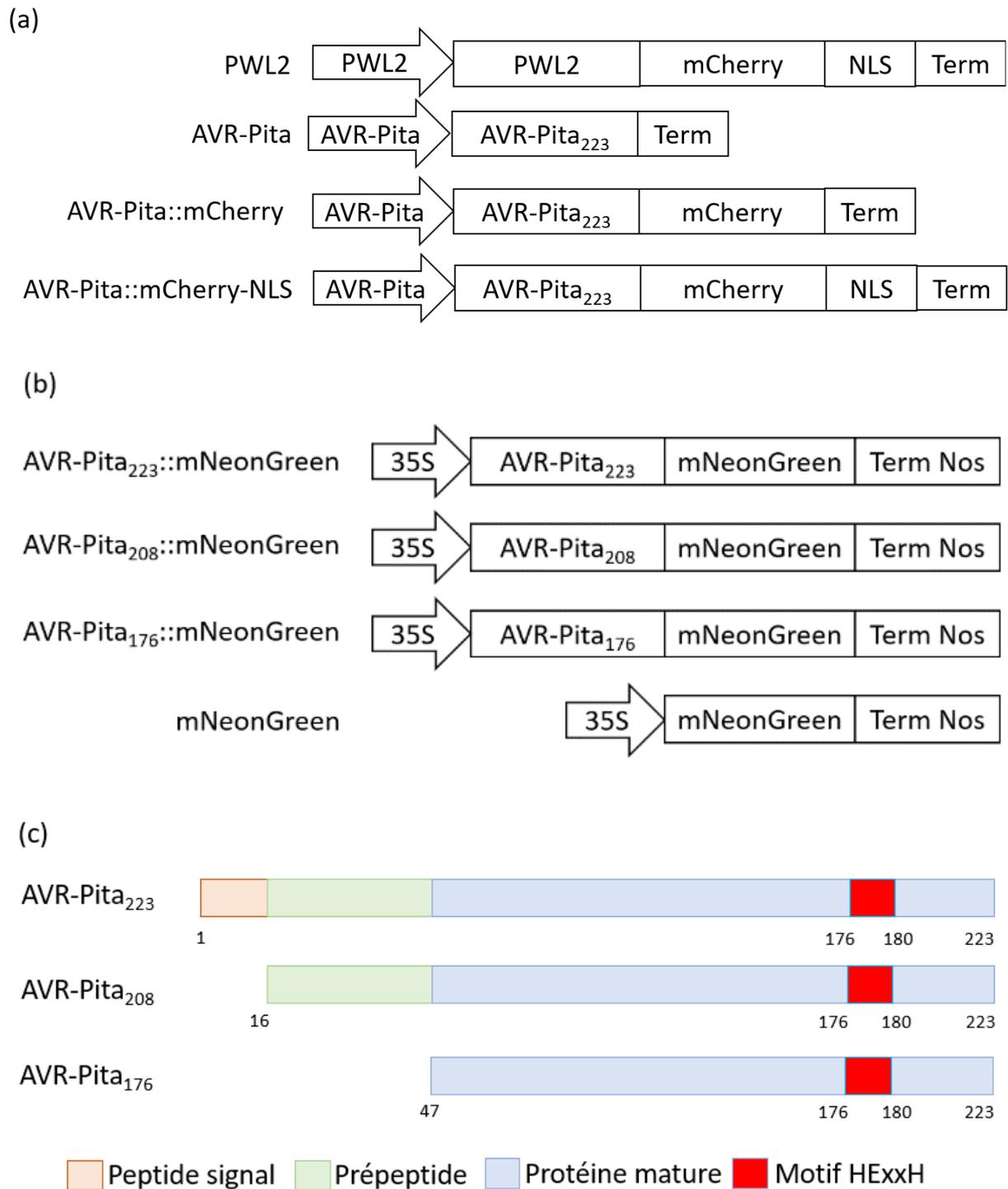


Figure 5 : Différents construits et formes d'AVR-Pita utilisés pour la translocation et la localisation subcellulaire d'AVR-Pita. (a) Construits utilisés pour la co-transformation des protoplastes de GUY11 pour observer la translocation d'AVR-Pita. (b) Construits exprimés transitoirement dans des feuilles de *N. benthamiana* pour l'observation de la localisation subcellulaire. (c) Différentes formes de la structure d'AVR-Pita utilisées dans la construction des plasmides AVR-Pita::mNeonGreen pour l'agroinfiltration de *N. benthamiana* par *Agrobacterium tumefaciens* transformantes.

mycélium grâce au promoteur constitutif de la protéine ribosomique 27 (RP27) alors que la fluorescence rouge des constructions mCherry n'est exprimé que lors de l'interaction avec le riz. Pour s'assurer de la présence des constructions avec PwL2 et AVR-Pita, nous avons réalisé un génotypage par PCR. Après extraction de l'ADN génomique de *M. oryzae*, nous avons réalisé des PCR avec des oligonucléotides sur la mCherry ou sur AVR-Pita (Annexe 2).

Constructions plasmidiques

L'ensemble des constructions générés sont basés sur la technologie GoldenGate (Engler et al., 2014); Fig. 5b).

Après amplification avec une DNA polymérase haute-fidélité (Invitrogen Platinum SuperFi II, ThermoFisher) et purification (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up) les fragments individuels du construit (promoteur, région codante, protéine fluorescente, terminateur) ont d'abord été clonés dans un plasmide pTwist LO universel via l'enzyme de restriction BbsI et l'enzyme de ligation T4 DNA ligase NEB. Par la suite des bactéries *E. coli* compétentes (One Shot TOP10) sont transformées par choc thermique avec les plasmides LO, permettant ainsi une multiplication de la quantité de plasmides LO. Les colonies blanches d'*E. coli* transformées sont sélectionnées ajout de X-gal et IPTG sur milieu LB agar, l'insertion du fragment dans le plasmide se fait au milieu du gène Lac Z. Les bactéries ne pouvant plus dégrader le X-gal resteront blanches. Les plasmides sont extraits et purifiés par mini préparation (Plasmid DNA Purification, NucleoSpin plasmid MACHEREY-NAGEL).

Les constructions finales ont ensuite été assemblé par combinaison des fragments LO dans un plasmide binaire L1 pICH47742 par réaction Golden Gate via l'enzyme BsaI et l'enzyme de ligation T4 DNA ligase NEB. Les plasmides L1 multipliés par transformation de *E. coli* compétentes puis extraits et purifiés (voir transformation *E. coli* TOP10 avec le plasmide LO ci-dessus).

Le clonage Golden Gate a préalablement été réalisé *in silico* avec le logiciel Geneious, puis l'intégrité des constructions et notamment la préservation du cadre de lecture ont ensuite été vérifié par séquençage de fragments et analysé avec le logiciel Geneious.

Localisation subcellulaire en système hétérologue dans *N. benthamiana* :

Pour déterminer la localisation subcellulaire d'AVR-Pita, les plasmides précédemment générés ont été insérés dans des *Agrobacterium tumefaciens* GV3103 par électroporation. Les plasmides ont été exprimés transitoirement par agroinfiltration dans des feuilles de *N. benthamiana* âgés de 6 semaines. Afin de contrecarrer le « gene silencing » qui peut diminuer le niveau d'expression des protéines recombinantes, la protéine viral P19 a été co-infiltrée. Les agrobactéries ont été d'abord incubées dans le milieu d'induction (MES-KOH 10 mM pH=5.6, acétylsyringone 150 µM, MgCl₂ 10 mM) pendant 4h à l'obscurité, ensuite la DO₆₀₀ a été ajustée 0.25 pour les GV3103 et à 0.2 pour les P19 avec du milieu d'induction. La solution d'agrobactéries a ensuite été infiltrée dans les feuilles de *N. benthamiana* avec une seringue sans aiguille. Deux jours après infiltration, les cellules épidermiques de la face abaxiale des feuilles de *N. benthamiana* ont été observées au microscope confocal.

Inoculation de la gaine foliaire de riz :

Des plants de riz (*Oryza sativa*) de la variété Maratelli, âgés de 6 semaines ont été utilisés pour observer la translocation d'AVR-Pita. L'inoculation de la gaine foliaire a été faite sur des feuilles dont la gaine entoure la dernière feuille émergente par sur des gaines. Le plant de riz a été coupé à environ 3 cm de la base, les couches externes et la feuille émergente sont retirées délicatement. Des segments de

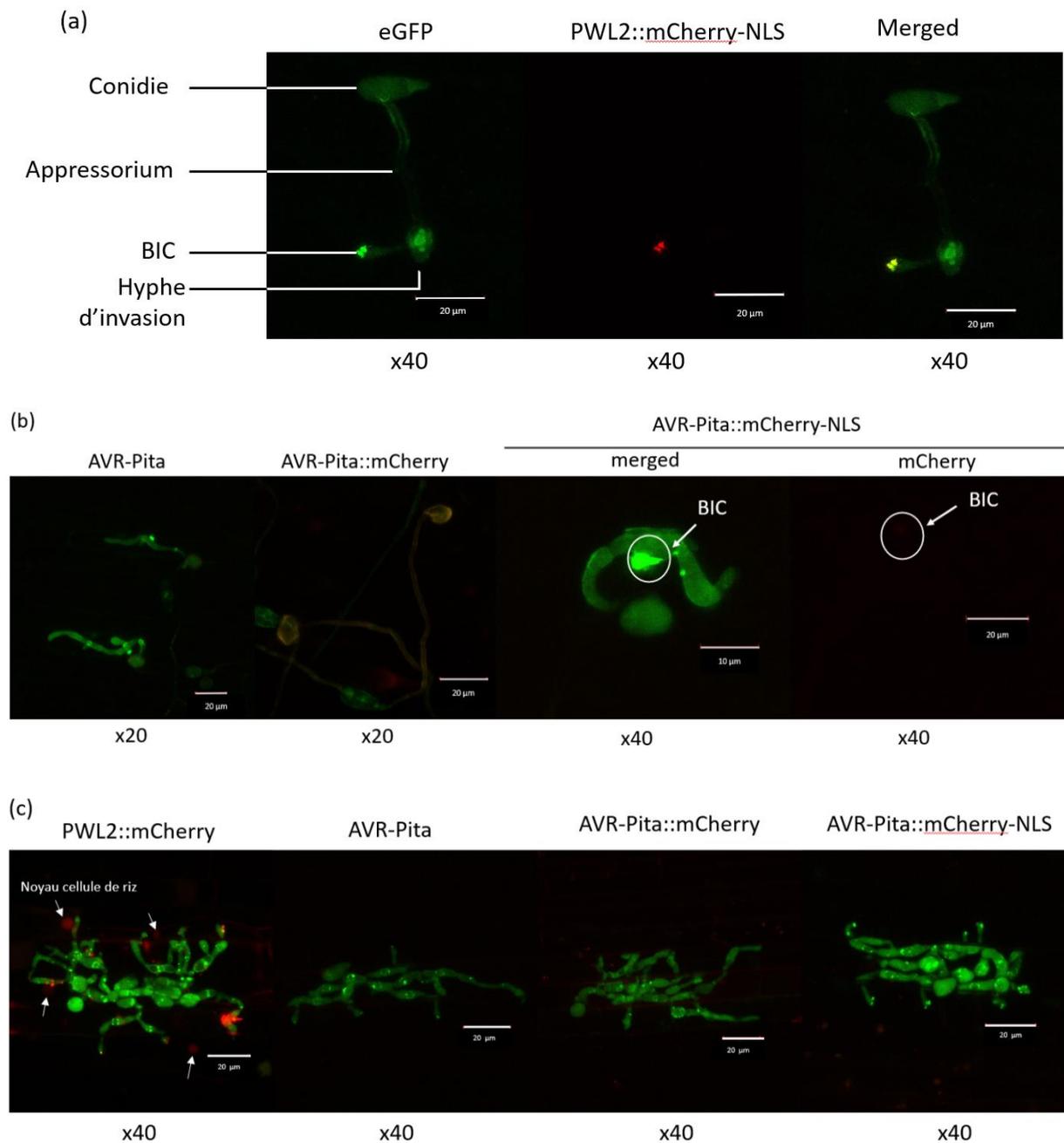


Figure 6 : Observation de la translocation d'AVR-Pita par microscopie confocale. (a) Observation par microscopie confocale des différentes structures d'une conidie germée dans des cellules épithéliales de la gaine foliaire de riz, exprimant les construits eGFP et PWL2::mCherry-NLS. Grossissement objectif x40 à immersion eau. (b) Observation par microscopie confocale de la colonisation des cellules épithéliales de la gaine foliaire de riz par *M. oryzae* exprimant les construits eGFP et AVR-Pita / AVR-Pita::mCherry / AVR-Pita::mCherry-NLS. 26-29 heures post inoculation et grossissement objectif x40 à immersion eau. (c) Observation par microscopie confocale de la colonisation des cellules épithéliales de la gaine foliaire de riz par *M. oryzae* exprimant les construits eGFP et PWL2::mCherry-NLS / AVR-Pita / AVR-Pita::mCherry / AVR-Pita::mCherry-NLS. 40-44 heures post inoculation et grossissement objectif x40 à immersion eau.

10 cm ont été découpés dans les gaines avec le bord supérieur taillé en biseaux. A l'aide d'une pipette P200, entre 200 et 600 μ l d'inoculum ajusté à 50 000 spores/ml avec de l'eau ont été introduits dans la gaine par les deux extrémités. Les gaines ont été incubées de 24h à 48h dans une chambre humide à l'obscurité et à 25°C (voir Jones and Khang, 2018). La nervure centrale a été retirée délicatement et l'observation a été réalisée en microscopie confocale sur l'épiderme de la face interne de la gaine entre lame et lamelle.

Microscopie confocale :

L'observation en microscopie confocale a été réalisée sur microscope Zeiss LSM 700 équipé d'un logiciel Zeiss ZEN 2009. Les observations ont été faites en utilisant les objectifs x20 (Plan-Apochromat 20x/0.8 M27) et x40 à immersion dans l'eau (W Plan-Apochromat 40x/1.0 DIC M27). Les longueurs d'excitation des lasers pour la eGFP étaient de 530 nm, pour la mCherry étaient de 630 nm, pour la mNeonGreen étaient de 540 nm et pour la mRFP étaient de 620 nm. Les images ont été acquises en réalisant un Z-stack pour la translocation et en acquisition simple pour la localisation subcellulaire. Elles ont été traitées avec le logiciel Zen lite black edition pour obtenir une projection de l'intensité maximale.

Tests de phénotypage :

L'inoculation des feuilles de riz a été effectuée par aspersion d'une suspension de spores (4×10^4 spores/ml dans 30ml gélatine 0.5%). Les plantes inoculées ont été incubées une nuit dans une chambre humide d'inoculation (26°C + 90% d'humidité) puis transférées en phytotron (12h : éclairage et 29°C, 12h : obscurité et 21°C). Les symptômes ont été observés 7 jours post inoculation, les 6 feuilles N-1 ou N-2 (feuilles ayant reçues le plus d'inoculum, le choix a varié en fonction du stage de croissance de chaque variété) d'une même variété pour une souche donnée, ont été coupées puis collées sur des feuilles A4 papier adhésif blanc. Ensuite les feuilles A4 ont été scannées à 800 dpi et enregistrées au format Tiff.

Résultats :

La translocation d'AVR-Pita::mCherry

Pour déterminer la localisation d'AVR-Pita au cours de la colonisation de la plante hôte, nous avons d'abord observé si la construction AVR-Pita::mCherry était transloquée du BIC vers le cytoplasme de l'hôte à travers la membrane entourant la matrice apoplasmique, l'EIHM. Dans le cas où le signal mCherry serait observé dans la cellule de riz, cela permettra de confirmer l'hypothèse qu'AVR-Pita est un effecteur cytoplasmique.

Dans une première étape nous avons produit des souches de *M. oryzae* co-transformées, exprimant deux constructions. La première construction, présente dans toutes les souches est le peptide signal de l'effecteur AVR1-CO39 fusionné à la eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) sous le contrôle d'un promoteur constitutif (pRP27). Cette construction permet de vérifier l'intégrité de la membrane (EIHM) séparant la matrice apoplasmique du cytoplasme de la cellule colonisée et de marquer le champignon. La seconde construction exprimée dans les souches est de différente nature en fonction des souches. Tout d'abord, l'effecteur PWL2 fusionné à la mCherry avec un signal d'adressage au noyau (NLS, Nuclear Localization Signal) et exprimé sous son promoteur natif (pPWL2) constitue notre témoin positif. Il a été démontré que PWL2::mCherry-NLS est d'accord sécrété et accumulé dans le BIC avant d'être transloqué puis localisé au niveau du noyau de la cellule de riz (Khang et al., 2010; Zhang et al., 2021). Les autres souches de *M. oryzae* expriment différentes constructions d'AVR-Pita sous contrôle

de leur promoteur natif (pAVR-Pita) à savoir AVR-Pita seul (control négatif pour la localisation), AVR-Pita fusionné à la mCherry et AVR-Pita fusionné à la mCherry plus NLS.

Les observations ont été faites dans des cellules épithéliales de la face interne de la gaine de riz. Les spores germées de *M. oryzae* et l'invasion primaire des cellules de riz sont observées à 26-29 hpi (heure post inoculation) et à 40-44 hpi. Il a été précédemment démontré qu'AVR-Pita, et notamment les effecteurs cytoplasmiques étaient d'abord sécrétés puis accumulés dans le BIC (Khang et al., 2010), l'observation à 26-29 hpi a pour but d'observer cette accumulation d'AVR-Pita dans le BIC. L'observation à 40-44 hpi permet d'observer la présence ou l'absence de l'effecteur tagué au sein de la cellule colonisée.

Le signal eGFP de la souche portant le construit pPWL2::PWL2::mCherry-NLS permet d'observer une conidie germée développant un hyphes d'invasion. Le signal eGFP est présent dans toutes les structures de colonisation du champignon et il est fortement concentré au niveau du BIC. Le signal mCherry est également présent et concentré en un point correspondant au BIC (Fig. 6a) ce qui confirme que la protéine PWL2 est accumulée dans le BIC et donc que notre témoin positif est correct. Pour le témoin négatif (la souche portant AVR-Pita sans protéine fluorescente) aucun signal correspondant à la mCherry n'est détecté, seul le signal eGFP est détecté dans une spore colonisant une cellule de riz (Fig. 6b).

En ce qui concerne l'effecteur AVR-Pita fusionné à la mCherry ou mCherry-NLS, les observations sont moins évidentes. A 26-29 hpi, pour pAVR-Pita::AVR-Pita::mCherry, un signal fluorescent rouge très faible est détecté et colocalisé avec le signal eGFP au niveau de la conidie, du mycélium et de l'appressorium. Pour ce transformant, nous n'avons pas observé de pénétration du champignon dans les cellules hôtes sur cette première observation. Pour la construction pAVR-Pita::AVR-Pita::mCherry-NLS, le stade de développement était plus avancé et comme pour PWL2, nous avons pu observer un hyphes invasif primaire et le BIC caractérisé par un signal eGFP très fort. En observant ce même site d'infection pour le signal mCherry, nous observons une accumulation très faible, à la limite de la détection. Après superposition du signal eGFP et mCherry, nous pouvons déterminer qu'AVR-Pita::mCherry-NLS est localisé au niveau du BIC (Fig. 6b). Il semblerait qu'entre 26 et 29 heures après inoculation, l'effecteur AVR-Pita soit produit dans le champignon puis accumulé dans le BIC.

A 40-44 hpi, l'ensemble des souches de *M. oryzae* transformés ont atteint un stade d'infection plus avancé, le signal eGFP nous permet de visualiser les hyphes d'invasion primaire et secondaires se développant dans plusieurs cellules de l'hôte. Le signal fluorescent correspondant à la construction PWL2::mCherry est observable à l'extérieur du champignon et il est localisé au niveau du noyau des cellules de riz infectées par les spores de *M. oryzae*. Cette observation confirme que PWL2 est un effecteur cytoplasmique à localisation nucléaire conformément aux résultats publiés par (Khang et al., 2010). Pour les souches exprimant AVR-Pita, AVR-Pita::mCherry et AVR-Pita::mCherry-NLS. La fluorescence rouge correspondant à la mCherry est très faible et elle est présente dans des zones éloignées de la cellule infectée. D'autre part, le témoin négatif AVR-Pita sans protéines fluorescente nous a permis de voir qu'il y avait un peu de signal récupéré dans le canal mCherry qui était dû à l'auto-fluorescence de la cellule végétale quand le gain et le pourcentage de puissance du laser étaient élevés. Cette fluorescence ne semble donc pas être liée à la mCherry mais elle semble être dû à l'auto-fluorescence des cellules végétales AVR-Pita semble être produit par les souches AVR-Pita::mCherry et AVR-Pita::mCherry-NLS mais la faible expression de nos constructions ne nous permet pas de conclure quant à sa translocation de cette effecteur dans le cytoplasme de la cellule de riz pour l'instant.

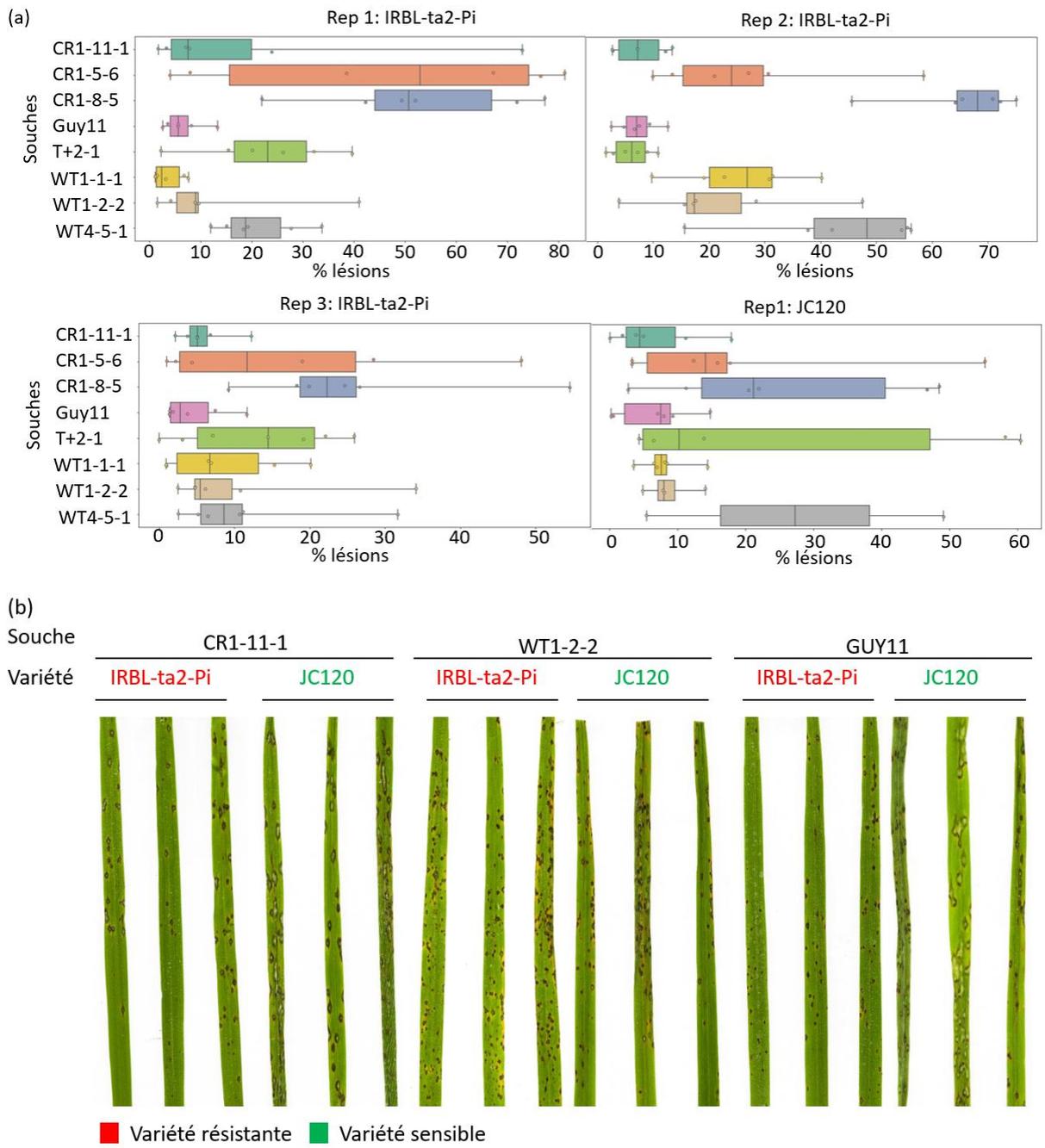


Figure 8 : Phénotypage des souches mutantes *avr-pita* CRISPR sur les variétés IRBL-ta2-Pi et JC120.
 (a) Représentation sous forme de « Box plot » des données de pourcentage de lésions par surface de feuille, induits par les 9 souches de *M. oryzae* sur deux variétés IRBL-ta2-Pi (résistante) et JC120 (sensible). Analyse réalisée avec les programmes LeAFtool et Python. (b) Scans des feuilles portant les lésions induit par l'inoculation des souches CR1-11-1 (mutant *avr-pita* CRISPR), WT1-2-2 (WT CRISPR) et GUY11 (WT) sur deux variétés IRBL-ta2-Pi (résistante) et JC120 (sensible).

Test de phénotypage pour les souches AVR-Pita::mCherry

Afin de tester si les constructions d'AVR-Pita que nous transformés dans les souches de *M. oryzae* sont fonctionnelles, nous avons inoculé nos transformants sur différentes variétés de riz possédants des résistances spécifiques à l'allèle d'AVR-Pita que nous avons utilisé. L'isolat GUY11 de *M. oryzae* que nous avons utilisé possède un allèle d'AVR-Pita reconnu par le locus de résistance *Pita*². En revanche, cet allèle n'est pas reconnu par le locus *Pita* présent dans les variétés K1, IRBL-K1 et IRBL-CT2. Les constructions que nous avons générées sont basés sur un allèle d'AVR-Pita spécifiquement reconnu par le locus de résistance *Pita*. Par conséquent, les constructions AVR-Pita introduites dans GUY11 devrait induire une reconnaissance de GUY11 sur par *Pita* et donc diminuer la virulence du champignon.

Nous avons inoculé par aspersion d'une solution d'inoculum à 4×10^4 spores/ml sur des plants de riz âgés de 4 semaines de 5 variétés différentes. 7 jours après inoculation, les feuilles N-1 ou N-2 sont récoltées, collées sur des feuilles de papiers adhésives puis scannées. Après avoir entrainer le programme LeAFtool à faire la distinction entre les lésions causée par *M. oryzae* et les artéfacts, nous avons déterminé la surface des lésions et le pourcentage de lésions par surface de feuille de riz. Une analyse des scans sera réalisée par le programme LeAFtool et une étude statistique sera effectuée sur Python.

La localisation subcellulaire d'AVR-Pita

En parallèle des expérimentations de translocation précédemment décrites, nous avons initié la localisation subcellulaire dans des cellules de *N. benthamiana* dans l'hypothèse où la translocation d'AVR-Pita serait éventuellement validé. Pour cela nous avons choisi d'exprimer transitoirement la protéine effectrice AVR-Pita fusionnée à la protéine fluorescente mNeonGreen dans des feuilles de *N. benthamiana* par agroinfiltration.

Nous avons agroinfiltré 3 formes d'AVR-Pita (Fig. 5c) à savoir : la protéine mature seule (AVR-Pita₁₇₆), la protéine mature avec le pré-propeptide (AVR-Pita₂₀₈) et la protéine mature avec le pré-propeptide et le peptide signal (AVR-Pita₂₂₃). Chacune de ces 3 protéines AVR-Pita ont été fusionnées avec la mNeonGreen à l'extrémité C-terminal. L'utilisation de ces trois formes d'AVR-Pita nous permet une étude plus complète de la localisation d'AVR-Pita. Le peptide signal est normalement clivé après sécrétion de la protéine et pré-propeptide est lui aussi sensé être clivé afin de libérer le site actif de la métalloprotéase (Bogdanović et al., 2016)Cependant, ces clivages participant à la maturation de la métalloprotéase non jamais été mis en évidence pour AVR-Pita. Tous les construits ont été réalisés grâce à la méthode du Golden Gate cloning et sont sous contrôle du promoteur constitutif 35S. Nous avons co-infiltré les feuilles de *N. benthamiana* avec une souche d'agrobactéries possédants une construction de l'ARN_t-cysteinylyl synthetase fusionnée à la protéine fluorescente mRFP (pNP118 Peeters et al., 2000) qui est localisée dans les mitochondries et les chloroplastes et nous permettra de marquer ces compartiments subcellulaires. En effet, une étude récemment publiée propose l'hypothèse selon laquelle AVR-Pita serait localisé dans les mitochondries pour interagir avec COX11 (Han et al., 2021).

Lors des prises de vue, nous avons récupéré 3 canaux indépendants : La mNeonGreen (visualisé en cyan), la mRFP (visualisé en rouge) et l'auto-fluorescence chloroplastique (visualisé en jaune). Le plasmide pNP118 agroinfiltré seul est utilisé comme témoin négatif, il produit un signal fluorescent

mRFP localisé dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules de *N. benthamiana* (Fig. 7a). Aucun signal fluorescent correspondant à la mNeonGreen n'est détecté dans le témoin négatif, cependant ce plasmide pNP118 ne semble pas spécifique des mitochondries ni les chloroplastes (Fig. 7a). Le plasmide induisant la production de la mNeonGreen seule a été utilisé comme témoin positif. Dans le témoin positif le signal mNeonGreen est détecté au niveau du noyau et au niveau du cytoplasme, des ponts cytoplasmiques sont visibles, il y a une colocalisation des signaux mRFP et mNeonGreen (Fig. 7a). En ce qui concerne nos 3 constructions avec AVR-Pita fusionné à mNeonGreen, aucun signal spécifique correspondant au canal de la mNeonGreen n'a pu être observé.

Expression des constructions mNeonGreen dans les feuilles de *N. benthamiana*

Nous n'avons pas détecté de signal fluorescent mNeonGreen montrant la présence des protéines de fusion AVR-Pita::mNeonGreen avec le microscope confocal. Nous avons donc fait une extraction des protéines totales des feuilles de *N. benthamiana transformées* suivi d'un Western blot pour confirmer la présence des protéines mNeonGreen. Les constructions mNeonGreen sont spécifiquement détectés à l'aide d'un anticorps anti-mNeonGreen. Une seconde hybridation avec des anticorps anti-souris fusionnés à l'enzyme horseradish peroxidase (HRP) se fixant spécifiquement sur les anticorps anti mNeonGreen permet la visualisation des protéines chimériques. Le contrôle positif consiste en la protéine mNeonGreen exprimée seule et nous visualisons une bande dans la zone de poids moléculaire attendu (environ 25 kDa). Conformément à notre observation au microscope confocal, la protéine mNeonGreen seule semble être correctement exprimée. Pour les échantillons AVR-Pita::mNeonGreen nous n'observons aucune bande dans la zone de poids moléculaire à celle d'AVR-Pita::mNeonGreen (de 57 à 52 kDa en fonction de la troncation) (Fig. 7b). La coloration au Ponceau nous permet de visualiser les protéines totales et confirme que l'extraction a bien fonctionné ainsi que la quantité de protéine chargée dans le gel est identique. En conclusion, l'analyse par western blot nous confirme l'absence d'AVR-Pita dans les échantillons de feuille de *N. benthamiana*.

Le phénotypage des mutants CRISPR AVR-Pita

Afin de déterminer la contribution d'AVR-Pita dans la virulence de *M. oryzae* nous avons réalisé un phénotypage de différents isolats de *M. oryzae* mutés sur le gène *avr-pita* sur 12 variétés de riz. Nous partons du postulat que si AVR-Pita contribue à la virulence de *M. oryzae* alors s'il est muté la souche mutante sera moins virulente. Nous avons choisi de tester 3 souches mutantes knock-out *avr-pita* générées par CRISPR avant le début de ce stage. Nous avons utilisé deux types de souches contrôles, des souches WT tel que GUY11, et des souches WT CRISPR, c'est-à-dire des souches qui ont subi une mutagenèse CRISPR mais avec une insertion ectopique, n'entraînant pas la mutation du gène *AVR-Pita*.

Nous avons inoculé par aspersion de 30 mL d'une solution de conidie des différents isolats à une concentration de 4×10^4 spores/ml sur des plants de riz âgés de 4 semaines. 7 jours après inoculation, les feuilles N-1 ou N-2 sont récoltées, collées sur des feuilles de papiers adhésives puis scannées. Après avoir entraîné le programme LeAFtool à faire la distinction entre les lésions causées par *M. oryzae* et les artéfacts, nous avons déterminé la surface des lésions et le pourcentage de lésions par surface de feuille de riz. Une analyse graphique des données obtenue par LeAFtool a été réalisée sur Python et a permis d'obtenir les graphiques suivants (Fig. 8a).

Parmi les 12 variétés de riz sur lesquelles les souches mutantes *avr-pita* CRISPR ont été testées, seule la variété IRBL-ta2-Pi est normalement résistante aux souches de *M. oryzae* portant allèle *AVR-Pita* de

GUY11 car elle a été sélectionnée pour porter le gène de résistance *Pita*². Nous avons choisi de montrer notre analyse sur cette variété résistante et sur JC120 une variété sensible.

Premièrement nous avons comparé visuellement les souches mutantes *avr-pita* entre elles. La souche CR1-8-5 semble induire un phénotype différent quel que soit le type de variété sur laquelle elle est testée. CR1-8-5 induit un pourcentage de lésion par surface de feuille compris entre 20 et 70 % selon les répétitions et les variétés de riz alors que les deux autres souches mutantes *avr-pita* n'induisent qu'un pourcentage compris entre 5 et 15%. Il est possible que cette lignée soit défectueuse des tests additionnels doivent être réalisés afin de vérifier que la mutation soit efficiente. Nous avons effectué la même comparaison avec les souches WT et CRISPR WT. La souche WT4-5-1 semble induire un pourcentage plus grand de lésions par surface de feuille chez la plupart des variétés de riz testées (Annexe 3).

Sur la variété IRBL-ta2-Pi, les souches mutantes *avr-pita* CRISPR et les souches WT CRISPR induisent une augmentation du pourcentage des lésions pour surface de feuilles par rapport à la souche de référence GUY11. Il est observé le même résultat sur la variété JC120.

Le programme LeAFTool ne peut pas faire la différence entre lésions sensibles (lésions larges et grises) caractéristiques de la sensibilité de la variété de riz, et les lésions résistantes (lésions petites et noires). Ces lésions résistantes peuvent être des zones de nécroses dû à la réponse hypersensible et donc une résistance de l'hôte au pathogène. La souche GUY11 provoque une très forte apparition de lésions résistantes sur la variété IRBL-ta2-Pi alors que la variété JC120 présente un nombre de lésions moins important cependant les lésions sont des lésions sensibles (Fig. 8b). La même observation a été faite pour les souches WT CRISPR. Les souches mutantes CR1-11-1 et CR1-5-6 induisent l'apparition de lésions sensibles sur les variétés IRBL-ta2-Pi et JC120 avec une augmentation de la taille des lésions sur JC120.

Visuellement les souches mutantes *avr-pita* CRISPR induisent des lésions sensibles sur toutes les souches de riz alors que les souches WT induisent plus de lésions résistantes.

Pour le moment, nous ne pouvons pas avoir de conclusion définitive sur la contribution de AVR-Pita à la virulence de *M. oryzae*. Il semble cependant que la contribution soit minimale et particulièrement difficile à apprécier. La forte variabilité de notre jeu de données sur la contribution d'AVR-Pita à la virulence de *M. oryzae* rend l'interprétation difficile. De plus, les conditions de cultures n'étaient pas optimales, certaines variétés de riz présentées des symptômes physiologiques tel que des chloroses et un problème de germination notamment la variété CO39.

Discussion :

L'émergence de nouvelles maladies et le développement de souches d'agents pathogènes résistants posent un réel problème dans l'agriculture intensive pour toutes les zones agricoles. Notamment la pyriculariose du riz, une maladie fongique causée par *Magnaporthe oryzae* qui induit chaque année des pertes considérables de rendement et par conséquent des pertes économiques non négligeables. Il est important de mieux comprendre la contribution des effecteurs fongiques dans la virulence des champignons phytopathogènes pour établir des stratégies de contrôle de ces maladies. Dans le cadre de ce projet, nous nous intéressons à un effecteur en particulier de *M. oryzae*, l'effecteur AVR-Pita. AVR-Pita est un effecteur fongique dont la structure protéique possède des similarités avec les métalloprotéases de la famille M35, caractérisée par la présence d'un peptide signal et d'un site

catalytique présentant motif HExxH caractéristique. La fonction d'AVR-Pita dans la cellule de riz et son rôle dans la virulence de *M. oryzae* n'ont pas encore été démontrés à ce jour. Certaines études laissent penser qu'AVR-Pita pourrait être un effecteur cytoplasmique, pouvant d'abord être accumuler dans le BIC avant d'être transloqué à l'intérieur des cellules infectées. Son accumulation dans le BIC a déjà été observée mais ni sa translocation ni sa localisation subcellulaire ont été vérifiées.

Nous avons produit des souches de l'isolat GUY11 de *M. oryzae* exprimant à la fois le peptide signal de la protéine effectrice AVR1-CO39 fusionnée à la eGFP et notre effecteur étudié AVR-Pita fusionné à la mCherry pour visualiser une hypothétique translocation d'AVR-Pita dans les cellules de riz durant la phase de colonisation. Les résultats obtenus montrent une production de la protéine de fusion AVR-Pita dans les stades précoces d'infection notamment au niveau des appressoriums et des hyphes d'invasion, et ils montrent une accumulation d'AVR-Pita dans le BIC. Cependant le signal de fluorescence mCherry est très faible et à la limite de la sensibilité de notre microscope. Nous avons anticipé cette éventualité c'est pour cela qu'en position C-terminale de la protéine AVR-Pita::mCherry, il a été ajouté un signal d'adressage au noyau (NLS). Dans le cas d'une translocation dans les cellules de l'hôte, le NLS induit la concentration du signal mCherry dans le noyau le rendant ainsi plus facilement détectable. Le NLS pourrait dans une autre éventualité éviter l'induction d'une réponse immunitaire de la part de la cellule infectée. En effet, même si la reconnaissance d'AVR-Pita par le système immunitaire végétale est encore mal comprise, les deux récepteurs *Pi-ta* et *Ptr* sont respectivement cytoplasmique et membranaire (Jia et al., 2000; Zhao et al., 2018). Par conséquent, la localisation artificielle dans le noyau d'AVR-Pita empêcherait sa reconnaissance par *Pi-ta* ou *Ptr* même si la variété utilisé ici (Maratelli) n'est pas supposé posséder les bons allèles pour la reconnaissance d'AVR-Pita. Pour des stades plus avancés dans la colonisation des cellules hôtes, le signal mCherry permettant de visualiser l'effecteur AVR-Pita n'a été détecté ni dans les structures fongiques ni dans les cellules végétales, nous avons observé des résultats similaires lors de l'expression transitoire d'AVR-Pita dans *N. benthamiana*. Les résultats obtenus ne permettent donc pas de conclure quant à la translocation d'AVR-Pita dans les cellules colonisées.

Cependant, le design expérimental semble correct du fait que les témoins, positif et négatif, montrent respectivement la présence et l'absence du signal de fluorescence produit par la mCherry. Il existe plusieurs hypothèses pouvant expliquer l'absence ou la non-détection d'AVR-Pita dans les cellules de riz. La première hypothèse serait qu'AVR-Pita est très faiblement exprimé aux stades précoces de l'infection et il pourrait être exprimé en plus grande quantité plus tard dans l'infection. Des données non publiées par l'équipe d'accueil ont montré que le pic d'expression de l'effecteur AVR-Pita était positionné 3 jours après l'inoculation. Pour confirmer cette hypothèse des observations seront réalisées à des étapes plus tardives. La deuxième hypothèse émise s'intéresse plus à la stabilité de la protéine. Il se pourrait qu'AVR-Pita soit une protéine très instable avec un temps d'activité très court dans la cellule infectée et qu'elle serait rapidement dégradée. AVR-Pita::mCherry serait sécrété par *M. oryzae* et aurait une interaction courte avec la cellule de riz avant d'être soit dégradée par le protéasome soit par autodigestion, ce qui empêcherait l'accumulation du signal mCherry pour qu'il devienne détectable. Dans ce cas-là deux expériences se présentent afin de stabiliser la protéine AVR-Pita::mCherry. Si AVR-Pita est dégradé par le protéasome un traitement avec un inhibiteur du protéasome ou un inhibiteur de l'ubiquitination pourrait être effectué sur les plants de riz. Si AVR-Pita à la capacité de s'autodigérer alors une mutation sur le résidu glutamate E₁₇₇, résidu caractéristique du motif HExxH du site catalytique (Pan et al., 2020) permettrait de supprimer l'activité catalytique de l'effecteur. La dernière hypothèse émise sur la non détection d'AVR-Pita::mCherry est que cette

protéine agit à faible dose ainsi la quantité sécrétée par *M. oryzae* n'est pas assez suffisante pour générer un signal fluorescent détectable. Un changement de promoteur dans la construction AVR-Pita pourrait être effectué pour faire sécréter en plus grande quantité AVR-Pita::mCherry et ainsi atteindre le seuil de détection. A la place du promoteur natif pAVR-Pita un promoteur constitutif tel que le promoteur RP27 (promoteur de la protéine constitutive ribosomale P27) promoteur de notre construction de SP_AVR-CO39:eGFP pourrait être utilisé. Cependant une étude a montré que l'utilisation d'un promoteur non natif pour exprimer constitutivement un effecteur cytoplasmique avait un fort impact sur son accumulation dans le BIC et induisait un changement de localisation (Khang et al., 2010). De plus nous allons utiliser les données rassemblées lors du phénotypage des souches AVR-Pita::mCherry pour valider que ces souches expriment réellement la protéine AVR-Pita::mCherry. Les variétés utilisées pour ce phénotypage ne possèdent pas le locus *Pi-ta*² qui reconnaît allèle *avr-pita* de la souche GUY11, utilisée pour la transformation des protoplastes. L'allèle *avr-pita* utilisé pour réaliser la construction AVR-Pita::mCherry est celui reconnu par le locus de résistance *Pi-ta*. Ainsi dans le cas où l'analyse des données montre l'apparition d'une réaction de résistance (lésions résistantes induites par une réponse hypersensible) cela signifierait que les constructions pAVR-Pita:AVR-Pita ou pAVR-Pita:AVR-Pita::mCherry sont fonctionnelles, et bien exprimés car détecté par les protéines de résistance.

En parallèle de la translocation, nous avons exprimé transitoirement dans des feuilles de *N. benthamiana*, l'effecteur AVR-Pita fusionné à la protéine fluorescente mNeonGreen pour essayer de déterminer la localisation subcellulaire de cet effecteur. Malgré une détection du signal mNeonGreen avec le témoin positif, la protéine fluorescente mNeonGreen seule, aucune fluorescence liée à celle-ci n'a été détectée pour les construits AVR-Pita::mNeonGreen rendant la détermination de la localisation subcellulaire d'AVR-Pita impossible. De plus, les feuilles de *N. benthamiana* ayant été transitoirement transformées avec les construits AVR-Pita::mNeonGreen, développaient un phénomène de mort cellulaire dans les zones agroinfiltrées. Ce phénotype n'a pas facilité l'observation par microscopie confocale. Nous avons ensuite réalisé un Western blot sur des extraits protéiques des cellules de feuilles de *N. benthamiana* agroinfiltrées et aucune bande aux alentours de 52kDa n'a été révélée.

Seul pour le témoin positif une bande significative indiquant la présence de la protéine mNeonGreen dans les feuilles a été observé. L'effecteur AVR-Pita fusionné à la mNeonGreen n'est pas présent dans les feuilles de *N. benthamiana*, ce qui prouve que l'absence du signal mNeonGreen est corrélée à l'absence de l'effecteur. Cette absence de la protéine AVR-Pita::mNeonGreen est possiblement liée à une dégradation de celle-ci soit par autodigestion soit par le protéasome de l'hôte. Dans l'hypothèse où AVR-Pita s'auto-digère, il y a la possibilité de générer un mutant catalytique d'*avr-pita*. Cette mutation est réalisée par la substitution du résidu glutamate E₁₁₇ du motif HExxH caractéristique du site catalytique des métalloprotéases (Orbach et al., 2000; Zhang et al., 2021). Nous avons produit la mutation en transformant le E₁₇₇ par une alanine ou par une glutamine en utilisant le kit QuickChange, et nous sommes actuellement en train de produire les construits AVR-Pita_{E177Q} fusionné à une protéine fluorescente. Une autre possibilité est que le marqueur mNeonGreen utilisé ici ne soit optimal pour la détection en confocal et par western blot. En effet, bien que nous ayons pu observer un signal pour la mNeonGreen exprimée seule en confocal et en western blot, ce signal était faible en comparaison avec la eGFP par exemple. Nous avons donc entrepris de refaire toutes les constructions en changeant de protéine fluorescente et en prenant la eGFP, ce travail est toujours en cours au laboratoire. Pour ce qui est de la contribution d'AVR-Pita à la virulence de *M. oryzae*, nous avons inoculé des souches mutantes *avr-pita* sur un panel de variétés de riz pour observer l'impact de cette mutation knock-out

sur l'apparition des symptômes et donc sur la virulence du champignon. Les données brutes montrent une très forte variabilité entre les souches utilisées et entre les répétitions rendant une analyse statistiquement significative impossible. Cependant, nous avons observé qu'il ne semblait pas y avoir de différence entre les différentes souches testées au niveau du pourcentage de la surface de la feuille couvert par des lésions. Cette observation indiquerait qu'AVR-Pita n'est pas essentiel à la virulence de *M. oryzae* malgré le fait qu'il est conservé dans la majorité des souches de *M. oryzae*. Il faut noter que nous avons rencontré deux problèmes majeurs. Tout d'abord, des variétés de riz présentant des symptômes physiologiques et des problèmes de germination pouvant induire un biais dans l'expérimentation. Ensuite, le programme LeAFtool utilisé pour reconnaître les lésions et calculer leur nombre et leurs surfaces par rapport à celle de la feuille, n'est pas assez entraîné pour distinguer la différence entre les types de lésions. Pour résoudre ce problème de variabilité, nous pourrions améliorer le fichier d'entraînement de LeAFtool et retirer les souches atypiques de l'analyse Python. De plus une analyse statistique fine pour permettre de voir les tendances observées au sein d'une même répétition étaient reproduites sur l'ensemble des répétitions ou si cela était simplement dû à une forte variabilité. Nous pourrions aussi utiliser un autre programme que LeAFtool utilisant le machine learning et potentiellement beaucoup plus à même de différencier plusieurs types de lésion. Ce programme est actuellement, en cours de développement dans l'UMR.

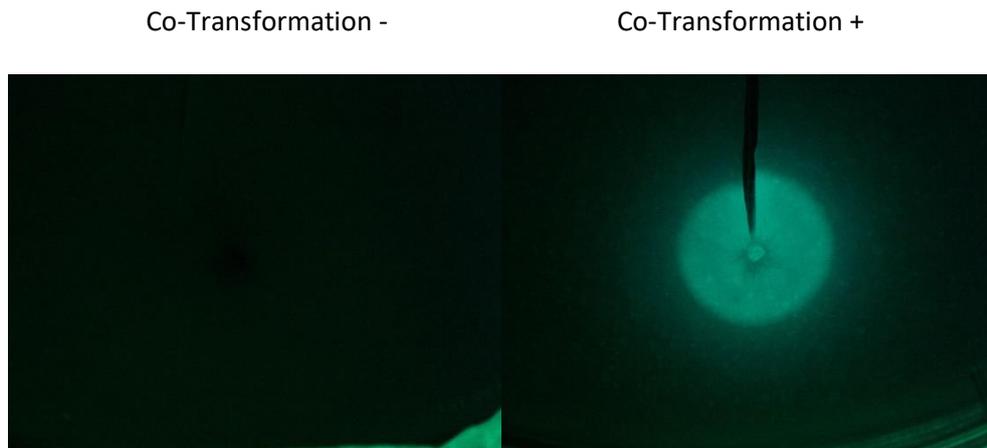
Il est probable que les améliorations d'analyse d'image et d'analyse statistique que nous avons prévu d'effectuer ne suffisent pas à révéler une contribution d'AVR-Pita à la virulence de *M. oryzae*. Dans ce cas, nous pouvons penser qu'il y a une redondance fonctionnelle entre plusieurs effecteurs dont AVR-Pita ce qui indiquerait qu'AVR-Pita contribue à la virulence mais qu'il n'est pas nécessairement requis ou que sa contribution est trop faible pour être apprécié. Cependant, une étude récente a montré qu'AVR-Pita avait un effet positif sur la virulence de *M. oryzae* (Han et al., 2021). Dans cette étude, les auteurs ont exprimé constitutivement AVR-Pita dans des lignées transgéniques de riz. Ces lignées sont plus susceptibles au champignon *M. oryzae* ce qui suggère qu'une abondance d'AVR-Pita dans les cellules de l'hôte facilite la colonisation par le pathogène. Cependant cette étude a été réalisée dans des lignées transgéniques de riz en exprimant constitutivement l'effecteur à l'intérieur du compartiment cellulaire ce qui peut conduire à des artefacts non significatifs en condition réelle.

AVR-Pita est un effecteur peu commun par sa similitude structurelle avec les métalloprotéases M35. Il semble important pour accroître la virulence de *M. oryzae* à cause de sa conservation dans la plupart des isolats. Mais il semblerait qu'il ait une action redondante avec d'autres effecteurs ne permettant pas de facilement visualiser sa contribution à la virulence de *M. oryzae*. De plus sa caractérisation comporte des zones d'ombres sur sa localisation et sa translocation. Cette étude permet toute fois de parfaire le design des expérimentations et de mettre au point des outils essentiels pour améliorer notre compréhension de cet effecteur.

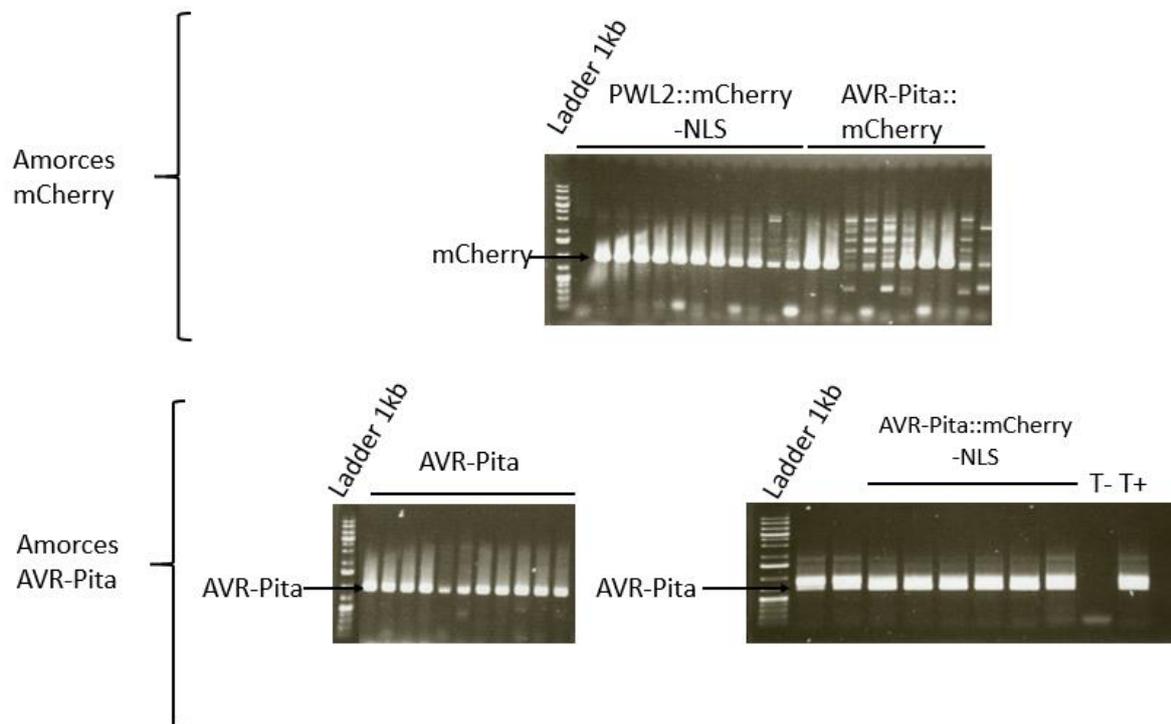
- Białas A, Zess EK, de la Concepcion JC, Franceschetti M, Pennington HG, Yoshida K, Upson JL, Chanclud E, Wu CH, Langner T, et al** (2017) Lessons in effector and NLR biology of plant-microbe systems. *bioRxiv* **31**: 34–45
- Bigeard J, Colcombet J, Hirt H** (2015) Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecular Plant* **8**: 521–539
- Bogdanović X, Palm GJ, Schwenteit J, Singh RK, Gudmundsdóttir BK, Hinrichs W** (2016) Structural evidence of intramolecular propeptide inhibition of the aspincin metalloendopeptidase AsaP1. *FEBS Letters* **590**: 3280–3294
- Chuma I, Isobe C, Hotta Y, Ibaragi K, Futamata N, Kusaba M, Yoshida K, Terauchi R, Fujita Y, Nakayashiki H, et al** (2011) Multiple translocation of the avr-pita effector gene among chromosomes of the rice blast fungus *magnaporthe oryzae* and related species. *PLoS Pathogens*. doi: 10.1371/journal.ppat.1002147
- Dean R, van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J, et al** (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **13**: 414–430
- Dodds PN, Rathjen JP** (2010) Plant immunity: Towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* **11**: 539–548
- Engler C, Youles M, Gruetzner R, Ehnert TM, Werner S, Jones JDG, Patron NJ, Marillonnet S** (2014) A Golden Gate modular cloning toolbox for plants. *ACS Synthetic Biology* **3**: 839–843
- Fernandez J, Orth K** (2018) Rise of a Cereal Killer: The Biology of *Magnaporthe oryzae* Biotrophic Growth. *Trends in Microbiology* **26**: 582–597
- Han J, Wang X, Wang F, Zhao Z, Li G, Zhu X, Su J, Chen L** (2021) The Fungal Effector Avr-Pita Suppresses Innate Immunity by Increasing COX Activity in Rice Mitochondria. *Rice*. doi: 10.1186/s12284-021-00453-4
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A** (2001) The innate immune response to bacterial γ -agellin is mediated by Toll-like receptor 5. **410**: 1–5
- Jia Y, McAdams SA, Bryan GT, Hershey HP, Valent B** (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO Journal* **19**: 4004–4014
- Khang CH, Berruyer R, Giraldo MC, Kankanala P, Park SY, Czymmek K, Kang S, Valent B** (2010) Translocation of *Magnaporthe oryzae* effectors into rice cells and their subsequent cell-to-cell movement. *Plant Cell* **22**: 1388–1403
- Khush GS** (2005) What it will take to Feed 5.0 Billion Rice consumers in 2030. *Plant Molecular Biology* **59**: 1–6
- Orbach MJ, Farrall L, Sweigard JA, Chumley FG, Valent B** (2000) A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene Pi-ta. *Plant Cell* **12**: 2019–2032
- Pan L, Wen S, Yu J, Lu L, Zhu X, Zhang Z** (2020) Genome-wide identification of M35 family metalloproteases in *rhizoctonia cerealis* and functional analysis of RCMEP2 as a virulence factor during the fungal infection to wheat. *International Journal of Molecular Sciences*. doi: 10.3390/ijms21082984

- Io Presti L, Kahmann R** (2017) How filamentous plant pathogen effectors are translocated to host cells. *Current Opinion in Plant Biology* **38**: 19–24
- Io Presti L, Lanver D, Schweizer G, Tanaka S, Liang L, Tollot M, Zuccaro A, Reissmann S, Kahmann R** (2015) Fungal effectors and plant susceptibility. *Annual Review of Plant Biology* **66**: 513–545
- Rodriguez-Moreno L, Ebert MK, Bolton MD, Thomma BPHJ** (2018) Tools of the crook- infection strategies of fungal plant pathogens. *Plant Journal* **93**: 664–674
- Saitoh H, Fujisawa S, Mitsuoka C, Ito A, Hirabuchi A, Ikeda K, Irieda H, Yoshino K, Yoshida K, Matsumura H, et al** (2012) Large-scale gene disruption in *Magnaporthe oryzae* identifies MC69, a secreted protein required for infection by monocot and dicot fungal pathogens. *PLoS Pathogens*. doi: 10.1371/journal.ppat.1002711
- Stergiopoulos I, de Wit PJGM** (2009) Fungal effector proteins. *Annual Review of Phytopathology* **47**: 233–263
- Wan J, Zhang X, Stacey G** (2008) Chitin signaling and plant disease resistance. **6**: 831–833
- Zhang X, Huang H, Wu B, Xie J, Viljoen A, Wang W, Mostert D, Xie Y, Fu G, Xiang D, et al** (2021) The M35 Metalloprotease Effector FocM35 _ 1 Is Required for Full Virulence of *Fusarium oxysporum* f . sp . *cubense* Tropical.
- Zhao H, Wang X, Jia Y, Minkenberg B, Wheatley M, Fan J, Jia MH, Famoso A, Edwards JD, Wamische Y, et al** (2018) The rice blast resistance gene *Ptr* encodes an atypical protein required for broad-spectrum disease resistance. *Nature Communications*. doi: 10.1038/s41467-018-04369-4

Annexes :

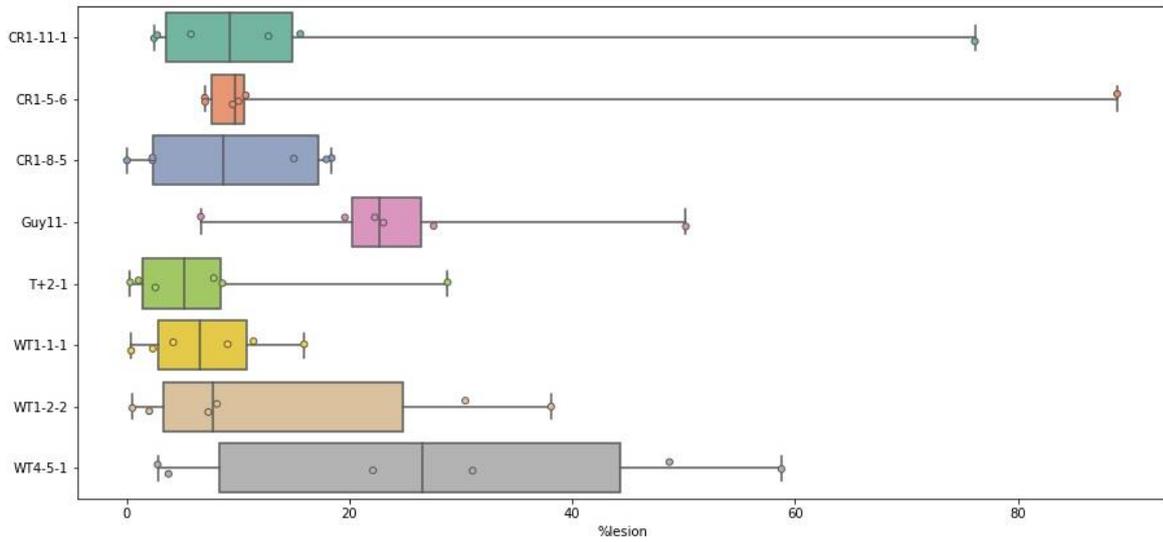


Annexe 1 : Sélection des souches *M. oryzae* co-transformées, par présence de fluorescence eGFP

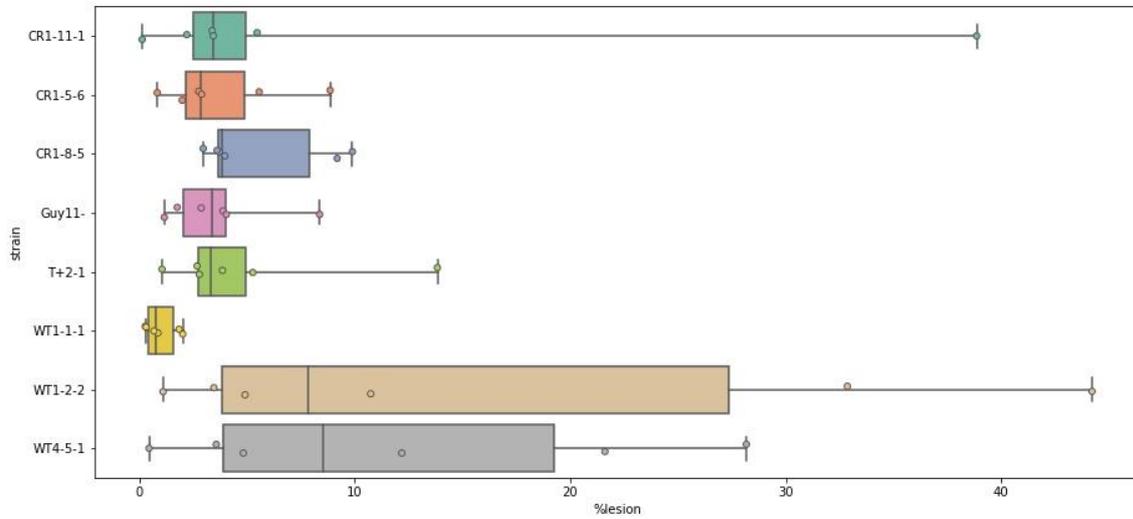


Annexe 2 : Sélection des souches *M. oryzae* co-transformées par PCR

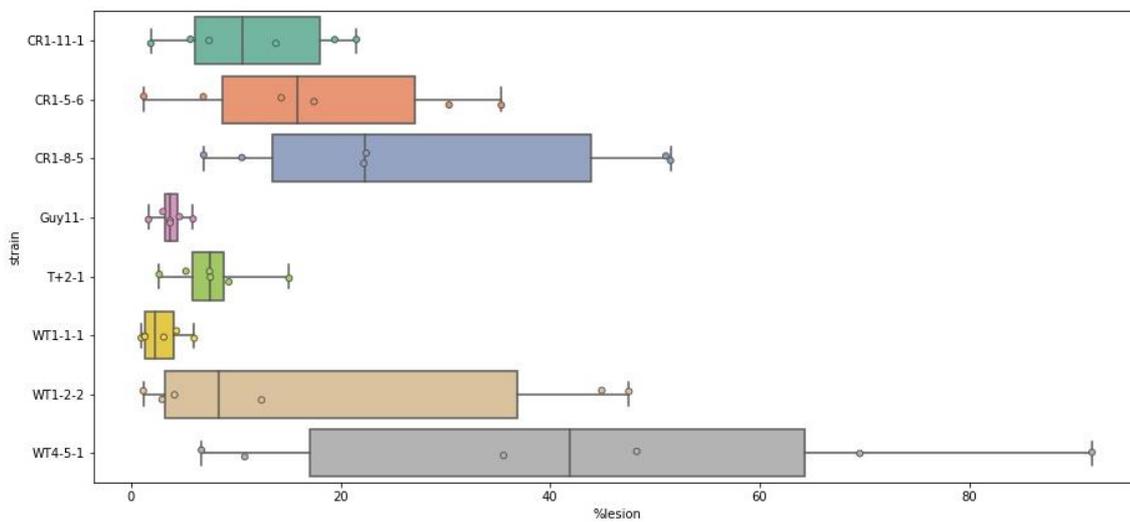
Chau



CO39



IR36



Annexe : Box Plot représentant les données brutes LeAFtool

