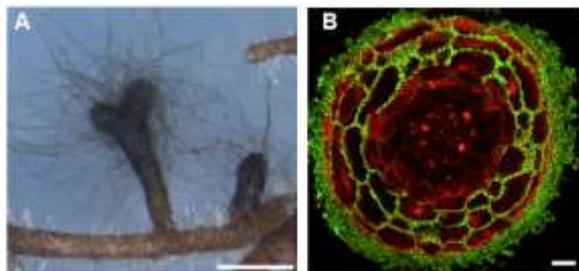
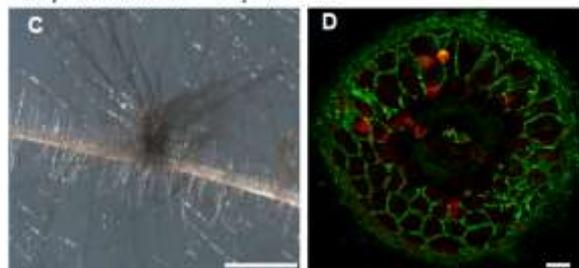


*Pinus sylvestris*



*Populus tremula* × *Populus alba*



## Ectomycorrhiza formed by *Cenococcum geophilum*.

Morphological characteristics of typical ectomycorrhiza formed by *C. geophilum* in interaction with *Pinus sylvestris* (A) and *Populus tremula* L. × *Populus alba* L.-INRA 717(C). Cross sections of ectomycorrhizal roots show the presence of a Hartig net between epidermal and cortex cells in both interactions (B, D).

Responsable scientifique : Annegret KOHLER, UMR Interactions Arbres/Micro-organismes

Partenaires Labex : Claire Veneault-Fourrey (IAM), Maira de Freitas Pereira (postdoc IAM INRA/ Forest Dynamics WSL)

Collaborations : WSL Birmensdorf /Suisse

### Contexte —

Certains champignons des sols des forêts s'associent avec des racines des arbres pour former des ectomycorhizes (ECM). En échange de substrats carbonés, les champignons ectomycorhizien fournissent des minéraux améliorant la nutrition des arbres. Ces associations protègent également les arbres de la sécheresse et contribuent directement à l'exclusion des microbes compétitifs. La formation d'une ectomycorhize fonctionnelle nécessite un contact étroit entre les cellules fongiques et les cellules racinaires. Ainsi, les champignons ECMs doivent manipuler les réponses de défense et le métabolisme des cellules hôtes. A l'instar des agents phytopathogènes, ces champignons mutualistes utilisent des petites protéines sécrétées (PSSs) comme des clés moléculaires pour promouvoir la symbiose.

### Objectifs —

L'objectif principal de ce projet est de comprendre le rôle des PSS de *Cenococcum geophilum* dans la formation et le fonctionnement de l'ECM. Ce champignon est très répandu et d'un intérêt écologique majeur pour les écosystèmes forestiers

### Démarche —

Nous avons (i) dresser un répertoire de PSSs de *C. geophilum* à partir de la séquence de son génome et de données d'expression ; (ii) étudier la variation intra- et interspécifique des gènes candidats afin d'élucider l'évolution de ces gènes ; (iii) caractériser d'un point de vue fonctionnel quelques gènes candidats en validant leur expression, en étudiant leur localisation.

### Résultats marquants —

- Les gènes codant des protéines sécrétées de *C. geophilum* induits lors de l'interaction symbiotique sont similaires que l'interaction s'effectue entre *C. geophilum* et le gymnosperme *Pinus sylvestris* (pin) ou l'angiosperme *Populus tremula* × *Populus alba* (peuplier). Peu de gènes induits sont spécifiques d'une seule interaction mutualiste. Toutefois, l'interaction avec le pin induit davantage de gènes codant pour des CAZymes, alors que l'interaction avec le peuplier induit davantage de gènes codant des PSS. Ces analyses d'expression ont permis d'identifier

- 22 protéines (PPSs) comme effecteur putatif pour une caractérisation fonctionnelle plus poussée.
- La diversité intra- et interspécifique des séquences des 22 MiSSPs “effecteurs candidats” a été analysée à partir du génome de 15 souches de *C. geophilum* d'origine géographique distincte à l'échelle européenne et deux autres champignons Dothidéomycètes étroitement apparentés. Les profils présence-absence des gènes parmi les isolats de *C. geophilum* sont expliqués d'abord par l'appartenance à un groupe d'isolats, plutôt que l'origine géographique ou le type de forêt d'où proviennent les souches.
  - Enfin, nous avons montré que six CgMiSSPs sont localisées dans quatre compartiments subcellulaires distincts tels que le réticulum endoplasmique, la membrane plasmique, le cytosol et le tonoplaste, lorsqu'elles sont exprimées transitoirement dans des feuilles de tabac.

### **Principales conclusions incluant des points-clés de discussion —**

Notre travail présente une première analyse du sécrétome avec un focus sur les PPS du champignon ectomycorhizien *C. geophilum*. Nous avons montré qu'il produit un catalogue très similaire de protéines sécrétées pour communiquer avec les racines de pin et de peuplier, avec toutefois des différences de niveau d'expression pour les gènes codant les CAZymes ou les PPS entre les deux hôtes. Un polymorphisme présence/absence a été observé pour ces PPS, avec certains conservés parmi les souches de *C. geophilum* d'origine géographique différente et d'autres absentes dans de nombreuses souches. Ce polymorphisme présence/absence des PPS pourrait refléter leurs différents rôles comme effecteurs pour réguler/contrôler les voies de signalisation ou la formation de l'interface de biotrophie.

### **Perspectives —**

Note prochain objectif est de démontrer le rôle essentiel (ou non) des PPS de *C. geophilum* dans la formation et/ou le développement des ectomycorhizes. La transformation génétique du champignon *C. geophilum* n'est pas une méthode maîtrisée et ne pourra donc pas être utilisée pour mener des analyses fonctionnelles sur les PPS. Nous proposons donc d'utiliser d'autres méthodes pour diminuer l'expression des transcrits des PPS, e.g. l'utilisation d'ARN interférant double brin (dsi). Cette méthode prometteuse a été utilisée avec succès chez différentes interactions plantes-, e.g. l'agent pathogène *Botrytis cinerea* et le champignon ectomycorhizien *Pisolithus albus*.

### **Valorisation —**

The first BLACKSECRET publication will be submitted End of November 2017 to the Research Topic “Mycorrhizosphere Communication: Mycorrhizal Fungi and Endophytic Fungus-Plant Interactions” in *Frontiers in Microbiology*. A second publication is in preparation and submission is planned for January 2018.

The post-doctoral fellow (Maira de Freitas Pereira) attended several conferences and presented her results by poster or oral presentations. One of these conferences was the French consortium “Effectome” where she met national and international researchers working on effectors of plant-associated microorganisms. She attended the international Molecular Mycorrhiza Meeting (iMMM) in Toulouse as well as Swiss conferences such as, Zürich Mycology Symposium 2017 (ETH Zürich 27.1.2017), Host-Microbes Genomics 2017 (Neuchâtel 8.9.2017), good opportunities to present BLACKSECRET and to discuss with Swiss researchers.

In addition, we presented our project and LABEX Arbre to a broad community via television (<http://www.nancy.inra.fr/Toutes-les-actualites/Le-reseau-NFZ-au-caeur-d-un-reportage-de-France-3-Lorraine>) and radio (<http://www.radiocristal.org/podcasts/l-invite.html>).

### **Effet levier du projet —**

The initial one year WSL-LABEX Arbre project has already been extended by a 6 month post-doc grant by the Grand Est Region (to A. Kohler and M. de Freitas Pereira) and a 6 month WSL financing (to M. Peter and M. de Freitas Pereira) and allowed us to reinforce our collaboration with the Forest Dynamics team at WSL. Future common projects are already planned. The results from BLACKSECRET enabled us also to introduce *Cenococcum* as emerging model system to the IAM “Plant-Microbe Interfaces” project funded by the U.S. DOE Genomics: GTL: Systems Biology for Energy and Environment, in collaboration with colleagues from Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA (<http://genomicscience.energy.gov/research/sfas/ornlpmi.shtml>). This project aims to use “systems biology” (integration of data from genomic; transcriptomic, proteomic and metabolomic analysis) in order to understand the interfaces between *Populus* and its associated microbe communities.