



**Recherche des protéines effectrice liée à la symbiose dans le champignon endomycorhizien éricoïde Oidiodendron maius**

Responsable scientifique : Elena MARTINO, UMR Interactions Arbres/Micro-organismes (IAM)

Partenaires Labex : Kohler A., Martin F., Morin E., Murat C.(UMR IAM)

Collaborations : Perotto S., Stefania Daghino, Casarrubia S. (Université de Turin), Héma Fritz (Université-Paris-Est-Créteil)

**Contexte —**

- Les champignons mycorhiziens éricoïdes (ERM) appartiennent à la classe des Léotiomycètes et forment une association symbiotique endomycorhizienne avec les Ericacées. Dans les environnements pauvre en nutriments et riche en métaux lourdes où ces espèces se retrouvent la survie de la plante repose sur la dégradation de la matière organique (SOM) par les champignons éricoïdes qui confèrent aussi une importante tolérance aux contaminants métalliques.
- Les champignons symbiotiques et pathogènes qui interagissent avec les plantes utilisent des effecteurs pour manipuler le métabolisme de la plante afin de pouvoir coloniser les tissus végétaux. Des petites protéines sécrétées (SSPs) ont été identifiées comme effecteurs fongiques chez des espèces ectomycorhiziennes (ECM) et endomycorhiziennes à arbuscule (AM), mais la présence des SSPs jouant le rôle d'effecteurs chez les ERM était inconnue.
- La croissance des plantes et leur développement peut être influencé par des microorganismes mutualistes et non-mutualistes. Nous avons étudié la capacité du champignon ERM *Oidiodendron maius* et d'autres champignons à influencer la croissance et le développement de la plante non-hôte *Arabidopsis thaliana*.

### **Objectifs —**

- Caractériser les mécanismes à la base de la phase symbiotique mais aussi de la dégradation de la matière organique pour mieux comprendre comment fonctionne la symbiose ERM et son impact sur le cycle du C.
- Identifier grâce à la transcriptomique des SSPs pouvant intervenir dans le dialogue entre le champignon ERM et la plante hôte.
- Certains mécanismes de tolérance aux métaux lourdes des ERM ont été identifiés, mais les mécanismes moléculaires et cellulaires qui aide la plante à résister à ce stress restent encore inconnues. Nous avons étudié cet aspect dans l'association symbiotique ERM entre le champignon éricoïde tolérant aux métaux *O. maius* et la plante hôte *Vaccinium myrtillus*.
- Étudier l'effet des champignons ERM et d'autres champignons sur le développement et la croissance de la plante non-hôte *Arabidopsis thaliana*.

### **Démarche —**

- Nous avons analysé les génomes des champignons ERM *Meliniomyces bicolor*, *M. variabilis*, *O. maius* et *Rhizoscyphus ericae* en comparant leurs répertoires de gènes avec ceux des champignons avec différents stratégies de vie (mycorhiziens, endophytes, saprotrophes, pathogènes). Nous avons aussi identifié des gènes impliqués dans la relation symbiotique en analysant les données de transcriptomique.
- Nous avons analysé par RNAseq le transcriptome d'*O. maius* Zn lorsque de sa croissance seul ou en interaction avec sa plante hôte *V. myrtillus* sur milieu de contrôle ou additionné du Cd.
- Nous avons étudié l'effet des composés solubles et volatiles produit par *O. maius* sur la plante non-hôte *A. thaliana* en mettant en place plusieurs setups expérimentales dans des boîtes de Petri non-compartmentées ou compartmentées.

### **Résultats marquants —**

- Les champignons ERM ont un contenu en enzymes dégradant les polysaccharides, en lipases, en protéases et en enzymes impliqués dans le métabolisme secondaire plus similaire aux champignons saprotrophes et pathogènes qu'aux ECM. Parmi les gènes surexprimés pendant la symbiose nous avons retrouvé des gènes codant pour des enzymes dégradant la paroi cellulaire (CWDE), des lipases, des protéases, des transporteurs et des SSPs (MiSSPs).
- OmSSP1 est la MiSSP d'*O. maius* la plus fortement surexprimés pendant la symbiose, elle présente des caractéristiques communes avec les hydrophobines fongiques même si le motif Pfam caractéristique des hydrophobines est absent. Un alignement de séquences la place parmi les hydrophobines de Classe 1 alors qu'une analyse bioinformatique suggère qu'elle appartiendrait à une nouvelle classe d'hydrophobines. La présence d'un peptide signal prédit et un test basé sur la levure montrent que OmSSP1 est sécrétée pendant la symbiose. Les mutants nuls d'OmSSP1 ont montré une capacité réduite à former des mycorhizes éricoïdes avec des racines de *Vaccinium myrtillus*, suggérant un rôle d'effecteurs pour OmSSP1 dans l'interaction mycorhizienne éricoïde.
- Les racines de plantes non mycorhizées accumulent plus de Cd que les plantes mycorhizées. La teneur plus élevée en Cd dans les racines non mycorhizées reflète l'abondance de transcrits codant pour des protéines liées au stress, telles que les HSP. L'analyse transcriptomique montre que des transporteurs de métaux sont surexprimés chez les plantes mycorhizées, ce mécanisme pourrait être responsable de la teneur réduite en Cd des plantes mycorhizées exposées à ce métal.
- Le champignon ERM *O. maius* a favorisé la croissance de la plante non hôte *A. thaliana* dans toutes les setups expérimentales. Un phénotype particulier de racine, caractérisé par un raccourcissement de la racine primaire et par une augmentation de la longueur et du nombre des racines latérales, a été observé chez *A. thaliana* dans les boîtes non-compartmentées, suggérant que des molécules diffusibles solubles pourraient être responsables de cette morphologie racinaire.

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

- Le répertoire de gènes des champignons ERM révèle une capacité à mener un double mode de vie saprotrophe et biotrophe. Cela pourrait indiquer une transition incomplète du saprotrophisme vers la symbiose, ou, alternativement, une stratégie de vie versatile similaire aux champignons endophytes.
- Notre étude démontre pour la première fois l'importance des MiSSPs dans la symbiose ERM. La particularité de l'interaction champignon/plante dans la symbiose ERM et les caractéristiques distinctives d'OmSSP1 par rapport aux hydrophobines de Classe I typiques, suggèrent des fonctions spécifiques à la symbiose ERM.
- La faible proportion de gènes de réponse au stress régulés positivement dans les racines mycorhizées exposées au Cd peut être due à la teneur en Cd plus faible mesurée dans les racines mycorhizées et au fait que le métabolisme antioxydant du GSH est activé dans les racines des plantes par la symbiose. Les données d'expression ont également mis en évidence comme certains transporteurs de métaux, impliqués soit dans l'absorption ou dans l'efflux de métal, sont régulés chez la plante et il pourrait être responsables de la teneur réduite en Cd observée en particulier dans les racines mycorhizées.

- *A. thaliana* est devenu une espèce modèle pour étudier les interactions hôte et non-hôte *in vitro*. Plusieurs champignons ont déjà montré une capacité d'améliorer la croissance d'*A. thaliana in vitro*. Nos résultats montrent que les champignons ERM et d'autres champignons mycorrhiziens et non mycorrhiziens améliore aussi la croissance de cette plante. *O. maius*, ainsi que la moitié environ des autres champignons testés, ont induit chez *A. thaliana* un phénotype de racine particulier, probablement causé par des composés fongiques solubles diffusibles. Bien que la nature de ces composés fongiques soit encore inconnue, l'incapacité d'un mutant d'*O. maius*, altéré dans son métabolisme de l'azote, à induire ce phénotype racinaire devrait nous aider à élucider les mécanismes impliqués

#### Perspectives —

- Etudier la localisation cellulaire d'OmSSP1 pour comprendre son rôle
- Etudier la localisation et le rôle des transporteurs de la plante surexprimés en présence de Cd lors de la symbiose
- Etudier la nature des molécules solubles responsable du développement racinaire particulier observé chez *A. thaliana* cultivée avec certaines champignons

#### Valorisation —

##### Stage Master 2:

Héma Fritz (Université-Paris-Est-Créteil - Val de Marne). Effets de l'interaction du champignon endomycorhizien éricoïde *Oidiodendron maius* avec plantes hôtes et non-hôtes. 10 février – 8 août 2014

##### Période de stage pendant une thèse:

Le projet a permis de renforcer les liens entre l'UMR laM et l'Université de Turin par l'accueil de Salvatore Casarrubia (étudiant en thèse de doctorat) pendant une première période de 5 mois (10 mars – 31 juillet 2014) et une deuxième période de 4 mois (7 avril – 15 juillet 2015).

Financement d'une action liée au projet EffectER (PopGenEr: Analyse génomique de population du champignon endomycorhizien éricoïde *Oidiodendron maius* - *Phenotypic and genomic adaptation of the ericoid fungus Oidiodendron maius to heavy metals*)

Dans le cadre du projet EffectER le Labex ARBRE a financé un nouveau projet visant à l'analyse génomique de 18 souches d'*O. maius* provenant de différentes populations comme entre autres de sites pollués et non pollués. La variabilité génomique est en cours d'analyse sur l'ensemble du génome et ciblée sur les SSPs, CAZymes et gènes potentiellement responsables de la tolérance aux métaux lourds de certaines souches. Ce projet de génomique des populations produira de nouvelles informations sur l'évolution et l'adaptation des champignons mycorrhiziens aux stress environnementaux et à la symbiose. Le projet a financé le séjour de Stefania Daghino de l'Université de Turin qui a travaillé au sein de l'UMR1136-IAM pendant la période mai-juin 2015.

##### Publications liées au projet :

- Casarrubia S., Sapienza S., Fritz H., Daghino S., Rosenkranz M., Schnitzler J-P., Martin F., Perotto S., Martino E. (2016). Ecologically different fungi affect *Arabidopsis* development: contribution of soluble and volatile compounds. *PLoS ONE* 11(12): e0168236. doi:10.1371/journal.pone.0168236.
- Casarrubia S, Daghino S, Kohler A, Morin E, Khouja H-R, Daguerre Y, Veneault-Fourrey C, Martin FM, Perotto S, Martino E. (2018). The hydrophobin-like OmSSP1 may be an effector in the ericoid mycorrhizal symbiosis. *Frontiers in Plant Science*, 9, 546.
- Martino E., Morin E, Grelet G-A, Kuo A, Kohler A, Daghino S, Barry KW, Cichocki N, Clum A, Dockter RB, Hainaut M, Kuo RC, LaButti K, Lindahl BD, Lindquist EA, Lipzen A, Khouja H-K, Magnuson J, Murat C, Ohm RA, Singer SW, Spatafora JW, Wang M, Veneault-Fourrey C, Henrissat B, Grigoriev IV, Martin FM, Perotto S. 2018. Comparative genomics and transcriptomics depict ericoid mycorrhizal fungi as versatile saprotrophs and plant mutualists. *New Phytologist*, 217, 1213–1229.
- Casarrubia S, Martino E, Daghino S, Kohler A, Morin E, Khouja H-R, Murat C, Barry KW, Lindquist EA, Martin FM and Perotto S. 2020. Modulation of plant and fungal gene expression upon Cd exposure and symbiosis in ericoid mycorrhizal *Vaccinium myrtillus*. *Frontiers in Microbiology* 11, 341. doi: 10.3389/fmicb.2020.00341

##### Présentations orales liées au projet :

- 2017 - Martino E., Morin E, Grelet GA, Kohler A, Daghino S, Murat C, Henrissat B, Grigoriev IV, Martin F, Perotto S. Comparative genomics and transcriptomics for understanding ericoid mycorrhizal fungi ecology. 9th International Conference on Mycorrhiza, ICOM9, Prague, July 30 - August 4, 2017
- 2017 - Kohler A., Martino E., Morin E., Grelet G., Daghino S., Kuo A., Grigoriev I., Martin F., Perotto S. Comparative genomics and transcriptomics depict ericoid mycorrhizal fungi as versatile saprotrophs and plant mutualists. *JGI User Meeting*, Walnut Creek, CA, USA. March 20-23

- 2016 - Daghino S., Murat C., De Mita S., Martino E., Martin F., Perotto S. Phenotypic and genomic adaptation of the ericoid fungus *Oidiodendron maius* to heavy metals. *13<sup>th</sup> European Conference on Fungal Genetics*, Paris (France), April 4-6, 2016
- 2014 - Martino E., Khouja H-R, Casarrubia S, Daghino S, Kohler A, Veneault-Fourrey C, Morin E, Murat C, Grelet G, Martin F, Perotto S. Peculiarities of ericoid mycorrhizal fungi. *4<sup>th</sup> Mycorrhizal Genomics Initiative Workshop (MGIW4)*, Sevilla (Spain), March 27, 2014

*Posters liées au projet :*

- 2017 - Casarrubia S, Daghino S, Kohler A, Morin E, Daguerre Y, Veneault-Fourrey C, Martin F, Perotto S, Martino E. The small secreted protein OmSSP1 is up-regulated in ericoid mycorrhiza and is involved in symbiosis. *9th International Conference on Mycorrhiza, ICOM9*, Prague, July 30 - August 4, 2017.
- 2016 - Martino E., Grelet G., Morin E., Kohler A., Daghino S., Henrissat B., Kuo A., Grigoriev I., Martin F., Perotto S. New insights from genome and transcriptome analyses of four ericoid mycorrhizal fungi. *13<sup>th</sup> European Conference on Fungal Genetics*, Paris (France), April 4-6
- 2016 - Casarrubia S., Sapienza S., Fritz H., Daghino S., Rosenkranz M., Schnitzler J-P., Martin F., Perotto S., Martino E. Fungi with different ecological strategies affect *Arabidopsis* development *in vitro*: contribution of some soluble and volatile compounds. *111<sup>o</sup> Congresso della Società Botanica Italiana (III International Plant Science Conference - IPSC)* Roma, Tor Vergata, 21-23 September
- 2015 - Martino E., Daghino S., Grelet G., Kohler A., Morin E., Casarrubia S., Veneault-Fourrey C., Henrissat B., Kuo A., Grigoriev I., Martin F., Perotto S. Ericoid mycorrhizal fungi: saprotrophs or symbionts? *2<sup>nd</sup> International Molecular Mycorrhiza Meeting (IMMM 2015)*, Cambridge (UK), September 3-4
- 2015 - Martino E., Kuo A., Grelet G., Daghino S., Kohler A., Morin E., Murat C., Casarrubia S., Khouja H-R., Henrissat B., Veneault-Fourrey C., Grigoriev I., Perotto S., Martin F. Comparative genomics of Leotiomycetes suggests a high saprotrophic potential irrespective of fungal ecological strategies. *28<sup>th</sup> Fungal Genetics Conference*, Pacific Grove, CA (USA), March 17-22
- 2015 - Casarrubia S., Martino E., Daghino S., Kohler A., Veneault-Fourrey C., Daguerre Y., Martin F., Perotto S. Looking for symbiosis-related effector proteins in the ericoid endomycorrhizal fungus *Oidiodendron maius*. *36<sup>th</sup> New Phytologist Symposium - The Cell biology at the plant-microbe interface*. Munich (Germany), 29 November – 1 December
- 2014 - Casarrubia S, Fritz H, Martino E., Daghino S, Kohler A, Veneault-Fourrey C, Martin F, Perotto S. Looking for effector symbiosis-related proteins in the ericoid endomycorrhizal fungus *Oidiodendron maius*. *Max-Planck-ARBRE inter-departmental workshop on plant-fungus interactions*, Nancy (France), November 18-19