

TITRE DU PROJET : Etude des mécanismes de régulation de l'immunité par l'analyse de récepteurs LysM-RLK chez la vigne

Renseignements administratifs sur la direction de thèse

Directeur de thèse HDR :

Nom : **LEBORGNE-CASTEL**

Prénom : **Nathalie**

- nom et label de l'unité de recherche (ainsi que l'équipe interne s'il y a lieu) : **UMR 1347 Agroécologie, Pôle IPM, groupe « Immunité de la vigne : mécanismes et stimulation »**

- localisation :

INRAE Dijon Bourgogne-Franche-Comté 17 Rue Sully, 21000 Dijon

- adresse courriel du contact scientifique :

nathalie.leborgne-castel@u-bourgogne.fr ou nathalie.leborgne-castel@inrae.fr

Descriptif du projet de thèse

Contexte de la thèse

La vigne est la cible de **nombreuses maladies cryptogamiques**, telles la pourriture grise (*Botrytis cinerea*), le mildiou (*Plasmopara viticola*) ou l'oïdium (*Erysiphe necator*), entraînant une baisse de la qualité et de la productivité. L'utilisation de traitements phytosanitaires, à haut risque pour l'environnement et la santé humaine, est donc largement répandue pour maintenir la rentabilité des vignobles. Dans un contexte d'une agriculture plus durable limitant l'utilisation de tels intrants de synthèse, la compréhension de la régulation de **l'immunité naturelle** des végétaux est essentielle pour envisager l'obtention de plantes plus **tolérantes aux maladies**.

Lors des interactions entre les plantes et les agents pathogènes, des signaux dérivés de microorganismes (Microbe-Associated Molecular Patterns, MAMPs) ou de la plante attaquée (Damage-Associated Molecular Patterns, DAMPs) sont reconnus par des récepteurs localisés à la membrane plasmique des cellules végétales (Pattern Recognition Receptors, PRRs). Cette perception est d'importance majeure pour initier des réponses appropriées des plantes conduisant à l'immunité végétale (Héloir et al. 2019, *Front Plant Sci.* 10:1117).

Il existe différents types de récepteurs dont les LysM-RLK (Lysin Motif Receptor-Like Kinases) qui chez de nombreuses espèces végétales jouent un rôle dans les interactions entre plantes et microorganismes pathogènes ou mutualistes (Buendia et al. 2018, *Front Plant Sci.* 9:1531). A partir de métadonnées de vigne, notre équipe a identifié 16 gènes codant des récepteurs LysM-RLK, nommés VvLYK. Parmi ces derniers, VvLYK1-1, VvLYK1-2, VvLYK4-2 et VvLYK5-1 sont impliqués dans l'activation des réponses immunitaires sous l'effet de chito-oligosaccharides présents dans la paroi des champignons (Brulé et al. 2019, *Plant Biotechnol J* 17, 812–825 ; Roudaire et al. 2023, *Front Plant Sci* 14:113078, thèse Roudaire 2023). A l'inverse, VvLYK6 est impliqué dans l'inhibition des réactions de défense (Villette et al en préparation pour *New Phytol.*). D'autres récepteurs, tel VvLYK3-1, n'ont pas un rôle encore bien défini.

Les récepteurs LysM-RLK activent les réponses cellulaires après perception de ligands (oligosaccharides ; chito-oligosaccharides) et fonctionnent en hétéro-complexes pour déclencher la signalisation, comme démontré en présence de chito-oligosaccharides chez *Arabidopsis* pour AtCERK1 et AtLYK5 (Cao et al. 2014, *Elife* 3: 03766), et leurs orthologues chez la

vigne VvLYK1-1 et VvLYK5-1 (Roudaire et al. 2023, *Front Plant Sci* 14:1130782). Chez le riz, OsCERK1 peut à la fois interagir avec des chito-oligosaccharides (Miya et al. 2007, *PNAS* 4 :19613-18) et avec des oligosaccharides de la paroi végétale (Yang et al. 2021, *Nat Commun* 12, :2178). De plus, OsCERK1 peut interagir avec différents co-récepteurs pour activer ou réprimer les réactions de défense en fonction du ligand (Akamatsu et al. 2016, *Curr Genomics* 17 :297–307 ; Zhang et al. 2021, *PNAS* 118(16):e2023738118). Cette multiplicité de ligands ou de partenaires protéiques d'interaction suggère une régulation fine de ces récepteurs.

Les récepteurs d'immunité sont adressés *via* l'exocytose à la membrane plasmique par le système endomembranaire. De plus, l'internalisation à partir de la membrane plasmique vers des compartiments endocytiques peut participer à la fois à leur turnover et à la signalisation, contribuant à la désensibilisation des cellules végétales vis-à-vis de MAMP (Leborgne-Castel & Bouhidel 2014, *Front Plant Sci* 5:735). Chez Arabidopsis, il a été observé qu'après reconnaissance de chito-oligosaccharides par le complexe AtCERK1-AtLYK5, seul AtLYK5 est internalisé (Erwig et al. 2017, *New Phytol* 215(1):382-396). Ce changement d'abondance de récepteurs à la membrane plasmique par un turnover différentiel entre partenaires du complexe pourrait être également un moyen de régulation de la réponse immunitaire, car AtCERK1, restant à la membrane, peut interagir avec d'autres ligands et/ou d'autres co-récepteurs inhibant l'immunité.

Objectifs de la thèse

Le projet vise une meilleure compréhension **des mécanismes cellulaires et moléculaires mis en place pour moduler les réactions de défense par certains récepteurs de la famille LysM-RLK chez la vigne.**

Dans ce projet de thèse nous proposons d'aborder sous un angle original la **régulation de récepteurs VvLYK** (tels VvLYK3-1 et VvLY6) impliqués potentiellement dans l'inhibition de l'immunité dans un contexte de pathogénicité.

Dans un premier temps, il sera nécessaire d'augmenter le niveau de connaissances de VvLYK3-1, pour lequel une analyse transcriptomique a montré une diminution de son expression lors d'une infection par *Botrytis cinerea* (thèse T. Roudaire). Chez Arabidopsis les mutants *lyk3* sont plus résistants à ce champignon (Paparella et al. 2014, *Plant Physiol* 165 :262–276), appuyant l'hypothèse du rôle de ce récepteur dans l'inhibition des défenses. Une **approche de génomique fonctionnelle** chez la vigne, par édition CRISPR-Cas9, sera menée puisque cette technologie est maintenant maîtrisée au laboratoire (Villette et al., 2024 *J. Plant Methods*, 20:45). De plus, un étudiant de M2, qui vient de rejoindre l'équipe, initiera ce travail d'édition génomique pour VvLYK3-1. Chez ces plantes de vigne éditées, les **réponses immunitaires** [*e.g* phosphorylation des MAPK, expression gènes de défense et synthèse de métabolites (phytoalexines, phytohormones)], déclenchées par divers ligands ainsi que le degré de résistance à des pathogènes seront évalués en comparaison avec les plants sauvages.

Dans un second temps, une étude sera menée pour comprendre la **régulation subcellulaire** des récepteurs candidats (VvLYK6 et VvLYK3-1). Trois hypothèses seront donc explorées :

- 1) Existe-il une compétition pour la formation de différents hétéro-complexes impliquant le co-récepteur VvLYK1-1 pour activer ou inhiber les défenses ?
- 2) Existe-il une spécificité ou une compétition pour les ligands pour un récepteur donné régulant les défenses ?
- 3) La localisation spatio-temporelle des récepteurs seuls ou en complexe *via* le trafic endomembranaire (exocytose/endocytose) évolue-t-elle dans le temps suite au contact avec un ligand donné, et régule-t-elle la signalisation de défense ?

Le projet s'appuiera sur des **données du laboratoire** (projet Plant2pro « VitiLYKs » 2020-2023, thèse de T. Roudaire soutenue en 2023) et utilisera des **méthodologies et outils disponibles ou en cours de création** (cellules ou plants de vigne édités par CRISPR-Cas9 ou exprimant des récepteurs couplés à des protéines fluorescentes et des ligands biotinylés). Il utilisera également des **approches de microscopie innovantes telle la microscopie corrélative** (replaçant un événement observé en microscopie de fluorescence dans un contexte ultra-structural en microscopie électronique) en cours de développement (DimaCell, Dijon).

Ces travaux devraient **enrichir le socle cognitif des voies de signalisation** induisant les réactions de défense à des stress biotiques et la régulation de ces processus à l'échelle cellulaire et tissulaire. Les données attendues aideront à mieux i) **caractériser les récepteurs** ayant une activité inhibitrice dans l'immunité de la vigne et ii) **identifier des mécanismes de régulation originaux**, susceptibles d'être ciblés dans des stratégies d'amélioration pour permettre à terme l'obtention de **lignées plus tolérantes** aux pathogènes fongiques.

- Connaissances et compétences requises

Biologie cellulaire et moléculaire et les interactions plantes-microorganismes.

Bases de physiologie végétale. Notions de techniques de microscopie seraient un avantage.

Résumé en français et anglais

Résumé français

Dans un contexte d'une agriculture plus durable limitant l'utilisation d'intrants phytosanitaires, la compréhension de la régulation de l'immunité naturelle des végétaux est essentielle. Lors d'interactions entre plantes et microorganismes pathogènes, la perception de molécules engendre des réponses de défense végétales. Cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires de reconnaissance de ces molécules par des récepteurs membranaires des cellules végétales et la transduction du signal en aval ne sont pas toujours bien appréhendés. Le projet vise à mieux décrire ces mécanismes chez la vigne (*Vitis vinifera*) par l'étude de récepteurs de l'immunité de la famille VvLYK, dont certains joueraient un rôle dans l'inhibition de défense dans un contexte de pathogénicité.

Des plantes éditées pour des gènes candidats codant des récepteurs inhibiteurs de l'immunité seront phénotypées tant pour les réponses immunitaires que la tolérance à des pathogènes. La reconnaissance de ligands par des VvLYK candidats sera ensuite analysée afin de déterminer la spécificité et/ou la généricité de ces ligands. Les récepteurs pouvant agir comme activateur ou inhibiteur en fonction de partenaires protéiques et/ou des ligands associés, la formation d'hétéro-complexes de ces récepteurs candidats ainsi que la localisation subcellulaire spatio-temporelle de chacun d'entre eux, en présence ou non de ligands seront étudiées. Ceci pourra déterminer des stratégies originales des cellules végétales pour réguler finement la transduction de signaux et la réponse immunitaire. L'objectif finalisé de ce projet est d'améliorer la tolérance de la vigne aux maladies cryptogamiques.

Résumé anglais

In a context of sustainable agriculture that limits the use of phytosanitary inputs, understanding the regulation of natural immunity in plants is essential. During plant-pathogen interactions, the perception of molecules triggers plant defence responses. However, the cellular and molecular mechanisms by which these molecules are recognised by membrane receptors of plant cells and the downstream signal transduction are not always well understood. The project aims to better decipher these mechanisms in grapevine (*Vitis*

vinifera) by studying immune receptors of the VvLYK family, with a particular focus on some of which have a potential role as inhibitors of defence reactions.

Plants edited for candidate immune receptor genes will be phenotyped for both immune responses and tolerance to pathogens. Ligand recognition by candidate VvLYKs will be then studied to determine the specificity and/or genericity of these ligands. Since receptors can act as activators or inhibitors depending on protein partners and/or associated ligands, the formation of heteromeric complexes of these candidate receptors will be studied as well as the spatiotemporal subcellular localisation of each of them, in the presence or absence of ligands. This can determine original strategies for plant cells to finely regulate signal transduction and immune responses. The ultimate aim of this project is to improve grapevine tolerance to fungal diseases.

Mots clés :

Inhibition de l'immunité, ligands, MAMP/DAMP, perception, récepteurs, vigne