



# Mécanismes moléculaires du fonctionnement de complexes de récepteurs immunitaires de plantes

Spécialité BIDAP - Biologie, Interactions, Diversité Adaptative des Plantes

Ecole Doctorale [GAIA - Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau](#)

Titre  Mécanismes moléculaires du fonctionnement de complexes de récepteurs immunitaires de plantes


Titre  Molecular mechanisms of resistance signaling by cytoplasmic immune receptor complexes in plants.


Directeur de thèse [M. Thomas KROJ](#) - Tel : 04 99 62 48 62

Encadrement L'encadrement et la direction de la thèse seront assurés par Thomas Kroj (DR2, INRA) qui coordonne au sein de l'équipe ICAP (interactions céréales-agents pathogènes) de BGPI le programme « Récepteurs immunitaires de type NLR ». T. Kroj a encadré de nombreux étudiants (10 étudiants L3, M1, M2) et trois thésards. L'équipe ICAP compte une quinzaine de personnes dont 7 permanents (deux chercheurs INRA, une enseignante-chercheur, une ingénieure et trois techniciennes). Le thésard travaillera en étroite collaborations avec tous ces personnes et notamment les 3 personnes directement impliquées dans le même programme. Le candidat recevra une formation approfondie dans des techniques de pointe en biochimie des protéines, biologie moléculaire végétale et phytopathologie moléculaire et sera, quand nécessaire, aidé par le personnel technique de l'équipe pour la réalisation de ces expériences. Il participera à des conférences scientifiques nationales et internationales pour compléter ses connaissances sur l'état de l'art en biologie végétale et phytopathologie moléculaire. Un séjour court dans au moins un autre laboratoire européen sera organisé pour apprendre de nouvelles approches, pour permettre au candidat de faire l'expérience d'un autre environnement scientifique et à agrandir son réseau professionnel.

Contact Thomas KROJ [thomas.kroj@inra.fr](mailto:thomas.kroj@inra.fr) - Tel : 0499624862

Unité de recherche [BGPI - Biologie et Génétique des Interactions Plante-Parasite UMR 385](#) - Tel : 04 99 62 48 50


Mots clés  Immunité des plantes  
agents pathogènes fongiques  
récepteur immunitaire  
effecteur  
signalisation  
gène de résistance

Mots clés  Plant immunity  
phytopathogenic fungus  
resistance  
immune receptor  
effector  
resistance gene


Formation en Biochimie, Biologie Moléculaire, Phytopathologie ou Biologie

## Végétale

Profil candidat 

Profil candidat  Training in biochemistry, molecular biology, phytopathology or plant biology

Description de la problématique de recherche

Les protéines NLRs caractérisés par un domaine de liaison aux nucléotides et un domaine de répétitions riches en leucines sont des récepteurs importants du système immunitaire des plantes [1]. Les gènes correspondants représentent la classe principale des gènes R utilisés dans l'amélioration des  plantes pour la résistance aux maladies. Ces récepteurs NLRs agissent en reconnaissant des facteurs de virulence sécrétée par des agents pathogènes (effecteurs). Ils sont subdivisés en fonction de leur domaine de signalisation N-terminal : CNLS (la seule classe de NLR présents dans les céréales), qui possèdent un domaine coiled-coil (CC) et TNLs qui possèdent un domaine Toll-interleukine- 1 (TIR).


Les NLRs sont cruciales pour la résistance des plantes mais leur mode d'action est encore mal compris. Un nombre croissant de résistances médiées par des paires de deux protéines NLR différentes a été décrit au cours des dernières années. Les interactions d'hétéro paires de CNLS, qui sont les seuls NLRs des céréales, sont mal comprises. Ils n'ont été étudiés que dans le cas de la paire de NLRs RGA4-RGA5 du riz qui reconnaît les effecteurs AVR-Pia et AVR1-CO39 du champignon *Magnaporthe oryzae*, agent causal de la maladie de la pyriculariose du riz [3-5].

Notre travail sur RGA4-RGA5 a conduit à l'élaboration d'un modèle de fonctionnement pour l'interaction RGA4-RGA5 où les fonctions de reconnaissance et de signalisation sont partagées entre les deux partenaires de l'hétéro-paire [3-5, 9]. RGA5 agit comme un récepteur qui lie directement des effecteurs alors que RGA4 agit comme une protéine de signalisation constitutivement active et responsable de l'activation de la résistance. En l'absence d'agent pathogène, RGA5 réprime l'activité de RGA4. Lors de la liaison de l'effecteur AVR-Pia ou AVR1-CO39, RGA5 perd cette activité de répresseur et RGA4 déclenche la signalisation en aval.

La liaison des effecteurs par RGA5 commence à être comprise puisqu'un domaine de liaison des effecteurs nommé domaine RATX1 a été identifié et la partie d'AVR-Pia impliquée dans la liaison de ce domaine a été délimitée. En plus, d'autres parties de RGA5, en dehors du domaine RATX1 semblent impliquées dans la liaison d'AVR-Pia et AVR1-CO39. Par contre, les bases

moléculaires des interactions fonctionnelles entre RGA4-RGA5 ne sont pas comprises, mais il semble que des homo- et hétéro-complexes de RGA4 et RGA5 jouent un rôle important. Nous avons ainsi montré que les protéines RGA4 et RGA5 pleine longueur ainsi que les domaines CC isolées forment des homo et hétéro-complexes.

Dans la thèse, les mécanismes moléculaires de la reconnaissance des effecteurs AVR-Pia et AVR1-CO39 par RGA4/RGA5 ainsi que de l'interaction entre ces deux NLRs dans l'activation de la résistance seront étudiés. Par ailleurs, il sera vérifié dans quelle mesure le mode de fonction du couple RGA4/RGA5 est générique et régit également le fonctionnement d'autres paires de NLRs.

Thesis detailed overview  The most important class of resistance proteins are NLRs that are characterized by nucleotide-binding and leucine-rich repeat domains. NLR-coding genes are the main class of R genes employed in resistance breeding and their innovative, knowledge-based use (e.g. in pyramiding or variety mixture strategies) is a central element in sustainable crop protection. NLR proteins act as immune receptors and recognize pathogen-secreted virulence factors (effectors) termed avirulence proteins (AVRs)[1]. They are further subdivided according to their N-terminal signalling domain: CNLs, the only class of NLRs present in cereals, harbour a coiled-coil (CC) domain and TNLs possess a Toll-Interleukin-1 (TIR) domain.

NLRs are crucial for plant resistance but their molecular mode of action is still poorly understood. An increasing number of resistances mediated by pairs of distinct NLR proteins has been described over the last years. The recent description of TIR domain structures and interactions in the *Arabidopsis thaliana* TNL hetero-pair RRS1-RPS4 was a major breakthrough and allowed the development of the first model for TNL hetero-pair interactions [2]. Hetero-pair interactions in CNLs, the only NLRs of cereals, are poorly defined and have only been investigated in the case of the RGA4-RGA5 pair from rice that recognizes the effectors AVR-Pia and AVR1-CO39 from *Magnaporthe oryzae* [3–5].

Our investigation of the RGA4-RGA5 hetero-pair led to the development of a sharing model for RGA4-RGA5 interaction where R protein functions are shared between the two partners of the hetero-pair[3–5, 9]. RGA5 acts as an AVR-receptor that recognizes AVR effectors by binding them physically while RGA4 acts as a constitutively active signaling protein responsible for the activation of cell death and resistance. In the absence of pathogen, RGA5 represses RGA4 activity. Upon binding of AVR-Pia or AVR1-CO39, RGA5 loses its repressor activity and RGA4 triggers downstream signaling.

The binding of AVR effectors to RGA5 is beginning to be understood since an effector-binding domain in RGA5 named RATX1 domain has been identified and the surface of AVR-Pia that interacts with this domain has been characterized. In addition, other parts of RGA5 seem also involved in effector binding.

However, the mechanistic basis of the RGA4-RGA5 interactions that seem to involve the formation of RGA4/RGA5 complexes are badly defined. Two hybrid analysis and co-IP experiments indicate that RGA4 and RGA5 full-length proteins and isolated CC domains form homo and hetero-complexes[3,4]. For two other NLR immune receptors, MLA10 and L6, it has been shown that homo-dimerization via respectively the CC or the TIR domain is important for resistance signaling and cell death[6,7] and in the case of RPS4 and RRS1 TIR domain homo- and hetero-interactions are crucial [2]. It could thus be that RGA4 homo-complexes trigger cell death activation while RGA4-RGA5 hetero-complexes are inactive. Binding of AVR-Pia to RGA5 could disrupt hetero-complexes and allow the formation of RGA4 homo-complexes triggering cell death. An alternative model is that RGA4-RGA5 hetero-complexes switch from an inactive to an active state upon Avr-binding. Deletion analysis of RGA4 and RGA5 did not identify minimal domains sufficient for cell death activation or repression; i.e., CC domains are not sufficient. However, it appeared that the RGA4 CC domain is required for cell death activation. In addition, CC domains were identified as best candidates for mediating homo- and hetero-complexes.

During the PhD thesis, the molecular mechanisms of AVR1-CO39 and AVR-Pia effector recognition by RGA4/RGA5 and the functional interactions between these 2 NLRs will be studied. In addition, it will be investigated whether other NLR pairs in rice work like RGA4/RGA5 by a “sharing model” where one partner activates signaling while the other acts as a repressor and effector receptor.

**Thématique** Le projet de thèse traite une question fondamentale en phytopathologie moléculaire: Comment les récepteurs immunitaires de type NLR reconnaissent-elles les effecteurs et comment cet évènement de reconnaissance est-il traduit dans l'activation d'une cascade de signalisation aboutissant à la résistance de la plante. A long terme il sera possible d'exploiter ces connaissances pour la création de nouveaux récepteurs immunitaires plus performants et plus durables.

Domaine Phytopathologie, Biologie Végétale, Biochimie, Biologie Moléculaire

Objectif L'objectif du projet est d'avancer dans la compréhension des mécanismes moléculaires qui régissent la reconnaissance des effecteurs par les récepteurs immunitaires de type NLR. Ceci sera abordé dans le système expérimental que représente la double reconnaissance des effecteurs AVR-Pia et AVR1-CO39 de *Magnaporthe oryzae* par les protéines NLRs RGA4 et RGA5 du riz. Les objectifs spécifiques de la thèse seront :

- Comprendre au niveau moléculaire la liaison d'AVR1-CO39 et d'AVR-Pia à RGA5 en combinant des analyses structurales et fonctionnelles
- Etudier le complexe de récepteurs RGA4/RGA5 dans l'état inactif et actif afin de comprendre au niveau moléculaire comment RGA5 réprime l'activité de RGA4 et comment la liaison des effecteurs à RGA5 conduit à l'activation du complexe.
- Etudier si le modèle d'interaction mis en évidence pour la paire de NLRs RGA4/RGA5 (« modèle de partage des fonctions ») s'applique également à d'autres paires de NLRs chez les céréales et notamment ceux formés par des homologues de RGA4 et de RGA5.

Contexte Les plantes possèdent un système immunitaire performant qui les protège des agents pathogènes tels que les bactéries, les virus et les champignons. Or, cette résistance naturelle est constamment menacée car les agents pathogènes évoluent et parviennent à contourner les résistances et à infecter leur hôte. Ainsi, des variétés résistantes deviennent sensibles et de nouvelles maladies émergent. Trouver des résistances durables et les utiliser de manière à ce qu'elles restent efficaces à long terme est un des grands enjeux de l'agriculture du 21<sup>ème</sup> siècle, qui devra utiliser moins de pesticides tout en garantissant qualité et productivité. Pour atteindre cet objectif, il est indispensable d'approfondir nos connaissances relatives au système immunitaire végétal et aux stratégies d'attaque des agents pathogènes. Les maladies des cultures sont provoquées par des agents pathogènes très bien adaptés à leur plante hôte. Ils ont la capacité d'inactiver la réponse immunitaire végétale qui déploie pourtant un véritable arsenal de défenses contre les microorganismes, comme la production de substances antimicrobiennes ou une mort cellulaire au niveau du site d'infection pour empêcher l'envahisseur de s'installer. Les agents pathogènes ont de leur côté développé diverses stratégies d'attaque telles que l'inactivation de composés toxiques ou la coupure des voies de signalisation cellulaires. Plantes et agents pathogènes, au cours de leur histoire évolutive commune, se sont ainsi livrés à une véritable course aux armements et se retrouvent aujourd'hui face à face, chacun en possession d'un arsenal complexe et très sophistiqué. Une des armes les plus puissantes des agents pathogènes sont des protéines appelées effecteurs. Ces effecteurs sont sécrétés dans le tissu végétal au cours de l'infection et ciblent des processus cellulaires centraux tels que le

métabolisme ou la défense, afin de promouvoir l'invasion. Pour atteindre leur but, les effecteurs interagissent avec les protéines cellulaires de l'hôte pour les modifier ou les détruire. Mais les plantes peuvent contrer l'attaque grâce à des protéines de surveillance nommées protéines de résistance, qui leur permettent de reconnaître les agents pathogènes à travers l'activité des effecteurs. Cette reconnaissance peut être directe ou indirecte. Dans le premier cas, la protéine de résistance lie physiquement l'effecteur et agit donc comme son récepteur; dans le second cas, la protéine de résistance détecte la dégradation ou la modification d'une protéine végétale cible de l'effecteur.

Malgré de nombreuses recherches menées partout dans le monde dans ce domaine et en dépit des enjeux cruciaux en matière de protection des cultures qui se cachent derrière la compréhension du fonctionnement des résistances génétiques, les mécanismes moléculaires qui régissent ces reconnaissances et le lien entre reconnaissance et activation de la résistance restent encore largement inconnus. Le système d'étude constitué des NLRs RGA4 et RGA5 et des effecteurs AVR1-CO39 et AVR-Pia a été développé dans le laboratoire d'accueil au cours des 5 dernières années et est maintenant reconnu mondialement comme un des meilleurs modèles pour la dissection du mode d'action des NLRs chez les plantes.

**Méthode** Nous disposons des structures tridimensionnelles des effecteurs AVR-Pia et AVR1-CO39 et nous avons cartographié les surfaces et résidus clés pour l'interaction avec le domaine RATX1. La détermination des structures tridimensionnelles des complexes entre ces effecteurs et le domaine RATX1 de RGA5 ainsi que d'autres domaines de RGA4 et RGA5 a également été initié.

Dans la thèse, ces données structurales seront exploités pour créer des mutations dans des résidus qui semblent importants pour les interactions protéines-protéines et le bon fonctionnement des domaines. De tels mutants des effecteurs et NLRs seront analysés pour leur liaison à des NLRs et effecteurs respectivement et pour leur activité in planta (en particulier leur activité d'avirulence ou de résistance respectivement).

Pour l'analyse de la fonction des NLRs et effecteurs ainsi que leurs mutants, l'expression transitoire chez *N. benthamiana* ou dans des protoplastes de riz et la transformation stable du riz seront utilisés. Pour l'analyse des interactions protéine-protéine, des techniques in vitro utilisant des protéines recombinantes tels que l'ITC, les pull-down et la filtration sur gel couplée à MALS et des approches in vivo telles que Y2H, co-IP, électrophorèse avec gel natif et BiFC seront utilisés. Ces techniques sont établies dans le groupe et ont été utilisés avec succès pour nos études antérieures publiées dans des revues à fort impact.

Les analyses structurales sont effectuées en collaboration avec le groupe de A. Padilla au Centre de Biologie Structural (UMR CNRS-INSERM) qui est expert dans l'analyse de la structure des protéines par RMN et cristallographie et avec qui nous avons développé une collaboration à long terme.

Des constructions pour l'expression des protéines pleine longueur et des domaines individuels dans des systèmes hétérologues (*E. coli*, levures) et in planta (*N. benthamiana* et riz) sont disponibles pour AVR-Pia, AVR1-CO39, RGA4 et RGA5 ainsi que d'autres NLRs du riz. Ainsi, le doctorant sera en mesure de commencer immédiatement les études fonctionnelles avec du matériel biologique qui a déjà été généré et utilisé avec succès dans les études précédentes.

Résultat attendu

- 1) Meilleure compréhension du fonctionnement des récepteurs immunitaires de type NLR
- 2) Compréhension, au niveau moléculaire, de la formation des complexes AVR1-CO39/RGA5 et AVR-Pia/ RGA5
  - 2.1 Identification chez AVR-Pia et AVR1-CO39 des surfaces et des résidus clés qui établissent la liaison avec RGA5 et en particulier le domaine RATX1 de RGA5
  - 2.2 Identification dans le domaine RATX1 de RGA5 la surface et les résidus clé qui établissent la liaison avec AVR1-CO39 et/ou AVR-Pia.
  - 2.3 Identifications chez RGA5 des motifs autres que le domaine RATX1 impliqués dans la liaison des effecteurs.
- 3) Compréhension, au niveau moléculaire, de la formation et du mode d'action des complexes RGA4/RGA5
  - 3.1 Elucidation de la stœchiométrie des complexes RGA4/RGA5 dans l'état actif et inactif
  - 3.2 Identifications des zones de contact entre RGA4 et RGA5
    - 3.2.1 Compréhension du rôle du domaine CC dans la formation des complexes et dans l'activation de la signalisation par RGA4 ainsi que la régulation de RGA4 par RGA5.
    - 3.2.2 L'importance d'autres domaines que les CC dans la formation

des complexes et la régulation de leur activité

- 4) Vérification de l'hypothèse que d'autres paires de NLRs chez les céréales fonctionnent de la même manière que RGA4/RGA5 c'est-à-dire d'après un mode de partage des fonctions.

Référence 1. Dangl JL, Horvath DM, Staskawicz BJ. Pivoting the Plant Immune System from Dissection to Deployment. *Science* (80- ). 2013;341: 746–751. doi:10.1126/science.1236011

2. Williams SJ, Sohn KH, Wan L, Bernoux M, Sarris PF, Segonzac C, et al. Structural basis for assembly and function of a heterodimeric plant immune receptor. *Science*. 2014;344: 299–303. doi:10.1126/science.1247357

3\*. Césari S, Kanzaki H, Fujiwara T, Bernoux M, Chalvon V, Kawano Y, et al. The NB-LRR proteins RGA4 and RGA5 interact functionally and physically to confer disease resistance. *EMBO J*. 2014;33: 1941–1959. doi:10.15252/embj.201487923

4\*. Césari S, Bernoux M, Moncuquet P, Kroj T, Dodds PN. A novel conserved mechanism for plant NLR protein pairs : the “ integrated decoy ” hypothesis. *Front Plant Sci*. 2014;5: 577.

5\*. Cesari S, Thilliez G, Ribot C, Chalvon V, Michel C, Jauneau A, et al. The rice resistance protein pair RGA4/RGA5 recognizes the *Magnaporthe oryzae* effectors AVR-Pia and AVR1-CO39 by direct binding. *Plant Cell*. 2013;25: 1463–81. doi:10.1105/tpc.112.107201

6. Maekawa T, Cheng W, Spiridon LN, Töller A, Lukasik E, Saijo Y, et al. Coiled-coil domain-dependent homodimerization of intracellular barley immune receptors defines a minimal functional module for triggering cell death. *Cell Host Microbe*. 2011;9: 187–99. doi:10.1016/j.chom.2011.02.008

7. Bernoux M, Ve T, Williams S, Warren C, Hatters D, Valkov E, et al. Structural and functional analysis of a plant resistance protein TIR domain reveals interfaces for self-association, signaling, and autoregulation. *Cell Host Microbe*. Elsevier Inc.; 2011;9: 200–11. doi:10.1016/j.chom.2011.02.009

8\*. De Guillen K, Ortiz-Vallejo D, Gracy J, Fournier E, Kroj T, Padilla A. Structure Analysis Uncovers a Highly Diverse but Structurally Conserved Effector Family in Phytopathogenic Fungi. *PLOS Pathog*. 2015;11:



e1005228. doi:10.1371/journal.ppat.1005228

9\* Ortiz-Vallejo D, De Guillen K, Cesari S, Chalvon V, Gracy J, Padilla A, Kroj T Recognition of the Magnaporthe oryzae effector AVR-Pia by the decoy domain of the rice NLR immune receptor RGA5. Plant Cell. 2017 in press. DOI 10.1105/tpc.16.00435

\* publications de l'équipe sur le sujet

### **Conditions scientifiques matérielles (conditions de sécurité spécifiques) et financières du projet de recherche**

Le projet de thèse s'inscrit dans le projet ANR 'Immune Receptor' (2016 – 2019) qui assure le financement des expériences et missions du thésard.

Le thésard profitera pour la réalisation de son projet à l'UMR BGPI d'un équipement performant et moderne pour la biologie moléculaire, la génétique et la génomique des champignons et des plantes ainsi que d'installations de haute qualité pour la croissance des plantes et des tests d'infection en conditions contrôlées.

### **Ouverture Internationale**

L'équipe ICAP est focalisée sur l'étude de la pyriculariose du riz provoqué par *M. oryzae* et est mondialement reconnue comme un des meilleurs laboratoires dans ce domaine. Il a de multiples collaborations internationales (par exemple Japon IBC, Australie CSIRO, Royaume Uni JIC et TSL et Philippines-IRRI) et a coordonné un réseau de recherche Européen qui réunit plus de 200 scientifiques dans le domaine de la phytopathologie (Sustain COST action FA1208). Le candidat ne recevra pas seulement une formation approfondie dans des techniques de pointe en biochimie des protéines, biologie moléculaire végétale et phytopathologie moléculaire mais participera aussi à des conférences scientifiques nationales et internationales pour compléter ses connaissances sur l'état de l'art en biologie végétale et phytopathologie moléculaire et effectuera un séjour court dans au moins un autre laboratoire européen pour apprendre de nouvelles approches, pour faire l'expérience d'un autre environnement scientifique et pour agrandir son réseau professionnel.

### **Collaborations envisagées**

Le projet est basé sur une collaboration étroite et de longue durée avec une équipe de biologistes structurales à l'UMR CBS (Montpellier, équipe d'André Padilla). Par ailleurs, il existe des collaborations sur la thématique avec les équipes de R. Terauchi (Université de Kyoto et IBC, Japon) et de P. Dodds (CSIRO, Australie) qui seront bénéfiques au projet.

**Objectifs de valorisation des travaux de recherche du doctorant : diffusion, publication et confidentialité, droit à la propriété intellectuelle,...**

Le projet n'est pas confidentiel et les résultats seront disséminés dans des conférences scientifiques et par des publications dans des revues scientifiques à comité de lecture. Au vue de l'importance de la thématique pour la protection des plantes et de l'intérêt de la communauté scientifique pour la question, il est attendu que comme dans les thèses précédentes réalisées dans l'équipe, ces publications seront dans des journaux à fort ou très fort impact (Plant Cell, PLoS Pathogens, eLife, New Phytologist, Plant Journal, ...).

Début de la thèse : 1 octobre 2017