



**Fig. Transcriptional regulation of the gene members of the 21 SSP families of interest in response to nitrate and phosphate stresses and ectomycorrhizal associations in *Populus canescens*.** Heatmaps representing the hierarchical clustering of SSP encoding genes of poplar based on their pattern of relative expression in response to nutrient stresses (nitrate starvation (LN) and phosphate (starvation) and to ectomycorrhizal associations with different ectomycorrhizal fungi (*Laccaria bicolor* (Lb), *Cenococcum geophilum* (Cg), *Pisolithus microcarpus* (Pm) and *Amanita muscaria* (Am)). For each condition: first column is an early time point and the second a later time point of collection. Framed in red: the 35 genes regulated by nitrate and ectomycorrhizal

## Poplar Small Secreted Peptides Candidates REgulating Ectomycorrhizal symbiosis during Nitrate stresses

Responsable scientifique : Clémence BONNOT (CR), UMR Interactions Arbres/Micro-organismes (IAM) 1136

Partenaires Labex : Marie-Béatrice BOGEAT-TRIBOULOT (CR, UMR SILVA) sur les WP2 et WP3 du projet  
 Annegret KOHLER (IR, UMR IAM) sur le WP3 du projet

Collaborations : Oak Ridge National Laboratory (U.S. Department of Energy ; TN, USA) et Duke University (NC, USA)

Actions thématiques concernées : WP1 (1.1 et 1.2)

### **Contexte —**

Les symbioses ectomycorhiziennes sont essentielles pour la séquestration du carbone et le cycle des nutriments dans les forêts boréales et tempérées. Elles améliorent la croissance des arbres, leur fournissant des nutriments et permettant l'augmentation de la photosynthèse en fort taux de CO<sub>2</sub> atmosphérique (Martin *et al.*, 2016; Steidinger *et al.*, 2019). Elles représentent cependant un coût carboné pour l'arbre qui leur alloue jusqu'à 20 % de ses ressources carbonées (Farrar & Jones, 2000; Hodge *et al.*, 2009; Nehls *et al.*, 2010). Pour maintenir une croissance optimale, les arbres intègrent les signaux nutritionnels environnementaux pour réguler en conséquence leurs interactions ectomycorhiziennes (Plett *et al.*, 2020). Fertilisation et pollution nutritives diminuent les populations fongiques et associations ectomycorhiziennes dans les sols forestiers, affectant croissance, santé et capacité de séquestration du carbone des arbres (Baum & Makeschin, 2000; Parrent *et al.*, 2006; Averill *et al.*, 2018). Cependant, les voies de signalisation régulant les associations ectomycorhiziennes en réponse aux stress nutritionnels sont inconnues. Chez les herbacées, de petits peptides sécrétés (SSPs) conduisent des signaux locaux et systémiques régulant leurs associations symbiotiques avec les bactéries fixatrices d'azote et les champignons mycorhiziens arbusculaires en réponses aux stress nutritifs (Bisseling & Scheres, 2014; de Bang *et al.*, 2017a; Roy & Müller, 2022). Présents chez les arbres, leur rôle dans la médiation des signaux nutritifs régulant la symbiose ectomycorhizienne est inconnu.

### **Objectifs —**

PopSCREEN a pour objectif de vérifier le rôle des SSPs dans la régulation de la symbiose ectomycorhizienne en réponse aux stress nitrate (excès ou carence) chez l'arbre modèle *Populus x canescens*.

### **Démarche —**

Pour atteindre cet objectif, PopSCREEN est conçu en trois étapes : l'identification *In silico* par analyse croisée transcriptomique et phylogénétique des SSPs transcriptionnellement et spécifiquement régulés par la carence ou l'excès de nitrate chez le peuplier ectomycorhizé ; l'évaluation *In vitro* de leurs effets sur la symbiose ectomycorhizienne entre le peuplier et le champignon *Laccaria bicolor* ; et la caractérisation de leurs spécificités, transposabilités et relations dose-effet.

### **Résultats marquants —**

- Nous avons analysé chez *P. x canescens* la phylogénie et l'expression en réponse à la mycorhization, et à la carence et à l'excès de phosphate et nitrate, de 607 gènes encodant les membres de 21 familles de SSPs connues pour réguler certaines associations symbiotiques ou être régulés par des stress nutritifs chez les plantes herbacées.
- Nous avons identifié 35 gènes à l'origine de SSPs dont l'expression semble être régulée spécifiquement par le nitrate et la symbiose ectomycorhizienne. Parmi eux, 20 encodent des peptides assez courts pour être synthétisés et pourrait être testés sur la symbiose ectomycorhizienne entre *P. X canescens* et *L. bicolor* en crible pharmacologique.
- 10 ont été clonés et 10 autres sont en cours de clonage pour vérification de leur séquence avant synthèse.
- Dans le même temps, une technique de culture fongique sur lame de microscope a été mis au point afin de permettre de caractériser rapidement et à moindre cout l'effet des peptides sélectionnés sur des paramètres fin du développement fongique.

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

Comme chez les plantes herbacées, l'ensemble des 21 familles de SSP choisies pour notre étude compte plusieurs membres régulés transcriptionnellement par la symbiose. 81% d'entre-elles comptent au moins un membre dont l'expression est régulée par le nitrate. Au total, l'expression de 6 % des gènes appartenant à ces 21 familles d'intérêts est régulée transcriptionnellement à la fois par la symbiose ectomycorhizienne et le nitrate. Ces gènes semblent de bons candidats au support des signaux inducteurs et répresseurs de la symbiose ectomycorhizienne en réponse aux stress nitrate.

### **Perspectives —**

Vérifier et caractériser *In vitro* les effets des peptides qu'ils encodent, nous permettra de sélectionner parmi eux des gènes candidats solides (activité spécifique sur la symbiose et transposable à l'interaction du peuplier avec différents champignons ectomycorhiziens) pour caractérisation fonctionnelle dans de futurs projets visant à disséquer les mécanismes moléculaires des signaux de régulation de la symbiose ectomycorhizienne en réponses aux stress nutritionnels.

### **Valorisation —**

Oral lors des rencontres du réseaux INUPRAG :

Clémence Bonnot, Alexis Chartoire, Emmanuelle Morin, Annegret Kohler, Francis Martin (2023-02-21). Do SSPs regulate ectomycorrhizal symbiosis in response to biotic and abiotic nutrient signals in trees? INUPRAG Symposium on Integrative Plant Biology 2023, Umeå, Suède. Conférence invitée. <https://hal.inrae.fr/hal-04186836>.

### **Effet levier du projet —**

L'identification de SSPs régulant la symbiose ectomycorhizienne en réponse au nitrate, et leur caractérisation fonctionnelle ultérieure, amélioreront notre compréhension des mécanismes moléculaires d'intégration des signaux nutritifs environnementaux régulant les interactions symbiotiques et la nutrition des arbres dans un environnement changeant. Ces informations sont cruciales pour comprendre et prédire les mécanismes d'adaptation et l'évolution des forêts dans le contexte du changement climatique. La découverte de SSPs régulant les interactions ectomycorhizienne ouvrira également la voie à de possible applications commerciales en fongiculture (vergers à champignons) et pépinières pour la production d'engrais biologique destiné à la mycorhization contrôlée d'arbre pour plantation forestière.