

Equipe	ECCP
Demandeur	Richard O'CONNELL
Objectif de la demande	Ultrastructural phenotype of the <i>Colletotrichum higginsianum</i> $\Delta sge1$ and $\Delta zip1$ transcription factor mutants
Contexte de la demande	Obtaining data to complete a paper describing the <i>C. higginsianum</i> $\Delta sge1$ and $\Delta zip1$ mutants Article submission planned for June 2020.
Date de la demande	11/2019
Période souhaitée	01/2020 – 06/2020
Durée prévisionnelle	6 months
Projet associé	Relevant to the ERA-CAPS 'Exosomes' project, which makes use of the $\Delta sge1$ mutant

Détails du projet (~1/2 -1 page) Ou Présentation (jusqu'à ~5 pages pptx)	Background: SGE1 and ZIP1 are global transcriptional activators of numerous pathogenicity genes in appressoria of <i>C. higginsianum</i> and are essential for pathogenicity. The $\Delta sge1$ and $\Delta zip1$ mutants never produce visible biotrophic hyphae in host epidermal cells. However, whereas the appressoria of $\Delta sge1$ induce the formation of large-diameter callose papillae with high frequency, $\Delta zip1$ appressoria induce small papillae or none at all, similar to the wild-type fungus. Project description: The ultrastructure of appressorial penetration sites of the $\Delta sge1$ and $\Delta zip1$ mutants will be compared with that of wild-type <i>C. higginsianum</i> and the non-adapted species <i>C. destructivum</i>. The project aims to answer the following questions: ➤ <i>Do appressoria of the mutants form normal penetration pores and do penetration hyphae emerge from the pores?</i> ➤ <i>Do the penetration hyphae penetrate the plant cuticle and cell wall?</i> ➤ <i>Do $\Delta sge1$ papillae have the same structure as normal papillae (e.g. multiple layers, presence of embedded plant exosomes)?</i> ➤ <i>How thick are $\Delta sge1$ papillae compared to normal papillae? (measurements from 10-15 per genotype)</i> ➤ <i>What is happening at the sharp boundaries of the large papillary haloes induced by $\Delta sge1$?</i> Methods to be used: 1. Fixation with formaldehyde/glutaraldehyde and osmium tetroxide, dehydration in organic solvents 2. Infiltration in epoxy resin, heat polymerisation of the resin 3. Cutting semi-thin and ultra-thin sections using a microtome, mounting sections on EM grids 4. Staining grids with uranyl acetate and lead citrate, and imaging with a TEM General: In addition to completing data for an article in preparation, the project will provide the Engineer with training in fixing, embedding and sectioning techniques, which will be useful in the future for other projects at BIOGER, including the antibody localization of plant and fungal components (immunofluorescence, immunogold)
---	---

Matériel/personnels prévu par l'équipe	Materials for fixing samples, resin embedding and cutting ultrathin sections will be provided by the ECCP group.
Achats à envisager	Huyen Chu will train the engineer in preparing infected Arabidopsis plants, R. O'Connell will provide training in fixation, resin embedding and ultrathin sectioning. Training in grid staining and use of the TEM will be provided by the Plateforme IMAGERIE-GIF.
Budget prévu (oui/non)	Yes

Equipement(s) plateforme BIOGER	Vacuum infiltration system, resin polymerisation oven, Leica UC7 ultramicrotome
Accès plateforme extérieur	TEM Plateforme IMAGERIE-GIF
Budget prévu (oui/non)	Fees for using the Plateforme IMAGERIE-GIF will be paid by ECCP.

Equipe	EGIP
Demandeur	MH LEBRUN, A GENISSEL
Objectif de la demande	Analyse du processus infectieux de mutants de <i>Zymoseptoria tritici</i> altérés dans leur pouvoir pathogène
Contexte de la demande	projet en cours : Caractérisation de mutants de <i>Zymoseptoria tritici</i> altérés dans leur pouvoir pathogène (mutants obtenus, une partie des souches transgéniques GFP est déjà obtenue, le reste sera construit en février 2020)
Date de la demande	19-11-2019
Période souhaitée	Toute l'année suivant disponibilité plateforme
Durée prévisionnelle	15 jours sur toute l'année
Projet associé	non

Détails du projet (~1/2 -1 page) Ou Présentation (jusqu'à ~5 pages pptx)	<i>Décrire le projet. Indiquer le titre général et détailler les techniques en imagerie/cytologie souhaitée.</i> Caractérisation du processus infectieux de mutants de <i>Zymoseptoria tritici</i> altérés dans leur pouvoir pathogène Quatre mutants de <i>Zymoseptoria tritici</i> altérés dans leur pouvoir pathogène (un mutant de délétion du gène SLT2, trois mutants d'insertion du transposon impala) ont été obtenus par l'équipe EGIP. Une partie des souches transgéniques exprimant la GFP constitutivement est déjà obtenue (3 souches sauvages, le mutant SLT2), Le reste des souches exprimant la GFP constitutivement sera construit en février 2020 (mutant impala) L'objectif du projet est d'identifier à quelle phase du processus infectieux est bloqué chaque mutant par rapport aux souches sauvage correspondantes. Deux articles en cours (mutant SLT2, mutagenèse impala) utiliseront ces données. <i>Préciser si les techniques mentionnées sont établies ou des mises au point sont nécessaires à faire.</i> Analyse du processus infectieux de souches de <i>Z. tritici</i> exprimant le GFP/RFP par Microscopie confocale (pénétration, colonisation asymptomatique, formation des pycnides, sporulation)
---	---

Matériel/personnels prévu par l'équipe	<i>Indiquer le matériel mis à disposition/achat prévu par l'équipe pour le projet</i>
---	---

Achats à envisager	<i>Zymoseptoria tritici</i> : Souches sauvages, mutants et transformants correspondant exprimant constitutivement la GFP ou la RFP
Budget prévu (oui/non)	Plantes de blé infectées par l'équipe <i>Si une personne de l'équipe va contribuer à la formation de l'ingénieur (ex. préparation de plantes infectées) ou/et participer au projet.</i> MH Lebrun, A Genissel, Post-Doc Syngenta, étudiant Master <i>Colorants/réactifs/anticorps (etc...) pour la préparation de l'échantillon déjà choisi, disponibles ou nécessité d'achat.</i>
Equipement(s) plateforme BIOGER	<i>Indiquer le ou les équipements plateforme prévu d'être utilisé</i> Microscope confocal
Accès plateforme extérieur	<i>Indiquer le ou les équipements plateforme prévu d'être utilisé, et nom/lieu de la plateforme</i>
Budget prévu (oui/non)	

Equipe	EPLM
Demandeur	V. Laval / J. Soyer, E. Gay et A. Jicquel
Objectif de la demande	<i>Evaluer la capacité de L. maculans à infecter des cotylédons et pétioles de colza en présence ou non d'un autre champignon phytopathogène</i>
Contexte de la demande	<i>Expérimentations dans le cadre des thèses d'A. Jicquel et E. Gay, et du stage de M2 de M. Gorse pour l'écriture d'un article + amélioration du suivi de l'infection sur cotylédons et tiges de colza pour l'équipe EPLM en présence ou non d'autres champignons</i>
Date de la demande	Novembre 2019
Période souhaitée	Premier semestre 2020 (début du semestre pour les expérimentation sur cotylédons et fin du semestre sur tiges)
Durée prévisionnelle	6 mois
Projet associé	Projets Ephicas, Projet Promosol Metaphor et CASDAR Atypical

Détails du projet (~1/2 -1 page) Ou Présentation (jusqu'à ~5 pages pptx)	- <i>Sur cotylédons, capacité d'infection de L maculans en présence de L. biglobosa ou A. brassicicola / ou dans le cas d'une interaction non hôte (sur Brassica carinata).</i> - <i>Sur cotylédons et pétioles, capacité d'infection d'un mutant de L. maculans ne causant plus de symptômes sur tige.</i>
---	--

Matériel/personnels prévu par l'équipe	<i>Réalisation des tests pathologiques sur cotylédons et tiges par l'équipe EPLM. A. Jicquel, E. Gay, J. Soyer / M. Gorse, N. Vignolles /V. Laval réaliseront les expérimentations avec l'aide de Kaori Sakai.</i>
Achats à envisager	<i>Une souche de L. maculans exprimant constitutivement la GFP est disponible.</i>
Budget prévu (oui/non)	
Equipement(s) plateforme BIOGER	<i>Microscope confocal, vibratome (pour les pétioles), essais de transparenisation + fixation pour les cotylédons ?</i>

Accès plateforme extérieur	<i>Indiquer le ou les équipements plateforme prévu d'être utilisé, et nom/lieu de la plateforme</i>
Budget prévu (oui/non)	

Equipe	AMAR
Demandeur	Anne-Sophie Walker
Objectif de la demande	Déterminer la cible de la molécule 4-PBA
Contexte de la demande	Nouveau projet sous réserve de financement par SPE et sous réserve de résultats préliminaires
Date de la demande	
Période souhaitée	Entre septembre 2020 et janvier 2021
Durée prévisionnelle	Indiquer le temps estimé
Projet associé	Oui demande SPE 2020 FAST&FURIOUS.

Détails du projet (~1/2 -1 page) Ou Présentation (jusqu'à ~5 pages pptx)	<i>Décrire le projet. Indiquer le titre général et détailler les techniques en imagerie/cytologie souhaitée.</i> <i>Préciser si les techniques mentionnées sont établies ou des mises au point sont nécessaires à faire.</i> La molécule 4-PBA, naturellement produite par des bactéries a une activité bactériostatique et J-L Cacas et son équipe (AgroParisTech) ont montré qu'elle possède également une activité antifongique sur plusieurs champignons phytopathogènes, notamment <i>Botrytis cinerea</i> et <i>Zymoseptoria tritici</i>. Cependant le mode d'action de la molécule 4-PBA n'est pas connu. G. Steinberg, chercheur à l'université d'Exeter (UK), et son équipe ont construits des souches de <i>Z. tritici</i> exprimant des marqueurs fluorescents (17 marqueurs différents développés) permettant de discriminer différents compartiments cellulaires et/ou organelles. En utilisant ces souches fluorescentes, ils ont ainsi mis en évidence le mode d'action de la molécule dodine (article en révision). L'objectif serait donc soit d'aller dans le laboratoire de G. Steinberg (Exeter, UK) afin de tester la molécule 4-PBA sur ces souches fluorescentes et ainsi déterminer le compartiment cible ou affecté par la molécule soit de tester ces souches directement à BIOGER. Connaître le compartiment cible ou affecté par une molécule permet de diminuer le nombre de cibles potentielles et ainsi faciliter l'identification de la ou les cibles en utilisant des approches complémentaires. Ce projet se fera sous condition de financement (demande de financement par SPE déposée, réponse vers décembre 2019). Et s'il est financé, des expériences préliminaires par les équipes de J-L Cacas, G. Steinberg voire AMAR devront être réalisées au préalable.
---	---

Matériel/personnels prévu par l'équipe	<i>Indiquer le matériel mis à disposition/achat prévu par l'équipe pour le projet : Souches de <i>Z. tritici</i> fluorescentes fournies par G. Steinberg</i>
Achats à envisager	<i>Si une personne de l'équipe va contribuer à la formation de l'ingénieur (ex. préparation de plantes infectées) ou/et participer au projet. Anaïs Laleve participera au projet</i>
Budget prévu (oui/non)	<i>Colorants/réactifs/anticorps (etc...) pour la préparation de l'échantillon déjà choisi, disponibles ou nécessité d'achat.</i>

Equipement(s) plateforme BIOGER	<i>Indiquer le ou les équipements plateforme prévu d’être utilisé : Microscope à fluorescence</i>
Accès plateforme extérieur	<i>Indiquer le ou les équipements plateforme prévu d’être utilisé, et nom/lieu de la plateforme</i>
Budget prévu (oui/non)	