

Equipe	<i>EPLM</i>
Demandeur	<i>V. Laval / J. Soyer, E. Gay et A. Jicquel</i>
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	<i>Novembre 2019</i>
Période souhaitée	<i>Premier semestre 2020 (début du semestre pour les expérimentation sur cotylédons et fin du semestre sur tiges</i>
Durée prévisionnelle	<i>6 mois</i>
Projet associé	<i>Projets Ephicas, Projet Promosol Metaphor et CASDAR Atypical</i>

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 Achats à envisager Budget prévu (oui/non)	<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> <i>Une souche de L. maculans exprimant constitutivement la GFP est disponible.</i>
Equipement(s) plateforme BIOGER	<i>Microscope confocal, vibratome (pour les pétioles), essais de transparisation + fixation pour les cotylédons ?</i>
Accès plateforme extérieur Budget prévu (oui/non)	<i>Indiquer le ou les équipements plateforme prévu d'être utilisé, et nom/lieu de la plateforme</i>

Equipe	EGIP
Demandeur	Marc-Henri LEBRUN
Objectif de la demande	Analyse cytologique des interactions entre les cultivars de blé portant le gène de résistance STB16 et les isolats avirulents de <i>Zymoseptoria tritici</i> Question: A quelle étape du cycle infectieux les isolats avirulents sont-ils bloqués ?
Contexte de la demande	L'assistance du Plateau Cytologie permettra de réaliser les expériences préliminaires de fixation, transpiration, coloration et d'observation du champignon dans les feuilles de blé infectées afin de définir le protocole optimal pour le séjour de M Battache (étudiante en thèse GDEC, projet collaboratif) à Bioger début 2021 qui réalisera les expériences finales avec l'appui d'EGIP
Date de la demande	3/11/2020
Période souhaitée	12/2020-3/2021
Durée prévisionnelle	4 mois
Projet associé	FSOV PERSIST Préserver et améliorer l'Efficacité des gènes de Résistance du blé à la Septoriose: le cas du gène <i>STb16q</i> , durée du 1-10-2018 au 31-09-2021. Thèse de M Battache (GDEC, 2018-2021)

Détails du projet	: Afin de construire des résistances durables du blé à <i>Zymoseptoria tritici</i>, il est indispensable de comprendre les mécanismes impliqués dans la reconnaissance des isolats avirulents par des cultivars portant des gènes de résistance majeurs. Suite à l'introduction récente (2012) du gène de résistance majeur <i>Stb16q</i> à large spectre en France, il est apparu en 2016 des isolats capables d'attaquer les cultivars portant ce gène (isolats virulents-STB16) qui sont en cours d'expansion. Nous exploitons cette situation biologique contemporaine en recherchant les déterminants génétiques fongiques à l'origine de ce contournement (gène d'avirulence-STB16) et en étudiant les mécanismes mis en place lors de la reconnaissance des isolats avirulents par les cultivars portant STB16. En particulier, une analyse cytologique de cette interaction est en cours de réalisation en collaboration avec l'unité GDEC de Clermont, afin d'identifier quelles sont les étapes du cycle infectieux où sont bloquées les isolats avirulents lorsqu'ils attaquent un cultivar résistant. Description du projet : L'attaque des cultivars de blé portant le gène STB16q par des isolats avirulents de <i>Z. tritici</i> conduit à une absence de symptômes visibles. Une première étude réalisée par le GDEC semble indiquer que les isolats avirulents sont incapables de pénétrer dans la feuille de blé, mais ces premières observations ne sont pas quantitatives. L'objectif du projet est de quantifier les différents événements associés à la tentative d'infection des feuilles de blé de cultivars résistant par les isolats avirulents, afin de répondre aux questions suivantes : ➤ <i>Quel est le taux de germination et de colonisation de la surface des feuilles de blé par les isolats virulents et avirulents</i> ➤ <i>Quel est le taux de pénétration des stomates des feuilles de blé par les isolats virulents et avirulents</i> ➤ <i>Est ce que les isolats avirulents sont capable de coloniser la cavité sous-stomatique</i> ➤ <i>Quel est la réaction des stomates lors de ces tentatives d'infection (fluorescence, ROS)</i> ➤ <i>Existe-t-il une réaction du blé à la tentative d'infection par accumulation de callose</i>
--------------------------	---

	Matériels et Méthodes : - Cultivars de blé possédant ou non le gène STB16, dont des lignées de blé isogéniques du cultivar Chinese spring développées par le GDEC (+/- STB16q) - -Souches transgéniques virulentes et avirulentes pour les cultivars de blé possédant STB16q exprimant constitutivement la eGFP ou la RFP construites par l'équipe EGIP (disponibles) ➤ Fixation des feuilles infectées, observation directe des hyphes en surface (souches GFP, calcofluor) : optimisation ➤ Transparisation des feuilles infectées: optimisation ➤ Coloration des hyphes dans les feuilles transparisées: essais colorants et WGA-alexa, optimisation ➤ Optimisation de la visualisation de la pénétration de Z. tritici par les stomates (souches GFP, confocal) ➤ Optimisation de la détection de la fluorescence et des ROS dans les stomates et des accumulations de callose Attendus: L'aide de la plateforme permettra d'optimiser les méthodes d'observation des hyphes infectieux de Z. tritici dans les étapes précoces de l'infection, décrites dans plusieurs articles, mais qui ne sont pas encore optimales pour des observations quantitatives. Les méthodes optimisées seront utilisées par M Battache pour quantifier les différents événements associés à chaque étape précoce (germination, colonisation de la surface, pénétration par les stomates, colonisation de la cavité sous stomatique) du cycle infectieux dans le cas de différentes interactions (virulent/avirulent vs résistant/sensible). Ces expériences seront intégrées dans un chapitre de la thèse de M. Battache sur le rôle des stomates dans la résistance contrôlée par le gène STB16.
--	--

Matériel/personnels prévu par l'équipe	Matériel biologique fourni par EGIP (souches transgéniques, feuilles infectées). Participation d'une étudiante en thèse (Melissa Battache) de l'unité INRA GDEC de Clermont (séjour prévu à Bioger fin Février 2021)
Achats à envisager	WGA-Alexa (longueur d'onde optimale à définir)
Budget prévu (oui/non)	Oui, Persist
Equipement(s) plateforme BIOGER	Leica DM5500 fluorescence microscope, Confocal BIOGER
Accès plateforme extérieur	Non
Budget prévu (oui/non)	

Equipe	ECCP
Demandeur	Richard O'CONNELL
Objectif de la demande	<i>Title</i> : Biogenesis of fungal extracellular vesicles (EVs) in <i>Colletotrichum higginsianum</i> appressoria <i>Questions</i> : Where, and at what stage of development, do EVs accumulate in appressoria ? Do they arise from multivesicular endosomes ?
Contexte de la demande	The postdoc on the project, Huyen Chu, will take 4.5 months maternity leave from 19/11/2020 until 30/3/2021. Assistance of the Plateau Cytologie is requested to cover this period. This will allow continuation of the cell biology part of the project, which is our distinctive contribution to this international collaboration.
Date de la demande	3/11/2020
Période souhaitée	19/11/2020-19/4/2021
Durée prévisionnelle	5 months
Projet associé	ERA-CAPS 'Exosomes' project (collaboration with Indiana University-USA, Danforth Plant Science Center-USA, Copenhagen University-Denmark). Began 1/12/2018, ends 30/11/2021. Assistance from the Plateau Cytologie was mentioned in the original project proposal.

Détails du projet	Background : Our previous TEM on <i>Colletotrichum</i> appressoria formed on plants showed EVs are present in the penetration pore at 10 hpi but not at 22 hpi (other time-points were not examined). We recently developed procedures to produce dense monolayers of appressoria <i>in vitro</i> (on Aclar plastic membranes) and to detach them (without disruption) for EV isolation. Project description : To optimize the yield of isolated EVs from <i>in vitro</i> appressoria, and to understand EV biogenesis, we need to know : ➤ <i>At what stage of appressorium formation are EVs most abundant in the pore ? When is the pore « open » (no cell wall present) ?</i> ➤ <i>Is EV formation associated with the fusion of multivesicular bodies (endosomes) with the fungal plasma membrane ?</i> ➤ <i>Can we detect RFP-tagged EV marker proteins in the pore using immunogold labelling ?</i> To answer these questions, it is necessary to perform a TEM time-course study of appressorium formation on Aclar. Methods to be used : ➤ Fixation with formaldehyde/glutaraldehyde and osmium tetroxide ➤ Dehydration and embedding in epoxy resin ➤ Cutting ultra-thin sections with a microtome, mounting on EM grids ➤ Staining grids and imaging by TEM General comments : The work will allow us to finalize part of our first paper on <i>Colletotrichum</i> EVs (currently in preparation with the University of Indiana team). The data will also form a major part of a second paper on the isolation and characterization of EVs from appressoria (based on Huyen's work at BIOGER). The project is technically feasible and will benefit from the many years experience of R. O'Connell in ultrastructural research (he will also help to cut sections and use the TEM). The engineer will receive in-depth training in a wide range of techniques for fixation, embedding and sectioning, which will be valuable for BIOGER scientists in the future.
--------------------------	--

Matériel/personnels prévu par l'équipe	All materials for fixing samples, resin embedding, cutting and staining ultrathin sections will be provided from the ERA-CAPS project.
Achats à envisager	Huyen Chu will train the engineer in mass-production of <i>Colletotrichum</i> appressoria <i>in vitro</i> , R. O'Connell will provide advice/training in fixation, resin embedding and ultrathin sectioning, grid staining.
Budget prévu (oui/non)	Yes, ERA-CAPS project
Equipement(s) plateforme BIOGER	Leica DM5500 fluorescence microscope, resin polymerisation oven, Leica UC7 ultramicrotome
Accès plateforme extérieur Budget prévu (oui/non)	TEM Plateforme IMAGERIE-GIF. Training in using the TEM at IMAGERIE-GIF (2 half-days, September 2020) was paid for by the ERA-CAPS project. A CNRS training course in theory and practice of TEM (4 full-days, October 2020) was paid by INRA Service de la Formation Permanente. All fees for using the Plateforme IMAGERIE-GIF will be paid from the ERA-CAPS project.