

**PROPOSITION SUJET de MASTER 2017-2018**

**TITRE** : Etude des effecteurs synthétisés par *Frankia alni* par approche de gain-de-fonction en hôte hétérologue

**Nom, Prénom du Maitre de Stage :** PUJIC Petar  
**Qualité :** IR  
**Téléphone :** 04.72.43.29.86 **E-mail :** petar.pujic@univ-lyon1.fr

**Nom, Prénom du co-encadrant éventuel :** BOUBAKRI Hasna  
**Qualité :** MCf  
**Téléphone :** 04.72.44.82.00 **E-mail :** hasna.boubakri@univ-lyon1.fr

**Laboratoire d'accueil, Responsable et équipe :** UMR5557-USC1364, Ecologie Microbienne. Responsable unité Yvan Moëgne-Loccoz. Equipe « symbiose actinorhizienne ». Responsable Equipe : Philippe Normand

**Adresse :** Université Claude Bernard Lyon I (Bât G. Mendel, 4e étage). Rue Dubois. 69622 Villeurbanne

**Nom du candidat éventuellement proposé :**

S'il n'est pas retenu, acceptez-vous un autre candidat ?

Oui - Non

**Description du sujet au verso** ⇒

## Sujet (objectif, démarche et technique, collaboration(s),...) :

**Contexte scientifique :** *Frankia* (Gram+, GC>70%) est une actinobactérie en symbiose avec des plantes dicotylédones de 8 familles d'angiospermes et 24 genres, dont l'aulne (*Alnus* sp). Cette bactérie est capable de fixer l'azote atmosphérique et de le transformer en nutriments assimilables pour la plante. En comparaison à une autre symbiose plantes-microorganismes bien connue et plus étudiée qui est celle existant entre les *Rhizobium* et les légumineuses, *Frankia* a un spectre d'hôte beaucoup plus grand. Cela rend cette symbiose attractive pour une éventuelle extension biotechnologique à des plantes économiquement intéressantes.

Un des objectifs de l'équipe est de mieux comprendre les mécanismes d'infection de *Frankia* au niveau de l'aulne en identifiant les effecteurs symbiotiques synthétisés par le partenaire microbien. Malheureusement, les difficultés de transformation génétique de *Frankia* ont grandement freiné l'utilisation des méthodes classiques de génétique (construction de mutants perte de fonction) pour étudier ce dialogue. Pour contourner ce problème, des approches protéomiques (Hammad et al. 2003; Mastronunzio et al. 2008), transcriptomiques (Alloisio et al. 2010), physiologiques (Pujic et al. 2011) ou génomiques (Normand et al. 2007) ont été menées dans l'équipe et ont permis d'identifier quelques effecteurs de cette symbiose.

Toutefois, en raison de l'absence d'un système de transformation génétique de *Frankia*, nous proposons de mener une étude fonctionnelle en travaillant par gain de fonction chez un voisin phylétique, *Streptomyces* (Gram+, GC >70%) pour lequel des outils de génie génétique existent (Raynal et al. 2006). Pour cela, nous souhaitons exprimer de manière hétérologue de grandes régions génomiques (100 kb) de *Frankia* chez *Streptomyces*. Le choix d'un hôte hétérologue phylogénétiquement proche de la bactérie étudiée permettra de réduire considérablement les problèmes d'expression des protéines (reconnaissance des régions promotrices/ARN polymérases, protéines toxiques...). Ensuite, un criblage fonctionnel sera réalisé en mettant en contact ces *Streptomyces* modifiés avec la plante (induction de racines secondaires ou de la déformation des poils racinaires, induction du système de réponse de type SYM chez la plante).

**Hypothèses :** On pose comme postulat que *Frankia* produit des effecteurs métaboliques qui induisent au niveau de la plante une cascade de signaux qui mène à la symbiose. Ceci est conforté par le fait que des analyses transcriptionnelles chez la plante confirment l'induction d'une cascade analogue à celle observée chez les légumineuses en contact avec *Rhizobium* (Hocher et al, 2011).

### Démarche expérimentale :

- 1) Une banque génomique de *Frankia* est disponible au laboratoire. Certains clones portent des gènes de *Frankia* qui sont fortement surexprimés lors du contact avec la plante (Alloisio, et al. 2010). Quelques clones portant des grandes régions génomiques de *Frankia* seront introduits dans *Streptomyces* par conjugaison.
- 2) La réponse de la plante sera ensuite analysée en évaluant i) le développement et ii) l'induction de la déformation des poils racinaires. Le niveau d'expression du système de signalisation chez la plante sera vérifié en prenant un gène clef de cette voie (*nin*) et en étudiant son niveau d'expression par qPCR.
- 3) En cas de réponse positive, les gènes candidats seront délétés puis les mutants testés au niveau fonctionnel pour confirmer leur implication dans le phénotype observé.

### Référence :

- Alloisio N., et al. 2010. "The *Frankia alni* symbiotic transcriptome." **Mol Plant Microbe Interact** 23: 593-607.
- Hammad Y. et al. 2003. A possible role for phenyl acetic acid (PAA) on *Alnus glutinosa* nodulation by *Frankia*. **Plant Soil** 254: 193-205.
- Mastronunzio JE et al. (2008). Comparative secretome analysis suggests low plant cell wall degrading capacity in *Frankia* symbionts. **BMC Genomics** 9: 47.
- Normand P. et al. 2007. Genome characteristics of facultatively symbiotic *Frankia* sp. strains reflect host range and host plant biogeography." **Genome Res** 17: 7-15.
- Pujic P. et al. (2011). "Lectin genes in the *Frankia alni* genome." *Arch Microbiol* 194(1): 47-56.
- Raynal A. et al. (2006). "Excisable cassettes: new tools for functional analysis of *Streptomyces* genomes." *Appl Environ Microbiol* 72(7): 4839-44.