



HAL
open science

Caractérisation fonctionnelle des protéines SSP1-like

Thomas Bacchetta

► **To cite this version:**

Thomas Bacchetta. Caractérisation fonctionnelle des protéines SSP1-like. Biotechnologies. 2018. hal-02010585

HAL Id: hal-02010585

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-02010585v1>

Submitted on 7 Feb 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Master BioMANE 2^{ème} année

*Biotechnologies, Microbiologie, Aliment, Nutrition,
Environnement*

Parcours Biotechnologies Microbiennes

Année Universitaire 2017/2018

*Caractérisation fonctionnelle des protéines SSP1-like :
approches biochimiques et physiologiques*

Mémoire présenté par

BACCHETTA Thomas

Stage effectué du 15 avril au 13 juillet 2018

Encadré par Mélanie Morel-Rouhier - Professeur

Remerciements

Même après avoir fait trois stages, en commencer un quatrième et arriver dans un nouvel environnement n'est jamais évident. Mais bizarrement il existe des endroits dans lesquels se sentir vite à l'aise est assez facile. Se lever tous les jours pour venir travailler dans une bonne ambiance est quelque chose à ne pas sous-estimer, et ces six mois passés au laboratoire IAM n'auraient pu mieux se passer.

Je tiens ici à remercier l'ensemble du laboratoire pour l'ambiance chaleureuse qui perdure chaque jour. Je ne peux évidemment pas (et je le regrette) m'attarder sur chacune des personnes que j'ai pu côtoyer durant ces 6 mois mais sachez juste que mes remerciements vont à chacun d'entre vous.

Merci à Nicolas pour m'avoir accompagné durant ce stage, que ce soit pour m'aider dans les manips ou pour faire en sorte que je comprenne au mieux chacun des aspects du stage et des techniques utilisées. Par la même occasion je ne peux pas ne pas remercier l'ensemble des doctorants du labo. C'est avec eux que j'ai passé le plus de temps, et il faut se l'avouer, c'est tout de même eux qui mettent chaque jour une telle ambiance et joie de vivre en ce 3^{ème} étage.

Une petite pensée aussi à Muriel, qui doit sûrement être en train de préparer du boulgour à l'heure où j'écris ces mots. Désolé de t'avoir embêté tous les jours avec ton repas..... et merci pour ton aide dans la prise de photos pour le rapport.

Enfin merci Mélanie. Alors à titre exceptionnelle je vais te tutoyer dans ces remerciements (mais uniquement dans les remerciements). Merci pour tout. Tu as réussi en six mois quelque chose que ma mère n'a jamais pu faire en 18 ans..... me faire apprécier les champignons. Quand j'ai demandé à faire ce stage, c'était vraiment un gros pari. Travailler sur des protéines et des champignons.... j'avais peur. Je partais quasiment de zéro et pour cette raison la personne proposant le stage comptais autant que le sujet. Alors certes je ne te connaissais que par le biais de quelques cours et de deux TP, mais il y a chez certaines personnes quelque chose qui fait qu'on se rend compte assez rapidement que ce sont des gens à part. Quand tu m'as dit que tu comptais proposer un sujet je n'ai pas hésité une seule seconde. Je voulais absolument apprendre à travailler sur autre chose que les bactéries, mais je ne connaissais rien en dehors des bactéries. Et donc merci d'avoir pris autant de temps pour faire en sorte que je reparte d'ici avec un maximum de bagage, et ce malgré le fait que les résultats que j'ai pu apporter n'aient pas été à la hauteur de ce que j'aurais voulu produire. Merci également de tout le temps que tu as passé sur mon rapport de stage à m'expliquer les raisons de chacune de tes corrections (oui il y avait beaucoup de rouge), et merci d'avoir toujours été là pour répondre à chacune des questions que j'ai eu durant ces six mois.

J'aurais envie de dire que le seul hic de ce stage reposait sur une drôle d'histoire de tartes, mais bon....je dois malheureusement avouer qu'elles étaient bonnes.

Ps : ahhh siiii, il faut juste que tu apprennes à suivre les lignes pour les tests en goutte.

Sommaire

Introduction.....	7
I) Présentation du laboratoire	9
II) Les champignons dégradeurs de bois.....	9
A) Les mécanismes de dégradation	9
B) La dégradation du bois, un processus générateur de stress	10
III) Les petites protéines sécrétées	12
A) Généralités	12
B) La protéine SSP1 de <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	13
C) Pa_3780, Pa_2010 et les protéines Gas	14
IV) Objectifs du stage	17
Matériels et méthodes	19
I) Matériel biologique	21
A) Séquences protéiques	21
B) Souches bactériennes.....	21
C) Souches fongiques.....	21
D) Plasmides.....	22
E) Amorces.....	22
II) Milieux et conditions de culture	22
III) Manipulation d'acides nucléiques	23
A) Extractions	23
1) Extractions plasmidiques.....	23
2) Extraction des ARN totaux et synthèse d'ADNc	23
B) Clonages	23
1) Amplification des gènes d'intérêt.....	23
2) Digestion et ligation.....	23
C) Transformations et vérification de la présence de l'insert.....	24
D) Analyses de l'expression des gènes <i>ssp1</i> , <i>3780</i> et <i>2010</i> par qPCR.....	24
IV) Production de protéines recombinantes chez <i>E. coli</i>	25
V) Purification de protéines recombinantes	26
A) Chromatographie d'affinité IMAC	26
B) FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography).....	26

C) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE).....	26
VI) Dosage d'activité glucuronidase.....	26
VII) Analyses évolutives.....	27
Résultats.....	29
I) Analyse évolutive des protéines SSP1-like.....	31
A) Analyses phylogénétiques.....	31
B) Clusterisation des 1057 SSP1-like.....	34
II) Conditions d'expression des gènes <i>ssp1</i> , <i>3780</i> et <i>2010</i>	37
A) Tests de croissance de <i>P. anserina</i> et <i>P. chrysosporium</i>	37
B) Analyse de l'expression des gènes <i>ssp1</i> , <i>3780</i> et <i>2010</i>	38
III) Analyse fonctionnelle des protéines Pc_SSP1, Pa_2010 et Pa_3780.....	40
A) Analyse phénotypique des simples mutant $\Delta 3780$ et $\Delta 2010$ et du double mutant $\Delta 3780\text{-}\Delta 2010$ chez <i>P. anserina</i>	40
B) Tests de complémentation fonctionnelle du mutant $\Delta gas1$ chez <i>S. cerevisiae</i>	41
1) Tests de sensibilité du mutant $\Delta gas1$ chez <i>S. cerevisiae</i>	41
2) Tests de complémentation fonctionnelle.....	42
IV) Production de protéines recombinantes et analyses biochimiques.....	44
A) Production de Pc_SSP1.....	44
B) Production de Pa_2010 et Pa_3780.....	46
Discussion.....	47
Références.....	51
Références bibliographiques.....	53
Annexes.....	57

Abréviations

CAZY = Carbohydrate Active enZYmes

CBM = Carbohydrate Binding Module

FPLC = Fast Protein Liquide Chromatographie

GAS = Glycolipid Anchored Surface

GPD = Glycéraldéhyde-3-Phosphate-Déshydrogénase

IMAC = Immobilized Metal Affinity Chromatography

JGI = Joint Genome Institute

PCR = Polymerase Chain Reaction

SDS-PAGE = Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SSP = Small Secreted Protein

Introduction

I) Présentation du laboratoire

L'Unité Mixte de Recherche 1136 Interactions Arbre Microorganismes (IAM) est une unité sous co-tutelle INRA et Université de Lorraine composée de 46 membres permanents (<http://mycor.nancy.inra.fr/IAM/>). Trois équipes la composent : 1) Ecogénomique des interactions ; 2) Ecologie des champignons pathogènes ; 3) Réponses au stress et régulation redox. C'est au sein de cette troisième équipe localisée sur le site de la Faculté des Sciences et Technologies de Nancy que mon stage s'est déroulé.

Cette équipe composée de 9 membres permanents étudie la réponse au stress chez les plantes et les champignons avec comme organismes modèles le peuplier et le champignon de pourriture blanche *Phanerochaete chrysosporium*.

II) Les champignons dégradeurs de bois

A) Les mécanismes de dégradation

Les dégradeurs de bois jouent un rôle majeur dans le cycle du carbone des écosystèmes forestiers. Les champignons réalisant ce travail sont les pourritures. Il en existe deux grands groupes : les pourritures blanches et les pourritures brunes. Les organismes composant ces deux groupes diffèrent par leur capacité à dégrader ou non la lignine et par les mécanismes utilisés pour dégrader les structures polysaccharidiques de la paroi végétale.

La paroi végétale est composée de trois éléments majoritaires (Figure 1):

- La lignine est un composé polyphénolique formé de 3 sous-unités : l'alcool coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique dont les pourcentages sont variables selon le type de cellule et les essences. Elle représente entre 15 et 25% de la biomasse végétale.
- La cellulose est un polymère de D-glucoses reliés par des liaisons β -1,4.

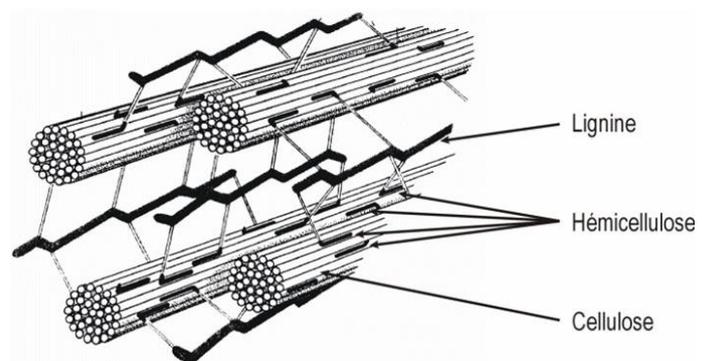


Figure 1 : Représentation schématique de l'organisation des 3 principaux composants de la paroi végétale (source : <http://www.thermo-color-bois.fr>).

C'est le polysaccharide le plus présent sur terre constituant 35 à 50% de la biomasse végétale.

- Les hémicelluloses sont des composés polysaccharidiques formés par de nombreux sucres parmi lesquels on retrouve le glucose, le mannose ou le galactose ainsi que des acides uroniques. Elles interagissent avec les fibres de cellulose et avec la lignine, participant ainsi à la rigidité de la paroi.

Les pourritures blanches sont appelées ainsi car le processus de dégradation utilisé par ces organismes entraîne un blanchissement du bois colonisé. Ces pourritures sont les seules à pouvoir dégrader la lignine par des mécanismes enzymatiques faisant intervenir des lignine et des manganèse peroxydases H_2O_2 dépendantes ainsi que des laccases (Hammel and Cullen., 2008). En parallèle de la dégradation de la lignine, ces champignons possèdent aussi un cocktail enzymatique leur permettant de déstructurer la cellulose et l'hémicellulose. La première est dégradée par des cellulases (endoglucanases, cellobiohydrolases et β -glucosidases) qui vont pouvoir fixer le substrat via un domaine CBM (carbohydrate binding module). La seconde de par sa plus grande complexité va nécessiter l'intervention d'enzymes supplémentaires. Certaines sont responsables du clivage de la chaîne principale (xylanases, estérases) tandis que d'autres permettent le débranchement des chaînes latérales (arabinofuranosidases). Grâce à leurs capacités de dégradation, ces champignons se sont révélés très intéressants d'un point de vue biotechnologique avec par exemple des utilisations dans le traitement du papier, des textiles ou même de déchets dangereux.

Les pourritures brunes quant à elles peuvent uniquement dégrader la cellulose et l'hémicellulose par le biais de glycosides hydrolases mais également par la formation de radicaux hydroxyles $HO\bullet$. Ce composé oxydant pouvant dégrader les polysaccharides de la paroi et modifier légèrement la lignine est formé lors de la réaction de Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^- + HO\bullet$) (Arantes *et al.*, 2011). La lignine subira donc seulement quelques modifications chimiques laissant ainsi au bois une couleur brune.

B) La dégradation du bois, un processus générateur de stress

Récemment, des études phylogénomiques ont été menées afin de mettre en lien la présence de certains gènes avec les capacités de dégradation de ces espèces. Il semblerait que l'évolution de 4000 familles de gènes soit corrélée au style de vie des pourritures blanches (Nagy *et al.*, 2016). Parmi ces familles on retrouve des oxydases, des peroxydases ou des

cellobiohydrolases, mais également un nombre important de gènes impliqués dans la résistance au stress et la détoxification.

Cela a permis de révéler que la dégradation du bois était un processus induisant un stress chez les espèces lignolytiques.

Ces stress peuvent être causés par des espèces réactives de l'oxygène ou alors par des composés appelés "extractibles" (Figure 2). Ces petites molécules sont appelées comme cela car facilement

extraites du bois grâce à des solvants. On y retrouve des terpènes, des glucides ou encore des composés phénoliques, dont les proportions varient selon les essences. Ils représentent entre 1 et 10% de la masse du bois (Valette *et al.*, 2017).

Ces composés apportent au bois certaines propriétés, mais se sont également révélés être des molécules antifongiques. Certaines vont pouvoir inhiber l'action de laccases, bloquer la réaction de Fenton en piégeant le Fe^{3+} ou l' H_2O_2 , ou même se fixer directement sur les enzymes et ainsi empêcher la dégradation du bois. D'autres encore vont bloquer la synthèse de chitines et de glucanes ou même agir en dérégulant l'homéostasie des cellules. Le carvacrol par exemple est un terpène pouvant causer une dérégulation du flux de calcium entrant dans les cellules ce qui va par la suite entraîner une altération de la paroi (Valette *et al.*, 2017).

Dans le but de comprendre de quelle manière les champignons dégradeurs de bois parviennent à se développer en présence de ces molécules, des analyses transcriptomiques ont été menées sur *Phanerochaete chrysosporium* en présence d'extractibles de chêne (Thuillier *et al.*, 2014). Les résultats ont révélé une induction de gènes codant des protéines impliquées dans des systèmes de dégradation, de détoxification et de réponse au stress. Le résultat novateur de cette analyse fut l'induction de plusieurs gènes codant pour des petites protéines sécrétées de fonction inconnue (SSP).

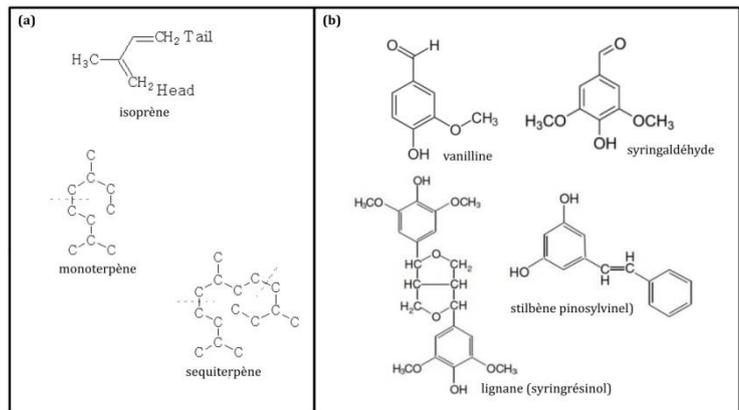


Figure 2 : Exemples de molécules présentes dans les extractibles. a) exemples de terpènes ; b) exemples de composés phénoliques (Source : d'après Deroy, 2015).

III) Les petites protéines sécrétées

A) Généralités

Les SSP ont été définies comme des protéines de moins de 300 acides aminés et possédant un peptide signal de sécrétion (Feldman *et al.*, 2017). A cette définition peut se rajouter la présence d'au moins 4 cystéines dans la séquence (Valette., 2017). La plupart des SSP sont retrouvées chez des champignons interagissant avec des plantes, quels que soient leurs modes de vie, et il s'avère que pour les cas étudiés ces SSP tiennent un rôle majeur dans ces interactions. Certaines comme des lipases, protéases ou CAZymes participent à l'acquisition de nutriments, d'autres à la défense du champignon, alors que les hydrophobines peuvent favoriser le développement du mycélium (Kim *et al.*, 2016). Chez *Laccaria bicolor*, une espèce ectomycorhizienne, la protéine MiSSP7 est un effecteur qui se révèle être indispensable à la symbiose avec la plante hôte (Plett *et al.*, 2011). Cette protéine permettrait l'élongation de l'hyphe au sein du système racinaire en rendant les cellules de la plante favorables au mutualisme. Il en va de même pour la protéine SP7 du champignon endomycorhizien *Glomus intraradices* qui est un effecteur contribuant au développement de la symbiose en contournant le système immunitaire de la plante (Kloppholz *et al.*, 2016). A l'opposé, chez le pathogène *Heterobasidion annosum* il a pu être démontré qu'un groupe de 8 SSP induisait une mort cellulaire chez le pin *Nicotiana benthamiana*, et qu'en particulier la protéine HaSSP30 induisait la mort cellulaire dans les 2 jours suivant l'infection (Raffaello and Asiegbu., 2017). Certaines SSP présentes chez les champignons du genre *Aspergillus* ont la capacité de fixer des enzymes comme des cutinases afin d'en améliorer l'activité de dégradation des tissus végétaux. Il a également été proposé que les SSP puissent jouer un rôle dans la protection du champignon face à des stress induits lors de la dégradation de la biomasse (Terauchi *et al.*, 2017).

Si les études sur les SSP chez les champignons mycorhiziens et pathogènes commencent à s'accumuler, celles concernant les organismes saprotrophes et notamment les pourritures restent encore rares. En 2002 une étude a montré qu'une protéine sécrétée (swollenin) par *Trichoderma reesei* possède une séquence proche de celles des expansines des plantes (Saloheimo *et al.*, 2002). Ces protéines, impliquées dans la modification de la structure des parois agissent en créant des ruptures au sein des liaisons hydrogènes des fibres de cellulose, activité que possède également la swollenin. A l'origine suspectée de participer au remodelage

de la paroi lors de l'élongation de *T. reesei*, il s'avère qu'en réalité elle fait partie d'un cocktail enzymatique chargé de dégrader la biomasse végétale.

B) La protéine SSP1 de *Phanerochaete chrysosporium*

L'organisme étudié au sein du laboratoire est le basidiomycète *Phanerochaete chrysosporium*. Ce champignon de la classe des agaricomycètes est un organisme modèle ayant permis de nombreuses études du système enzymatique extracellulaire des pourritures blanches permettant de dégrader la lignine. Son génome composé d'environ 35 millions de paires de bases et 13 602 gènes répartis sur 10 chromosomes a été le premier génome de basidiomycètes séquencé. *P. chrysosporium* possède respectivement 10 et 5 gènes codant des lignine peroxydases et des manganèse peroxydases impliquées dans la dégradation de la lignine, ainsi que 166 gènes codant des glycosides hydrolases, 14 carbohydrates estérases et 57 glucanosyles transférases dont le rôle est de dégrader la cellulose ou les hémicelluloses (Martinez *et al.*, 2004).

La protéine Pc_SSP1 de *P. chrysosporium*, dont le gène est induit en présence d'extractibles de chêne (Thuillier *et al.*, 2014), est composée de trois parties : un peptide signal de sécrétion, une partie N-terminale conservée avec 4 cystéines et une partie C-terminale variable riche en alanine et glycine, mais son rôle est à l'heure actuelle complètement inconnu.

Son orthologue a été identifié dans des secrétomes de *Trametes versicolor* en culture sur bois (Deroy., 2015). En particulier, cette protéine (ProtID 136431 dans la base de données du JGI) a été visualisée dans les secrétomes d'écotypes de *T. versicolor* prélevés sur hêtres dans la nature puis mis en contact avec du chêne *in vitro*. Cette protéine n'a en revanche pas été identifiée dans les secrétome d'écotypes prélevés sur chêne et remis en contact avec cette même essence (Figure 3). Ces résultats laissent penser que SSP 136431 pourrait être spécifiquement sécrétée en réponse à la toxicité de molécules extractibles de chêne pour les organismes qui ne sont pas adaptés à cet environnement.

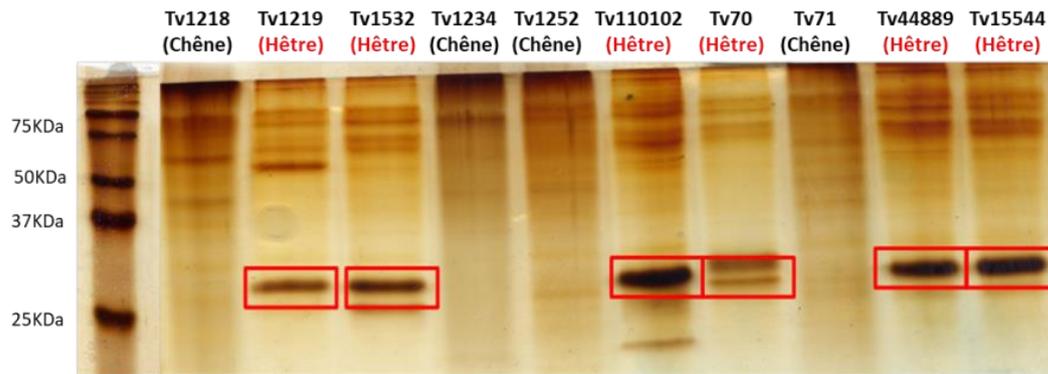


Figure 3 : Gel SDS-PAGE sur le secrétome de *T. versicolor* sur chêne (source : Deroy., 2015).

Le rôle physiologique de Pc_SSP1 est encore inconnu, cependant au vu de ces résultats préliminaires, c'est vers un rôle dans les mécanismes de réponse au stress induit par les extractibles que s'orientent les hypothèses actuelles.

C) Pa_3780, Pa_2010 et les protéines Gas

Une méthode pour l'étude du rôle physiologique d'une protéine est la création de mutants de surexpression ou de délétion. Cependant les méthodes de transformations classiques se sont avérées inefficaces chez *P. chrysosporium*. Des tests de transformation par biolistiques (transformation par le biais d'un canon à ADN) ou par lipotransfection (endocytose de vésicules lipidiques contenant de l'ADN) ont été tentés mais le taux de réussite était extrêmement faible (Valette., 2017). Il a donc été nécessaire de trouver un autre organisme fongique chez qui ces modifications seraient réalisables. Le choix s'est porté vers un organisme coprophile : *Podospora anserina*. Ce champignon poussant sur les excréments d'herbivores est capable de dégrader la biomasse. C'est un organisme modèle, couramment utilisé comme outil génétique car facilement manipulable pour la création de mutants surexpresseurs ou knock-out. De plus, il a un cycle de vie court et aisément maîtrisable d'environ 7 jours. Des orthologues de *ssp1* ont été recherchés au sein de son génome et deux gènes ont pu être mis en évidence : 3780 (ProtID JGI 208230) et 2010 (ProtID JGI 209725)(séquences en Annexe 1). Les protéines correspondantes sont également de fonction inconnue. Cependant une homologie de séquences a été identifiée par blastP pour Pa_3780 avec une "gas like protein" du pathogène *Grosmannia clavigera* (Figure 4). Cette homologie de 71% se situe au niveau de la partie N-terminale des deux protéines.

```

QUERY: 208230 (290)
Hit: nr_b_320587842 (258)
     defLine: gi|320587842|gb|EFX00317.1| gas1-like protein [Grosmannia clavigera kw1407]

SCORE: 727  EVALUE: 0
Alignment Length: 195  IDENTITIES: 70.77% (138/195)  SIMILARITIES: 82.05% (160/195)
GAPS: 2
QUERY START: 9  QUERY END: 203
HIT START: 5  HIT END: 197

   9  TLLPLAFLP LPSLVAHGVLAAQGEADSPSPVGFVNDIAIRNCTSIINPCQMDTTIIRDAEIAAGTVNS  78
      TL+ +AAFL  VSAHGVLAAQG+A SP SVGF VII+A+ RNCT+I+PCQ DTT+IRDAEIAAGTV
   5  TLMVAFLAG--VSAHGVLAAQGDAGSPASVGFQVNNALPRNCTTISPCQDQTTLIRDAEIAAGTVTE  72

  79  CGRTKLNGLIDVGTVTENALAEAVTAVRQGSVDVTIHQVNADGAGPYTCDLDEGNSGIMSHLVSN  148
      CGRT+L GNIDV T TE+AAA GAVT+V  GS + +TIHQVNADGAGPY+CDLDE S+SG+MSH L V+N
  73  CGRTELGTIDVKTSTEDAISSGAVTVAAGSQLTITIHQVNADGAGPYSCLDEASDSGVMSHNLTVAN  142

 149  NIPGQNGLSQAAEQEFITVTPDDMKICGGSTGNVCTVRCRNNAAQAGPFGLIS  203
      NIPG NGLS A EQ+F ITVTP  + C GGSTGNVCTVRCRN A AGPFGG +
 143  NIPGTNGLSLAKEQDFNITVTPSTLNCSSGGSTGNVCTVRCRNNAAAGPFGGCF  197

```

Figure 4 : Aligement partiel des séquences protéiques de Pa_3780 et Gas1-like de *G. clavigera* disponible sur la page descriptive de Pa_3780 sur le site du JGI (<https://genome.jgi.doe.gov/cgi-bin/dispGeneModel?db=Podan3&id=208230>).

Les protéines Gas (Glycolipid Anchored Surface) sont des protéines impliquées dans le remodelage de la paroi chez les champignons et plus particulièrement dans l'élongation des chaînes de glucanes. Ce composé majeur, synthétisé par des β -1,3-glucane synthases ancrées dans la membrane lipidique, est un homopolymère de glucoses formant une couche épaisse de β -1,3-glucane à laquelle viennent s'ancrer les molécules de chitines et des mannoprotéines (Figure 5). Les molécules de β -1,3-glucane sont clivées formant de courtes chaînes qui vont ensuite venir se brancher de manière latérale sur les chaînes nouvellement créées (Figure 6) permettant la création de cette couche épaisse dans la paroi. Les protéines Gas catalysent les deux étapes de cette élongation : le clivage et le transfert (Mouyna *et al.*, 2000). Ces enzymes sont des glucanosyl-transférases et appartiennent à la famille des Glycosides Hydrolases 72 (GH72) dans la base de données des Carbohydrate Active Enzymes (CAZY) (<http://www.cazy.org/>).

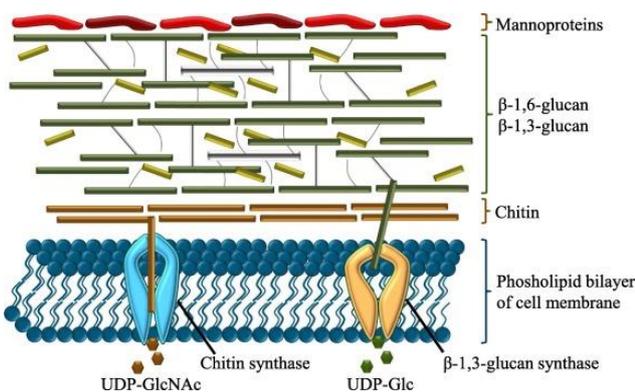


Figure 5 : Schéma représentatif de la paroi des champignons (Fesel et Zuccaro., 2016).

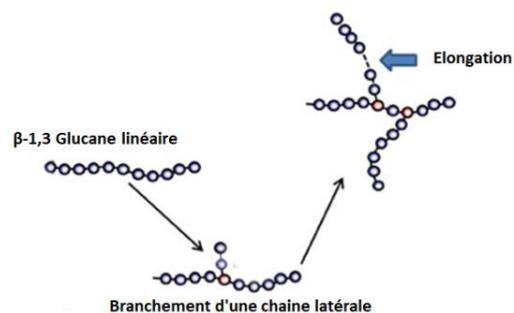


Figure 6 : Schéma récapitulatif de l'élongation de la chaîne de β -1,3-Glucane (d'après Mouyna *et al.*, 2013).

Les membres de cette famille partagent une même conformation modulaire (Popolo and Vai., 1999) (Figure 7). Côté N-terminal on retrouve un peptide signal de sécrétion suivi du domaine catalytique GH72 dans lequel deux glutamates sont conservés chez tous les membres de la famille GH72. La partie C-terminale commence par un linker et une Cys-box comportant en moyenne 6 cystéines. Selon la présence ou l'absence du domaine Cys-box, les membres de la famille GH72 sont répartis dans deux groupes : GH72⁺ pour ceux possédant ce domaine et GH72⁻ pour ceux ne le possédant pas. Les protéines Gas se terminent par un domaine riche en sérine puis dans certains cas par un signal glycosylphosphatidylinositol (GPI) permettant l'ancrage à la membrane (Ragni *et al.*, 2007).

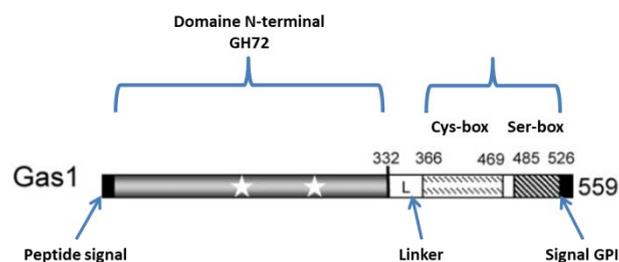


Figure 7 : Représentation schématique de la répartition en domaines de la protéine Gas1 de *Saccharomyces cerevisiae*. Les deux étoiles représentent les résidus catalytiques E161 et E262 (Ragni *et al.*, 2007).

Ces protéines Gas, appelées également Gel (Glucan-Elongating glucanotransferase), Phr (pH-regulated) ou Epd (Essential Pseudohyphal development) selon les espèces sont présentes chez de nombreux organismes quels que soient leurs modes de vie.

C'est chez *Saccharomyces cerevisiae* que les Gas ont tout d'abord été identifiées. On en dénombre cinq (Gas1-5) et Gas1 a été parmi les premières à être caractérisées (Ram *et al.*, 1998). La délétion du gène *gas1* se traduit par une diminution de la quantité de β -1,3-glucane dans les parois, un taux de chitine anormalement élevé ainsi qu'une faible croissance et des anomalies structurales. Gas2 et Gas4 quant à elles jouent un rôle dans la formation des spores et leur délétion entraîne une diminution de la capacité de sporulation (Ragni *et al.*, 2007).

Chez des espèces pathogènes, ces protéines jouent un rôle essentiel dans l'infection des plantes. La protéine Gas1 de *Fusarium oxysporum* par exemple est indispensable à la croissance du champignon le long des pieds de tomates (Caracuel *et al.*, 2005). Sa délétion réduit fortement la virulence et a permis de démontrer pour la première fois le rôle d'une protéine Gas dans un mécanisme de pathogénicité. Chez *Magnaporthe oryzae* la délétion de trois protéines Gel abolit la capacité de la souche à causer la pyriculariose du riz, et il a été démontré que Gel3 participerait directement à l'invasion de la plante (Samalova *et al.*, 2016).

IV) Objectifs du stage

L'objectif principal de ce stage est de préciser le rôle physiologique de la protéine Pc_SSP1 de *P. chrysosporium*.

L'hypothèse de départ était que cette protéine, ainsi que ses orthologues chez *P. anserina* pouvaient avoir un lien avec la famille des protéines Gas. Cela reposait dans un premier temps sur des homologies de séquences, que ce soit entre Pa_3780 et une protéine Gas de *G. clavigera*, ou alors par la présence chez Pc_SSP1, Pa_3780 et Pa_2010 d'un domaine DUF3129 (numéro d'accession : pfam1132) côté N-terminal, domaine de fonction inconnue mais partagé également par plusieurs protéines Gas. De plus, des similarités phénotypiques sont venues étayer cette hypothèse. En effet les mutants $\Delta 3780$ et $\Delta 2010$ chez *P. anserina* présentent le même phénotype de sensibilité au rouge Congo que le mutant $\Delta gas1$ de *S. cerevisiae*.

Ce travail s'est organisé en 3 grandes parties :

- 1) Après avoir identifié les séquences codant des protéines SSP1-like dans les génomes de divers champignons avec des modes de vie variés, la première étape a été de mener une analyse phylogénétique de ces séquences dans le but de rechercher une corrélation éventuelle entre l'évolution de ces séquences, la taxonomie des espèces considérées et leurs modes de vie.
- 2) La seconde partie de ce stage a concerné l'analyse phénotypique des mutants $\Delta 3780$ et $\Delta 2010$ de *P. anserina* et $\Delta gas1$ de *S. cerevisiae* soumis à différents agents chimiques ciblant la paroi et d'analyser la fonction potentielle de Pc_SSP1, Pa_3780 et Pa_2010 par complémentation fonctionnelle de ces mutants.
- 3) Enfin, la dernière partie a consisté en une caractérisation biochimique de ces protéines après production et purification des protéines recombinantes en hôte hétérologue bactérien.

Matériels et méthodes

I) Matériel biologique

A) Séquences protéiques

L'ensemble des séquences protéiques sont présentées en *Annexe 1*.

B) Souches bactériennes

***Escherichia coli* DH5 α** : Cette souche, utilisée pour le clonage, a été créée pour optimiser l'efficacité des transformations par mutation d'une recombinaison et l'inactivation d'une endonucléase.

Génotype = F⁻ Φ 80/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (r_K⁻, m_K⁺) *phoA supE44* λ -*thi-1 gyrA96 relA1*.

***Escherichia coli* BL21 (DE3) pSBET** : Souche utilisée pour la production de protéines recombinantes eucaryotes. C'est une version optimisée de la souche BL21 permettant l'utilisation de deux codons rares pour l'arginine (AGG et AGA).

Génotype = F⁻ *ompT hsdSB*(r_B⁻ m_B⁻) *gal dcm* (DE3) pSBET (Kn).

***Escherichia coli* Rosetta 2 (DE3)** : Souche utilisée pour la production de protéines recombinantes eucaryotes. C'est un dérivé d'*E. coli* BL21 possédant la capacité d'utiliser des codons rares chez les bactéries (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC, CGG).

Génotype : F⁻ *ompT hsdSB*(r_B⁻ m_B⁻) *gal dcm* (DE3) pRARE2 (Cam^R).

C) Souches fongiques

***Podospora anserina* S** : Champignon appartenant au groupe des ascomycètes et à la classe des sordariomycètes. C'est une espèce facilement manipulable génétiquement et qui est utilisée pour des observations phénotypiques et la création de mutants de délétion (Δ 3780 et Δ 2010).

Son génome est disponible en ligne sur le site du JGI (<https://genome.jgi.doe.gov/Podan3/Podan3.home.html>).

***Phanerochaete chrysosporium* RP78** : Champignon appartenant au groupe des basidiomycètes et à la classe des agaricomycètes. Cette souche homocaryotique (deux noyaux identiques) est utilisée au laboratoire pour l'étude de la protéine Pc_SSP1. Son génome est disponible (<https://genome.jgi.doe.gov/Phchr2/Phchr2.home.html>).

***Saccharomyces cerevisiae* BY4742** : Cette souche sauvage, ainsi que le mutant de délétion Δ *gas1* ont été fournis par Johannes Hermann (Université de Kaiserslautern). Ces deux souches ont été utilisées pour des tests de phénotypages et elles présentent une auxotrophie à l'uracile.

Les transformations de *S. cerevisiae* se font à l'acétate de lithium selon un protocole adapté de Gietz *et al* (1992).

Génotype : Mat α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0.

D) Plasmides

Les cartes des plasmides sont disponibles en *Annexe 2*.

pET26B : Plasmide utilisé pour la production de protéines chez *E. coli*. Le gène est placé sous la dépendance du promoteur et du terminateur T7 et le plasmide apporte une étiquette 6 histidines côté C-terminal.

pAKS125 : Plasmide utilisé pour la complémentation chez *P. anserina*. Il permet une fusion du gène avec l'étiquette HA (Human influenza hemagglutinin epitope. Le promoteur précédant ici le gène est le promoteur T3.

p426-GPD : Plasmide pour la complémentation chez *S. cerevisiae*. Le gène est sous la dépendance du promoteur fort GPD (Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase).

E) Amorces

La liste des amorces utilisées pour l'amplification des 4 gènes (*ssp1*, *3780*, *2010* et *gas1*) est proposée en *Annexe 3*. Cinq autres couples d'amorces ont servi au suivi de l'expression des gènes par PCR quantitatives.

II) Milieux et conditions de culture

Les milieux utilisés pour les cultures sont : Milieu Luria Bertani ou milieu ZYM5052 avec ajout d'antibiotiques pour les cultures d'*E. coli*, un milieu de sporulation et le milieu de culture Tien and Kirk pour *P. chrysosporium*, le milieu M2 pour *P. anserina* et enfin les milieux YPD et YNB pour *S. cerevisiae*. Tous ces milieux sont autoclavés à 120°C avant leur utilisation. Leur composition est présentée en *Annexe 4*. Les cultures d'*E. coli* et de *P. chrysosporium* sont réalisées à 37°C, celles de *P. anserina* à 25°C, et enfin celles de *S. cerevisiae* à 30°C.

Pour les observations phénotypiques, des traitements par divers agents endommageant la paroi ont été effectués. Les produits utilisés sont le sorbitol, le rouge Congo, la caspofungine, le calcofluor et des extraits acétoniques de chêne. Les quantités utilisées sont précisées dans la présentation des résultats.

III) Manipulation d'acides nucléiques

A) Extractions

1) Extractions plasmidiques

Les plasmides utilisés sont stockés dans la souche *E. coli* DH5 α . Les extractions sont réalisées grâce à un kit fourni par la société GE Healthcare (Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit) selon les recommandations du fournisseur.

2) Extraction des ARN totaux et synthèse d'ADNc

Ces extractions sont réalisées à l'aide d'un kit fourni par la société Qiagen (Plant RNA Purification Kit: RNeasy Plant MiniKit) dont le protocole modifié est présenté en *Annexe 5*.

Les ADN complémentaires ont été synthétisés à partir de 500ng d'ARN totaux à l'aide du kit iScript Reverse Transcription Supermix de BioRAD selon les recommandations du fournisseur. Cette enzyme permet de produire des ADNc avec un ratio 1/1 par rapport à la quantité d'ARNm ajoutée.

B) Clonages

1) Amplification des gènes d'intérêt

L'amplification des 4 gènes d'intérêt a été réalisée par PCR (Polymrase Chain Reaction) à partir des ADNc synthétisés et en utilisant une polymérase haute-fidélité (Herculase, Agilent) en suivant les recommandations du fournisseur. Les cycles sont détaillés dans la Figure 8.

La vérification des produits PCR se fait par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. Puis les fragments PCR attendus sont récupérés par découpage du gel et purifiés sur colonne avec le kit Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification de la société GE Healthcare. L'élution se fait dans 80 μ L d'H₂O milliQ.

2) Digestion et ligation

Digestions

Le volume final de la réaction est de 90 μ L. Les enzymes de restriction utilisées pour les différents clonages sont fournies par Thermo Scientific et sont présentées en *Annexe 3*. Le fragment PCR et le plasmide pour lequel il est destiné sont digérés par les mêmes enzymes en

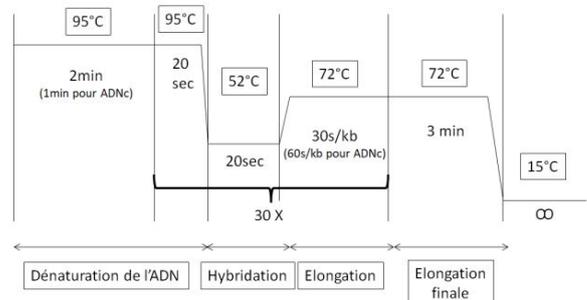


Figure 8 : Détail des cycles pour les PCR Herculase

suivant les recommandations du fournisseur afin de produire des extrémités compatibles. La purification est réalisée grâce au kit Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification.

Dans le cas de vecteurs digérés par une seule enzyme, une déphosphorylation est nécessaire avec l'enzyme FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Scientific) selon les recommandations du fournisseur.

Ligation dans un vecteur d'expression

L'insert et le vecteur linéarisé sont mélangés avec un rapport 3 pour 1 pour un volume maximal de 16µL puis le mélange est chauffé 1 minute à 50°C. La ligation s'effectue après ajout de la T4 DNA ligase (Thermo Scientific) et son tampon selon les recommandations du fournisseur.

C) Transformations et vérification de la présence de l'insert

Des PCR sur colonies ont été utilisées pour s'assurer de la présence des plasmides contenant les inserts en utilisant l'enzyme GoTaq G2 Flexi (Promega) selon les recommandations du fournisseur. Le déroulement des cycles est détaillé dans la Figure 9.

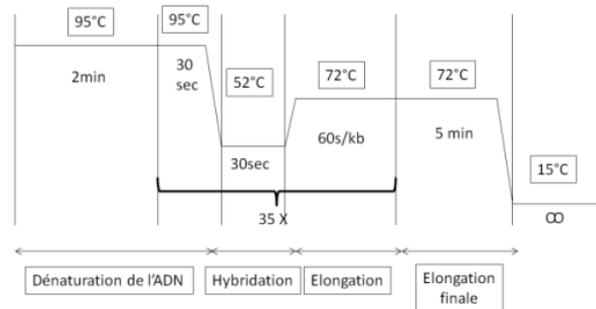
Après extraction plasmidique, une seconde vérification par digestion du plasmide est également

nécessaire pour prouver la présence de l'insert. Les plasmides sont ensuite envoyés en séquençage à la société Genewiz afin de vérifier l'intégrité de la séquence nucléotidique.

Les transformations chez *E. coli* sont réalisées soit par choc thermique (selon le protocole de la société Addgene), soit par électroporation (Dower *et al.*, 1988).

D) Analyses de l'expression des gènes *ssp1*, 3780 et 2010 par qPCR

Les PCR quantitatives sont réalisées en microplaques de 96 puits. 2µL d'ADNc à 0,25 ng.µL⁻¹ ou 5ng.µL⁻¹, 5,5µL d'un mélange d'amorces sens et antisens à 0,8µM chacune et 7,5µL d'iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) sont ajoutés dans chacun des puits. La réaction comporte une première étape de dénaturation de 3 minutes à 95°C, puis 39 cycles avec une dénaturation de 15 secondes à 95°C et une hybridation/élongation de 1 minute à 60°C. Enfin, pour la réalisation de la courbe de dénaturation ou melting-curve, un gradient de température est réalisé de 65°C à 95°C en montant d'un degré par seconde. La qPCR est réalisée à l'aide du CFX 96-Real Time System (Bio-Rad). Les ratios d'expression sont calculés selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$, après avoir



vérifié l'efficacité des amorces. Le gène rapporteur utilisé pour la qPCR chez *P. chrysosporium* est celui codant pour l'ubiquitine, tandis que pour *P. anserina* c'est celui codant pour la glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase qui a été retenu.

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{échantillon condition testée}} - Ct_{\text{échantillon condition standard}}) - (Ct_{\text{rapporteur condition testée}} - Ct_{\text{rapporteur condition standard}}).$$

IV) Production de protéines recombinantes chez *E. coli*

Les souches d'*E. coli* utilisées (Rosetta 2 et BL21), possèdent le gène codant pour la T7 RNA polymérase sous le contrôle du promoteur *lacUV5*, promoteur inhibé par la présence de LacI. Deux méthodes d'induction ont été utilisées : la 1^{ère} est une induction à l'IPTG afin de lever l'inhibition par LacI. La seconde méthode est une induction par le milieu ZYM5052. Ce dernier offre 2 sources de carbone qui sont le glucose et le lactose. Le glucose sera utilisé comme source principale dans un premier temps afin de produire de la biomasse, et le lactose dans un second temps sera utilisé puis transformé en allolactose afin de lever l'inhibition du promoteur *lacUV5* et de produire la protéine d'intérêt. La production des protéines par ces deux techniques est présentée dans la Figure 10. Les milieux sont ensuite centrifugés et le culot bactérien est soumis à sonication (2 fois 1 minute). Afin de récupérer la phase soluble l'échantillon est centrifugé 30 minutes à 15000rpm.

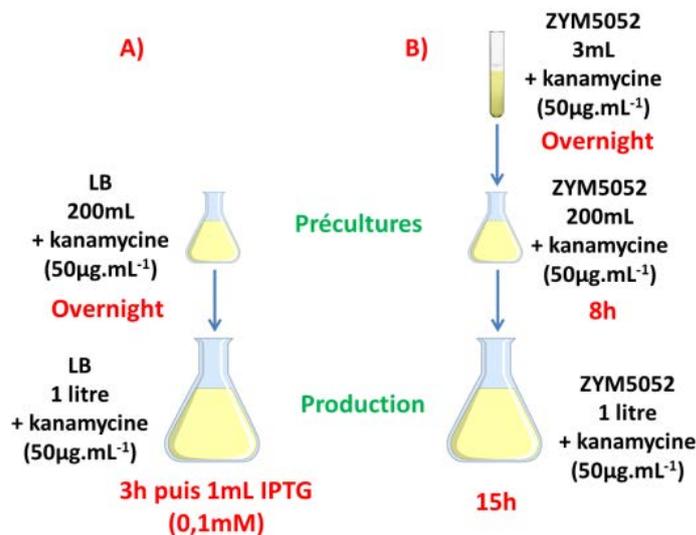


Figure 10 : Représentation schématique des 2 méthodes d'induction pour la production de protéines recombinantes chez *E. coli*. A) Induction à l'IPTG ; B) Induction par le milieu ZYM5052.

V) Purification de protéines recombinantes

A) Chromatographie d'affinité IMAC

L'IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) est une technique de chromatographie utilisant une colonne chargée d'ions nickel (Ni^{2+}) dans le but de retenir par chélation les protéines portant une étiquette 6 histidines. La colonne est fournie par la société Qiagen et le déroulement de la purification s'effectue selon les recommandations du fournisseur. Les protéines éluées sont concentrées en cellules de concentration amicon (membrane YM10) sous pression d'azote. Les protéines seront retenues par la membrane tandis que le tampon passera à travers.

B) FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)

Les échantillons (volume de 1mL maximum) sont ensuite déposés sur une colonne Superdex 200 16/600 et la résine qu'elle contient permet une séparation des protéines dont la taille varie entre 10kDa et 600kDa, selon leur taille et leur état d'oligomérisation. La colonne est équilibrée par un tampon Tris-HCl 30mM NaCl 500mM. Le système est piloté par un automate Aktä Purifier (GE Healthcare). Les protéines éluées sont concentrées comme décrit ci-dessus.

C) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Les protéines sont mélangées à un tampon Laemmli 5X et chauffées à 95°C 10min avant d'être déposées dans un gel de polyacrylamide 15%. La migration s'effectue dans un tampon de migration entre 120 et 180V. La révélation des signaux protéiques sur gel s'effectue grâce à des incubations successives dans une solution de coloration puis dans une solution de décoloration. La composition des différentes solutions et tampons est présentée en *Annexe 6*.

VI) Dosage d'activité glucuronidase

Cette méthode de dosage est basée sur le clivage et le relargage de méthylumbelliférol à partir du complexe MUG (4-Méthylumbelliféryl- β -D-glucuronide). Pour le dosage d'activité, les milieux réactionnels contiennent 50 μ L de protéines (entre 6,7 et 74,5ng selon les fractions), 50 μ L de tampon phosphate de sodium pH6 et 50 μ L de substrat MUG à 500 μ M. La réaction dure 60 minutes à 60°C sous agitation à 800rpm, puis 100 μ L de Tris 2,5M pH10 sont ajoutés pour la stopper. La fluorescence due au relargage de la méthylumbelliférol est mesurée en microplaque à 460nm avec une excitation à 380nm grâce à un lecteur à fluorescence (EnSight multimode Plate Reader (PerkinElmer)).

VII) Analyses évolutives

L'ensemble des séquences utilisées dans ces analyses ont été récupérées sur le site du JGI (<https://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>) par blastP sur les séquences protéiques de Pc_SSP1, Pa_3780 et Pa_2010 avec un cut-off de 10^{-5} . Les alignements de séquences ont été faits par CLUSTALW, avec les logiciels BioEdit et SeaView. Les arbres ont quant à eux été réalisés à l'aide du logiciel MEGA7.

La clusterisation des séquences a été réalisée en collaboration avec une équipe de mathématiciens (Christophe Guyeux et Jean Claude Scharr de l'Université de Bourgogne Franche Comté). La méthode utilisée consiste dans un premier temps en un alignement multiple des protéines avec muscle, puis une matrice de distance entre chaque couple de séquence en est déduite à l'aide de l'algorithme de Needleman-Wunch qui attribue une valeur entière d'autant plus grande que les séquences sont proches. Les scores de substitution entre acides aminés ont été récupérés de la matrice Blosum 62. Puis cette matrice de distance a été transformée en matrice de similarité en divisant chaque ligne par son maximum, en enlevant à la matrice des 1 cette dernière puis en rendant symétrique la matrice obtenue. La matrice obtenue contient des 0 sur la diagonale et plus la similarité entre séquences est faible plus le nombre se rapproche de 1.

Résultats

I) Analyse évolutive des protéines SSP1-like

Dans le but de rechercher s'il existait une corrélation entre l'évolution des protéines SSP1-like et les modes de vie des champignons les possédant, les séquences protéiques de Pc_SSP1, Pa_2010 et Pa_3780 ont été blastées (blastP) sur l'ensemble de la base de donnée du JGI (<https://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>) avec un cut-off de 10^{-5} . Les 1500 résultats obtenus ont été alignés et les séquences les plus divergentes ont été éliminées, ainsi 1057 séquences ont été retenues pour la suite des analyses.

A) Analyses phylogénétiques

L'analyse des 1057 séquences de SSP1-like montre qu'elles sont retrouvées à la fois chez les ascomycètes et les basidiomycètes, avec des modes de vie variés. La majorité des séquences appartient à des organismes pathogènes et des dégradeurs de bois, mais les SSP1-like ont également été retrouvées chez des espèces coprophiles, des mycorhiziens, des endophytes et des lichens. Une analyse phylogénétique de l'ensemble des séquences a été réalisée. Un premier arbre sur lequel le mode de vie des espèces considérées a été reporté est présenté en Figure 11A.

L'arbre montre un regroupement des séquences SSP1-like d'espèces dégradeurs de bois majoritairement dans un cluster (Cluster A). Cependant ce cluster présente également quelques séquences des représentants des autres modes de vie. Les 5 autres groupes identifiés contiennent essentiellement des séquences de pathogènes. Les séquences Pc_SSP1, Pa_2010 et Pa_3780 ont été identifiées dans des groupes différents et éloignés. Nous avons voulu vérifier dans un second temps si la répartition de ces protéines dépendait de la taxonomie des espèces fongiques plutôt que de leur mode de vie (Figure 11B). L'arbre présenté montre la répartition des champignons selon leur appartenance au groupe des ascomycètes ou des basidiomycètes. Cette représentation semble en effet plutôt indiquer une répartition selon la taxonomie. Il est important de noter que la grande majorité des basidiomycètes séquencés et présents dans les bases de données du JGI sont des dégradeurs de bois, expliquant le nombre important de dégradeurs de bois dans le cluster A.

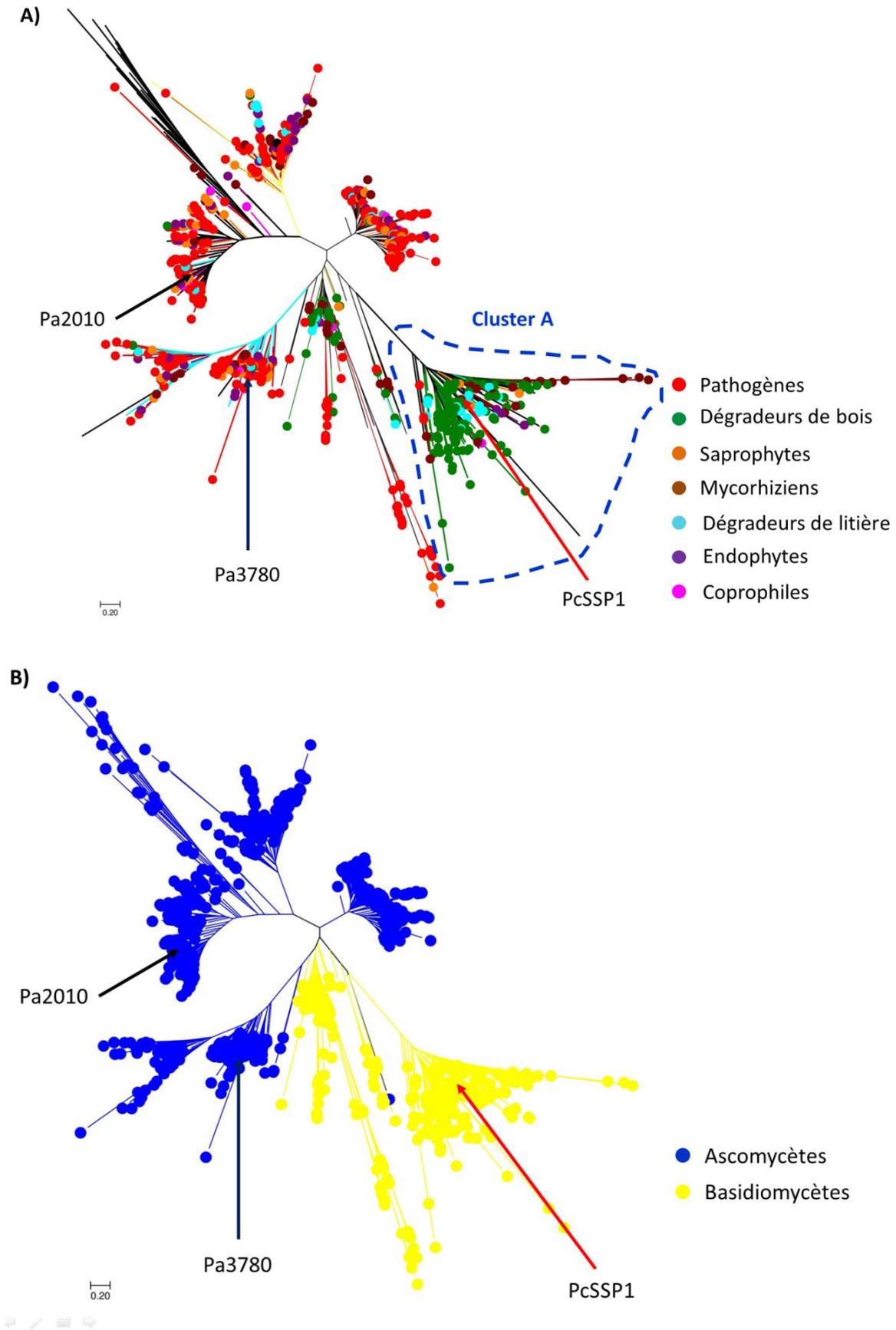


Figure 11 : Arbre phylogénétique réalisé par la méthode du neighbor-joining sur 1057 séquences obtenues par blastP avec les séquences de Pc_SSP1, Pa_3780 et Pa_2010 comme matrice. A) coloration des séquences selon le type trophique de l'organisme ; B) coloration des séquences selon l'appartenance aux groupes des ascomycètes ou des basidiomycètes.

Une analyse plus fine concernant la répartition des SSP1-like dans les différentes classes fongiques a été réalisée (Figure 12). Pour cela, la proportion d'espèces présentant une séquence SSP1-like a été reportée sur le chronogramme disponible sur le site du JGI. Le nombre de génomes disponibles étant très variable entre les classes, cette proportion a été reportée sous forme de pourcentages et de ratios (nombre d'espèces présentant une SSP1-like/nombre des génomes disponibles). L'absence de séquence ou la présence à 100% est dans chaque cas corrélée avec un nombre très faible de génomes disponibles et peuvent donc être biaisées. Pour les classes dont le nombre d'espèces séquencées est important, cette analyse montre que les SSP1-like ne sont pas présentes chez toutes les espèces d'un même groupe et que la proportion est variable en fonction de ces groupes.

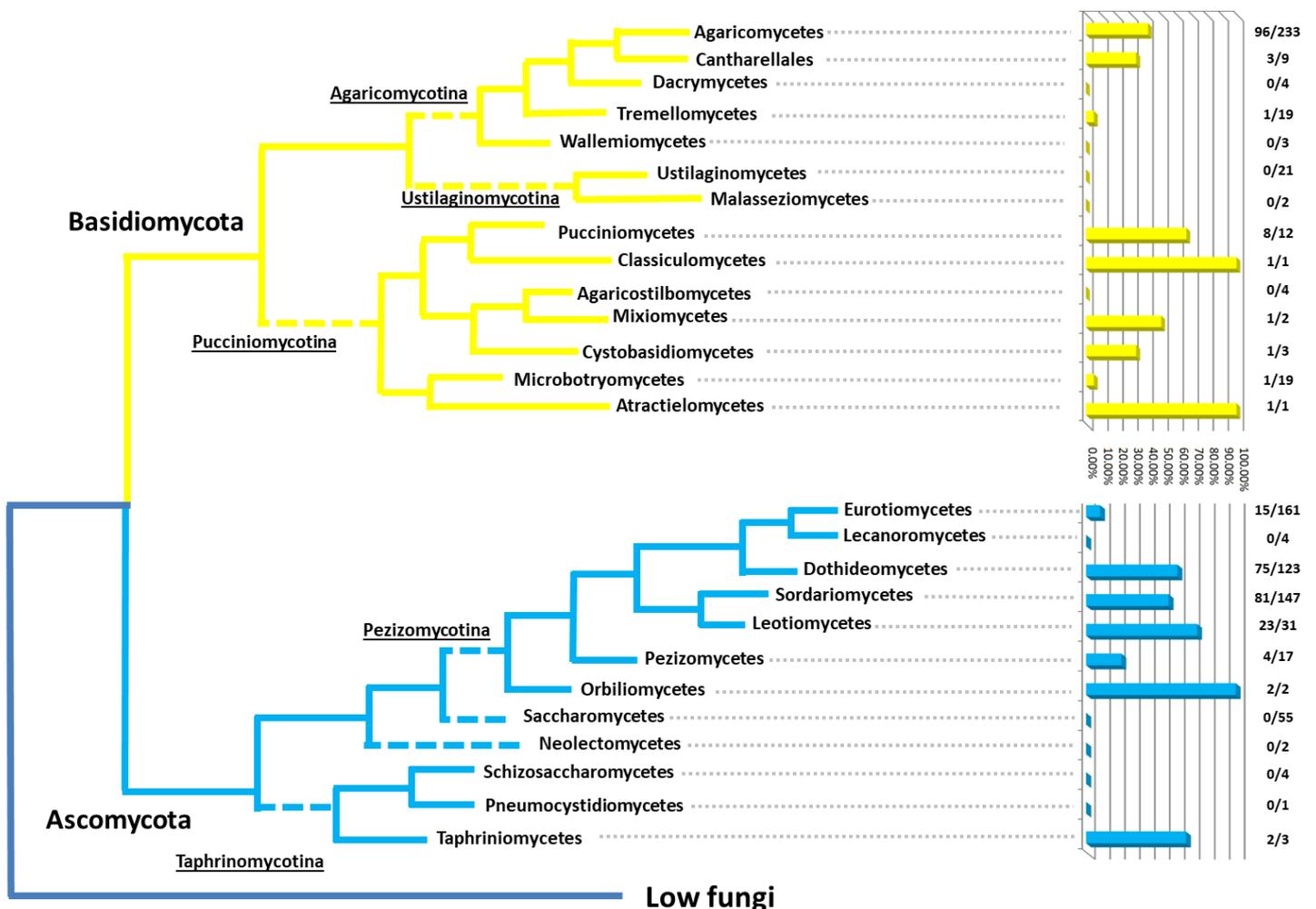


Figure 12 : Représentation schématique de la proportion d'espèces possédant une protéine SSP1-like dans chaque classe composant les champignons supérieurs (basé sur la base de données du JGI). Le nombre d'espèces présentant une SSP1-like par rapport au nombre de génome disponible est également reporté.

B) Clusterisation des 1057 SSP1-like

Pour affiner cette analyse, nous avons travaillé en collaboration avec une équipe de mathématiciens de l'Université de Bourgogne Franche Comté spécialisés dans l'analyse évolutive des génomes (Christophe Guyeux et Jean Claude Charr). Le but de cette étude était d'identifier, par des méthodes plus robustes que la phylogénie réalisée en Figure 1, des clusters de séquences par le biais d'une méthode de calcul basé sur une matrice de similarité entre les séquences deux à deux. Par cette méthode, 8 clusters de taille et de composition différentes ont ainsi pu être identifiés (Figure 13).

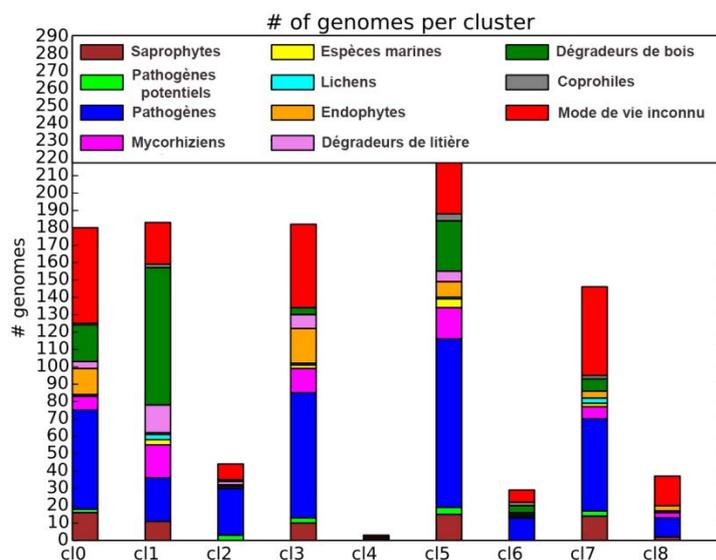
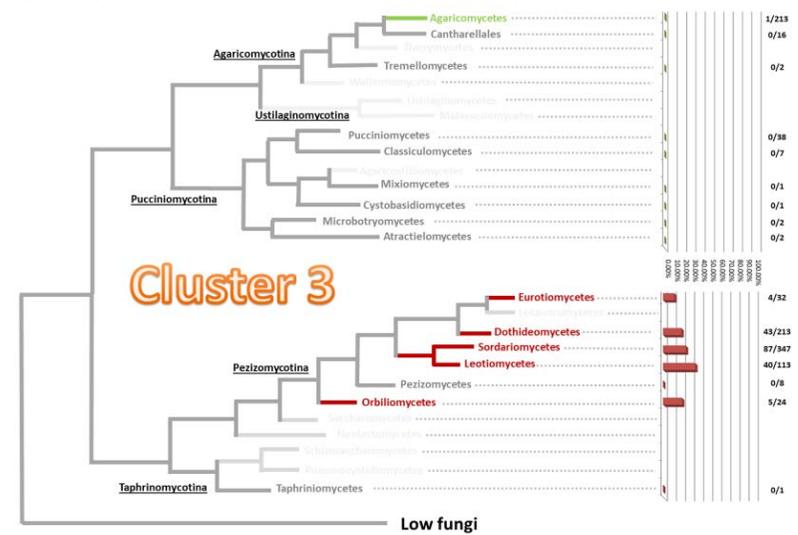
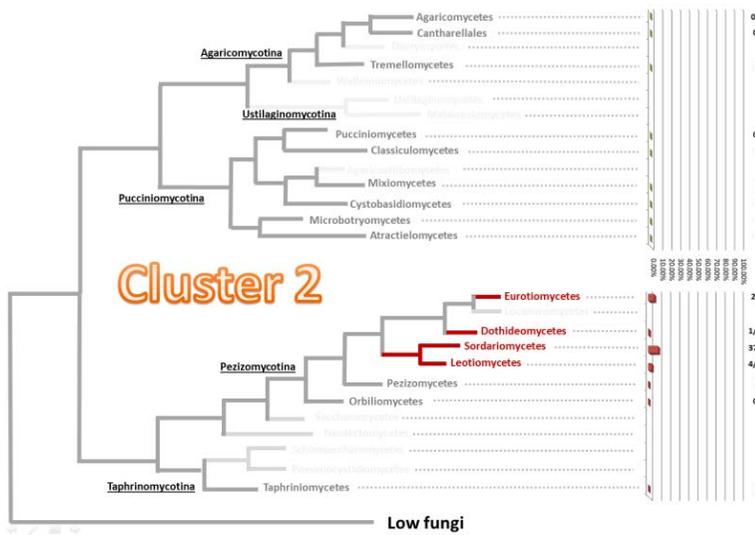
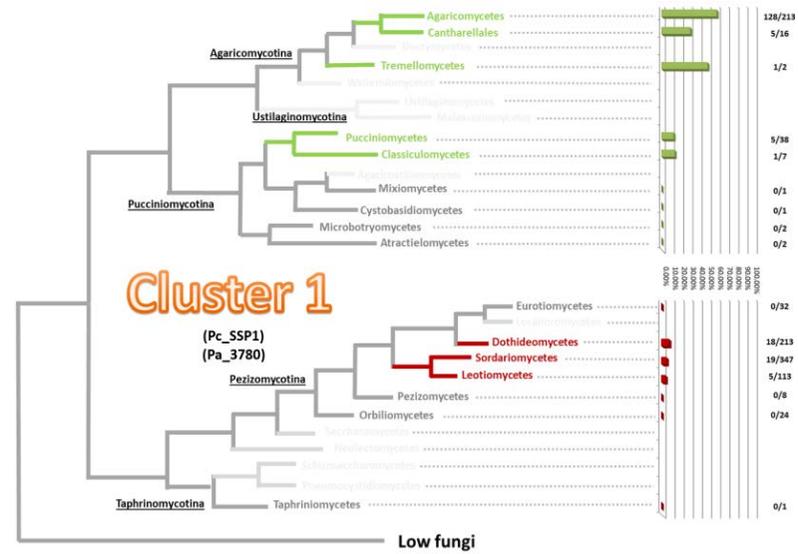
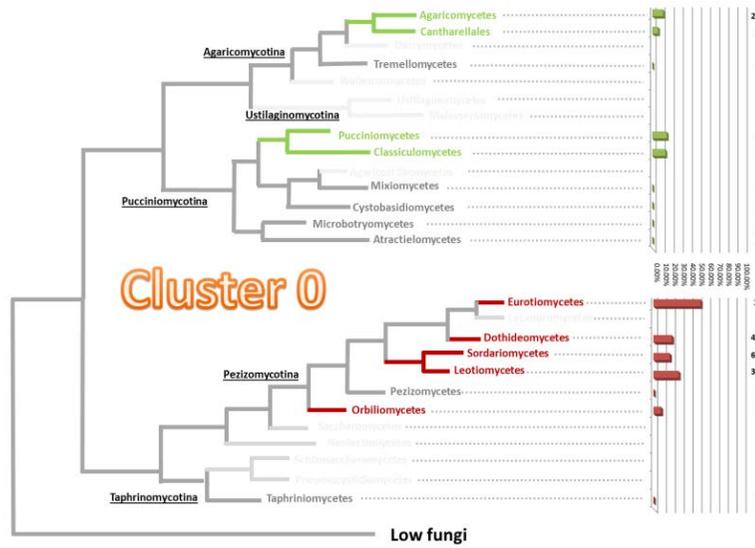


Figure 13 : Histogrammes représentant le nombre d'espèces possédant une SSP1-like dans les 8 différents clusters identifiés par le biais d'une matrice de similarité. La répartition des espèces en fonction de leur mode de vie est symbolisée par des couleurs.

La clusterisation des séquences n'est pas dépendante du mode de vie des champignons. En effet, globalement, des représentants de chaque mode de vie sont retrouvés dans chaque cluster. Cependant des différences dans les proportions de ces champignons par cluster peuvent être détectées dans certains cas. C'est le cas pour les dégradeurs de bois qui sont retrouvés majoritairement dans les clusters 0, 1 et 5.

Chaque cluster a ensuite été analysé plus en détail. La Figure 14 présente la répartition des séquences de chaque cluster en fonction de la taxonomie des champignons. Les séquences de basidiomycètes sont essentiellement regroupées dans les clusters 1 et 5. La répartition des séquences d'ascomycètes est bien plus hétérogène. Les clusters 0, 1 et 5 par exemple regroupent plusieurs séquences d'ascomycètes, en particulier des sordariomycètes, et des séquences de basidiomycètes. Les séquences de Pc_SSP1 de *P. chrysosporium* et Pa_3780 de *P. anserina* sont regroupées dans le cluster 1. Ce cluster comprend essentiellement des séquences



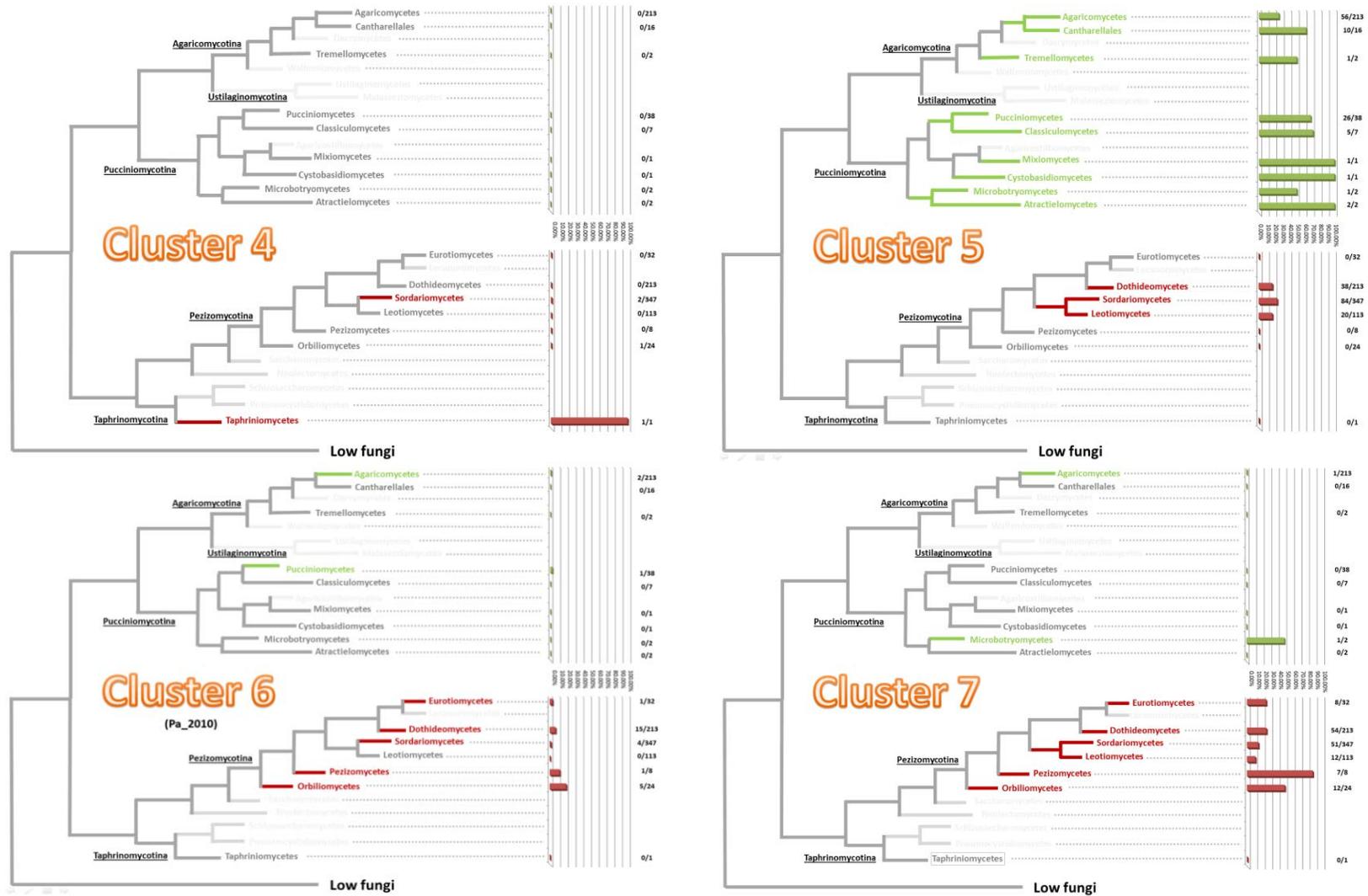


Figure 14 : Répartition par cluster des protéines SSP1-like dans les différents taxons. On retrouve en rouge les ascomycètes et en vert les basidiomycètes. L'arbre utilisé est une représentation schématique de celui proposé sur le site du JGI (<https://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>).

d'agaricomycètes et de sordariomycètes et dothideomycètes, suggérant que la présence de ces séquences n'est pas exclusivement liée à la taxonomie des espèces. La séquence Pa_2010 diverge des deux autres et est présente dans le cluster 6 qui ne représente que peu de génomes (Figure 13) et contient essentiellement des séquences de pezizomycotina.

II) Conditions d'expression des gènes *ssp1*, 3780 et 2010

Partant de l'hypothèse que ces protéines pourraient être impliquées dans le maintien de la paroi fongique, différents agents ont été testés pour induire un stress pariétal, dans le but de suivre à la fois (i) la croissance des champignons en présence de ces composés et (ii) l'expression des 3 gènes d'intérêt dans ces conditions de stress. Les composés choisis sont :

- Le rouge Congo car il inhibe l'assemblage des chaînes de glucane dans la paroi.
- Le calcofluor qui se fixe à la chitine et entraîne une surproduction anormale de ce polymère, perturbant l'intégrité cellulaire.
- La caspofungine a été choisie en tant qu'antifongique inhibant l'activité des glucane-synthases.
- Le sorbitol qui dérégule l'équilibre osmotique au niveau de la paroi provoquant ainsi une forte sortie d'eau de la cellule.
- Les extraits de chênes qui contiennent des molécules en mélange qui présentent des activités antifongiques (Valette *et al.*, 2017).

A) Tests de croissance de *P. anserina* et *P. chrysosporium*

Des premiers tests de sensibilité avaient déjà été réalisés sur *P. chrysosporium* et *P. anserina* en présence de rouge Congo ($150\mu\text{g.mL}^{-1}$) et d'extraits de chêne ($4\text{mg}/20\text{mL}$). Nous avons donc opté pour l'utilisation des mêmes concentrations pour nos tests. Les concentrations pour les autres agents ont été choisies en fonction des données de la littérature, à savoir 1M pour le sorbitol (Ram *et al.*, 1998), $25\mu\text{g.mL}^{-1}$ pour le calcofluor (Roncero *et al.*, 1988) et 500ng.mL^{-1} pour la caspofungine (Lesage *et al.*, 2004).

La comparaison des différents résultats obtenus (Figure 15) permet dans un premier temps déjà de remarquer une résistance de *P. chrysosporium* à tous ces agents, résistance qui va même jusqu'à la dégradation du rouge Congo et du calcofluor. Pour *P. anserina* en revanche, la souche s'est avérée être beaucoup plus sensible aux agents utilisés que *P. chrysosporium*.

Des inhibitions de croissance sur les milieux avec sorbitol 1M, caspofungine 500ng.mL⁻¹ et calcofluor 25µg.mL⁻¹ ont aussi pu être remarquées, avec néanmoins une inhibition partielle pour les deux premiers et totale pour le troisième composé. Pour la caspofungine une modification de l'aspect du mycélium est également notable avec une croissance moins diffuse et plus dense. Enfin, une coloration différente et une modification de l'aspect du mycélium sont à noter pour la culture sur extraits de chêne.

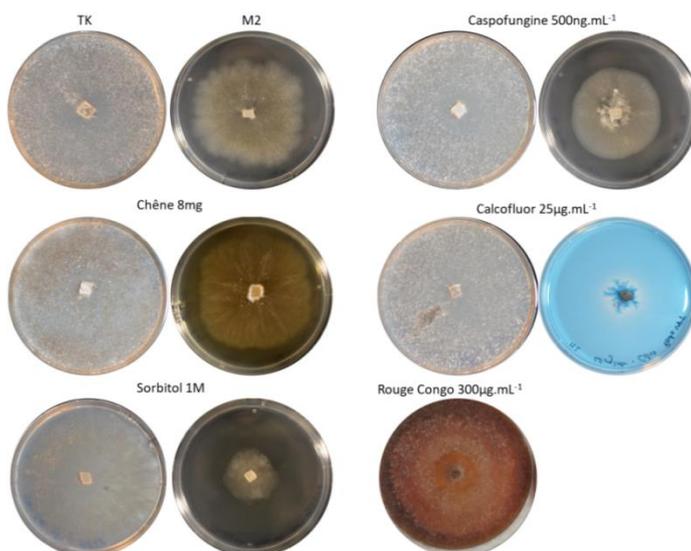


Figure 15 : Culture de *P. chrysosporium* et *P. anserina* sur milieu TK/M2 + agents chimiques afin de tester la sensibilité des deux organismes à ces agents. Pour chaque couple de photos, à gauche = *P. chrysosporium* ; à droite = *P. anserina*.

B) Analyse de l'expression des gènes *ssp1*, *3780* et *2010*

Les tests de sensibilité de ces souches aux différents agents chimiques nous ont permis de choisir les concentrations à utiliser pour la suite des analyses de l'expression des gènes. Des cultures ont été réalisées en milieu liquide (M2 pour *P. anserina* et TK pour *P. chrysosporium*) avec ajout d'extraits de chêne (4mg/15mL), de caspofungine 400ng.mL⁻¹, de sorbitol 1M, de calcofluor 6,25µg.mL⁻¹ (concentration minimale utilisée permettant le développement de *P. anserina*) ou de rouge Congo 150µg.mL⁻¹. Après 4 jours pour *P. chrysosporium* et 7 jours pour *P. anserina* la biomasse a été récupérée pour en extraire les ARN totaux. Les concentrations obtenues sont indiquées en Annexe 7. Une gamme de concentration en ADNc de la condition contrôle a été réalisée pour vérifier l'efficacité des oligonucléotides et déterminer la concentration en ADNc optimale pour les qPCR sur les différents échantillons (Figure 16). Pour *P. chrysosporium*, 2µL à une concentration de 0,2ng.µL⁻¹ ont été retenus, et pour *P. anserina* nous nous sommes placés à 5ng.µL⁻¹. Ces premières observations suggèrent que Pc_SSP1 est naturellement plus exprimée chez *P. chrysosporium* par rapport aux deux isoformes de *P. anserina*.

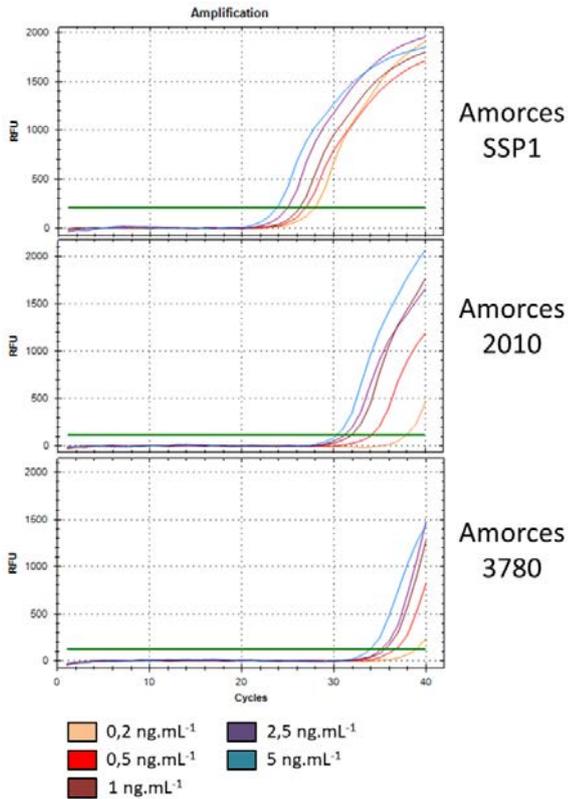


Figure 16 : Graphiques représentant les courbes de fluorescence obtenues pour les tests d'efficacité des trois couples d'amorces par réalisation d'une gamme de concentration en ADNc.

Tableau 1 : Ratios d'expression des gènes *ssp1*, *3780* et *2010* par rapport à la condition contrôle, obtenus par qPCR. Les extractions d'ARN sur les cultures de *P. anserina* en présence de sorbitol ont fourni des quantités trop faibles pour réaliser une qPCR. Les valeurs indiquées entre parenthèses semblent aberrantes et nécessiteront une confirmation

Conditions	<i>P. chrysosporium</i>			<i>P. anserina</i>	
	<u><i>ssp1</i></u>	<u><i>3780</i></u>	<u><i>2010</i></u>		
Extraits de chêne	0,40	(28250,33)	(4433,42)		
Rouge Congo	3,07	10,61	4,76		
Sorbitol	5,16				
Caspofungine	1,91	856,53	50,17		
Calcofluor	1,02	104,63	19,59		

Pour *P. chrysosporium* *ssp1* est exprimé plus fortement lorsque le champignon pousse dans un milieu additionné de rouge Congo et de sorbitol (respectivement 3,07 et 5,16 fois). (Tableau 1). Pour les extraits de chêne en revanche on observe une inhibition du gène. Enfin, en présence de caspofungine et de calcofluor, l'induction des gènes ne semble pas varier aux concentrations utilisées. Il est ici nécessaire de rappeler que la concentration en calcofluor utilisée ($6,25\mu\text{g.mL}^{-1}$) a été choisie pour être en adéquation avec la concentration utilisée pour *P. anserina*. Mais cette concentration semble trop faible pour avoir un effet chez *P. chrysosporium* qui dégrade complètement le composé (Figure 15). Pour *P. anserina* en revanche les ratios d'expression sont bien plus élevés et ce pour chaque traitement. Ces résultats suggèrent que Pa_3780 et Pa_2010 sont induits dans toutes les conditions. Cependant ces résultats restent à confirmer puisque la qualité des ARN de *P. anserina* sur gel n'était pas aussi probante que celles des ARN de *P. chrysosporium*, malgré des ratios de qualité acceptables (Annexe 7). De plus, les valeurs d'induction obtenues en présence d'extraits de chêne sont très élevées, ce qui pourrait être dû à une amplification anormalement faible du gène de référence dans la condition en présence de chêne (Ct=38) par rapport à la condition contrôle (Ct=25).

III) Analyse fonctionnelle des protéines Pc_SSP1, Pa_2010 et Pa_3780

A) Analyse phénotypique des simples mutant $\Delta 3780$ et $\Delta 2010$ et du double mutant $\Delta 3780\text{-}\Delta 2010$ chez *P. anserina*

Pour les analyses fonctionnelles, les trois mutants de *P. anserina* ($\Delta 3780$, $\Delta 2010$ et $\Delta 3780\text{-}\Delta 2010$) ont été soumis aux mêmes traitements que le sauvage afin de voir si les délétions entraînaient l'apparition d'un phénotype particulier (Figure 17). Le mutant $\Delta 3780$ présente une réduction de croissance par rapport au sauvage sur tous les milieux et même le M2 seul, il n'est donc pas possible d'attribuer ce phénotype aux agents utilisés. Le mutant $\Delta 2010$ et le double mutant présentent tous les deux un phénotype similaire avec un aspect granuleux et la présence de structures aériennes sur le milieu M2. Mais là encore les agents utilisés n'induisent pas de phénotype clairement visible par rapport à la condition contrôle.

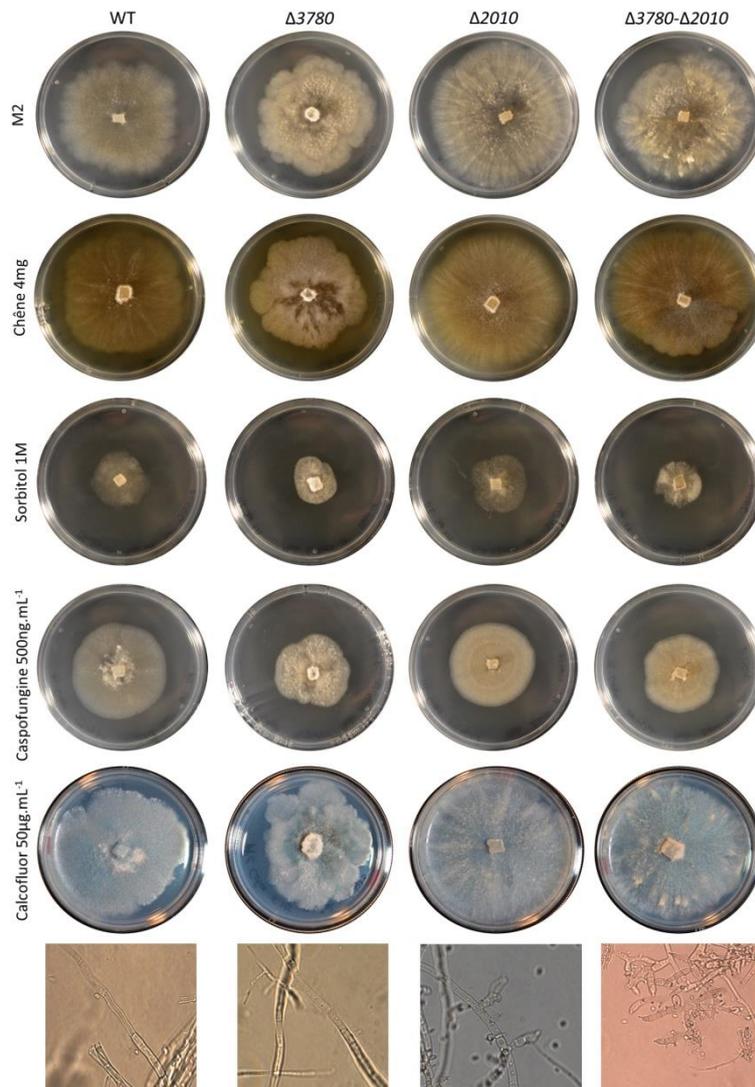


Figure 17 : Cultures de *P. anserina* WT, $\Delta 2010$ et $\Delta 3780\text{-}\Delta 2010$ sur milieu M2 + agents chimiques. Les photos en bas de l'image ont été prises par microscope à épi-fluorescence à partir des boîtes avec calcofluor.

Les structures aériennes pour les deux mutants ayant la délétion du gène *2010* ont été retrouvées sur plusieurs boîtes et une formation gélatineuse a même pu être observée (Figure 18). Les analyses microscopiques menées par la suite ont révélé que cette structure était en réalité un amas d'hyphes.

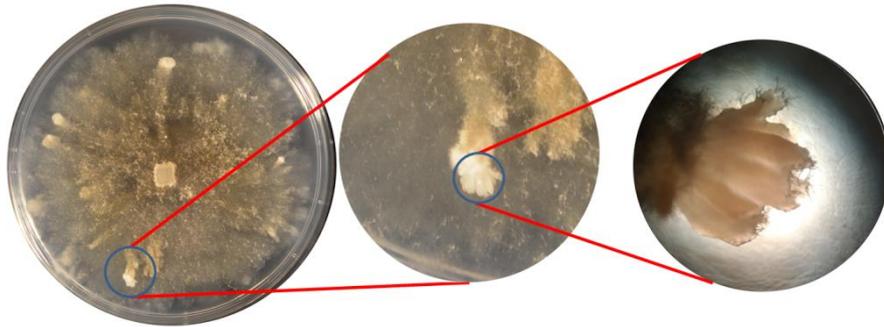


Figure 18 : Structure aérienne présente chez le double mutant $\Delta 3780\text{-}\Delta 2010$ cultivé sur milieu M2.

La microscopie a également permis de montrer que pour les quatre conditions génétiques, si la souche WT présente un phénotype classique, une modification de l'aspect des cellules avec l'apparition de nombreux bourgeonnements latéraux peut être remarquée chez les mutants ainsi que la présence d'une multitude de petites structures rondes qui pourraient correspondre à une prolifération de spermaties (gamètes mâles). Ce phénotype est en cours de confirmation puisque la prolifération de spermaties peut également être due à une mutation appelée "incolore" qui peut survenir lorsque les souches sont stockées dans un réfrigérateur dont la température est supérieure à 4°C.

B) Tests de complémentation fonctionnelle du mutant $\Delta gas1$ chez *S. cerevisiae*

Pour étudier la fonction des trois protéines et leur potentielle implication dans le remodelage de la paroi, des tests de complémentation du mutant $\Delta gas1$ ont été réalisés.

1) Tests de sensibilité du mutant $\Delta gas1$ chez *S. cerevisiae*

La première chose à faire a été de déterminer les concentrations pour chaque composé à utiliser, celles pour lesquelles une différence entre la souche sauvage et le mutant $\Delta gas1$ était la plus visible. Le rouge Congo, le sorbitol et les extraits de chêne ayant déjà été testés auparavant par l'équipe ces phases de tests n'ont concerné que le calcofluor et la caspofungine (Figure 19). Les tests en gouttes ont été réalisés pour des dilutions allant de 10^0 à 10^{-4} en partant d'une culture à une densité optique à 600nm de 0,6.

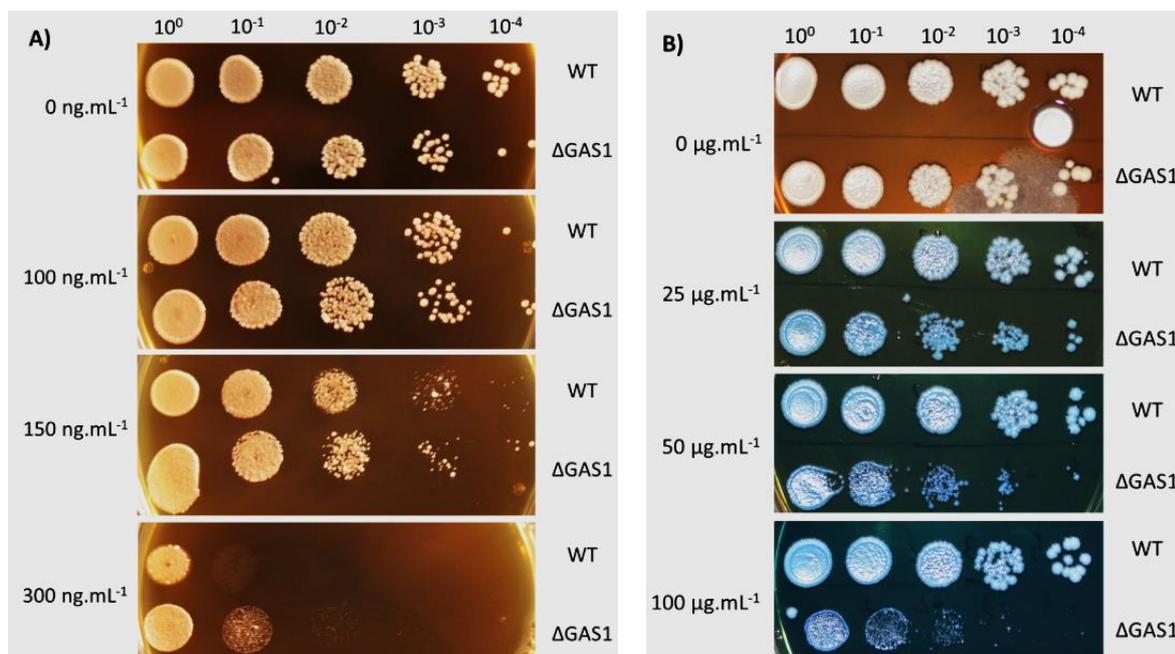


Figure 19 : Cultures de *S. cerevisiae* par la méthode des tests en gouttes afin de tester l'impact de différentes concentrations en caspofungine et en calcofluor sur la souche sauvage et le mutant *Δgas1*. A) Tests sur caspofungine ; B) Tests sur calcofluor.

Pour la caspofungine, on peut remarquer qu'à forte concentration le mutant *Δgas1* se développe plus que la souche sauvage. Pour le calcofluor il est clair ici que la délétion de *gas1* entraîne l'apparition d'un phénotype de sensibilité qui est bien marqué à 50 et 100µg.mL⁻¹. Au vu de ces résultats, deux concentrations ont donc été retenues pour les tests de complémentation fonctionnelle : 150 et 300ng.mL⁻¹ pour la caspofungine et 50 et 100µg.mL⁻¹ pour le calcofluor.

2) Tests de complémentation fonctionnelle

Après avoir transformé le mutant *Δgas1* avec le plasmide p426GPD comportant les gènes *3780*, *2010*, *ssp1* ainsi qu'avec le plasmide vide, des tests en gouttes ont été réalisés sur le milieu YPD en présence des 5 différents composés (Figure 20). Les extraits de chêne ne sont pas présentés puisqu'ils n'induisent aucune sensibilité chez le mutant à des concentrations allant jusque 16mg/boite.

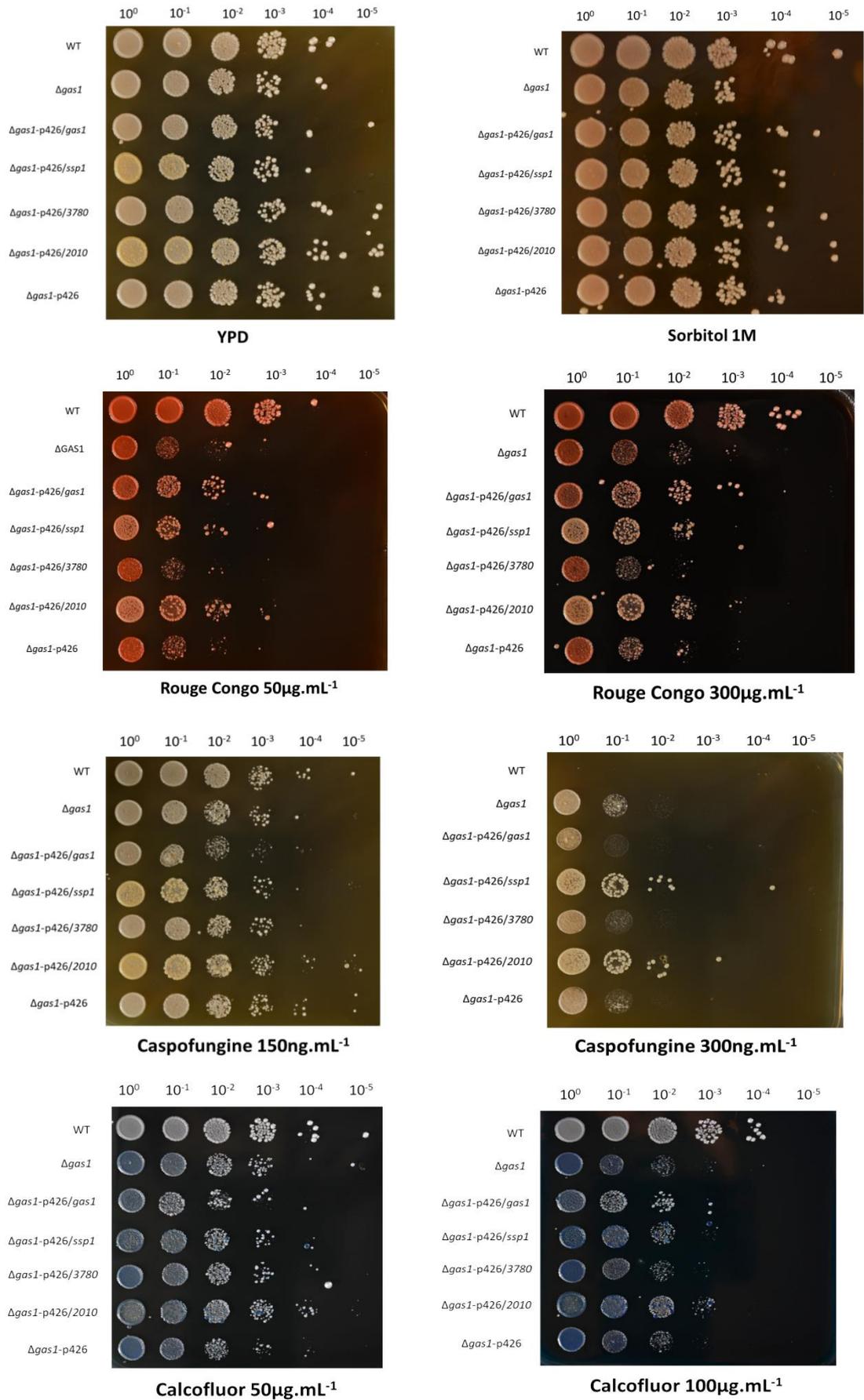


Figure 20 : Résultats des tests en gouttes de cultures de *S. cerevisiae* WT, mutant *Δgas1* et les 5 transformants sur des boîtes d'YPD contenant les différents agents chimiques sur le WT. Les boîtes ont été placées 3 jours à 30°C.

Ces tests confirment que le rouge Congo et le calcofluor induisent une inhibition de croissance du mutant par rapport à la souche sauvage, alors que la caspofungine à $300\mu\text{g.mL}^{-1}$ inhibe davantage la croissance de la souche sauvage comparée au mutant Δgas1 .

La transformation par le plasmide p426-GPD portant le gène *gas1* restaure partiellement le phénotype sauvage. En revanche pour le milieu avec caspofungine 150ng.mL^{-1} la surexpression de Gas1 entraîne une perte de croissance par rapport au mutant et au sauvage. L'explication ici va de pair avec celle expliquant le non développement de la souche sauvage sur caspofungine 300ng.mL^{-1} à l'instar des mutants Δgas1 . Chez *S. cerevisiae*, étant donné que la délétion de *gas1* entraîne la diminution du taux de glucane au sein de la paroi au profit d'une augmentation de la quantité de chitine (Ragni *et al.*, 2007) cela pourrait vouloir signifier une réduction de la production de glucanes. Étant donné que la caspofungine inhibe également cette production au niveau des glucane-synthases, l'effet sera moins fort si cette production est déjà faible comme chez le mutant Δgas1 . Une surproduction de Gas1 va donc entraîner des perturbations dans le développement dès une concentration de 150ng.mL^{-1} , alors que dans le cas du sauvage cette inhibition est atteinte à plus haute concentration.

Pour les mutants surexprimant Pa_2010 et Pc_SSP1, en particulier sur rouge Congo et caspofungine 300ng.mL^{-1} , la complémentarité permet un meilleur développement que le mutant mais il s'est avéré que ces phénotypes étaient dus à une contamination bactérienne.

IV) Production de protéines recombinantes et analyses biochimiques

A) Production de Pc_SSP1

Pc_SSP1 a été produite et purifiée avec succès chez *E. coli*. Après extraction, purification et concentration, l'extrait protéique contenant Pc_SSP1 a été fractionné sur FPLC afin d'estimer la taille et l'état d'oligomérisation de la protéine.

Sur le profil FPLC, deux pics sont observables aux alentours des fractions A4 et A13, et trois légers épaulements sont également identifiables aux niveaux des fractions B9, B14 et C6 (Figure 21). Pour vérifier la nature de ces pics, $15\mu\text{L}$ des sept fractions mises en avant sur le profil FPLC ont été déposés sur gel (Figure 22).

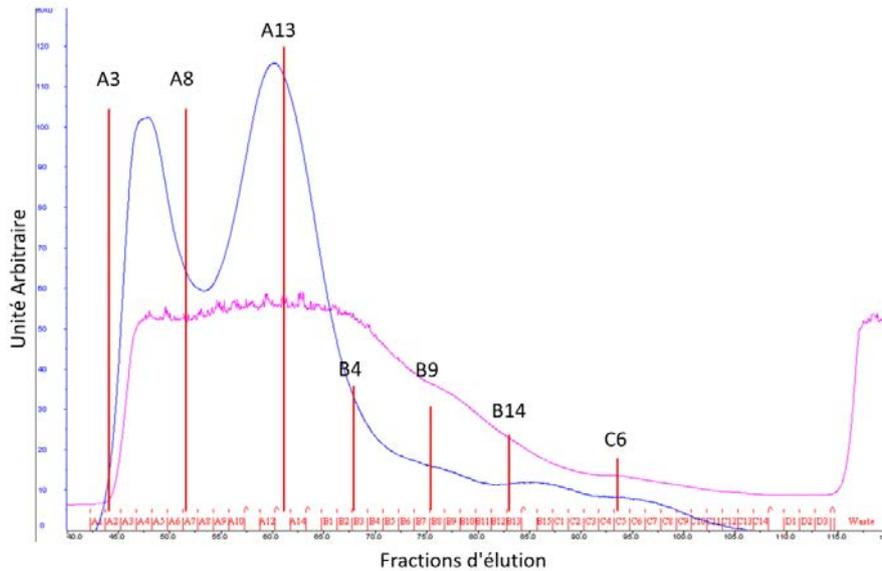


Figure 21 : Profil FPLC de l'extrait protéique contenant Pc_SSP1 purifié. La courbe bleue représente l'absorbance à 280nm et la courbe rose l'absorbance à 214nm.

La bande retrouvée aux alentours de 25kDa correspond bien à la protéine Pc_SSP1 et la bande à 15kDa est une forme clivée de cette dernière. La grande majorité des protéines ont été récupérées dans les fractions correspondant au second pic de la courbe d'absorbance à 280nm. Ce pic correspond à des tailles allant de 180 à 230kDa, ce qui montre que la protéine Pc_SSP1 se trouve majoritairement sous forme agrégée.

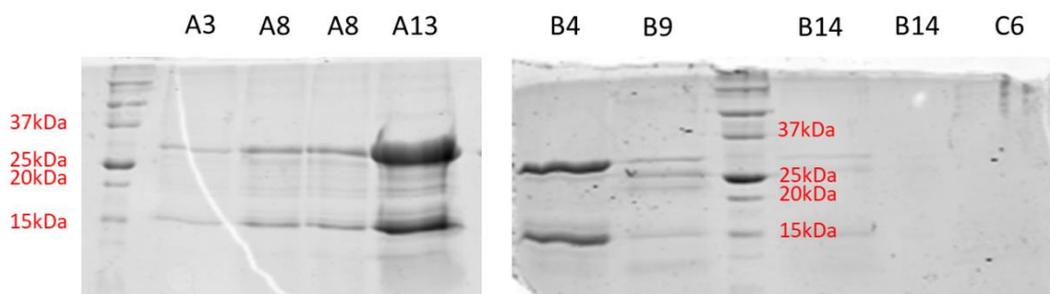


Figure 22 : Migration sur gel de polyacrylamide 15% des 7 fractions retenues après passage de l'échantillon protéique sur FPLC.

La protéine a ensuite été dosée dans les fractions allant d'A3 à B7 puis l'activité β -glucuronidase a été mesurée dans ces fractions afin de déterminer dans un premier temps si cette protéine possédait cette activité, et dans un second temps de déterminer sous quelle forme Pc_SSP1 était la plus active. Ces tests avaient déjà été réalisés au laboratoire, il s'agissait ici de confirmer les premiers résultats obtenus. L'activité β -glucuronidase a été identifiée uniquement dans les fractions A3 à A9, et atteint une valeur maximum de $0,48 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ dans la fraction A6 (Figure 23). Cette fraction correspond à une molécule avec une taille de 483,44 kDa, ce qui revient à un multimère d'environ 20 unités. Bien que cette activité soit très faible, nous avons pu la confirmer dans cette nouvelle expérience.

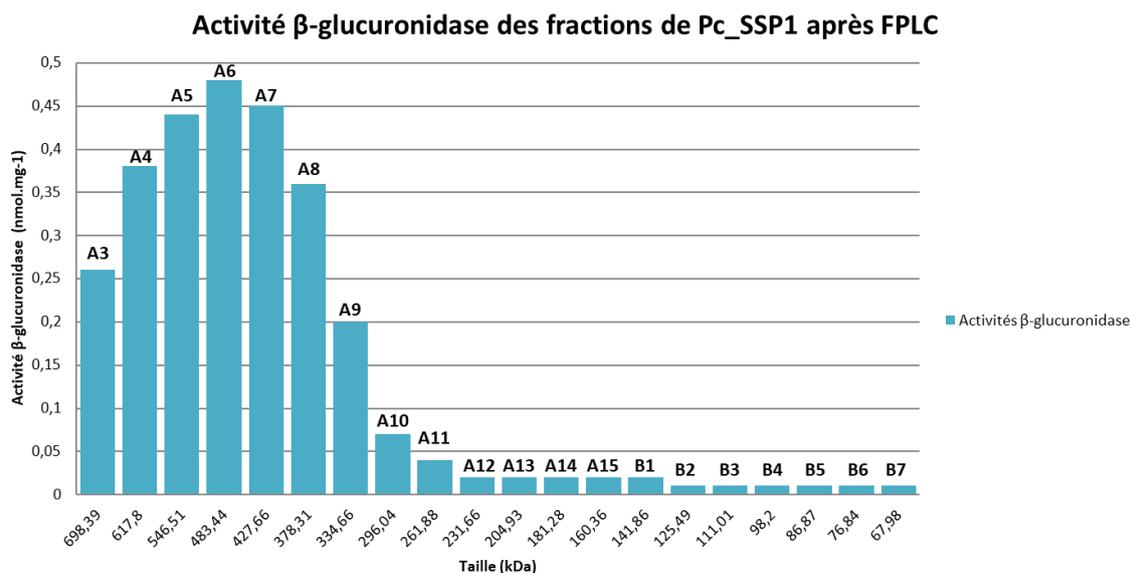


Figure 23 : Histogramme présentant les activités β -glucuronidase des différentes fractions FPLC de Pc_SSP1

B) Production de Pa_2010 et Pa_3780

Dans le but de caractériser les propriétés biochimiques et l'activité de ces protéines en comparaison avec Pc_SSP1, des tests de production ont également été réalisés chez *E. coli*. Malgré de nombreuses tentatives de production chez la souche BL21 ou chez différentes version de Rosetta 2, des inductions à l'IPTG et avec le milieu ZYM5051, la production de ces deux protéines s'est révélée infructueuse (Figure 24). Les profils protéiques des souches transformées sont tous similaires à la souche témoin et aucune bande supplémentaire n'est visible à la taille attendue (37 et 40kDa pour Pa_3780 et Pa_2010 respectivement).

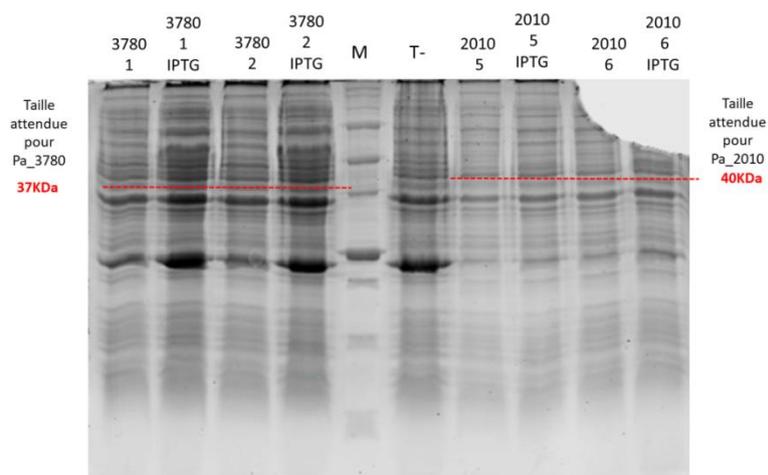


Figure 24 : Vérification des tests de production sur gel de polyacrylamide 15%. M) marqueur de taille ; T-) Témoin Rosetta ne portant pas le plasmide.

D'autres souches de production sont actuellement testées pour pallier à ce problème.

Discussion

Dans le but de déterminer la fonction de la protéine Pc_SSP1 de *P. chrysosporium*, l'objectif était ici de rechercher si les évolutions des protéines SSP1-like étaient liées au mode de vie des champignons. Les protéines SSP1-like, bien que majoritairement retrouvées dans les génomes des champignons dégradateurs de bois se retrouvent également dans les génomes d'espèces mycorhiziennes ou pathogènes par exemple. De plus, ces gènes ont été identifiés à la fois chez des basidiomycètes et des ascomycètes. Ces résultats suggèrent que la présence d' SSP1 dans les génomes ne dépend pas du mode de vie des champignons ni de leur taxonomie. Il reste à déterminer la raison pour laquelle ces isoformes ne sont pas uniformément réparties dans les différents groupes. Cependant le nombre de génomes séquencés n'étant pas homogènes dans les classes fongiques, l'aspect quantitatif de ces analyses est difficile à réaliser. Par exemple au sein des basidiomycètes, 233 génomes sont disponibles pour les agaricomycètes alors que seulement 12 le sont chez les pucciniomycètes.

D'un point de vue fonctionnel, une isoforme d'un basidiomycète dégradateur de bois et deux isoformes d'un ascomycète coprophile ont été comparées. Les résultats ont montré une forte induction des trois gènes en condition de stress pariétal avec différents agents mais une inhibition de *ssp1* pour la culture en présence d'extraits de chênes. Ces premiers résultats sont donc en faveur d'un rôle de ces trois protéines dans un mécanisme de résistance au stress pariétal. Les ratios d'expression plus importants chez *P. anserina* peuvent s'expliquer par le fait que cette espèce fongique ne possède pas de système de dégradation extracellulaire poussé, ce qui le laisse ainsi sujet à de forts stress pariétaux. Au contraire, *P. chrysosporium* possédant un important système de dégradation va pouvoir dégrader une partie de ces composés et ainsi réduire le stress subit. Pour étayer cette conclusion, le calcofluor est le composé entraînant le ratio d'expression le plus bas et on remarque sa totale dégradation par le champignon sur boîte. Le lien entre le stress induit par ces agents chimiques et ces surexpressions reste à confirmer mais cela supporte l'hypothèse qui est que Pc_SSP1, Pa_2010 et Pa_3780 seraient impliquées dans un mécanisme de remodelage de la paroi. Cette hypothèse est en accord avec les résultats obtenus lors de l'analyse phénotypique des mutants délétés qui montrent un développement anormal des hyphes. Une des perspectives sera la complémentation fonctionnelle de ces mutants par les quatre gènes (*ssp1*, *gas1*, *3780* et *2010*). Pour cela, les clonages de ces gènes dans un plasmide d'expression optimisé pour *P. anserina* (pAKS125) ont été ébauchés.

D'un point de vue biochimique, nous avons pu montrer une activité β -glucuronidase pour la protéine Pc_SSP1. Cette activité déjà décelée auparavant par l'équipe (résultats non publiés), reste tout de même très faible, ne dépassant pas $0,48\text{nmol.mg}^{-1}$. A titre de comparaison, l'enzyme β -glucuronidase humaine possède une activité dépassant les 400nmol.mg^{-1} . Il faut tout de même rappeler que la protéine Pc_SSP1 a été produite ici chez *E. coli* et n'a donc pas subi les modifications post-traductionnelles qu'elle subit lors de sa production chez *P. chrysosporium*. Les prédictions en ligne ont par exemple montré trois potentiels sites de glycosylation pour la protéine.

Donc si cette protéine possède une activité de clivage de sucres, les liaisons osidiques des glucuronides ne sont très probablement pas le substrat naturel de cette enzyme, d'où la faible valeur d'activité. L'insertion du gène dans le plasmide pPICZ α permettant la production protéique chez la levure *Pichia pastoris* (espèce eucaryote couramment utilisée pour la production de protéines recombinantes) a également été réalisée afin de pouvoir tester la production et l'expression chez cette dernière et dans un second temps de tester l'activité de clivage des sucres sur d'autres substrats comme le laminarin (forme de stockage des glucanes).

Durant ce stage, différentes approches ont été utilisées pour préciser le rôle de protéines jusqu'alors inconnues. Bien que ces expériences doivent être confirmées par des réplicats biologiques, les résultats des analyses de séquences et des tests de complémentation fonctionnelle laissent penser que ces trois protéines sont différentes de Gas1 dont le rôle est connu dans le remodelage de la paroi. Cependant, le mutant délété pour *2010* présente un phénotype d'altération de la structure des hyphes même en l'absence d'agents chimiques, suggérant que la protéine pourrait avoir un rôle dans le développement fongique. En revanche, Pc_SSP1 de *P. chrysosporium* pourrait avoir un rôle plus spécifique dans la résistance aux extractibles puisque c'est la seule condition entraînant une induction du gène.

Références

Références bibliographiques

- Arantes, V., Milagres A. M. F., Filley T. R., Goodell, B., (2011). Lignocellulosic polysaccharides and lignin degradation y wood decay fungi: the relevance of nonenzymatic Fenton-based reactions. *J Ind Microbial Biotechnol.* **Vol 38**, 541-555
- Caracuel, Z., Martinez-Rocha, A. L., Di Pietro, A., Madrid, M. P., Gonzalez-Roncero, M. I., (2005). *Fusarium oxysporium gas1* encodes a putative β -1,3-Glucanosyltransferase required for virulence on tomato plants. *Molecular plant-microbe interactions.* **Vol 11**, 1140-1147.
- Deroy, A., (2015). Evolution et adaptation des champignons saprophytes : les systèmes impliqués dans la dégradation du bois chez *Trametes versicolor*. Thèse de doctorat en Biologie Végétale et Forestière.
- Dower, W. J., Miller, J. F., Ragsdale, C. W., (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic acid research.* **Vol 16**, 6127-6145.
- Feldman, D., Kowbel, D. J., Louise Glass, N., Yarden, O., Hadar., Ytzahak, H., (2017). A role for small secreted proteins (SSPs) in a saprophytic fungal lifestyle : Ligninolytic enzyme regulation in *Pleurotus ostreatus*. *Nature.* **7 : 14553**.
- Fesel, P. H., Zuccaro, A., (2016). B-Glucan : crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. *Fungal genetics and biology.* **Vol 90**, 53-60.
- Gietz, D., St Jean, A., Schiestl, R. H., (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic acid research.* **Vol 20**, 1425.
- Hammel, K. E., Cullen, D., (2008). Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Current opinion in plant biology.* **Vol 11**, 349-355.
- Kim, K. T., Jeon, J., Choi, J., Cheong, K., Song, H., Choi, G., Kang, S., Lee, Y. H., (2016). Kingdom-wide analysis of fungal small secreted proteins (SSPs) reveals their potential role in host association. *Frontiers in Plant Science.* **Vol 7**.
- Kloppholz, S., Kuhn, H., Requena, N., (2016). A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. *Current biology.* **Vol 21**, 1204-1209.
- Lesage, G., Sdicu, AM., Ménard, P., Shapiro, J., Hussein, S., Bussey, H., (2004). Analysis of β -1,3-Glucan assembly in *Saccharomyces cerevisiae* using a synthetic interaction network and altered sensitivity to caspofungine. *Genetics.* **Vol 167**, 35-49.
- Martinez, D., Larrondo, L. F., Putnam, N., Sollewijn Gelpke, M. D., Huang, K., Chapman, J., Helfenbein, K. G., Ramiya, P., Detter J. C., Larimer, F., Coutinho, P. M., Henrissat, B., Berka, R., Cullen, D., Rokhsar, D., (2004). Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nature Biotechnology.* **Vol 22**, 695-700.

- Mouyna, I., Monod, M., Fontaine, T., Henrissat, B., Léchenne, B., Latgé, J. P., (2000). Identification of the catalytic residues of the first family of $\beta(1-3)$ glucanoyltransferase identified in fungi. *Biochem. J.* **Vol 347**, 741-747.
- Nagy, L. G., Riley, R., Bergmann, P. J., Krizsan, K., Martin, F. M., Grigoriev, I. V., Cullen, D., Hibbet, D. S., (2016). Genetic bases of fungal white rot decay predicted by phylogenomic analysis of correlated gene-phenotype evolution. *Mol. Biol. Evol.* **Vol 34**, 35-44.
- Plett, J. M., Kemppainen, M., Kale, S. D., Kohler, A., Legué, V., Brun, A., Tyler, B. M., Pardo, A. G., Martin, F., (2011). A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. *Current biology.* **Vol 21**, 1197-1203.
- Popolo, L., Vai, M., (1999). The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. *Biochimica et Biophysica Acta.* **Vol 1426**, 385-400.
- Raffaello, T., Asiegbu, F. O., (2017). Small secreted proteins from the necrotrophic conifer pathogen *Heterobasidion annosum s.l.* (HaSSPs) induce cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Scientific reports.* **7 : 8000**.
- Ragni, E., Fontaine, T., Gissi, C., Latgé, J. P., Popolo, L., (2007). The gas family of proteins of *Saccharomyces cerevisiae* : characterization and evolutionary analysis. *Yeast.* **Vol 24**, 297-308.
- Ram, A. F. J., Kapteyn, J. C., Montijn, R. C., Caro, L. H. P., Douwes, J. E., Baginsky, W., Mazur, P., Van Den Ende, H., Klis, F. M., (1998). Loss of the plasma membrane-bound protein Gas1p in *Saccharomyces cerevisiae* results in the release of $\beta 1,3$ -glucan into the medium and induces a compensation mechanism to ensure cell wall integrity. *Journal of bacteriology.* **Vol 180**, 1418-1424.
- Roncero, C., Valdivieso, M.H., Ribas, J.C., Duran, A., (1988). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to calcofluor white. *Journal of bacteriology.* **Vol 170**, 1950-1954.
- Saloheimo, M., Paloheimo, M., Hakola, S., Pere, J., Swanson, B., Nyssönen, E., Bhatia, A., Ward, M., Penttilä, M., (2002). Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *Eur. J. Biochem.* **Vol 269**, 4202-4211.
- Samalova, M., Mérida, H., Vilaplana, F., Bulone, V., Soanes, D. M., Talbot, N. J., Gurr, S. J., (2016). The β -1,3-glucanoyltransferase (Gels) affect the structure of the rice blast fungal cell wall during appressorium-mediated plant infection. *Cellular Microbiology.* **Vol 19**.
- Terauchi, Y., Kim, Y.K., Tanaka, T., Nanatani, K., Takahashi, T., Abe, Keietsu., (2017). Asp30 of *Aspergillus oryzae* cutinase CutL1 is involved in the ionic interaction with fungal hydrophobin RolA. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* **Vol 81**, 1363-1368.

Tien, M., Kirk, T. K., (1988). Lignin Peroxydase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in enzymology*. **Vol 161**, 238-249.

Thuillier, A., Chibani, K., Belli, G., Herrero, E., Dumarçay, S., Gérardin, P., Kohler, A., Deroy, A., Dhalleine, T., Bchini, R., Jacquot, J. P., Gelhaye, E., Morel-Rouhier, M., (2014). Transcriptomic responses of *Phanerochaete chrysosporium* to oak acetonic extracts : focus on a new glutathione transferase. *Applied and environmental microbiology*. **Vol 80**, 6316-6327.

Valette, N., Benoit-Gelber, I., Di Falco, M., Wiebenga, A., P. de Vries, R., Gelhaye, E., Morel-Rouhier, M., (2016). Secretion of small proteins is species-specific within *Aspergillus* sp. *Microbial Biotechnology*. **Vol 10**, 323-329.

Valette, N., Perrot, T., Sormani, R., Gelhaye E., Morel-Rouhier, M., (2017). Antifungal activities of wood extractives. *Fungal Biology Review*. **Vol 31**, 113-123.

Valette, N., (2017). "Caractérisation fonctionnelle de petites protéines sécrétées chez les champignons lignolytiques". Thèse de doctorat en Biologie Végétale et Forestière.

Annexes

Annexe 1: séquences protéiques

Pc_SSP1 :

>jgi|Phchr2|2981896|fgenesh1_kg.7_#_419_#_Locus773v1rpk365.38
MMSKLYFVAAILLGLVLSLQANAHAIITPALGVSGQTRNDVQRPSKANECGNVNVANTINTSTPVKAAADGSFTATITNFNAGVDG
SRQVTALVDASGTGKNFVPATVTVQNGDKAPTQVGSQQQLAVSLPPTKTCIGGNTKDLCLVSFTTAGGFVNCVAVQQAAAGASNGSTA
GAAAAGAAQAASGSAAAGTTATAAGAAASGTATTGKHHHHKGAANATQAQEAKEFAKLKAAAPRDYSIRGMRFAFARVRRALTSF
DEELQA*

Pa_2010 :

>Pa_6_2010
MCWQTRVSAHRGGSRPRCGGLMITTIWTRGLRELSIRSHYHPSLISQFYIFILFTLKRPGDQLSTFFYSHLSFPTSRRQGPLYNL
YHFIFHFKKHQPHELLIMSPSLTLLTLLLPVLPVTAHGAIVQATGNAGSGMALGIDTTTPRDGTRRRPFQDSTRFRGSSAQTF
GETIGAGDNQLEAGTRAILAETGDQLPQVTPGGEVSMMLHQVNADGGGPPYQCMINADATGQQWSNIQVTQNVPRNSRNRQGQTTA
FPLTASIPANQQCTGTVAGQENVCLVRCQNSARAGPFGGVVPMAGAAAGNNADNNVEVGNNGNGTDTGAANARLLARSVKASE
MKLQALIQRVELDGLDRDPVLAEFLEDFEA

Pa_3780 :

>Pa_5_3780
MYPLSTQNTLLPLAAFLPLSLVSAHGVILAAQGEADSPPSVGFVNDIAIARNCTSINPCQMDTTIIRDAEIAAGTVNSCGRTKLNG
NIDVGTVTENALAEAVTAVRQSSVDVTIHQVNADGAGPYTCDLDEGSNSGIMSHLVVSNIPGQNGLSQAAEQEFTITVTMPD
DMKCI GGSTGNVCTVRCR NAAQAGPFGGCFVAVQIDVEPAINTAKDIT TADTLEAAQFQTSANQAAFAAAVDANAKAGSSEQEQLN
AAVEAILALSTVSAEFPTLTPTINTERIVPTGTGGAQPTAALGSTFPFVENGDNNGNGNGTGNNDNPAGVNPFPVEDGNGNDNG
NGNGNGGGSGRGRGRGRNRNRNQKRYHTVEELLKRFVLPDDGN

Sace_Gas1 :

>GAS1/YMR307W
MLFKSLSKLATAAAFAGVATAADDVPAIEVVGNKFFYSNNGSQFYIRGVAYQADTANETSGSTVNDPLANYESCSRDI PYLKKLNT
NVIRVYAINTTLDHSECMKALNDADIYVIADLAAPATSINRDDPTWTVDLFNSYKTVVDTFANYTNVLGFFAGNEVTNNTNTDAS
AFVKA AIRDVRQYISDKNYRKIPVGYSSNDDTRVKMTDYFACGDDVKADFYGINMYEWCGKSDFKTSGYADR TAEFKNLSIPV
FFSEYGCNEVTPRLFTEVEALYGSNM TDVWSSGGIVMYFEETNKYGLVSI DGNDVKTLDDFNYSSEINKISPTSANTKSYSATTS
DVACPATGKYWSAATELPPTPNGGLCSMNAANSCVVSDDVSDDYETLFWICNEVDCSGISANGTAGKYGAYSFCTPKEQLSFV
MNLYYEKSGGSKSDCSFSGSATLQTATTQASCSSALKEIGSMGTNSASGSVDLGSGETSSTASSNAGSSSSKNSGSSSSSSSSSS
SSASSSSSSKNAATNVKANLAQVVFTSIIISLSIAAGVGFALV*f

Annexe 2 : cartes des plasmides

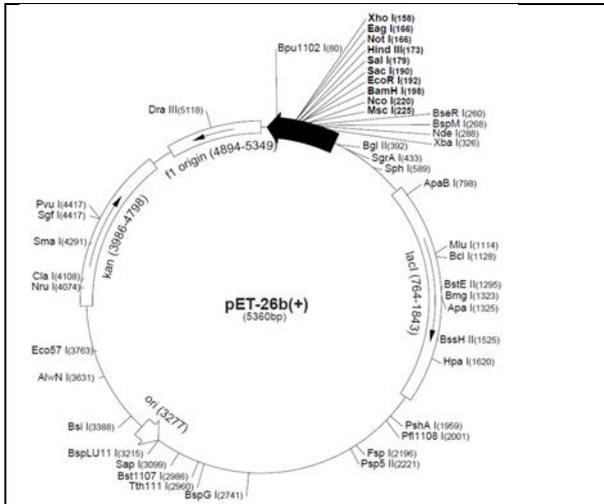


Figure 25: Carte du plasmide pET26B (d'après Novagen) ; *lacI* = gène codant le répresseur de l'opérateur *lac*, inhibant la transcription du gène inséré dans la cassette de clonage ; ori = origine de réplication du plasmide pBR3222 ; *kan* = gène conférant la résistance à la kanamycine ; f1 origin = origine de réplication du phage f1. Le gène inséré sera placé sous le contrôle du promoteur T7.

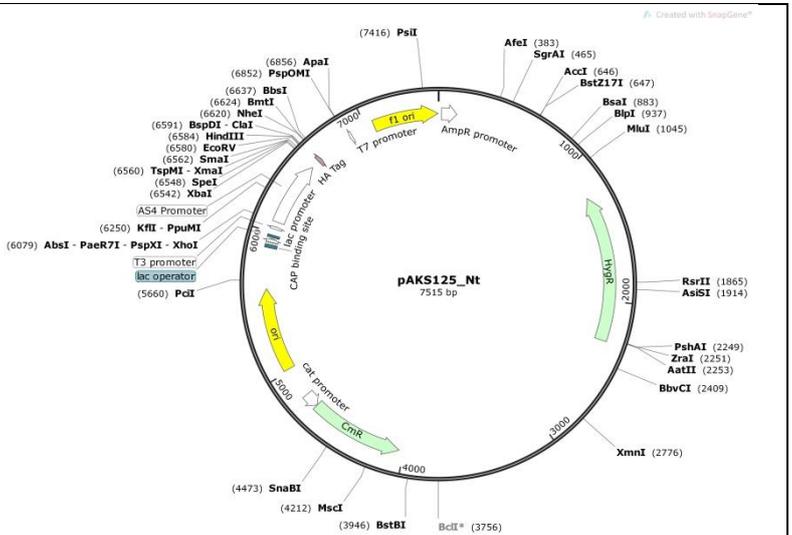


Figure 26 : Carte du plasmide pAKS125 ; *hygR* = gène conférant la résistance à l'hygromycine ; *cmR* = gène conférant la résistance au chloramphénicol ; *cat* promoteur = promoteur du gène *cat* d'*E. coli* conférant la résistance au chloramphénicol ; ori = origine de réplication ; f1 ori = origine de réplication du phage f1 ; AS4 Promoter = promoteur pour la production de protéines chez la levure ; HA Tag : Human influenza hemagglutinin epitope tag

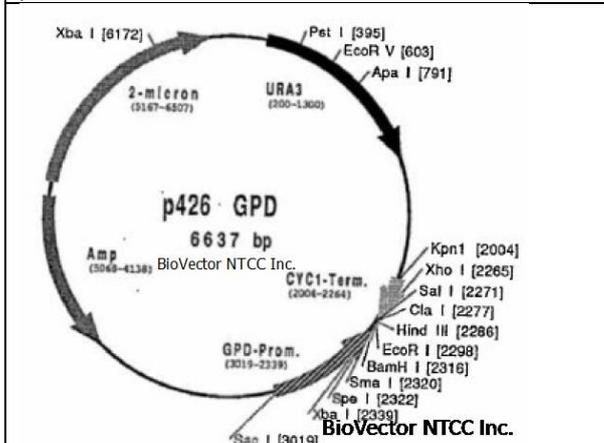


Figure 27 : Carte du plasmide p426-GPD (d'après BioVector NTCC Inc.) ; *ura3* : gène codant une Orotidine-5'-phosphate (OMP) décarboxylase chargée de convertir l'OMP en uridine monophosphate (uracil + ribose) utilisé comme marqueur de sélection ; *amp* : gène apportant la résistance à l'ampicilline ; GPD-prom = promoteur constitutif fort de *S. cerevisiae*.

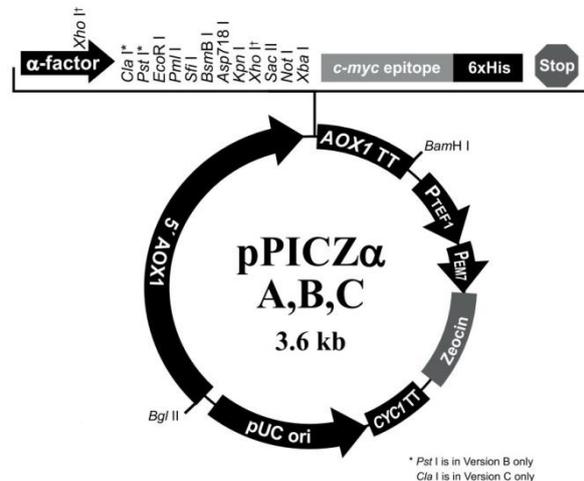


Figure 28 : Carte du plasmide pPICZα (d'après Invitrogen) ; 5' AOX1 = région de 942 pb contenant le promoteur AOX1 permettant une expression inducible au méthanol ; α-factor = signal de sécrétion de *S. cerevisiae* ; c-myc epitope = permet la détection de protéines par l'anticorps anti-myc ; 6xHis = tag histidine pour la purification de la protéine ; AOX1 TT = terminateur de transcription du gène AOX1 ; PTEF1 = promoteur d'un facteur d'élongation de *S. cerevisiae*, permettant la production de zeocin chez *P. pastoris* ; PEFT = promoteur pour la production de zeocin chez *E. coli* ; Zeocin = gène *Sh Ble* de résistance à la zeocin ; CYC1 TT = terminateur de transcription du gène CYC1 de *S. cerevisiae*, augmente la stabilité de l'ARNm pour la production de zeocin ; pUC ori = promoteur permettant la réplication du plasmide chez *E. coli*.

Annexe 3 : liste des amorces

Gène	Plasmide de destination du fragment	Nom de l'amorce	Séquence
GAS1	p426	ScGAS1- SpE -for	CCCC ACTAGT ATGTTGTTTAAATCCCTT
		ScGAS1- Bam NoSTOP-rev	CCCC GGATCC AACCAAGCAAACCGAC
	pET26	ScGAS1- Nde -for	CCCCCCC CATATG GACGATGTTCCAGCGATT
		(voir ScGAS1- Bam NoSTOP-rev ci-dessus)	
	pAKS	(voir ScGAS1- SpE -for ci-dessus)	
ScGAS1- Hind Nostop-rev		CCCC AAGCTT AACCAAGCAAACCGAC	
SSP1	p426	PcSSP1- Spe (mutHind)-for	CCCC ACTAGT ATGATGTCCA AGCTCT AT
		PcSSP1- Bam NoStop	CCCC GGATCC TGCTTGGAGCTCCTCATC
	pAKS	(voir PcSSP1- Spe (mutHind)-for ci-dessus)	
		PcSSP1- Hind Nostop-rev	CCCC AAGCTT TGCTTGGAGCTCCTCATC
3780	pET26	3780NoPEP Nde I for	CCCCCCC CATATG GCCCACGGTGT CATCCTC
		3780 Xho NoSTOP rev	CCCC CTCGAG GTTGCCATCATCGGGGAG
	pAKS	Pa3780- Spe -for	CCCC ACTAGT ATGTACCCCTTTCTACC
		Pa3780- Hind NoStop-rev	CCCC AAGCTT GTTGCCATCATCGGGGAG
		(voir Pa3780- Spe -for ci-dessus)	
2010	pET26	2010- Hind -for	CCCC AAGCTT ATGTGCTGGCAA ACTCGG
		Pa2010- Xho -NoSTOP-rev	CCCC CTCGAG AGCCTCAAAG TCCTCAA
	pAKS	Pa2010- Spe -for	CCCC ACTAGT ATGTGCTGGCAA ACTCGG
		Pa2010- Hind NoStop-rev	CCCC AAGCTT AGCCTCAAAG TCCTCAA

	Nom de l'amorce	Séquence
qPCR SSP1	SSP1QPCRfor	TATTT CGTTGCCGCCATCCT
	SSP1QPCRrev	TTGAAC CATCCACACCAGCA
qPCR 2010	QPCR-Pa2010For	TG TCGCTGGTCGGAGAATG
	QPCR-Pa2010Rev	CT CCAAGAACTCAGCCAGCA
qPCR 370	QPCR-Pa3780For	GGA ATCATGTCCCACGAGCT
	QPCR-Pa3780Rev	AT GTCTTGGCGGTGTTGAT
qPCR GPD	qPCR_GPDpodoFor	G ACTGTCAAGTTGGCATCA
	qPCR_GPDpodoRev	CG CGCTCAGTGTAGAACTTG
qPCR Actine	qPCR Actin for	CG GTACCCTTCAACACCA
	qPCR Actin rev	AG CTCAAGACCCAGGAACG

Annexe 4 : composition des milieux de cultures

Tableau 2 : Composition milieu ZYM5052

Composés	Quantités
Tryptone	10g
Extrait de levure	5g
Na ₂ HPO ₄	4,5g
KH ₂ PO ₄	3,5g
NH ₄ Cl	2,5g
Na ₂ SO ₄	1g
Glycérol (250g/L)	20mL
Lactose (100g/L)	20mL
Glucose (25g/L)	20mL
MgSO ₄ (24,6g/100mL)	1mL

Tableau 3 : Composition milieu de sporulation (Tien and Kirk., 1988)

Composés	Quantités
Glucose	10g
Malt extract	10g
Peptone	2g
Extrait de levure	2g
Asparagine	1g
KH ₂ PO ₄	2g
MgSO ₄ 7H ₂ O	1g
Thiamine HCl	1mg
Agar (si solide)	20g
H ₂ O distillée	Qsp 1L

Tableau 4 : Composition milieu TK (Tien and Kirk., 1988)

Composés	Quantités
<u>Autoclaver</u>	
Glucose 20% (80g/400mL)	50mL
Acétate de Na 100mM pH 4,5 (5,44g/100mL)	50mL
Tween 1,8% (5,4/300mL)	25mL
H ₂ O distillée	787,5mL
Agar (si solide)	20g
<u>Filtrer</u>	
CaCl ₂ (1g/100mL)	10mL
KH ₂ PO ₄ et MgSO ₄ (20 + 5g/200mL)	20mL
Traces (composition en Tableau 7)	35mL
Thiamine (6mg/30mL)	5mL
Alcool vératryl	70,2μL
MnCl ₂	5mL

Tableau 5 : Composition milieu M2

Composés	Quantités
KH ₂ PO ₄ (0,05g/mL)	5mL
K ₂ HPO ₄ (0,06g/mL)	5mL
MgSO ₄ (0,05g/mL)	5mL
Urée (0,1g/mL)	5mL
Biotine (0,1mg/mL)	0,5mL
Thiamine (0,1g/mL)	0,5mL
Oligoéléments (composition en Tableau 8)	1mL
Dextrine de pomme de terre	4g
Agar (si solide)	10g
H ₂ O distillée	980mL

Tableau 6 : Composition milieu YPD

Composés	Quantités
Extrait de levure	10g
Peptone	20g
D-Glucose	20g
Agar (si solide)	20g
H ₂ O distillée	Qsp 1L

Tableau 7 : Composition milieu YNB

Composés	Quantités
<u>Filtrer</u>	
YNB	6,75g
Drop out	1,92g
<u>Autoclaver</u>	
Glucose	20g
Agar	20g
H ₂ O distillée	Qsp 1L

Tableau 8 : Composition des éléments traces pour le milieu TK

Composés	Quantités
Nitrilotriacetate	3g
MgSO ₄	6g
NaCl	2g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,2g
CoCl ₂	0,2g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,2g
CuCl ₂	0,2g
ALK	20mg
H ₃ BO ₃	20mg
NaMoO ₄ 2H ₂ O	20mg

Tableau 9 : Composition des oligoéléments pour le milieu M2

Composés	Quantités
KH ₂ PO ₄ (0,05g/mL)	5mL
K ₂ HPO ₄ (0,06g/mL)	5mL
MgSO ₄ (0,05g/mL)	5mL
Urée (0,1g/mL)	5mL
Biotine (0,1mg/mL)	0,5mL
Thiamine (0,1g/mL)	0,5mL
Oligoéléments (composition en Tableau 8)	1mL
Dextrine de pomme de terre	4g
Agar (si solide)	10g
H ₂ O distillée	980mL

Annexe 5 : protocole d'extraction d'ARN

- 1) Ajouter 450µL de tampon RLC + 4,5µL de β-mercaptoéthanol et vortexer
- 2) Transvaser dans une colonne du kit (violette)
- 3) Centrifuger 2 minutes 14 500rpm
- 4) Transférer le surnageant dans un eppendorf
- 5) Ajouter 0,5V d'éthanol ARN free et agiter par retournement doucement
- 6) Transférer dans une colonne (rose) du kit
- 7) Centrifuger 30 secondes à 10 000rpm
- 8) Laver la membrane avec 350µL de RW1, centrifugation 30 secondes à 10 000rpm
- 9) Traitement DNase. Ajouter 80µL d'un mélange DNase + tampon
- 10) Laisser agir 30 minutes à température ambiante
- 11) Ajouter 350µL de RW1, centrifugation 30 secondes à 10 000rpm
- 12) Vider la partie liquide
- 13) Ajouter 500µL de RPE et centrifuger 30 secondes à 10 000rpm
- 14) Vider la partie liquide et remettre 350µL de RPE + centrifugation 30 secondes à 10 000rpm
- 15) Recentrifuger à vide 1 minute pour bien tout éliminer
- 16) Enlever le tube de récupération, et le remplacer par un eppendorf ARN free
- 17) Ajouter 200µL d'H₂O DEPC (celle du kit)
- 18) Centrifuger 1 minute pour récupérer l'ARN dans l'eppendorf
- 19) Ajouter 200µL de LiCl 4M (permet la dégradation de potentielle RNases), retourner doucement
- 20) Stocker à -20°C

Annexe 6 : compositions des solutions et tampons pour gels SDS-PAGE

Composition pour un gel de migration à 15%	
Tris-HCl 1,5M pH 8,85	1,875mL
H ₂ O	2,68mL
Acrylamide 40%	2,81mL
SDS 20%	37,5μL
AMPS 10%	45μL
TEMED	11μL

Composition pour 3mL de gel de concentration	
Tris-HCl 0,5M pH 6,8	0,75mL
H ₂ O	1,77mL
Acrylamide 40%	399μL
SDS 20%	15μL
AMPS 10%	27μL
TEMED	4,8μL

Composition solution de coloration
Acide acétique 10%
Ethanol 45%
H ₂ O 45%
Bleu de Coomassie 1g.L ⁻¹

Composition solution de décoloration
Acide acétique 7,5%
Ethanol 5%
H ₂ O 87,5%

Annexe 7 : dosage des extractions d'ARN

ARN de *P. chrysosporium* :

Agent	Concentration (ng.µL ⁻¹)	DO 260/280	DO 260/230
Témoin	939,4	2,12	2,72
Chêne 4mg	426,8	1,94	2,56
Sorbitol 1M	1339,9	2,13	2,63
Rouge Congo 150µg.mL ⁻¹	623	2,07	2,66
Caspofungine 400ng.mL ⁻¹	924,8	2,12	2,66
Calcofluor 6,25µg.mL ⁻¹	147,7	1,97	2,81

ARN de *P. anserina* :

Agent	Concentration (ng.µL ⁻¹)	DO 260/280	DO 260/230
Témoin	106,6	1,92	2,71
Chêne 4mg	608,8	1,91	2,40
Rouge Congo 150µg.mL ⁻¹	228,4	2,06	2,49
Caspofungine 400ng.mL ⁻¹	1053,4	2,18	2,50
Calcofluor 6,25µg.mL ⁻¹	225	2,06	2,58

ANNEXE



Année universitaire : 2017/2018

Convention de stage entre

Nota : pour faciliter la lecture du document, les mots « stagiaire », « enseignant référent », « tuteur de stage », « représentant légal », « étudiant » sont utilisés au masculin

<p>1 - L'ÉTABLISSEMENT D'ENSEIGNEMENT ou DE FORMATION</p> <p>Nom : Université de Lorraine Adresse : CS 25233 54052 Nancy Représenté par (signataire de la convention) Stéphane FLAMENT Qualité du représentant Doyen de la Faculté des Sciences et Technologies Composante/UFR ... : FACULTE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES - MASTER BIOMANE ☎ 03 72 74 51 39 mél : karine.jacquot@univ-lorraine.fr Adresse (si différente de celle de l'établissement) : Campus Aiguillettes - BP 70239 54506 VANDOEUVRE LES NANCY CEDEX</p>	<p>2 - L'ORGANISME D'ACCUEIL</p> <p>Nom : UMR IAM 1136 Adresse : Fac. des Sciences Bd des Aiguillettes 54506 Vandoeuvre les Nancy Représenté par (nom du signataire de la convention) : Eric Gelhaye Qualité du représentant : Directeur UMR Service dans lequel le stage sera effectué : Equipe repenses aux shens et repuration redox ☎ 0372745160 mél : Eric.Gelhaye@univ-lorraine.fr Lieu du stage (si différent de l'adresse de l'organisme) :</p>
---	---

3 - LE STAGIAIRE

Nom : Baccarella Prénom : Thomas Sexe : F M Né(e) le : 09/05/1993
 Adresse : 27 rue Saint-Julien 54000 Nancy
 ☎ 06 62 10 41 39 mél : thomas.baccarella@gmail.com
 INTITULE DE LA FORMATION OU DU CURSUS SUIVI DANS L'ETABLISSEMENT D'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET VOLUME HORAIRES (ANNUEL OU SEMESTRIEL) : MASTER BIOTECHNOLOGIES MICROBIOLOGIES ALIMENT NUTRITION ENVIRONNEMENT (BIOMANE)

SUJET DE STAGE Caractérisation fonctionnelle de protéines fongiques : approches biochimiques et physiologiques.

Dates : Du 15.10.17 Au 13.07.18
 Représentant une durée totale de 6 (Nombre de Semaines / de Mois (rayer la mention inutile))
 Et correspondant à Jours de présence effective dans l'organisme d'accueil.
 Répartition si présence discontinue : nombre d'heures par semaine ou nombre d'heures par jour (rayer la mention inutile).
 Commentaire :

<p>ENCADREMENT DU STAGIAIRE PAR L'ETABLISSEMENT D'ENSEIGNEMENT</p> <p>Nom et prénom de l'enseignant référent : LEBLOND Pierre ☎ 03.72.74.51.43 mél : pierre.leblond@univ-lorraine.fr</p>	<p>ENCADREMENT DU STAGIAIRE PAR L'ORGANISME D'ACCUEIL</p> <p>Nom et prénom du tuteur de stage : MORA - ROUVIER Mélanie Fonction : Professeur ☎ mél : Melanie.Moral@univ-lorraine.fr 0372745329</p>
--	--

Caisse primaire d'assurance maladie à contacter en cas d'accident (lieu de domicile du stagiaire sauf exception) : CPAM

Article 1 – Objet de la convention

La présente convention règle les rapports de l'organisme d'accueil avec l'établissement d'enseignement et le stagiaire.

Article 2 – Objectif du stage

Le stage correspond à une période temporaire de mise en situation en milieu professionnel au cours de laquelle l'étudiant(e) acquiert des compétences professionnelles et met en œuvre les acquis de sa formation en vue de l'obtention d'un diplôme ou d'une certification et de favoriser son insertion professionnelle. Le stagiaire se voit confier une ou des missions conformes au projet pédagogique défini par son établissement d'enseignement et approuvées par l'organisme d'accueil.

Le programme est établi par l'établissement d'enseignement et l'organisme d'accueil en fonction du programme général de la formation dispensée.

ACTIVITES CONFIEES :

Expérimentations en laboratoire

COMPETENCES A ACQUERIR OU A DEVELOPPER :

Article 3 – Modalités du stage

La durée hebdomadaire de présence du stagiaire dans l'organisme d'accueil sera de 35 heures sur la base d'un temps complet/ ~~temps partiel~~ (rayer la mention inutile).

Si le stagiaire doit être présent dans l'organisme d'accueil la nuit, le dimanche ou un jour férié, préciser les cas particuliers :

Article 4 – Accueil et encadrement du stagiaire

Le stagiaire est suivi par l'enseignant référent désigné dans la présente convention ainsi que par le service de l'établissement en charge des stages. Le tuteur de stage désigné par l'organisme d'accueil dans la présente convention est chargé d'assurer le suivi du stagiaire et d'optimiser les conditions de réalisation du stage conformément aux stipulations pédagogiques définies.

Le stagiaire est autorisé à revenir dans son établissement d'enseignement pendant la durée du stage pour y suivre des cours demandés explicitement par le programme, ou pour participer à des réunions ; les dates sont portées à la connaissance de l'organisme d'accueil par l'établissement.

L'organisme d'accueil peut autoriser le stagiaire à se déplacer. Toute difficulté survenue dans la réalisation et le déroulement du stage, qu'elle soit constatée par le stagiaire ou par le tuteur de stage, doit être portée à la connaissance de l'enseignant-référent et de l'établissement d'enseignement afin d'être résolue au plus vite.

MODALITES D'ENCADREMENT (visites, rendez-vous téléphoniques, etc)

Article 5 – Gratification - Avantages

En France, lorsque la durée du stage est supérieure à deux mois consécutifs ou non, celui-ci fait obligatoirement l'objet d'une gratification, sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises et pour les stages relevant de l'article L4381-1 du code de la santé publique.

Le montant horaire de la gratification est fixé à 15 % du plafond horaire de la sécurité sociale défini en application de l'article L.241-3 du code de la sécurité sociale. Une convention de branche ou un accord professionnel peut définir un montant supérieur à ce taux.

La gratification due par un organisme de droit public ne peut être cumulée avec une rémunération versée par ce même organisme au cours de la période concernée.

La gratification est due sans préjudice du remboursement des frais engagés par le stagiaire pour effectuer son stage et des avantages offerts, le cas échéant, pour la restauration, l'hébergement et le transport.

L'organisme peut décider de verser une gratification pour les stages dont la durée est inférieure ou égale à deux mois.

(**article 5 suite**) En cas de suspension ou de résiliation de la présente convention, le montant de la gratification due au stagiaire est proratisé en fonction de la durée du stage effectué.

La durée donnant droit à gratification s'apprécie compte tenu de la présente convention et de ses avenants éventuels, ainsi que du nombre de jours de présence effective du/de la stagiaire dans l'organisme.

LE MONTANT DE LA GRATIFICATION est fixé à 554,40 € par heure / jour / mois (rayer les mentions inutiles)

Article 5 bis – Accès aux droits des salariés – Avantages (Organisme de droit privé en France sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises) :

Le stagiaire bénéficie des protections et droits mentionnés aux articles L.1121-1, L.1152-1 et L.1153-1 du code du travail, dans les mêmes conditions que les salariés.

Le stagiaire a accès au restaurant d'entreprise ou aux titres-restaurants prévus à l'article L.3262-1 du code du travail, dans les mêmes conditions que les salariés de l'organisme d'accueil. Il bénéficie également de la prise en charge des frais de transport prévue à l'article L.3261-2 du même code.

Le stagiaire accède aux activités sociales et culturelles mentionnées à l'article L.2323-83 du code du travail dans les mêmes conditions que les salariés.

AUTRES AVANTAGES ACCORDES :

Article 5ter – Accès aux droits des agents - Avantages (Organisme de droit public en France sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises) :

Les trajets effectués par le stagiaire d'un organisme de droit public entre leur domicile et leur lieu de stage sont pris en charge dans les conditions fixées par le décret n°2010-676 du 21 juin 2010 instituant une prise en charge partielle du prix des titres d'abonnement correspondant aux déplacements effectués par les agents publics entre leur résidence habituelle et leur lieu de travail.

Le stagiaire accueilli dans un organisme de droit public et qui effectue une mission dans ce cadre bénéficie de la prise en charge de ses frais de déplacement temporaire selon la réglementation en vigueur.

Est considéré comme sa résidence administrative le lieu du stage indiqué dans la présente convention.

AUTRES AVANTAGES ACCORDES :

Article 6 – Régime de protection sociale

Pendant la durée du stage, le stagiaire reste affilié à son régime de Sécurité sociale antérieur.

Les stages effectués à l'étranger sont signalés préalablement au départ du stagiaire à la Sécurité sociale lorsque celle-ci le demande.

Pour les stages à l'étranger, les dispositions suivantes sont applicables sous réserve de conformité avec la législation du pays d'accueil et de celle régissant le type d'organisme d'accueil.

6-1 Gratification d'un montant maximum de 15 % du plafond horaire de la sécurité sociale :

La gratification n'est pas soumise à cotisation sociale.

Le stagiaire bénéficie de la législation sur les accidents de travail au titre du régime étudiant de l'article L.412-8 2° du code de la sécurité sociale.

En cas d'accident survenant au stagiaire soit au cours d'activités dans l'organisme, soit au cours du trajet, soit sur les lieux rendus utiles pour les besoins du stage et pour les étudiants en médecine, en chirurgie dentaire ou en pharmacie qui n'ont pas un statut hospitalier pendant le stage effectué dans les conditions prévues au b du 2° de l'article L.418-2, l'organisme d'accueil envoie la déclaration à la Caisse Primaire d'Assurance Maladie ou la caisse compétente (voir adresse en page 1) en mentionnant l'établissement d'enseignement comme employeur, avec copie à l'établissement d'enseignement.

6.2 – Gratification supérieure à 15 % du plafond horaire de la sécurité sociale :

Les cotisations sociales sont calculées sur le différentiel entre le montant de la gratification et 15 % du plafond horaire de la Sécurité Sociale.

L'étudiant bénéficie de la couverture légale en application des dispositions des articles L.411-1 et suivants du code de la Sécurité Sociale. En cas d'accident survenant au stagiaire soit au cours des activités dans l'organisme, soit au cours du trajet, soit sur des lieux rendus utiles pour les besoins de son stage, l'organisme d'accueil effectue toutes les démarches nécessaires auprès de la Caisse Primaire d'Assurance Maladie et informe l'établissement dans les meilleurs délais.

6.3 – Protection Maladie du/de la stagiaire à l'étranger

1) Protection issue du régime étudiant français

- pour les stages au sein de l'Espace Economique Européen (EEE) effectués par des ressortissants d'un Etat de l'Union Européenne, ou de la Norvège, de l'Islande, du Liechtenstein ou de la Suisse, ou encore de tout autre Etat (dans ce dernier cas, cette disposition n'est pas applicable pour un stage au Danemark, Norvège, Islande, Liechtenstein ou Suisse), l'étudiant doit demander la Carte Européenne d'Assurance Maladie (CEAM).

- pour les stages effectués au Québec par les étudiant(e)s de nationalité française, l'étudiant doit demander le formulaire SE401Q (104 pour les stages en entreprises, 106 pour les stages en université) ;

- dans tous les autres cas les étudiants qui engagent des frais de santé peuvent être remboursés auprès de la mutuelle qui leur tient lieu de Caisse de Sécurité Sociale étudiante, au retour et sur présentation des justificatifs : le remboursement s'effectue alors sur la base des tarifs de soins français. Des écarts importants peuvent exister entre les frais engagés et les tarifs français base du remboursement. Il est donc fortement conseillé aux étudiants de souscrire une assurance Maladie complémentaire spécifique, valable pour le pays et la durée du stage, auprès de l'organisme d'assurance de son choix (mutuelle étudiante, mutuelle des parents, compagnie privée ad hoc...) ou, éventuellement et après vérification de l'étendue des garanties proposées, auprès de l'organisme d'accueil si celui-ci fournit au stagiaire une couverture Maladie en vertu du droit local (voir 2^e ci-dessous).

2) Protection sociale issue de l'organisme d'accueil

En cochant la case appropriée, l'organisme d'accueil indique ci-après s'il fournit une protection Maladie au stagiaire, en vertu du droit local :

OUI : cette protection s'ajoute au maintien, à l'étranger, des droits issus du droit français

NON : la protection découle alors exclusivement du maintien, à l'étranger, des droits issus du régime français étudiant).

Si aucune case n'est cochée, le 6.3 – 1 s'applique.

6.4 Protection Accident du Travail du stagiaire à l'étranger

1) Pour pouvoir bénéficier de la législation française sur la couverture accident de travail, le présent stage doit :

- être d'une durée au plus égale à 6 mois, prolongations incluses ;

- ne donner lieu à aucune rémunération susceptible d'ouvrir des droits à une protection accident de travail dans le pays d'accueil ; une indemnité ou gratification est admise dans la limite de 15 % du plafond horaire de la sécurité sociale (cf point 5), et sous réserve de l'accord de la Caisse Primaire d'Assurance Maladie sur la demande de maintien de droit ;

- se dérouler exclusivement dans l'organisme signataire de la présente convention ;

- se dérouler exclusivement dans le pays d'accueil étranger cité.

Lorsque ces conditions ne sont pas remplies, l'organisme d'accueil s'engage à cotiser pour la protection du stagiaire et à faire les déclarations nécessaires en cas d'accident de travail.

2) La déclaration des accidents de travail incombe à l'établissement d'enseignement qui doit en être informé par l'organisme d'accueil par écrit dans un délai de 48 heures.

3) La couverture concerne les accidents survenus :

- dans l'enceinte du lieu du stage et aux heures du stage,
- sur le trajet aller-retour habituel entre la résidence du stagiaire sur le territoire étranger et le lieu du stage,
- dans le cadre d'une mission confiée par l'organisme d'accueil du stagiaire et obligatoirement par ordre de mission,

(6-4 suite)

• lors du premier trajet pour se rendre depuis son domicile sur le lieu de sa résidence durant le stage (déplacement à la date du début du stage),

• lors du dernier trajet de retour depuis sa résidence durant le stage à son domicile personnel.

4) Pour le cas où l'une seule des conditions prévues au point 6.4-1/ n'est pas remplie, l'organisme d'accueil s'engage à couvrir le/la stagiaire contre le risque d'accident de travail, de trajet et les maladies professionnelles et à en assurer toutes les déclarations nécessaires.

5) Dans tous les cas :

• si l'étudiant est victime d'un accident de travail durant le stage, l'organisme d'accueil doit impérativement signaler immédiatement cet accident à l'établissement d'enseignement ;

• si l'étudiant remplit des missions limitées en-dehors de l'organisme d'accueil ou en-dehors du pays du stage, l'organisme d'accueil doit prendre toutes les dispositions nécessaires pour lui fournir les assurances appropriées.

Article 7 – Responsabilité et assurance

L'organisme d'accueil et le stagiaire déclarent être garantis au titre de la responsabilité civile.

Pour les stages à l'étranger ou outremer, le stagiaire s'engage à souscrire un contrat d'assistance (rapatriement sanitaire, assistance juridique...) et un contrat d'assurance individuel accident.

Lorsque l'organisme d'accueil met un véhicule à la disposition du stagiaire, il lui incombe de vérifier préalablement que la police d'assurance du véhicule couvre son utilisation par un étudiant

Lorsque dans le cadre de son stage, l'étudiant utilise son propre véhicule ou un véhicule prêté par un tiers, il déclare expressément à l'assureur dudit véhicule et, le cas échéant, s'acquitte de la prime y afférente.

Article 8 – Discipline

Le stagiaire est soumis à la discipline et aux clauses du règlement intérieur qui lui sont applicables et qui sont portées à sa connaissance avant le début du stage, notamment en ce qui concerne les horaires et les règles d'hygiène et de sécurité en vigueur dans l'organisme d'accueil.

Toute sanction disciplinaire ne peut être décidée que par l'établissement d'enseignement. Dans ce cas, l'organisme d'accueil informe l'enseignant référent et l'établissement des manquements et fournit éventuellement les éléments constitutifs.

En cas de manquement particulièrement grave à la discipline, l'organisme d'accueil se réserve le droit de mettre fin au stage tout en respectant les dispositions fixées à l'article 9 de la présente convention.

Article 9 – Congés – Interruption du stage

En France (sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises ou dans les organismes de droit public), en cas de grossesse, de paternité ou d'adoption, le stagiaire bénéficie de congés et d'autorisations d'absence d'une durée équivalente à celle prévue pour les salariés aux articles L.1225-16 à L.1225-28, L.1225-35, L.1225-37, L.1225-46 du code du travail.

Pour les stages dont la durée est supérieure à deux mois et dans la limite de la durée maximale de 6 mois, des congés ou autorisations d'absence sont possibles.

NOMBRE DE JOURS DE CONGES AUTORISES / ou modalités des congés et autorisations d'absence durant le stage :

.....
Pour toute autre interruption temporaire du stage (maladie, absence injustifiée...) l'organisme d'accueil avertit l'établissement d'enseignement par courrier.

Toute interruption du stage, est signalée aux autres parties à la convention et à l'enseignant référent. Une modalité de validation est mise en place le cas échéant par l'établissement. En cas d'accord des parties à la convention, un report de la fin du stage est possible afin de permettre la réalisation de la durée totale du stage prévue initialement. Ce report fera l'objet d'un avenant à la convention de stage.

Un avenant à la convention pourra être établi en cas de prolongation du stage sur demande conjointe de l'organisme d'accueil et du stagiaire, dans le respect de la durée maximale du stage fixée par la loi (6 mois).

(Article 9 suite)

En cas de volonté d'une des trois parties (organisme d'accueil, stagiaire, établissement d'enseignement) d'arrêter le stage, celle-ci doit immédiatement en informer les deux autres parties par écrit. Les raisons invoquées seront examinées en étroite concertation. La décision définitive d'arrêt du stage ne sera prise qu'à l'issue de cette phase de concertation.

Article 10 – Devoir de réserve et confidentialité

Le devoir de réserve est de rigueur absolue et apprécié par l'organisme d'accueil compte-tenu de ses spécificités. Le stagiaire prend donc l'engagement de n'utiliser en aucun cas les informations recueillies ou obtenues par eux pour en faire publication, communication à des tiers sans accord préalable de l'organisme d'accueil, y compris le rapport de stage. Cet engagement vaut non seulement pour la durée du stage mais également après son expiration. Le stagiaire s'engage à ne conserver, emporter, ou prendre copie d'aucun document ou logiciel, de quelque nature que ce soit, appartenant à l'organisme d'accueil, sauf accord de ce dernier.

Dans le cadre de la confidentialité des informations contenues dans le rapport de stage, l'organisme d'accueil peut demander une restriction de la diffusion du rapport, voire le retrait de certains éléments confidentiels.

Les personnes amenées à en connaître sont contraintes par le secret professionnel à n'utiliser ni ne divulguer les informations du rapport.

Article 11 – Propriété intellectuelle

Conformément au code de la propriété intellectuelle, dans le cas où les activités du stagiaire donnent lieu à la création d'une œuvre protégée par le droit d'auteur ou la propriété industrielle (y compris un logiciel), si l'organisme d'accueil souhaite l'utiliser et que le stagiaire en est d'accord, un contrat devra être signé entre le stagiaire (auteur) et l'organisme d'accueil.

Le contrat devra alors notamment préciser l'étendue des droits cédés, l'éventuelle exclusivité, la destination, les supports utilisés et la durée de la cession, ainsi que, le cas échéant, le montant de la rémunération due au stagiaire au titre de la cession. Cette clause s'applique quel que soit le statut de l'organisme d'accueil.

Article 12 – Fin de stage – Rapport - Evaluation

1) Attestation de stage : à l'issue du stage, l'organisme d'accueil délivre une attestation dont le modèle figure en annexe, mentionnant au minimum la durée effective du stage et, le cas échéant, le montant de la gratification perçue. Le stagiaire devra produire cette attestation à l'appui de sa demande éventuelle d'ouverture de droits au régime général d'assurance vieillesse prévue à l'art. L.351-17 du code de la sécurité sociale ;

2) Qualité du stage : à l'issue du stage, les parties à la présente convention sont invitées à formuler une appréciation sur la qualité du stage.

Le stagiaire transmet au service compétent de l'établissement d'enseignement un document dans lequel il évalue la qualité de l'accueil dont il a bénéficié au sein de l'organisme d'accueil. Ce document n'est pas pris en compte dans son évaluation ou dans l'obtention du diplôme ou de la certification.

3) Evaluation de l'activité du stagiaire : à l'issue du stage, l'organisme d'accueil renseigne une fiche d'évaluation de l'activité du stagiaire qu'il retourne à l'enseignant référent (ou préciser si fiche annexe ou modalités d'évaluation préalablement définis en accord avec l'enseignant référent).....

4) Modalités d'évaluation pédagogiques : le stagiaire devra (préciser la nature du travail à fournir –rapport, etc.- éventuellement en joignant une annexe).....

NOMBRE D'ECTS (le cas échéant) :
.....

5) Le tuteur de l'organisme d'accueil ou tout membre de l'organisme d'accueil appelé à se rendre dans l'établissement d'enseignement dans le cadre de la préparation, du déroulement et de la validation du stage ne peut prétendre à une quelconque prise en charge ou indemnisation de la part de l'établissement d'enseignement.

Article 13 – Droit applicable – Tribunaux compétents

La présente convention est régie exclusivement par le droit français.

Tout litige non résolu par voie amiable sera soumis à la compétence de la juridiction française compétente.

FAIT A Vandœuvre LE 4.12.17

POUR L'ÉTABLISSEMENT D'ENSEIGNEMENT

Nom et signature du représentant de l'établissement
Stéphane FLAMENT

STAGIAIRE (ET SON REPRESENTANT LEGAL LE CAS

ECHÉANT)

Nom et signature

Baccetta

L'enseignant référent du stagiaire

Pierre LEBLOND



Fiches à annexer à la convention :

- ① Attestation de stage (page suivante)
- ② Fiche stage à l'étranger (pour informations sécurité sociale voir site cleiss.fr, pour fiches pays voir site diplomatie.gouv.fr)
- ③ Autres annexes (le cas échéant)

POUR L'ORGANISME D'ACCUEIL

Nom et signature du représentant de l'organisme d'accueil

Interaction Arbres et Organismes

Boulevard de la République

54506 VANDŒUVRE CEDEX

FRANCE

Le tuteur de stage de l'organisme d'accueil

Nom et signature

PREL-ROUHIER Néloué



Résumé

Lors de la dégradation du bois le champignon *Phanerochaete chrysosporium* est soumis à des stress induits par la présence de composés appelés "extractibles". Les analyses de transcriptomiques menées sur *P. chrysosporium* en présence de ces extractibles ont révélé une induction de gènes codant des protéines de réponse au stress ainsi que des petites protéines sécrétées de fonction inconnue. L'objectif de ce stage a été de caractériser au niveau fonctionnel l'une d'entre elles (la protéine SSP1). En partant de l'hypothèse que SSP1 pourrait avoir une activité similaire à une glucanosyl-transférase (Gas1) de *Saccharomyces cerevisiae*, des analyses comparatives de séquences et des tests de complémentation fonctionnelle chez les mutants $\Delta gas1$ ont permis de contredire cette hypothèse. Les analyses biochimiques ont démontré une activité β -glucuronidase pour la protéine SSP1, mais de faible intensité. Cette dernière posséderait donc probablement bien une activité de clivage des sucres mais avec un substrat différent. L'ensemble des séquences de SSP1 appelées SSP1-like ont été recherchées pour étudier leur répartition au sein des champignons, et les analyses ont permis de montrer que la présence de ce gène n'était pas liée au mode trophique. Les analyses pour déterminer le rôle de cette protéine en lien avec la dégradation du bois sont toujours en cours.

Mot clés : *Phanerochaete chrysosporium*, dégradation du bois, extractibles, stress, SSP1

Abstract

During the wood-decay process, *Phanerochaete chrysosporium* is submitted to an "extractives" induced stress. Transcriptomic analysis on *P. chrysosporium* in the presence of wood extracts revealed an induction of genes which encode stress response proteins and small secreted protein with unknown function. The aim of this internship was the characterization of one of these proteins (SSP1). Based on the hypothesis that SSP1 could have an activity related to a *Saccharomyces cerevisiae* glucanosyl-transferase (Gas1), sequence(s) comparative analysis and functional complementation tests on $\Delta gas1$ mutant argued against this hypothesis. Biochemical assays revealed a β -glucuronidase activity for SSP1, but the level was pretty low. SSP1 would possess a glycoside-cleavage activity, but with a different substrate. All of the SSP1 sequences, called SSP1-like, have been retrieved in order to study their distribution among fungi. The analysis evidenced that the presence of the gene was not related to the trophic mode. Determination of the role of the protein in wood decay process is still ongoing.

Key-words : *Phanerochaete chrysosporium*, wood decay, extractives, stress, SSP1