



HAL
open science

Étude des mécanismes de résistance au cuivre chez le champignon de pourriture blanche *Phanerochaete chrysosporium*

Carla Blot

► **To cite this version:**

Carla Blot. Étude des mécanismes de résistance au cuivre chez le champignon de pourriture blanche *Phanerochaete chrysosporium*. Microbiologie et Parasitologie. 2022. hal-04585255

HAL Id: hal-04585255

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-04585255>

Submitted on 23 May 2024

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.



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES
UNIVERSITAIRES**

Mémoire diffusé sur recommandation des responsables du Master

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 bibliothèque : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

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>



FACULTE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE L'UNIVERSITE DE
LORRAINE

Master Recherche et Innovation en Microbiologie

-

Cursus Master en Ingénierie Biologie-Santé-Environnement

Année Universitaire 2021/2022

**Etude des mécanismes de résistance au cuivre chez le
champignon de pourriture blanche *Phanerochaete
chrysosporium***

Mémoire présenté par BLOT Carla

Stage effectué du 10 janvier au 24 juin 2022
dans l'unité Interactions Arbres-Microorganismes (IAM) UMR 1136 à la faculté des
Sciences et Technologies, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy et encadré par Morel-Rouhier
Mélanie, responsable de l'équipe Réponse aux stress et régulation rédox et Kévin
Claudien, doctorant 3^{ème} année.



Remerciements

Le stage de M2 est le stage le plus important pour un étudiant. Déjà, il s'agit de la dernière épreuve d'un long acheminement scolaire, depuis ses débuts sur les bancs de la maternelle. Et puis, au contraire, il s'agit du déterminant essentiel à un nouveau commencement vers notre future carrière scientifique. De nombreuses personnes se retrouvent impliquées, volontairement ou non, dans cette maturation. Ce sont certaines de ces personnes que j'aimerais remercier ici.

Je remercie chaleureusement toutes les personnes qui m'ont aidé pendant ce stage, et notamment ma tutrice, le Pr. Mélanie MOREL-ROUHIER, pour son intérêt et son soutien, mais aussi pour son écoute et sa grande disponibilité. Je la remercie pour ses conseils tout au long de mon stage qui, de la paillasse à la rédaction, m'ont été très utiles. Je remercie également mon tuteur M. Kévin Claudien, pour tout son travail d'acclimatation réalisé pour l'obtention des données RNA-seq nécessaire à mon stage.

Ce travail n'aurait pas pu être réalisé sans la disponibilité du Pr. Sylvain DARNET, qui m'a ouvert ses archives de script R. Je le remercie pour le partage de son expertise dans le domaine de la transcriptomique. Je remercie également M. Raphael BCHINI dans la réalisation technique des manipulations mais aussi pour le soutien qu'il m'a apporté pour me décharger de travail en fin de stage. Merci au Pr. Sébastien DUPLESSIS et au Pr. Annegret KOHLER de m'avoir ouvert les portes de l'INRAE de Champenoux. Merci à Laura, Arthur, Jean-Michel, Anne-Laure et Damien qui ont pu m'aider pendant ces 6 mois de stage et merci à Guillaume et Linda qui m'ont aidé dans ma recherche de thèse. Et enfin, je tiens à remercier très chaleureusement l'incroyable Flavien, sache que ton sticker Dindon prônera fièrement sur la porte de mon bureau de thèse et qu'il me rappellera tous les bons moments passés ici à IAM.

Sommaire

Table des matières

Table des matières

I. PRESENTATION DE LA STRUCTURE D'ACCUEIL.....	1
II. INTRODUCTION.....	1
1. Le cuivre, essentiel mais toxique.....	2
2. Homéostasie du cuivre chez les champignons.....	2
3. Mécanismes de défense des champignons contre le cuivre.....	4
a. Complexation et précipitation extracellulaire.....	4
b. Biosorption du cuivre par la paroi cellulaire.....	5
c. Régulation de l'intégrité de la paroi en réponse à un stress.....	6
d. OSIP, protéine pariétale impliquée dans l'intégrité de la paroi.....	7
III. OBJECTIF DU STAGE.....	8
IV. MATERIELS ET METHODES.....	9
1. Matériel.....	9
2. Extraction d'ARN de <i>P. chrysosporium</i>	9
3. Transcription inverse et qPCR.....	10
4. Clonage moléculaire.....	10
5. Transformation bactérienne.....	11
6. Expression dans <i>Escherichia coli</i> et purification des protéines recombinantes.....	11
7. Test d'alkylation.....	12
8. Titration calorimétrique isotherme (ITC).....	12
9. RNA-seq.....	13
V. RESULTATS.....	14
1. Purification de la protéine recombinante OSIP sans étiquette polyhistidine.....	14
2. OSIP interagit avec le cuivre.....	15
3. Les cystéines d'OSIP ne sont pas impliquées dans la fixation du cuivre.....	15
4. OSIP est réprimée en présence de cuivre chez <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	16
5. Analyse transcriptomique de <i>P. chrysosporium</i> acclimatée au Tanalith.....	17
a. Analyse de la qualité des données transcriptomiques.....	17
b. Analyse globale de l'expression des gènes.....	18
VI. DISCUSSION.....	21
CONCLUSION.....	26
BIBLIOGRAPHIE	

Liste des Abréviations

Ac : *P. chrysosporium* acclimatée au Tanalith

ACP : Analyse en composante principale

BCS : bathocuproinedisulfonic acid disodium saltCox : Cytochrome c oxydase

Ctr : Transporteurs de cuivre

CuL : Ligands de cuivre

CWI : Intégrité de la paroi cellulaire

GO : Gene Ontology

Hsp : Protéines heat shock

IAM : Interactions Arbres/Microorganismes

ITC : Titration calorimétrique isotherme

K_D : constante d'affinité

KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

KOG : EuKaryotic Orthologous Groups

LPMO : Lytic Polysaccharide MonoOxygenase

m-PEG : methoxyl-PEG-maleimide

MTs : Métallothionéines

Non-Ac : *P. chrysosporium* non acclimatée au Tanalith

OSIP : Oak stress-induced protein

ProtID : identifiant de la protéine sur le génome *P. chrysosporium* 4.0

SOD : Superoxyde dismutase

ΔG : énergie libre de Gibbs

ΔH : différence d'enthalpie

I. PRESENTATION DE LA STRUCTURE D'ACCUEIL

Mon stage s'est déroulé au sein de l'Unité Mixte de Recherche INRAE/Université de Lorraine 1136 Interactions Arbres/Microorganismes (IAM) sous la tutelle du Professeur Mélanie Morel-Rouhier et du doctorant Kévin Claudien. Cette unité vise à améliorer la connaissance et la compréhension des interactions entre micro-organismes et arbres forestiers pour contribuer à la durabilité des écosystèmes forestiers. L'unité se compose de 3 équipes, (i) Ecologie des champignons pathogènes forestiers dirigée par Pascal Frey, (ii) Ecogénomique des interactions dirigée par Marc Buée et enfin (iii) Réponse aux stress et régulation redox dirigée par Mélanie Morel-Rouhier, l'équipe à laquelle je me suis intégrée. Cette équipe a pour objectif global de comprendre comment les plantes (en utilisant en particulier l'arbre modèle *Populus trichocarpa*) et les champignons (en utilisant en particulier les champignons de pourriture blanche) peuvent faire face et s'adapter aux contraintes environnementales. L'équipe a notamment travaillé sur la relation structure-fonction des enzymes antioxydantes et de détoxification cellulaire appartenant aux familles thiorédoxine, glutaredoxine, thiol peroxydase, méthionine sulfoxyde réductase et glutathion transférase. Ce stage s'intègre dans le projet FunMic qui a pour but d'utiliser les systèmes fongiques pour développer de nouveaux outils biotechnologiques et notamment dans le projet Woodwaste. Ce projet est financé par l'Agence Nationale de Recherche et l'objectif est d'évaluer le potentiel de champignons dégradateurs de bois pour la décontamination des bois traités. L'équipe se compose de 11 membres permanents, 2 post-doctorants et 9 doctorants.

II. INTRODUCTION

Chaque année en France, le secteur de l'industrie du bois génère environ 1,4 Mt de déchets de bois traité au Tanalith. Ce composé chimique est un mélange de cuivre et d'azoles permettant au bois de résister aux contraintes biotiques et permet ainsi d'augmenter sa durabilité. Cependant, ce composé chimique est toxique et le recyclage du bois est impossible. De nouvelles stratégies d'extraction de ce composé sont en cours de développement, notamment grâce à l'utilisation d'un champignon de pourriture blanche, *Phanerochaete chrysosporium*. Ce champignon est un Basidiomycète et appartient à l'ordre des Polyporales qui compte à ce jour 85 espèces (JGI Mycosm). Cette espèce est très étudiée et son génome a d'ailleurs été le premier génome basidiomycète à être séquencé (Martinez *et al.*, 2004). P.

Tableau 1 | Exemples de protéines impliquées dans l'homéostasie du cuivre chez les champignons
(adapté de Festa *et al.*, 2011)

Protéine	Fonction	Localisation
Facteurs de transcription		
Ace1	Activation transcriptionnelle lors de forte teneur en cuivre	Noy ^a
Mac1	Activation transcriptionnelle lors de faible teneur en cuivre	Noy ^a
Chaperonne		
Atx1	Métallochaperonne transférant le Cu à des P-types ATPases	Cyt ^b
Ccs	Métallochaperonne livrant le Cu à Cu/Zn Sod1	Cyt/mit ^{bc}
Métallothionéine	Petites protéines riches en cystéines fixant le cuivre pour la détoxification intracellulaire	Cyt ^b
Transporteurs		
P _{IB} -type ATPase	Export du Cu	Mb ^d
Ctr	Import du Cu	Mb ^d
Transfert d'électrons		
Cytochrome <i>c</i> oxydase	Nécessaire pour la dernière étape de la respiration cellulaire	Mit ^c
Protection radicaux libre		
Cu/Zn SOD	Oxydoréductases catalysant la dismutation des anions superoxyde O ₂ ^{•-} en O ₂ et H ₂ O ₂	Cyt/mit ^{bc}
Oxydase		
Multicopperferroxidase		Div ^f

Noy^a : noyau ; Cyt^b : cytoplasme ; Mit^c : mitochondrie ; Mb^d : membrane ; Ext^e : extracellulaire ; Div^f : multiple localisations.

chryso sporium se distingue par son système enzymatique extracellulaire de dégradation de la lignine (Zhang *et al.*, 2014) et sa résistance remarquablement élevée aux métaux lourds (Çeribasi et Yetis, 2001). Cette propriété intéressante lui permet de se développer sur du bois traité avec des formulations à base de cuivre du type Tanalith.

1. Le cuivre, essentiel mais toxique

Les métaux sont des éléments essentiels pour tous les êtres vivants. Ils jouent deux grands rôles uniques et critiques en biologie : (i) ils catalysent des réactions biochimiques essentielles à la vie et (ii) ils structurent de nombreuses protéines. Le cuivre est un métal de transition intervenant dans la respiration cellulaire et dans de nombreux autres processus cellulaires importants (Festa *et al.*, 2011). En effet, le transfert d'électrons généré par la réduction du cuivre Cu^{2+} en Cu^+ est exploité par de nombreuses enzymes pour catalyser des réactions biochimiques (Tableau 1) (Festa *et al.*, 2011). La forme réduite Cu^+ a une forte affinité pour les thiols (cystéines et méthionines) et la forme oxydée Cu^{2+} pour l'oxygène et les imidazoles (acides aspartiques, glutamiques et histidines) (Festa *et al.*, 2011). Cependant, les ions cuivre non liés peuvent être cytotoxiques. De par leur grande stabilité décrite par la série d'Irving-Williams ($\text{Mn}^{2+} < \text{Fe}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$) (Irving et Williams 1953), ils sont capables de déplacer, voir remplacer, d'autres cofacteurs métalliques de leurs sites de liaison, induisant ainsi des changements conformationnels conduisant à la dégradation de la protéine et/ou l'inactivation de l'enzyme (Tottey *et al.*, 2008; Foster et Robinson 2011; Foster *et al.*, 2014). Le cuivre peut également interagir de manière aspécifique et non appropriée avec les lipides, l'ADN et certains métabolites. De plus, le cuivre (I) est capable de générer des espèces réactives de l'oxygène en catalysant la réaction de Fenton avec une constante de vitesse beaucoup plus élevée que celle du fer (II) (Poole, 2017). Par conséquent, l'homéostasie du cuivre au sein d'une cellule est hautement contrôlée et régulée.

2. Homéostasie du cuivre chez les champignons

L'homéostasie du cuivre chez des champignons modèles, comme *Saccharomyces cerevisiae* est relativement bien connue. Le cuivre extracellulaire, majoritairement sous forme oxydée Cu^{2+} , est réduit par la réductase ferrique membranaire (Fre1) puis traverse la membrane plasmique à l'aide de transporteurs hautement spécifiques au cuivre (Ctr), Ctr1 et Ctr3. Les Ctr sont riches en méthionines et possèdent un motif caractéristique Met – $\text{X}_{(1-3)}$ – Met

essentiel au transport du Cu^+ (Puig *et al.*, 2002; Dancis *et al.*, 1994). Ces transporteurs sont très conservés chez les champignons : une étude regroupant 300 espèces fongiques a démontré qu'elles possédaient toutes au moins un transporteur Ctr (Ding *et al.*, 2011). Dans le cytoplasme, le cuivre libre est très rapidement complexé par des ligands tels que les métallothionéines (MTs) (Cup1 et Crs5). Les MTs sont de petites protéines riches en cystéines capables de fixer jusqu'à 8 Cu^+ grâce à des motifs conservés Cys – $\text{X}_{(1-2)}$ – Cys et sont donc très efficaces pour lier le cuivre. Ces petites protéines constituent le mécanisme de détoxification le plus conservé chez les procaryotes et les eucaryotes dans la cas d' une concentration intracellulaire toxique en cuivre (Winge *et al.*, 1985; Lerch 1980). Le cuivre est délivré vers les différents compartiments cellulaires *via* des métallochaperones (Atx1, Ccs, Cox17). Atx1 est une métallochaperone hautement spécifique au transporteur de cuivre Ccc2 de l'appareil de Golgi (Lin et Culotta 1995) où a lieu la maturation et les modifications post-traductionnelles des protéines. Atx1 fixe le cuivre au niveau de son motif Cys – X – Cys dans lequel les deux cystéines lient le cuivre. Ccs est une métallochaperone spécialement dédiée au transport du cuivre vers les superoxyde dismutases qui permettent de neutraliser les radicaux libres (Culotta *et al.*, 1997). Au niveau mitochondrial, le cuivre joue un rôle essentiel dans la respiration cellulaire, et notamment un rôle structural permettant l'activité des sous-unités Cox1 et Cox2 de la cytochrome c oxydase (Smith *et al.*, 2017). A ce jour, le trafic du cuivre cytosolique vers la mitochondrie ainsi que l'import du cuivre à travers la membrane externe de la mitochondrie restent inconnus. Cependant, au sein de l'espace intermembranaire mitochondrial, une chaperone, Cox17, permet de capter le cuivre et de le transférer ensuite aux protéines d'assemblage de la cytochrome c oxydase Cox11 ou Sco1/2 pour être inséré ensuite dans les sous-unités Cox1 et Cox2, respectivement. Le cuivre est stocké dans la matrice mitochondriale pour des raisons inconnues, lié à un ligand et forme un complexe Cu:L (Smith *et al.*, 2017). Tous ces gènes, qui contrôlent l'homéostasie du cuivre, sont hautement régulés en fonction des concentrations intracellulaires en cuivre par deux facteurs de transcription, Ace1 et Mac1. Chez les Basidiomycètes, une forme chimérique de ces deux facteurs de transcription est retrouvée chez quelques espèces, comme par exemple chez *Cryptococcus neoformans*, appelé Cuf1 (Smith *et al.*, 2017). Il joue à la fois le rôle d'Ace1 et de Mac1. Ces facteurs de transcription sont composés de régions riches en cystéines, avec un motif conservé Cys – $\text{X}_{(1-2)}$ – Cys permettant de fixer le cuivre Cu^+ . Dans une situation de carence en cuivre, Mac1 se lie aux promoteurs des gènes *CTR1*, *CTR3* et *FRE1* au niveau d'une séquence

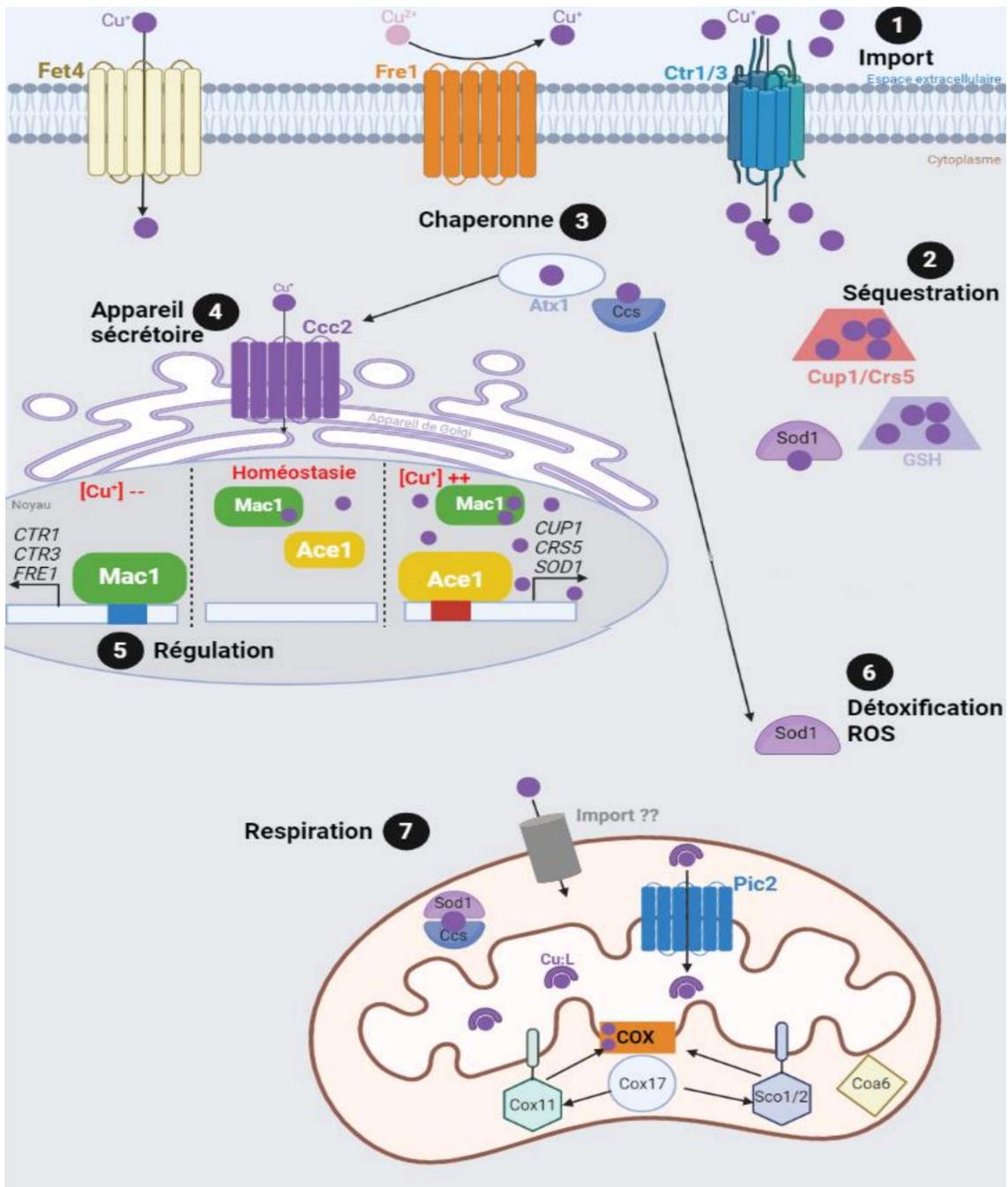


Figure 1 | Import et trafic du cuivre chez *Saccharomyces cerevisiae* (adapté de Smith et al., 2017). **1** Une réductase ferrique réduit le Cu^{2+} extracellulaire en Cu^+ pour l'importer dans cellule via le transporteur de cuivre hautement spécifique Ctr ou le transporteur à métaux peu spécifique Fet4. **2** Dans le cytosol, Cu^+ est séquestré par des métallothionéines Cup1 et Crs5, par le glutathion et par la superoxyde dismutase (Sod) pour limiter la cytotoxicité du cuivre libre. **3** Des protéines chaperonne livre le Cu^+ aux compartiments cellulaires : Atx1 cible l'appareil sécrétoire tandis que Ccs cible les Sod. Aucune chaperonne ciblant la mitochondrie n'est connue à ce jour. **4** Atx1 livre le Cu^+ à Ccc2, le transporteur de cuivre de l'appareil de Golgi. De nombreuses protéines qui le traversent ont besoin de cuivre pour leur activité. **5** CUP1/CRS5 et SOD1 sont régulés positivement par Ace1 lors d'un excès en Cu^+ dans la cellule pour limiter la toxicité du cuivre tandis que Mac1 régule positivement CTR1/3 et FRE1 lors d'une déplétion en cuivre pour assurer les besoins vitaux en cuivre de la cellule. **6** La protéine chaperonne Ccs approvisionne les Sod1, nombreuses dans le cytosol, afin d'assurer l'activité de détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) de Sod1. **7** La cytochrome c oxydase (COX) nécessite du cuivre pour le transfert d'électrons de la chaîne respiratoire. L'import à travers la membrane externe de la mitochondrie reste, à ce jour, inconnu. Dans l'espace intermembranaire, Cox17 fixe le Cu^+ qui le transfère ensuite à Sco1/2 ou Cox11 pour l'assemblage de COX. Coa6 joue un rôle critique dans la métallation de COX et l'assemblage de COX via des mécanismes encore inconnu. Le cuivre est stocké lié à un ligand (Cu :L) dans la matrice mitochondriale pour des raisons inconnues.

consensus 5' – TTTGCTC – 3' et permet d'activer leur transcription et ainsi augmenter l'entrée de cuivre au sein de la cellule. Lorsque les concentrations en cuivre dépassent les 10 nM, Mac1 est saturé en cuivre, il est dégradé et la transcription de *CTR1/3* et *FRE1* est réduite ce qui permet de limiter l'import de cuivre dans la cellule. Dans une situation d'excès en cuivre, le facteur de transcription Ace1 régule positivement les gènes *CUP1*, *CRS5* et *SOD1* qui permettent de chélater le cuivre et limiter sa toxicité intracellulaire (Smith *et al.*, 2017). La Figure 1 résume le mécanisme d'homéostasie du cuivre chez *S. cerevisiae* connu à ce jour (Smith *et al.*, 2017).

3. Mécanismes de défense des champignons contre le cuivre

Avant que le cuivre ne soit importé dans la cellule, il existe de nombreux mécanismes physico-chimiques pour limiter l'accumulation intracellulaire de cuivre qui pourrait être toxique. Chez les champignons, le mécanisme de défense lors de concentrations élevées en métaux, comme le cuivre, repose en général sur la séquestration et l'immobilisation du métal par des agents intracellulaires et extracellulaires. Au niveau intracellulaire, le cuivre est chélaté par les MTs. Chez les champignons de pourriture blanche, ce mécanisme de détoxification n'a pas été décrit et il semblerait que la chélation du cuivre au niveau extracellulaire jouerait un rôle plus important dans la résistance au cuivre (Baldrian, 2003).

a. Complexation et précipitation extracellulaire

La première ligne de défense des champignons face à des concentrations toxiques en métaux est la sécrétion de polysaccharides, de métabolites et d'enzymes extracellulaires capables de chélater le cuivre. Cela peut conduire à une précipitation extracellulaire, une complexation ou une cristallisation du cuivre permettant de l'immobiliser et de réduire sa biodisponibilité, mais cela peut aussi modifier sa nature et l'oxyder, le réduire, le méthyler ou le déalkyler, réduisant ainsi sa capacité à être transporté et/ou son imperméabilité (Gadd, 1993). Par exemple, chez les champignons de pourriture brune, la sécrétion d'acide oxalique permet la précipitation du cuivre sous forme d'oxalate de cuivre, insoluble, limitant sa biodisponibilité et permettant ainsi d'augmenter la tolérance du champignon à des concentrations extracellulaires élevées en cuivre (Baldrian, 2003). Claudien *et al.*, (2022, non publié) ont montré que *Postia placenta*

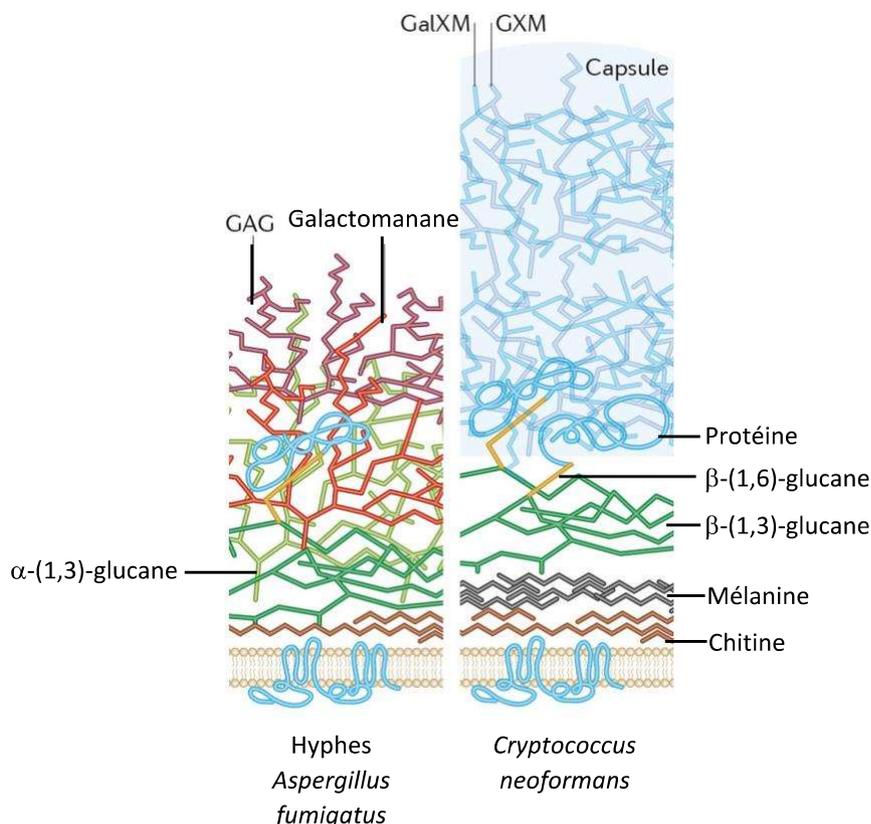


Figure 2 | Organisation structurale de la paroi cellulaire de différentes espèces de champignons (adapté de Erwig et Gow, 2016). La plupart des champignons ont une couche basale de structure commune composée de chitine et de glucane (β -(1,3) et β -(1,6)) qui constituent le squelette primaire sur lequel les autres composants vont s'accrocher. Chez les champignons filamenteux comme *Aspergillus fumigatus*, la couche superficielle est composée de mannanes modifiés par du β -(1,5) galactofurane. Les polysaccharides de la couche basale sont des β -(1,3)- β -(1,4) glucanes attachés à une couche externe d' α -(1,3)(1-4) glucane soluble. Les hyphes d'*Aspergillus fumigatus* possèdent également du galactosaminoglycane (GAG) et des protéines glycosylées. Le basidiomycète *Cryptococcus neoformans*, possède une capsule externe composée de glucuronoxylomannane (GXM) et de galactoxylomannane (GalXM). Cette capsule est fixée à une couche d' α -(1,3) glucane, majoritairement, mais aussi à des peptides et d'autres polysaccharides comme le β -(1,6) glucane. *C. neoformans* possède également une couche de mélanine dont la localisation au sein de la paroi n'est pas précise.

Tableau 2 : Tableau des différentes classes de protéines, avec leurs fonctions, retrouvées dans la paroi cellulaire fongique, d'après (Gow *et al.*, 2017)

Protéine	Fonction
Transglycosidases	Assemblage des polysaccharides néoformés aux autres polysaccharides de la paroi
Hydrolases et déacetylase	Dégradation des polysaccharides de la paroi
Yapsin	Protéases aspartique libérant un certain nombre de protéines GPI de la paroi
Adhésines	Adhésion aux surfaces et entre cellules, formation de biofilm
Hydrophobines	Exclusif aux champignons filamenteux, forme un revêtement hydrophobe à la surface de la paroi. Joue un rôle dans la morphogénèse, l'adhésion aux surfaces

est capable de sécréter jusqu'à 300 mg/L d'oxalate soluble dans le milieu cellulaire lors de la dégradation de sciure de bois traité au Tanalith E3474. *P. chrysosporium*, quant-à lui, dans les mêmes conditions, ne produit qu'une faible quantité d'oxalate (6 mg/L), suggérant l'implication d'autres mécanismes dans la résistance au cuivre. La sécrétion de mélanine, composant pigmenté de la paroi cellulaire des champignons, dans le milieu extracellulaire, permet également de séquestrer le cuivre de par ses nombreux sites de fixation potentiels (groupes carboxyles, hydroxyles, carbonyles et méthoxyles) (Gadd, 1993).

b. Biosorption du cuivre par la paroi cellulaire

La paroi cellulaire est une structure dynamique essentielle à la viabilité de la cellule, à la morphogénèse et aussi à la pathogénicité des champignons. Elle constitue une interface avec l'environnement extérieur et sa composition est hautement régulée en réponse à des changements externes, comme par exemple lors d'une situation de stress. Cette structure est absolument vitale à la survie du champignon, à tel point qu'un cinquième du génome de la levure est consacré à la biosynthèse de la paroi cellulaire (de Groot *et al.*, 2001). La paroi cellulaire des champignons filamenteux est composée d'une couche basale principalement composée de β -(1,3)-glucane avec des chaînes intermédiaires β -(1,6)-glucane et de chitine formant un squelette réticulé et rigide près de la membrane plasmique et de couches plus superficielles de composition spécifique à l'espèce (Figure 2). Les protéines de la paroi sont glycosylées avec une séquence de sécrétion en N-terminal et peuvent transiter dans la paroi avant d'être sécrétée ou bien faire partie intégrante de la structure. Ces dernières contiennent alors une partie C-terminal composée d'une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI-anchor) permettant leur ancrage stable à la membrane (Ferguson 1999; Latgé et Calderone 2006). (Tableau 2).

De nombreux sites de fixation potentiels aux métaux sont présents au niveau de ces couches superficielles, comme par exemple les groupes carboxyles, amines, hydroxyles, phosphates et sulphydriles (Gadd, 1993). La complexation du cuivre au niveau de la paroi permet ainsi de limiter sa perméabilité et de l'immobiliser. Ces caractéristiques distinctives de la paroi des champignons en font des candidats intéressants pour la biosorption de métaux lourds. *P. chrysosporium* est capable de fixer et accumuler les métaux lourds dans ses hyphes, jusqu'à 74,78 mg de cuivre par gramme de biomasse sèche (Chen *et al.*, 2012). Le mécanisme par lequel le cuivre interagit avec la paroi reste tout de même peu connu, notamment au

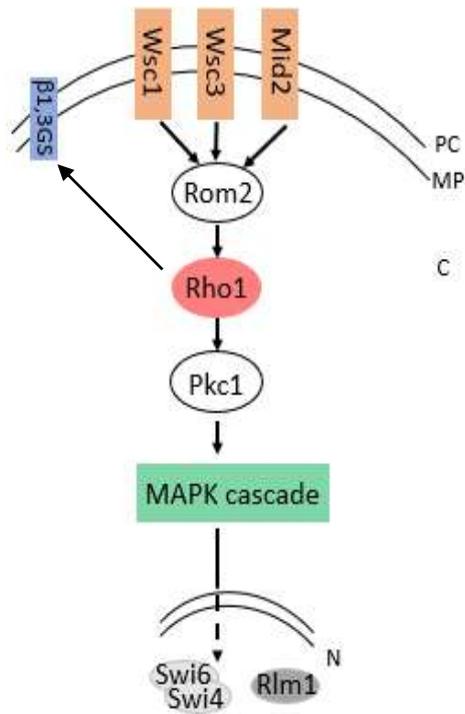


Figure 3 | Cascade de signalisation simplifiée régulant le remodelage de la paroi cellulaire en réponse à un stress chez le champignon modèle *Aspergillus fumigatus* (adapté de Dichtl *et al.*, 2016). PC : paroi cellulaire ; MP : membrane plasmique ; C : cytoplasme ; N : noyau, β1,3GS : sous-unité β-1,3 glucane synthase.

niveau de potentiels protéines fixatrices de cuivre qui pourraient jouer un rôle précurseur dans l'homéostasie du cuivre. Vacchina *et al* (2001) ont rapporté que les chélateurs de cuivre dans la paroi pourraient être d'origine protéique, et ont notamment identifié un candidat par couplage d'une chromatographie d'exclusion de taille et d'une spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (SEC-ICP MS). Cependant ces protéines n'ont pas été clairement identifiées. Probst *et al.*, (2021, pre-print) rapporte qu'une petite protéine sécrétée de la paroi, Cbi1, jouerait un rôle dans l'import de cuivre en le livrant au transporteur Ctr lors de conditions de carence en cuivre.

c. Régulation de l'intégrité de la paroi en réponse à un stress

La paroi cellulaire des champignons est donc une structure pouvant être modulée en fonction de divers signaux de stress, contrôlés par une cascade de signalisation conservée : la voie de l'intégrité de la paroi cellulaire (CWI). Dichtl *et al* (2016) ont très bien décrit la cascade CWI chez les champignons (Figure 3). La voie CWI est partiellement conservée chez les différentes espèces de champignons et elle est active même dans des conditions de croissance normale pour maintenir la biogenèse de la paroi et l'intégrité de la cellule. Simplement, cette cascade est déclenchée à la surface de la cellule, au niveau de la paroi, en réponse à un stress, par des protéines de surface qui fonctionnent comme des senseurs : la famille Wsc et Mid2. Ces protéines ont une structure globalement similaire composée de courts domaines cytoplasmiques C-terminaux, un seul domaine transmembranaire et un domaine périplasmique riche en résidus sérine et thréonine (Ibe *et Munro*, 2021). Chez le champignon pathogène d'insecte *Beauveria bassiana*, la délétion de la protéine signal Wsc1 a entraîné une augmentation marquée de la sensibilité des hyphes et des conidies au Cu^{2+} (Tong *et al.* 2019). Le signal est ensuite transmis à un facteur d'échange de guanine Rom2 nécessaire à l'activation de la cascade CWI qui stimule ensuite l'échange de nucléotide sur une petite GTPase essentielle à la cascade, Rho1. Une fois activée, cette dernière stimule plusieurs effecteurs en aval impliqués dans la biogenèse de la paroi cellulaire et régule notamment la β -1,3-glucane synthase et la cascade des mitogen-activated protein kinases (MAPK) activée par la protéine kinase C, Pkc1. Cette cascade MAPK va induire une réponse transcriptionnelle en activant les facteurs de transcriptions Rlm1 et Swi4/6 qui, *in-fine*, activent les gènes impliqués dans la biogenèse de la paroi cellulaire.

d. OSIP, protéine pariétale impliquée dans l'intégrité de la paroi

Oak stress-induced protein (OSIP) est une petite protéine sécrétée spécifique aux champignons et de fonction inconnue. Elle a été identifiée dans une étude transcriptomique de *P. chrysosporium* dans une condition de stress générée par la présence d'extractibles de bois de chêne pouvant être toxiques pour les champignons. Sa séquence protéique se divise en trois parties distinctes : (i) un signal de sécrétion, (ii) une partie N-term avec des résidus cystéines conservés et (iii) une région terminale C-term variable riche en résidus alanine et glycine. Ce gène est répandu au sein du règne fongique, notamment chez les champignons ligninolytiques, pathogènes, mycorhiziens et saprophytes. Il a été démontré que cette protéine jouait un rôle dans la voie CWI, notamment dans l'adaptation de la matrice extracellulaire composée de polysaccharides et de protéines pour répondre à un stress (Valette *et al.*, 2021). Il a d'ailleurs été observé qu'une fois purifiée et stockée à -20°C , OSIP formait une sorte de gel compact et élastique, dépendant de la présence de la partie C-term riche en alanine et glycine (Valette, mémoire de thèse). La recherche d'homologies structurales a révélé que la structure d'OSIP prédite par Pymol[®] se superposait à la structure d'une des sous-unités d'une Lytic Polysaccharide MonoOxygenase (LPMO) (Valette, mémoire de thèse). Les LPMO sont des métalloprotéines possédant du cuivre dans leur site actif et dont le rôle est de catalyser l'oxydation des polysaccharides. Au sein de ces protéines, le cuivre est coordonné par un résidu histidine en N-term et par un autre résidu histidine plus interne (Brander *et al.*, 2020). La séquence d'OSIP présente un motif caractéristique de 4 résidus histidine successifs. Cependant, OSIP ne possède pas les sites actifs retrouvés généralement chez les LPMO (Valette, mémoire de thèse).

III. OBJECTIF DU STAGE

Le premier objectif de ce stage était de caractériser la fonction d'OSIP chez *P. chrysosporium* (ProtID : 2981896) afin de savoir si elle jouerait un rôle dans la résistance au cuivre chez ce champignon. Pour cela, dans un premier temps, il s'agissait de savoir si OSIP était capable de fixer le cuivre par titration calorimétrique isotherme (ITC) et comment elle le fixait par vérification de l'état rédox de la protéine, à savoir si les cystéines de la protéine étaient réductibles et donc capables de fixer le cuivre. Enfin, dans un troisième temps, il s'agissait de déterminer si la fonction d'OSIP chez *P. chrysosporium* était bien impliquée dans la résistance au cuivre par une analyse de son expression génique lors d'une exposition au cuivre par qPCR.

Le deuxième objectif était de déterminer les mécanismes mis en place par *P. chrysosporium* pour s'adapter à des concentrations toxiques en cuivre. Pour cela, une analyse transcriptomique a été réalisée sur une souche acclimatée au Tanalith afin d'identifier le mécanisme de défense du champignon par rapport à une souche non acclimatée. Afin de déterminer si l'adaptation avait lieu au niveau intracellulaire ou au niveau de la paroi cellulaire, les gènes composant la paroi et sa biogénèse ainsi que les gènes impliqués dans l'homéostasie du cuivre ont été spécifiquement étudiés lors de cette étude.

IV. MATERIELS ET METHODES

1. Matériel

Souches :

Fongiques

- *Phanerochaete chrysosporium* RP78
- *Podospora anserina* S⁺

Bactériennes

- *E. coli* DH5 α : maximise l'efficacité de la transformation grâce à la mutation de 3 gènes facilitant l'insertion du plasmide : recA1, endA1 et lacZ Δ M15
- *E. coli* BL21 (DE3) : permet l'expression de protéines recombinantes à l'aide d'un système d'induction de l'ARN polymérase T7 avec de l'IPTG

Plasmides :

- pET26b(+) : Vecteur bactérien avec une séquence signal et un marqueur de résistance à la kanamycine pour l'expression de protéines dans le périplasme.
- PcSSP1 p426 : amplification de la séquence d'OSIP pour la construction dans pET26b(+)

Amorces :

- 4474NOPEP_Nde_for : (CCCCCATATGGCTATTATCAGCCCGCG) amplification d'OSIP sans étiquette polyhistidine et d'OSIP sans queue AG + sans étiquette polyhistidine
- 4474 new end_Bam_STOP_recombinante_rev : (TTGATGATTTTCAGTAACGTTAAGTGGATCCTCATGCTTGGAGCTCCTCATCGAAA GAGG) amplification d'OSIP sans étiquette polyhistidine
- Pc4474_NOAG_Stop_Not_rev : (CGAGTGCGGCCGtcatcccgggtcgaaccggt) amplification d'OSIP sans queue AG + sans étiquette polyhistidine

Milieux :

- LB (LB Broth 20 g/L supplémenté en agar (10 g/L) pour boîte solide
- Malt 1% : extrait de malt 1 g/100 mL

2. Extraction d'ARN de *P. chrysosporium*

P. chrysosporium a été cultivé sur un milieu malt 1% pendant 3 jours. Puis un traitement au cuivre a été effectué en ajoutant du CuSO₄ à des concentrations finales de 100 μ M, 250 μ M, 500 μ M et 1 mM. Dans le but de générer une carence en cuivre, du BCS (bathocuproinedisulfo-

nic acid disodium salt) a été ajouté pour certains des échantillons à des concentrations finales de 250 μ M, 500 μ M et 1 mM. Les traitements ont été effectués pendant 24h, à 37°C. Le mycélium a ensuite été prélevé et broyé au mortier. Les ARNs totaux ont été extraits et purifiés à l'aide du kit RNeasy Plant mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les instructions du fournisseur. Une étape supplémentaire de digestion des ADN génomiques résiduels a été effectuée par traitement à la DNase (30 minutes à température ambiante) directement sur la colonne entre les lavages. Les ARNs ont été élués dans 200 μ L d'eau RNase free et précipités avec 2 M de chlorure de lithium à -20°C toute la nuit. Plusieurs étapes de lavage à l'éthanol 70° ont été réalisées avant de resuspendre le culot d'ARN dans 30 μ L d'eau DCEP. La concentration des ARNs a été mesurée à l'aide du Nanodrop 1000 spectrophotometer (Labtech International Ltd, Heathfield, UK) et 300 ng ont été déposés sur gel d'agarose 1% TAE 1% H₂O DEPC afin de vérifier leur intégrité. Les ARNs ont été conservés à -80°C.

3. Transcription inverse et qPCR

Les ADNc ont été synthétisés à partir de 500 ng d'ARN à l'aide du kit iScript (Bio-Rad) dans un volume total de 20 μ L en suivant les instructions du fournisseur. 2 μ L d'une dilution 1 :10 des ADNc ont été utilisés pour les réactions de qPCR (SYBR® Green SuperMix (Bio-Rad), 0,8 μ M des amorces forward et reverse spécifiques du gène à amplifier, dans un volume final de 15 μ L). Les amplifications ont été réalisées avec le CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) disponible sur la plateforme ASIA. Les niveaux d'expression des transcrits ont été normalisés avec le gène de référence codant pour l'Actine en utilisant le calcul $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak et Schmittgen, 2001) et exprimés par rapport à la moyenne des ΔC_t de la condition sans cuivre.

4. Clonage moléculaire

Les séquences codantes de la forme entière d'OSIP, c'est-à-dire avec son extrémité C-terminal riche en alanine et en glycine (queue AG) de *P. chrysosporium* RP78 (JGI Prot_ID : 2981896) et de la forme tronquée d'OSIP (sans la queue AG) ont été amplifiées à l'aide de la Taq polymérase Herculase II (Agilent technologies). L'insert complet ou tronqué d'OSIP et le vecteur, pET26b(+) (kanamycine^R) ont été digérés avec les enzymes de restrictions NdeI/BamHI et NdeI/NotI (Fast Digest, Thermo Fisher Scientific), respectivement, pendant 30

min ~ 1 h à 37°C. La ligature a été réalisée dans un volume final de 20 µL pendant la nuit à 4°C en utilisant 2 µL d'ADN ligase T4 (5 U/µL, Thermofisher Scientific) avec un excès d'insert par rapport au plasmide.

5. Transformation bactérienne

Des bactéries *E. coli* DH5α ont été transformées par choc thermique à 42°C pendant 45 secondes avec 10 µL du produit de ligature. Les cellules ont été régénérées dans du SOC pendant 2 h à 37°C sous agitation puis étalées sur boîtes sélectives LB complémentées avec 50 µg/mL de kanamycine. Les clones ont ensuite été testés par PCR avec les amorces adéquates en utilisant la GoTaq polymérase (Promega). A partir des clones positifs, les plasmides ont été extraits et purifiés avec le kit PureYield (Promega). Toutes les constructions ont été vérifiées par séquençage avec 100 ng/µL de plasmide.

Des bactéries *E. coli* BL21 (DE3) ont été transformées par électroporation à 2 800 V en utilisant environ 10 ng de plasmide puis régénérées dans du LB pendant 30 minutes à 37°C sous agitation. Les bactéries transformées ont été étalées sur boîtes sélectives LB complémentées avec 50 µg/mL de kanamycine.

6. Expression dans *Escherichia coli* et purification des protéines recombinantes

Des cultures d'*E. coli* BL21 (DE3) ont été successivement amplifiées jusqu'à 2,4 L dans un milieu LB supplémenté en kanamycine (50 µg/mL) à 37 °C. L'expression protéique a été induite en phase exponentielle par ajout de 100 µM d'isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) pendant 4 h à 37 °C. Les cultures ont ensuite été centrifugées 20 min à 4 400 g. Les culots ont été resuspendus dans 15 mL de tampon Tris-HCl 30 mM NaCl 500 mM pH 8,0 pour les protéines recombinantes non taggées et dans 15 mL du tampon Tris-HCl 30 mM NaCl 300 mM et Imidazole 10 mM pH 8,0 pour les protéines recombinantes his-taggées, et conservés à -20 °C. Le culot de cellules a ensuite été lysé par sonication (2 × 1 min avec 1 min d'intervalle) et les fractions solubles et insolubles ont été séparées par centrifugation pendant 40 min à 27 000 g. Pour la purification des protéines recombinantes non taggées, la fraction soluble a été précipitée en deux étapes avec du sulfate d'ammonium (40% et 80%). La migration des fractions sur gel SDS-PAGE à 15% a permis de mettre en évidence la présence de la protéine

dans la fraction protéique précipitant à 80 %. Les protéines recombinantes ont ensuite été purifiées par chromatographie d'exclusion de taille (colonne ACA44, 5 × 75 cm) équilibrée dans un tampon Tris-HCl 30 mM NaCl 500 mM. Les fractions de sortie de colonne contenant la protéine ont été regroupées, dialysées par ultrafiltration contre un tampon TE pH 8 (Tris 30 mM, EDTA 0,5 mM) pour éliminer le NaCl et chargées sur une colonne de DEAE (diéthylaminoéthyl) équilibrée dans un tampon TE pH 8. Les protéines recombinantes ont été éluées à l'aide d'un gradient de sel jusqu'à 400 mM. Les fractions d'intérêt ont été concentrées par filtration centrifuge (Sartorius, Goettingen, Allemagne), conservées dans du tampon Tris 30 mM pH 8 à -4 °C et très rapidement utilisées pour les tests biochimiques. La pureté des protéines a été évaluée par SDS-PAGE et les concentrations de protéines ont été déterminées par spectrophotométrie à 280 nm en utilisant un coefficient d'extinction molaire à 3230 M⁻¹ cm⁻¹ pour OSIP sous forme complète ou à 1615 M⁻¹ cm⁻¹ pour OSIP sous forme tronquée.

7. Test d'alkylation

La protéine recombinante OSIP (5 µM) a été réduite avec 10X – 50X – 100X de DTT et de TCEP dans 50 µL de Tris 30 mM NaCl 200 mM pH 8 toute la nuit à 4°C. Les protéines ont été précipitées à froid avec du TCA 20% puis centrifugées 10 minutes à 13 400 rpm. Le culot de protéine a été lavé à l'acétone glacial 100% et resuspendu dans une solution d'alkylation Tris-HCl 100 mM 1% SDS à 2 mM de methoxy-PEG maleimide (mPEG). Environ 2 µg de protéines réduites et alkylées ont été déposés sur un gel SDS-Page (12%) non dénaturant.

8. Titration calorimétrique isotherme (ITC)

30 µM de protéine recombinante OSIP sans étiquette polyhistidine dans un tampon Tris 30mM pH 8 a été titrée avec 300 µM d'une solution en cuivre CuCl₂ diluée dans le même tampon à l'aide d'un calorimètre MicroCal iTC200 (Malvern Instruments, Malvern, U.K.) disponible au sein de la plateforme ASIA, sous agitation (750 rpm) et à 25°C. 2 µL du titrant ont été injectés séquentiellement toutes les 5 minutes dans la cellule de réaction et les données thermiques intégrées ont été ajustées au modèle à un ensemble de sites dans Origin (logiciel MicroCal Data Analysis) selon les instructions du fabricant. Les expériences ont été réalisées en double en prenant en compte un titrage à blanc (tampon dans tampon). Toutes les solutions utilisées ont été préalablement dégazées et filtrées.

9. RNA-seq

Une souche de *P. chrysosporium* RP78 a été acclimatée par 3 repiquages successifs sur boîte malt 1% supplémenté avec du Tanalith à une concentration correspondant à 3 mg/L de cuivre dans le Tanalith (cette souche sera nommée Ac). En parallèle, des repiquages ont été effectués sans Tanalith (cette souche sera nommée Non_Ac). Un quatrième repiquage de ces 2 souches Ac et Non_AC a été réalisé en triplicat sur Tanalith (3 mg/L de cuivre dans le Tanalith). Les mycéliums ont été prélevés après 2 jours de croissance et les ARNs ont été extraits avec le kit d'extraction RNeasy plant mini kit (Qiagen) selon le protocole décrit précédemment. La qualité et l'intégrité des ARNs totaux extraits ont été mesurées sur la machine Tape station (Agilent). Les échantillons ont été envoyés à la plateforme de séquençage IGA Tech (Italie). Les séquences ont été générées sur une machine Illumina, avec une taille de 150 nucléotides en « paired séquences ». Les fichiers ont été récupérés au format FASTQ et importés dans le logiciel CLC Genomic Workbench 12.0 (Qiagen Digital Insights). La qualité des séquences a été analysée et 3% de chaque séquence a été coupée à l'extrémité 5', pour enlever les nucléotides ayant des basses valeurs de qualité. Les séquences ont été cartographiées sur le transcriptome de *P. chrysosporium* RP78 v4 (JGI Mycocosm : [Phchr4_2](#)). Tous les transcrits ayant moins de 10 séquences cartographiées dans les réplicats biologiques ont été considérés comme non exprimés et retirés, laissant un total de 11 648 gènes considérés comme exprimés sur 12 256 gènes totaux. Pour vérifier la qualité des réplicats biologiques, une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée avec le logiciel R (version 4.2.0). Les données de transcriptomique ont ensuite été normalisées entre bibliothèques avec le package DESeq2 sur R. Pour vérifier si les gènes différentiellement exprimés entre les deux conditions (Ac vs Non_Ac) un t.test a été réalisé en utilisant le logiciel R. Seuls les gènes ayant un p-value inférieure à 5% et possédant une valeur de *fold change* supérieur à 1,5 (sur-exprimés) ou < 1,5 (sous-exprimés) ont été considérés pour la suite des analyses. Les annotations KOG (Eukaryotic Orthologous Groups of proteins, NCBI) des gènes de *P. chrysosporium* v4 ont été extraits de la base de données JGI Mycocosm et ont permis la visualisation des fonctions biologiques associées à l'adaptation du champignon au Tanalith. De plus, l'ensemble des gènes de *P. chrysosporium* v4 annotés avec le mot clé « copper » ont été extraits de JGI Mycocosm et attribués aux transcrits correspondants afin de réaliser une carte de chaleur, *heatmap*, avec l'outil Morpheus (Broad Institute, MIT). Une re-annotation des transcrits a été

A. >OSIP (JGI Prot ID_2981896)

MMSKLYFVAA ILLGVLSLQA NAHAIITPAL GVSGQGTRND VQRPSKANEC GNVNVANTIN TSTPVKAAAD
 GSFTATITNF NAGVDGSRQV TALVDASGTG KNFVPATVTQ NGDKAPTDVG SSQLAVSLPP GTKCIGGNTK
 DLCLVSFTTA GGFGNCVAVQ QAAGASGNGS TAGAAAAGAA QAASGSAAAAG TTATAAGAAA SGTATTGKKH
 HHHKGAANAT QAQEAKAEFA KLKAAAPRDY SIRGMRFAVA VRRALTSFDE ELQA*

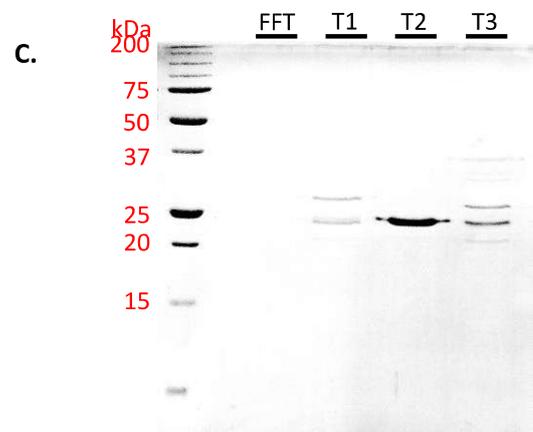
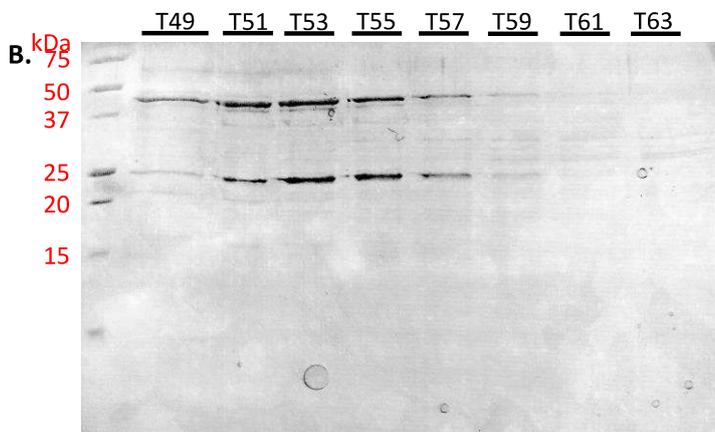


Figure 4 | Purification de la protéine recombinante OSIP par chromatographie d'exclusion de taille et par chromatographie d'échange d'ion. A : séquence protéique d'OSIP (JGI ProtID : 2981896). En vert, la séquence peptidique de sécrétion N-term. En rouge, la région C-term riche en alanine et en guanine, la queue AG. La protéine est produite sous sa forme complète, c'est-à-dire, avec la queue AG. Les acides aminés surlignés en jaune sont potentiellement capables de fixer le cuivre. B : gel SDS-Page 15% des tubes d'absorbance positive après passage de la fraction précipitée à 80% de sulfate d'ammonium sur colonne ACA44. C : gel SDS-Page 15% des tubes d'absorbance positive après passage sur colonne DEAE. FFT = flowthrough ; T =tube.

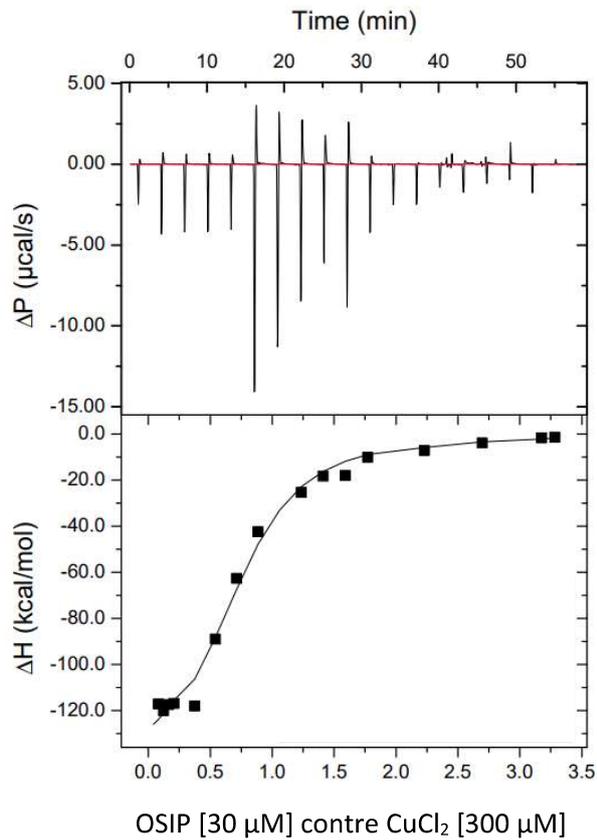
réalisée en utilisant le logiciel BLAST2GO et la version actualisée de la base de données nr du serveur NCBI. Cette dernière étape a eu pour but d'annoter les transcrits sans aucune annotation disponible et ainsi compléter l'annotation des transcrits disponibles sur le JGI.

V. RESULTATS

1. Purification de la protéine recombinante OSIP sans étiquette polyhistidine

Pour caractériser les propriétés biochimiques d'OSIP, sa séquence nucléique entière ou tronquée (sans la partie C-term riche en alanine et glycine) (Figure 4. A) a d'abord été clonée dans le plasmide pET26b(+) à l'aide des sites de restrictions NdeI/BamHI et NdeI/not, respectivement. Puis la protéine recombinante a été produite et purifiée sans étiquette polyhistidine, qui pourrait potentiellement fixer le cuivre et fausser les résultats. Pour cela, deux souches d'expression d'*Escherichia coli* ont été testées : BL21 (DE3) et Rosetta (DE3). Les protéines ont été produites avec succès dans la souche *E. coli* BL21 (DE3). OSIP a ensuite été purifiée par chromatographie d'exclusion de taille qui permet de séparer les protéines en fonction de leur taille et de leur encombrement stérique suivie d'une chromatographie d'échange d'ions sur cellulose diéthylaminoéthyle (DEAE) permettant de séparer les molécules chargées négativement par augmentation progressive de la concentration saline de la solution d'élution. Après la purification, 8 grammes par litre de protéine ont été obtenus.

Pour la forme complète d'OSIP, la protéine recombinante de 26 kDa est bien séparée par la chromatographie d'exclusion de taille, un contaminant est retrouvé vers 40 kDa (Figure 4.B). Les fractions 51 à 57 ont été collectées et dessalées par dialyse dans un tampon TE pH 8 avant d'être passées sur colonne DEAE. La durée de rétention de la protéine recombinante est très faible et elle est éluée dès les premières fractions (Figure 4.C). La protéine est majoritairement retrouvée dans la fraction 2 (T2), qui ne possède d'ailleurs pas d'autre contaminant. Cette fraction a été concentrée et dialysée contre un tampon Tris-HCl 30 mM avant de poursuivre les analyses car le tampon TE est composé d'EDTA qui pourrait chélater le cuivre et fausser les résultats. Les expériences impliquant la protéine recombinante ont été réalisées dans les 48 h suivant la purification et aucune agrégation n'a été observé à 4°C dans le tampon Tris-HCl 30 mM.



Paramètres thermodynamiques	Cu^{2+}
n	$0,704 \pm 0,03$
K_d (μM)	$3,77 \pm 15,6$
ΔH (kcal/mol)	$-149 \pm 8,66$
$-\text{T}\Delta S$ (kcal/mol)	142
ΔG (kcal/mol)	-7

Figure 5 | Interaction entre OSIP et le cuivre par titration calorimétrique isotherme. A : Données ITC brutes (panneau supérieur) et données de liaison isotherme de liaison avec courbe d'ajustement à un site de la titration d'OSIP avec sa queue AG et sans étiquette polyhistidine par le cuivre (CuCl_2). B : Paramètres thermodynamiques de la liaison entre OSIP et le cuivre avec les erreurs standard. n : nombre de site de liaison ; K_d : constante d'affinité ; ΔH : changement d'enthalpie de la réaction, $-\text{T}\Delta S$: changement de l'entropie de la réaction ; ΔG : énergie libre de Gibbs.

De plus, de manière étonnante, dans un tampon Tris 30 mM NaCl 500 mM pH 8, en plus d'absorber à 280 nm, OSIP absorbe également vers 330 nm. Cependant, lorsqu'elle est dans un tampon TE pH 8, avec 0,5 mM EDTA, cette tendance n'est pas observée.

Pour conclure, ces résultats indiquent que la protéine recombinante OSIP sans étiquette polyhistidine peut être purifiée par chromatographie d'exclusion de taille et par chromatographie d'échange d'ions, et qu'elle est relativement stable à 4°C dans un tampon Tris-HCl 30 mM 48 h après purification.

2. OSIP interagit avec le cuivre

Rapidement après la purification, pour éviter que la protéine ne se dégrade et perde son activité, un test d'interaction par ITC a été réalisé dans le but de déterminer si OSIP fixe le cuivre. Cette méthode repose sur la mesure de la température de réaction entre deux molécules qui libèrent ou absorbent de la chaleur, par rapport à une cellule référentielle à température fixe. Plusieurs expériences successives ont permis d'ajuster les paramètres de l'appareil pour obtenir des paramètres cinétiques interprétables. Comme le plateau inférieur était difficilement atteignable en modifiant seulement les concentrations titrant (Cu)/titré (OSIP), dû à une interaction trop rapide, le volume injecté a été réduit en début d'expérience pour diminuer la quantité de cuivre ajoutée à la cellule titrée (0,5 µL contre 2 µL), d'où la présence des quatre petits pics en début d'enregistrement sur la Figure 5. Ainsi, avec ces paramètres d'injection et en titrant 30 µM de protéine recombinante par 300 µM de CuCl₂ à 25°C avec une agitation de 750 rpm, une interaction a été détectée, avec une courbe d'ajustement à un site, signifiant que OSIP ne possède qu'un seul site de liaison. Cette liaison est exothermique, avec un changement d'enthalpie (ΔH) négative de -149 kcal/mol, et exergonique, avec une énergie libre de Gibbs (ΔG) de -7 kcal/mol. Une constante d'affinité (K_D) de 3,7 µM a été mesurée. Ces résultats permettent de conclure qu'OSIP interagit avec le cuivre avec une bonne affinité.

3. Les cystéines d'OSIP ne sont pas impliquées dans la fixation du cuivre

Pour déterminer si le cuivre se fixe aux résidus cystéines de la séquence protéique, un test d'alkylation a été réalisé. Le cuivre est capable de se lier aux thiols libres des protéines et les

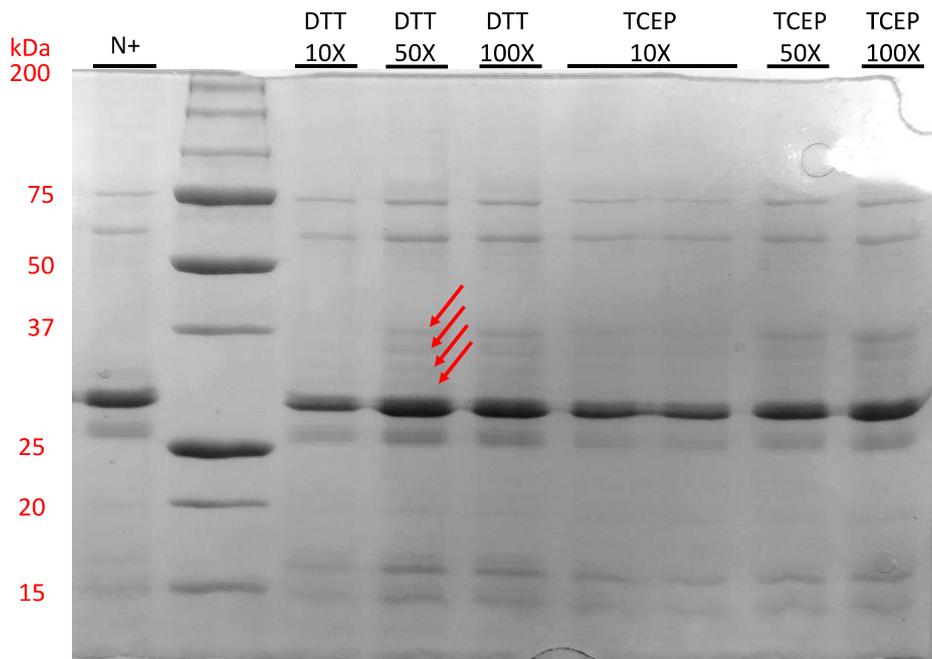


Figure 6 | Sensibilité d'OSIP aux traitements réducteurs par test d'alkylation des cystéines. 5 μ M de protéines recombinantes non traitées ou traitées au DTT ou TCEP sont alkylées avec du mPEG et séparées sur gel SDS-Page non dénaturant. N+ : native alkylée ; DTT : dithiothréitol ; TCEP : Tris(2-carboxyethyl)phospine.

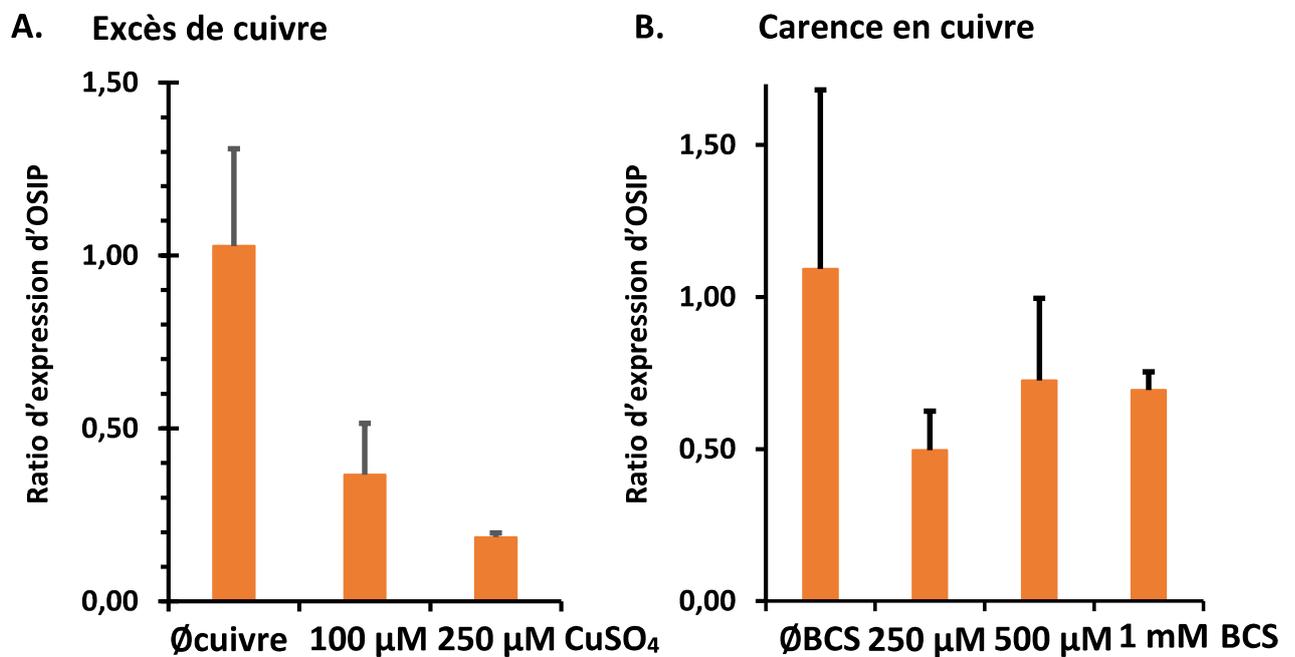


Figure 7 | Profil d'expression du gène OSIP de *Phanerochaete chrysosporium* lors de concentrations élevées et lors de carence en cuivre. A. Expression génique d'OSIP en présence d'un excès en cuivre (100 μ M et 250 μ M de CuSO₄). B. Expression génique d'OSIP lors d'une carence en cuivre par ajout d'un chélateur de cuivre, le BCS (250 μ M, 500 μ M et 1 mM). Le gène codant pour l'actine a été utilisé comme gène de référence pour le calcul des niveaux d'expression des transcrits OSIP, qui ont été normalisés par rapport à la condition contrôle sans cuivre. Les barres d'erreur représentent l'écart-type à la moyenne de 3 réplicats biologiques.

cystéines sont relativement bien conservées parmi les homologues d'OSIP, ce qui laisse supposer qu'elles ont un rôle dans l'activité de la protéine. Ce test repose sur l'utilisation d'un agent alkylant, le méthoxyl-PEG-maleimide (mPEG), capable de se lier aux thiols libres des protéines, ce qui augmente donc le nombre de carbone et par conséquent, le poids moléculaire, ce qui est ensuite révélé par un gel SDS-Page. La première étape consiste à réduire les protéines à l'aide d'agents réducteurs comme le DTT ou le TCEP pour libérer les thiols puis alkylé la protéine. OSIP possède 4 cystéines dans sa séquence. Sur le gel SDS-Page (Figure 6), les 4 formes d'OSIP avec une, deux, trois ou les quatre cystéines réduites, sont légèrement visibles après réduction de la protéine recombinante avec 50 et 100 fois plus de DTT ou TCEP que de protéine. Cependant, la majorité reste totalement oxydée et n'est pas réduite, et ce, jusqu'à une concentration testée en agent réducteur de 1000 fois plus concentrée que la protéine (résultats non montrés). Cela signifie que les cystéines ne sont pas atteignables par ces agents réducteurs et jouent donc un rôle purement structural. En conclusion, ces résultats suggèrent qu'OSIP ne fixe pas le cuivre au niveau de ces cystéines.

4. OSIP est réprimée en présence de cuivre chez *Phanerochaete chrysosporium*

Dans le but de valider le rôle d'OSIP chez l'organisme modèle d'étude *P. chrysosporium*, l'expression d'OSIP en présence de concentrations toxiques en cuivre a été étudiée par qPCR. Pour cela, *P. chrysosporium* a été cultivé en milieu malt 1% avec des concentrations toxiques en cuivre (100 μ M, 250 μ M, 500 μ M et 1 mM). Les ARNs totaux ont été extraits et retro-transcrits en ADNc. Des profils d'expression génique ont ensuite été obtenus par qPCR (Figure 7). Les valeurs d'expression ont été normalisées avec le gène codant pour l'actine. En présence de 100 μ M de CuSO₄, OSIP est environ 2,5 fois moins exprimé et jusqu'à 5 fois moins exprimé en présence de 250 μ M de CuSO₄. Ce résultat suggère une tendance dégressive de l'expression d'OSIP en présence d'une augmentation de la concentration en cuivre. A noter qu'à partir de 500 μ M de cuivre, les ARNs de *P. chrysosporium* étaient pour la plupart dégradés, suggérant que la concentration en cuivre était trop toxique pour la cellule. Ces résultats suggèrent qu'OSIP ne jouerait pas un rôle dans la résistance au cuivre. Sachant qu'OSIP interagit avec le cuivre, une nouvelle hypothèse est formulée selon laquelle OSIP jouerait au contraire un rôle en situation de carence pour assurer un apport vital de cuivre pour le bon fonctionnement de la cellule. Dans le même but de déterminer si OSIP joue un

rôle lors d'une carence en cuivre, l'expression d'OSIP a été mesurée par qPCR lors d'une situation de carence en cuivre. Pour cela, *P. chrysosporium* a été cultivé 3 jours en milieu malt 1% puis 250 μ M, 500 μ M et 1 mM de BCS ont été ajoutés au milieu pendant 24 heures. Les ARNm ont ensuite été extraits et synthétisés en ADNc pour mesurer l'expression des gènes par qPCR. Les profils d'expression obtenus n'ont pas révélé de tendance entre les différentes concentrations de BCS (Figure 7.B). En effet, la valeur d'expression d'OSIP ne suit pas vraiment une tendance puisque à 250 μ M de BCS, le niveau d'expression est de 0,5, alors qu'à 500 μ M de BCS il est de 0,73 et pour 1 mM de 0,69. Il semblerait que la différence du niveau d'expression soit seulement dû à l'expérience de qPCR. Ces résultats montrent que l'ajout de BCS n'a pas changé l'expression d'OSIP et donc aucune conclusion ne peut être faite quant à l'expression d'OSIP lors d'une carence en cuivre.

5. Analyse transcriptomique de *P. chrysosporium* acclimatée au Tanalith

Dans le but d'étudier de manière plus globale les mécanismes majeurs de résistance au Tanalith, un produit de préservation du bois à base de cuivre essentiellement et d'azoles, une approche de transcriptomique a été utilisée. Une souche de *P. chrysosporium* dite acclimatée (Ac) a été repiquée 3 fois successivement sur milieu malt supplémenté en Tanalith (3mg de Cu dans Tanalith/L) avant d'être comparée sur le même milieu avec une souche non acclimatée (Non_Ac). Une adaptation claire au cuivre de la souche Ac était visible dès le premier jour de croissance sur Tanalith (Figure 8. A). Le transcriptome de ces deux souches a été comparé par RNA-Seq.

a. Analyse de la qualité des données transcriptomiques

Des bibliothèques de transcrits ont été générées à partir des souches Ac et Non_Ac, après 48 heures de croissance sur milieu Tanalith, et séquencées. La couverture de séquençage du transcriptome de *P. chrysosporium* (version 4) varie de 52% à 78% en fonction des réplicats (Figure S1). Afin de vérifier que l'ensemble des transcrits a été séquencé et identifié par RNA-seq, une courbe de raréfaction a été générée pour visualiser la profondeur du séquençage (Figure 10. B). Lorsque le plateau de la courbe de raréfaction est atteint, le séquençage est complet et l'ensemble des gènes est représenté dans les données d'expression génique. Dans

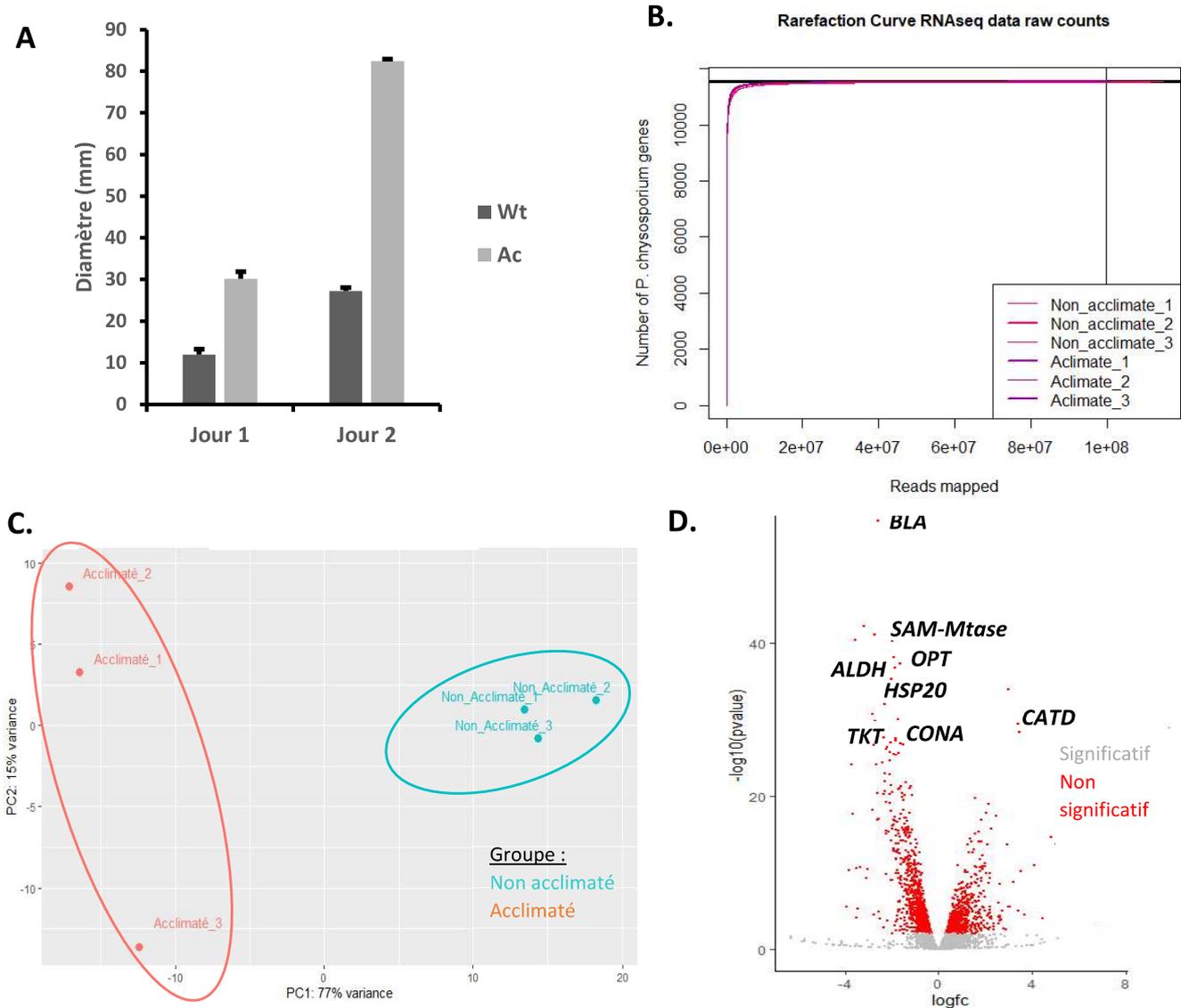


Figure 8 | Analyses de la qualité de l'expérience de RNA-seq et de l'expression différentielle des gènes chez le champignon *Phanerochaete chrysosporium* non acclimaté vs acclimaté. A. Tableau des données de la cartographie des séquences générées par le séquençage sur le transcriptome de *Phanerochaete chrysosporium* version 4.0. Non_Ac = non acclimaté ; Ac = acclimaté. Les transcrits ne possédant pas ou peu d'expression, c'est-à-dire moins de 10 séquences cartographiées pour chaque réplicat, n'ont pas été considérés B. Courbe de raréfaction des 6 réplicats biologiques représentant le nombre total de gènes de *Phanerochaete chrysosporium* version 4 mappés en fonction du nombre de séquences cartographiées. C. ACP des réplicats biologiques représentant la similitude des échantillons. En vert : les souches non acclimatées ; en orange : les souches acclimatées. Volcano plot représentant la variation d'expression génique en fonction de la p-value. En rouge : expression significative ; en gris : expression non significative ; en gras et italique : acronyme des enzymes parmi les 20 gènes les plus significativement exprimés. ADHL : Aldéhyde déshydrogénase ; BLA : beta-lactame ; CATD : Cathepsine D ; CONA : Concanavaline ; HSP20 : Heat shock protein 20 ; OPT : Oligotransporteur ; SAM-Mtase : S-adenosyle-L-méthionine-dependant méthyltransférase ; TKT : Transcétolase.

cette expérience, les 12 256 gènes du génome de *P. chrysosporium* ont été recouverts à partir d'environ 10 millions de séquences, et ce pour chaque réplicat. L'analyse en composante principale (ACP) montre une séparation nette des conditions Ac et Non_Ac, formant deux groupes distincts (Figure 10. C). Alors que les réplicats de la condition Non_Ac sont groupés, les réplicats Ac sont plus dispersés, ce qui pourrait être expliqué par la basse couverture de séquençage du réplicat Ac_3. Les deux conditions Ac et Non_Ac sont positionnées dans deux groupes distincts sur l'ACP, ce qui suggère que la variation entre conditions est beaucoup plus importante que la variation entre réplicat. Après normalisation du nombre de séquences générées par transcrit, tous les transcrits ayant une couverture de séquençage inférieure à 10 séquences pour chaque réplicat biologique ont été exclus de l'analyse. Ainsi, 11 638 gènes ont été considérés comme exprimés sur 12 256 au total dans le génome de *P. chrysosporium*. Sur ces 11 638 gènes, 153 sont surexprimés et 140 sont sous-exprimés de manière significative ($|fold\ change| > 1,5$; $p\text{-value} < 5\%$) dans la condition Ac par rapport à la condition Non_Ac. Un diagramme de dispersion de type Volcano plot a été réalisé afin de visualiser les gènes différentiellement exprimés (Figure 10. D). Les 20 transcrits d'expression ayant les variations les plus significatives sont les suivants: Cathepsine D (*CatD*), Concanavalin A (*CONA*), Transcétolase (*TKT*), Heat Shock Protein 20 (*HSP20*), Aldéhyde Déhydrogénase (*ALDH*), Oligotransporteur (*OPT*), S-adenosyl-méthionine-dépendante méthyltransferases (*SAM-Mtase*) et Beta-lactamase (*BLA*), les autres étant de fonction inconnue.

a. Analyse globale de l'expression des gènes

L'expression des 11 638 gènes a été visualisée et comparée, pour les conditions Ac et Non_Ac au Tanalith, sur une carte de chaleur (heatmap). Dans l'ensemble, la classification agglomérante hiérarchique a révélé que les gènes étaient divisés en deux groupes principaux, en fonction de la condition présentant l'expression maximale (Figure 11. A). Tous les gènes du premier groupe présentent un niveau d'expression maximal dans la condition Ac et ont été divisés en cinq clusters (k1-k5). En particulier, les gènes du cluster k2 sont fortement exprimés dans la condition Ac par rapport à la condition Non_Ac. En revanche, le cluster k4 est composé en grande partie de gènes uniquement surexprimés dans le réplicat Ac_3 et l'expression de ces gènes semble donc être dépendante de ce réplicat. Dans le cluster 2, 6 gènes codant pour des protéines en lien avec la paroi cellulaire sont surexprimés et parmi eux, 5 gènes codent pour

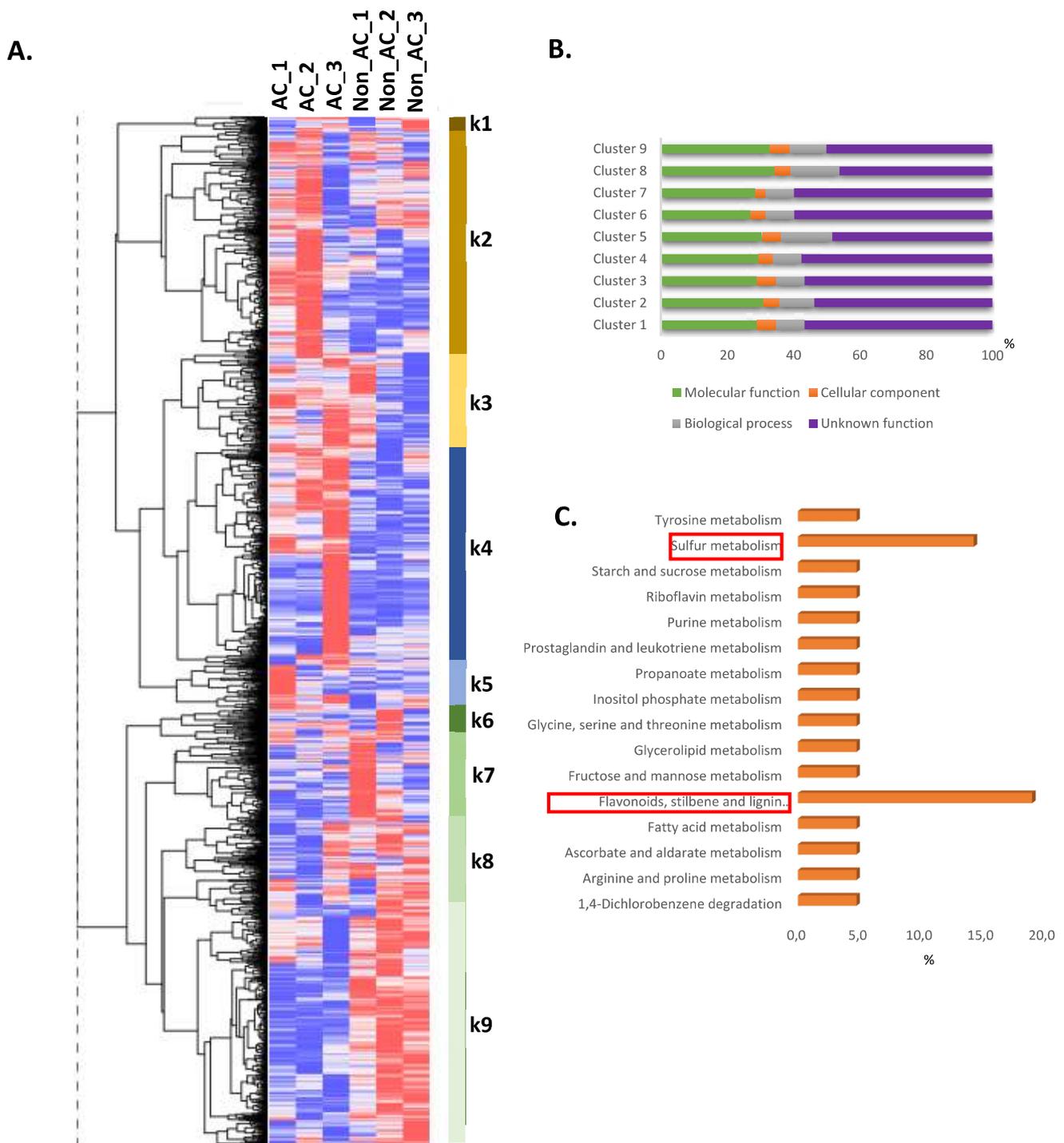


Figure 9 | Classification hiérarchique des 11 648 gènes exprimés avec leur fonction GO dans la souche acclimatée et non acclimatée au Tanalith de *Phanerochaete chrysosporium*. A. Classification hiérarchique par corrélation de Pearson des gènes exprimés dans les conditions acclimatée et non acclimatée en présence de Tanalith. La valeur de l'expression a été transformée par la fonction log2. En rouge, les gènes les plus exprimés, en bleu, les plus faiblement exprimés. Les gènes se distribuent dans 9 groupes (k1 – k9) en fonction de leur expression. B. Catégorisation des gènes en fonction de leur catégories GO (fonction moléculaire, composant cellulaire, processus biologique et fonction inconnue).

des hydrophobines (ProtID : 5547097, 6224249, 6268424, 6328981, 6409685). Le sixième gène code une pectine lyase (ProtID : 4381412). Les gènes compilés du deuxième groupe ont leur maximum d'expression dans la souche Non_Ac et ont été divisés en quatre clusters (k6-k9). Les gènes regroupés dans le cluster k9 sont particulièrement surexprimés dans la condition Non_Ac. Les gènes liés à l'homéostasie du cuivre, identifiés à partir de la base données du JGI, en utilisant le mot clé « copper » sont présents dans 4 clusters (k2, k3, k4 et k9) dont 3 appartenant au groupe 1, représenté par une surexpression dans la condition Ac.. Parmi ces gènes surexprimés chez la condition Ac, 4 multicopper oxidases (SpollA) (ProtID : 6395509, 6380956, 6380827, 6380842), retrouvées en tandem dans le génome de *P. chrysosporium*, sont retrouvés dans les clusters k2, k3 et k4. Des chaperones SOD sont également retrouvée dans le cluster k2 et k4 (ProtID : 6324197 et 6250053). Un transporteur spécifique au cuivre et ainsi qu' un facteur de transcription (ProtID : 6381241 et 6219633, respectivement) sont retrouvés dans le cluster k4. Dans le cluster 9 regroupant les gènes sur-exprimés dans la condition Non_Ac, 2 gènes codant des beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferases possédant un motif WSC (ProtID : 6380186 et 6380236) et le gène codant OSIP sont retrouvés. Les catégories fonctionnelles GO des gènes regroupés dans les 9 clusters ont été extraits et comparés entre elles (Figure 11. B). Environ 30% des gènes de chaque cluster font partie du GO « molecular function », 5 % du GO « cellular component » et 10 % du GO « biological process ». 50% des gènes de chaque cluster sont de fonction inconnue. Aucun enrichissement de terme GO n'a été observé parmi les clusters.

Les gènes impliqués dans la composition et la biogénèse de la paroi ont été identifiés par recherche basée sur le mot clé « structural constituent of cell wall » et « cell wall biogenesis ». Au total, 31 gènes annotés comme impliqués dans la paroi cellulaire sont exprimés chez *P. chrysosporium* v4. Parmi ces gènes, 71 % sont exprimés dans les clusters k1 à k5, soit les clusters regroupant les gènes surexprimés chez la condition Ac. La majorité se retrouvent plus précisément dans le cluster 2. Des gènes de synthèses de polysaccharides sont principalement retrouvés comme la chitine synthase (ProtID : 6222000, 6234763, 6138149, 6225204, 655543) et la 1,3-beta-glucane synthase (ProtID : 6268309) mais aussi des gènes de dégradation de ces polysaccharides, en moindre proportion, avec 2 gènes codant la chitinase dans le cluster 2 (ProtID : 5349601, 6175705). Deux gènes codants des protéines extracellulaires de type SEL-1

sont également retrouvés, uniquement dans le cluster 2. La majorité des gènes de biosynthèse de la paroi, sous-régulés chez la condition acclimatée, se retrouve dans le cluster k9. Parmi ces gènes, 2 codent pour l'akyrine (ProtID : 6239364, 6107629), 2 impliqués dans la voie de biosynthèse du phosphatidylinositol (ProtID : 6262467, 6275131) et 2 transférases (ProtID : 6294475 et 6306959).

L'encyclopédie des Gènes et Génomes de Kyoto (KEGG) est utilisé pour identifier l'activation ou l'inactivation de certaines voies biochimiques. Pour terminer cette analyse, un enrichissement fonctionnel KEGG a été réalisée pour les gènes les plus significativement exprimés ($|fold\ change| > 1,5$; $p\text{-value} < 5\%$) et a permis d'identifier certaines voies surexprimées lors d'une exposition au Tanalith (Figure 10. C). Dans la condition Ac, deux voies biochimiques présentent des gènes surexprimés, le « métabolisme du soufre » et la « biosynthèse de flavonoïdes ». En revanche, aucune fonction KEGG n'a été identifiée pour les gènes significativement sous-exprimés.

Le tableau 2 résume les 20 gènes les plus significativement exprimés ($|foldchange| > 1,5$; $p\text{-value} < 5\%$) avec leur KOG et GO annotations.

Tableau 2 | Tableau des 20 gènes les plus significativement régulés chez *P. chrysosporium* acclimatée au Tanalith avec leurs annotations GO et KOG.

<i>ProteinID</i>	<i>FC</i>	<i>pvalue</i>	<i>KOG</i>	<i>GO</i>
6329584	3,48	3,99E-29		
6218419	3,40	4,43E-30	KOG1339 : Aspartyl protease	GO::0004192 : obsolete cathepsin D activity
6386190	2,97	1,47E-31		
4061576	-1,68	5,15E-38		GO::0016021 : integral component of membrane
6223646	-1,72	1,34E-30		
6371988	-1,80	1,75E-34	KOG0710 : Molecular chaperone (small heat-shock protein Hsp26/Hsp24	
5525050	-1,81	3,83E-28		GO:0004553 : hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds GO:0005975 : carbohydrate metabolic process
6361559	-1,86	2,08E-37	KOG2262 : Sexual differentiation process protein ISP4	GO::0055085 : transmembrane transport
6269212	-1,92	9,17E-39		GO::0016021 : integral component of membrane
6257368	-1,96	6,44E-41	KOG3178 : Hydroxyindole-O-methyltransferase and related SAM-dependant methyltransferases	GO::0008168 : methyltransferase activity GO::0008171 : O-methyltransferase activity
6201380	-2,01	5,07E-36	KOG2450 : Aldehyde dehydrogenase	GO::0008152 : metabolic process GO::0016491 : oxidoreductase activity GO::0055114 : obsolete oxidation-reduction process
6382187	-2,31	1,02E-32		
6339218	-2,33	2,76E-28		GO:0003824 : catalytic activity GO:0005975 : carbohydrate metabolic process GO:0008152 : metabolic process GO:0016832 : aldehyde-lyase activity
6382186	-2,55	1,37E-56		GO::0008800 : beta-lactamase activity GO::0016787 : hydrolase activity
6243789	-2,69	7,93E-42		GO::0019825 : oxygen binding GO::0020037 : heme binding
6172658	-2,72	1,46E-30		GO::0006952 : defense response

Suite Tableau 2.

6389099	-2,84	1,79E-31	GO:0016020 : membrane GO::0016021 : integral component of membrane
6213517	-3,22	7,77E-43	
6359907	-3,54	4,54E-41	

VI. DISCUSSION

Les champignons de pourriture blanche sont reconnus pour leur arsenal enzymatique capable de dégrader des polysaccharides complexes, la lignine ainsi que des composés polluants présents dans le sol. De plus, leur résistance aux métaux, comme le cuivre, en font des objets d'étude intéressants. Plusieurs mécanismes physico-chimiques et biologiques directs et indirects peuvent être impliqués dans la survie du champignon dans des conditions de toxicité au cuivre (Gadd, 1993). Au niveau extracellulaire, la paroi cellulaire constitue la première barrière physique du champignon contre le cuivre en excès. Ses composants sont capables de fixer le cuivre pour l'immobiliser. D'ailleurs, au cours de mon stage, j'ai pu observer la biomasse de *P. chrysosporium* cultivé en milieu malt et cuivre (500 μ M et 1 mM) devenir bleue-verte, révélant l'accumulation de cuivre au sein de la paroi. Le rôle des protéines dans la fixation du cuivre extracellulaire reste à ce jour peu étudié. L'objectif de ce stage consistait à identifier de potentiels candidats capables de chélater le cuivre au sein de la paroi cellulaire chez *P. chrysosporium* afin de mieux comprendre les mécanismes de résistance au cuivre de ce champignon.

OSIP est une protéine pariétale candidate impliquée dans l'intégrité de la paroi cellulaire (Valette *et al.*, 2021). L'hypothèse initiale de ce stage était qu'elle jouerait un rôle dans la résistance de *P. chrysosporium* à des concentrations toxiques en cuivre. Nous avons démontré qu'OSIP interagissait bien avec le cuivre et qu'elle ne le fixait probablement pas au niveau de ses résidus cystéines mais plutôt au niveau des résidus His, comme c'est le cas pour les LPMO et de nombreuses autres enzymes cuivre dépendantes (Brander *et al.*, 2020). Pour vérifier cette hypothèse, j'ai produit et purifié OSIP tronquée pour sa partie C-terminale. Cette partie C-terminale contient à la fois l'extension riche en Ala et Gly et un patch de 4 résidus His. Cette protéine tronquée a été produite dans *E. coli* BL21, cependant, elle était instable et s'agglomérait lors de la purification et nous n'avons pas pu mesurer son interaction avec le cuivre par ITC. Le plus intéressant serait de muter spécifiquement et uniquement les 4-His pour limiter les phénomènes d'agglomération de la protéine et confirmer l'implication de ce patch dans la fixation du cuivre. L'impossibilité de réduire la protéine recombinante OSIP confirme qu'il ne s'agit effectivement pas d'une LPMO ou d'une enzyme dépendante du cuivre, car ces dernières possèdent une activité d'oxydo-réduction que ne possède visible -

ment pas OSIP (Brander *et al.*, 2020). Sachant que les résidus histidines fixent préférentiellement le cuivre sous sa forme oxydée (Cu^{2+}), abondamment retrouvé dans le milieu extracellulaire, et qu'il ne s'agit pas d'une enzyme dépendante du cuivre, OSIP capterait donc le cuivre au niveau de la paroi, sans l'utiliser pour son activité. De plus, la protéine recombinante OSIP a la particularité de former un gel. Une hypothèse serait donc que, lorsque le cuivre est en excès dans le milieu extracellulaire, OSIP forme un gel autour de la paroi pour séquestrer le cuivre et limiter sa toxicité intracellulaire. Pour répondre à cette interrogation, l'expression d'*OSIP* a été analysée par qPCR en condition d'excès de cuivre. Cependant, l'effet inverse de notre hypothèse a été observé. En effet, l'expression d'*OSIP* chez *P. chrysosporium* est réprimée dans cette condition, jusqu'à 5 fois en présence de 250 μM de CuSO_4 . Donc OSIP ne jouerait pas un rôle dans la résistance au cuivre, mais puisqu'elle interagit bien avec le cuivre, nous avons émis l'hypothèse qu'elle jouerait un rôle lors d'une carence en cuivre.

Un article récent présente la caractérisation d'une protéine Cbi1 chez *Cryptococcus neoformans* qui présente des caractéristiques similaires à OSIP (Garcia-Santamarina *et al.*, 2020). En effet, Cbi1 est également une petite protéine sécrétée. Elle a été initialement assimilée à une LPMO, mais, comme OSIP, elle ne possède ni d'activité rédox ni les sites actifs caractéristiques de ces enzymes lytiques (Brander *et al.*, 2020). De plus, elle possède des résidus histidine capable de chélater le cuivre et jouerait un rôle dans le transport du cuivre extracellulaire vers le transporteur de cuivre Ctr1. *CBI1* est fortement induit lors d'une carence en cuivre et la délétion de ce gène perturbe l'intégrité de la paroi cellulaire (Brander *et al.*, 2020, Probst *et al.*, 2021, preprint). Ainsi, sur la base de ces informations, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle OSIP serait active lors d'une carence en cuivre, permettant l'apport d'une quantité suffisante en cuivre pour la survie de la cellule. Pour répondre à cette problématique, l'expression d'*OSIP* a été mesurée par qPCR chez *P. chrysosporium* en présence de BCS, un chélateur de cuivre. Cependant, l'ajout de BCS n'a pas changé significativement l'expression d'*OSIP* comparé à la condition contrôle.

Le BCS utilisé pour créer une carence en cuivre n'a jamais été utilisé au laboratoire et aucune publication n'était disponible quant à l'utilisation de ce composé sur des champignons filamenteux. Nous avons donc utilisé la pré-publication de Probst *et al* (2021) comme référence

pour la détermination des concentrations à utiliser, leur modèle d'étude étant *Cryptococcus neoformans*. Cependant n'ayant observé aucune différence d'expression d'OSIP il n'est pas à exclure que le BCS n'ait pas eu l'effet escompté. Un travail d'optimisation des concentrations de BCS sur *P. chryso sporium*, couplé à des dosages de cuivre libre résiduel dans le milieu extérieur permettrait de déterminer les conditions permettant de générer une carence en cuivre chez cette espèce.

OSIP est donc un candidat pariétal intéressant dans la chélation du cuivre au niveau extracellulaire de par son interaction avec le cuivre, validé par ITC. L'absence de potentiel rédox décline cette protéine des enzymes dépendantes du cuivre. Les résultats d'expression d'OSIP en présence de cuivre excluent un rôle de la protéine dans la résistance au cuivre, au contraire, elle jouerait davantage un rôle lors d'une carence en cuivre. Les paramètres d'appauvrissement du milieu en cuivre restent tout de même à déterminer.

Parallèlement à ce travail de caractérisation, afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans la résistance au Tanalith de *P. chryso sporium*, des données transcriptomiques ont été générées par séquençage Illumina et étudiées à partir d'une souche non acclimatée (Non_Ac) et acclimatée (Ac) au Tanalith par repiquages successifs sur milieu supplémenté en Tanalith à 3 mg/L de Cu dosé dans le Tanalith. La souche Ac a une croissance beaucoup plus rapide sur milieu Tanalith, montrant la mise en place d'un mécanisme d'adaptation temporaire permettant de lutter contre des concentrations toxiques en cuivre.

La qualité du séquençage est satisfaisante pour évaluer l'expression génique, avec un score PHRED oscillant entre 20 et 40 pour chaque base nucléique, c'est-à-dire 1 à 100 erreurs toutes les 100 à 10 000 paires de bases, respectivement. Les erreurs se trouvant majoritairement à l'extrémité 5' des séquences obtenues, 5 nucléotides a été retirés pour toutes les séquences de chaque condition. La couverture de séquençage du transcriptome de *P. chryso sporium* version 4, est de 100% des gènes, dès les 10 millions de séquences atteints. Cette couverture de séquençage a été rapidement atteints et il aurait été judicieux de réduire la profondeur du séquençage afin d'augmenter le nombre d'échantillons et ainsi réduire les différences d'expression des gènes entre réplicat biologique et obtenir des analyses statistiques plus robustes. Cependant, sur le total de séquences générées par le séquençage, seulement 52% à 68% sont cartographiées sur le transcriptome de *P. chryso sporium*. Ceci est peut-être dû au fait de la présence d'ARN ribosomiaux ou mitochondriaux non représentés dans le transcripto-

me. Une cartographie sur le génome aurait pu être plus informative. De plus, relativement peu de gènes sont différentiellement exprimés avec un $|fold\ change| > 1,5$ et une $p\text{-value} < 5\%$. Sur les 11 648 gènes exprimés initialement, seulement 293 entrent dans ces critères (140 sont réprimés et 153 sont induits chez la souche Ac par rapport à la souche Non-Ac). Dans la condition Ac, une variation assez importante est observée entre les réplicats biologiques, ce qui pourrait expliquer le faible taux d'expression significative des gènes. Le phénomène d'acclimatation est peut-être unique pour chaque souche/réplicats, avec une réponse très spécifique à l'environnement extérieur. Il est donc difficile d'évaluer la réponse des champignons à des concentrations toxiques en cuivre. En augmentant l'échantillonnage, l'évaluation de la réponse physiologique pourrait être plus précise, avec un appui statistique plus important.

Le nombre de séquences obtenues pour le réplicat Non_Ac_1 est 2 fois moins important que pour les autres réplicats. Cette variation peut être expliquée par un biais technique lors de la préparation des bibliothèques d'ARNs, notamment par la présence de séquences dupliquées dû à l'amplification des fragments d'ADNc par PCR avant le séquençage. La duplication de fragments de PCR est en moyenne à 3 millions de séquences pour l'ensemble des réplicats biologiques. Pour le réplicat Ac_3, plus de 6 000 000 de duplicats de séquences sont observés contre 1 million pour le réplicat Non_Ac_1. Cela pourrait expliquer la variation entre réplicat et donc le faible nombre de gènes possédant une expression significative.

Les 293 gènes régulés de manière significative permettent néanmoins de proposer des hypothèses quant au mécanisme d'adaptation de *P. chrysosporium* au Tanalith. Premièrement, les gènes impliqués dans l'homéostasie du cuivre ne sont pas régulés de manière significative suggérant que les transporteurs d'efflux ou les protéines intracellulaires impliquées dans la chélation du cuivre ne sont pas responsables de la résistance au cuivre de la souche acclimatée. Chez les champignons, la sécrétion de métabolites secondaires est une stratégie de défense contre la toxicité des métaux par immobilisation à l'extracellulaire. L'acide oxalique est reconnu comme chélateur de cuivre extracellulaire et permet son immobilisation afin de limiter son entrée dans la cellule. Cependant, *P. chrysosporium* ne sécrète que très peu d'acide oxalique, même en présence d'une concentrations toxiques en cuivre (Claudien *et al.*, 2022). Parmi les gènes surexprimés de manière significative

($|\text{foldchange}| > 1,5$; $p\text{value} < 0,05$), deux gènes codant pour des naringenin-chalcone synthases, un pour une caffeoyl-CoA O-methyltransferase et une beta-glucosidase, sont exprimés environ 2 fois plus chez la souche acclimatée que chez la souche non acclimatée au Tanalith, et toutes les quatre sont impliquées dans la biosynthèse de flavonoïdes. Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires composés de deux cycles aromatiques largement distribués dans le règne végétal, mais quelques champignons possèdent également les gènes nécessaires à leur biosynthèse (Mohanta 2020). Les flavonoïdes possèdent une activité antioxydante et sont notamment capable de chélater le cuivre au niveau des groupes hydroxyles des cycles aromatiques (Mira *et al.*, 2002). Il semblerait donc que *P. chrysosporium* dépende plutôt de la sécrétion de flavonoïdes que de l'acide oxalique pour chélater le cuivre extracellulaire. De plus, le gène codant la 3-dehydroquinase synthase est 5 fois plus exprimée chez la souche acclimatée que chez la souche non acclimatée. Cette enzyme intervient dans la voie de shikimate, impliquée dans la production d'acides aminés aromatiques pour la biosynthèse de métabolites secondaires et permet notamment la synthèse des flavonoïdes (Herrmann et Weaver 1999).

Un deuxième potentiel mécanisme de défense qui se dégage de cette analyse transcriptomique est le remodelage de la paroi de *P. chrysosporium* pour s'adapter à cet environnement toxique. Trois peptidases aspartiques, la cathepsine D et deux pepsine A, sont significativement exprimées chez la souche acclimatée et jouent un rôle dans la dégradation des protéines. La cathepsine peut être sécrétée et permet la dégradation de la matrice extracellulaire. C'est l'une des protéases majeures dans le remodelage de la paroi cellulaire (Patel *et al.*, 2018; Fonović et Turk 2014). D'autres gènes codant des enzymes de dégradation des composants de la paroi, comme la glucane (1,3)-beta-glucosidase et la chitinase sont surexprimés dans la condition acclimatée. Deux gènes codant des hydrophobines sont significativement sur-exprimés, environ 2 fois plus, chez la souche acclimatée. Les hydrophobines sont spécifiques aux champignons et sont capables de s'assembler spontanément en une monocouche hydrophobe autour de la paroi cellulaire. Cette couche est extrêmement stable et insoluble et sert de bouclier contre les agressions extérieures, limitant l'influx d'intrants potentiellement toxiques pour la cellule (Bayry *et al.* 2012). 70% des hydrophobines annotées chez les champignons ont été identifiées chez les Agaricomycètes et sont donc en expansion au sein de cette classe (JGI, MycoCosm ; mot-clé « hydrophobin »).

Cette caractéristique unique pourrait expliquer en partie la résistance accrue des pourritures blanches aux substances toxiques extracellulaires, comme le cuivre.

CONCLUSION

Le cuivre est un métal essentiel à la vie mais qui peut rapidement devenir cytotoxique lorsque sa concentration n'est plus contrôlée au sein de la cellule. La première barrière physique qui protège le champignon est la paroi cellulaire, cependant, le mécanisme d'interaction avec le cuivre reste relativement peu connu chez *P. chrysosporium*. Ce champignon de pourriture blanche sécrète de nombreux métabolites secondaires et se distingue par sa grande résistance aux métaux, et notamment le cuivre. Ici, nous avons montré que les deux principaux mécanismes de défense de *P. chrysosporium* contre le cuivre contenu dans le Tanalith était la sécrétion de flavonoïdes permettant de neutraliser le cuivre extracellulaire et le remodelage de la paroi cellulaire avec une couche hydrophobe superficielle d'hydrophobines afin de limiter l'influx de cuivre au sein de la cellule. De plus, la caractérisation de la protéine pariétale OSIP possédant un site de liaison au cuivre a permis de conclure qu'elle ne jouait pas un rôle dans la résistance au cuivre et n'était pas une enzyme dépendante du cuivre. Plus de recherches sont nécessaires pour déterminer son rôle au sein de la cellule. Peu de protéines pariétales se sont dégagées de cette étude transcriptomique. Cependant, beaucoup de gènes surexprimés ne sont pas annotés. Une curation manuelle, spécifiquement tournée vers les marqueurs d'appartenance à la paroi cellulaire, comme par exemple la présence d'une hélice transmembranaire, permettrait de déterminer la réelle proportion de protéines pariétales impliquées dans l'acclimatation de *P. chrysosporium* au cuivre contenu dans le Tanalith.

BIBLIOGRAPHIE

- Baldrian, Petr. 2003. « Interactions of Heavy Metals with White-Rot Fungi ». *Enzyme and Microbial Technology* 32 (1): 78-91. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00245-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00245-4).
- Bayry, Jagadeesh, Vishukumar Amanianda, J. Iñaki Guijarro, Margaret Sunde, et Jean-Paul Latgé. 2012. « Hydrophobins—Unique Fungal Proteins ». *PLoS Pathogens* 8 (5): e1002700. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002700>.
- Brander, Søren, Istvan Horvath, Johan Ø. Ipsen, Ausra Peculyte, Lisbeth Olsson, Cristina Hernández-Rollán, Morten H. H. Nørholm, et al. 2020. « Biochemical Evidence of Both Copper Chelation and Oxygenase Activity at the Histidine Brace ». *Scientific Reports* 10 (1): 16369. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73266-y>.
- Çeribasi, I. H., et U. Yetis. 2001. « Biosorption of Ni(II) and Pb(II) by *Phanerochaete Chrysosporium* from a Binary Metal System - Kinetics ». *Water SA* 27 (1): 15-20. <https://doi.org/10.4314/wsa.v27i1.5004>.
- Chen, Guiqiu, Jiaqi Fan, Rushi Liu, Guangming Zeng, Anwei Chen, et Zhengjun Zou. 2012. « Removal of Cd(II), Cu(II) and Zn(II) from Aqueous Solutions by Live *Phanerochaete Chrysosporium* ». *Environmental Technology* 33 (23): 2653-59. <https://doi.org/10.1080/09593330.2012.673015>.
- Culotta, Valeria Cizewski, Leo W.J. Klomp, Jeffrey Strain, Ruby Leah B. Casareno, Bernhard Krems, et Jonathan D. Gitlin. 1997. « The Copper Chaperone for Superoxide Dismutase ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (38): 23469-72. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.38.23469>.
- Dancis, Andrew, Daniel S. Yuan, David Haile, Candice Askwith, David Eide, Charles Moehle, Jerry Kaplan, et Richard D. Klausner. 1994. « Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: An unexpected role for copper in iron transport ». *Cell* 76 (2): 393-402. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90345-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90345-X).
- Ding, Chen, Jun Yin, Edgar Mauricio Medina Tovar, David A. Fitzpatrick, Desmond G. Higgins, et Dennis J. Thiele. 2011. « The Copper Regulon of the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus Neoformans* H99 ». *Molecular Microbiology* 81 (6): 1560-76. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07794.x>.
- Erwig, Lars P., et Neil A. R. Gow. 2016. « Interactions of Fungal Pathogens with Phagocytes ». *Nature Reviews Microbiology* 14 (3): 163-76. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.21>.
- Ferguson, M.A. 1999. « The Structure, Biosynthesis and Functions of Glycosylphosphatidylinositol Anchors, and the Contributions of Trypanosome Research ». *Journal of Cell Science* 112 (17): 2799-2809. <https://doi.org/10.1242/jcs.112.17.2799>.
- Festa, Richard A., et Dennis J. Thiele. 2011. « Copper: an Essential Metal in Biology ». *Current biology : CB* 21 (21): R877-83. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.09.040>.
- Fonović, Marko, et Boris Turk. 2014. « Cysteine Cathepsins and Extracellular Matrix Degradation ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, Matrix-mediated cell behaviour and properties, 1840 (8): 2560-70. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.03.017>.
- Foster, Andrew W., Deenah Osman, et Nigel J. Robinson. 2014. « Metal Preferences and Metallation * ». *Journal of Biological Chemistry* 289 (41): 28095-103. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.588145>.
- Foster, Andrew W., et Nigel J. Robinson. 2011. « Promiscuity and preferences of metallothioneins: the cell rules ». *BMC Biology* 9 (1): 25. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-25>.
- Gadd, G. M. 1993. « Interactions of Fungi with Toxic Metals ». *New Phytologist* 124 (1): 25-60. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1993.tb03796.x>.
- García-Santamarina, Sarela, Corinna Probst, Richard A. Festa, Chen Ding, Aaron D. Smith, Steven E. Conklin, Søren Brander, et al. 2020. « A Lytic Polysaccharide Monooxygenase-like Protein Functions in Fungal Copper Import and Meningitis ». *Nature Chemical Biology* 16 (3): 337-44. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0437-9>.

- Groot, Piet W. J. de, Cristina Ruiz, Carlos R. Vázquez de Aldana, Encarnación Duenas, Víctor J. Cid, Francisco Del Rey, José M. Rodríguez-Peña, et al. 2001. « A Genomic Approach for the Identification and Classification of Genes Involved in Cell Wall Formation and Its Regulation in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Comparative and Functional Genomics* 2 (3): 124-42. <https://doi.org/10.1002/cfg.85>.
- Herrmann, Klaus M., et Lisa M. Weaver. 1999. « The Shikimate Pathway ». *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50 (1): 473-503. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.473>.
- Ibe, Chibuike, et Carol A. Munro. 2021. « Fungal Cell Wall Proteins and Signaling Pathways Form a Cytoprotective Network to Combat Stresses ». *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)* 7 (9): 739. <https://doi.org/10.3390/jof7090739>.
- Irving, H., et R. J. P. Williams. 1953. « 637. The Stability of Transition-Metal Complexes ». *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, n° 0 (janvier): 3192-3210. <https://doi.org/10.1039/JR9530003192>.
- Latgé, J. P., et R. Calderone. 2006. « The Fungal Cell Wall ». In *Growth, Differentiation and Sexuality*, édité par Ursula Kües et Reinhard Fischer, 73-104. The Mycota. Berlin, Heidelberg: Springer. https://doi.org/10.1007/3-540-28135-5_5.
- Lerch, Konrad. 1980. « Copper Metallothionein, a Copper-Binding Protein from *Neurospora Crassa* ». *Nature* 284 (5754): 368-70. <https://doi.org/10.1038/284368a0>.
- Lin, S. J., et V. C. Culotta. 1995. « The ATX1 Gene of *Saccharomyces Cerevisiae* Encodes a Small Metal Homeostasis Factor That Protects Cells against Reactive Oxygen Toxicity. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (9): 3784. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.9.3784>.
- Livak, K. J., et T. D. Schmittgen. 2001. « Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method ». *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4): 402-8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Martinez, Diego, Luis F. Larrondo, Nik Putnam, Maarten D. Sollewijn Gelpke, Katherine Huang, Jarrod Chapman, Kevin G. Helfenbein, et al. 2004. « Genome Sequence of the Lignocellulose Degrading Fungus *Phanerochaete Chrysosporium* Strain RP78 ». *Nature Biotechnology* 22 (6): 695-700. <https://doi.org/10.1038/nbt967>.
- Mira, Lurdes, M. Tereza Fernandez, Marta Santos, Rui Rocha, M. Helena Florêncio, et Keith R. Jennings. 2002. « Interactions of Flavonoids with Iron and Copper Ions: A Mechanism for their Antioxidant Activity ». *Free Radical Research* 36 (11): 1199-1208. <https://doi.org/10.1080/1071576021000016463>.
- Mohanta, Tapan Kumar. 2020. « Fungi Contain Genes Associated with Flavonoid Biosynthesis Pathway ». *Journal of Functional Foods* 68 (mai): 103910. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103910>.
- Patel, Seema, Ahmad Homaei, Hesham R. El-Seedi, et Nadeem Akhtar. 2018. « Cathepsins: Proteases That Are Vital for Survival but Can Also Be Fatal ». *Biomedicine & Pharmacotherapy* 105 (septembre): 526-32. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.148>.
- Poole, Robert K., éd. 2017. *Microbiology of Metal Ions*. Advances in Microbial Physiology, volume 70. Kidlington London Cambridge, MA San Diego, CA: Elsevier, Academic Press.
- Probst, Corinna, Sarela Garcia-Santamarina, Jacob T. Brooks, Inge Van Der Kloet, Dennis J. Thiele, et J. Andrew Alspaugh. 2021. « Adaptive Changes in the Fungal Cell Wall Mediate Copper Homeostasis ». Preprint. Microbiology. <https://doi.org/10.1101/2021.12.14.472543>.
- Puig, Sergi, Jaekwon Lee, Miranda Lau, et Dennis J. Thiele. 2002. « Biochemical and Genetic Analyses of Yeast and Human High Affinity Copper Transporters Suggest a Conserved Mechanism for Copper Uptake * ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (29): 26021-30. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202547200>.
- Smith, Aaron D., Brandon L. Logeman, et Dennis J. Thiele. 2017. « Copper Acquisition and Utilization in Fungi ». *Annual Review of Microbiology* 71 (1): 597-623. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-030117-020444>.

- Tong, Sen-Miao, Ding-Yi Wang, Ben-Jie Gao, Sheng-Hua Ying, et Ming-Guang Feng. 2019. « The DUF1996 and WSC Domain-Containing Protein Wsc1I Acts as a Novel Sensor of Multiple Stress Cues in *Beauveria Bassiana* ». *Cellular Microbiology* 21 (12): e13100. <https://doi.org/10.1111/cmi.13100>.
- Tottey, Steve, Kevin J. Waldron, Susan J. Firbank, Brian Reale, Conrad Bessant, Katsuko Sato, Timothy R. Cheek, et al. 2008. « Protein-Folding Location Can Regulate Manganese-Binding versus Copper- or Zinc-Binding ». *Nature* 455 (7216): 1138-42. <https://doi.org/10.1038/nature07340>.
- Vacchina, Véronique, Petr Baldrian, Jiri Gabriel, et Joanna Szpunar. 2002. « Investigation of the Response of Wood-Rotting Fungi to Copper Stress by Size-Exclusion Chromatography and Capillary Zone Electrophoresis with ICP MS Detection ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 372 (3): 453-56. <https://doi.org/10.1007/s00216-001-1104-y>.
- Valette, Nicolas, Julien Renou, Alexis Boutilliat, Antonio José Fernández-González, Valérie Gautier, Philippe Silar, Christophe Guyeux, et al. 2021. « OSIP1 Is a Self-assembling DUF3129 Protein Required to Protect Fungal Cells from Toxins and Stressors ». *Environmental Microbiology* 23 (3): 1594-1607. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15381>.
- Winge, D. R., K. B. Nielson, W. R. Gray, et D. H. Hamer. 1985. « Yeast Metallothionein. Sequence and Metal-Binding Properties ». *The Journal of Biological Chemistry* 260 (27): 14464-70.
- Zhang, Qihua, Guangming Zeng, Guiqiu Chen, Min Yan, Anwei Chen, Jianjian Du, Jian Huang, et al. 2014. « The Effect of Heavy Metal-Induced Oxidative Stress on the Enzymes in White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium* ». *Applied biochemistry and biotechnology* 175 (novembre). <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1298-z>.

Abstract: Tanalith is a chemical compound largely composed of copper as well of azole used in the wood industry to increase durability. It is impossible to recycle waste wood treated with Tanalith so far. A wood-decay fungus, *Phanerochaete chrysosporium*, is capable of growing onto Tanalith and is therefore a recycling bioremediation solution being considered. However, the mechanism by which this fungus is able to acclimate to this compound remains unknown. This study compared the transcriptomic profiles of acclimated and non-acclimated *P. chrysosporium*. A total of 293 transcripts were significantly expressed and allowed us to propose a hypothesis for a mechanism of resistance to Tanalith. The two main *P. chrysosporium* defense are: the secretion of flavonoids capable of chelating copper and the remodeling of its cell wall by adding a superficial hydrophobic layer composed of hydrophobins, thus limiting the influx of input. In addition, in order to identify a precursor role of cell wall proteins in copper resistance, we characterized a candidate parietal protein, Oak stress-induced protein (OSIP). Isothermal calorimetric titration confirmed its interaction with copper, however, qPCR analysis of OSIP expression showed that it is not involved in copper resistance. Further characterization of this protein is required to characterize its function relative to copper within the cell.

Keywords: copper resistance mechanism, RNA-sequencing, transcriptomic, white-rot fungus, cell wall proteins

Résumé : Le Tanalith est un composé chimique composé majoritaire de cuivre et d'azoles utilisé dans l'industrie du bois pour augmenter sa durabilité. Il est à ce jour impossible de recycler les déchets de bois traités au Tanalith. Un champignon dégradateur de bois, *Phanerochaete chrysosporium*, est capable de se développer et de s'adapter à ce composé chimique et est donc une solution de bioremédiation envisagée pour le recyclage. Seulement, le mécanisme par lequel ce champignon est capable de s'acclimater à ce composé reste inconnu. Cette étude a comparé le profil transcriptomique de *P. chrysosporium* acclimaté et non acclimaté au Tanalith. Un total de 293 transcrits sont significativement régulés et nous ont permis de proposer une hypothèse de mécanisme de résistance au Tanalith. *P. chrysosporium* se défend par deux grandes voies : la sécrétion de flavonoïdes capable de chélater le cuivre et le remodelage de sa paroi cellulaire par ajout d'une couche hydrophobe superficielle d'hydrophobines limitant l'influx d'intrant. De plus, dans le but de dégager un rôle précurseur des protéines de la paroi dans la résistance au cuivre, nous avons caractérisé une protéine pariétale candidate, Oak stress-induced protein (OSIP). Une titration calorimétrique isotherme a confirmé son interaction avec le cuivre, cependant, l'analyse de l'expression d'OSIP par qPCR a montré qu'elle n'est pas impliquée dans la résistance au cuivre. Une caractérisation approfondie de cette protéine est nécessaire afin de mieux comprendre sa fonction dans la gestion du cuivre au sein de la cellule.

Mots clés : mécanisme de résistance au cuivre, RNA-sequencing, transcriptomique, pourriture blanche, protéines pariétales