



**HAL**  
open science

# Étude d'enzymes oxydatives fongiques actives sur les polysaccharides de paroi fongique

Roseline Assiah Yao

► **To cite this version:**

Roseline Assiah Yao. Étude d'enzymes oxydatives fongiques actives sur les polysaccharides de paroi fongique. Microbiologie et Parasitologie. 2022. hal-04588517

**HAL Id: hal-04588517**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-04588517v1>**

Submitted on 27 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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

MASTER DE MICROBIOLOGIE  
SPECIALITE MICROBIOLOGIE INDUSTRIELLE (MIND)

RAPPORT DE STAGE

ETUDE D'ENZYMES OXYDATIVES  
FONGIQUES ACTIVES SUR LES  
POLYSACHARIDES DE PAROI FONGIQUE

Présenté par  
YAO Roseline Assiah

Stage tenu du 10 Janvier au 08 Juillet 2022

Sous la supervision de :

Jean-Guy BERRIN : Directeur de recherche INRAE, UMR Biodiversité et Biotechnologie Fongiques

Bastien BISSARO : Chargé de recherche INRAE, UMR Biodiversité et Biotechnologie Fongiques

## Remerciements

Au terme de ce stage, qui marque la fin de ce cursus en master de Microbiologie, je souhaite adresser mes remerciements au Prof Frédéric Jorand et à l'ensemble de l'équipe pédagogique du master de Microbiologie pour être à l'initiative de cette formation et pour l'encadrement dont nous avons été l'objet tout le long de ce cursus ;

Je tiens à adresser également mes remerciements à Madame la directrice de l'UMR Biodiversité et Biotechnologie Fongiques, **Marie -Noelle ROSSO**, pour m'avoir permis de réaliser ce stage au sein de son laboratoire ;

Mes remerciements vont également à de l'ensemble des personnels du laboratoire (Ingénieurs, techniciens...) pour l'écoute et la disponibilité ;

Un grand merci à la chaleureuse équipe de recherche BOOST, qui m'a accueilli pour ce stage, plus particulièrement à

- **Mireille Haon, Sacha Grisel et Olivier Tranquet** pour la patience, l'attention, le soutien et l'aide apportés tout le long de ce stage à la paillasse et dans le laboratoire en général ;

L'ensemble des doctorants et post-doctorats de l'équipe pour avoir contribué à mon intégration et pour le partage enrichissant d'expérience ;

Enfin, à mes très chers encadrants, **Jean-Guy Berrin** et **Bastien Bissaro** qui m'avez fait confiance. A vous qui, dès le premier jour, et jusqu'au bout m'avez accompagné de vos conseils et de votre expertise, à vous qui avez encouragé mes initiatives, en usant de patience envers moi, mêlant rigueur et bienveillance, je veux exprimer ma profonde gratitude.

J'ai été honorée de travailler avec vous. Vous m'avez fait découvrir et aimer la recherche scientifique, MERCI !

# SOMMAIRE

Liste des sigles et abréviations	IV
Liste des tableaux et figures	V
Présentation de la structure d'accueil	VI
<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>I. PAROIS FONGIQUES</b>	<b>2</b>
I.1. Composition et structure des parois fongiques	2
I.2. Rôles de la paroi fongique	4
<b>II. MODIFICATION ET DÉGRADATION ENZYMATIQUE DE LA PAROI FONGIQUE : LES CARBOHYDRATE-ACTIVE ENZYMES (CAZymes)</b>	<b>5</b>
II.1. Les chitinases	5
II.2. Les chitine désacétylases	6
II.3. Les enzymes à activité auxiliaire (AA)	6
<b>III. USTILAGO MAYDIS</b>	<b>9</b>
III.1. Généralités	9
III.2. Composition et structure de la paroi fongique d' <i>Ustilago maydis</i>	10
III.3. Aspect moléculaire : analyses omiques	10
<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>12</b>
<b>I. Cinétique de croissance d'<i>Ustilago maydis</i> et analyse sécrétomique</b>	<b>12</b>
I.1. Cinétique de croissance d' <i>Ustilago maydis</i> .	12
I.2. Production de sécrétomes et analyse protéomique	13
<b>II. Production d'enzymes et tests d'activité enzymatique</b>	<b>14</b>
II.1. Test d'activité enzymatique sur <i>UmAA7</i>	14
II.2. Production et test d'activité enzymatique sur la LPMO d' <i>Ustilago maydis</i> ( <i>UmAA10</i> )	15
II.3. Méthodes analytiques	16
<b>RESULTATS</b>	<b>17</b>
<b>I. <i>Ustilago maydis</i> : croissance et sécrétomique</b>	<b>17</b>
I.1. Croissance d' <i>Ustilago maydis</i>	17
I.2. Production des sécrétomes et analyse protéomique	19
<b>II. Caractérisation préliminaire de la AA7 et de la LPMO d'<i>Ustilago maydis</i></b>	<b>22</b>
II.1. Caractérisation de la chitooligosaccharide oxydase d' <i>Ustilago maydis</i> (AA7)	22
II.2. Caractérisation de la LPMO d' <i>Ustilago maydis</i> ( <i>UmAA10</i> )	24

<b>DISCUSSION</b>	<b>27</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>29</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>31</b>
<b>ANNEXE</b>	<b>35</b>

## Liste des sigles et abréviations

<b>AA</b>	: Enzyme à activité auxiliaire (Classification CAZy)
<b>ABTS</b>	: Acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
<b>AMPc</b>	: Adénosine monophosphate cyclique
<b>AscA</b>	: Acide Ascorbique
<b>BMGY</b>	: Buffered Glycerol Complex Medium
<b>BMMY</b>	: Buffered Methanol-Complex Medium
<b>CBM33</b>	: Carbohydrates Binding Module 33
<b>CBP21</b>	: Chitine binding protein 21
<b>CHOS</b>	: Chitooligosaccharide
<b>CIRM-CF</b>	: Centre Internationale de Ressources Microbienne – Champignons filamenteux
<b>EDTA</b>	: Éthylène diamine tétraacétique
<b>GH</b>	: Glycoside hydrolase
<b>GPI</b>	: Glycosylphosphatidylinositol
<b>HPAEC -PAD</b>	: High-performance anion-exchange chromatography/pulsed amperometric detection
<b>IMAC</b>	: Immobilized Metal Affinity Chromatography
<b>LC-MS/MS</b>	: Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry
<b>LPMO</b>	: Lytic polysaccharide monoxygenase
<b>MAPK</b>	: Mitogen-activated protein kinase
<b>PG</b>	: Peptidoglycane
<b>PKA</b>	: Protéine kinase A
<b>qsp</b>	: Quantité suffisante pour
<b>rpm</b>	: Rotation par minute
<b>SDS-PAGE</b>	: Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis
<b>SPI -LI2D</b>	: Service de pharmacologie et d'Immunoanalyse - Laboratoire Innovations technologiques pour la Détection et le Diagnostic (CEA Marcoule)
<b>UDP -N-GlcNAc</b>	: Uridyl diphosphate-N acetylglucosamine
<b>YPD</b>	: Yeast Potato Dextrose

## Liste des tableaux et figures

### Liste des tableaux

Figure 1 : Modèle de structure de la paroi fongique .....	4
Figure 2 : Evolution de la composition de la paroi fongique d'un champignon filamentueux pendant la phase infectieuse .....	5
Figure 3 : Mode de liaisons et mécanisme catalytique des LPMOs .....	8
Figure 4 : Structure tridimensionnelle de la SmAA10A de <i>Serratia marcescens</i> , une entérobactérie	8
Figure 5 : Structure d'une AA7 chitooligosaccharide oxydase de <i>Fusarium graminearum</i> .....	9
Figure 6 : Tumeurs, morphologie et cycle infectieux d' <i>Ustilago maydis</i> .....	11
Figure 7 : Cinétique de croissance d' <i>U. maydis</i> .....	18
Figure 8 : Cinétique de croissance d' <i>Ustilago maydis</i> sur différentes sources de carbone. ....	20
Figure 9 : Evolution morphologiques d' <i>Ustilago maydis</i> au cours du temps en fonction des différentes sources de carbone. ....	20
Figure 10 : Analyse de l'ensemble des CAZymes identifiées par protéomique dans les sécrétomes en fonction des différentes conditions de culture. ....	22
Figure 11 : Evolution des activités oxydase et déshydrogénase de UmAA7 en fonction du pH.....	23
Figure 12 : Représentations de Michaelis - Menten des activités enzymatiques de UmAA7. ....	24
Figure 13 : Profil HPAEC – PAD des produits solubles libérés par suite de l'action de UmAA10..	26
Figure 1 Annexe 1 : Mécanisme catalytique simplifié des CAZymes de la famille des AA7.....	35
Figure 2 annexe 3 : Profil de migration électrophorétique de la AA7 (panel A) et de la AA10 (panel B) d' <i>U. maydis</i> . ....	38
Figure 3 annexe 3 : Spécificité de substrat de la AA7 d' <i>U. maydis</i> . ....	38
Figure 4 annexe 3 : Représentation logarithmique de la cinétique de croissance sur maltose d' <i>Ustilago maydis</i> au cours du temps. ....	39
Figure 5 annexe 3 : Evolution morphologique d' <i>Ustilago maydis</i> au cours du temps. ....	39
Figure 6 annexe 4 : structure 3D des résidus du site actifs de quelques AA7. ....	40

### Liste des tableaux

Tableau 1 : Tableau comparatif des paramètres cinétiques de chitooligosaccharide oxydases.....	24
Tableau 1 Annexe 1 : Tableau récapitulatif sur les LPMO et leur activité.....	35
Tableau 2 annexe 2 : Composition de la solution de sel de Holliday .....	36
Tableau 3 annexe 2 : Composition du milieu Basal Salt pour la production de la AA10 d' <i>U. maydis</i> en bioréacteur.....	37

## Présentation de la structure d'accueil.

L'INRAE, Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement est un organe public de recherche fondé en 1946. Les principaux objectifs de cet organisme sont de répondre aux enjeux socio-environnementaux posés dans les sociétés modernes, c'est-à-dire répondre aux problématiques de l'agriculture durable, de l'optimisation de l'utilisation des ressources en eau, et plus généralement d'assurer une recherche efficace pour la mise en place d'un développement durable à grande échelle.

L'UMR BBF, Unité Mixte de Recherche en Biodiversité et Biotechnologie Fongiques est une unité INRAE dirigée par Marie-Noelle ROSSO. Elle est située sur le campus de Luminy au sein du département Biotechnologies de l'école de Polytech de Marseille. Les principaux travaux de cette unité sont orientés sur la recherche et le développement de certaines propriétés génétiques fongiques pour la mise au point de nouveaux procédés biotechnologiques dans les industries. Une des thématiques est la recherche d'enzymes fongiques naturelles (et des séquences codantes associées) capables de dégrader la biomasse lignocellulosique pour produire, par exemple, des biocarburants.

Les travaux de l'unité s'organisent autour de deux thématiques principales :

- L'étude de la biodiversité fongique sur les plans génétiques et taxonomiques. Le laboratoire accueille des échantillons fongiques provenant de biotopes variés. C'est à dire 3000 souches dont 80% de basidiomycètes et 20% d'ascomycètes. Ces ressources servent de base à la sélection de fonctions ou de séquences génomiques d'intérêt pour les secteurs agro-alimentaire, agronomiques et industriels.

- L'étude de l'adaptabilité des systèmes lignocellulolytique des champignons filamenteux aux substrats (par des approches génomiques, transcriptomiques et protéomiques) et des mécanismes catalytiques des enzymes lignocellulolytique.

Plus globalement, ces études participent aux recherches fondamentales d'optimisation et de développement des procédés biotechnologiques menées par l'INRAE.

L'unité est organisée en trois équipes de recherche : l'équipe AROmass qui étudie les mécanismes de dégradation de composés aromatiques, l'équipe RESPONSES qui étudie les réponses biotiques et abiotiques des champignons et l'équipe BOOST qui m'a accueilli dans le cadre de ce stage et qui étudie le rôle des CAZymes (« Carbohydrate-active enzymes ») fongiques dans la dégradation de polysaccharides récalcitrants, dans un contexte biologique et biotechnologique.

## INTRODUCTION

Estimé à plus d'un million d'espèces, le règne des champignons rassemble des organismes hétérotrophes, ayant en commun des caractéristiques phylogénétiques et phénotypiques, au rang desquelles (et de façon non exhaustive) une paroi cellulaire chitineuse, une croissance unicellulaire ou mycélienne, avec des hyphes septés, et la synthèse de la lysine par la voie de l'acide aminoadipique (Latijnhouwers *et al.*, 2003 ; Naranjo-Ortiz et Gabaldón, 2019).

Les champignons arborent différents style de vie : la saprotrophie, la symbiose et la pathogénicité, mettant en jeu différents types d'interaction avec les végétaux : la nécrotrophie, la biotrophie et l'hémibiotrophie (Perfect et Green, 2001 ; Wang *et al.*, 2014).

Quel que soit le type d'interaction adopté, la réussite de celle-ci dépend fortement des évènements se déroulant à l'interface des parois du champignon et de la plante. En effet, lors de l'infection, en plus de représenter une barrière physique, ces parois sont le support de système de reconnaissance et la cible de molécules de défense (Latgé et Beauvais, 2014). Dans le but de réussir le processus d'infection et de prendre le dessus sur son hôte, le champignon utilise plusieurs stratégies notamment la production d'enzymes de dégradation dirigées contre les polysaccharides de la paroi végétale connues sous l'appellation CAZymes pour « carbohydrate-active enzymes » (Kubicek *et al.*, 2014 ; Rytioja *et al.*, 2014). Ces CAZymes fongiques, du fait de leur haut potentiel de dégradation des parois végétales, ont fait l'objet de nombreux travaux de recherche, qui ont notamment abouti à la découverte d'enzymes oxydatives actives sur les polysaccharides : les « lytic polysaccharide monooxygenases » ou LPMO (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010).

Lors du processus infectieux, certaines espèces fongiques, notamment les espèces dimorphiques (Gauthier, 2015), remodelent leurs propres parois à l'aide de CAZymes dirigés contre les polysaccharides des parois fongiques (Klein et Tebbets, 2007). Bien que des CAZymes actives sur les polysaccharides de paroi fongiques aient été découvertes et caractérisées chez certains champignons pathogènes, et que des études transcriptomiques au cours des différentes phases de l'infection aient mis en évidence la surexpression des gènes codant pour certaines CAZymes actives sur la paroi (Lyu *et al.*, 2015), le rôle biologique de ces enzymes ainsi que les interactions possibles entre ces enzymes restent très peu connus (Lyu *et al.*, 2015 ; Blatzer *et al.*, 2020).

Afin d'apporter des éléments de réponse sur ces questions, le champignon choisi dans le cadre de ce stage est *Ustilago maydis*, champignon basidiomycète pathogène du maïs. Ce champignon est un modèle dans l'étude du dimorphisme, des interactions biotrophiques lors de l'infection, et dans bien d'autres processus biologiques intrinsèques aux eucaryotes (Matei and Doehlemann, 2016; Olicón-Hernández *et al.*, 2019). Son génome est connu (Kämper *et al.*, 2006) et des données transcriptomiques obtenues lors de l'infection (Lanver *et al.*, 2018) ont montré la surexpression de

deux enzymes classées parmi les enzymes redox à activité auxiliaire (AA): une oligosaccharide oxydase (*UmAA7*) et une LPMO (*UmAA10*). Cependant, jusqu'à ce jour (12/05/2022), aucune donnée sur la caractérisation de ces enzymes et leur rôle biologique n'est disponible dans la littérature. Par ailleurs, la présence de ces deux enzymes oxydatives potentiellement actives sur la chitine chez un champignon qui infecte le maïs, nous amène à émettre l'hypothèse que ces enzymes auraient une activité sur la paroi du champignon, notamment dans les processus de remodelage de la paroi fongique, en réponse aux fluctuations environnementales.

L'objectif de mon stage a donc été de caractériser ces deux enzymes de façon indépendante. Ces travaux ont également été l'occasion de produire et d'analyser des sécrétomes obtenus à partir de culture d'*Ustilago maydis* sur des substrats susceptibles d'induire des changements morphologiques et probablement le remodelage de sa paroi. Ce dernier axe avait pour but d'explorer le champ des CAZymes actives sur les polysaccharides de parois induites par chaque condition.

Ce manuscrit qui présente l'ensemble des travaux réalisés durant ce stage, introduira dans une première partie le sujet par un état de l'art avant de passer dans une deuxième partie à la présentation des résultats et leur interprétation.

## I. PAROIS FONGIQUES

### I.1. Composition et structure des parois fongiques

La paroi cellulaire a plusieurs fonctions dans les différents règnes du monde vivant. Elle peut jouer un rôle protecteur contre la pression osmotique et les attaques biotiques et abiotiques et assurer une fonction de structure pour définir la forme d'un organisme. Chez les champignons, il s'agit d'un organite dynamique qui est fortement régulé en réponse aux changements environnementaux (Gow *et al.*, 2017).

Les parois fongiques sont principalement constituées de polysaccharides et de protéines. Les principaux polymères polysaccharidiques sont la chitine et les glucanes (**figure 1**) (Free, 2013). La paroi fongique peut contenir d'autres polysaccharides en proportion moins importante, notamment les mannanes et les galactomannanes, associés à des protéines essentielles pour la paroi (Free, 2013). Plus de la moitié des protéines associées à la paroi possèdent une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) qui les lie à la membrane cytoplasmique. Ces protéines liées à la membrane de façon covalente ou associées à la paroi de façon non covalente, ont des fonctions diverses, notamment, enzymatiques, structurales, de senseurs environnementaux, d'adhésions et de protections contre les changements environnementaux (Free, 2013). Les principaux constituants de la paroi fongique sont présentés ci-dessous.

### I.1.1. La chitine

La chitine est un polymère cristallin hydro-insoluble, retrouvé dans la cuticule des insectes, des crustacés et dans les parois fongiques. Il s'agit d'un polymère linéaire d'unités de  $\beta$ -D-glucose substituées en C2 par un groupement acétamide et liées par des liaisons de type  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). (Bowman et Free, 2006). La chitine représente 1 à 2 % de la masse de la paroi fongique des levures et entre 10 et 20 % de la paroi des champignons filamenteux (Bowman et Free, 2006). Dans la nature, il existe trois formes de chitine en fonction de l'arrangement des chaînes dans les microfibrilles : la chitine  $\alpha$  avec des feuillettes anti-parallèles, la chitine  $\beta$  avec des feuillettes parallèles et la chitine  $\gamma$  où deux chaînes parallèles alternent avec une chaîne antiparallèle (Ruiz-Herrera and Ortiz-Castellanos, 2019). La chitine est synthétisée par la chitine synthase, enzyme transmembranaire, utilisant l'UDP-*N*-GlcNac comme substrat (Bowman et Free, 2006). La chitine confère de la force et de la rigidité physique du fait de sa structure cristalline, contribuant à l'intégrité structurale de la paroi fongique. (Gow *et al.*, 2017).

### I.1.2. Les glucanes

Les glucanes représentent une composante universelle et importante des parois fongiques, quel que soit le stade de développement. Ils représentent 30 à 80% de la masse de la paroi fongique (Free, 2013). Il s'agit de polymères de D-glucopyranose avec une variété de stéréoisomères : les  $\alpha$ -glucanes, les  $\beta$ -glucanes et les polymères mixtes d' $\alpha$  et de  $\beta$ -glucanes. Ces polymères peuvent être linéaires simples ou branchés (Synytsya et Novak, 2014).

#### *Les $\beta$ -glucanes*

Les polysaccharides fongiques les plus abondants sont les polymères de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) -glucanes. Ils représentent 30 à 60% de la masse de la paroi fongique (Free, 2013). Ce sont des polymères auxquels les autres composants de la paroi fongique sont liés. (Bowman et Free, 2006). La structure tridimensionnelle de ces polymères se présente sous la forme d'hélice, conférant une certaine élasticité et une force de traction à la paroi fongique (Free, 2013). Un autre polymère retrouvé dans les parois fongiques est celui constitué de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-glucane. Il joue le rôle d'élément liant entre les polymères sur-cités (Osherov et Yarden, 2010).

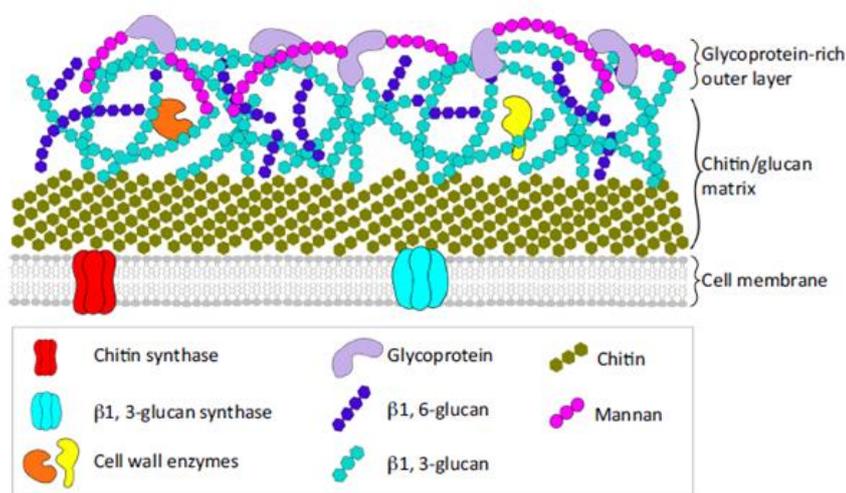
#### *Les $\alpha$ -glucanes*

Les  $\alpha$ -glucanes retrouvés dans la paroi fongique sont hydro-insolubles et organisés en microfibrilles. Ce sont en majorité des  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucanes. Ces polymères joueraient le rôle de ciment alcalo-soluble entre les microfibrilles de chitine et de glucane (Osherov and Yarden, 2014). Ils peuvent également se présenter au niveau de la couche la plus externe de la paroi et jouer le rôle de barrière physique contre les dégradations enzymatiques (**figure 2**) (Geoghegan *et al.*, 2017). Chez certaines espèces fongiques, la paroi peut être également constituée de, polymère mixte d' $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) et d' $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-

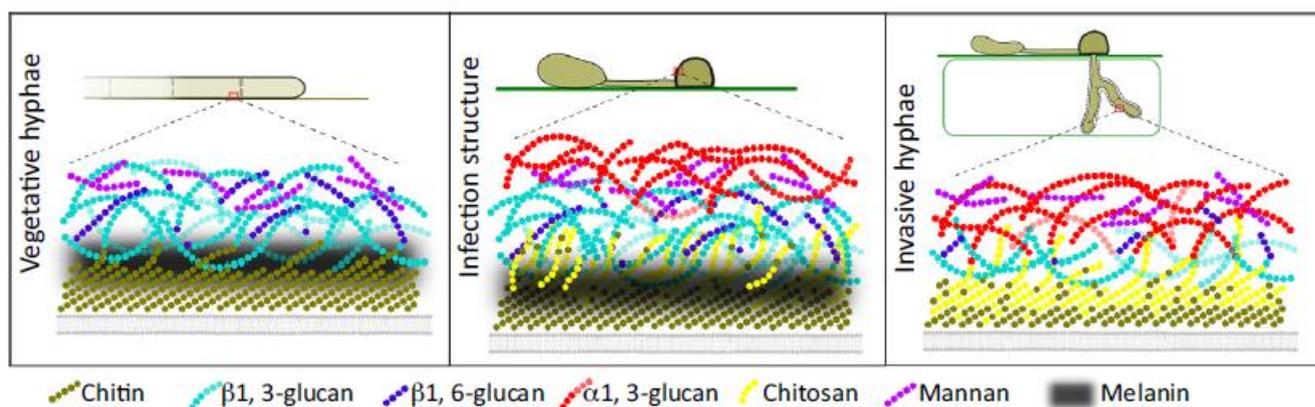
glucanes ou de polymères d' $\alpha$ -(1→4) et  $\alpha$  (1→6) -glucanes. Les polymères d' $\alpha$ -glucanes seraient impliqués dans la virulence et/ ou la morphogénèse (Ruiz-Herrera and Ortiz-Castellanos, 2019).

## I.2. Rôles de la paroi fongique

Outre ses fonctions structurales dans le développement et l'intégrité des cellules fongiques (Oshero et Yarden, 2010), la paroi fongique est l'organite qui permet les premières interactions avec l'hôte. C'est également une zone de transit de nombreuses molécules toxiques ou hydrolytiques produites par le champignon, permettant à celui-ci de faire face aux menaces environnementales (Latgé, 2007). La paroi est aussi une cible thérapeutique de choix d'antifongiques dans le cadre d'applications médicales (Gow *et al.*, 2017). Dans l'interaction hôte-pathogène, certains constituants de la paroi fongique, notamment les mannanes, les  $\beta$ -(1-3) glucanes ou la chitine peuvent être reconnus par les récepteurs spécifiques de l'hôte et induire une réponse immunitaire chez ce dernier (Geoghegan *et al.*, 2017 ; Gow *et al.*, 2017). Paradoxalement, certains composants de la paroi fongique, notamment les glycoprotéines ou les  $\alpha$ -(1-3) -glucanes, peuvent masquer ces motifs, permettant au champignon d'échapper au système immunitaire de l'hôte. La modification de la chitine en chitosane (**figure 2**), la liaison des polysaccharides à des effecteurs ou la répression de certains gènes impliqués dans la synthèse des polysaccharides de la paroi sont certaines des stratégies adoptées par les champignons pour prendre le dessus dans la course aux armements qui les oppose à leur hôte (Gow *et al.*, 2017).



**Figure 1 : Modèle de structure de la paroi fongique** (Geoghegan *et al.*, 2017). La paroi fongique est constituée d'une matrice interne faite de chitine et de glucane et d'une couche externe de glycoprotéines. Des liaisons hydrogènes inter-chaines entre les différents polymères de sucres permettent la formation d'un réseau qui confère sa résistance à la paroi. Les protéines de la paroi sont des composantes minoritaires de celle-ci. Certaines peuvent être liées de façon covalente aux glucanes.



**Figure 2 : Evolution de la composition de la paroi fongique d'un champignon filamenteux pendant la phase infectieuse** (Geoghegan *et al.*, 2017). La structure présentée sur cette figure omet délibérément les protéines associées à la paroi, dans un souci de simplification. La structure et la composition de la paroi fongique varie en fonction du stade de développement. En effet au cours de l'infection, une partie de la chitine est transformé en chitosane pour échapper à la reconnaissance par les chitinases des plantes.

La quantité de  $\beta$ -(1-3)-glucane est réduite au profit de l'apparition d' $\alpha$ -(1-3)-glucanes, toujours dans le but d'échapper au système de reconnaissance de la plante, en vue de favoriser l'infection.

## II. MODIFICATION ET DÉGRADATION ENZYMATIQUE DE LA PAROI FONGIQUE : LES CARBOHYDRATE-ACTIVE ENZYMES (CAZymes)

Les « carbohydrate-active enzymes » (CAZymes) sont des enzymes impliquées dans l'assemblage, la modification ou la dégradation de polysaccharides ou de glycoconjugués (Drula *et al.*, 2022). Les CAZymes sont classifiées dans la base de données CAZy ([www.cazy.org/](http://www.cazy.org/)) sur la base de la similarité des séquences peptidiques, du repliement des protéines et du mécanisme enzymatique (Henrissat, 1991). La base de données CAZy est organisée en six grandes classes : Les glycosides hydrolases (GH), les glycosyltransférases (GT), les polysaccharides lyases (PL), les carbohydrates estérases (CE), les modules de liaisons aux hydrates de carbone ou « carbohydrates-binding modules » (CBM) et les enzymes à activités auxiliaires (AA). Dans cette section, seront présentées quelques familles de CAZymes actives sur les polysaccharides de paroi fongique, notamment sur la chitine.

### II.1. Les chitinases

Les chitinases (E.C. 3.2.1.14) font partie de la famille des glycosides hydrolases (GH). Les chitinases fongiques sont principalement retrouvées dans la famille des GH18. Elles catalysent l'hydrolyse de la liaison  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) entre les résidus de *N*-GlcNAc de la chitine, libérant des chitooligosaccharides (CHOS) (Hartl *et al.*, 2012). Ces chitinases (jusqu'à 20 gènes dans le génome des champignons filamenteux) sont souvent distinguées par leur mode d'action/rôle : les *exo*-chitinases, qui sont processives, et les *endo*-chitinases, qui sont non processives (Alcazar-Fuoli *et al.*, 2011). Ces

chitinases fongiques peuvent avoir un rôle nutritionnel, où elles interviennent dans la digestion de chitine exogène ou fongique par autolyse, mais également un rôle dans la morphogénèse des champignons (Alcazar-Fuoli *et al.*, 2011)

## II.2. Les chitine désacétylases

Cette famille d'enzyme qui fait partie de la classe des Carbohydrate estérases (CE), précisément de la famille CE4, regroupe des enzymes impliquées dans la désacétylation des peptidoglycanes, des acétylxylanes (constituants des hémicelluloses) et de la chitine. Les CE4 interviennent chez les champignons dans la modification de la paroi fongique par la désacétylation de la chitine en chitosane, nécessaire à la virulence et à la morphogénèse des levures (Geoghegan *et al.*, 2017). Cependant, le rôle de ces enzymes dans le remodelage de la paroi fongique, dans certains cas, mérite d'être élucidé car elles sont très souvent exprimées mais le produit de leur action (le chitosane) est difficilement détecté (Blatzer *et al.*, 2020).

## II.3. Les enzymes à activité auxiliaire (AA)

Outre les activités hydrolytiques dirigées contre les polysaccharides, des systèmes enzymatiques oxydatifs ont également été découverts et regroupés dans la classe des enzymes à activité auxiliaire (AA) dans la base de données CAZy (Levasseur *et al.*, 2013). La classe des AA rassemble aujourd'hui 17 familles et une focalisation sera uniquement faite dans les paragraphes qui suivent sur les « lytic polysaccharides monooxygenases » (LPMO) qui sont retrouvées dans plusieurs familles et les oligosaccharides oxydases de la famille AA7.

### II.3.1. Les « lytic polysaccharides monooxygenases » (LPMO)

#### Historique

Dans les années 50, Reese et ses associés ont soulevé l'hypothèse selon laquelle la dégradation de la cellulose ferait intervenir des processus autres que ceux hydrolytiques. Cette hypothèse s'est révélée correcte, lorsque la protéine d'origine bactérienne CBP21 (renommée CBM33) qui augmente l'activité hydrolytique des chitinases (GH18) sur chitine, et son homologue structural fongique, une GH61 connue pour agir en synergie avec les cellulases sur la cellulose, ont montré une activité oxydative sur ces différents polymères (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010 ; Phillips *et al.*, 2011). Ces découvertes qui ont bouleversé la compréhension des mécanismes de dépolymérisation des polymères récalcitrants, ont abouti à considérer les CBM33 et les GH61 comme membres d'une même superfamille : les lytic polysaccharides monooxygenases (LPMO) (Horn *et al.*, 2012).

#### Mécanisme

Les LPMO (aussi appelées PMO par certains), sont des enzymes à cuivre qui réalisent le clivage oxydatif de polysaccharides (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010 ; Quinlan *et al.*, 2011) Leur topologie particulière, avec un site actif situé sur une surface relativement plane, leur permet d'interagir avec

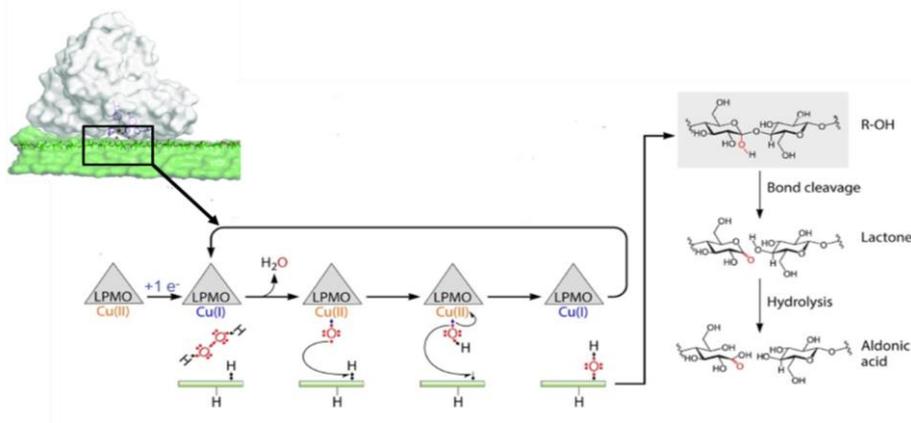
la surface plane cristalline des polymères tels que la chitine ou la cellulose (**figure 3**) (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2017). Le site actif des LPMO est constitué d'un atome de cuivre complexé par deux histidines dont une histidine à l'extrémité N-terminale (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2017) (**figure 4**). Un 3<sup>e</sup> acide aminé, une tyrosine ou une phénylalanine, est situé en position de coordination axiale et est important pour l'intégrité fonctionnelle de la LPMO.

Les LPMO réalisent le clivage oxydatif des liaisons osidique en hydroxylant le carbone C1 ou C4 (certaines enzymes étant capable de réaliser ces deux types de clivage) (**figure 3**). Ce clivage mène à la création d'extrémités libres qui sont un point d'accès pour les hydrolases. La réalisation de ce clivage oxydatif nécessite l'activation de l'enzyme, via la réduction du cuivre catalytique de l'état Cu (II) à l'état Cu (I) par un donneur d'électron. Le donneur d'électron peut être de nature organique, enzymatique ou une espèce réactive de l'oxygène (Bissaro *et al.*, 2018).

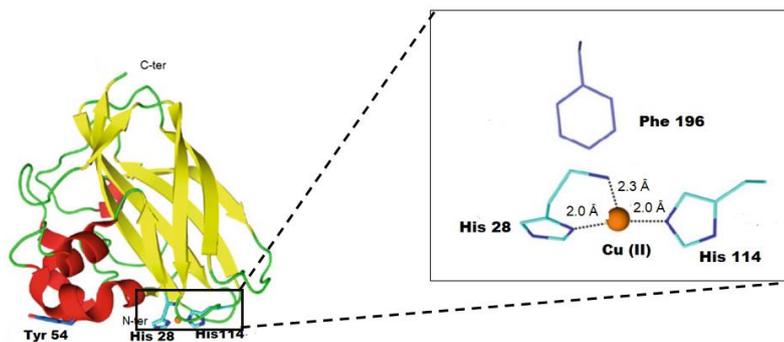
La forme active LPMO-Cu(I), après liaison au polysaccharide, réagit ensuite avec un cosubstrat oxygéné, initialement décrit comme étant l'oxygène (O<sub>2</sub>) (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010) et récemment révisé comme étant plus probablement le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Bissaro *et al.*, 2017) pour hydroxylater le carbone cible (C1 ou C4). Cette hydroxylation aboutit à un réarrangement moléculaire, à l'origine de la rupture de la liaison osidique (Beeson *et al.*, 2012). Le clivage oxydatif en C1 donne une lactone menant par hydratation spontanée à un acide aldonique, tandis que le clivage en C4 donne un 4-cétoaldose menant à un diol géminale (Beeson *et al.*, 2012).

### **Diversité d'origine, de spécificité de substrat et de fonctions**

Ces enzymes comptent 8 familles aujourd'hui : AA9 à AA11 et AA13 à AA17. Les plus étudiées sont les AA9 (anciennement GH61) et AA10 (anciennement CBP21 puis CBM33). Les familles se distinguent non seulement par leur organisme d'origine mais aussi par la spécificité du substrat (Vandhana *et al.*, 2022). (**Voir tableau 1 annexe 1**). Les familles des AA9 et AA11 regroupent uniquement des enzymes d'origine fongique actives respectivement sur la cellulose et probablement d'autres substrats et sur la chitine, tandis que la famille des AA10 regroupe des LPMO d'origine bactériennes et virales actives sur la chitine et/ou la cellulose (Vandhana *et al.*, 2022).. Par ailleurs, les données génomiques attestent que des AA10 sont également retrouvées chez les Ustilaginomycètes, dont fait partie notre objet d'étude, *Ustilago maydis*. A ce jour aucune de ces AA10 fongiques n'est caractérisée.



**Figure 3 : Mode de liaisons et mécanisme catalytique des LPMO.** Les LPMOs possèdent à leur base une surface plane permettant le contact facile avec le substrat. Cette surface plane abrite le site catalytique. Le cuivre catalytique est réduit grâce à un électron provenant d'un donneur. Le donneur d'oxygène choisi dans ce cas est le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ . Le peroxyde d'hydrogène permet la formation d'un oxyde de cuivre intermédiaire qui réalise l'hydroxylation du carbone C1. Cette hydroxylation entraîne une réaction d'élimination spontanée, à la base du clivage de la liaison osidique (Bissaro *et al.*, 2017 ; Kim *et al.*, 2013).

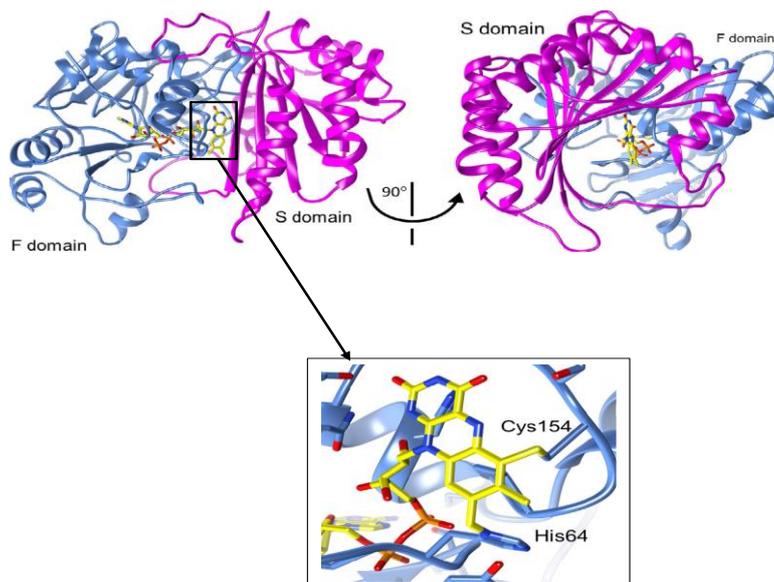


**Figure 4 : Structure tridimensionnelle de la SmAA10A de *Serratia marcescens*, une entérobactérie** (Courtade et Aachmann, 2019). Les brins  $\beta$  sont présentés en jaune, les hélices  $\alpha$  en rouge et les coudes en vert. A la base de la structure est représenté le site actif de l'enzyme : il est constitué d'un atome de cuivre (II) complexé par les azotes des histidines en position 28 et 114, formant l'Histidine Brace. La Phénylalanine est en position de coordination axiale. La Tyrosine en position 54 est impliquée dans la liaison au substrat, ici la chitine.

### II.3.2. Les oligosaccharides oxydases (AA7)

Les AA7 sont des carbohydrates oxydases avec une flavine comme cofacteur qui réalisent l'oxydation de la fonction hémiacétalique C1-OH (EC 1.13.x) ou C1-NH (EC 1.5.3.x), en présence d'oxygène (activité oxydase) ou d'un accepteur d'électron organique (activité déshydrogénase), donnant la lactone correspondant au sucre oxydé (Hellemond *et al.*, 2006 ; Haddad Momeni *et al.*, 2021). Cette oxydation entraîne la libération de deux électrons du substrat, pris en charge par le coenzyme FAD qui est ensuite réoxydé en réduisant, soit l'oxygène en  $H_2O_2$  ou un accepteur organique (**figure 1 annexe 1**) (Hellemond *et al.*, 2006 ; Haddad Momeni *et al.*, 2021).

Structurellement, ces enzymes comportent deux domaines ; un domaine de liaisons au FAD situé du côté N-terminal (Domaine F) et un domaine de liaison au substrat situé en C-terminal (Domaine S) (**figure 5**). Des résidus spécifiques forment le site actif, constituant la poche de liaison au substrat permettent de définir la spécificité des AA7 à leur substrat. Ce fait a été démontré dans le cas de la chitooligosaccharide oxydase (ChitO) de *Fusarium graminearum*, des mutations uniques ou multiples entraînent des changements de spécificité de substrat : chitooligosaccharides vs. glucooligosaccharides (Heuts *et al.*, 2007; Ferrari *et al.*, 2015).



**Figure 5 : Structure d'une AA7 chitooligosaccharide oxydase de *Fusarium graminearum*.**

(Savino *et al.*, 2020). En accord avec les structures des oligosaccharides oxydases de la familles des AA7, l'enzyme possède deux domaines : le domaine F qui abrite les residus associés de façon covalente avec le FAD (une Cystéine et une Histidine) et le domaine S qui abrite les residus qui permettent la liaison au substrat.

En fonction du style de vie adopté par le champignon, ces enzymes peuvent être plus ou moins présentes et exprimées lors du cycle de vie. Les AA7 sont notamment retrouvés chez les phytopathogènes (Haddad Momeni *et al.*, 2021). Des études transcriptomiques ont démontré la régulation des gènes codant pour la AA7 chez le pathogènes du maïs *Ustilago maydis*, qui fera l'objet du prochain chapitre.

### III. *USTILAGO MAYDIS*

#### III.1. Généralités

*Ustilago maydis* est un champignon pathogène basidiomycète de l'ordre des ustilaginales, responsable de la maladie du charbon du maïs (Klosterman *et al.*, 2007) (**figure 6**). *U. maydis* est un champignon biotrophe, dimorphique c'est-à-dire capable de passer de la forme levure saprotrophe, à

la forme filamenteuse pathogène sous certaines conditions (Klose *et al.*, 2004). Cette différenciation est induite par deux voies de signalisation ; la voie AMPc / PKA et la voie Ras / MAPK (Klose *et al.*, 2004 ; Kahmann et Kämper, 2004). En effet, la forme levure, se présentant sous la forme d'un cigare, prolifère par bourgeonnement et la colonisation de la plante est activée quand des levures compatibles se reconnaissent et fusionnent à la surface de la plante (Vollmeister *et al.*, 2012). Le dicaryon obtenu après la fusion et qui est la forme infectieuse du champignon, édifie une structure d'infection, l'appressorium. La caryogamie a lieu et le mycélium prolifère provoquant des tumeurs sur l'organe infecté. Ces tumeurs contiennent des téliospores, qui dans des conditions favorables, germent et libèrent des basidiospores haploïdes (Kahmann et Kämper, 2004 ; Vollmeister *et al.*, 2012). Le cycle infectieux complet d'*U. maydis* dure environ deux semaines (Dean *et al.*, 2012).

### III.2. Composition et structure de la paroi fongique d'*Ustilago maydis*

La composition et la structure de la paroi fongique chez *U. maydis* évolue avec les changements morphologiques. La composition biochimique de la paroi fongique d'*U. maydis* a été déterminée par Ruiz-Herrera *et al.* (1996). Cette étude, menée sur une souche haploïde, a montré que la composition et l'organisation des polysaccharides de la paroi fongique diffèrent d'une forme à une autre.

D'un point de vue qualitatif, la souche haploïde étudiée au stade de levure présentait en plus des monosaccharides de base que sont le glucose (Glc), le mannose (Man) et le galactose (Gal) des sucres particuliers spécifiques tels que le fucose, l'arabinose et le ribose. Les sucres majoritaires sont par ordre décroissant Glc/Man/Gal et Glc/Gal/Man/Xyl chez les formes levure et filamenteuse, respectivement.

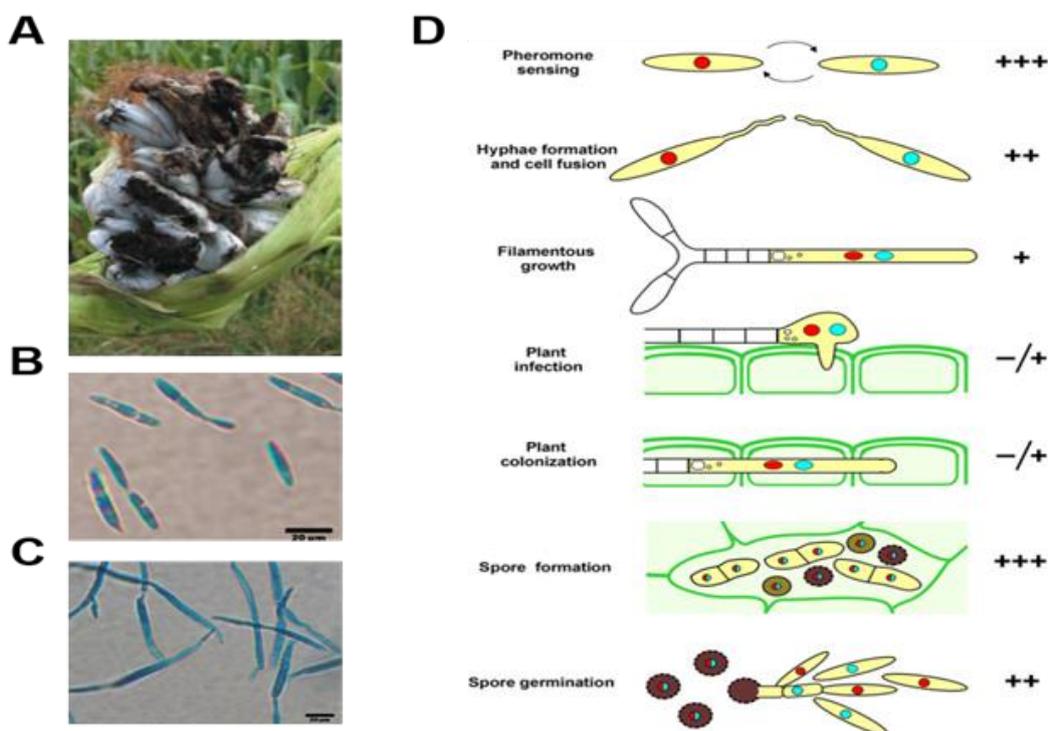
### III.3. Aspect moléculaire : analyses omiques

Le génome du Basidiomycète *U. maydis* a été mis à disposition par un consortium de chercheurs en 2006. Avec un génome de 20.5 Mb et 6902 gènes prédits, ce champignon possède très peu de gènes impliqués dans la dégradation de la paroi végétale dont peu de CAZymes ce qui serait en accord avec son mode de vie biotrophe (Kämper *et al.*, 2006).

Ce manque est compensé par la présence de gènes codants pour des petites protéines secrétées qui sont des effecteurs permettant au champignon de contourner le système de défense de son hôte et de réussir son implantation. Cette mise à disposition de génome a ouvert de nouvelles perspectives quant aux fonctions susceptibles de s'exprimer chez *Ustilago maydis*. En outre, des études transcriptomiques visant à comprendre, à la lumière des gènes exprimés, les phénomènes impliqués dans le dimorphisme lors de son cycle de vie ont été menées. C'est le cas de cette étude menée par Martínez-Soto et Ruiz-Herrera, (2013) qui a déterminé les gènes différentiellement exprimés entre les conditions levure et mycélienne, comme les précurseurs de chitinase ou des glucose oxydases. De nombreux gènes de fonction inconnue ont également été identifiés.

Par ailleurs, avec l'annotation récente des enzymes à activités auxiliaires, nous disposons aujourd'hui d'informations supplémentaires pour l'annotation des fonctions enzymatiques. Dans une analyse transcriptomique réalisée par Lanver *et al.* (2018) au cours du cycle infectieux, les gènes codant pour des enzymes à activité oxydative qui serait probablement impliquées dans la modification de la paroi fongique, notamment la LPMO de famille AA10 et la chitooligosaccharide oxydase de la famille AA7 ont été mises en évidence.

En outre, dans la mise en évidence de nouvelles activités enzymatiques sur un organe externe comme la paroi fongique, l'exploration du sécrétome reste une piste d'intérêt. En effet, la nature de la source de carbone et les conditions de culture sont des déterminants importants dans la composition enzymatique du sécrétome (Berrin *et al.*, 2017). Le sécrétome d'*Ustilago maydis* obtenu par culture sur son de maïs par Couturier *et al.* (2012) a permis de mettre en évidence grâce à la re-annotation des gènes (données non publiées mais produite au laboratoire) la sécrétion d'enzymes susceptibles d'agir sur la paroi fongique, notamment la chitooligosaccharide oxydase (AA7) et des protéines de fonction inconnue.



**Figure 6 : Tumeurs, morphologie et cycle infectieux d'*Ustilago maydis*.** A : tumeurs d'épi relarguant des télisporos par senescence (Kahmann et Kämper, 2004). B et C : microphotographie de cellules d'*Ustilago maydis* au stade levure (B) et au stade filamenteux (C). Les cellules ont été colorées avec du bleu de lactophénol et observées avec à l'aide d'un microscope à fond clair. La différenciation a été induite par changement de pH (Martínez-Soto et Ruiz-Herrera, 2013) D : cycle infectieux d'*Ustilago maydis*. A la surface des feuilles, les spores compatibles se reconnaissent et fusionnent. Cette fusion aboutit à la formation d'un filament dicaryotique infectieux. Le mycélium se développe au niveau des graines du maïs et entraîne la formation de tumeur sur différentes parties de la plante. Ces tumeurs qui contiennent des télisporos entrent en senescence et libèrent ces derniers.

La présence de ces enzymes révélées par ces analyses nous amène à nous questionner sur leurs rôles éventuels dans le processus de pathogénicité d'*U. maydis* et plus précisément dans le remodelage de la paroi fongique.

Une étude récente menée par Zhong *et al.* (2022) sur l'implication des LPMO dans le remodelage du peptidoglycane (PG) chez *Streptomyces coelicolor*, a permis de mettre en évidence l'action synergique entre une AA10 capable de se lier au peptidoglycane et le lysozyme dans la morphogénèse de la bactérie. En effet, sur la base de leurs résultats, les auteurs ont proposé un modèle de modification du PG dans lequel la AA10 de *S. coelicolor* créerait des coupures individuelles dans le PG, ce qui faciliterait l'action du lysozyme. Cette étude nous conforte dans l'hypothèse que les oxydases produites lors des interactions entre *U. maydis* et son hôte peuvent être dirigées contre sa propre paroi, venant en soutien aux hydrolases en vue du remodelage de celle-ci. Pour le moment, peu d'études se sont intéressées à ce sujet. D'où l'intérêt des travaux menés lors de ce stage, dans le but de comprendre le rôle des enzymes oxydatives sur le remodelage de la paroi fongique.

## MATERIELS ET METHODES

### I. Cinétique de croissance d'*Ustilago maydis* et analyse sécrétomique

La souche d'*U. maydis* utilisée au cours de ce stage est la souche haploïde UM521. L'ensemble des réactifs utilisés lors de cette étude était de grade analytique.

#### I.1. Cinétique de croissance d'*Ustilago maydis*.

Dans le but de suivre la cinétique de croissance d'*Ustilago maydis*, une préculture d'*U. maydis* a été réalisées à partir de cellules d'*U. maydis* au stade levure conservées à – 80 °C. Une Fiole d'Erlenmeyer bafflée de 250 mL a étéensemencée avec 100 mL de milieu YPD liquide contenant 10<sup>5</sup> cellules/mL, puis incubée pendant 24 h à 28 °C et à 150 rpm d'agitation. Par la suite, 10<sup>5</sup> cellules/mL de cette préculture ont servi à ensemencer chacune des 16 fioles d'Erlenmeyer bafflées de 250 ml (8 conditions, 2 essais / condition) contenant 100 mL de milieu minimum liquide Array, (**Annexe 2**) dont la composition est données par Wallen *et al.* (2021). La source de carbone incorporée à ce milieu minimum est le maltose à 2 %. Les cultures ont été incubées à 28 °C sous agitation (150 rpm) et la croissance a été suivie dans le temps entre 0 et 144 h avec des prélèvements à 2 h d'intervalles entre 0 et 8 h puis à 24 h d'intervalle. Les paramètres mesurés sont les suivants :

- Le dénombrement au microscope optique sur cellules de Malassez
- La mesure de la densité optique à 600 nm (DO)
- La détermination du poids sec

- La consommation de maltose par HPAEC - PAD à la DIONEX (ISC 6000, Thermo Fischer scientific, Massachusetts, USA)
- Le suivi de l'évolution morphologique des cellules par microscopie optique à fluorescence (Olympus BH-2)

## I.2. Production de sécrétomes et analyse protéomique

Pour la production de sécrétome, trois conditions ont été choisies en fonction de la source de carbone : le maltose (20 g/L) qui représente la condition contrôle, l' $\alpha$ -chitine (15 g/L) et la biomasse d'*U. maydis* lyophilisée et broyée (15 g/L) (**Annexe 2**). Ces différentes sources de carbone ont été incorporées au milieu minimum liquide *Array* (Wallen *et al.*, 2021) avec 2.5 g/L de maltose dans le cas des milieux contenant la chitine et la biomasse, pour l'induction de la croissance. A partir de préculture d'*U. maydis* sur YPD réalisée comme décrites au paragraphe précédent,  $10^5$  cellules/ml ont servi à ensemencer 100 mL de milieu de culture dans des Erlenmeyer bafflés de 250 mL chacun, incubés à 28 °C sous agitation (150 rpm). Avec des prélèvements à J1, J3 et J6, 3 conditions de culture et 3 essais / condition, 27 sécrétomes ont ainsi été produits. Aussi, un suivi de croissance a été réalisé par mesure de la DO à 600 nm pour chaque essai, accompagné d'un suivi de l'évolution morphologique par microscopie.

Pour obtenir le sécrétome dans les différentes conditions, les surnageants de culture ont été séparés du culot cellulaire et autres matières solides, par centrifugation suivi d'une série de filtration ( $2,7 \mu\text{m} > 1,6 \mu\text{m} > 0,7 \mu\text{m} > 0,45 \mu\text{m}$ ). Les filtrats ont ensuite été congelés à  $-20 \text{ °C}$  puis décongelés progressivement à  $+4 \text{ °C}$  et filtrés à nouveau sur filtre  $0,2 \mu\text{m}$ . Les filtrats ont ensuite subi une série de diafiltration dans des enceintes VIVACELL<sup>®</sup> 5 KDa (Sartorius, Royaume - Uni) dans le but de concentrer les protéines sécrétées dans du Tampon Acétate à 50 mM et à pH 5,2, jusqu'à un volume d'environ 1 mL. Le dosage des protéines dans les différents filtrats a été réalisé par la méthode de Bradford (Bradford, 1976) dans du tampon Tris-HCl (50 mM, pH 8) en présence du réactif de Bradford (BIO-RAD protein assay, USA). Le profil de migration électrophorétique des protéines dans les différentes conditions en triplicat a été réalisé sur gel SDS PAGE. Les différents triplicats correspondant aux différentes conditions ont été mélangés et 10  $\mu\text{g}$  de protéines ont été utilisés pour l'analyse protéomique, réalisée par LC-MS/MS (Q Exactive HF, ThermoFischer scientific) par la plateforme ProGénoMix du SPI/LI2D (CEA/Marcoule).

## II. Production d'enzymes et tests d'activité enzymatique

### II.1. Test d'activité enzymatique sur *UmAA7*

#### II.1.1. Test de spécificité de substrat

La spécificité de substrat de *UmAA7* a été vérifiée sur 11 substrats : le glucose, la cellobiose, le cellotriose (respectivement COS 1, COS 2, COS 3), le *N*-acétylglucosamine, le chitobiose, le chitotriose et le chitotétraose (respectivement CHOS 1, CHOS 2, CHOS 3 et CHOS 4), le mannose, le galactose, le lactose et le gentiobiose (respectivement MAN, GAL, LAC, et GENT). L'activité de l'enzyme sur ces différents substrats a été suivie en microplaque, par spectrophotométrie au spectrophotomètre (TECAN, Suisse) en exploitant l'activité déshydrogénase de l'enzyme. Plus en détails, dans un volume réactionnel total de 100  $\mu$ L, 1 mM de chaque substrat a été mis en présence de 100 nM d'enzymes dans du tampon acétate de sodium (50 mM, pH 5,0). L'accepteur d'électron est le 2,6-dichloro-phénol-indophénol (DCIP, SIGMA, Allemagne), ajouté à la réaction à 200  $\mu$ M final. Le DCIP est un composé oxydant chromogène, bleu à l'état oxydé et incolore à l'état réduit, avec un maximum d'absorption à 595 nm. La décoloration du DCIP au cours temps, correspondant à sa réduction par les électrons provenant de l'activité d'oxydation du substrat par l'enzyme, permet de déterminer la vitesse de la réaction ( $V_i/E$ ). Une gamme étalon de DCIP a servi pour la détermination des concentrations de produits.

#### II.1.2. Détermination du pH optimum de réaction

La détermination du pH optimum de l'enzyme a été réalisée dans le cas de l'activité oxydase et de l'activité déshydrogénase de l'enzyme.

De la même façon que décrite ci-dessus, l'activité déshydrogénase de *UmAA7* (100 nM final) a été déterminée en présence de chitobiose (1 mM), DCIP (200  $\mu$ M), dans différents tampons (50 mM), avec une plage de pH variant entre 2,5 et 9. Une gamme étalon de DCIP à chaque pH, a servi à déterminer les concentrations de produits.

L'activité oxydase a été mise en évidence par le test à l'ABTS dont le principe est le suivant : en présence d'un substrat (oligosaccharide) oxydé par l'enzyme testée (ici *UmAA7*), et absence d'accepteur d'électron organique, les électrons réduisent l' $O_2$  en  $H_2O_2$ . Cette molécule d' $H_2O_2$  est ensuite réduite en  $H_2O$  par une enzyme auxiliaire, une peroxydase, grâce aux électrons provenant de l'ABTS qui est oxydé en un composé de couleur verte. Le suivi spectrophotométrique de l'évolution de cette coloration verte (à 414 nm) permet de déterminer l'activité de l'enzyme testée. Le substrat utilisé dans le cas de cette réaction est le chitobiose à 1 mM, mis en présence de 10 nM de *UmAA7*, de 0,1 mg/ml de peroxydase (Peroxydase from Horseradish, SIGMA) et de 0,25 mg/mL d'ABTS.

Les plages de pH testés ont varié entre 4 et 9, avec des concentrations de tampon à 50 mM. Une gamme étalon de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a permis de déterminer les concentrations de produits.

L'ensemble des réactions a été réalisé en triplicat.

### II.1.3. Détermination des paramètres cinétiques de l'enzyme

La détermination des paramètres cinétiques de l'enzyme a été réalisée dans le cas des activités oxydase et déshydrogénase, suivant les principes des réactions décrites précédemment. Le substrat utilisé dans les deux cas est le chitobiose à des concentrations variant entre 0,1 et 3 mM pour l'activité déshydrogénase et entre 0,025 et 2,5 mM pour l'activité oxydase. Les réactions ont été réalisées à pH 5 pour l'activité déshydrogénase et à pH 6,5 pour l'activité oxydase. L'ensemble des réactions a été réalisé en triplicat. Les vitesses initiales déterminées aux différentes concentrations de substrat, ont servi à déterminer la constante catalytique  $k_{cat}$ , la constante  $K_M$ , et l'efficacité catalytique  $k_{cat}/K_M$ .

## II.2. Production et test d'activité enzymatique sur la LPMO d'*Ustilago maydis* (UmAA10)

### II.2.1. Production de l'enzyme.

La production de l'enzyme a été réalisée de deux façons : en bioréacteur et en fiole d'Erlenmeyer. La souche de *Pichia pastoris* utilisée dans le cadre de cette production est la souche *SuperMans*.

- Production en bioréacteur

Une préculture de *Pichia pastoris* contenant le vecteur recombinant a été réalisée en milieu YPD (30 °C / 160 rpm / 6 h). Par la suite, 150 µL de cette préculture ont servi à ensemencer 100 mL de milieu BMGY (Incubation à 30 °C / 200 rpm / 16 h). Lorsque la DO du milieu à 600 nm a été comprise entre 4 et 6, 40 mL de cette culture a servi à ensemencer 400 mL de milieu Basal salt (composition au **tableau 3 annexe 2**) contenu dans un bioréacteur d'1 L (agitation : 400 à 900 rpm / saturation O<sub>2</sub> : 0 -50 % / pH de culture : 5). Lorsque la consommation du glycérol est arrivée à son terme, 80 mL de sorbitol à 25 g/L et 2 mL de méthanol pur sont ajoutés au milieu (Phase de transition). Lorsque les deux substrats ont été quasiment consommés, la phase d'induction au méthanol est réalisée par ajout à un débit constant de méthanol (1,2 % / min). De l'EDTA à 2,7 mM est ajouté au milieu. L'induction au méthanol est réalisée de façon journalière, avec une augmentation du débit d'alimentation en méthanol (2,4 % / min).

A la fin de la culture (augmentation et stabilisation de la saturation en oxygène), le contenu du bioréacteur est récupéré et centrifugé. Le surnageant est récupéré, filtré, et l'enzyme est séparée du surnageant par chromatographie d'affinité (IMAC) et sa concentration mesurée au spectrophotomètre (Nanodrop 2000, Thermo Fischer Scientific).

- Production en fiole d'Erlenmeyer

Une préculture de *Pichia pastoris* contenant le vecteur recombinant a été réalisée en milieu YPD (30 °C / 160 rpm/ 6h). Puis 750 µL de cette préculture ont servi à ensemer 500 mL de milieu BMGY (Incubation à 30 °C / 200 rpm / 16 h). Lorsque la DO du milieu à 600 nm est comprise entre 4 et 6, le milieu est centrifugé à 5000 rpm / 5 min à température ambiante et le culot de cellule est re-suspendu dans 100 mL de milieu BMMY (20 °C/200 rpm). De l'EDTA à 2,7 mM est ajouté au milieu et une induction au méthanol à raison de 3 % est réalisée chaque jour pendant 3 jours. Au jour 3, le milieu est centrifugé, le surnageant récupéré et filtré puis purifié par IMAC et sa concentration mesurée au spectrophotomètre (Nanodrop 2000, Thermo Fischer Scientific).

- Charge en cuivre

La charge en cuivre de la AA10 a été réalisée comme suit : une quantité d'enzyme est mise en présence de 3 équivalents molaires de sulfate de cuivre et incubée à + 4 °C pendant 30 min. Puis, l'excédent en cuivre est éliminé par chromatographie d'exclusion moléculaire (sur colonne PD-10 Sephadex G25 miditrap) et l'enzyme récupérée est conservée à + 4 °C.

### II.2.2. Tests d'activité enzymatique

L'activité de la UmAA10 a été mis en évidence sur deux substrats modèles : l' $\alpha$ - et la  $\beta$ -chitine. Le substrat, à 10 mg/ml final, est mis en contact avec l'enzyme à 1 µM. Après 30 min d'incubation à 30 °C sous agitation (1000 rpm), de l'acide ascorbique à 1 mM est ajouté à l'ensemble. La réaction est réalisée dans du tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 7,0), et incubée à 30 °C sous agitation (1000 rpm) pendant 24 h. Ensuite, le milieu réactionnel est centrifugé et le surnageant est analysé par chromatographie échangeuse d'anion (HPAEC -PAD) à l'aide de l'automate DIONEX (ISC 6000, Thermo Fischer scientific, Massachusetts, USA) (voir paragraphe ci-dessous).

Dans le but de tester la synergie entre la LPMO d'*U. maydis* et une chitinase, un milieu réactionnel identique au précédent est préparé et complété avec de la chitinase de *Streptomyces griseus* (SIGMA, Allemagne) à 2,5 µg/mL. Ces deux réactions sont accompagnées d'une série de réactions contrôles réalisées dans les mêmes conditions.

## II.3. Méthodes analytiques

### II.3.1. Chromatographie échangeuse d'anion (HPAEC -PAD)

Après réaction, les échantillons ont été centrifugés (12500 g, 5 min, 4 °C), et les surnageants dilués de manière appropriée avant injection sur la colonne. Les analytes ont été séparés à l'aide du programme suivant : La méthode de détection est réalisée à l'aide d'une chromatographie échangeuse d'anions à haute performance (HPAEC) couplée à une détection ampérométrique pulsée (PAD) (système DIONEX ICS 6000, ThermoFischer Scientific, USA). Le système est équipé d'une colonne

de garde CarboPac-PA1 (2 x 50 mm) et d'une colonne CarboPac-PA1 (2 x 250 mm) maintenue à 30 °C. Le débit utilisé pour cette méthodologie est de 0,1 mL/min, et le volume d'injection des échantillons est de 25 µL. Les solvants utilisés sont du NaOH 100 mM (éluant A) et du NaOAc 1M dans du NaOH 100 mM (éluant B). Les conditions initiales d'éluion sont fixées à 98,6% d'éluant A et 1,4% d'éluant B. La méthodologie suivante a été appliquée : 0 -10 min, 1,4% B ; 10-32 min, 1.4-14% B ; 32 min, 14-1,4% B ; 32-46 min, 1,4% B. Le traitement des données et l'intégration des chromatogrammes ont été réalisés à l'aide du logiciel de chromatographie Chromeleon 7.2.10.

### II.3.2. Analyses statistiques et bio-informatiques

Les tests statistiques réalisés dans cette étude, ont été fait avec le logiciel XLSTAT, avec un niveau de confiance fixé à 95 %. Les prédictions de structures des enzymes et la visualisation des structures ont été réalisés respectivement avec le logiciel en ligne *Robetta* (<https://rosetta.bakerlab.org/>) et le logiciel de visualisation de structure *Pymol*.

## RESULTATS

Les paragraphes qui suivent présentent, dans un premier temps, l'exploration de l'arsenal enzymatique d'*U. maydis* lors de sa croissance sur différents substrats complexes. Cette étape était précédée de la détermination de la cinétique de croissance d'*U. maydis* sur maltose, substrat plus simple, en milieu minimum, dans le but de servir de référence aux culture sus-cités. Dans un second temps, les résultats de la caractérisation préliminaire des deux enzymes d'*U. maydis* appartenant aux familles AA7 et AA10 seront présentés.

### I. *Ustilago maydis* : croissance et sécrétomique

#### I.1. Croissance d'*Ustilago maydis*

##### I.1.1. Suivi de croissance

- Observations expérimentales

Afin de maîtriser les conditions de culture d'*U. maydis* dans l'optique de réaliser des productions de sécrétomes, un suivi de la cinétique de croissance d'*U. maydis* a été effectué (**figure 7**). Pour ce faire, quatre paramètres ont été suivis : (i) le dénombrement des cellules, (ii) la consommation de maltose au cours du temps dans le milieu (**figure 7A**), (iii) le poids sec et (iv) la densité optique (DO) à 600 nm (**figure 7B**). L'ensemble des paramètres montrent un accroissement du nombre de cellules entre 0 et 96 h, associé à une consommation du substrat. Cette croissance cellulaire tant à se stabiliser, voire à légèrement baisser au-delà de 96 h. En outre, hormis la variation importante observée entre les poids secs des deux essais à 48 h, la tendance est à une évolution en palier : entre 0 et 24 h, entre 48 et 72

h et entre 96 et 144 h pour les trois paliers identifiés, avec des valeurs maximales à 0,142 et 0,129 g pour les essais 1 et 2. En ce qui concerne le dénombrement de cellules au cours du temps, des différences allant de  $1,05 \times 10^9$  à  $3,75 \times 10^9$  cellules sont observées respectivement à 48, 72 et 96 h entre les différents essais, bien que la tendance générale montre une augmentation du nombre de cellules au cours du temps.

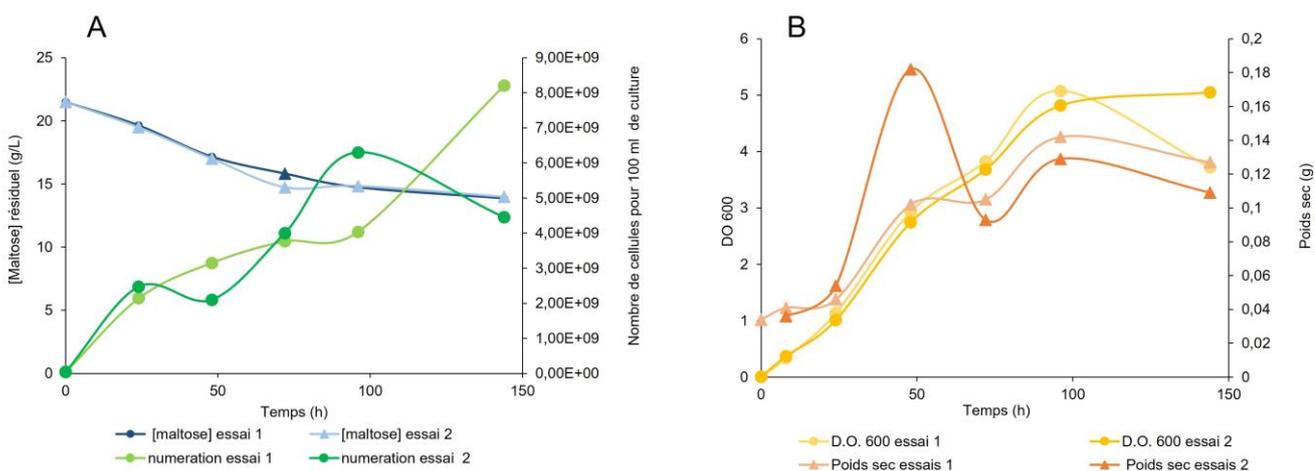
Quant au substrat, sa concentration dans le milieu baisse, passant de 21,5 g/l à 13,8 et 13,9 g/L respectivement pour les essais 1 et 2. Cela indique que le maltose n'est pas limitant en fin de culture.

- Analyse des données

Sur chacun des duplicatas réalisés au cours du temps, des corrélations en général fortes ( $R_s > 0,75$ ), sont observées entre la consommation en maltose et la DO entre le maltose et le dénombrement cellulaire (négativement corrélés dans chacun des cas), et entre la DO et le dénombrement des cellules (positivement corrélés). Ces corrélations ont été mises en évidence par le test de corrélation de Spearman, avec un niveau de confiance à 95% dans chacun des cas.

- Paramètres cinétiques de croissance d'*U. maydis* sur maltose

Les paramètres de croissance d'*U. maydis*, notamment le temps de génération et le taux de croissance spécifiques ont été déterminées à partir des mesures de DO obtenues au cours du temps pour chacun des essais (**figure 4 annexe 3**). Cette représentation met en évidence une phase exponentielle de croissance qui s'étend entre 4 et 24 h, suivie par une phase de décélération et une phase stationnaire entre 96 et 144 h. Les temps de génération  $T$  sont respectivement de 8 h et 9,4 h pour chacun des duplicatas, tandis que les taux de croissance spécifiques  $\mu$  se chiffrent respectivement à 0,087 et 0,073  $h^{-1}$ .



**Figure 7 : Cinétique de croissance d'*U. maydis*.**

Suivi par (A) dénombrement cellulaire et concentration en maltose, (B) DO à 600 nm et poids sec. Les expériences ayant été réalisées en duplicata chaque paramètre est représenté par deux courbes, en raison d'une courbe par essai.

### **I.1.2. Evolution morphologique d'*Ustilago maydis* au cours du temps**

L'évolution morphologique d'*U. maydis* a été suivie au cours du temps en présence de maltose comme source de carbone (**figure 5 annexe 3**). Entre 0 et 72 h, les cellules se présentent sous la forme de cigare donc la taille varie entre 20 et 60  $\mu\text{m}$  de longueur. A 96 h et au-delà, bien que les premières formes observées soient encore majoritaires, de plus en plus de cellules présentent à leur surface et le long des cellules, de nombreuses cicatrices de bourgeonnement.

L'ensemble des données cinétiques obtenues, soutenues par les observations microscopiques ont permis de définir les conditions de référence pour les prochaines cultures d'*U. maydis*, dont les résultats sont présentés dans le prochain paragraphe. Ces conditions sont : croissance pendant six jours avec comme référence morphologique, les cellules en forme de levure.

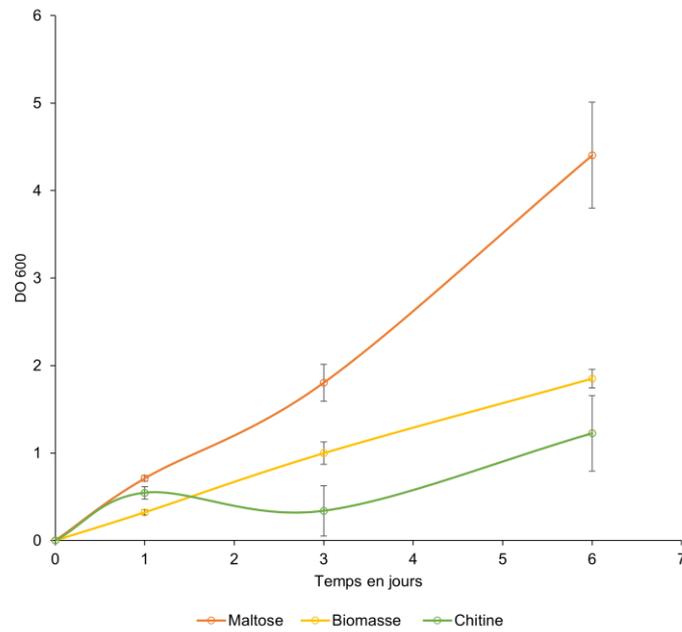
### **I.2. Production des secrétomes et analyse protéomique**

Dans le but d'observer le comportement d'*U. maydis* en croissance sur des composants de la paroi fongique, un suivi de croissance sur chitine et sur biomasse fongique a été réalisé avec analyse des secrétomes produits lors de la croissance sur ces deux substrats.

#### **I.2.1. Suivi de croissance sur chitine et biomasse fongique d'*Ustilago maydis***

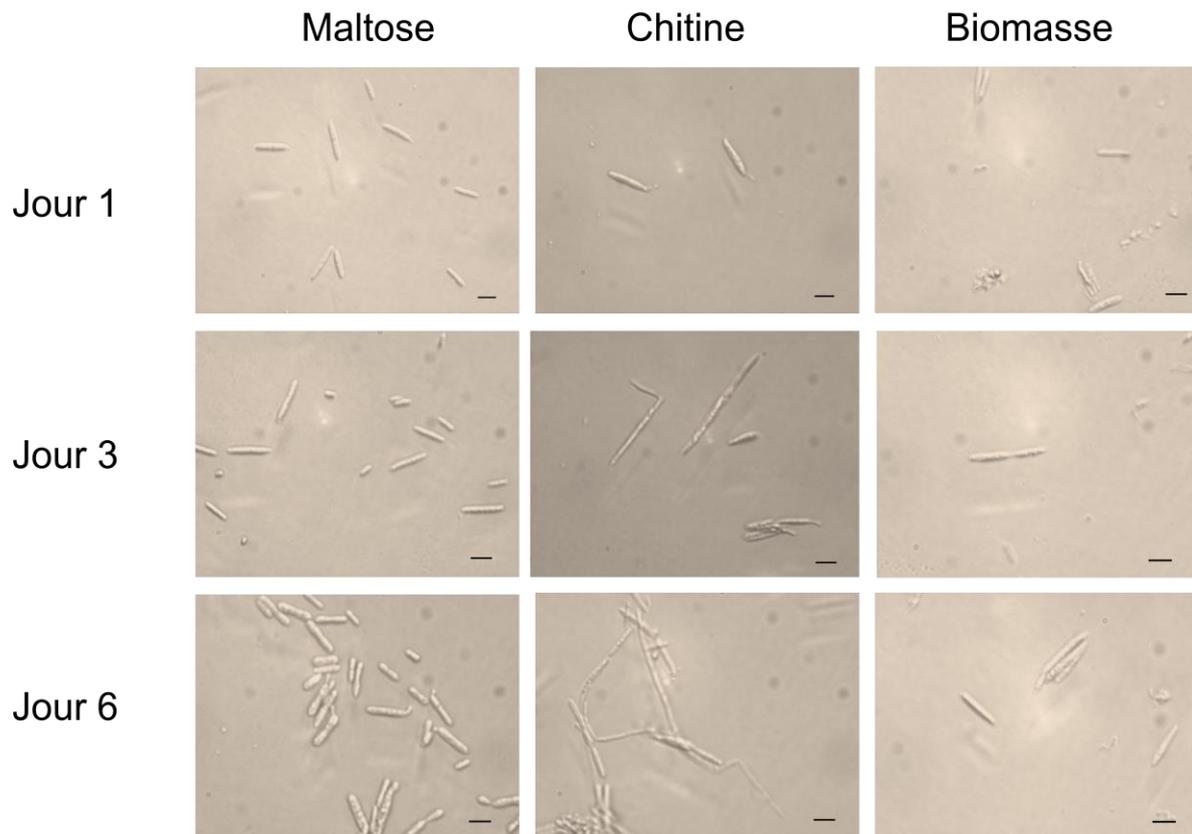
Le suivi de la croissance d'*U. maydis* sur maltose, chitine et biomasse fongique d'*U. maydis*, a été effectué par la mesure de la DO à 600 nm à J1, J3 et J6, mais aussi par des observations microscopiques. Par rapport à la croissance sur maltose qui représente la condition contrôle, les croissances sur biomasse et chitine sont relativement faibles (**figure 8**). Alors qu'au bout de six jours de croissance en présence de maltose, la DO atteint  $4,4 \pm 0,6$ , les croissances sur biomasse et chitine donnent respectivement à J6 des DO de  $1,8 \pm 0,1$  et  $1,2 \pm 0,4$ .

En présence de maltose ou de biomasse comme source de carbone, la morphologie des levures d'*U. maydis* se présente tout d'abord (J1) sous forme de cigare (**figure 9**). Cependant, dans le cas de la chitine, un mélange de cellules en forme de cigare et de cellules un peu plus allongées est observé. Des filaments à l'un des pôles cellulaires des levures, sont observés à partir de J3, uniquement dans la condition chitine. De plus en plus de filaments en croissance et de cellules allongées sont observés à J6, ce qui indique un effet lié à la présence de la chitine.



**Figure 8 : Cinétique de croissance *d'Ustilago maydis* sur différentes sources de carbone.**

La croissance a été suivie par mesure de la densité optique à 600 nm. Pour chaque source de carbone, les expériences réalisées pour les mesures journalières ont été réalisées en triplicat.



**Figure 9 : Evolution morphologiques *d'Ustilago maydis* au cours du temps en fonction des différentes sources de carbone.**

L'échelle indiquée par la barre correspond à 40  $\mu\text{m}$ .

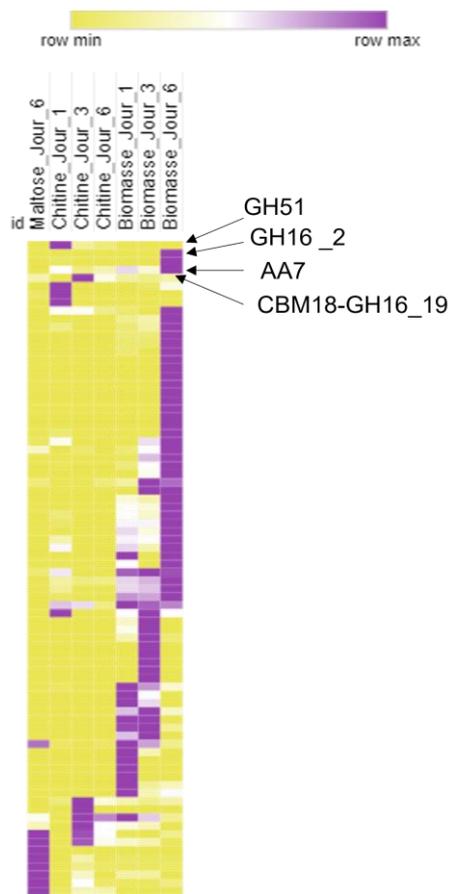
### I.2.2. Analyse sécrétomique

Pour chaque condition, correspondant aux différentes sources de carbone (maltose, chitine, biomasse fongique), un sécrétome (en triplicat) après 1, 3 ou 6 jours de culture a été obtenu. A la suite des étapes de concentration, lavage par diafiltration et détermination des concentrations de protéines, uniquement ceux listés ont été envoyés en analyse protéomique :

- Maltose J6
- Biomasse fongique J1, J3 et J6
- Chitine J1, J3 et J6

En considérant l'ensemble de ces conditions, 80 CAZymes ont été identifiées. La **figure 10** présente une carte de l'abondance des CAZymes sécrétées en fonction de la source de carbone et au cours du temps. Cette analyse préliminaire permet d'ores et déjà d'observer la sécrétion d'un certain nombre de CAZymes d'intérêt dans le contexte de notre étude, comme les enzymes des familles GH18, CE4 et GH25 qui correspondent à des enzymes potentiellement actives sur la chitine. Une analyse plus poussée des prédictions de spécificité de substrat des différentes CAZymes sécrétées sera menée ultérieurement.

En outre, cette carte permet de mettre en évidence les CAZymes différenciellement sécrétées dans les différentes conditions. Cela est notamment le cas pour la GH51 présente uniquement dans la condition « chitine » ou des GH16\_2 présentes uniquement dans la condition « biomasse ». Cependant, certaines CAZymes sont présentes dans toutes les conditions, à l'exemple de la CBM18-GH16\_19 ou de la AA7 qui sera l'objet du prochain chapitre (**figure 10**).



**Figure 10 : Analyse de l'ensemble des CAZymes identifiées par protéomique dans les sécrétomes en fonction des différentes conditions de culture.**

La carte a été réalisée grâce au logiciel en ligne Morpheus, (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>) à partir des nombres de spectres obtenus pour chaque protéine à chaque condition.

## II. Caractérisation préliminaire de la AA7 et de la LPMO d'*Ustilago maydis*

### II.1. Caractérisation de la chitooligosaccharide oxydase d'*Ustilago maydis* (AA7)

#### Conditions optimales de réaction et paramètres cinétiques de l'enzyme

La AA7 d'*U. maydis* utilisée lors de ces réactions est une protéine recombinante produite chez la levure *Pichia pastoris* et purifiée. Avec une taille prédite à 54,8 kDa, son profil de migration présente une bande de taille comprise entre 55 et 70 kDa (**figure 2.A annexe 3**).

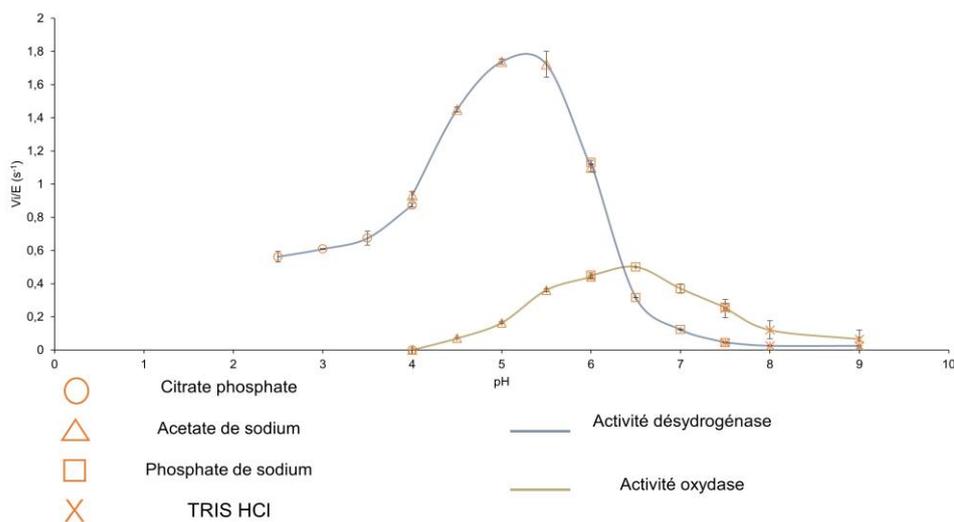
Les résultats de criblage de la spécificité de substrat de la AA7 d'*U. maydis* (*UmAA7*) se trouvent en annexe (**figure 3 annexe 3**). Sur l'ensemble des substrats testés (par l'activité déshydrogénase), l'enzyme semble présenter une spécificité pour les chitooligosaccharides, avec une préférence pour le chitobiose (CHOS 2), avec un  $V_i/E$  de  $0.91 \text{ s}^{-1}$ . Cependant, des vitesses (plus faibles) sont également observées pour les sucres simples, notamment le glucose et le mannose mais aussi pour

les cellooligosaccharides. Le chitobiose est donc le substrat préférentiel, qui a été utilisé pour l'ensemble des tests relatifs à cette enzyme.

La **figure 11** met en évidence les activités déshydrogénase et oxydase de l'enzyme en fonction du pH. D'après cette figure, le pH optimum pour l'activité déshydrogénase se situe entre 5 et 5,5 avec une vitesse maximale entre 1,72 et 1,74 s<sup>-1</sup>, tandis que le maximum d'activité oxydase à 0,5 s<sup>-1</sup> est observé à pH 6,5.

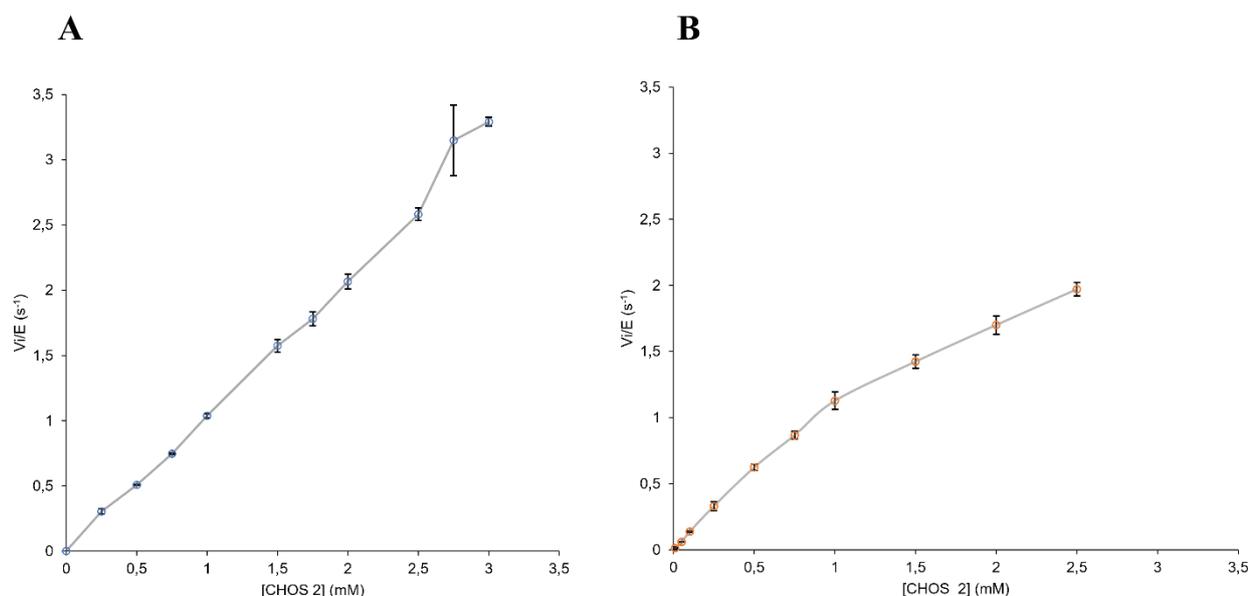
La représentation de Michaelis - Menten de l'activité déshydrogénase (**figure 12. A**) et de l'activité oxydase (**figure 12. B**) de la AA7 montrent un profil qui n'atteint pas la saturation, sachant que nous sommes limités par la solubilité du substrat. En utilisant la méthode de Lineweaver et Burk, les paramètres cinétiques ont néanmoins été déterminés. Les constantes catalytiques sont de 10,36 s<sup>-1</sup> et 3,87 s<sup>-1</sup> pour l'activité déshydrogénase et oxydase, respectivement, tandis que le  $K_M$  apparent est de 8,62 mM et 2,90 mM.

Le **tableau 1** présente les paramètres cinétiques sur chitobiose de *UmAA7* comparativement à d'autres AA7. D'après ces résultats, *UmAA7* présente une efficacité catalytique et une affinité pour le substrat plus faible que les autres enzymes dans le cas des deux types d'activité (oxydase et déshydrogénase). En outre, en comparant les activités oxydase et déshydrogénase, il apparaît que l'enzyme présente une meilleure efficacité catalytique ( $k_{cat}/K_M$ ) (du fait d'une meilleure affinité pour le substrat) lorsque l'oxygène est l'accepteur d'électron.



**Figure 11 : Evolution des activités oxydase et déshydrogénase de *UmAA7* en fonction du pH.**

Les différentes plages de pH ont été générées par différents tampons : de 2,5 à 4 : Citrate phosphate ; de 4 à 6 : Acétate de sodium ; de 6 à 7,5 : phosphate de sodium ; de 7,5 à 9 : TRIS. Activité déshydrogénase : réactions réalisées avec 100 nM d'enzyme ; activité oxydase : réaction réalisée avec 10 nM d'enzyme. Substrat utilisé dans les deux cas : chitobiose à 1 mM.



**Figure 12 : Représentations de Michaelis - Menten des activités enzymatiques de *UmAA7*.**

Panel A : activité déshydrogénase ; panel B : activité oxydase ; CHOS 2 : chitobiose.

Activité déshydrogénase : réactions réalisées avec 100 nM d'enzyme ; activité oxydase : réaction réalisée avec 10 nM d'enzyme.

**Tableau 1 : Tableau comparatif des paramètres cinétiques de chitooligosaccharide oxydases**

	Activité oxydase				Activité déshydrogénase			
	<i>MoChi</i>	<i>PbChi7A</i> <sup>1</sup>	<i>FgChi7A</i> <sup>1</sup>	<i>UmAA7</i>	<i>MoChi7A</i> <sup>1</sup>	<i>PbChi7A</i> <sup>1</sup>	<i>FgChi7A</i> <sup>1</sup>	<i>UmAA7</i>
$K_M$ (mM)	0.064	0.3	0.27	2.90	0.33	-	1.32	8.62
$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	3.71	3.55	6.14	3.87	-	2.0	-	10.36
$k_{cat}/K_M$ (s <sup>-1</sup> · M <sup>-1</sup> )	6.83	1.27	8.58	1.13	5.56	-	2.17	1.03 x
	x 10 <sup>4</sup>	x 10 <sup>4</sup>	x 10 <sup>3</sup>	x 10 <sup>3</sup>	x10 <sup>4</sup>	-	x 10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>

*MoChi7A* : chitooligosaccharide de *Pyricularia oryzae* ; *PnChi7A* : Chitooligosaccharide oxydase de *Polyporus brumalis* ; *FgChi7A* : chitooligosaccharide oxydase de *Fusarium graminearum* PH-1.

<sup>1</sup> les données proviennent de Haddad Momeni *et al.* (2021). La détermination de ces paramètres cinétiques a été réalisée dans chacun des cas avec le chitobiose comme substrat.

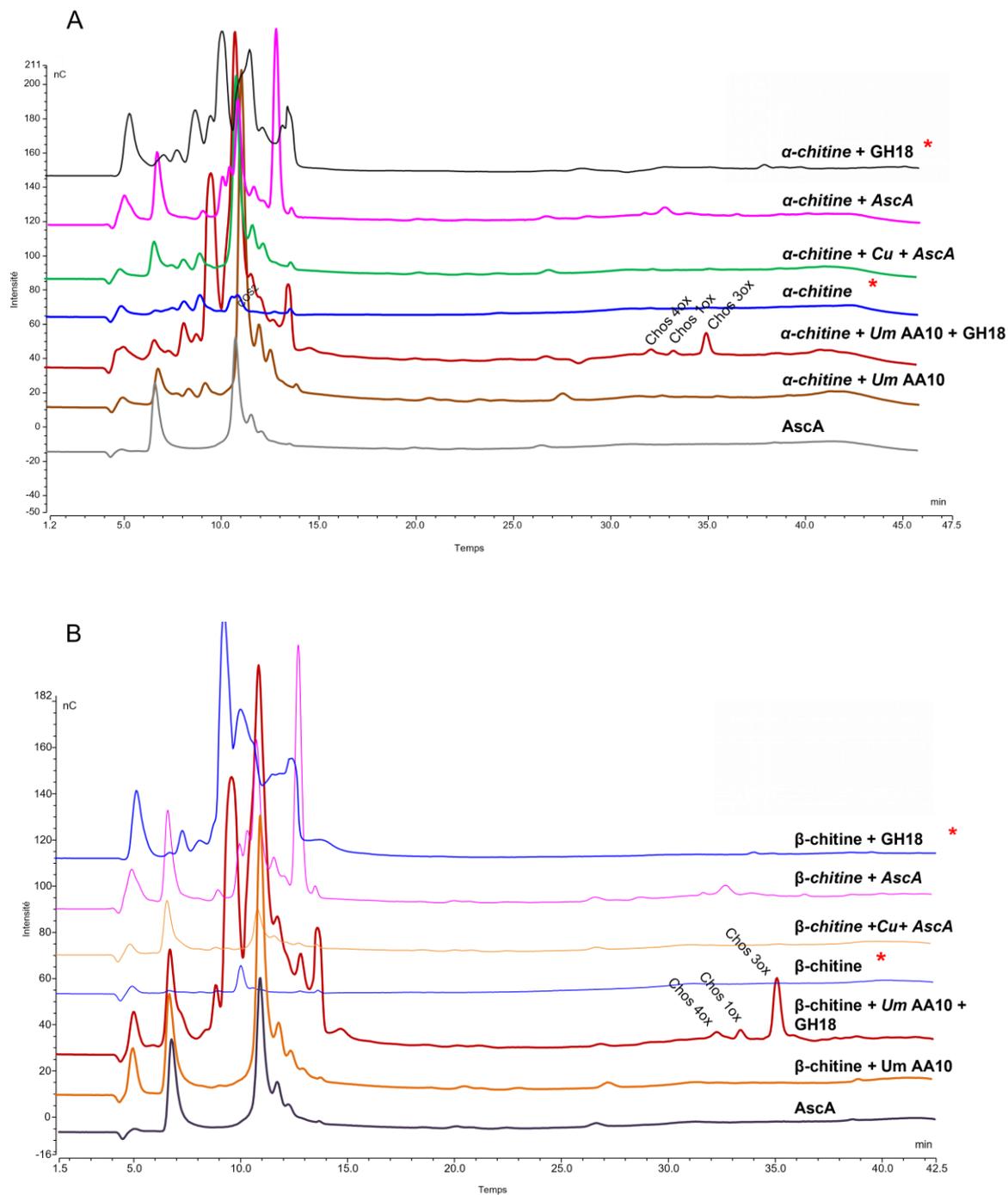
## II.2. Caractérisation de la LPMO d'*Ustilago maydis* (*UmAA10*)

La AA10 d'*U. maydis* (*UmAA10*) utilisés lors de ce test est une protéines recombinante produite chez la levure *Pichia pastoris* et purifiée. Avec une taille prédite à 19.5 kDa, son profil de migration présente une bande de taille comprise entre 15 et 25 kDa (**figure 1. B annexe 3**)

Les prédictions structurales et phylogénétique réalisés sur la AA10 d'*U. maydis* (*UmAA10*) avant mon arrivée en stage, lui prédisent une spécificité d'action sur la chitine. Des tests d'activité sur la

chitine ont ensuite été réalisés et analysés par chromatographie ionique (HPAEC-PAD). La **figure 13** montre les produits obtenus après action de *UmAA10*. Lorsque *UmAA10* est mise en présence du substrat ( $\alpha$  ou  $\beta$  - chitine) avec l'acide ascorbique (AscA) comme donneur d'électron (courbe «  $\alpha/\beta$  - chitine + *UmAA10* »), aucun chitooligosaccharide oxydé n'est observé. Cependant, lorsqu'une chitinase (GH18) est ajoutée à la réaction précédemment décrite, des chitooligosaccharide oxydés sont observés, quel que soit le substrat ( $\alpha$  ou  $\beta$ -chitine), ce qui témoigne d'un clivage oxydatif de la LPMO. De plus, en présence de ces deux enzymes (chitinase + *UmAA10*), une libération plus importante de chitooligosaccharide neutres (apparaissant entre 5 et 15 min) est observée. Cette observation renforce l'idée d'une réaction synergique des deux enzymes dans la dégradation des substrats étudiés.

Ces résultats sont validés par les profils des réactions contrôles. En effet, les substrats  $\alpha$  et  $\beta$  – chitine contiennent peu d'oligosaccharides simples (apparaissant entre 5 et 15 min). L'application d'une chitinase (GH18) à ces deux substrats permet la libération de chitooligosaccharides neutres (Voir les chromatogramme «  $\alpha$  - chitine + GH18 » et «  $\beta$  - chitine + GH18 »). En absence de système enzymatique (GH18 ou LPMO), et en présence de l'acide ascorbique (AscA) et du substrat, des pics observés entre 5 et 15 min, correspondant à l'acide ascorbique, associés à d'autres pics, sont observés. Pour l'ensemble des contrôles présentés, aucun oligosaccharide oxydé n'est, en général, observé.



**Figure 13 : Profil HPAEC – PAD des produits solubles libérés par suite de l’action de UmAA10.**

Panel A:  $\alpha$ -chitine; panel B:  $\beta$ -chitine. Les réactions ont été réalisés à pH 7. Les inscriptions sur les courbes correspondent aux principaux réactifs des milieux réactionnels, hormis l’eau et le tampon. Les réactions qui ne contiennent pas UmAA10 sont des réactions contrôles.

AscA : acide ascorbique. L’acide ascorbique est le donneur d’électron qui active la AA10 en réduisant le cuivre catalytique. Les réactions contenant UmAA10 sont réalisés avec 1  $\mu$ M d’enzyme. Cu : cuivre. Le contrôle réalisé en présence de cuivre contient 1  $\mu$ M de cuivre ajouté sous forme de sulfate de cuivre

(\*) : les réactions affectées d’une étoile ne contiennent pas d’acide ascorbique.

## DISCUSSION

Au cours de son cycle de vie, *Ustilago maydis* passe successivement par trois stades, caractérisés par des différences morphologiques majeures : un stade haploïde sous forme de levure saprotrophe, un stade dicaryotique sous forme de filament pathogène et un stade diploïde sous forme de téliospores (Banuett, 1995). La forme haploïde saprotrophe d'*U. maydis* est celle qui a fait l'objet de notre étude. La croissance d'*U. maydis* sur le milieu minimum choisi dans le cadre de notre étude (2 % maltose + sels minéraux + sulfate d'ammonium (Wallen *et al.*, 2021) a montré un taux de croissance spécifique moyen égal  $0,08 \text{ h}^{-1}$  avec un temps de génération moyen de 8,7 h. Ces paramètres mettent en évidence une croissance lente d'*Ustilago maydis* comparativement aux données de la littérature. En effet, Olicón-Hernández *et al.* (2015) ont obtenu sur milieu minimum avec glucose comme source de carbone, un taux de croissance spécifique et un temps de génération respectivement à  $0,31 \text{ h}^{-1}$  et 2,24 h. Cárdenas-Monroy *et al.* (2017) ont pu démontrer lors de leur étude, les différences de croissance d'*U. maydis* sur différents substrats en milieu minimum : sur glucose et sur éthanol, le temps de génération étaient compris entre 2 et 4.9 h tandis que sur disaccharide (Lactose) et sur polyol (Glycérol) la croissance d'*U. maydis* étaient plus lente avec des phases exponentielles pouvant s'étendre jusqu'à 50 h (20 h dans notre cas). Cela sous-tend l'idée que *U. maydis* a une préférence pour les sucres simples et les monoalcools comme source de carbone. Ceci explique la faible croissance d'*U. maydis* sur la chitine et la biomasse fongique, substrats plus complexes, par rapport à la croissance sur maltose (notre condition contrôle). Par ailleurs, sur la chitine, une différenciation cellulaire progressive a été observée, caractérisée par l'apparition de filaments à l'un des pôles cellulaires. Il est connu que cette différenciation peut être induite chez d'*U. maydis* par différents stimuli : phéromones, lipides et surface hydrophobe, pH acide ou encore carence en azote (Gauthier, 2015). Dans le cas de notre étude, l'hypothèse la plus plausible est une baisse de pH due à l'acidification du milieu, liée à la dégradation de la chitine. Toutefois, cette hypothèse devrait être vérifiée. Sur biomasse fongique d'*U. maydis*, les cellules obtenues étaient un peu plus allongées, que celles obtenues sur maltose. Contrairement à la chitine qui est un homopolymère, la biomasse fongique d'*U. maydis* est une source complexe de carbone et d'azote, sa paroi étant constituée d'environ 73,1 % de polysaccharides neutres dont 14,2 % de chitine (pourcentage massique) (Ruiz-Herrera *et al.*, 1996). Cette complexité pourrait expliquer la sécrétion différentielle de nombreuses CAZymes mise en évidence par notre analyse sécrétomique. Trois groupes d'enzymes ont notamment été identifiés lors de la croissance sur biomasse : **(I-Bio)** des CAZymes prédites active sur la chitine : CE4 (chitine désacétylase) et GH18 (chitinase) ; **(II-Bio)** des CAZymes prédites active sur les glucanes et/ou mannanes : GH5\_9 et GH38 ; et **(III-Bio)** des CAZymes dont la nature du substrat biologique reste à élucider : des AA3\_2, GH10 (prédite xylanase) et GH62 (prédite

arabinofuranosidase). Pour le groupe (III-Bio), des analyses bio-informatique (phylogénie, prédiction de structure) pourraient être menées pour élucider leur rôle potentiel, dans la mesure où les GH10 et GH62 sont habituellement actives sur les polymères végétaux. En ce qui concerne la croissance sur chitine, où une différenciation cellulaire est observée, des CAZymes actives sur chitine (CE4) et sur glucanes (CBM18-GH16\_19) ont été identifiées. Cependant, pour d'autres CAZymes (AA3\_2, GH51 et GH135 (prédite active sur galactosaminogalactanes)), les spécificités de substrat restent à définir par des approches biochimiques. Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude sont en adéquation avec les données sécrétomiques de Couturier *et al.* (2012) obtenus par culture d'*U. maydis* sur son de maïs. Ces données réannotées par Reyre *et al.* (*en préparation*) mettent en évidence la sécrétion de certaines AA3\_2, de CE4 et d'une GH135, prédite comme actives sur la paroi fongique. Par ailleurs, les données transcriptomiques obtenues par Lanver *et al.* (2018) lors de la différenciation cellulaire pendant le cycle infectieux, mettent en évidence la surexpression des gènes codant pour les enzymes AA3\_2, AA7 et AA10. Dans nos analyses sécrétomiques, un seul peptide correspondant à la AA10 a été détecté. Cela pourrait s'expliquer par un ancrage de cette enzyme à la paroi fongique d'*U. maydis*. Quant à la AA7, elle est observée dans toutes les conditions.

Bien que leurs rôles biologiques soient peu connus, les AA7 sont fréquemment retrouvées chez des champignons phytopathogènes. En effet, l'oxydation d'oligosaccharides pourrait jouer un rôle dans les processus de pathogénicité. La production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, qui joue le rôle de molécule signal dans certains processus biologiques, pourrait constituer une arme supplémentaire dans la compétition avec d'autres organisme, pour les substrats. Les tests d'activités enzymatiques menés sur la AA7 d'*U. maydis* ont démontré que cette enzyme présente une activité déshydrogénase, mais aussi une activité oxydase sur chitoooligosaccharide. Par ailleurs ces deux activités semblent s'équivaloir au vu des efficacités catalytiques de l'ordre de 10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>. Cependant, les paramètres cinétiques obtenus dans le cas de notre étude pour la AA7 d'*U. maydis* (*UmAA7*), montrent une efficacité catalytique inférieure d'environ un ordre de magnitude (10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>) pour les activités oxydase et déshydrogénase, comparativement aux AA7 (~10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>) caractérisées dans la littérature (Haddad Momeni *et al.*, 2021). Cette différence pourrait être due à des conditions réactionnelles non optimales et/ou un mode de reconnaissance du substrat différent. En effet, il est bien connu que la mutation des résidus impliqués dans la liaison de l'enzyme au substrat influence sa spécificité de substrat et son efficacité catalytique (Heuts *et al.*, 2007). Or *UmAA7* présente, d'après les résultats de modélisation moléculaire, des différences dans la composition de son site actif par rapport aux chitoooligosaccharide oxydases caractérisées dans la littérature (**figure 5 annexe 4**). Ce fait nous interpelle sur la nature des substrats et cosubstrats réels de cette enzyme, qui méritent une caractérisation plus approfondie.

Les LPMO sont des monooxygénases qui agissent en synergie avec les glycosides hydrolases dans la dégradation de polymères récalcitrants (Berrin *et al.*, 2017). Les enzymes qui font partie de cette

famille, sont retrouvées à 97 % chez les bactéries, à 2,9 % chez les virus et à 0,1 % chez les archées (Vandhana *et al.*, 2022). En effet, celles-ci sont soit actives sur la cellulose ou la chitine, soit actives sur les deux polymères. Chez les bactéries, ces enzymes sont impliquées dans les processus de nutrition, d'endosymbiose, ou de virulence (Agostoni *et al.*, 2017). Cependant, ces enzymes sont également présentes, bien que rares, chez les champignons, plus précisément dans l'ordre des Ustilaginales. La AA10 retrouvée chez *U. maydis* est la seule LPMO présente dans son génome, là où d'autres espèces fongiques peuvent posséder jusqu'à plusieurs dizaines de LPMO (de la famille AA9 notamment) (Blatzer *et al.*, 2020). Ce fait nous amène à nous interroger sur le rôle biologique de cette enzyme chez *U. maydis*. Les tests enzymatiques réalisés sur substrat modèle dans le cadre de mon stage mettent en évidence l'activité de type LPMO sur la chitine. Par ailleurs, la synergie d'activité entre cette LPMO et une chitinase a également été mise en évidence et confirme le rôle des LPMO en soutien de l'activité des glycosides hydrolases. Cependant, des investigations plus poussées doivent être menées sur cette enzyme dans le but de la caractériser de manière approfondie (i.e. détermination des conditions optimales de réaction, donneurs d'électrons, donneur d'oxygène, etc...).

## CONCLUSION

La paroi fongique joue un rôle important dans la survie du champignon face aux conditions environnementales et dans les interactions entre le champignon et son hôte. Cette paroi constituée de polysaccharides, voit sa composition varier au cours du temps, grâce à des modifications enzymatiques réalisées par les CAZymes produites par le champignon. Ces CAZymes peuvent être des hydrolases ou des oxydoréductases, à l'exemple des LPMO ou des AA7.

*U. maydis* présente dans son génome une seule LPMO (*UmAA10*) et une seule chitooligosaccharide oxydase (*UmAA7*), dont les gènes sont surexprimés au cours du cycle infectieux (Lanver *et al.*, 2018). L'objectif de ce stage a été de réaliser une caractérisation préliminaire de ces enzymes. Celle-ci a été réalisée avec succès pour *UmAA7* qui présente à la fois une activité déshydrogénase et une activité oxydase, dans des conditions réactionnelles particulières. Son activité sur les chitooligosaccharides, éléments de la paroi fongique, pourrait indiquer une éventuelle fonction dans le remodelage de la paroi d'*U. maydis*. Les analyses sécrétomiques ont permis de mettre en évidence sa sécrétion induite en présence ou en absence de composantes de la paroi fongique. Quant à *UmAA10*, elle a été produite avec succès lors de nos travaux et son activité sur la chitine et la synergie d'activité avec une chitinase ont été mise en évidence.

Ces résultats préliminaires sont encourageants, car ces enzymes sont actives sur des éléments de la paroi fongique, et constituent les prérequis nécessaires pour aller explorer, dans de futures études, le

rôle biologique de ces enzymes chez *U. maydis* et notamment, tester l'hypothèse selon laquelle elles seraient impliquées dans les processus enzymatiques de remodelage de la paroi fongique.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AGOSTONI, M., J. A. HANGASKY, and M. A. MARLETTA. 2017. Physiological and Molecular Understanding of Bacterial Polysaccharide Monooxygenases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*. 81: e00015-17.
- ALCAZAR-FUOLI, L., C. CLAVAUD, C. LAMARRE, V. AIMANIANDA, V. SEIDL-SEIBOTH, E. MELLADO, and J.-P. LATGÉ. 2011. Functional analysis of the fungal/plant class chitinase family in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*. 48: 418–429.
- BANUETT, F. 1995. Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annual Review of Genetics*. 29: 179–209.
- BEESON, W. T., C. M. PHILLIPS, J. H. D. CATE, and M. A. MARLETTA. 2012. Oxidative cleavage of cellulose by fungal copper-dependent polysaccharide monooxygenases. *Journal of the American Chemical Society*. 134: 890–892.
- BERRIN, J.-G., M.-N. ROSSO, and M. ABOU HACHEM. 2017. Fungal secretomics to probe the biological functions of lytic polysaccharide monooxygenases. *Carbohydrate Research*. 448: 155–160.
- BISSARO, B., A. VÁRNAI, Å. K. RØHR, and V. G. H. EIJSINK. 2018. Oxidoreductases and Reactive Oxygen Species in Conversion of Lignocellulosic Biomass. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*. 82: e00029-18.
- BISSARO, B., Å. K. RØHR, G. MÜLLER, P. CHYLENSKI, M. SKAUGEN, Z. FORSBERG, S. J. HORN, G. VAAJE-KOLSTAD, and V. G. H. EIJSINK. 2017. Oxidative cleavage of polysaccharides by monocopper enzymes depends on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Nature Chemical Biology*. 13: 1123–1128.
- BLATZER, M., A. BEAUVAIS, B. HENRISSAT, and J.-P. LATGÉ. 2020. Revisiting Old Questions and New Approaches to Investigate the Fungal Cell Wall Construction. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 425: 331–369.
- BOWMAN, S. M., and S. J. FREE. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*. 28: 799–808.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248–254.
- CÁRDENAS-MONROY, C. A., T. POHLMANN, G. PIÑÓN-ZÁRATE, G. MATUS-ORTEGA, G. GUERRA, M. FELDBRÜGGE, and J. P. PARDO. 2017. The mitochondrial alternative oxidase *Aox1* is needed to cope with respiratory stress but dispensable for pathogenic development in *Ustilago maydis*. *PLOS ONE*. 12: e0173389.
- COURTADE, G., and F. L. AACHMANN. 2019. Chitin-Active Lytic Polysaccharide Monooxygenases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1142: 115–129.
- COUTURIER, M., D. NAVARRO, C. OLIVÉ, D. CHEVRET, M. HAON, A. FAVEL, L. LESAGE-MEESSEN, B. HENRISSAT, P. M. COUTINHO, and J.-G. BERRIN. 2012. Post-genomic analyses of fungal lignocellulosic biomass degradation reveal the unexpected potential of the plant pathogen *Ustilago maydis*. *BMC Genomics*. 13: 57.
- DEAN, R., J. a. L. VAN KAN, Z. A. PRETORIUS, K. E. HAMMOND-KOSACK, A. DI PIETRO, P. D. SPANU, J. J. RUDD, M. DICKMAN, R. KAHMANN, J. ELLIS, and G. D. FOSTER. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 13: 414–430.
- DRULA, E., M.-L. GARRON, S. DOGAN, V. LOMBARD, B. HENRISSAT, and N. TERRAPON. 2022. The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. *Nucleic Acids Research*. 50: D571–D577.
- FERRARI, A. R., M. LEE, and M. W. FRAAIJE. 2015. Expanding the substrate scope of chito oligosaccharide oxidase from *Fusarium graminearum* by structure-inspired mutagenesis. *Biotechnology and Bioengineering*. 112: 1074–1080.
- FREE, S. J. 2013. Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Advances in Genetics*. 81: 33–82.
- GAUTHIER, G. M. 2015. Dimorphism in Fungal Pathogens of Mammals, Plants, and Insects. *PLOS Pathogens*. 11: e1004608.

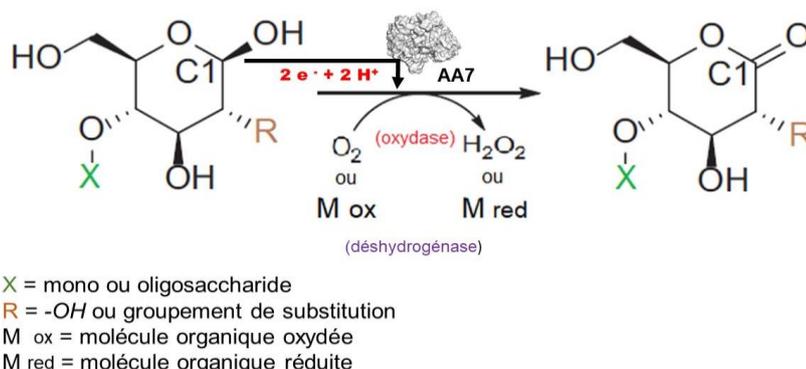
- GEOGHEGAN, I., G. STEINBERG, and S. GURR. 2017. The Role of the Fungal Cell Wall in the Infection of Plants. *Trends in Microbiology*. 25: 957–967.
- GOW, N. A. R., J.-P. LATGE, and C. A. MUNRO. 2017. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiology Spectrum*. 5: 1–25.
- HADDAD MOMENI, M., F. FREDSLUND, B. BISSARO, O. RAJI, T. V. VUONG, S. MEIER, T. S. NIELSEN, V. LOMBARD, B. GUIGLIARELLI, F. BIASO, M. HAON, S. GRISEL, B. HENRISSAT, D. H. WELNER, E. R. MASTER, J.-G. BERRIN, and M. ABOU HACHEM. 2021. Discovery of fungal oligosaccharide-oxidising flavo-enzymes with previously unknown substrates, redox-activity profiles and interplay with LPMOs. *Nature Communications*. 12: 2132.
- HARTL, L., S. ZACH, and V. SEIDL-SEIBOTH. 2012. Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93: 533–543.
- VAN HELLEMOND, E. W., N. G. H. LEFERINK, D. P. H. M. HEUTS, M. W. FRAAIJE, and W. J. H. VAN BERKEL. 2006. Occurrence and Biocatalytic Potential of Carbohydrate Oxidases. Pp. 17–54, in *Advances in Applied Microbiology*. vol. 60. Academic Press.
- HENRISSAT, B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *The Biochemical Journal*. 280 ( Pt 2): 309–316.
- HEUTS, D. P. H. M., D. B. JANSSEN, and M. W. FRAAIJE. 2007. Changing the substrate specificity of a chitooligosaccharide oxidase from *Fusarium graminearum* by model-inspired site-directed mutagenesis. *FEBS Letters*. 581: 4905–4909.
- HORN, S. J., G. VAAJE-KOLSTAD, B. WESTERENG, and V. G. EIJSINK. 2012. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels*. 5: 45.
- KAHMANN, R., and J. KÄMPER. 2004. *Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development. *The New Phytologist*. 164: 31–42.
- KÄMPER, J., R. KAHMANN, M. BÖLKER, L.-J. MA, T. BREFORT, B. J. SAVILLE, F. BANUETT, J. W. KRONSTAD, S. E. GOLD, O. MÜLLER, M. H. PERLIN, H. A. B. WÖSTEN, R. DE VRIES, J. RUIZ-HERRERA, C. G. REYNAGA-PEÑA, K. SNETSELAAR, M. MCCANN, J. PÉREZ-MARTÍN, M. FELDBRÜGGE, C. W. BASSE, G. STEINBERG, J. I. IBEAS, W. HOLLOMAN, P. GUZMAN, M. FARMAN, J. E. STAJICH, R. SENTANDREU, J. M. GONZÁLEZ-PRIETO, J. C. KENNEL, L. MOLINA, J. SCHIRAWSKI, A. MENDOZA-MENDOZA, D. GREILINGER, K. MÜNCH, N. RÖSSEL, M. SCHERER, M. VRANES, O. LADENDORF, V. VINCON, U. FUCHS, B. SANDROCK, S. MENG, E. C. H. HO, M. J. CAHILL, K. J. BOYCE, J. KLOSE, S. J. KLOSTERMAN, H. J. DEELSTRA, L. ORTIZ-CASTELLANOS, W. LI, P. SANCHEZ-ALONSO, P. H. SCHREIER, I. HÄUSER-HAHN, M. VAUPEL, E. KOOPMANN, G. FRIEDRICH, H. VOSS, T. SCHLÜTER, J. MARGOLIS, D. PLATT, C. SWIMMER, A. GNIRKE, F. CHEN, V. VYSOTSKAIA, G. MANNHAUPT, U. GÜLDENER, M. MÜNSTERKÖTTER, D. HAASE, M. OESTERHELD, H.-W. MEWES, E. W. MAUCELI, D. DECAPRIO, C. M. WADE, J. BUTLER, S. YOUNG, D. B. JAFFE, S. CALVO, C. NUSBAUM, J. GALAGAN, and B. W. BIRREN. 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*. 444: 97–101.
- KIM, S., J. STÅHLBERG, M. SANDGREN, R. PATON, and G. BECKHAM. 2013. Quantum mechanical calculations suggest that lytic polysaccharide monoxygenases use a copper-oxyl, oxygen-rebound mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111.
- KLEIN, B. S., and B. TEBBETS. 2007. Dimorphism and virulence in fungi. *Current Opinion in Microbiology*. 10: 314–319.
- KLOSE, J., M. M. DE SÁ, and J. W. KRONSTAD. 2004. Lipid-induced filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology*. 52: 823–835.
- KLOSTERMAN, S. J., M. H. PERLIN, M. GARCIA-PEDRAJAS, S. F. COVERT, and S. E. GOLD. 2007. Genetics of morphogenesis and pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Advances in Genetics*. 57: 1–47.
- KUBICEK, C. P., T. L. STARR, and N. L. GLASS. 2014. Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*. 52: 427–451.

- LANVER, D., A. N. MÜLLER, P. HAPPEL, G. SCHWEIZER, F. B. HAAS, M. FRANITZA, C. PELLEGRIN, S. REISSMANN, J. ALTMÜLLER, S. A. RENSING, and R. KAHMANN. 2018. The Biotrophic Development of *Ustilago maydis* Studied by RNA-Seq Analysis. *The Plant Cell*. 30: 300–323.
- LATGÉ, J.-P. 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology*. 66: 279–290.
- LATGÉ, J.-P., and A. BEAUVAIS. 2014. Functional duality of the cell wall. *Current Opinion in Microbiology*. 20: 111–117.
- LATIJNHOUWERS, M., P. J. G. M. DE WIT, and F. GOVERS. 2003. Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. *Trends in Microbiology*. 11: 462–469.
- LEVASSEUR, A., E. DRULA, V. LOMBARD, P. M. COUTINHO, and B. HENRISSAT. 2013. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnology for Biofuels*. 6: 41.
- LYU, X., C. SHEN, Y. FU, J. XIE, D. JIANG, G. LI, and J. CHENG. 2015. Comparative genomic and transcriptional analyses of the carbohydrate-active enzymes and secretomes of phytopathogenic fungi reveal their significant roles during infection and development. *Scientific Reports*. 5: 15565.
- MARTÍNEZ-SOTO, D., and J. RUIZ-HERRERA. 2013. Transcriptomic analysis of the dimorphic transition of *Ustilago maydis* induced in vitro by a change in pH. *Fungal Genetics and Biology*. 58–59: 116–125.
- MATEI, A., and G. DOEHLEMANN. 2016. Cell biology of corn smut disease-*Ustilago maydis* as a model for biotrophic interactions. *Current Opinion in Microbiology*. 34: 60–66.
- NARANJO-ORTIZ, M. A., and T. GABALDÓN. 2019. Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 94: 2101–2137.
- OLICÓN-HERNÁNDEZ, D. R., M. G. ARAIZA-VILLANUEVA, J. P. PARDO, E. ARANDA, and G. GUERRA-SÁNCHEZ. 2019. New Insights of *Ustilago maydis* as Yeast Model for Genetic and Biotechnological Research: A Review. *Current Microbiology*. 76: 917–926.
- OLICÓN-HERNÁNDEZ, D. R., A. N. HERNÁNDEZ-LAUZARDO, J. P. PARDO, A. PEÑA, M. G. VELÁZQUEZ-DEL VALLE, and G. GUERRA-SÁNCHEZ. 2015. Influence of chitosan and its derivatives on cell development and physiology of *Ustilago maydis*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 79: 654–660.
- OSHEROV, N., and O. YARDEN. 2014. The Cell Wall of Filamentous Fungi. Pp. 224–237, in *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi* (K. A. BORKOVICH and D. J. EBBOLE, eds.). ASM Press, Washington, DC, USA.
- PERFECT, S. E., and J. R. GREEN. 2001. Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. *Molecular Plant Pathology*. 2: 101–108.
- PHILLIPS, C. M., W. T. BEESON, J. H. CATE, and M. A. MARLETTA. 2011. Cellobiose dehydrogenase and a copper-dependent polysaccharide monooxygenase potentiate cellulose degradation by *Neurospora crassa*. *ACS Chemical Biology*. 6: 1399–1406.
- QUINLAN, R. J., M. D. SWEENEY, L. LO LEGGIO, H. OTTEN, J.-C. N. POULSEN, K. S. JOHANSEN, K. B. R. M. KROGH, C. I. JØRGENSEN, M. TOVBORG, A. ANTHONSEN, T. TRYFONA, C. P. WALTER, P. DUPREE, F. XU, G. J. DAVIES, and P. H. WALTON. 2011. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108: 15079–15084.
- REYRE, J.-L., S. GRISEL, M. HAON, O. TRANQUET, D. NAVARRO, D. ROPARTZ, S. LEGALL, E. RECORD, G. SCIARA, J.-G. BERRIN, and B. BISSARO. Functional characterization of a GH16 glucanase and AA3\_2 oligosaccharide dehydrogenase secreted by *Ustilago maydis* reveals activities directed towards the fungal cell wall. In progress.
- RUIZ-HERRERA, J., and L. ORTIZ-CASTELLANOS. 2019. Cell wall glucans of fungi. A review. *Cell Surface (Amsterdam, Netherlands)*. 5: 100022.

- RUIZ-HERRERA, J., C. G. LEON, A. CARABEZ-TREJO, and E. REYES-SALINAS. 1996. Structure and chemical composition of the cell walls from the haploid yeast and mycelial forms of *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology*. 20: 133–142.
- RYTIOJA, J., K. HILDÉN, J. YUZON, A. HATAKKA, R. P. DE VRIES, and M. R. MÄKELÄ. 2014. Plant-polysaccharide-degrading enzymes from Basidiomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*. 78: 614–649.
- SAVINO, S., S. JENSEN, A. TERWISSCHA VAN SCHELTINGA, and M. W. FRAAIJE. 2020. Analysis of the structure and substrate scope of chito oligosaccharide oxidase reveals high affinity for C2-modified glucosamines. *FEBS Letters*. 594: 2819–2828.
- SYNYTSYA, A., and M. NOVAK. 2014. Structural analysis of glucans. *Annals of Translational Medicine*. 2: 17.
- VAAJE-KOLSTAD, G., Z. FORSBERG, J. S. LOOSE, B. BISSARO, and V. G. EIJSINK. 2017. Structural diversity of lytic polysaccharide monooxygenases. *Current Opinion in Structural Biology*. 44: 67–76.
- VAAJE-KOLSTAD, G., B. WESTERENG, S. J. HORN, Z. LIU, H. ZHAI, M. SØRLIE, and V. G. H. EIJSINK. 2010. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science (New York, N.Y.)*. 330: 219–222.
- VANDHANA, T. M., J.-L. REYRE, D. SUSHMAA, J.-G. BERRIN, B. BISSARO, and J. MADHUPRAKASH. 2022. On the expansion of biological functions of lytic polysaccharide monooxygenases. *The New Phytologist*. 233: 2380–2396.
- VOLLMEISTER, E., K. SCHIPPER, S. BAUMANN, C. HAAG, T. POHLMANN, J. STOCK, and M. FELDBRÜGGE. 2012. Fungal development of the plant pathogen *Ustilago maydis*. *FEMS Microbiology Reviews*. 36: 59–77.
- WALLEN, R. M., K. RICHARDSON, M. FURNISH, H. MENDOZA, A. DENTINGER, S. KHANAL, and M. H. PERLIN. 2021. Hungry for Sex: Differential Roles for *Ustilago maydis* Locus Components in Haploid Cells vis à vis Nutritional Availability. *Journal of Fungi*. 7: 135.
- WANG, X., N. JIANG, J. LIU, W. LIU, and G.-L. WANG. 2014. The role of effectors and host immunity in plant-necrotrophic fungal interactions. *Virulence*. 5: 722–732.
- ZHONG, X., L. ZHANG, G. P. VAN WEZEL, E. VIJGENBOOM, and D. CLAESSEN. 2022. Role for a Lytic Polysaccharide Monooxygenase in Cell Wall Remodeling in *Streptomyces coelicolor*. *MBio*. 13: e0045622.

# ANNEXE

## Annexe 1 : Introduction



**Figure 1 Annexe 1 : Mécanisme catalytique simplifié des CAZymes de la famille des AA7.** Figure modifiée obtenue à partir de Savino *et al.* (2020). L'enzyme catalyse l'oxydation de l'extrémité réductrice de l'oligosaccharide. L'oxydation du carbone C1 libère des électrons pris en charge par le coenzyme FAD de la AA7. Ces électrons sont cédés à un accepteur d'électron, qui est l'oxygène dans le cas d'une activité oxydase ou une molécule organique dans le cas d'une activité déshydrogénase

**Tableau 1 Annexe 1 : Tableau récapitulatif sur les LPMO et leur activité (à partir des données de Vandhana *et al.* (2022))**

Famille et sous-familles	Substrat connu	Règne ou domaine d'origine	Séquences téléchargées *	Enzymes caractérisées *
AA9	Cellulose ou polymère avec un squelette glucane lié $\beta$ -(1,4)	Champignons	889	34
AA10	Chitine et/ou cellulose	Bactéries (97%) Virus (2,9%) Archées (0.1%) Champignons (0.1%)	8099	32
AA11	Chitine	Champignons	242	1
AA13	Substances amidonnées	Champignons	34	4
AA14	Hétéroxylane	Champignons	49	2
AA15	Chitine et/ou cellulose	Virus (14.5 %) Eucaryotes (algues, oomycètes...) (85.5%)	324	3
AA16	Cellulose	Champignons Oomycètes	74	1
AA17	Pectine	Oomycètes	424	3

- Les données des deux dernières colonnes ont été obtenue à partir de la base de données CAZY

## Annexe 2 ; Matériels et méthodes

Composition milieu Array ((Wallen *et al.*, 2021)

- Solution de sel de Holliday : 6,25 % (voir **tableau 2 annexe 2**)
- Sulfate d'ammonium : 50 mM
- Substrat

Pour le suivi cinétique sur maltose : Maltose 2 %

Pour la production de sécrétome :

- Milieu « Chitine » : 1,5% d' $\alpha$  – chitine + 0,25 % de maltose
- Milieu « Biomasse. » ; 1,5 % de biomasse lyophilisée et broyée+ 0,25% de maltose
- Milieu « Maltose » : 2 % de maltose

**Tableau 2 annexe 2 : Composition de la solution de sel de Holliday**

Réactifs	Quantité
Nitrate d'ammonium	24 g
Chlorure de potassium	8 g
Sulfate de magnésium (7 H <sub>2</sub> O)	2 g
Chlorure de calcium	1 g
Élément trace	8 ml
H <sub>2</sub> O qsp	2 L
<b>Composition solution d'éléments trace (à conserver à + 4 °C)</b>	
Acide borique	30 mg
Chlorure de manganèse	70 mg
Chlorure de zinc	200 mg
Molybdate de sodium	20 mg
Chlorure ferrique	50 mg
Sulfate de cuivre	200 mg
H <sub>2</sub> O qsp	500 mL

**Tableau 3 annexe 2 : Composition du milieu Basal Salt pour la production de la AA10 d'*U. maydis* en bioréacteur**

<b>Réactifs</b>	<b>Quantité en g pour 400 mL de milieu</b>
<b>Sulfate de calcium dihydraté (CaSO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O)</b>	0,372 g
<b>Chlorure de potassium (KCl)</b>	3,08 g
<b>Sulfate de magnésium ((MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O)</b>	5,96 g
<b>Hydroxyde de potassium (KOH)</b>	1,652 g
<b>Glycérol</b>	16 g
<b>H<sub>2</sub>O distillée</b>	300 mL
<b>Acide orthophosphorique 85%</b>	10,68 mL
<b>Mettre sous agitation et laisser dissoudre un certain temps</b>	
<b>H<sub>2</sub>O distillée qsp</b>	400 mL

### Annexe 3 : Résultats

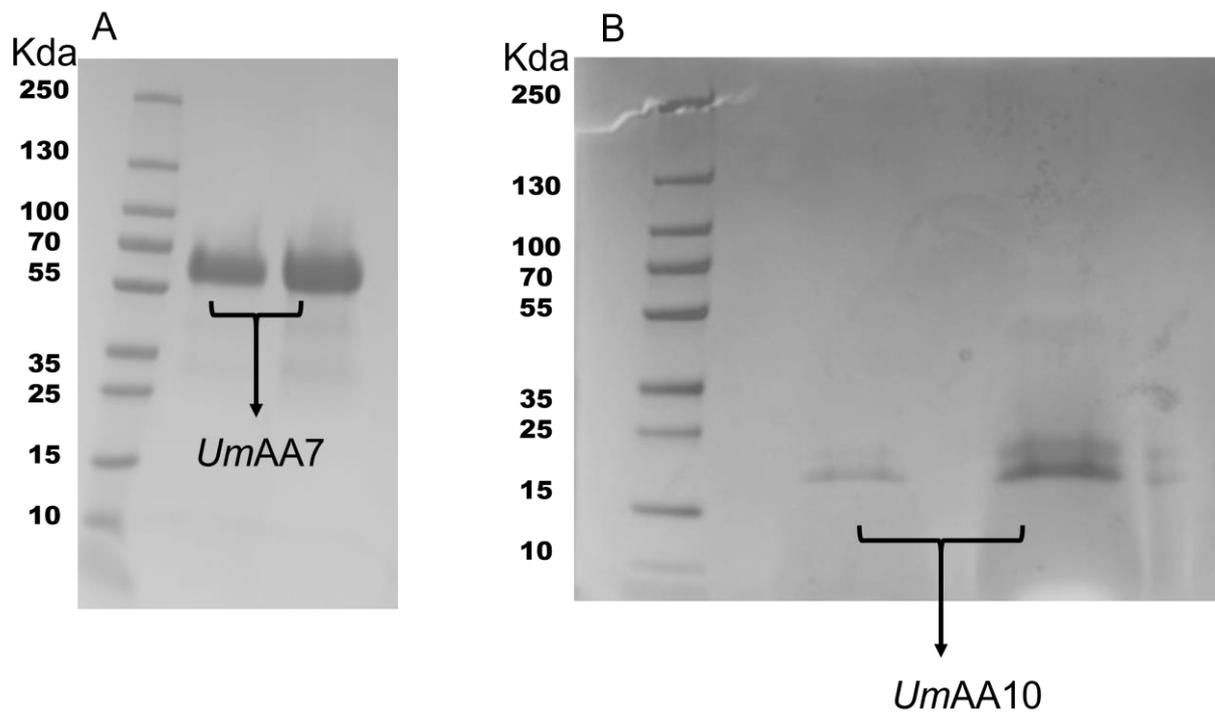


Figure 2 annexe 3 : Profil de migration électrophorétique de la AA7 (panel A) et de la AA10 (panel B) d'*U. maydis*.

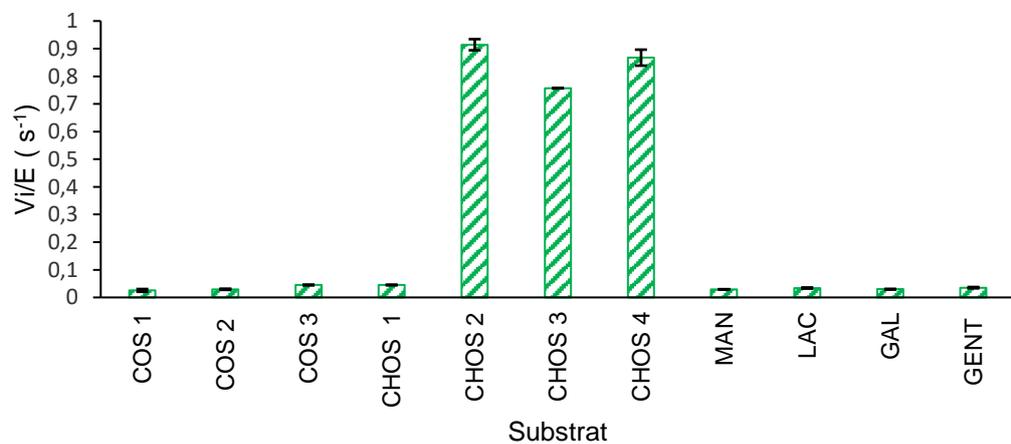
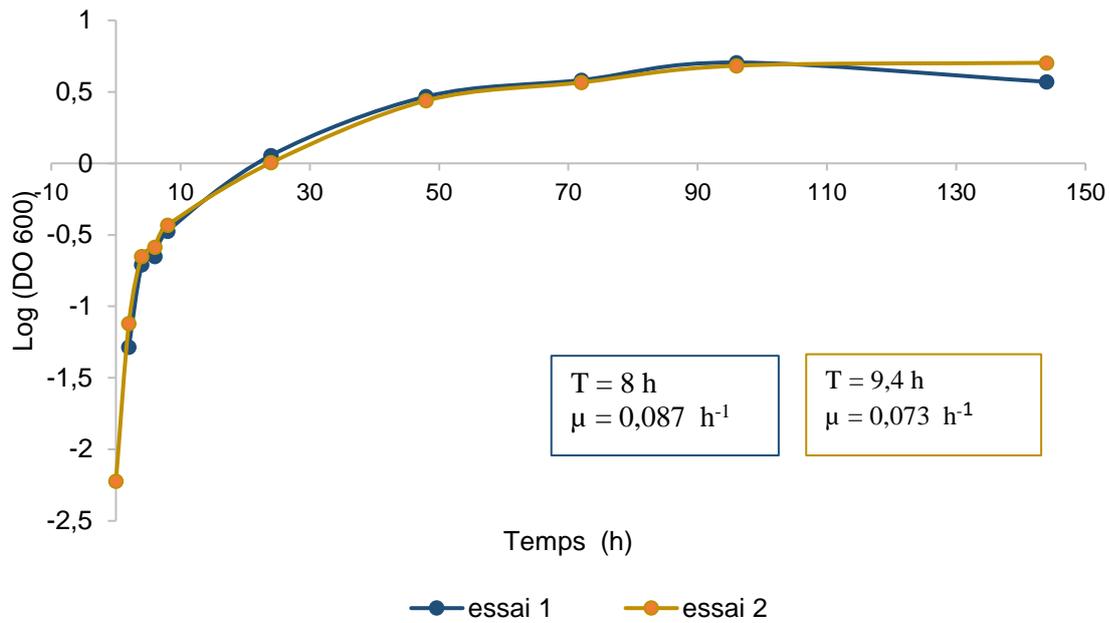


Figure 3 annexe 3 : Spécificité de substrat de la AA7 d'*U. maydis*.

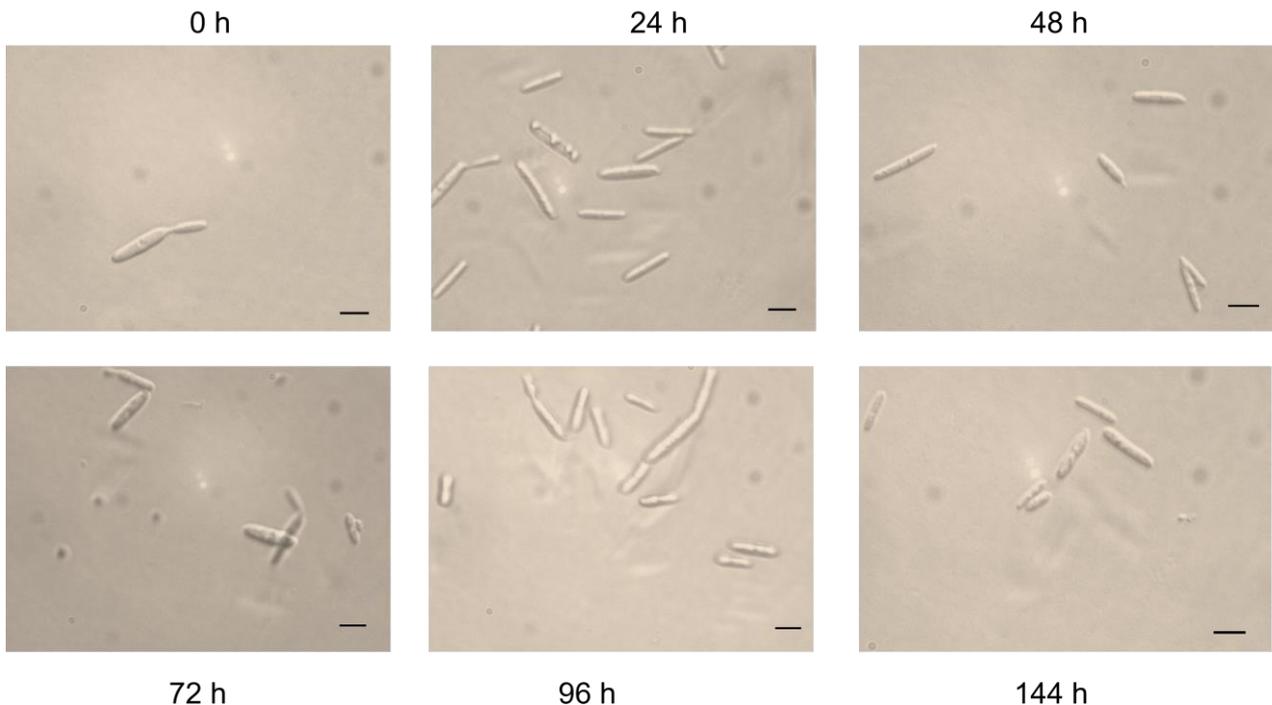
Cette spécificité a été étudiée en exploitant l'activité déshydrogénase de l'enzyme (DCIP comme accepteur d'électron à 200  $\mu$ M). Les mesures ont été réalisées en microplaque en présence de 100 nM d'enzyme.



**Figure 4 annexe 3 : Représentation logarithmique de la cinétique de croissance sur maltose d’*Ustilago maydis* au cours du temps.**

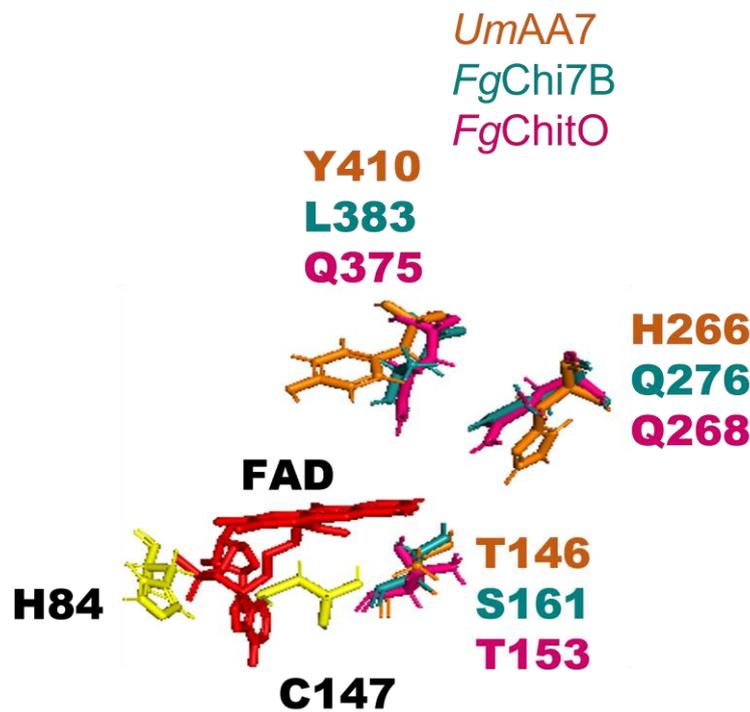
$T$  : temps de génération ( $T = \frac{\text{Log}(2)}{\alpha}$ )

$\mu$  : Taux de croissance spécifique ( $\mu = \frac{\alpha}{2.303}$ ) avec  $\alpha$  correspondant à la pente de la droite représentant la phase exponentielle (entre 4 h et 24 h)



**Figure 5 annexe 3 : Evolution morphologique d’*Ustilago maydis* au cours du temps.** Les cellules sont cultivées en milieu minimum liquide (Milieu Array) avec le maltose comme source de carbone. Le trait d’échelle correspond à 40  $\mu\text{m}$ .

## Annexe 4 : Discussion



**Figure 6 annexe 4 : structure 3D des résidus du site actifs de quelques AA7.**

La structure de UmAA7 est une prédiction de structure fournie par le logiciel de modélisation de structure en ligne Robetta. Les résidus en jaunes représentent les résidus de la UmAA7 en contact avec le FAD. Les résidus de la UmAA7 se liant au substrat (en orange) sont superposés à ceux de deux AA7 de *Fusarium graminearum* (FgChi7B et Fg ChitO) actives sur les chitooligosaccharides. L'on remarque aisément que sur les trois résidus de UmAA7, deux résidus prédits ne ressemblent à aucun des résidus des AAT de *Fusarium graminearum*.

## Convention de stage n° 88198 entre

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

<b>1 - L'ÉTABLISSEMENT D'ENSEIGNEMENT ou DE FORMATION</b>	<b>2 - L'ORGANISME D'ACCUEIL</b>
<p><b>Nom :</b> Université de Lorraine  <b>Adresse :</b> CS 25233 54052 Nancy  <b>Tél :</b>  <b>Représenté par (signataire de la convention) :</b>            Stéphane FLAMENT  <b>Qualité du représentant :</b> Doyen de la Faculté des Sciences et Technologies  <b>Composante/UFR :</b> MASTER MICROBIOLOGIE - M2  <b>Adresse (si différente de celle de l'établissement) :</b> Campus Aiguillettes - BP 70239 54506 VANDOEUVRE-LES-NANCY CEDEX  <b>Tél :</b> 03 72 74 51 39  <b>Mél :</b></p>	<p><b>Nom :</b> INRA PACA  <b>Adresse :</b> 228, route de l'Aerodrome Domaine Saint Paul Site Agroparc 84914 AVIGNON FRANCE  <b>Représenté par (nom du signataire de la convention) :</b>            Mr NABOT Jean-Philippe  <b>Qualité du représentant :</b> Directeur du Centre INRAE PACA  <b>Service dans lequel le stage sera effectué :</b>            BBF INRAE - UMR1163  <b>Tél :</b> 0432722000  <b>Mél :</b>  <b>Lieu du stage (si différent de l'adresse de l'organisme) :</b> Cp925 163 AVENUE DE LUMINY 13288 MARSEILLE 09EME FRANCE</p>

<b>3 - LE STAGIAIRE</b>
<p><b>Nom :</b> YAO      <b>Prénom :</b> Roseline Assiah      <b>Sexe :</b> F      <b>Né(e) le :</b> 16/01/1996      <b>Numéro d'étudiant :</b> 32026146  <b>Adresse :</b> 39 BOULEVARD MARÉCHAL LYAUTEY VILLERS - LES -NANCY 54600 VILLERS-LES-NANCY FRANCE  <b>Tél :</b> 0779292966      <b>Portable :</b> 0779292966      <b>Mél :</b> roseline-assiah.yao7@etu.univ-lorraine.fr  <b>INTITULÉ DE LA FORMATION OU CURSUS SUIVI DANS L'ÉTABLISSEMENT D'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET VOLUME HORAIRE (ANNUEL OU SEMESTRIEL) :</b>            M2-Microbiologie (NANCY) (FI)  <b>Nombre d'heures de formation :</b> Plus de 200 heures.</p>

<p><b>SUJET DE STAGE :</b> Etude d'enzymes fongiques actives sur les polysaccharides de parois  <b>Dates :</b> du 10/01/2022 au 09/07/2022  <b>Correspondant à 924 heures de présence effective dans l'organisme d'accueil et représentant une durée totale de 6 mois 0 jour(s) et 0 heure(s)</b>  <b>Commentaire :</b> 127 jours de travail, à raison de 7 heures de travail par jour</p>
--

<b>Encadrement du stagiaire par l'établissement d'enseignement</b>	<b>Encadrement du stagiaire par l'organisme d'accueil</b>
<p><b>Nom et prénom de l'enseignant référent :</b>            JORAND Frédéric  <b>Tél :</b> +33 3 72 74 72 14  <b>Mél :</b> frederic.jorand@univ-lorraine.fr</p>	<p><b>Nom et prénom du tuteur de stage :</b>            BERRIN Jean-Guy  <b>Fonction :</b> Directeur de recherche  <b>Tél :</b>  <b>Mél :</b> jean-guy.berrin@inrae.fr</p>

<p>Caisse Primaire d'Assurance Maladie à contacter en cas d'accident (lieu de domicile de l'étudiant sauf exception) :</p>
--

Vu le code de la santé publique notamment ses articles L. 3131-1 et suivants ;  
Vu le code de l'éducation, notamment ses articles L. 124-1 à L. 124-20, L. 612-11 et D. 124-1 à D. 124-9 ; D714-21 et suivants ;  
Vu le code de la sécurité sociale et notamment les articles L. 242-4-1, L. 412-8 et D. 242-2-1 ;  
Vu le code du travail et notamment ses articles L. 1221-13 et D. 1221-23 et suivants ;  
Vu le Décret n° 2020-1257 du 14 octobre 2020 déclarant l'état d'urgence sanitaire  
Vu le PROTOCOLE NATIONAL POUR ASSURER LA SANTÉ ET LA SÉCURITÉ DES SALARIÉS FACE À L'ÉPIDÉMIE DE COVID-19 du 29 octobre 2020

Préalable :

**Stages en France :** Compte-tenu des circonstances exceptionnelles dues à la pandémie de Covid 19, il est entendu entre les parties qu'elles auront vérifié au préalable que les missions confiées au stagiaire se prêtent à un travail en présentiel et/ou à distance et qu'il dispose du matériel adéquat.

Les tuteurs vérifient la possibilité d'utilisation par les parties d'outils de communication adéquats.

Le stage ne pourra être réalisé en présentiel que dans le strict respect du protocole national du 31 août 2020 et de toute disposition hygiène, sécurité et santé applicable à l'organisme d'accueil.

Il est entendu entre les parties qu'en cas de confinement total, le stage basculera automatiquement en stage à distance ou fera l'objet d'une suspension par avenant en cas d'impossibilité de stage à distance.

Les stages des étudiants des filières médicales et paramédicales font l'objet de dispositions spécifiques.

Une visite médicale sera automatiquement organisée pour tous les étudiants exposés à un risque pendant leur stage.

Contact de la médecine préventive : \_\_\_\_\_

**Stages à l'étranger :** Compte-tenu des circonstances exceptionnelles dues à la pandémie de Covid 19, il est entendu entre les parties qu'elles auront vérifié au préalable que :

- Si le stage a lieu en présentiel, une assurance spécifique rapatriement est contractée par le stagiaire pour le retour, en cas de confinement ou d'autres circonstances rendant impossible la poursuite du stage.
- Les missions confiées au stagiaire se prêtent à un travail en présentiel et/ou à distance et qu'il dispose du matériel adéquat.

Les tuteurs vérifient la possibilité d'utilisation par les parties d'outils de communication adéquats.

Le stage ne pourra être réalisé en présentiel que dans le strict respect de toute disposition hygiène, sécurité et santé applicable à l'organisme d'accueil.

Il est entendu entre les parties qu'en cas de confinement, le stage basculera automatiquement en stage à distance ou fera l'objet d'une suspension par avenant en cas d'impossibilité de stage à distance, en complément des modalités de rapatriement.

Le stagiaire s'engage sur l'honneur par la présente à se signaler avant son départ sur ARIANE : <https://pastel.diplomatie.gouv.fr/fildariane/dyn/public/login.html>

Le stagiaire atteint du Covid19 pendant son stage devra respecter les conditions prescrites dans le pays d'accueil, notamment en termes de quarantaine. L'établissement d'enseignement ne pourra pas être tenu de rapatrier le stagiaire.

Une visite médicale sera automatiquement organisée pour tous les étudiants exposés à un risque pendant leur stage.

Contact de la médecine préventive : \_\_\_\_\_

Contact en cas d'urgence : (autre que le stagiaire) : \_\_\_\_\_

### Article 1 - Objet de la convention

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

### Article 2 - Objectif du stage

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

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

#### ACTIVITÉS CONFIEES :

Travail en laboratoire et présentation des résultats à l'oral et à l'écrit.

#### Compétences à acquérir ou à développer :

Biologie moléculaire, biochimie, enzymologie, mycologie

### Article 3 - Modalités du stage

La durée hebdomadaire de présence du stagiaire dans le lieu désigné dans l'entête sera de **35.00** heures sur la base d'un **Temps Plein**.

Il est interdit de confier au stagiaire des tâches dangereuses pour sa santé ou sa sécurité.

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

### Article 4 - Accueil et encadrement du stagiaire

Le stagiaire est suivi par l'enseignant référent désigné dans la présente convention ainsi que par le service de l'établissement en charge des stages.

Le tuteur de stage désigné par l'organisme d'accueil dans la présente convention est chargé d'assurer le suivi du stagiaire et d'optimiser les conditions de réalisation du stage conformément aux stipulations pédagogiques définies.

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

#### Suivi hebdomadaire

Si les conditions sanitaires le permettent : d'une part, le stagiaire est autorisé à revenir dans son établissement d'enseignement pendant la durée du stage pour y suivre des cours demandés explicitement par le programme, ou pour participer à des réunions (les dates sont portées à la connaissance de l'organisme d'accueil par l'établissement), d'autre part, l'organisme d'accueil peut autoriser le stagiaire à se déplacer, sauf pour les stages à l'étranger.

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

### Article 5 - Gratification - Avantages

En France, lorsque la durée du stage est supérieure à 308 heures consécutives ou non, celui-ci fait obligatoirement l'objet d'une gratification, sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises et pour les stages relevant de l'article L4381-1 du code de la santé publique.

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

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

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

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

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

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

LE MONTANT DE LA GRATIFICATION est fixé à **3.90** euros Net par heure.

Modalités de versement de la gratification : **Virement bancaire**

### **Article 5 bis - STAGES EN FRANCE Accès aux droits des salariés - Avantages**

(Organisme de droit privé en France sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises) :

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

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

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

L'organisme d'accueil s'engage à respecter toute directive sanitaire nationale ou sectorielle.

### **Article 5ter - STAGES EN FRANCE Accès aux droits des agents - Avantages**

(Organisme de droit public en France sauf en cas de règles particulières applicables dans certaines collectivités d'outre-mer françaises) :

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

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

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

AUTRES AVANTAGES ACCORDÉS (associés à l'article 5bis ou 5ter selon le statut public ou privé de l'organisme d'accueil) :

Aucun

### **Article 6 - Régime de protection sociale (maladie et accidents)**

Pendant la durée du stage, le stagiaire reste affilié à son régime de Sécurité sociale antérieur. Il doit impérativement vérifier ses conditions de couverture maladie et fournir une attestation de couverture à son établissement d'enseignement au moment de la signature de la convention de stage et dans tous les cas avant le départ.

#### **6.1 - Gratification d'un montant maximum de 15% du plafond horaire de la Sécurité sociale - protection par la France (voir conditions article 6.4):**

La gratification n'est pas soumise à cotisation sociale conformément aux termes de l'article R412-4 du code de la Sécurité sociale.

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

En cas d'accident ou de maladie professionnelle survenant au stagiaire soit au cours d'activités dans l'organisme, soit au cours du trajet, soit sur les lieux rendus utiles pour les besoins du stage et pour les étudiants en médecine, en chirurgie dentaire ou en pharmacie qui n'ont pas un statut hospitalier pendant le stage effectué dans les conditions prévues au b du 2e de l'article L.412-8 du code de la sécurité sociale, l'organisme d'accueil envoie la déclaration à la Caisse Primaire d'Assurance Maladie ou la caisse compétente (voir adresse en page 1) en mentionnant l'établissement d'enseignement comme employeur, avec copie à l'établissement d'enseignement.

#### **6.2 - Gratification supérieure à 15 % du plafond horaire de la Sécurité sociale : LE STAGIAIRE N'EST PAS COUVERT PAR LA FRANCE POUR LES STAGES A L'ETRANGER AVEC GRATIFICATION SUPERIEURE AU PLAFOND LEGAL**

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

L'étudiant bénéficie de la couverture légale en application des dispositions des articles L.411-1 et suivants et de l'article R412-4 du code de la Sécurité sociale.

En cas d'accident survenant au stagiaire soit au cours des activités dans l'organisme, soit au cours du trajet, soit sur des lieux rendus utiles pour les besoins de son stage, l'organisme d'accueil effectue toutes les démarches nécessaires auprès de la Caisse Primaire d'Assurance Maladie et informe l'établissement dans les meilleurs délais.

#### **6.3 - Protection maladie du stagiaire à l'étranger :**

##### **1) Protection issue du régime français**

- pour les stages au sein de l'Espace Economique Européen (EEE) effectués par les étudiant(e)s de nationalité d'un pays membre de l'Union Européenne, l'étudiant doit demander la Carte Européenne d'Assurance Maladie (CEAM).

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

Dans tous les autres cas de figure:

Les stagiaires qui engagent des frais de santé à l'étranger peuvent être remboursés auprès de la mutuelle qui leur tient lieu de Caisse de Sécurité Sociale Étudiante, au retour et sur présentation des justificatifs : le remboursement s'effectue alors sur la base des tarifs de soins français, des écarts importants peuvent exister. Il est donc fortement recommandé au stagiaire de souscrire une assurance maladie complémentaire spécifique, valable pour le pays et la durée du stage, auprès de l'organisme d'assurance de son choix (mutuelle étudiante, mutuelle des parents, compagnie privée ad hoc...). Exception : si l'organisme d'accueil fournit au stagiaire une couverture Maladie en vertu des dispositions du droit local (voir 2 ci-dessous), alors le stagiaire peut choisir de bénéficier de cette protection Maladie locale. Avant d'effectuer un tel choix, il vérifiera l'étendue des garanties proposées.

##### **2) Protection issue de l'organisme d'accueil**

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

**OUI** (celle-ci s'ajoute au maintien, à l'étranger, des droits issus du régime français)

**NON** (la protection découle alors exclusivement du maintien, à l'étranger, des droits issus du régime français)

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

#### 6.4 - Protection Accident du Travail du stagiaire à l'étranger

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

- être d'une durée au plus égale à 12 mois
- ne donner lieu à aucune rémunération susceptible d'ouvrir des droits à une protection accident de travail dans le pays étranger
- se dérouler exclusivement dans l'organisme d'accueil partie à la présente convention
- se dérouler exclusivement dans le pays étranger cité.

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

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

3) La couverture concerne les accidents survenus :

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

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

5) Dans tous les cas :

- si l'étudiant est victime d'un accident de travail durant le stage, l'organisme d'accueil doit impérativement signaler immédiatement cet accident à l'établissement d'enseignement ;
- si l'étudiant remplit des missions limitées en dehors de l'organisme d'accueil ou en dehors du pays du stage, l'organisme d'accueil doit prendre toutes les dispositions nécessaires pour lui fournir les assurances appropriées.

#### Article 7 - Responsabilité et assurance

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

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

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

#### Article 8 - Discipline

Le stagiaire est soumis à la discipline et aux clauses du règlement intérieur qui lui sont applicables et qui sont portées à sa connaissance avant le début du stage, notamment en ce qui concerne les horaires et les règles d'hygiène et de sécurité en vigueur dans l'organisme d'accueil. Le stagiaire s'engage à signaler tout dysfonctionnement en termes d'hygiène et de sécurité à son organisme d'accueil ET à son établissement d'enseignement supérieur.

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

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

#### Article 9 - Congés - Interruption du stage

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

Pour les stages dont la durée est supérieure à deux mois et dans la limite de la durée maximale de 6 mois, des congés ou autorisations d'absence sont possibles: **2,5 jours par mois de stage**

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

Toute interruption du stage, est signalée aux autres parties à la convention et à l'enseignant référent. Une modalité de validation est mise en place le cas échéant par l'établissement. En cas d'accord des parties à la convention, un report de la fin du stage est possible afin de permettre la réalisation de la durée totale du stage prévue initialement. Ce report fera l'objet d'un avenant à la convention de stage. Un avenant à la convention pourra être établi en cas de prolongation du stage sur demande conjointe de l'organisme d'accueil et du stagiaire, dans le respect de la durée maximale du stage fixée par la loi (924 heures).

#### Article 10 - Devoir de réserve et confidentialité

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

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

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

#### Article 11 - Propriété intellectuelle

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

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

#### Article 12 - Fin de stage - Rapport - Evaluation

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

2) Qualité du stage : à l'issue du stage, les parties à la présente convention sont invitées à formuler une appréciation sur la qualité du stage. Le stagiaire transmet au service compétent de l'établissement d'enseignement un document dans lequel il évalue la qualité de l'accueil dont il a bénéficié au sein de l'organisme d'accueil. Ce document n'est pas pris en compte dans son évaluation ou dans l'obtention du diplôme ou de la certification.

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

4) Modalités d'évaluation pédagogiques : Rapport de Stage, Rapport et soutenance  
**NOMBRE D'ECTS (le cas échéant) : 30.00**

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

#### Article 13 - Droit applicable - Tribunaux compétents

La présente convention est régie exclusivement par le droit français.

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

FAIT À Angnon le 19/11/2021

**COLLEGIUM SCIENCES ET TECHNOLOGIES**  
**POUR L'ÉTABLISSEMENT D'ENSEIGNEMENT**  
Le Doyen,  
Viseur du centre, par délégation, **Stéphane FLAMENT**

**POUR L'ORGANISME D'ACCUEIL**  
**Jean-Philippe NABOT**

**STAGIAIRE (ou son représentant légal le cas échéant)**  
**Roseline Assiah YAO**

Par délégation,  
**Valérie RIVIERE**  
Directrice Adjointe des Services d'Appui  
du Centre de Recherche INRAE  
Provence-Alpes-Côte d'Azur

**L'enseignant référent du stagiaire**

**Frédéric JORAND**

Pr  
**Frédéric  
JORAND**

Signature numérique de Pr  
Frédéric JORAND  
DN : cn=Pr Frédéric JORAND,  
o=Université de Lorraine,  
ou=LCPME - Faculté de  
Pharmacie,  
email=fredERIC.jorand@univ-  
lorraine.fr, c=FR  
Date : 2021.11.29 21:54:18  
+0100

**Le tuteur de stage de l'organisme d'accueil**

**Jean-Guy BERRIN**

Fiches à annexer à la convention : 1) Attestation de stage / 2) Fiche de stage à l'étranger (pour informations sécurité sociale voir site cleiss.fr - pour fiche pays voir site diplomatie.gouv.fr) / 3) Autres annexes (le cas échéant)

## Résumé

*Ustilago maydis* est un champignon basidiomycète, pathogène du maïs et étudié comme modèle pour la compréhension de nombreux processus biologiques. Au cours de son cycle de vie, notamment du cycle infectieux, ce champignon dimorphique, à l'image de nombreux champignons filamenteux remodèle sa paroi principalement constituée de polysaccharides par des processus enzymatiques peu connus. Deux oxydoréductases prédites comme actives sur la chitine, élément de la paroi fongique, présentent une surexpression de leurs gènes lors du cycle infectieux, pendant la différenciation cellulaire : il s'agit de la seule AA7 et de la seule « lytic polysaccharides monooxygenases » (LPMO) de ce champignon. Nos travaux ont consisté à réaliser une caractérisation préliminaire de ces deux enzymes. Ces enzymes ont été produites avec succès et ont démontré leur activité sur la chitine pour la LPMO et les chitooligosaccharides pour la AA7. Par ailleurs, l'analyse des sécrétomes d'*Ustilago maydis*, induits par des constituants de la paroi fongique a permis la mise en évidence de ces enzymes, renforçant l'hypothèse de leur rôle dans les processus enzymatiques de remodelage de la paroi fongique

Mots clés : *Ustilago maydis*, LPMO, AA7, polysaccharides, paroi fongique

## Abstract

*Ustilago maydis* is a basidiomycete fungus, a pathogenic of maize and studied as a model for many biological processes. During its life cycle, especially the infectious cycle, this dimorphic fungus, like many filamentous fungi, modifies its cell wall, mainly composed of polysaccharides, by enzymatic processes. But very little is known about these processes. Two oxidoreductases predicted to be active on chitin, a fungal cell wall component, are up regulated during the infectious cycle, especially during cell differentiation: these are the only AA7 and the only lytic polysaccharides monooxygenases (LPMO) of *Ustilago maydis*. My work consisted in a preliminary characterization of these two enzymes. These enzymes were successfully produced and shown their activity on chitin for LPMO and chitooligosaccharides for *UmAA7*. Moreover, the analysis of *Ustilago maydis* secretomes induced by fungal cell wall components allowed the identification of these enzymes, reinforcing the hypothesis of their role in the enzymatic processes of fungal cell wall remodeling.

Key words: *Ustilago maydis*, LPMO, AA7, polysaccharides, fungal cell wall