

Rôle de la voie de signalisation MAP kinase Mps1 dans la pathogénie fongique et dans le contrôle de l'intégrité de la paroi

Cemile Ant

► To cite this version:

Cemile Ant. Rôle de la voie de signalisation MAP kinase Mps1 dans la pathogénie fongique et dans le contrôle de l'intégrité de la paroi. Biologie végétale. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENV006 . tel-00603704

HAL Id: tel-00603704 https://theses.hal.science/tel-00603704

Submitted on 27 Jun 2011

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 GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : Biologie Végétale

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Cemile Ant

Thèse dirigée par **Christelle Breton** et codirigée par **Marc-Henri Lebrun**

préparée au sein du Laboratoire CNRS/Bayer CropScience... dans l'École Doctorale Chimie et Science des vivants

ROLE DE LA VOIE DE SIGNALISATION MAP KINASE MPS1 DANS LA PATHOGENIE FONGIQUE ET DANS LE CONTRÖLE DE L'INTEGRITE DE LA PAROI

Thèse soutenue publiquement le **21 mars 2011**, devant le jury composé de :

Mme Breton Christelle
Profefesseur, CERMAV, (Directeur de thèse)
M Lebrun Marc-Henri
DR, CNRS, (Co-Directeur de thèse)
M Silar Philippe
Professeur Institut de Génétique et Microbiologie UMR 8621, (Président)
M Gay Gilles
Professeur, Université Claude Bernard(Rapporteur)
M Jean-Marie François
Professeur, Institue de Biotechnologie-Bioprocédés UMS-CNRS 5504 (Rapporteur)
M Beffa Rolland
Senior Scientific Manager, Bayer CropScience, (Membre)



Je dédie cette thèse

A Eric BERNANOSE : Un être rare qui méritait de vivre plus pour changer le monde et le rendre plus doux, plus gentil, plus vivable.

A Sabahat ANT, Nene : Ma grand-mère exceptionnelle qui m'a appris à aider, à sourire, à faire le chat, à écouter, à chanter ... Une grand-mère qui vivait au-dessus de son époque, une grand-mère qui ne sera jamais oubliée...

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier, tout d'abord, Dominique Job et Nathalie Poussereau, de m'avoir accepté dans le laboratoire mixte. Je remercie également Rolland Beffa, de m'avoir donné la chance d'effectuer ma thèse au sein du laboratoire mixte CNRS/Bayer CropScience, ainsi que de m'avoir soutenue tout au long de cette dernière.

Je souhaite particulièrement remercier Marc-Henri, mon directeur de thèse, pour m'avoir donné la chance d'effectuer une thèse, de m'avoir tant appris sur les champignons. Je voudrais surtout le remercier pour nos nombreuses discussions scientifiques qui m'ont toujours donné l'envie de faire plus. Je le remercie d'avoir partagé ses connaissances scientifiques avec moi et surtout de s'être autant rendu disponible, malgré son emploi du temps chargé.

Je remercie également Catherine Sirven et Anne Lapartient pour leur aide en bioinformatique.

Un grand merci, à Marie-Josephe Gagey, ma maman française du laboratoire, qui m'a aidée, scientifiquement et moralement, tout au long de ma thèse. Sans elle, cette thèse ne serait pas ce qu'elle est.

Je ne voudrais surtout pas oublier mes stagiaires, Christelle Bonnet, Carine Chantreuil et Sébastien Bruisson, pour leur travail ainsi que pour leur bonne humeur durant leurs stages.

Je voudrais dire merci à toutes les personnes du laboratoire, pour leur aide et leur présence.

A tous mes amis, qui m'ont soutenu durant ma thèse : Merci pour tout. Merci de m'avoir soutenue durant ces quatre années, merci de m'avoir écoutée parler de ma thèse pendant de longues heures, merci de m'avoir donné le courage et le sourire même pendant les moments les plus difficiles et surtout, merci d'avoir cru en moi et de m'avoir motivée dans l'aboutissement de cette thèse.

Enfin, le plus grand merci est pour ma famille, qui m'a soutenue durant toutes mes études. Je tiens surtout à remercier ma sœur, qui ne croit toujours pas que j'ai grandi et pour qui je resterai toujours sa petite sœur: Sa présence, sa compréhension, ses coups de pouce pour me remettre sur le droit chemin, ses conseils et tout simplement, je la remercie d'être ma sœur.

Beni hayata getiren, yanlarinda olmami ne kadar isteseler bile, okumam icin, beni, Fransa'ya gonderen, ogrenimin boyunca hep yanimda olan ve en onemlisi bana hayati ogreten anne ve baba, TESEKKURLER.

SOMMAIRES

I. I	INTRODUCTION	1 - 32
1.	La paroi cellulaire	3
	1.1. Ses rôles	3
	1.2. Chez le modèle <i>Saccaromycètes cerevisiae</i>	5
	1.3. Chez les champignons	5
	1.4. Ses composants	7
2.	Voies de signalisation utilisant des MAP kinases	9
	2.1. Introduction	9
	2.1.1. Phosphorylation, modification permettant une signalisation	10
	2.1.2. Détection des signaux	10
	2.2. Chez les mammifères	13
	2.3. Chez les champignons	15
	2.3.1. Chez la levure <i>S. cerevisia</i>	15
	2.3.2. Chez les champignons filamenteux	16
3.	Voies de signalisation impliquées dans le contrôle de l'intégrité cellulaire et pariétale	17
	3.1. Voie de signalisation Slt2 chez la levure <i>S. cerevisiae</i>	17
	3.2 . Les facteurs de transcriptions, Cibles de <i>SLT2</i>	18
	3.2.1. Les facteurs de transcription	18
	3.2.2. SBF Complexe : Swi4 – Swi6	18
	3.2.3. RLM1	20
	3.3. Cascade de Calcineurine et sa Cible directe CRZ1	20
	3.3.1. Calcineurine	20
	3.3.2. CRZ1	21
	3.4. Knr4	22
4.	Mode d'action des inhibiteurs agissant sur la paroi cellulaire	25
	4.1. Inhibiteurs altérants la paroi	25
	4.2. Inhibiteurs inhibant la biosynthèse des composants de la paroi	26
5.	Magnaporthe grisea, un modèle pour l'étude des cascades de signalisation MAP kinas	es 27
	5.1. Systématique de <i>Magnaporthe grisea</i>	27
	5.2. Pyriculariose du Riz	28
	5.2.1. Méthodes de Lutte	28
	5.3 . Cascades de signalisation MAP kinase de <i>Magnaporthe grisea</i>	29
	5.3.1. Les trois voies de MAPK impliquées dans la cascade de signalisation	30
	5.3.1.1 . PMK1	30
	5.3.1.2. OSM1	30
	5.3.1.3. MPS1	31

5.4. Voies de signalisation impliquées dans le contrôle de l'intégrité pariétale	31
5.4.1. Mps1	32
5.4.2. Crz1	32
Projet de la thèse	33
II. Matériels et Méthodes	34 - 51
1. Matériels	34
1.1. Matériel fongique	34
1.2. Cultivars de riz et d'orge	34
1.3. Plasmides	34
1.4. Souches bactériennes	34
1.5. Amorces pour PCR	35
1.6. Amorces pour qPCR	38
2. Méthodes Bio-informatiques	39
2.1. Séquençage de l'ADN	39
2.2. Analyse des séquences	39
2.3. Alignements des séquences et Arbres phylogéniques	40
3. Méthodes de Biologie Moléculaire	40
3.1 . Extraction de l'ADN génomique	40
3.2 . Amplification de l'ADN par PCR	40
3.3. Extraction d'ADN plasmidique	40
3.4. Digestion par des enzymes de restriction	41
3.5. Electrophorèse sur gel d'agarose	41
3.6 . Purification des fragments d'ADN	41
3.7. Ligation des fragments d'ADN	41
3.8 . Principe de ligation à trois voies	41
3.9. Principe de la PCR double joint	41
3.10. Transformation bactérienne	43
3.11.Southern Blot	43
3.11.1. Transfert d'ADN génomique sur membrane de nylon	43
3.11.2. Marquage de la sonde	43
3.11.3. Hybridation	44
3.11.4. Exposition et révélation de la membrane	44
3.12. Extraction des ARN totaux de champignon filamenteux	44
3.12.1. Préparation des échantillons	45
3.12.2 . Extraction des ARN totaux	45
3.13. Transcription Inverse	46
3.14. PCR quantitative	46
3.15. Analyse transcriptomique	46

	3.15.1 . Préparation et marquage de l'ARNa	46
	3.15.2 . Quantification des ARNa marqués	46
	3.15.3 . Hybridation et lavage des lames (format 22K)	46
	3.15.4 . Lecture des lames	47
	3.15.5 . Analyse des résult	47
	3.15.5.1. « Agilent feature extraction »	47
	3.15.5.2. <i>« GeneData Expressionnist Refiner Array »</i>	47
	3.15.5.3. « GeneData Expressionist Analyst »	47
4.	Méthodes de Biologie Cellulaire	47
	4.1. Conditions de culture	47
	4.2. Obtention et transformation des protoplastes	48
	4.3. Sélection secondaire des transformants	48
	4.4. Purification par monospores	48
	4.5. Conservation des mutants sur confettis	48
	4.6. Tests de pouvoir pathogène	49
	4.6.1. Sur plantes entières de riz et d'orge	49
	4.6.2. Sur feuilles d'orge en survie	49
	4.7. Cytologie	49
	4.7.1 . Développement d'appressoria sur membrane de Téflon	49
	4.7.2. Infection d'épiderme d'oignon	50
	4.7.3. Observation des hyphes de mycélium	50
	4.8. Tests avec des inhibiteurs	50
	4.8.1. Tests sur milieu gélosé	50
	4.8.2. Tests dans milieu liquide	50
[.	RESULTATS	49 - 97

III.	RESULTATS	49 - 9
1.	Etude de la MAP kinase Mps1 chez <i>M. grisea</i>	49
	1.1. Analyse bioinformatique de la MAP kinase, encodée par <i>MgMPS1</i>	49
	1.2. Construction de mutants nuls du gène <i>MgMPS1</i>	49
	1.2.1 . Obtention du mutant nul Δ <i>mps1</i> chez <i>M. grisea</i>	50
	1.3. Croissance, morphologie et sporulation du mutant de gène <i>MgMPS1</i>	50
	1.3.1. Morphologie du mycélium, croissance radiale et sporulation	
	des mutants <i>Δmps1</i> de <i>M. grisea</i>	51
	1.4. Altération des parois des mutants $\Delta mps1$	52
	1.5. Sensibilité des mutants <i>Amps1</i> aux inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi	53
	1.5.1. Mise au point de la mesure de la sensibilité du mutant $Guy11\Delta KU802$	1 <i>mps1</i>
	aux inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi	53
	1.5.1.1. Sensibilité de <i>M. grisea</i> aux inhibiteurs de la biosynthèse	

		de la paroi : Milieu gélosé	53
		1.5.1.1.1. Mise au point des mesures d'inhibition de croissance	
		sur milieu gélosé	53
		1.5.1.1.2. Sensibilité du mutant G <i>uy11ΔKU80Δmps1</i> aux inhibiteurs	
		de la biosynthèse de la paroi : Milieu gélosé	54
	1.5	5.1.2. Sensibilité de <i>M. grisea</i> aux inhibiteurs de la biosynthèse	
		de la paroi : Milieu liquide	55
		1.5.1.2.1. Mise au point des mesures d'inhibition en milieu liquide	55
		1.5.1.2.2 . Sensibilité du mutant G <i>uy11Δku80Δmps1</i> aux inhibiteurs de la	
		biosynthèse de la paroi : milieu liquide	57
	1.5.2.	Sensibilité de <i>M. grisea</i> à un mélange de fongicides d'aculéacine et	
		de nikkomycine	52
	1.6. Pouvo	pir pathogène du mutant Δ <i>mps1</i>	59
	1.6.1.	Pouvoir pathogène des mutants <i>∆mps1</i> pour l'orge	59
	1.6.2.	Pouvoir pathogène des mutants <i>∆mps1</i> pour le riz	60
	1.6.3.	Différentiation appressoriale du mutant $\Delta mps1$	60
	1.7. Concl	usion sur la caractérisation du mutant <i>Amps1</i> de <i>M. grisea</i>	61
	1.8. Utilisa	ation de mutants nuls conditionnels pour étudier les fonctions cellulaires	
	contrô	lées par <i>MgMPS1</i>	63
	1.8.1.	Principe de mutant conditionnel avec un promoteur pNia	63
	1.8.2.	Construction et caractérisation du mutant conditionnel pNia::Mps1	
	(chez le mutant <i>Guy11Δku80Δmps1</i>	63
	1.9. Utili:	sation des mutants avec un allèle de <i>MgMPS1</i> sensible à des inhibiteurs	
	spécifi	ques	65
	1.9.1.	Principe de mutants cible-spécifiques	65
	1.9.2.	Construction et caractérisation d'un allèle de MgMPS1 sensible à	
	des inł	nibiteurs spécifiques	65
2.	Etude des	facteurs de transcription Swi4, Swi6 et Rlm1 de <i>M. grisea</i>	67
	2.1. Rech	erche des gènes de <i>M. grisea</i> encodant les orthologues des gènes	
	enco	dant les facteurs de transcription Swi4, Swi6 et Rlm1 de la levure	67
	2.1.1.	Analyse bioinformatique du facteur de transcription MgSWI4	67
	2.1.2.	Analyse bioinformatique du facteur de transcription MgSWI6	67
	2. 1	.2.1. Comparaison des domaines fonctionnels de Swi4/Swi6	68
	2.1.3.	Analyse bioinformatique du facteur de transcription MADS box,	
		encodé par <i>MgRLM1</i>	68
	2.2. Const	ruction de mutants nuls des gènes <i>MgSWI4, MgSWI6</i> et <i>MgRLM1</i>	69
	2.2.1.	Obtention des mutants nuls <i>Guy11∆ku80∆swi4</i>	69
	2.2.2.	Obtention des mutants nuls <i>Guy11Δku80Δswi6</i>	69

	2.2.3.	Obtention des mutants nuls <i>Guy11Δku80Δrlm1</i>	70
	2.2.4.	Complémentation des mutants obtenus	70
	2.3 . Crois	ssance, morphologie et sporulation des mutants des gènes	
	MgS	<i>WI4, MgSWI6</i> et <i>MgRLM1</i>	70
	2.4. Altéra	ation des parois des mutants des gènes <i>MgSWI4, MgSWI6</i> et <i>MgRLM1</i>	71
	2.5 . Sensil	bilité des mutants nuls des gènes <i>MgSWI4, MgSWI6</i> et <i>MgRLM1</i>	
	aux inł	nibiteurs de la biosynthèse de la paroi	72
	2.5.1.	Sensibilité des mutants <i>P1.2Δku80Δswi4, Guy11Δku80Δswi6,</i>	
	C	<i>Guy11Δku80Δrlm1</i> au mélange d'aculéacine et de nikkomycine	72
	2.6 . Pouvo	oir pathogène des mutants nuls <i>MgMps1, MgSWI4, MgSWI6</i> et <i>MgRLM1</i>	73
	2.6.1.	Pouvoir pathogène des mutants <i>P1.2ΔkuU80Δswi4, Guy11ΔkuU80Δswi6</i>	
		et <i>Guy11ΔkuU80Δrlm1</i> pour l'orge	73
	2.6.2	. Pouvoir pathogène des mutants <i>P1.2ΔkuU80Δswi4, Guy11ΔkuU80Δswi6</i>	
		et <i>Guy11∆kuU80∆rlm1</i> pour le riz	73
	2.6.3	Différentiation appressoriale des mutants <i>P1.2ΔkuU80Δswi4,</i>	
		<i>Guy11∆kuU80∆swi6</i> et <i>Guy11∆kuU80∆rlm1</i>	74
3.	Etude du fa	acteur de transcription Crz1 chez <i>M.grisea</i>	75
	3.1. Etude	bioinformatique du gène de <i>M.grisea</i> encodant l'orthologue de <i>ScCRZ1</i>	75
	3.2. Const	ruction de mutants nuls du gène <i>MgCRZ1</i>	76
	3.3 . Croiss	sance, morphologie et sporulation du mutant nul <i>Guy11Δku80Δcrz1</i>	76
	3.4. Sensil	bilité des mutants nuls du gène <i>MgCRZ1</i> aux inhibiteurs	
	de la biosy	nthèse de la paroi	76
	3.4.1.	Altération de la paroi du mutant <i>Guy11Δku80Δcrz1</i>	76
	3.4.2.	Sensibilité du mutant <i>Guy11∆ku80∆crz1</i> au mélange d'aculéacine et	
		de nikkomycine	77
	3.5 . Pouvo	pir pathogène du mutant $\Delta crz1$	77
	3.5.1.	Pouvoir pathogène du mutant <i>Guy11∆ku80∆crz1</i> pour l'orge et le riz	77
	3.5.2.	Différentiation appressoriale du mutant $\Delta crz1$	78
4.	Etude du g	ène AGS1 dont l'expression est contrôlée par MPS1 chez M. grisea	79
	4.1 . Etude	bioinformatique du gène <i>AGS1</i> de <i>M. grisea</i>	79
	4.2. Const	ruction de mutants nuls du gène <i>MgAGS1</i>	80
	4.3. Croiss	sance, morphologie et sporulation du mutant nul <i>Guy11Δku80Δags1</i>	80
	4.4. Sensil	bilité des mutants nuls des gènes <i>MgAGS1</i> aux inhibiteurs	
	de la	biosynthèse de la paroi	81
	4.4.1	. Altération de la paroi du mutant nul <i>Guy11Δku80Δags1</i>	81
	4.4.2	. Sensibilité du mutant nul <i>Guy11∆ku80∆ags1</i> à un mélange	
		d'aculéacine et de nikkomycine	81
	4.5. Pouvo	pir pathogène du mutant $\Delta ags1$	82

	4.6. Conclusions sur le mutant $\Delta ags1$ de <i>M. grisea</i>	82
5	Etude du rôle du gène candidat <i>MgIDC1</i> orthologue de <i>PaIDC1</i> , dans la voie de	
	signalisation Mps1 chez <i>M. grisea</i>	84
	5.1 . Etude bioinformatique du gène de <i>M. grisea</i> encodant l'orthologue d' <i>IDC1</i> de	
	Podospora anserina	84
	5.2. Construction de mutants nuls de gène <i>MgIDC1</i>	84
	5.3. Croissance, morphologie et sporulation du mutants nul <i>Guy11Δku80Δidc1</i>	85
	5.4. Sensibilité du mutant nul du gène MgIDC1 aux inhibiteurs de la biosynthèse	
	de la paroi	85
	5.4.1. Altération de la paroi du mutant nul <i>Guy11Δku80Δidc1</i>	85
	5.4.2. Sensibilité du mutant nul <i>Guy11Δku80Δidc1</i> à un mélange	
	d'aculéacine et de nikkomycine	86
	5.5. Pouvoir pathogène du mutant $\Delta idc1$	86
	5.6. Conclusion sur le mutant $\Delta idc1$ chez <i>M. grisea</i>	87
6	Etude du gène candidat <i>MgADA2</i> orthologue de <i>ScADA2</i> et de son rôle dans la voie de	
	signalisation Mps1 de <i>M grisea</i>	88
	6.1. Etude bioinformatique du gène de <i>M. grisea</i> encodant l'orthologue d'ADA2	88
	6.2. Construction des mutants nuls du gène <i>MgADA2</i>	89
	6.3. Croissance, morphologie et sporulation du mutant nul <i>Guy11Δku80Δada2</i>	89
	6.4. Sensibilité du mutant nul du gène MgADA2 aux inhibiteurs de la biosynthèse	
	de la paroi	89
	6.5. Pouvoir pathogène du mutant $\Delta ada2$	90
	6.6. Conclusion sur le mutant $\Delta ada2$	90
7	. Etude du gène candidat <i>MgKNR4</i> orthologue de <i>ScKRN4</i> et de son rôle dans la voie de	
	signalisation Mps1 de <i>M grisea</i>	91
	7.1. Etude bioinformatique du gène de <i>M. grisea</i> encodant l'orthologue de <i>KNR4</i>	91
	7.2. Construction des mutants nuls du gène <i>MgKNR4</i>	91
	7.3. Conclusion sur le mutant $\Delta knr4$ chez <i>M. grisea</i>	92
8	Analyse des réseaux de régulation transcriptionelle contrôlés par MgMPS1	93
	8.1. Analyse de l'expression des gènes encodant les facteurs de transcriptions de la vo	ie
	de MAP kinase, Mps1	93
	8.1.1. Expression des gènes de l voie Mps1 au cours du développement ou de stre	SS
	chez <i>M. grisea</i>	93
	8.1.2. Analyse de l'expression des gènes candidats en présence de l'aculéacine	93
	8.2. Analyse des gènes candidats cibles de la voie Mps1	94
	8.2.1. Recherche des gènes candidats cibles de la voie Mps1	94
	8.2.2. Réponse transcriptionelle de <i>M. grisea</i> en réponse à l'aculéacine	95
IV.	DISCUSSION 98	3 - 113

1. Analyse bioinformatique de la voie MAP kinase Slt2/Mps1 chez les champignons	
ascomycètes et hémi-ascomycètes	98
2. Construction des mutants de délétion des gènes candidats de la voie de signalisation	
Mps1 chez M. grisea	100
3. Analyse phénotypique des mutants des gènes candidats de la voie de signalisation	
Mps1 chez <i>M. grisea</i> (Morphologie et Sporulation)	102
3.1. L'analyse morphologique du mutant $\Delta mps1$	102
3.2. Analyse morphologique des mutants cibles de <i>MPS1</i>	103
3.2.1. Phénotypes des mutants nuls des facteurs de transcription <i>SWI4, SWI6</i> et	
RLM1	104
3.2.2. Phénotypes des mutants nuls des modulateurs AGS1, IDC1, ADA2 et du	
facteur de transcription <i>CRZ1</i>	105
4. Analyse phénotypique des mutants des gènes candidats de la voie de signalisation	
Mps1 chez <i>M. grisea</i> (Modification de la paroi)	107
4.1. Effet des inhibiteurs sur le mutant $\Delta mps1$	107
4.2. Effets des inhibiteurs sur les autres mutants	108
4.3. Altération de la paroi des mutants en présence du glucanex	109
5. Analyse phénotypique des mutants des gènes candidats de la voie de signalisation	
Mps1 chez <i>M. grisea</i> (Pouvoir pathogène)	110
6. Analyse transcriptionnelle du mutant $\Delta mps1$	112
V. CONCLUSION	114 - 117
1. Schéma de fonctionnement de la voie de signalisation Mps1 chez <i>M. grisea</i>	115
2. Comparaison des rôles de la voie Mps1 chez <i>M. grisea</i> et la voie Slt2 chez <i>S. cerevisiae</i>	115
3 . L'importance de la voie de signalisation Mps1 chez <i>M. grisea</i> chez les ascomycètes	116
VI. PERSPECTIVES	118

VII. ANNEXES

ABBREVIATIONS

AA:	Acide aminé
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPc :	Adénosine MonoPhosphate cyclique
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	Acide ribonucléique messager
BET :	Bromure d'Ethidium
CDD :	Conserved Domains Database
DI :	Dose Inhibitrice
dNTP :	Désoxy Nucléotide TriPhosphate
ERKs :	Extracellular Signal Regulated Kinases
GABA :	Acide γ-amino-n-butyrique
JNK :	c-Jun N-terminales kinases
kb :	Kilo base
kDa :	Kilo Dalton
LB:	Luria Bertani
MAP :	Mitogen-Activated Protein
MAPK :	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPKK :	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
MAPKKK :	Mitogen-Activated Protein Kinase Kianse Kinase
MC :	Milieu Complet (Talbot)
MM :	Milieu Minimum (Tanaka)
mM :	Millimolaire
nt :	Nucléotide
ORF :	Cadre ouvert de lecture
Pb :	Paire de bases
PCR :	Réaction de polymérase en chaîne

PEG :	Polyéthylène Glycol
pH :	Potentiel hydrogène
PKC :	Protein Kinase C
PP:	Protéine phosphatase
ppm :	Partie par million
qPCR :	Réaction de polymérase en chaîne quantitative
RNAi	Interférence ARN
rpm :	Rotation par minute
SBF:	Facteur de liaison du complexe SCB
SCB :	SWI4-SWI6 Dependent Cell Cycle Box
SDS :	Sodium dodécyl sulfate
SRF :	Serum Response Factor
Tm :	Température de fusion des amorces
Tp50 :	Temps nécessaire pour une protoplastisation de 50%
UV :	Ultra Violet



Figure 1 : Dendrogramme de la superfamille des kinases chez la levure



Figure 2 : Arbres de l'évolution des protéines kinases

I. INTRODUCTION

Les cellules doivent intégrer de nombreux signaux exogènes et endogènes afin de réguler et coordonner les différents mécanismes contrôlant leur prolifération, leur différenciation ou leur mort programmée au cours du développement de chaque organisme. Cela leur permet de constamment s'adapter à leur environnement. Après leur perception par des récepteurs spécifiques, ces signaux sont transmis par divers systèmes de messagers biochimiques. Ces derniers forment des réseaux afin de moduler les activités cellulaires soit directement (e.g. activité enzymatiques, transporteurs), soit indirectement par le contrôle de l'expression des gènes appropriés. La compréhension des mécanismes de signalisation pour un effecteur donné, son répertoire de transducteurs et les interactions de ceux-ci dans un réseau plus sophistiqué, doit être mise en perspective de l'organisation complexe de la cellule.

Les cycles de phosphorylation - déphosphorylation représentent un mécanisme important de transmission des signaux cellulaires. Par un mécanisme de phosphorylation, les protéines kinases modifient l'activité, la localisation et l'affinité pour leur(s) substrat(s) peptidique(s). Ainsi, elles peuvent réguler la plupart des processus cellulaires, particulièrement la transduction des signaux, et coordonnent les différentes cascades de signalisation qui sont bien conservées chez différents organismes. La phosphorylation par les protéines kinases régule la fonction des protéines (directement ou par l'intermédiaire de la transduction des signaux appropriés) impliquées dans les processus cellulaires tels que des enzymes du métabolisme, des canaux et des pompes membranaires, des protéines du cytosquelette et des facteurs de transcription. En effet, 53 fonctions de kinases et superfamilles (subdivisée en 27 familles) sont bien conservées chez la levure, les nématodes, les insectes, les vertébrés, les plantes et les champignons. C'est pour cela que l'étude des cascades de signalisation, régulées par les protéines kinases nous aident à réaliser une étude comparative de l'activité des kinases ainsi qu'une vue d'ensemble des états de toutes les cellules (Manning, 2005).

Chez *S. cerevisiae*, on retrouve gènes identifiés comme protéines kinases 113 (Hunter et Plowman, 1997) représentant 2% (Gerard Manning, 2005) des gènes de la levure (Figure 1). Il existe 409 protéines kinases chez les nématodes et plus que 800 chez les vertébrés. L'analyse phylogénique des séquences des protéines kinases ont permis d'établir que les gènes codant les domaines catalytiques de presque toutes les sérine/thréonine/tyrosine kinases eucaryotes ont une origine commune et ont divergé au cours de l'évolution pour former plus d'une dizaine de famille.

Contrairement au nombre élevé de protéines kinases, Stark (1996) a trouvé, dans la base de données de PROSITE, seulement 31 séquences possédant divers motifs caractéristiques des protéines kinase (Figure 2). La différence entre le nombre de protéines kinases de protéines phosphatases montrerait, contrairement à la nature fortement spécifique des kinases, que

chaque sous-unité catalytique des phosphatases est, très probablement, capable de réagir avec un spectre plus large de protéines (théorie de targetting).

Les fonctions liées à la signalisation par l'intermédiaire de la phosphorylation dans les champignons peuvent être divisées en 3 groupes:

(1) la réponse aux signaux extracellulaires, d'hormones, de lumière, de stimulus physiques, de tissu végétal de la hôte, de croissance et de différentiation.

(2) le contrôle de processus qui se produisent de manière discontinue pendant le cycle cellulaire tel que la synthèse d'ADN et la mitose.

(3) la réponse au stress alimentaires et environnementaux.

Les protéines kinases peuvent être séparées en 5 grandes familles (Hanks, 1994) :

(1) Aspartate kinases ; (2) Histidine kinases ; (3) Sérine/thréonine kinases ; (4) Tyrosine kinases; (5) Dual specificity kinases.

Chez les champignons filamenteux et chez les eucaryotes, les protéines kinases Ser/Thr, sont prédominantes. Ces enzymes utilisent le gamma phosphate de l'ATP ou du GTP pour générer une liaison entre le phosphate avec le groupe alcool de la Sérine ou de la Thréonine. Ces protéines kinases sont des enzymes contenant une région catalytique fortement conservée et un domaine de régulation moins conservé. Ces deux domaines sont, en général, liés par un pseudo-substrat (PKC) qui maintient l'enzyme inactive. Dès maintenant, pour simplifier ce texte, nous assimilerons la notion de kinases à protéines kinases. La recherche menée depuis la dernière décennie a permis la découverte de plusieurs réseaux signalétiques intra et extracellulaires (grâce aux signaux transmis par les récepteurs via les petites protéines G hétérotrimèriques) et de faire le lien entre les défaillances possibles de ces réseaux et des maladies tel que certains cancers (Lee et Meccubrey, 2002), (Kerbel et al. 2000). Parmi celles-ci, on distingue des voies de signalisation formées de protéines kinases connues sous le nom de MAP kinases pour Mitogen-Activated Protein kinases. Les voies de transduction de signaux sont essentiellement des MAP kinases chez les cellules d'eucaryotes pour contrôler une variété processus, aussi complexes que, par exemple, la prolifération, la différenciation ou l'apoptose.

1. La paroi cellulaire

La paroi cellulaire est une structure rigide, extracellulaire, entourant la membrane plasmique chez les plantes, les algues, les bactéries et les champignons. Les animaux et les protozoaires en sont dépourvus. En effet, la paroi cellulaire apporte à la cellule un soutien structurel, une protection, et agit comme un mécanisme de filtrage. La paroi cellulaire fait aussi obstacle à l'expansion lorsque l'eau pénètre dans la cellule.

Les matières constitutives de la paroi cellulaire varient d'une espèce à l'autre. Chez les plantes, la plus forte composante de la paroi cellulaire, complexe, est un hydrate de carbone polymère du glucose appelé cellulose. Chez les bactéries, les formes de peptidoglycane sont dominantes. Chez les archéens, les parois des cellules ont des compositions différentes, elles peuvent être formées de glycoprotéines couches S, de pseudo peptidoglycanes, ou de polysaccharides. Les champignons possèdent des parois cellulaires composées de chitine et de glucanes alors que celles des algues sont généralement constituées de glycoprotéines et de polysaccharides. Toutefois, certaines espèces d'algues peuvent aussi avoir une paroi cellulaire formée, en plus, d'acide silicique. Souvent, les molécules d'autres structures se trouvent ancrées à la paroi cellulaire (Tableau 1).

ORGANISME	CONSTITUANTS				
Plante	Cellulose glycoprotéines Glucomannan		Glucomannanes, Xyloglucanes	Lignine, Cutine	
Bactérie Acides		peptidoglycane	Phospholipides,		
	téchoïques		Lipopolysaccharides		
Algue	Silicium	Alginique acidifiant	Xylanes, Mannanes	Polysaccharides	
				sulfonés	
Champignon	Chitine	β -1, 3 - glucane	Mannoprotéines		

Tableau 1 : Comparaison des constituants de la paroi cellulaire chez différents organismes

En effet, La paroi cellulaire est une structure de 100 à 200 nm d'épaisseur chez la levure S. cerevisiae. Il est considéré que la composition et l'architecture de la paroi peuvent varier notamment avec l'âge de la cellule, son état développemental ou en réponse à des modifications du milieu de culture (Aguilar, *et al.* 2003) (Sanchez *et al.* 1995).

1.1. Ses rôles

La paroi cellulaire chez la levure a quatre fonctions importantes :

a) **Stabilisation des conditions osmotiques internes** : L'osmolarité cytoplasmique de *S. cerevisiae* et d'autres champignons est habituellement plus élevé comparée à celle du milieu. Pour contenir l'afflux de l'eau, qui perturberait les conditions internes et causerait le gonflement excessif de la

cellule menant, par la suite, à la rupture de la membrane plasmique, les champignons forment une paroi rigide et élastique. L'extension de la paroi crée une contre pression, qui arrête l'afflux de l'eau, l'augmentation du volume cellulaire diminuant la pression osmotique.

b) **Protection contre le stress physique**: La paroi cellulaire est non seulement impliquée dans la maintenance homéostatique mais également dans la protection. La combinaison de la force mécanique considérable et de l'élasticité élevée permet à la paroi, de transmettre et redistribuer les stress physiques, de ce fait protégeant efficacement la cellule contre des dommages mécaniques (Koch, 2003), (Clarke *et al.* 1986).

c) Maintenance de la forme cellulaire, condition préalable pour la morphogénèse : La morphologie des cellules dépend beaucoup des contraintes externes à la membrane plasmique. En effet, le cytosquelette semble jouer un rôle moins important que dans les cellules animales. Plusieurs contraintes peuvent jouer : les pressions relatives des cellules voisines et la structure et la rigidité de la paroi cellulaire elle-même. C'est au cours de la différenciation cellulaire que de nombreuses formes adaptées à leurs fonctions sont acquises par les cellules. Les cellules de levure peuvent se développer en tant que cellules ovales, sous une forme plus allongée en absence d'azote ou en formant des pseudo-hyphes. La formation d'une structure d'appariement en réponse à la phéromone engendre également la morphogénèse due à la paroi cellulaire. Les formes singulières des champignons supérieurs sont un exemple saisissant de la façon dont la paroi cellulaire peut contribuer à la morphogénèse.

En plus de ces fonctions générales, les fonctions spécifiques de différentes protéines sont importantes. Il est montré clairement que la couche externe de la paroi cellulaire peut, à tout moment, se composer, au moins, de 20 glycoprotéines différentes et que la composition de cette couche peut varier selon les conditions de croissance (Cunningham *et al.* 2004), (Klis *et al.* 2005), (Itoh *et al.* 1997), (Dekker *et al.* 2005). Ceci donne à la cellule la possibilité d'avoir une large variété de nouvelles fonctions. Les protéines de paroi cellulaire permettent aux cellules de floculer, de reconnaître d'autres cellules et de former un biofilm; elles sont, également, exigées pour la croissance dans des conditions anaérobiques (Lowny *et al.* 2001), (Moreau-Vauzelle *et al.* 2004), (Kobayashi *et al.* 1999). Les protéines de la paroi cellulaire peruvent, aussi, fortement affecter l'hydrophobicité des cellules, ce qui est important pour l'adhésion au polystyrène et à d'autres surfaces abiotiques (Kjine *et al.* 1996). De plus, quelques protéines de la paroi cellulaire. Par exemple, les parois cellulaires de *Candida albicans* contiennent Sod4 et Sod5, les superoxydes dismutases avec GPI-modifiées, qui la protègent en présence d'un stress oxydatif.



Figure 3 : Représentation schématique de la structure moléculaire de la paroi cellulaire chez S. cerevisae (Basmaji, 2005)



Figure 4: la paroi cellulaire d'A. fumigatus (Latgé, et al. 2003)

En conclusion, la paroi protège la cellule contre les attaques physiques et chimiques et a une fonction majeure dans la morphogenèse.

1.2. Chez le modèle *Saccaromycètes cerevisiae*

La paroi cellulaire de la levure assure le maintien de la forme et l'intégrité cellulaire. Elle constitue entre 20 à 25 % de la masse sèche de la cellule. C'est une structure dynamique puisqu'elle est remodelée au cours des divisions cellulaires, de la croissance des cellules ainsi que, par exemple, en réponse aux agressions environnementales. Elle est constituée de proportions variables de polysaccharides et de protéines glycosylées (Nguyen *et al.* 1998) : Glucanes, 50-60% (unité de glucose liées à 80% en $\beta(1,3)$ et à 20% en $\beta(1,6)$) ; Mannoprotéines, 40-50% (Protéines glycosylées portant des chaînes de mannoses liées en $\alpha(1,2)$, $\alpha(1,3)$, $\alpha(1,6)$) et Chitine 1-3 % (Unités N- acétylglucosamine liées en $\beta(1,4)$) (Fleet, 1991), (Dallies *et al.* 1998) (Figure 3).

Les analyses de la paroi cellulaire par microscopie électronique ont révélé plusieurs couches. On observe une couche interne transparente et amorphe, considérée comme une couche squelettique et une couche externe, dense, constituée des fibrilles perpendiculaires à la surface, constitué de protéines liées par des liaisons covalentes avec la couche interne (Osumi M., 1998).

1.3. Chez les champignons

La paroi est une structure spécifique de cellule fongique et est très différente de la paroi des cellules végétales, composées fondamentalement de cellulose et de pectine. En effet, la cellulose ajoute de la rigidité aux parois cellulaires des plantes, alors que la chitine renforce celles des champignons. La paroi fongique est composée principalement de polysaccharides tels que la chitine, de ß-1,3-D-glucane et de ß-1,6-D-glucane, de mannane et de protéines (Davide, 2004). Tous ces composants sont associés entre eux en donnant lieu à une structure rigide, décrite dans la figure 4.

La paroi cellulaire fongique ressemble à celle de la levure Par ailleurs, les proportions des constituants sont relativement différentes (Tableau 2, Bowman et Free, 2006).

Organismes	Constituants				
	Chitine	Glucane	β-1,3-glucane	β-1,6-glucane	Protéine
Levure	1-3%	50-60%	80%	20%	30-50%
Champignon	10-20%	50-60%	90%	10%	20-30%

Tableau 2 : Pourcentage des concentrations des constituants de la paroi cellulaire chez la levure et chez les champignons

De plus, les recherches sur la composition des glucanes chez *S. cerevisiae* et *C. albicans* montrent que la paroi cellulaire des levures contiennent du β -1,3- and beta-1,6-glucanes

(Silverman *et al.* 1988). Par contre, la paroi cellulaire de la plupart des champignons, comme *N. crassa, A. fumigatus*, ne contiennent pas de beta-1,6-glucanes (Borkovich *et al.* 2004).

Du fait de sa localisation à l'extérieur de la cellule, la paroi est le premier lieu d'interaction avec le milieu extérieur, en jouant un rôle très important dans le développement de l'action pathogène des champignons (Chaffin WL, *et al.* 1998), (Nimrichter L., *et al.* 2005). Quelques composants de la paroi sont très immunogéniques et stimulent un grand nombre de réponses cellulaires et humorales pendant l'infection. Les composants de la paroi cellulaire comme les ß-glucanes et les mannones, ainsi que les anticorps dirigés contre la paroi cellulaire sont utile pour établir un diagnostic chez les patients ayant une infection fongique (Pazos *et al.* 2006). D'autres composants comme les mannones et les mannoprotéines sont des puissants immunomodulateurs (Heitman, 2005).

En effet, les champignons sont très divers, avec des espèces unicellulaires, comme les levures et/ou hyphale produisant des spores et divers autres structures associées à la reproduction. Dans chaque cas, la forme et l'intégrité du champignon dépendent de la force mécanique de la paroi cellulaire, qui joue de multiples rôles essentiels pendant l'interaction du champignon avec son environnement (Gooday, 1995) ou son hôte pour les champignons symbiotiques ou pathogènes. Outre ces importantes fonctions, décrites au début du chapitre, elle constitue le lieu d'interaction avec le milieu externe, en localisant en elle les adhésines et un grand nombre de récepteurs membranaires, qui, après leur activation, suite à un stimulus défini, entraîneront une cascade complexe de signaux dans la cellule.

La dégradation de la paroi cellulaire a un effet important sur la croissance et la morphologie du champignon, souvent le rendant susceptible à des stress causant sa lyse et sa mort. Etant donné le rôle essentiel de la paroi cellulaire pour la croissance et le développement du champignon, elle est considérée comme excellente cible pour les agents antifongiques.

1.4. Ses composants

a) **Glycoprotéines** : Les protéines représentent 30-50% du poids sec de la paroi fongique chez les levures et 20-30% du poids sec de la paroi des champignons filamenteux. La majorité des protéines associées à des glucides par des liaisons 0 ou N, forment les glycoprotéines. Les protéines de la paroi ont diverses fonctions, en prenant part au maintien de la forme cellulaire, en intervenant dans les processus d'adhésion (*e.g.* Als et Hwp1), en protégeant la cellule des dangers extérieurs, prenant part à l'absorption de molécules, transmettant des signaux au cytoplasme et en synthétisant et en remodelant les composants de la paroi (Bowman, 2006).

b) **Chitine**: La chitine est synthétisée à partir de N-acétyl glucosamine par l'enzyme chitine synthase. Le taux de la chitine dans la paroi fongique varie selon la phase morphologique du champignon. Il représente le 1-3% du poids sec de la paroi cellulaire des levures tandis que chez les champignons filamenteux le taux peut s'élever jusqu'à 10-20%. Le taux de chitine dans la paroi des hyphes chez *Candida albicans* est trois fois plus élevé


Figure 5 : Schéma représentatif de la membrane cellulaire chez les champignons. Les protéines du complexe ß-1,3-D-glucane synthase (Fks1 and Fks2) sont montrées avec les protéines impliquées dans l'activation de ces gènes

que celui chez les levures (Chattaway F. W., *et al.* 1968) tandis que le taux de la chitine pendant les phases mycéliales de *Paracoccidioides brasiliensis* et *Blastomyces dermatitidis*est de 25-30% moindre que celui de la phase levuriforme (Kanetsuna F., *et al.* 1969). Vu son importance dans la structure de la paroi, la synthèse de la chitine est une bonne cible pour l'action de composés antifongiques. Quelques agents qui interfèrent avec la synthèse de la chitine comme la Nikkomycine (Schluter U., Seiffert G., 1989) ou les Polyoxines (Dehoux Baudoin Cecile, Gorrichon Liliane, 2000), ont été commercialisés.

c) **Glucane** : Les glucanes sont des polysaccharides de structure et forment la part la plus importante de la paroi et représentent 50-60% du son poids sec. La majorité des polymères de glucane sont composés de molécules de glucose avec des liaisons &-1,3 (65 – 90%) bien qu'il existe aussi des liaisons &-1,6 (chez Candida mais pas chez Aspergillus), &-1,4, α -1,3 et α -1,4. Le &-1,3-D-glucane est le composant structurel le plus important de la paroi. De plus, il peut se lier de façon covalente à d'autres composants. Les &-1,3-D-glucanes sont synthétisés par un complexe d'enzymes situé dans la membrane plasmique, appelées glucane synthase. Ces enzymes catalysent la formation des chaînes linéaires de glucane composées approximativement de 1.500 résidus de glucose liés par des liaisons &-1,3. Dans ces chaînes, chaque 40-50 résidu de glucose sont liés de nouvelles unités de glucose par des liaisons &-1,6 pour donner lieu à une structure ramifiée. Ces ramifications peuvent être liées à d'autres glucanes, chitines ou mannoprotéines, conférant, à la paroi, une grande résistance mécanique essentielle pour maintenir l'intégrité cellulaire.

Les gènes qui codent pour le complexe de la ß-1,3-D-glucane synthase ont été initialement identifiés chez *Saccharomyces cerevisiae*: *FKS1* (Douglas *et al.* 1994) et *FKS2* (Qadota *et al.* 1996). Actuellement, les orthologues de ces gènes chez *Candida, Aspergillus, Cryptococcus, M.grisea, B.cinerea* et *Pneumocystis,* etc. ont été identifiés. *FKS1* code une protéine de la membrane cytoplasmique de 215 kDa qui est la sous-unité principale de la glucane synthase. La délétion des gènes *FKS1* ou *FSK2* produit des mutants avec une croissance lente et une paroi défectueuse (Mazur *et al.* 1995). De plus, la délétion des deux gènes est létale (Beauvais *et al.* 2000).

L'activité de la ß-1,3-D-glucane synthase (Figure 5) est régulée par le cycle cellulaire et est sous le contrôle du gène *RHO1*, qui interagit non seulement avec les protéines Fks mais avec la protéine kinase C, un contrôleur de la cascade MAP (Mitogen Activated Protein). Rho1 est activé par les protéines Rom1 et Rom2 et ce dernier est, à son tour, activé par les glycoprotéines de la paroi cellulaire Wsc1 et Mid2. La délétion du gène Rho1 est létale (David W Denning, 2003).



Figure 6: La cascade de signalisation MAPK

2. Voies de signalisation utilisant des MAP kinases

2.1. Introduction

Les MAP-kinases sont des kinases qui catalysent la phosphorylation des protéines MAP. On les désigne aussi par le sigle ERK (Extracellular signal Regulated Kinase). Les voies de signalisation MAP kinases impliquent une série de kinases qui s'activent en cascade (Figure 6) : la MAP-kinase est activée par une MAP-kinase-kinase, elle-même activée par une MAPkinase-kinase-kinase. La MAPKKK est activée par une autre protéine kinase activée, aussi par phosphorylation, en réponse à divers sollicitations (Maden *et al.* 1997). La MAPK, une fois phosphorylée, est transférée dans le noyau pour activer les différents facteurs de transcription. Ensuite, après que la cellule ait répondu au signal extracellulaire ou qu'elle se soit adaptée à la nouvelle condition, la MAPK est inactivée par une protéine phosphatase, dans le noyau. Ainsi, les facteurs de transcription activent leur cible dans le noyau (Levin, *et al.* 2002).

Ces cascades sont composées de différents modules. Tout d'abord, les protéines MAPKs (MAPKKK, MAPKK, MAPK), qui possèdent un motif conservé Thr-X-Tyr composé d'une thréonine, d'un acide aminé qui varie selon chaque type de MAPK et d'une tyrosine (Thr-Xaa-Tyr) dans sa boucle d'activation. L'acide aminé variable dans ce motif est essentiel car il permet à chaque MAPK d'être reconnue spécifiquement par sa kinase activatrice, ce qui assure une réponse adaptée à la stimulation extracellulaire de la part de la cellule (Robbins *et al.* 1993). De plus, chacune de ces MAPK est activée par une cascade de protéines kinases qui contient au moins deux kinases en amont. Ces dernières doivent phosphoryler la tyrosine et la thréonine de chaque MAPK pour que cette dernière deviennent totalement activée.

La spécificité de l'interaction entre les partenaires se fait, au moins en partie, via la reconnaissance entre les structures tertiaires des protéines. Il apparaît aussi clairement que l'activité de ces protéines est liée à leur degré de phosphorylation. Ainsi, il a été démontré que pour les MAPK de mammifères deux sites de phosphorylation sont présents (un résidu thréonine et un résidu tyrosine) et seulement la double phosphorylation de la protéine mène à une activation complète et efficace (Anderson *et al.* 1990). De manière analogue, les MAPKK requièrent une double phosphorylation sur deux résidus serines ou un résidu serine et un résidu thréonine pour être actives et phosphoryler la MAPK en aval de la cascade (Huang et Erikson, 1994). L'activation de la MAPKKK semble être plus complexe en raison de la diversité des signaux et des différents effecteurs (protéines G couplées à un récepteur membranaire, phospho-relais, senseur membranaire, protéine kinase...) menant à l'activation de la cascade. De plus, certaines MAPKKK peuvent former des oligomères et s'auto-phosphoryler (Tobiume *et al.* 2002).

Chaque MAPK activée va phosphoryler à son tour de nombreux substrats (facteurs de transcription, diverses protéines kinases, des phospholipases et différentes protéines associées au cytosquelette) qui seront nécessaires pour que la cellule réagisse efficacement aux contraintes de son environnement (Payne *et al.* 1991).



Figure 7 : Exemple d'une réaction de phosphorylation



Figure 8: Schéma général de la cascade de signalisation avec l'exemple de la cascade SLT2

2.1.1.Phosphorylation, modification permettant une signalisation

La phosphorylation est une modification post-traductionnelle des protéines qui intervient dans un très grand nombre de processus cellulaires (différenciation, division, prolifération, apoptose, etc..) et en particulier dans les mécanismes de signalisation. Le processus de phosphorylation est connu depuis plus d'un siècle (Levene et Alsberg, 1906)suivi de la mise en évidence d'une phosphosérine dans la vitelline(Lipmann et Levene, 1932) puis de la première description de la phosphorylation d'une protéine (Burnett G. et Kennedy E.P, 1954). La phosphorylation induit des modifications fonctionnelles très importantes de la protéine cible, comme, l'amplification ou inhibition de l'activité enzymatique, le changement de localisation cellulaire et le changement de structure qui permettent l'association avec d'autres protéines.

La réaction phosphorylation est l'estérification de la chaîne latérale de la sérine, de la thréonine ou de la tyrosine (chez les eucaryotes), par addition d'un ou plusieurs groupement(s) phosphate (Figure 7).

La phosphorylation est le plus souvent transitoire. Le ou les groupement(s) ajoutés sont ensuite clivés : la déphosphorylation est catalysée par les protéines phosphatases. La plupart des protéines kinases ont une phosphatase qui leur est associée. Ainsi, la phosphorylation déphosphorylation est un moyen de contrôler finement le flux d'une voie métabolique ou une signalisation.

2.1.2. Détection des signaux

Les premiers éléments de la cascade de signalisation sont les récepteurs associés à la membrane plasmique (Gray *et al.* 1997 ; Verna *et al.* 1997). En effet, l'activation de la protéine kinase est transmise par ces récepteurs de la membrane plasmique. Par exemple, l'activation de la voie de signalisation MAPK dépendante de Pkc1, la protéine kinase C, chez *S. cerevisiae* (Figure 8), intervient suite à des stress pariétaux, des stress thermiques, des mutations de gènes structuraux/régulateurs de la paroi ainsi que par des agents perturbant l'assemblage de la paroi (Martin *et al.* 2000). L'activation de la voie de la Pkc1 est transmise par les récepteurs de la membrane plasmique Hsc77/Slg1/Wsc2, Wsc2, Wsc3, Mid2 et Cwh43 (Martin-Yken *et al.* 2001). Ils interagissent avec Rom2 pour transmettre le signal à Rho1, une petite protéine extrêmement conservée fixant le GTP, qui active directement Pkc1 (Philip et Levin, 2001; Nonaka *et al.* 1995 ; Kamada *et al.* 1996).

Les cascades de MAPK contrôlent les facteurs de transcription à différents niveaux par phosphorylation. Ils ont des cibles des protéines co-régulées (John W. Edmunds and Louis, 2004). D'après les données, les facteurs de transcription cibles peuvent jouer le rôle d'une ancre nucléaire pour leur MAPK correspondant en réalisant une interaction stable avec elles. Par exemple; chez *S. cerevisiae*, la MAPK Hog1 et le facteur de transcription Hot1 interagissent physiquement (Marijn *et al.* 1999), (Figure 9). En effet, la MAPK Hog1, phosphorylé par la MAPKK Pbs1 est transférée dans le noyau grâce à Gsp1, une protéine impliquée dans



Figure 9: Représentation de la cascade de signalisation HOG chez *Saccharomyces cerevisiae*. Deux sous cascades distinctes (initiées par les protéines Sho1 et Sln1) permettent d'activer successivement les MAPKKK, les MAPKK et finalement Hog1, la MAP Kinase qui est transférée dans le noyau, par Gsp1, où elle initie la transcription d'un grand nombre de gènes, dont Hot1 (Pascal Hersen, *et al.* 2008)



Figure 10: Les divers signaux extracellulaires stimulent la cascade de Ras/Raf/MEK/ERK chez les mammifères et chacune peut obtenir des résultats cellulaires distincts

l'importation dans le noyau de protéine possédant un signal de localisation nucléaire (Oki *et al.* 1998). Du noyau, Hog1 phosphorylé induit différentes réponses dont Hot1 (Reiser *et al.* 1999). Ainsi, Hot1 ancre Hog1 aux gènes spécifiques pour l'activation de la transcription suite à une réponse de stress osmotique (Alepuz *et al.* 2003).

Les MAPKs peuvent reconnaître et se lier à des cibles de facteurs de transcription par le domaine de liaison, qu'on peut nommer « docking site », une région de résidus basiques suivie d'un motif LXL et d'une région hydrophobique (Takuji, et al. 2002), (Andrew D. et al. 2000). Les interactions des docking sites avec le motif de MAPKs correspondant peuvent produire un recrutement de MAPK stable et spécifique (G.S. May, et al. 2005). Le processus d'activation est bien défini : une fois activée, MAPKKK phosphoryle une sérine et/ou une thréonine du domaine N-terminal de la MAPKK qui va phosphoryler, par la suite, la MAPK par un résidu thréonine et/ou tyrosine. Une fois que ces deux acides aminés sont phosphorylés, la MAPK est activée. Cette organisation ne permet pas seulement l'amplification du signal, mais aussi, de façon plus importante, fournit des interfaces régulées supplémentaires donnant une cinétique, une durée et une amplitude précises à l'activité (Tibbles, et al. 1999), (Kyrikais, et al. 1999), (Robinson, M. J. et Cobb, M. H. 1997). L'inactivation des MAPKs est bien connue aussi : l'activité des MAPKs est négativement régulée par des protéines phosphatases qui enlèvent le phosphate des résidus thréonine et tyrosine de la boucle d'activation des MAPKs. En dépit des progrès, dans la compréhension de la cascade de MAPK, une des questions, qui demeure mal comprise, est comment un stimulus particulier obtient la réponse correcte. Ce sujet, nommé spécificité de MAPK, semble remarquable quand on considère la gamme de réponses cellulaires fort diverses induites, par plusieurs activateurs, activé par une seule voie de MAPK (Figure 10). Les changements spatiaux et temporels du signal de MAPK influencent la réponse cellulaire due à un stimulus spécifique et sont d'intérêt particulier en considérant la spécificité de MAPK.

En effet, les cellules ont développé une classe des protéines, nommée échafaudages (scaffold) ou protéines d'adaptateur, qui participent à la régulation spatiale et temporelle de la voie de MAPK. Ces protéines se lient aux composants multiples de la cascade de MAPK, les rassemblant, et facilitant, de ce fait, la propagation efficace du signal (Figure 10). En conséquence, les protéines d'échafaudages agissent en tant que modules de signal, fournissant un niveau complexe de contrôle de la signalisation de MAPK. À l'origine identifié chez la levure (Elion, 2001), plusieurs protéines d'échafaudages, qui modulent l'activité de MAPK des cellules de mammifères, ont été identifiées (Sacks, 2006).

Les protéines d'échafaudages fournissent un mécanisme par lequel la signalisation spatiotemporelle de MAPK est régulée. Cependant, les protéines d'échafaudages ont d'autres rôles additionnels par lesquels elles peuvent contrôler la signalisation de MAPK. En effet, elles peuvent fournir des mécanismes de normalisation positifs et négatifs (Garrington et Johnson, 1999). En assemblant différents composants de la cascade de MAPK, les protéines d'échafaudages facilitent leurs interactions et la propagation du signal. Cependant, les



Figure 11: Les protéines d'échafaudages. A : sous sa forme monomérique, Ste5 lie Ste11, Ste7 et Fus3, lors de la liaison à la protéine G, Ste11 est accessible à la kinase Ste20, et la transmission du signal est favorisée par le rapprochement stérique de Ste7 et Fus3. B : modèle basé sur la formation d'un dimère Ste5 (Sette, *et al.* 2000)

protéines d'échafaudages spécifiques permettent la mise en place d'un complexe multiprotéique au sein de la cascade afin de canaliser le signal vers une seule voie. Ces complexes pourraient se lier spécifiquement avec des récepteurs membranaires pour transmettre le signal. En conséquence, elles activent, préférentiellement, les cascades spécifiques, tout en simultanément, empêchant d'autres signaux de se mettre en place. Cette hypothèse est appuyée d'une part par le fait qu'elle rend compte de l'utilisation multiple d'une MAPK pour différents processus cellulaires et d'autre part par l'identification chez *S. cerevisiae* de la protéine Ste5 qui, par test double-hybride, interagit avec différents partenaires de la voie (Printen et Sprague, 1994). Ste5 recrute différents partenaires de la cascade afin former un complexe multi-protéique. Elle est requise pour ancrer le complexe au récepteur, à la protéine G ou au composant du signal situé à la membrane plasmique. Ste5 se lie par l'intermédiaire de sites de liaison distincts aux trois kinases de la cascade (Ste11/Ste7/Fus3), et à la protéine G (Figure 11).

La protéine Ste5 est nécessaire au processus de conjugaison (Choi et al. 1994). Comme Fus3 la protéine Ste5 n'est produite que dans les cellules haploïdes. Ceci correspond bien au fait que Ste5 est spécifique de la conjugaison et ne doit donc s'exprimer que dans les cellules haploïdes qui vont fusionner. En plus de sa fonction de protéine d'échafaudage, Ste5 aurait un rôle direct dans l'activation de la MAPKKK et la phosphorylation de Fus3 (Elion, 2001). Certains auteurs emploient le terme de scaffold catalytique pour ces protéines, qui permettent la formation d'un complexe et accentue leur activation. Enfin, la capacité de Ste5 à se dimérizer (Yablonski et al. 1996) et sa flexibilité moléculaire (Sette et al. 2000) font de cette protéine un acteur essentiel de la signalisation cellulaire. Par la suite, d'autres protéines d'échafaudage ont été identifiées chez la levure et les cellules de mammifères (Whitmarsh et Davis, 1998). Les travaux de plusieurs groupes de recherche pointent les interactions protéine-protéine comme des moyens puissants de coordination des processus de signalisation. Cette coordination est identifiée d'une manière claire au niveau de l'assemblage de complexes protéiques sur les récepteurs activés, ou de complexes de facteurs de transcription sur les promoteurs des gènes. Cependant, il devient apparent que cette façon de régulation est aussi largement utilisé pour le contrôle des réseaux de signalisation intracellulaire.

2.2. Chez les mammifères

Toutes les cellules eucaryotiques possèdent de multiples voies de MAPK, qui régule l'expression des gènes, la mitose, le métabolisme, la survie, l'apoptoses et la différentiation. A nos jours, chez les mammifères, ont été décrits cinq modules MAP kinases qui partagent des composantes structuralement apparentées tout en servant de médiateurs dans des réponses biologiques spécifiques (Denhardt, D. T., 1996), (Woodgett, J. R., *et al.* 1996): Extracellular signal-Regulated KinaseS (ERKs) 1 et 2 (ERK1/2), c-JuN amino-terminal KinaseS (JNKs) 1, 2, and 3, p38 isoformes α , β , γ , et δ , ERKs 3 et 4, et ERK5. Tout dernièrement, un nouveau groupe, ERK 7/8 a été découvert (Abe M. K., *et al.* 2001), (Iavarone C. *et al.* 2006). Ainsi, même si le rôle



Figure 12: Les composantes kinases de base de la voie ERK/MAP kinase. a). Schéma général d'une signalisation MAP kinase. b). la voie ERK/MAPK.

de ce dernier groupe reste inconnu pour le moment, on peut supposer qu'il existe six modules de MAP kinases chez les mammifères. Les groupes le plus intensivement étudiés jusqu'ici sont les ERK1/2, le JNKs, et les kinases p38.

En dépit d'une décennie révélant d'énormes progrès dans la compréhension de l'ensemble des circuits de signalisation intracellulaire, la voie ERK/MAPK cache encore beaucoup de secrets. Ceux-ci concernent principalement la régulation des composantes kinases du module, la compréhension de l'importance, dans une réponse biologique précise, des changements spatio-temporels de l'activité et de la distribution subcellulaire des composantes de la voie et enfin l'orchestration de ces variations au niveau moléculaire (Lenormand, P. *et al.* 2002).

a) Extracellular signal-Regulated Kinases (ERK1, ERK2); connu, également, sous le nom de MAP kinases classique. La voie de la signalisation ERK1/2 est préférentiellement activée en réponse aux facteurs de croissance et aux esters de phorbol (un inducteur de tumeur), et régule la prolifération et la différentiation des cellules (Figure 12).

b) c-Jun N-terminal KinaseS (JNKs), (MAPK8, MAPK9, MAPK10) connu, également, en tant que Stress-Activated Protein KinaseS (SAPKs).

c) p38isoforms (MAPK11, MAPK12 (= ERK6), MAPK13, MAPK14).JNK et des voies de la signalisation p38 sont sensibles aux stimuli de stress, tels que des cytokines, l'irradiation ultra-violette, la chaleur et le choc osmotique. Ils sont impliqués dans la différentiation des cellules et l'apoptoses.

d) ERK5. ERK5 (MAPK7), qui a été découvert récemment, est activé par des facteurs de croissance et par la présence de stress, et il participe à la prolifération de cellules.

e) ERK3/4. ERK3 (MAPK6) et ERK4 (MAPK4) sont des MAPKs structurellement atypique possédant des motifs SEG dans la boucle d'activation et montrant des différences importantes seulement dans la prolongation de la partie C-terminale. ERK3 et ERK4 sont principalement des protéines cytoplasmiques qui lient, transfèrent et activent MK5 (PRAK, MAP2K5). ERK3 est instable, à la différence d'ERK4 qui est relativement stable (Kant S., *et al.* 2006).

f) ERK7/8. (MAPK15) ceci est le membre le plus récemment décrit de MAPKs et se comporte comme une MAPKs atypique. Il possède une longue séquence C-terminale semblable à ERK3/4 (Gabby Krens, *et al.* 2006). Ils sont reconnus comme les nouveaux marqueurs de diagnostic pour certains cancers (USPTO Application 20060141473).



Figure 13 : Représentation schématique des voies de signalisation MAPK chez S. cerevisea(Popolo L., et al. 2001)



Figure 14: La voie MAP kinase activée par phéromone (Ashton Breitkreutz et Mike Tyers, 2002). Les composants ascendants de la voie activent la kinase Ste11, qui active la kinase Ste7, qui active alternativement le MAPKs Fus3 et Kss1. La protéine d'échafaudage Ste5 lie le module de MAPK aux activateurs ascendants dans la membrane. Une fois qu'activées, la MAPK active les cibles transcriptionelles, y compris Ste12 et ses régulateurs négatifs Dig1/Rst1 et Dig2/Rst2, et les cibles cytoplasmiques, y compris Cyclin-Dépendants Kinase (CDK) et le facteur de polarisation, Far1. Les substrats de MAPK ont divers rôles, comme l'induction des gènes spécifiques de l'arret de cellule-cycle et de la polarisation. La croissance invasive est également stimulée par cette voie. Fus3 atténue probablement le flux de signal par la phosphorylation inhibitrice de rétroaction des composants ascendants. Le rouge indique des étapes inhibitrices. Abréviation : PRÉ, élément de réponse à la phéromone

2.3. Chez les champignons

2.3.1. Chez la levure *S. cerevisiae*

Les études faites chez la levure ont montré qu'il existe cinq (Figure 13) voies de signalisation basées sur l'activation de cascade de MAPK, constituée de modules de trois kinases très conservées chez les eucaryotes (Gustin M. C., *et al.* 1998). Ces protéines, contrôlent les voies de signalisation en désignant, selon le contexte cellulaire, la voie qui doit être activée. Chez la levure, et en réponse à la phéromone, la MAPKKK Ste11 active la MAPKK Ste7, qui a son tour active les MAP kinases Kss1 et Fus3, toutes les deux participent à la réponse de phéromone, avec Fus*3* jouant le rôle principal (Sabbagh, *et al.* 2001). En outre, Kss1 (Figure 14) régule l'aspect invasif filamenteux (Cook, *et al.* 1997).

En réponse à un stress osmotique, Ste11 active sélectivement Pbs2, la MAPKK de la voie Hog1 (l'équivalent de la voie p38 chez les mammifères) (Elion, 2000), (Saito, *et al.* 1996). En présence d'un stress de la paroi cellulaire, la MAPKKK Bck1 active les MAPKK MKK1 et MKK2, qui a son tour active la MAP kinase Slt2. Quel signal activerait la MAPKKK et quelle MAPKK serait la cible de cette MAPKKK, serait déterminée par les protéines d'ancrage. En effet, dans le cas d'une réponse à la phéromone, la protéine d'échafaudage Ste5 rapproche Ste11 à son substrat Ste7, alors qu'en cas de réponse à un stress osmotique, Pbs2 crée une interaction stable avec Ste11 et avec le senseur osmotique Sho1, ce qui fait transmettre le signal à Hog1 (Davis, R. J., *et al.* 1996).

2.3.2. Chez les champignons filamenteux

Les études réalisées au sein du groupe SIGNALPATH nous ont aidés à souligner les ressemblances et les différences des cascades de signalisation MAP kinase chez différents champignons filamenteux, comparés à celles de *S. cerevisiae*. En utilisant les bases de données disponibles des génomes, la conservation de trois cascades MAPK et la voix de calcium calcineurine ont été exploré dans six espèces fongiques différentes, comme *Saccharomyces cerevisiae*, *Ustilago maydis, Magnaporthe grisea, Aspergillus fumigatus, Candida albicans, Ashbya gossypii.*

Fungal Genetics and Biology 46 (2009) 287-298



Contents lists available at ScienceDirect

Fungal Genetics and Biology



journal homepage: www.elsevier.com/locate/yfgbi

Review

Comparative genomics of MAP kinase and calcium-calcineurin signalling components in plant and human pathogenic fungi

Nicolas Rispail^a, Darren M. Soanes^b, Cemile Ant^c, Robert Czajkowski^d, Anke Grünler^e, Romain Huguet^b, Elena Perez-Nadales^a, Anna Poli^f, Elodie Sartorel^g, Vito Valiante^h, Meng Yangⁱ, Roland Beffa^c, Axel A. Brakhage^h, Neil A.R. Gowⁱ, Regine Kahmann^d, Marc-Henri Lebrun^c, Helena Lenasi^f, José Perez-Martin^g, Nicholas J. Talbot^b, Jürgen Wendland^e, Antonio Di Pietro^{a,*}

^a Departamento de Genética, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba, Spain

^b School of Biosciences, Geoffrey Pope Building, University of Exeter, Exeter EX4 4QD, United Kingdom

^c UMR2847 Centre National de la Recherche Scientifique/Bayer CropScience, 14 Rue Pierre Baizet, 69263 Lyon Cedex 09, France

^d Max-Planck-Institute for Terrestrial Microbiology, Department of Organismic Interactions, Karl-von-Frisch-Strasse, D-35043 Marburg, Germany

^e Carlsberg Laboratory, Yeast Biology, Gamle Carlsberg Vej 10, DK-2500 Valby, Copenhagen, Denmark

^f Institute of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Vrazov trg 2, Ljubljana, Slovenia

^g Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, 28049 Madrid, Spain

^h Department of Molecular and Applied Microbiology, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology – Hans Knöll Institute (HKI), 07745 Jena, Germany ⁱ Aberdeen Fungal Group, School of Medical Sciences, Institute of Medical Sciences, University of Aberdeen, Aberdeen, UK

ARTICLE INFO

Article history: Received 25 November 2008 Accepted 17 January 2009 Available online 7 February 2009

Keywords: Calcium MAPK Signalling Stress Virulence

ABSTRACT

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades and the calcium-calcineurin pathway control fundamental aspects of fungal growth, development and reproduction. Core elements of these signalling pathways are required for virulence in a wide array of fungal pathogens of plants and mammals. In this review, we have used the available genome databases to explore the structural conservation of three MAPK cascades and the calcium-calcineurin pathway in ten different fungal species, including model organisms, plant pathogens and human pathogens. While most known pathway components from the model yeast *Saccharomyces cerevisiae* appear to be widely conserved among taxonomically and biologically diverse fungi, some of them were found to be restricted to the *Saccharomycotina*. The presence of multiple paralogues in certain species such as the zygomycete *Rhizopus oryzae* and the incorporation of new functional domains that are lacking in *S. cerevisiae* signalling proteins, most likely reflect functional diversification or adaptation as filamentous fungi have evolved to occupy distinct ecological niches. © 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Adaptation to changes in the environment is crucial for viability of all organisms. In fungi, conserved signal transduction pathways control fundamental aspects of growth, development and reproduction. Two important classes of fungal signalling pathways are mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades and the calcium–calcineurin pathway. MAPK cascades are characterized by a three-tiered module comprising a MAP kinase kinase kinase (MAP-KKK), a MAP kinase kinase (MAPKK) and the MAPK which is activated by dual phosphorylation of conserved threonine and tyrosine residues within the activation loop (Chang and Karin, 2001). The calcium–calcineurin pathway functions via the Ca²⁺binding protein calmodulin and the calmodulin-dependent serine–threonine phosphatase, calcineurin (Chin and Means, 2000).

* Corresponding author. Fax: +34 957212072.

E-mail address: ge2dipia@uco.es (A. Di Pietro).

There is evidence for crosstalk between the MAPK and the calcium-calcineurin pathways, since the mating MAPK cascade regulates certain upstream components of the calcium-calcineurin pathway (Muller et al., 2003). Fungal MAPK and calcium signalling cascades are triggered by an array of stimuli and target a broad range of downstream effectors such as transcription factors, cytoskeletal proteins, protein kinases and other enzymes, thereby regulating processes such as the cell cycle, reproduction, morphogenesis and stress response (Cyert, 2003; Kraus and Heitman, 2003; Qi and Elion, 2005).

Core elements of MAPK and calcium signalling pathways are required for virulence in a wide array of fungal pathogens of plants and mammals (Kraus and Heitman, 2003; Lee et al., 2003; Lengeler et al., 2000; Zhao et al., 2007). Such a degree of functional conservation is remarkable, considering the taxonomic and biological diversity among these pathogens, but also raises a number of questions regarding the specific role of these pathways in fungal infection. Are virulence defects in signalling mutants simply caused by

^{1087-1845/\$ -} see front matter @ 2009 Elsevier Inc. All rights reserved. doi:10.1016/j.fgb.2009.01.002

perturbation of general metabolic and developmental processes, or are they related to "true" pathogenicity mechanisms that are specific for host infection? If the latter is true, what are these specific pathogenicity functions and which are the upstream and downstream signalling components that regulate their activity?

The availability of complete genome sequences from an increasing number of pathogenic fungi allows us to approach these questions at the genomic level. Comparative analysis of complete genome sequences from different yeasts and fungi has provided valuable insight into the evolution of genome organisation (Dietrich et al., 2004; Dujon et al., 2004; Kellis et al., 2004), facilitated the identification of regulatory sequences (Cliften et al., 2003) and assisted genome annotation (Dujon et al., 2004). Genome sequences are also valuable tools for the functional analysis of proteins and cellular pathways. At the protein level, comparison of orthologous sequences allows predictions on putative functional domains or key residues, whereas at the pathway level it provides the opportunity to assess the level of evolutionary conservation of specific pathways and to generate new hypotheses for their functional analysis.

In this review, we have explored the structural conservation of MAPK cascades and the calcium-calcineurin pathway in ten different fungi, including the model organisms Saccharomyces cerevisiae, Ashbya gossypii, Neurospora crassa and Schizosaccharomyces pombe, as well as three plant pathogens, Fusarium graminearum, Magnaporthe grisea and Ustilago maydis, the two human pathogens Aspergillus fumigatus, Candida albicans, and the opportunistic pathogen Rhizopus oryzae. The study included four species of filamentous ascomycetes from the subphylum Pezizomycotina (euascomycetes), one from the subphylum Taphrinomycotina (archiascomycetes) and three from the subphylum Saccharomycotina, as well as one basidiomycete (U. maydis) and one zygomycete (R. oryzae), thus covering a broad taxonomic range separated by nearly a billion years of evolution. The analysis addresses the conservation of signalling components beyond the core pathway modules, as well as the existence of paralogues in different organisms and the degree of sequence conservation among the components. Besides comparison of primary sequence, analysis of domain composition and predicted protein size was carried out to assess the quality of annotation in the genome databases.

2. Results

2.1. Pathway components included in the analysis

The following signalling pathways were included in the analysis: the Fus3 and Kss1 mating/filamentation MAPK cascade, the Mpk1 cell integrity MAPK cascade, the osmostress Hog1 MAPK cascade, and the calcium-calcineurin pathway. Database resources and bioinformatic analysis tools used in this study are indicated in Supplementary Table 1. Whenever possible, sequences were retrieved by BLAST (Altschul et al., 1997), using the S. cerevisiae sequence for query. Where blast searches with the S. cerevisiae sequence failed to retrieve a hit in a given species, orthologues from another species included in the analysis were used for blast analysis. Candidate genes were systematically validated by reciprocal blast, and only those that identified the original protein when used in a blast search of the S. cerevisiae genome were considered for further analysis. Multiple alignments, as well as calculations of identity scores, were performed with ClustalW at default settings. Validated candidate sequences were examined for potential annotation errors, and if required the annotation was corrected using the prediction software outlined in Supplementary Table 1. For several signalling components, orthologues from the basidiomycete human pathogen Cryptococcus neoformans were included in the analysis to confirm and extend results obtained in U. maydis.

Fig. 1 presents a schematic overview of the signalling pathways and their components in *S. cerevisiae*. Table 1 shows the number of orthologues for each component identified in the different fungal species. Identity scores of the *S. cerevisiae* protein with the closest orthologue of each species are provided in Supplementary Table 2. For a number of pathway components, reliable orthologues could not be detected in certain species, either because sequence conservation was too low or because they apparently do not exist. In the following sections, the results of the analysis are summarized for each of the pathways studied.

2.2. The Fus3 and Kss1 MAPK pathways

The Fus3 MAPK cascade mating pathway in S. cerevisiae has been characterized in detail (Elion, 2000; Gustin et al., 1998; Kurjan, 1993; Wang and Dohlman, 2004). Signalling is initiated when pheromone binds to the cognate cell surface receptors Ste2 or Ste3. Orthologues of Ste2 and Ste3 were identified in all ascomycetes tested in the study, including putative asexual species. Structural domains, such as the seven transmembrane regions, were well conserved although there were considerable variations in protein size. As reported previously (Bolker et al., 1992), the basidiomycete U. maydis has no Ste2 orthologues, but instead has two Ste3 orthologues, Pra1 and Pra2, reflecting the fact that basidiomycetes only have type a, but not type α pheromones. Analysis in *C. neoformans* provided similar results, suggesting that the duplication of Ste3like receptors occurred early in the basidiomycete clade. Neither Ste2 or Ste3 orthologues could be detected in the zygomycete R. oryzae. While this may be due to low sequence homology, an alternative explanation is that this type of receptors is not present in the zygomycetes, which employ a structurally distinct type of pheromones, trisporic acid derivatives, for sexual reproduction (Schimek and Wöstemeyer, 2006).

Once pheromone binds to its cognate receptor, it triggers dissociation of the G protein α subunit Gpa1 from the G protein $\beta\gamma$ subunits Ste4 and Ste18. Fungal G α proteins are divided into three groups according to their structure. *S. cerevisiae* Gpa1 and its orthologues in filamentous fungi belong to class I whereas Gpa2 belongs to class III (Li et al., 2007). In contrast, the two G α proteins in *S. pombe*, Gpa1 and Gpa2, belong to classes II and III, respectively. Due to its close homology with *S. cerevisiae* Gpa1, *S. pombe* Gpa1 was nevertheless included in the analysis. Gpa1 orthologues from *Saccharomycotina* contain a region of approximately 100 amino acids which is absent in the rest of the fungal species studied. All Gpa1 orthologues are predicted to be prenylated on the N-terminal cysteine residue and myristoylated on an N-terminal glycine residue required for the lipid-anchor to the plasma membrane.

According to a recent study, *R. oryzae* has four class I G α proteins, RO3G_01120, RO3G_09475, RO3G_0005 and RO3G_00875 (Li et al., 2007). We detected a new member of class I, RO3G_06003, whose original predicted sequence lacked the characteristic N-terminal region of G α proteins. The sequence annotation was manually corrected using Fgenesh+ to include the sequence of a predicted overlapping EST, resulting in a predicted polypeptide of 353 amino acids containing all typical features of G α proteins. In contrast, RO3G_00875 was found to be closer to *S. cerevisiae* Gpa2 and was therefore excluded from this analysis. We also identified new class II and class III G α proteins RO3G_16598 and RO3G_15639, respectively, both of which had not been described previously.

The heterotrimeric $\beta\gamma$ subunits Ste4 and Ste18 dissociate from G α to transmit the signal to the downstream pathway components (Wang and Dohlman, 2004). Only one orthologue of Ste4 and Ste18 was detected in most fungal species, except for *R. oryzae*, in which four orthologues of each subunit were identified (Table 1). For two putative G β subunits, RO3G_06062 and RO3G_08023, the pre-

Pheromones Starvation **High osmolarity** Hypotonic Shock Calcium/Calcineurin Mid1 Sho1 Ste2 Ste3 SIn1 Mid2 Cch1 Fig1 Hkr1 Sho1 Msb2 Msb2 L, Wsc1,2,3 Cdc4 (Ypd Rom2 Rhc Pkc' Sit⁴ Ste11 Bkc1, 2 Ste11 Ste11 Ŧ Pbs2 Ste5 Ste Mkk1. 2 Ste t t 1 Kss1 Hogi Fus3 Mpk1 Bni1 (Far1) Ste12

N. Rispail et al./Fungal Genetics and Biology 46 (2009) 287-298

Fig. 1. Schematic view of signalling components included in the study. Colors indicate different degrees of conservation among the fungal species *Saccharomyces cerevisiae*, *Ashbya gossypii* and *Candida albicans* (hemiascomycetes), *Schizosaccharomyces pombe* (archiascomycetes), *Aspergillus fumigatus, Fusarium graminearum, Magnaporthe grisea and Neurospora crassa* (euascomycetes), *Rhizopus oryzae* (zygomycetes) and *Ustilago maydis* (basidiomycetes): blue, components detected in all species studied; green, all except zygomycetes; orange, all except basidiomycetes; cyan, all except zygomycetes and archiascomycetes; pink, all except zygomycetes, basidiomycetes; red, all except euascomycetes; purple, only ascomycetes; yellow: only hemiascomycetes.

dicted sequence in the database lacked the first exon and was corrected manually. Similar to $G\alpha$ proteins, $G\beta$ subunits from the *Saccharomycotina* differ from those of filamentous fungi in size, due to the presence of additional regions throughout the length of the protein. All Ste18 orthologues contain a predicted prenylation site for lipid-anchoring to the membrane. No clear Ste18 orthologue was found in *S. pombe*, although its annotated genome contains a predicted G protein gamma subunit, Git11, which was included in the analysis.

Downstream of the $\beta\gamma$ subunits, the signal is transmitted to the guanine nucleotide exchange factor Cdc24 which activates the G protein Cdc42. Both proteins have one clear, and highly conserved orthologue in all fungal species, except for R. oryzae which contains two orthologues of each component. Cdc42 activates the PAK-like protein kinase Ste20 and the adaptor protein Ste50, which cooperate in activating the downstream MAPK module. Ste20 orthologues display considerable divergence in size between species. The predicted S. pombe and R. oryzae proteins are about 300 amino acids shorter than S. cerevisiae Ste20, whereas the orthologues from M. grisea, F. graminearum, A. fumigatus and U. maydis are approximately 100 residues longer, and that of C. albicans is 200 amino acids longer than the S. cerevisiae protein. The Ste20 orthologue Smu1 from U. maydis which contains a N-terminal Cdc42-binding domain and a C-terminal kinase domain, was previously found to be non-essential for mating and plant infection (Smith et al., 2004).

Orthologues of *S. cerevisiae* Ste50 were detected in all fungal species studied except for *R. oryzae*. Ste50 is an adaptor that links G protein-associated Cdc42–Ste20 complex to the MAPKKK Ste11 through the presence of a Sterile Alpha Motif (SAM) and a Ras Association (RA) domain (Wu et al., 1999). The SAM domain of the *M. grisea* orthologue Mst50 was previously shown to be essen-

tial for its interaction with Mst11 and for appressorium formation (Zhao et al., 2005). Interestingly, Ste50 orthologues of the basidiomycetes *U. maydis* (Ubc2) and *C. neoformans* are approximately double in size and contain a Src Homology 3 (SH3) domain which is lacking in the ascomycete Ste50 proteins. Deletion of the *U. maydis* orthologue Ubc2 was found to impair pheromone responses and virulence. Interestingly, the SH3 domains of Ubc2 were apparently not involved in morphogenesis, but clearly required for pathogenicity, suggesting that they are required for some, but not all signalling outputs of the pathway (Mayorga and Gold, 2001).

Bem1 is a SH3-domain protein that links the Ste5–MAPK cascade complex to upstream activators and specific downstream substrates, thus enabling efficient circuitry for G1 arrest and mating (Lyons et al., 1996). Bem1 orthologues are well conserved in the fungal species studied. *R. oryzae* has two Bem1 orthologues, one of which (RO3G_02285) contains a Rho-GDI domain that is lacking in the other Bem1 proteins. On the other hand, a conserved PB1 domain associated with heterodimer formation is lacking in the Bem1 orthologues of *C. albicans, R. oryzae* and *U. maydis.*

The MAPK module of the *S. cerevisiae* pheromone response pathway is composed of MAPKKK Ste11, MAPKK Ste7 and MAPK Fus3 (Wang and Dohlman, 2004). Ste11 functions in the Fus3 and Kss1 cascade, as well as in the Hog1 pathway by phosphorylating MAPKKs Ste7 and Pbs2, respectively. It contains a sterile alpha motif (SAM) domain involved in interaction with Ste50 (Grimshaw et al., 2004), which is conserved in all fungal orthologues except that of *A. gossypii*. In addition, Ste11 proteins from *F. graminearum*, *M. grisea*, *N. crassa* and *R. oryzae* contain a Ras association (RA) domain which is lacking in the other Ste11 orthologues. In *S. cerevisiae*, the RA domain of Ste50, an interaction partner of Ste11, is essential for tethering Ste11 to the plasma membrane through

Author's personal copy

Table 1

tified in diff

Signalling pathway components included in the study and number of orthologues identified in different fungal species.											
Protein	Function	Saccharomyces cerevisiae	Ashbya gossypii	Candida albicans	Schizosaccharomyces pombe	Aspergillus fumigatus	Fusarium graminearum	Magnaporthe grisea	Neurosapora crassa	Rhizopus oryzae	Ustilago maydis
Fus3 and	Fus3 and Kss1 MAPK pathway										
Ste2	α-Factor pheromone receptor	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
Ste3	a-Factor receptor	1	1	1	1	1	1	1	1	0	2
Gpa1	Guanine nucleotide-binding protein α subunit	1	1	1	1	1	1	1	1	4	1
Ste4	Guanine nucleotide-binding protein β subunit	1	1	1	1	1	1	1	1	4	1
Ste18	Guanine nucleotide-binding protein γ subunit	1	1	1	1	1	1	1	1	4	1
Cdc24	Guanine nucleotide exchange factor	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
Cdc42	Small rho-like GTPase	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
Bem1	SH3-domain protein	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
Ras2	GTP-binding protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ste20	PAK (p21-activated kinase)	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
Ste50	Protein kinase regulator	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Ste11	MAP kinase kinase kinase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ste7	MAP kinase kinase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ste5	Pheromone-response scaffold protein	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Fus3/ Kss1ª	MAP Kinase	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2
Ste12	Transcription factor	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0
Bni1	Formin	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Tec1	TEA/ATTS DNA-binding domain transcription factor	1	1	1	0	1	0	0	0	2	1
Sst2	Regulator of G protein signalling	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
Far1	Cyclin-dependent kinase inhibitor	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
Msg5/ Sdp1 ^a	MAPK phosphatase	2	1	1	1	1	1	0	1	2	2
Dig1	Regulatory protein	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Dig2	Regulatory protein	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ptp2/3 ^a	Tyrosine-protein phosphatase 3	2	2	2	2	1	1	1	1	2	1
Hog1 MA	DK nothum										
HOGI WAI	A painway Musin formilu momentum	2	2	1	0	1	1	1	1	0	1
Hkr1 ^a		2	2	1	0	1	1	1	1	0	1
Sho1	Transmembrane osmosensor	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
SIn1	Osmosensing histidine protein kinase	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0
Ypd1	Phosphorelay intermediate protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Cdc42	Small rho-like GTPase	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
Ste20	PAK (p21-activated kinase)	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
Cla4	PAK (p21-activated kinase)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ssk1	Cytoplasmic response regulator	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ste50	Protein kinase regulator	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Ste11	MAP kinase kinase kinase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ssk2/22 ⁴	MAP kinase kinase kinase	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1
Pbs2	MAP kinase kinase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Hog1	MAP kinase	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1
Rck1/2 ^a	Serine-threonine protein kinase	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1
Sko1	Basic leucine zipper (bZIP) transcription factor	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Msn2/4 ^a	Zinc finger transcription factor	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Hot1	Transcription factor	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Smp1/ Rlm1 ^a	MADS-box transcription factor	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1
Mcm1	MADS-box transcription factor	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1

Author's	personal	сору

Ptc2/3 ^ª	Protein phosphatase 2C homolog 2	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1
Mpk1 MA	Maki MADK pathway										
Wsc1	Plasma membrane sensor	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
Wsc2/3 ^a	Plasma membrane sensor	2	1	1	1	1	1	1	1	0	0
Mid2/	Plasma membrane sensor	2	1	ว		0	0	0	0	0	0
Mtl1		2		2	0		0	0	0	0	0
Zeo1	Peripheral membrane protein	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Rom1/2 ^ª	Guanine nucleotide exchange factor	2	1	1	2	1	1	1	1	2	1
Tus1	Guanine nucleotide exchange factor	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Sac7	GTPase activating protein	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Bem2	GTPase activating protein	1	1	1	0	0	0	0	0	2	1
Rho1	GTP-binding protein	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1
Pkc1	Protein kinase C	1	1	1	2	1	1	1	1	2	1
Sit4	Type 2A-related serine-threonine phosphatase	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
Bck1	MAP kinase kinase kinase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Bck2	MAP kinase kinase kinase	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Mkk1/2 ^a	MAP kinase kinase	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mpk1	MAP kinase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Swi4/	DNA-binding component of the SBF complex	2	2	1	2	1	1	1	1	2	1
Swi6	Transcription cofactor	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Smn1/	MADS-box transcription factor	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1
Rlm1 ^a	wibs box traiscription factor	2		•			1	1	1	2	
Fks2	Catalytic subunit of β-1,3-glucan synthase	1	1	1	4	1	1	1	1	1	1
Pst1	Cell wall protein	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0
Ppz1/2 ^a	Protein Phosphatase Z	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1
Pir3	Protein containing internal repeats	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Msg5/	MAPK phosphatase	2	1	1	1	1	1	0	1	2	2
Sdp1 ^a											
Ptp2/3 ^a	Tyrosine-protein phosphatase 3	2	2	2	2	1	1	1	1	2	1
C ^{2[*]} -calueurin pathway											
Cch1	Probable calcium-channel protein	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
Mid1	Putative stretch-activated Ca ²⁺ channel	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	component										
Fiø1	Integral membrane protein required for efficien	t1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
	mating			•	•	•	•	•	•	0	0
Cmd1	Calmodulin	1	1	1	2	1	1	1	1	4	1
Cna1/	Calcineurin subunit A	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1
Cmp2 ^a		2		1	1			1		2	
Cnb1	Calcineurin subunit B	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Pmc1	Calcium-transporting ATPase 2	1	1	1	1	3	5	3	2	5	1
Pmr1	Calcium-transporting ATPase 1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
Vcx1	Vacuolar calcium ion transporter	1	1	1	1	4	4	5	5	5	2
Yvc1	Vacuolar cation channel	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1
Fpr1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Cpr1	Pentidyl-prolyl cis-trans isomerase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Rcn1	Calcineurin inhibitor	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Cr71	Transcriptional regulator	1	1	1	2	1	1	1	1	2	1
C121	Transcriptional regulator				2					2	

Ptc1
Protein phosphatase 2C homolog 1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
1
<th1</th>
<th1</th>
<th1</th>
<

^a Two paralogues present in *Saccharomyces cerevisiae*.

association of Ste50 with Cdc42 (Truckses et al., 2006). The presence of a RA domain in Ste11 in filamentous species suggests, that the MAPKKK in these fungi could localize to the plasma membrane by directly binding Cdc42. Orthologues of the MAPKK Ste7 were detected in all species. Fuz7 and Mst7 were previously shown to be required for mating and virulence in *U. maydis* (Banuett and Herskowitz, 1994) and *M. grisea* (Zhao et al., 2005).

In S. cerevisiae, two MAPKs regulate distinct signalling outputs downstream of Ste7. One of them, Fus3, is essential for mating, whereas the other, Kss1, controls invasive growth and pseudohyphal development (Madhani et al., 1997). In contrast to Fus3, Kss1 can also be activated by Ste7 that is not bound to the Ste5 scaffold (Elion, 1998). Fus3 and Kss1 orthologues play crucial roles during infection in many plant pathogenic fungi including the three phytopathogens surveyed in this study, M. grisea (Xu and Hamer, 1996), F. graminearum (Jenczmionka et al., 2003) and U. maydis (Brachmann et al., 2003; Mayorga and Gold, 1999; Muller et al., 1999). Several species analyzed here have two orthologues of Fus3 and Kss1, including the close relative of S. cerevisiae, A. gossypii. In C. albicans, one of the two MAPKs, Cek2, clusters close to the Saccharomycotina sequences whereas the second MAPK, Cek1, which is involved in yeast-hyphal switching, mating efficiency and virulence (Csank et al., 1998; Chen et al., 2002), is more closely related to MAPK orthologues from filamentous Ascomycetes. In U. maydis, Kpp2 (Ubc3) and Kpp6 are two orthologues with overlapping functions in mating and plant infection, but Kpp6, which contains an unusual N-terminal domain, appears to be more specific for host penetration (Brachmann et al., 2003). The zygomycete R. oryzae also has two orthologues of Fus3 and Kss1 whose functions remain to be determined.

The scaffold protein Ste5 plays an essential role in *S. cerevisiae* pheromone signalling by recruiting the Ste11–Ste7–Fus3 complex to the plasma membrane (Pryciak and Huntress, 1998) and stimulating phosphorelay by proximity effects, oligomerization, and conformational changes (Qi and Elion, 2005). Our analysis failed to detect Ste5 orthologues in any of the fungal species studied except *A. gossypii*. It is possible that other, hitherto unknown, signal-ling components may carry out the scaffold function in this MAPK pathway.

Phosphorylated Fus3 in S. cerevisiae activates downstream effectors such as Ste12, Far1 or Sst2, leading to cell cycle arrest, polarized growth and formation of specialized fusion tubes called shmoos (Elion et al., 1993). Ste12 is a key transcription factor downstream of the pheromone-response cascade, which binds to pheromone response elements (PREs) in the upstream activating sequences of its target genes and, in cooperation with Tec1, also regulates genes involved in invasive growth (Madhani and Fink, 1997). A single Ste12 orthologue was detected in all fungal species examined, except S. pombe and U. maydis. Lack of Ste12 in U. may*dis* appears to be characteristic for this species rather than for the basidiomycete group, since C. neoformans does contain mating type-specific Ste12 orthologues (Wickes et al., 1997). In addition to the characteristic Ste-like homeodomain in the N-terminal region of the protein, Ste12 orthologues from filamentous fungi contain two C-terminal C_2H_2 zinc finger motifs which are lacking in the Saccharomycotina (Fig. 2A). The role of the zinc finger domain in Ste12 function is poorly understood. In M. grisea, both the Stelike region and the zinc finger region of Mst12 were required for invasive growth and virulence on rice plants (Park et al., 2004).

Far1 mediates the cell cycle arrest in response to pheromone (Peter et al., 1993), and specifies direction of polarized growth during mating by linking the heterotrimeric G $\beta\gamma$ subunits to the polarity establishment machinery (Butty et al., 1998). The Far1 protein contains a C₃HC₄-type ring zinc finger domain with a predicted role in the ubiquitination pathway. Far1 was recently shown to act as a dosage-dependent regulator of the pheromone response

during mating in *C. albicans* (Cote and Whiteway, 2008). Far1 orthologues were found in all species except *S. pombe* and *R. ory-zae*. In spite of sharing a low degree of sequence conservation (10–20%), all predicted Far1 proteins have the characteristic ring zinc finger domain. In addition, Far1 orthologues from filamentous fungi, but not from *Saccharomycotina*, contain a pleckstrin homology domain and a von Willebrand factor type A (VWA) domain, indicative of a possible involvement in multiprotein complexes (Fig. 2B). The role of Far1 proteins in fungal pathogenicity has not been addressed experimentally so far.

Sst2 is a GTPase-activating regulator of G protein signalling (RGS) for Gpa1, which regulates pheromone desensitization and prevents receptor-independent signalling of the mating pathway (Dohlman et al., 1996). Orthologues of Sst2 were identified in all species examined, including two orthologues in *R. oryzae*. Annotation errors in the predicted protein database sequences of *F. graminearum* and *M. grisea* were corrected manually. *S. pombe* Sst2 is significantly shorter (480 aa) than the rest of the orthologues (650–780 aa). All Sst2 proteins share the RGS domain, but the predicted *A. gossypii* and *C. albicans* proteins lack a conserved DEP-like segment (residues 50–135) which is required for binding to the cognate G protein-coupled receptor Ste2 (Ballon et al., 2006).

The filamentation and pseudohyphal growth pathway in S. cerevisiae is activated by a mucin-like protein, Msb2, consisting of a Nterminal signal peptide, an extracellular serine-threonine-rich repeat region predicted to be highly O-glycosylated, a single transmembrane domain and a short cytoplasmic tail interacting with the downstream component Cdc42 (Cullen et al., 2004). Recently a second mucin-like protein, Hkr1, was shown to function together with Msb2 as an osmosensor in the S. cerevisiae Hog1 pathway (Tatebayashi et al., 2007). We detected single orthologues of Msb2, but not Hkr1, in all species studied except for S. pombe and R. oryzae. Only A. gossypii has also an orthologue of Hkr1. All predicted Msb2 proteins contain a putative signal peptide and transmembrane region. While the exact amino acid repeats in the extracellular region are not present in some of the fungal orthologues, the high content of putatively glycosylated serine and threonine residues in this region is maintained, suggesting a conserved role of O-glycosylation in Msb2 function. Similarly, the amino acid sequence of the short cytoplasmatic tail is well conserved among filamentous ascomycetes, indicating an important role of this domain in intracellular signalling.

Another component required specifically for the filamentation and invasive growth pathway upstream of Cdc42, Ste20 and Kss1 is the small GTP-binding protein Ras2 (Mosch et al., 1996). In C. albicans, Ras links cellular morphogenesis to virulence by regulating the MAPK and cAMP signalling pathways (Leberer et al., 2001). In U. maydis, expression of a dominant active allele of the ras2 orthologue promoted pseudohyphal growth in a manner dependent on the pheromone-response MAPK cascade (Lee and Kronstad, 2002). Likewise, expression of a dominant active ras2 allele of M. grisea stimulated appressorium formation on non-inductive surfaces in the wild-type strain, but not in the *pmk1* mutant, suggesting that Ras2 functions upstream of the Mst11-Mst7-Pmk1 cascade (Park et al., 2006). A similar signalling role for Ras2 was proposed in F. graminearum (Bluhm et al., 2007). In this study, Ras2 orthologues containing predicted palmitoyl and farnesyl groups at the C-terminus for membrane localization were identified in all fungal species studied.

In *S. cerevisiae*, two nuclear protein substrates of Kss1, Dig1 and Dig2, negatively regulate the invasive growth pathway by repressing Ste12 action (Cook et al., 1996). We failed to detect Dig1 and Dig2 orthologues in any of the species analyzed except for the close relative *A. gossypii*, suggesting that a regulatory mechanism other than that mediated by Dig1 and Dig2 must be operating in filamentous fungi.

N. Rispail et al./Fungal Genetics and Biology 46 (2009) 287-298



Fig. 2. Scaled cartoon of the domain structure of Ste12 and Far1 orthologues from different fungal species. (A) Ste12 orthologues all contain a characteristic STE homeodomain in the N-terminal region. In addition, filamentous ascomycetes and the zygomycete *R. oryzae* have a C₂H₂ zinc finger domain in the C-terminal region. (B) Far1 orthologues all contain a C₃HC₄ ring type zinc finger domain in the N-terminal region. In addition, filamentous ascomycetes and the sygomycete and the basidiomycete *U. maydis* have a pleckstrin homology domain and a von Willebrand factor type A domain, whereas *A. gossypii* has an enolase domain.

For activation of genes involved in filamentous and invasive growth, Ste12 forms a heterodimer with the TEA/ATTS family transcription factor Tec1 to bind filamentation response elements (FREs) (Madhani and Fink, 1997). It has been suggested that Tec1 orthologues of pathogenic fungi could be of interest due to their possible implication in virulence (Madhani and Fink, 1998). Indeed, the Tec1 orthologue of *C. albicans* regulates hyphal development and virulence (Schweizer et al., 2000). However, in our survey we failed to detect clear Tec1 orthologues in *S. pombe* and the filamentous ascomycetes *F. graminearum, M. grisea* and *N. crassa*. Interestingly, the human pathogen *A. fumigatus* contains a Tec1 orthologue that is highly similar to *A. nidulans* AbaA, a transcription factor with an ATTS DNA-binding motif required for conidiophore development (Andrianopoulos and Timberlake, 1994). The role of Tec1 in virulence of *A. fumigatus* has not been explored so far.

In summary, most components of the Fus3 and Kss1 MAPK cascades are well conserved among the fungal species studied, including basidiomycetes and zygomycetes. Exceptions are the pheromone-response scaffold protein Ste5 and the two Ste12 regulators Dig1 and Dig2. A noteworthy finding is the multiplicity of heterotrimeric G protein subunits in the zygomycete *R. oryzae*.

2.3. The Hog1 MAPK pathway

The high osmolarity glycerol (HOG) pathway mediates responses to hyperosmotic shock and to other stresses (Hohmann et al., 2007).

In S. cerevisiae, the Hog1 pathway has two upstream branches that converge on the MAPKK Pbs2 (see Fig. 1). One branch consists of a phosphorelay system composed of the sensor histidine kinase Sln1, the phosphotransfer protein Ypd1 and the response regulator Ssk1. Hyperosmotic shock deactivates Sln1, leading to enhanced levels of dephospho-Ssk1 and sequential phosphorylation of the MAP-KKKs Ssk2 and Ssk22, the MAPKK Pbs2 and the MAPK Hog1 (Posas et al., 1996). Whereas Sln1 is the only histidine kinase present in S. cerevisiae, other fungi contain multiple histidine kinases which can be classified into different groups according to their topology (Catlett et al., 2003). Members of group VI, which includes Sln1, contain two transmembrane domains in addition to the characteristic phosphoacceptor, ATP-binding and response regulator receiver domains. The C. albicans orthologue CaSLN1 was shown to be involved in hyphal formation and virulence (Nagahashi et al., 1998), whereas deletion of the A. fumigatus orthologue TcsB produced no clear phenotype (Du et al., 2006). Orthologues, in which the critical Sln1 domains are conserved, were identified in most species studied. However, S. pombe, U. maydis and R. oryzae genomes do not contain any member of group VI. By contrast, a single orthologue of the phosphorelay protein Ypd1 and of the cytoplasmic response regulator Ssk1 was identified in all species. C. albicans mutants lacking Ssk1 are avirulent in an invasive murine model and fail to adhere to human cells (Calera et al., 2000). The orthologous RRG-1 response regulator from N. crassa was recently shown to function upstream of the osmoresponse MAPK pathway, and to regulate asexual develop-

ment, female fertility, osmotic stress and fungicide resistance (Jones et al., 2007).

The MAPKKKs Ssk2 and Ssk22 function downstream of the Sln1 branch to activate the MAPKK Pbs2 and the MAPK Hog1. All fungi surveyed including, *A. gossypii*, contain a single orthologue of Ssk2/Ssk22, except for *S. pombe* which has two paralogues clustering in a separate branch with the basidiomycetes and zygomycetes.

In the second osmosensing branch, the plasma membrane protein Sho1 recruits the MAPKKK Ste11 and the MAPKK Pbs2 to the cell surface. Orthologues of Sho1 displaying conserved structural features were detected in all species studied, except *S. pombe* and *R. oryzae.* Sho1 orthologues were found to link oxidative stress to morphogenesis and cell wall biosynthesis in *C. albicans* (Bermejo et al., 2008; Roman et al., 2005) and to regulate hyphal growth, morphology and oxidant adaptation in *A. fumigatus* (Ma et al., 2008), but were dispensable for virulence in both human pathogens. The role of Sho1 in fungal pathogenicity on plants has not been determined yet.

Similar to the Fus3 and Kss1 pathway, activation of Ste11 by the Sho1 branch of the osmoresponse pathway requires the small G protein Cdc42, the adaptor protein Ste50 and the PAK kinase Ste20 (Raitt et al., 2000). A second PAK kinase, Cla4, functions in parallel with Ste20 (Tatebayashi et al., 2006). In this study we detected a single Cla4 orthologue in all the fungal species studied.

The MAPKK Pbs2 serves as a scaffold for several components of the HOG pathway and integrates the two upper branches of the pathway. Phosphorylation of Pbs2 via Ssk2 and Ssk22 occurs under severe osmotic stress (Posas et al., 1996), whereas its activation by Ste11 takes place under less severe hyperosmotic conditions, whereby Pbs2 acts as a scaffold for Sho1, Ste11 and Hog1 (Posas and Saito, 1997). Single Pbs2 orthologues showing a conserved domain composition were detected in all the species studied.

All fungi surveyed contain a single orthologue of the osmoresponse MAPK Hog1, except for A. fumigatus which has two orthologues, similar to other Aspergilli (Miskei et al., 2009). The role of Hog1 orthologues has been studied in different fungal pathogens. C. albicans hog1 mutants are de-repressed in serum-induced hyphal formation and show reduced virulence (Alonso-Monge et al., 1999). In A. fumigatus, two Hog1 orthologues, SakA and MpkC play distinct roles in the response to oxidative and nutritional stresses but are not required for virulence (Reyes et al., 2006; Xue et al., 2004). Likewise, *M. grisea* mutants lacking the Hog1 orthologue Osm1 were sensitive to osmotic stress, but formed functional appressoria and were fully virulent on rice plants (Dixon et al., 1999). In F. graminearum, deletion mutants of MAPKKK FgOs4, MAPKK FgOs5 and MAPK FgOs2 showed markedly enhanced pigmentation and failed to produce trichothecenes in aerial hyphae, although their virulence phenotype has yet to be determined (Ochiai et al., 2007).

Downstream targets of Hog1 in *S. cerevisiae* include the MAPKdependent protein kinases Rck1 and Rck2 (Bilsland et al., 2004), as well as the transcription factors Sko1 (Rep et al., 2001), Msn2 and Msn4 (Martinez-Pastor et al., 1996), Hot1 (Rep et al., 2000), Smp1 and Rlm1 (de Nadal et al., 2003), and Mcm1 (Yu et al., 1995). Our study indicates that all these downstream components are well conserved across the fungal phyla, except for Hot1 whose presence is limited to the *Saccharomycotina*. In most cases, single orthologues of each component were detected, although *R. oryzae* has two orthologues for the MADS-box transcription factors Smp1, Rlm1 and Mcm1. In summary, the components of the Hog MAPK pathway are very well conserved throughout the fungal kingdoms, with the exception of the transcription factor Hot1 which is specific for the *Saccharomycotina*.

2.4. The Mpk1 cell integrity pathway

The Mpk1 cell integrity cascade is responsible for orchestrating changes in the cell wall through the cell cycle and in re-

sponse to various forms of stress (Levin, 2005). This pathway is activated by the integrin-like proteins Wsc1,2,3 which share a conserved extracellular motif of eight cysteines (Verna et al., 1997). A second activator of the Mpk1 pathway is Mid2, an Oglycosylated plasma membrane protein that interacts with Rom2, the guanine nucleotide exchange factor for Rho1, and with the cell integrity pathway protein Zeo1 (Philip and Levin, 2001). Orthologues of the Wsc1 and Wsc2 and 3 proteins are present in most ascomycetes, whereas Mid2 and Zeo1 are restricted to the Saccharomycotina. Wsc1 and Mid2 are linked to the guanine nucleotide exchange factors (GEFs) Rom1 and 2 which activate the GTPase Rho1 (Ozaki et al., 1996). Similar to S. cerevisiae, Rho1 is required for cell viability in C. albicans (Smith et al., 2002). In contrast, rho1 knockout mutants of the soilborne pathogen Fusarium oxysporum were viable and showed drastically reduced virulence on plants, but retained full virulence on immunodepressed mice (Martinez-Rocha et al., 2008). Both Rom1 and 2, as well as Rho1, are widely conserved in fungi, with a single orthologue of the two GEFs present in almost all species studied. In addition, Rho1 activity in S. cerevisiae is regulated by the GEF Tus1 and the GTPase activating proteins Sac7 and Bem2 (Levin, 2005). Both Tus1 and Sac7 are widely conserved among the fungal species studied. By contrast, Bem2 was detected in the Saccharomycotina, U. maydis and R. oryzae, but not in the other ascomycetes. The evolutionary and functional implications of this interesting differential distribution are currently unknown.

Rho1 activates protein kinase C (PKC) 1 which, in turn, activates a three-tiered kinase module composed of the MAPKKK Bck1, the MAPKKs Mkk1 and Mkk2 and the MAPK Mpk1 (Levin, 2005). In contrast to most fungi surveyed in this study, R. oryzae has two Pkc1 orthologues, as previously described for S. pombe (Kobori et al., 1994). Single orthologues were detected for each of the three components of the Mpk1 MAPK module. The role of Mpk1 orthologues has been determined in a number of fungal pathogens. Mps1 is essential for conidiation, appressorial penetration, and plant infection in M. grisea (Xu et al., 1998). In F. graminearum, Mgv1 is required for hyphal fusion and heterokaryon formation (Hou et al., 2002). In C. albicans, Mkc1 regulates cell wall integrity, growth at high temperatures, morphological transition and pathogenesis (Diez-Orejas et al., 1997). Recently, it was shown that the A. fumigatus orthologue MpkA controls cell wall signalling and oxidative stress response, but is dispensable for virulence (Valiante et al., 2008).

Mpk1 regulates multiple nuclear targets, including the SBF complex which is formed by DNA-binding component Swi4, Mbp1 and co-factor Swi6 and acts as a transcriptional activator of cell cycle-dependent genes (Nasmyth and Dirick, 1991). Two Swi4 and Mbp1 orthologues were found in *A. gossypii, S. pombe* and *R. oryzae*, opposed to only one in the other fungi. By contrast, all species studied have a single Swi6 orthologue.

A second nuclear target of Mpk1 is the MADS-box transcription factor Rlm1 which regulates the expression of at least 25 genes in *S. cerevisiae*, most of which have been implicated in cell wall biogenesis and function (Jung et al., 2002). These include the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein Pst1, the O-glycosylated protein Pir3 (Jung and Levin, 1999) and the glucan synthase catalytic subunit Fks2. Conserved orthologues were detected for Rlm1 itself, Pst1 (except in *U. maydis*) and Fks2 (including four orthologues in *S. pombe*). By contrast, no Pir3 orthologues were found outside of the *Saccharomycotina*.

The serine/threonine protein phosphatases Ppz1 and Ppz2 are key regulators of K⁺ and pH homeostasis, thus determining salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression (Yenush et al., 2002). In contrast to *S. cerevisiae*, all fungal species studied with the exception of *R. oryzae* contain only a single Ppz1 and 2 orthologue.

In summary, a high conservation of the Mpk1 MAPK cascade components was detected throughout the species studied, except for certain plasma membrane sensors such as Mid2, and for the downstream effector protein Pir3.

2.5. MAPK-regulatory protein phosphatases

Tyrosine, serine/threonine and dual-specificity phosphatases co-ordinately dephosphorylate and thereby inactivate different MAPKs in S. cerevisiae (Martin et al., 2005). The dual-specificity protein phosphatase Msg5 and the tyrosine phosphatase Ptp3 dephosphorylate Fus3, thereby regulating the adaptive response to pheromone (Zhan et al., 1997). Ptp2 and 3, as well as the type 2C protein phosphatase (PP2C) Ptc1 antagonize the osmosensing MAPK cascade by dephosphorylating Hog1 (Warmka et al., 2001; Wurgler-Murphy et al., 1997). The stress-inducible dualspecificity MAPK phosphatase Sdp1 negatively regulates the cell integrity pathway by dephosphorylating Mpk1 (Hahn and Thiele, 2002). In general, orthologues of these protein phosphatases were detected in all fungal species surveyed, suggesting that the mechanisms of regulating MAPK activity via dephosphorylation are broadly conserved in fungi. We detected mostly single orthologues, except for the Saccharomycotina and, in some cases, U. maydis and R. oryzae. The M. grisea genome database lacked an annotated Msg5 orthologue, but inspection of a genomic region from the excluded reads of annotated strain 70-15 and subsequent analysis of a genomic fragment from a field isolate (Y34) revealed the presence of a reliable Msg5 orthologue which was included in the analysis.

2.6. The calcium/calcineurin signalling pathway

Calcium signalling through the Ca²⁺-binding protein calmodulin and the Ca²⁺-calmodulin-dependent phosphatase calcineurin has been implicated in a multitude of processes, including stress response, mating, budding, and actin-based processes (Cyert, 2001) as well as in determining tolerance to antifungal drugs (Cruz et al., 2002; Del Poeta et al., 2000; Kontoyiannis et al., 2003; Sanglard et al., 2003; Steinbach et al., 2007; Walker et al., 2008). Cellular calcium levels in *S. cerevisiae* are regulated by multiple channels and transporters, including the voltage-gated high-affinity calcium channel Cch1 which functions together with the stretch-activated cation channel Mid1 (Locke et al., 2000). In contrast to the transmembrane protein Cch1, Mid1 is anchored to the membrane by a GPI-anchor.

A third player in calcium regulation is Fig1, an integral membrane protein required for efficient mating which may participate in the low affinity Ca^{2+} influx system, affecting intracellular signalling and cell-cell fusion (Muller et al., 2003). Cch1, Mid1 and Fig. 1 have single orthologues in all fungal species studied, except for the presence of two putative Cch1 orthologues in *R. oryzae*, and for the absence of Fig. 1 orthologues in *U. maydis* and *R. oryzae*. Both *R. oryzae* Cch1 sequences in the database contained annotation errors that were corrected manually. The role of these upstream sensors in filamentous fungi is largely unknown. Recently, a *N. crassa* mutant lacking a Mid1 orthologue was found to be affected in calcium homeostasis and vegetative growth (Lew et al., 2008). Moreover, deletion of a Cch1 orthologue affected ascospore discharge and mycelial growth in *F. graminearum* (Hallen and Trail, 2008).

In addition to plasma membrane channels, the calcium-transporting ATPases Pmr1 and Pmc1, the vacuolar ion exchanger Vcx1 and the vacuolar cation channel Yvc1 also contribute to regulation of cellular calcium levels and calcium signalling. Strikingly, while *S. cerevisiae* only has one of each of these components, filamentous fungi consistently contain two Pmr1 orthologues and most of them have between three and five orthologues of Pmc1 and Vcx1. Whether these multiple components have distinct or redundant functions is currently an open question.

S. cerevisiae calmodulin is a small, essential Ca²⁺-binding protein encoded by CMD1, which has both Ca2+-dependent and independent targets. One of the major Ca²⁺-dependent targets is calcineurin, a Ca²⁺ and calmodulin dependent phosphatase. S. cerevisiae calcineurin is composed of a heterodimer of a catalytic A subunit encoded by CMP2 and CNA1, and of a regulatory B subunit encoded by CNB1. In the presence of stimulatory levels of Ca²⁺, calmodulin binds to the A subunit of calcineurin, displacing an autoinhibitory domain. Calmodulin-calcineurin-activated gene expression is triggered by multiple external cues, including high temperature, high concentrations of ions, cell wall stress and exposure to mating pheromone (Cyert, 2003; Kraus and Heitman, 2003). In our survey we detected single orthologues for Cmd1, Cnb1, Cna1 and Cmp2, respectively, except for R. oryzae which has two Cna1 and Cmp2 orthologues. All these components showed a high degree of sequence identity (40-90%) among the fungal species studied. In the human pathogens C. albicans, C. neoformans and A. fumigatus, calcineurin was required for survival in serum and for virulence (Bader et al., 2003; Blankenship et al., 2003; Da Silva Ferreira et al., 2007; Fox et al., 2001; Odom et al., 1997; Steinbach et al., 2006, 2007). In the plant pathogen Sclerotinia sclerotiorum, the calcineurin orthologue controls sclerotial development and infection (Harel et al., 2006).

A key target of calcineurin is the zinc finger transcription factor Crz1, whose nuclear localization is positively regulated by calcineurin-mediated dephosphorylation (Cyert, 2001). Orthologues of Crz1 were recently shown to act as virulence factors in the human pathogen *A. fumigatus* (Cramer et al., 2008; Soriani et al., 2008) and the plant pathogen *Botrytis cinerea* (Schumacher et al., 2008). The fungal species surveyed in this study all contain a single orthologue of Crz1, except for *S. pombe* and *R. oryzae* which have two orthologues.

Fpr1 and Cpr1, two peptidyl–prolyl cis–trans isomerases that catalyze the cis–trans isomerization of peptide bonds N-terminal to proline residues, are the cellular targets of the drugs Cyclosporin A and FK506 and function as inhibitors of calcineurin through formation of a ternary complex (Wang and Heitman, 2005). Orthologues of these two proteins were detected in all fungal species studied, although their role in calcineurin regulation has not been determined. Similarly, orthologues of the Rcn1 protein, which is involved in regulation of calcineurin during calcium signalling (Kingsbury and Cunningham, 2000), were found in all species except *R. oryzae.*

In summary, all the components of the calcium–calcineurin pathway were highly conserved throughout the different fungal kingdoms. A noteworthy feature, whose biological significance is unclear, is the multiplicity of the calcium-transporting ATPases and the vacuolar calcium channels in filamentous fungal species.

3. Conclusions

Three conserved MAPK cascades and the calcium–calcineurin pathway play crucial roles in fungal pathogenicity. Here we have taken advantage of the availability of complete fungal genome sequences to survey the inventory of predicted MAPK and calcium–calcineurin signalling components in ten fungal species, including several plant and human pathogens, covering a wide array of taxonomical and biological diversity (Fig. 1, Table 1). While most components were found to be conserved among the model yeast *S. cerevisiae* and filamentous fungi, some components such as the scaffold protein Ste5, the regulatory proteins Dig1 and Dig2 and the transcription factor Hot1 are limited to the *Saccharomycotina*. The incorporation of new domains which are lacking in *S. cerevisi*

N. Rispail et al. / Fungal Genetics and Biology 46 (2009) 287-298

ae, such as the RA domain in Ste11, the zinc finger in Ste12, or the pleckstrin homology domain and VWA domains in Far1 (Fig. 2), might reflect functional adaptations as filamentous fungi have evolved to occupy different ecological niches, including their roles as pathogenic agents. The presence of multiple paralogues of many signalling components in the zygomycete R. oryzae is striking, although the evolutionary and functional significance of this finding is currently unknown. Thus, while the model yeast S. cerevisiae has provided an excellent roadmap of the components of MAPK and calcium-calcineurin pathways, functional analysis in pathogenic species represents the only way to understand the role of these signalling cascades in fungal virulence. So far, most studies have focused on a few core pathway components. While this has provided a useful overview of the general implication of these pathways in fungal virulence, a detailed analysis of the upstream and downstream factors that interact with these core signalling cascades is now clearly necessary. Such an approach should allow a more careful and critical evaluation of the specific role of each signalling pathway in infection-associated functions, and extend our understanding regarding how these conserved signalling cascades have been recruited by fungal pathogens to infect their eukaryotic hosts.

Acknowledgments

The authors acknowledge access to the genome data generated by the Broad Institute/Fungal Genome Initiative. We are grateful for the valuable suggestions of the anonymous reviewers. This analysis was carried out by members of the SIGNALPATH Marie Curie training network (MRTN-CT-2005-019277), which provided financial support for N.R., C.A., R.C., A.G., R.H., E.P.N., A.P., E.S., V.V. and M.Y.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.fgb.2009.01.002.

References

- Alonso-Monge, R., Navarro-Garcia, F., Molero, G., Diez-Orejas, R., Gustin, M., Pla, J., Sanchez, M., Nombela, C., 1999. Role of the mitogen-activated protein kinase Hog1p in morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. J. Bacteriol. 181, 3058–3068.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucl. Acids Res. 25, 3389–3402.
- Andrianopoulos, A., Timberlake, W.E., 1994. The Aspergillus nidulans abaA gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. Mol. Cell Biol. 14, 2503–2515.
- Bader, T., Bodendorfer, B., Schroppel, K., Morschhauser, J., 2003. Calcineurin is essential for virulence in *Candida albicans*. Infect. Immun. 71, 5344–5354.
- Ballon, D.R., Flanary, P.L., Gladue, D.P., Konopka, J.B., Dohlman, H.G., Thorner, J., 2006. DEP-domain-mediated regulation of GPCR signaling responses. Cell 126, 1079–1093.
- Banuett, F., Herskowitz, I., 1994. Identification of fuz7, a Ustilago maydis MEK/ MAPKK homolog required for a-locus-dependent and -independent steps in the fungal life cycle. Genes Dev. 8, 1367–1378.
- Bermejo, C., Rodriguez, E., Garcia, R., Rodriguez-Pena, J.M., Rodriguez de la Concepcion, M.L., Rivas, C., Arias, P., Nombela, C., Posas, F., Arroyo, J., 2008. The sequential activation of the yeast HOG and SLT2 pathways is required for cell survival to cell wall stress. Mol. Biol. Cell 19, 1113–1124.
- Bilsland, E., Molin, C., Swaminathan, S., Ramne, A., Sunnerhagen, P., 2004. Rck1 and Rck2 MAPKAP kinases and the HOG pathway are required for oxidative stress resistance. Mol. Microbiol. 53, 1743–1756.
- Blankenship, J.R., Wormley, F.L., Boyce, M.K., Schell, W.A., Filler, S.G., Perfect, J.R., Heitman, J., 2003. Calcineurin is essential for *Candida albicans* survival in serum and virulence. Eukaryot. Cell 2, 422–430.
- Bluhm, B.H., Zhao, X., Flaherty, J.E., Xu, J.R., Dunkle, L.D., 2007. RAS2 regulates growth and pathogenesis in *Fusarium graminearum*. Mol. Plant Microbe Interact. 20, 627–636.
- Bolker, M., Urban, M., Kahmann, R., 1992. The a mating type locus of U. Maydis specifies cell signaling components. Cell 68, 441–450.

- Brachmann, A., Schirawski, J., Muller, P., Kahmann, R., 2003. An unusual MAP kinase is required for efficient penetration of the plant surface by Ustilago maydis. EMBO J. 22, 2199–2210.
- Butty, A.C., Pryciak, P.M., Huang, L.S., Herskowitz, I., Peter, M., 1998. The role of Far1p in linking the heterotrimeric G protein to polarity establishment proteins during yeast mating. Science 282, 1511–1516.
- Calera, J.A., Zhao, X.J., Calderone, R., 2000. Defective hyphal development and avirulence caused by a deletion of the SSK1 response regulator gene in *Candida albicans*. Infect. Immun. 68, 518–525.
- Catlett, N.L., Yoder, O.C., Turgeon, B.G., 2003. Whole-genome analysis of twocomponent signal transduction genes in fungal pathogens. Eukaryot. Cell 2, 1151–1161.
- Cliften, P., Sudarsanam, P., Desikan, A., Fulton, L., Fulton, B., Majors, J., Waterston, R., Cohen, B.A., Johnston, M., 2003. Finding functional features in *Saccharomyces* genomes by phylogenetic footprinting. Science 301, 71–76.
- Cook, J.G., Bardwell, L., Kron, S.J., Thorner, J., 1996. Two novel targets of the MAP kinase Kss1 are negative regulators of invasive growth in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Genes Dev. 10, 2831–2848.
- Cote, P., Whiteway, M., 2008. The role of *Candida albicans* FAR1 in regulation of pheromone-mediated mating, gene expression and cell cycle arrest. Mol. Microbiol. 68, 392–404.
- Cramer Jr., R.A., Perfect, B.Z., Pinchai, N., Park, S., Perlin, D.S., Asfaw, Y.G., Heitman, J., Perfect, J.R., Steinbach, W.J., 2008. Calcineurin target CrzA regulates conidial germination, hyphal growth, and pathogenesis of *Aspergillus fumigatus*. Eukaryot. Cell 7, 1085–1097.
- Cruz, M.C., Goldstein, A.L., Blankenship, J.R., Del Poeta, M., Davis, D., Cardenas, M.E., Perfect, J.R., McCusker, J.H., Heitman, J., 2002. Calcineurin is essential for survival during membrane stress in *Candida albicans*. EMBO J. 21, 546–559.
- Csank, C., Schroppel, K., Leberer, E., Harcus, D., Mohamed, O., Meloche, S., Thomas, D.Y., Whiteway, M., 1998. Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. Infect. Immun. 66, 2713–2721.
- Cullen, P.J., Sabbagh Jr., W., Graham, E., Irick, M.M., van Olden, E.K., Neal, C., Delrow, J., Bardwell, L., Sprague Jr., G.F., 2004. A signaling mucin at the head of the Cdc42- and MAPK-dependent filamentous growth pathway in yeast. Genes Dev. 18, 1695–1708.
- Cyert, M.S., 2001. Genetic analysis of calmodulin and its targets in Saccharomyces cerevisiae. Annu. Rev. Genet. 35, 647–672.
- Cyert, M.S., 2003. Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: how yeast go crazy in response to stress. Biochem. Biophys. Res. Commun. 311, 1143–1150.
- Chang, L., Karin, M., 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature 410, 37–40.
- Chen, J., Chen, J., Lane, S., Liu, H., 2002. A conserved mitogen-activated protein kinase pathway is required for mating in *Candida albicans*. Mol. Microbiol. 46, 1335–1344.
- Chin, D., Means, A.R., 2000. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. Trends Cell Biol. 10, 322–328.
- da Silva Ferreira, M.E., Heinekamp, T., Hartl, A., Brakhage, A.A., Semighini, C.P., Harris, S.D., Savoldi, M., de Gouvea, P.F., De Souza Goldman, M.H., Goldman, G.H., 2007. Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* calcineurin. Fungal Genet. Biol. 44, 219–230.
- de Nadal, E., Casadome, L., Posas, F., 2003. Targeting the MEF2-like transcription factor Smp1 by the stress-activated Hog1 mitogen-activated protein kinase. Mol. Cell Biol. 23, 229–237.
- Del Poeta, M., Cruz, M.C., Cardenas, M.E., Perfect, J.R., Heitman, J., 2000. Synergistic antifungal activities of bafilomycin A(1), fluconazole, and the pneumocandin MK-0991/caspofungin acetate (L-743, 873) with calcineurin inhibitors FK506 and L-685, 818 against *Cryptococcus neoformans*. Antimicrob. Agents Chemother. 44, 739–746.
- Dietrich, F.S., Voegeli, S., Brachat, S., Lerch, A., Gates, K., Steiner, S., Mohr, C., Pohlmann, R., Luedi, P., Choi, S., Wing, R.A., Flavier, A., Gaffney, T.D., Philippsen, P., 2004. The Ashbya gossypii genome as a tool for mapping the ancient Saccharomyces cerevisiae genome. Science 304, 304–307.
- Diez-Orejas, R., Molero, G., Navarro-Garcia, F., Pla, J., Nombela, C., Sanchez-Perez, M., 1997. Reduced virulence of *Candida albicans MKC1* mutants: a role for mitogenactivated protein kinase in pathogenesis. Infect. Immun. 65, 833–837.
- activated protein kinase in pathogenesis. Infect. Immun. 65, 833–837. Dixon, K.P., Xu, J.R., Smirnoff, N., Talbot, N.J., 1999. Independent signaling pathways regulate cellular turgor during hyperosmotic stress and appressoriummediated plant infection by *Magnaporthe grisea*. Plant Cell 11, 2045–2058.
- Dohlman, H.G., Song, J., Ma, D., Courchesne, W.E., Thorner, J., 1996. Sst2, a negative regulator of pheromone signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: expression, localization, and genetic interaction and physical association with Gpa1 (the G-protein alpha subunit). Mol. Cell Biol. 16, 5194–5209.
- Du, C., Sarfati, J., Latge, J.P., Calderone, R., 2006. The role of the sakA (Hog1) and tcsB (sln1) genes in the oxidant adaptation of Aspergillus fumigatus. Med. Mycol. 44, 211–218.
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., De Montigny, J., Marck, C., Neuveglise, C., Talla, E., Goffard, N., Frangeul, L., Aigle, M., Anthouard, V., Babour, A., Barbe, V., Barnay, S., Blanchin, S., Beckerich, J.M., Beyne, E., Bleykasten, C., Boisrame, A., Boyer, J., Cattolico, L., Confanioleri, F., De Daruvar, A., Despons, L., Fabre, E., Fairhead, C., Ferry-Dumazet, H., Groppi, A., Hantraye, F., Hennequin, C., Jauniaux, N., Joyet, P., Kachouri, R., Kerrest, A., Koszul, R., Lemaire, M., Lesur, I., Ma, L., Muller, H., Nicaud, J.M., Nikolski, M., Oztas, S., Ozier-Kalogeropoulos, O., Pellenz, S., Potier, S., Richard, G.F., Straub, M.L., Suleau, A., Swennen, D., Tekaia, F., Wesolowski-Louvel, M., Westhof, E., Wirth, B., Zeniou-Meyer, M., Zivanovic, I., Bolotin-Fukuhara, M., Thierry, A.,
N. Rispail et al. / Fungal Genetics and Biology 46 (2009) 287-298

Bouchier, C., Caudron, B., Scarpelli, C., Gaillardin, C., Weissenbach, J., Wincker, P., Souciet, J.L., 2004. Genome evolution in yeasts. Nature 430, 35–44. Elion, E.A., 1998. Routing MAP kinase cascades. Science 281, 1625–1626.

- Elion, E.A., 2000. Pheromone response, mating and cell biology. Curr. Opin. Microbiol. 3, 573-581. Elion, E.A., Satterberg, B., Kranz, J.E., 1993. FUS3 phosphorylates multiple
- components of the mating signal transduction cascade: evidence for STE12 and FAR1. Mol. Biol. Cell 4, 495–510.
- Fox, D.S., Cruz, M.C., Sia, R.A., Ke, H., Cox, G.M., Cardenas, M.E., Heitman, J., 2001. Calcineurin regulatory subunit is essential for virulence and mediates interactions with FKBP12-FK506 in Cryptococcus neoformans. Mol. Microbiol. 39, 835-849.
- Grimshaw, S.J., Mott, H.R., Stott, K.M., Nielsen, P.R., Evetts, K.A., Hopkins, L.J., Nietlispach, D., Owen, D., 2004. Structure of the sterile alpha motif (SAM) domain of the Saccharomyces cerevisiae mitogen-activated protein kinase pathway-modulating protein STE50 and analysis of its interaction with the STE11 SAM. J. Biol. Chem. 279, 2192–2201.
- Gustin, M.C., Albertyn, J., Alexander, M., Davenport, K., 1998. MAP kinase pathways in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 1264-1300.
- Hahn, J.S., Thiele, D.J., 2002. Regulation of the Saccharomyces cerevisiae Slt2 kinase pathway by the stress-inducible Sdp1 dual specificity phosphatase. J. Biol. Chem. 277, 21278–21284.
- Hallen, H.E., Trail, F., 2008. The L-type calcium ion channel cch1 affects ascospore discharge and mycelial growth in the filamentous fungus Gibberella zeae (anamorph Fusarium graminearum). Eukaryot. Cell 7, 415-424.
- Harel, A., Bercovich, S., Yarden, O., 2006. Calcineurin is required for sclerotial development and pathogenicity of Sclerotinia sclerotiorum in an oxalic acidindependent manner. Mol. Plant Microbe Interact. 19, 682-693.
- Hohmann, S., Krantz, M., Nordlander, B., 2007. Yeast osmoregulation. Methods Enzymol. 428, 29-45.
- Hou, Z., Xue, C., Peng, Y., Katan, T., Kistler, H.C., Xu, J.R., 2002. A mitogen-activated protein kinase gene (MGV1) in Fusarium graminearum is required for female fertility, heterokaryon formation, and plant infection. Mol. Plant Microbe Interact. 15, 1119-1127.
- Jenczmionka, N.J., Maier, F.J., Losch, A.P., Schafer, W., 2003. Mating, conidiation and pathogenicity of Fusarium graminearum, the main causal agent of the headblight disease of wheat, are regulated by the MAP kinase gpmk1. Curr. Genet. 43, 87-95.
- Jones, C.A., Greer-Phillips, S.E., Borkovich, K.A., 2007. The response regulator RRG-1 functions upstream of a mitogen-activated protein kinase pathway impacting asexual development, female fertility, osmotic stress, and fungicide resistance in Neurospora crassa. Mol. Biol. Cell 18, 2123-2136.
- Jung, U.S., Levin, D.E., 1999. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. Mol. Microbiol. 34, 1049-1057.
- Jung, U.S., Sobering, A.K., Romeo, M.J., Levin, D.E., 2002. Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase. Mol. Microbiol. 46, 781-789.
- Kellis, M., Birren, B.W., Lander, E.S., 2004. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Nature 428, 617-624. Kingsbury, T.J., Cunningham, K.W., 2000. A conserved family of calcineurin
- regulators. Genes Dev. 14, 1595-1604.
- Kobori, H., Toda, T., Yaguchi, H., Toya, M., Yanagida, M., Osumi, M., 1994. Fission yeast protein kinase C gene homologues are required for protoplast regeneration: a functional link between cell wall formation and cell shape control. J. Cell Sci. 107 (Pt 5), 1131–1136. Kontoyiannis, D.P., Lewis, R.E., Osherov, N., Albert, N.D., May, G.S., 2003.
- Combination of caspofungin with inhibitors of the calcineurin pathway attenuates growth in vitro in Aspergillus species. J. Antimicrob. Chemother. 51, 313-316
- Kraus, P.R., Heitman, J., 2003. Coping with stress: calmodulin and calcineurin in model and pathogenic fungi. Biochem. Biophys. Res. Commun. 311, 1151-1157.
- Kurjan, J., 1993. The pheromone response pathway in Saccharomyces cerevisiae. Annu. Rev. Genet. 27, 147-179.
- Leberer, E., Harcus, D., Dignard, D., Johnson, L., Ushinsky, S., Thomas, D.Y., Schroppel, K., 2001. Ras links cellular morphogenesis to virulence by regulation of the MAP kinase and cAMP signalling pathways in the pathogenic fungus *Candida albicans*. Mol. Microbiol. 42, 673–687.
- Lee, N., D'Souza, C.A., Kronstad, J.W., 2003. Of smuts, blasts, mildews, and blights: cAMP signaling in phytopathogenic fungi. Annu. Rev. Phytopathol. 41, 399-427
- Lee, N., Kronstad, J.W., 2002. Ras2 Controls morphogenesis, pheromone response, and pathogenicity in the fungal pathogen Ustilago maydis. Eukaryot. Cell 1, 954-966.
- Lengeler, K.B., Davidson, R.C., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W.C., Wang, P., Pan, X., Waugh, M., Heitman, J., 2000. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64, 746-785.
- Levin, D.E., 2005. Cell wall integrity signaling in Saccharomyces cerevisiae. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 69, 262-291.
- Lew, R.R., Abbas, Z., Anderca, M.I., Free, S.J., 2008. Phenotype of a mechanosensitive channel mutant, mid-1, in a filamentous fungus, Neurospora crassa. Eukaryot. Cell 7. 647-655.
- Li, L., Wright, S.J., Krystofova, S., Park, G., Borkovich, K.A., 2007. Heterotrimeric G protein signaling in filamentous fungi. Annu. Rev. Microbiol. 61, 423-452.
- Locke, E.G., Bonilla, M., Liang, L., Takita, Y., Cunningham, K.W., 2000. A homolog of voltage-gated Ca(2+) channels stimulated by depletion of secretory Ca(2+) in yeast. Mol. Cell Biol. 20, 6686–6694.

- Lyons, D.M., Mahanty, S.K., Choi, K.Y., Manandhar, M., Elion, E.A., 1996. The SH3domain protein Bem1 coordinates mitogen-activated protein kinase cascade activation with cell cycle control in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell Biol. 16. 4095-4106.
- Ma, Y., Qiao, J., Liu, W., Wan, Z., Wang, X., Calderone, R., Li, R., 2008. The sho1 sensor regulates growth, morphology, and oxidant adaptation in Aspergillus fumigatus but is not essential for development of invasive pulmonary aspergillosis. Infect. Immun. 76. 1695-1701.
- Madhani, H.D., Fink, G.R., 1997. Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. Science 275, 1314–1317. Madhani, H.D., Fink, G.R., 1998. The control of filamentous differentiation and
- virulence in fungi. Trends Cell Biol. 8, 348-353.
- Madhani, H.D., Styles, C.A., Fink, G.R., 1997. MAP kinases with distinct inhibitory functions impart signaling specificity during yeast differentiation. Cell 91, 673-684.
- Martin, H., Flandez, M., Nombela, C., Molina, M., 2005. Protein phosphatases in MAPK signalling: we keep learning from yeast. Mol. Microbiol. 58, 6–16. Martinez-Pastor, M.T., Marchler, G., Schuller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H.,
- Estruch, F., 1996. The Saccharomyces cerevisiae zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). EMBO J. 15, 2227–2235. Martinez-Rocha, A.L., Roncero, M.I., Lopez-Ramirez, A., Marine, M., Guarro, J.,
- Martinez-Cadena, G., Di Pietro, A., 2008. Rho1 has distinct functions in morphogenesis, cell wall biosynthesis and virulence of Fusarium oxysporum. Cell Microbiol. 10, 1339-1351.
- Mayorga, M.E., Gold, S.E., 1999. A MAP kinase encoded by the ubc3 gene of Ustilago maydis is required for filamentous growth and full virulence. Mol. Microbiol. 34, 485-497
- Mayorga, M.E., Gold, S.E., 2001. The ubc2 gene of Ustilago maydis encodes a putative novel adaptor protein required for filamentous growth, pheromone response and virulence. Mol. Microbiol. 41, 1365-1379.
- Miskei, M., Karanyi, Z., Pocsi, I., 2009. Annotation of stress-response proteins in the aspergilli. Fungal Genet. Biol. 46, S105-S120.
- Mosch, H.U., Roberts, R.L., Fink, G.R., 1996. Ras2 signals via the Cdc42/Ste20/ mitogen-activated protein kinase module to induce filamentous growth in Saccharomyces cerevisiae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 5352-5356.
- Muller, E.M., Mackin, N.A., Erdman, S.E., Cunningham, K.W., 2003. Fig1p facilitates Ca²⁺ influx and cell fusion during mating of Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 278, 38461-38469.
- Muller, P., Aichinger, C., Feldbrugge, M., Kahmann, R., 1999. The MAP kinase kpp2 regulates mating and pathogenic development in Ustilago maydis. Mol. Microbiol. 34, 1007–1017.
- Nagahashi, S., Mio, T., Ono, N., Yamada-Okabe, T., Arisawa, M., Bussey, H., Yamada-Okabe, H., 1998. Isolation of CaSLN1 and CaNIK1, the genes for osmosensing histidine kinase homologues, from the pathogenic fungus Candida albicans. Microbiology 144 (Pt 2), 425–432. Nasmyth, K., Dirick, L., 1991. The role of SWI4 and SWI6 in the activity of G1 cyclins
- in yeast. Cell 66, 995-1013.
- Ochiai, N., Tokai, T., Nishiuchi, T., Takahashi-Ando, N., Fujimura, M., Kimura, M., 2007. Involvement of the osmosensor histidine kinase and osmotic stressactivated protein kinases in the regulation of secondary metabolism in Fusarium graminearum. Biochem. Biophys. Res. Commun. 363, 639–644. Odom, A., Muir, S., Lim, E., Toffaletti, D.L., Perfect, J., Heitman, J., 1997. Calcineurin is
- required for virulence of Cryptococcus neoformans. EMBO J. 16, 2576-2589.
- Ozaki, K., Tanaka, K., Imamura, H., Hihara, T., Kameyama, T., Nonaka, H., Hirano, H., Matsuura, Y., Takai, Y., 1996. Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces* cerevisiae. EMBO J. 15, 2196-2207.
- Park, G., Bruno, K.S., Staiger, C.J., Talbot, N.J., Xu, J.R., 2004. Independent genetic mechanisms mediate turgor generation and penetration peg formation during plant infection in the rice blast fungus. Mol. Microbiol. 53, 1695-1707.
- Park, G., Xue, C., Zhao, X., Kim, Y., Orbach, M., Xu, J.R., 2006. Multiple upstream signals converge on the adaptor protein Mst50 in Magnaporthe grisea. Plant Cell 18, 2822-2835.
- Peter, M., Gartner, A., Horecka, J., Ammerer, G., Herskowitz, I., 1993. FAR1 links the
- signal transduction pathway to the cell cycle machinery in yeast. Cell 73, 747–760. Philip, B., Levin, D.E., 2001. Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. Mol. Cell Biol. 21, 271-280.
- Posas, F., Saito, H., 1997. Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. Science 276, 1702–1705. Posas, F., Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A., Thai, T.C., Saito, H., 1996.
- Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. Cell 86, 865-875.
- Pryciak, P.M., Huntress, F.A., 1998. Membrane recruitment of the kinase cascade scaffold protein Ste5 by the Gbetagamma complex underlies activation of the yeast pheromone response pathway. Genes Dev. 12, 2684-2697.
- Qi, M., Elion, E.A., 2005. MAP kinase pathways. J. Cell Sci. 118, 3569–3572
- Raitt, D.C., Posas, F., Saito, H., 2000. Yeast Cdc42 GTPase and Ste20 PAK-like kinase regulate Sho1-dependent activation of the Hog1 MAPK pathway. EMBO J. 19, 4623-4631.
- Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J.M., Hohmann, S., 2000. The transcriptional response of Saccharomyces cerevisiae to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathwaydependent genes. J. Biol. Chem. 275, 8290–8300.

Author's personal copy

298

N. Rispail et al. / Fungal Genetics and Biology 46 (2009) 287-298

- Rep, M., Proft, M., Remize, F., Tamas, M., Serrano, R., Thevelein, J.M., Hohmann, S., 2001. The Saccharomyces cerevisiae Sko1p transcription factor mediates HOG pathway-dependent osmotic regulation of a set of genes encoding enzymes implicated in protection from oxidative damage. Mol. Microbiol. 40, 1067– 1083.
- Reyes, G., Romans, A., Nguyen, C.K., May, G.S., 2006. Novel mitogen-activated protein kinase MpkC of *Aspergillus fumigatus* is required for utilization of polyalcohol sugars. Eukaryot. Cell 5, 1934–1940.
- Roman, E., Nombela, C., Pla, J., 2005. The Sho1 adaptor protein links oxidative stress to morphogenesis and cell wall biosynthesis in the fungal pathogen *Candida albicans*. Mol. Cell Biol. 25, 10611–10627.
- Sanglard, D., Ischer, F., Marchetti, O., Entenza, J., Bille, J., 2003. Calcineurin A of *Candida albicans*: involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. Mol. Microbiol. 48, 959–976.
- Schimek, C., Wöstemeyer, J., 2006. Pheromone action in the fungal groups Chytridiomycota, and Zygomycota, and in the Oomycota. In: Kües, U., Fischer, R. (Eds.), The Mycota. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 215–231.
- Schumacher, J., de Larrinoa, J.F., Tudzynski, B., 2008. Calcineurin-responsive zinc finger transcription factor CRZ1 of *Botrytis cinerea* is required for growth, development, and full virulence on bean plants. Eukaryot. Cell 7, 584–601.
- Schweizer, A., Rupp, S., Taylor, B.N., Rollinghoff, M., Schroppel, K., 2000. The TEA/ ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. Mol. Microbiol. 38, 435–445.
- Smith, D.G., Garcia-Pedrajas, M.D., Hong, W., Yu, Z., Gold, S.E., Perlin, M.H., 2004. An ste20 homologue in *Ustilago maydis* plays a role in mating and pathogenicity. Eukaryot. Cell 3, 180–189.
- Smith, S.E., Csank, C., Reyes, G., Ghannoum, M.A., Berlin, V., 2002. Candida albicans RHO1 is required for cell viability in vitro and in vivo. FEMS Yeast Res. 2, 103– 111.
- Soriani, F.M., Malavazi, I., da Silva Ferreira, M.E., Savoldi, M., Von Zeska Kress, M.R., de Souza Goldman, M.H., Loss, O., Bignell, E., Goldman, G.H., 2008. Functional characterization of the Aspergillus fumigatus CRZ1 homologue, CrzA. Mol. Microbiol. 67, 1274–1291.
- Steinbach, W.J., Cramer Jr., R.A., Perfect, B.Z., Asfaw, Y.G., Sauer, T.C., Najvar, L.K., Kirkpatrick, W.R., Patterson, T.F., Benjamin Jr., D.K., Heitman, J., Perfect, J.R., 2006. Calcineurin controls growth, morphology, and pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. Eukaryot. Cell 5, 1091–1103.
- Steinbach, W.J., Reedy, J.L., Cramer Jr., R.A., Perfect, J.R., Heitman, J., 2007. Harnessing calcineurin as a novel anti-infective agent against invasive fungal infections. Nat. Rev. Microbiol. 5, 418–430.
- Tatebayashi, K., Tanaka, K., Yang, H.Y., Yamamoto, K., Matsushita, Y., Tomida, T., Imai, M., Saito, H., 2007. Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. EMBO J. 26, 3521– 3533.
- Tatebayashi, K., Yamamoto, K., Tanaka, K., Tomida, T., Maruoka, T., Kasukawa, E., Saito, H., 2006. Adaptor functions of Cdc42, Ste50, and Sho1 in the yeast osmoregulatory HOG MAPK pathway. EMBO J. 25, 3033–3044.
- Truckses, D.M., Bloomekatz, J.E., Thorner, J., 2006. The RA domain of Ste50 adaptor protein is required for delivery of Ste11 to the plasma membrane in the

filamentous growth signaling pathway of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell Biol. 26, 912–928.

- Valiante, V., Heinekamp, T., Jain, R., Hartl, A., Brakhage, A.A., 2008. The mitogenactivated protein kinase MpkA of *Aspergillus fumigatus* regulates cell wall signaling and oxidative stress response. Fungal Genet. Biol. 45, 618–627.
- Verna, J., Lodder, A., Lee, K., Vagts, A., Ballester, R., 1997. A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 13804–13809.
- Walker, L.A., Munro, C.A., de Bruijn, I., Lenardon, M.D., McKinnon, A., Gow, N.A., 2008. Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. PLoS Pathog. 4, e1000040.
- Wang, P., Heitman, J., 2005. The cyclophilins. Genome Biol. 6, 226.
- Wang, Y., Dohlman, H.G., 2004. Pheromone signaling mechanisms in yeast: a prototypical sex machine. Science 306, 1508–1509.
- Warmka, J., Hanneman, J., Lee, J., Amin, D., Ota, I., 2001. Ptc1, a type 2C Ser/Thr phosphatase, inactivates the HOG pathway by dephosphorylating the mitogenactivated protein kinase Hog1. Mol. Cell Biol. 21, 51–60.
- Wickes, B.L., Edman, U., Edman, J.C., 1997. The Cryptococcus neoformans STE12alpha gene: a putative Saccharomyces cerevisiae STE12 homologue that is mating type specific. Mol. Microbiol. 26, 951–960.
- Wu, C., Leberer, E., Thomas, D.Y., Whiteway, M., 1999. Functional characterization of the interaction of Ste50p with Ste11p MAPKKK in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Biol. Cell 10, 2425–2440.
- Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A., Saito, H., 1997. Regulation of the Saccharomyces cerevisiae HOG1 mitogen-activated protein kinase by the PTP2 and PTP3 protein tyrosine phosphatases. Mol. Cell Biol. 17, 1289–1297.
- Xu, J.R., Hamer, J.E., 1996. MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus Magnaporthe grisea. Genes Dev. 10, 2696–2706.
- Xu, J.R., Staiger, C.J., Hamer, J.E., 1998. Inactivation of the mitogen-activated protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 12713–12718.
- Xue, T., Nguyen, C.K., Romans, A., May, G.S., 2004. A mitogen-activated protein kinase that senses nitrogen regulates conidial germination and growth in *Aspergillus fumigatus*. Eukaryot. Cell 3, 557–560.
- Yenush, L., Mulet, J.M., Arino, J., Serrano, R., 2002. The Ppz protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. EMBO J. 21, 920–929.
- Yu, G., Deschenes, R.J., Fassler, J.S., 1995. The essential transcription factor, Mcm1, is a downstream target of Sln1, a yeast "two-component" regulator. J. Biol. Chem. 270, 8739–8743.
- Zhan, X.L., Deschenes, R.J., Guan, K.L., 1997. Differential regulation of FUS3 MAP kinase by tyrosine-specific phosphatases PTP2/PTP3 and dual-specificity phosphatase MSG5 in Saccharomyces cerevisiae. Genes Dev. 11, 1690–1702.
- Zhao, X., Kim, Y., Park, G., Xu, J.R., 2005. A mitogen-activated protein kinase cascade regulating infection-related morphogenesis in *Magnaporthe grisea*. Plant Cell 17, 1317–1329.
- Zhao, X., Mehrabi, R., Xu, J.R., 2007. Mitogen-activated protein kinase pathways and fungal pathogenesis. Eukaryot. Cell 6, 1701–1714.



Figure 15 : La voie de PKC régule l'intégrité cellulaire. La cascade de PKC MAPK est activée en réponse à la chaleur et au stress osmotique et au manque d'éléments nutritifs. Hcs77 est un mechano-senseur putatif. Pkc1 semble activer une branche de la cascade (une branche est le MAPK et l'autre est hypothétique). Les flèches pleines indiquent l'activation; la flèche à tiret est spéculative (Banuett,*et al.* 1998)



Figure 16: La cascade de signalisation de l'intégrité de la paroi, Slt2, chez *S.cerevisiea*, ainsi que les cibles déterminées de Mapk Slt2 (VigneshMuthuvijayan et Mark R. Marten, 2004)

3. Voies de signalisation impliquées dans le contrôle de l'intégrité cellulaire et pariétale

3.1. Voie de signalisation Slt2 chez la levure *S. cerevisiae*

La voie de signalisation Slt2 (Figure 15) est connue pour être impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, durant la synthèse de la paroi cellulaire chez *S. cerevisiae* ou/et en présence de stress comme l'hypo-osmolarité, une température élevée, un stress oxydatif (Staleva L., Hall A., Orlow S. J., 2004) ou une carence nutritionnelle. Un des rôles majeurs de cette voie est de maintenir l'intégrité cellulaire en contrôlant le système de réparation et la synthèse de la paroi cellulaire (Zarzoc, *et al.* 1996). La cascade de signalisation débute avec l'activation de Wcs1, une protéine membranaire putative connue comme « membrane stretching » (Figure 15).

Tout d'abord, il est constaté que la surexpression de HCS77 reproduit la surexpression de PKC1 en supprimant le défaut de croissance des mutants nuls de swi4 (Figure 16), qui est un des facteurs de transcription activés par Slt2.

En second lieu, il est observé que les mutants nuls *Ahcs77* montrent des phénotypes comme ceux des mutants défectueux dans la voie PKC1, notamment incapable de réparer les dommages d'un stress osmotique. En outre, les mutants Δ hcs77 sont morts une fois exposés aux rayons α (J.V.Gray, données non publiées), qui a été noté pour les mutants Δ mpk1 (Levin, D. E., et al. 1995). La délétion de HCS77 est létale en combinaison avec la délétion de SW14, de même que les mutants $\Delta mpk1$. De plus, les mutants $\Delta hcs77$ sont hypersensibles à l'inhibition partielle de la fonction Pkc1, laissant supposer que Pkc1 n'est pas entièrement activé chez le mutant (Levin, D. E., et al. 1997). Hcs77 est connu comme activateur de Rho1 qui, à son tour, active la protéine kinase C, homologue de Pkc1. En effet, Hcs77 envoie des signaux à la Pkc1 sur les défauts au niveau de la membrane plasmique en réponse à des stress. Ces senseurs interagissent avec Rom2p pour transmettre le signal à Rho1p, une petite protéine extrêmement conservée fixant le GTP, qui active directement Pkc1p. Il a été également démontré que Rho1 est une partie essentielle du complexe $1,3-\beta$ -glucane synthase, responsable de construction des polymères dans la paroi cellulaire (Kamada Y., et al. 1996). Pkc1 active la MAPKKK Bck1 qui va activer les MAPKKs Mkk1 et Mkk2 qui vont enfin activer la MAPK Slt2. Cette dernière permet ensuite l'activation par phosphorylation de facteurs de transcription tels que Rlm1 et le complexe SBF (Swi4 et Swi6).

La mutation de chacun des composants de cette voie résulte en une hypersensibilité aux températures élevées, et en une augmentation de la lyse cellulaire, dans des conditions de stress, même faibles, due à la faiblesse de la paroi cellulaire (Levin, D. E., *et al.* 1994).

3.2. Les facteurs de transcriptions, Cibles de *SLT2*

3.2.1. Les facteurs de transcription

Chez les eucaryotes, il existe trois différentes ARN polymérases (ARN pol). Chacune de ces ARN pol est responsable de la transcription d'un type d'ARN : l'ARN pol I transcrit les ARN ribosomiques (ARNr) ; l'ARN pol II transcrit les ARN messagers (ARNm) ; enfin, l'ARN pol III transcrit les ARN de transfert et les petits ARN (ARNt). Toute protéine nécessaire à l'initiation de la transcription est définie comme un facteur de transcription. Plusieurs facteurs de transcription agissent en reconnaissant directement des séquences cis-régulatrices au niveau des régions promotrices des gènes. Cependant, la liaison à l'ADN n'est pas toujours requise pour l'action d'un facteur de transcription. Un facteur de transcription peut ainsi reconnaître un autre facteur de transcription qui se lie directement à l'ADN, ou bien reconnaît directement l'ARN polymérase.

Les facteurs de transcription reconnaissent généralement des petites séquences d'ADN conservées contenues au niveau des promoteurs de leurs gènes cibles. Certains de ces facteurs et de ces séquences sont communs à plusieurs gènes et utilisés de manière constitutive, et d'autres sont spécifiques de gènes et leur activité est régulée. Les facteurs de transcription coopèrent avec les ARN polymérases et peuvent être divisés en trois groupes :

Les facteurs généraux de transcription, qui sont nécessaires à l'initiation de la synthèse de l'ARN au niveau des gènes de classe II (gènes codants pour des protéines). Ils forment avec l'ARN pol II un complexe au niveau du site d'initiation de la transcription et déterminent ainsi le site de démarrage de la transcription ; ce complexe est appelé complexe basal de transcription.

Les facteurs de transcription généraux et spécifiques de séquence, qui reconnaissent des petites séquences d'ADN localisées en amont du site de démarrage de la transcription (comme le facteur SP-1 qui reconnaît les boîtes GC) sont ubiquitaires, ils augmentent l'efficacité de la transcription des gènes contenant les boîtes GC dans leurs promoteurs.

Les facteurs de transcription spécifiques de séquence et inductibles, qui possèdent un rôle régulateur. Ils sont synthétisés ou activés d'une manière spécifique en fonction des conditions, du stade de développement ou dans certains tissus. Les séquences qu'ils reconnaissent sont appelées les « éléments de réponse ».

3.2.2. SBF Complexe : Swi4 – Swi6

Un des facteurs de transcription jouant un rôle important dans la signalisation impliquée dans la voie de l'intégrité cellulaire de la paroi est SBF (Koch, C. et K. Nasmyth, 1994) (SCB Binding Factor), un complexe hétérodimère induisant l'expression de nombreux gènes dépendants du cycle cellulaire au stade de transition G1/S. Ce complexe est composé de SWI4 (Andrew B., *et al.* 2001) et Swi6qui reconnaissent la séquence CACGAAA (SCB, for Swi4,6-dependent Cell Cycle Box) (Koch, C. *et al.* 1994). SWI4 est la sous-unité se liant à l'ADN (Taylor,

et al. 2000), et Swi6 n'est exigé que pour l'attachement d'ADN (Andrews, B. J., *et al.* 1992). SBF remplit une deuxième fonction en réponse transcriptionelle, en présence de stress de paroi cellulaire pendant lequel la Mapk Slt2 activée forme un complexe avec Swi4, la sous-unité de SBF, conférant sur Swi4 la capacité de se lier à l'ADN et d'activer la transcription de Fks2. Bien que la formation du complexe Mpk1-Swi4 et l'activation transcriptionelle de Fks2 n'exige pas l'activité catalytique de Mpk1, Swi6 est phosphorylé par Mpk1 et doit être présent dans le complexe Mpk1-Swi4 pour l'activation transcriptionelle de FKS2. En effet, Mpk1 activée, régule Swi6, dans le noyau, d'une façon biphasée. D'abord, la formation du complexe Mpk1-Swi4 enrôle Swi6 dans le noyau pour l'activation transcriptionelle. En second lieu, Mpk1 régule négativement Swi6 par phosphorylation de Ser238, qui empêche l'entrée nucléaire.

Swi6 a une fonction cytoplasmique qui est favorisée par la phosphorylation par Mpk1, qui bloque son importation nucléaire. Cette hypothèse est soutenue par l'observation récente que seulement Swi6, est exigé pour l'activation de la réponse en présence d'un stress de paroi cellulaire, dans le réticulum endoplasmique. (Scrimale et al. 2009). À cet égard, il est également remarquable que la phosphorylation par Mpk1 de Swi6 n'exige pas le recrutement de Swi6 au complexe Mpk1-Swi4, parce que cette phosphorylation se produit en l'absence de Swi4. L'observation que Mpk1 peut phosphoryler Swi6, en dehors du complexe Mpk1-Swi4-Swi6, indique que les deux phases de la régulation de Swi6 par Mpk1 ne sont pas interdépendantes (Levin et al. 2010). Des études biochimiques ont prouvé que Swi4est le composant de SBF qui se lie spécifiquement à SCB par un domaine N-terminal helix-turn-helix d'ADN-binding (Taylor I. A., et al. 2000). En revanche, SWI6 n'a aucune activité obligatoire de liaison à l'ADN mais est présent dans le complexe SBF en raison de son interaction avec SWI4par l'intermédiaire des régions C-terminales des deux protéines (Andrews B. J., et al. 1992). SWI6 est également un composant du complexe de transcription MBF (MCB « Mlul Cell cycle Box »-binding factor) qui se compose de Swi6 et de la protéine possédant un site de liaison à l'ADN, MBP1 (facteur de transcription), et se lie sur la séquence du promoteur « ACGCGT » (Breeden, L. 1996).

Il est connu que la surexpression de *Swi4*, chez le mutant nul Δ mpk1, ne rétablit pas la déformation de la lyse cellulaire (Madden K. Y., *et al.* 1997). Ainsi, les mutants nuls de Δ *swi4* et de Δ *swi6* sont hypersensibles au Calcofluor White. De plus, SWI4 et SWI6 sont phosphorylés par MPK1, en présence d'un stress de paroi, in vivo et in vitro (Figure 17). Ceci démontre le rôle de SBF dans le contrôle des mécanismes maintenant l'intégrité de la paroi (Igual, J. C., *et al.* 1996).

D'après les résultats de Levin et al. la transcription de Fks2 en réponse aux stress de la paroi, exige le facteur de transcription SWI4/SWI6 (SBF). En effet, SBF régule la transcription de la cycline G1 mais il a été trouvé que l'association de Mpk1 (Slt2) ou Mlp1 (Mpk1 Like Protein) avec le promoteur de Fks2 est dépendant du site de liaison de SBF, (Figure 18). De plus, l'association de Mpk et Swi4 semble co-dépendant mais indépendant de SWI6. L'association intramoléculaire de C-terminal de Swi4 avec son DBD (DNA-Binding Domain)



Figure 19: Modèle pour l'activation de la voie de l'intégrité cellulaire



Figure 20: Voie de « Calcium – Calcineurine(Qiagen) » chez S. cerevisiae

interfère avec sa capacité à se lier à l'ADN, ce qui est relâché par l'association de Swi6. En effet, dans ce cas, concernant l'activation de Fks2, Mpk1 ou Mlp1 remplace la fonction de Swi6, permettant à Swi4 de se lier à l'ADN. Par contre, il est évident que Swi4 possède des sites de liaison différents pour Mpk1 et Swi6 car Mpk1 forme un complexe ternaire avec SBF in vivo et in vitro.

3.2.3. Rlm1

Un autre effecteur potentiel de Mpk1 potentiel est le facteur de transcription Rlm1, qui a été identifié par un criblage génétique pour les mutations qui suppriment l'effet toxique d'une forme constitutivement active de Mkk1 MAPKK (Watanabe, *et al.* 1995). Rlm1 est membre de la famille de facteurs de transcription MADS (Mcm1-Arg80-Deficiens-serum response factor [SRF]) (Norman, *et al.* 1988), agissant sous forme de dimères et contrôlée par des MAP kinases (Dodou et Treisman, 1997). Bien que les cellules des mutants Δ rlm1 ne montrent pas une osmosensitiblité accrue, une hypersensibilité nutritive, ni les phénotypes des mutants de délétion des gènes de la voie Mpk1, le phénotype du mutant Δ mpk1 peut être partiellement supprimé par l'expression d'une protéine de fusion à laquelle Rlm1 est lié sur le domaine transcriptionelle de l'activation de GAL4. De ce fait, Rlm1 est un effecteur de la voie Mpk1 (Evdokia Dodou et Richard Treisman, 1997).

Le domaine putatif du site de liaison à l'ADN et de dimérisation de Rlm1, qui ressemble à celui du facteur de transcription metazoan MADSbox MEF2 (B. Nadal-Ginard, *et al.*1992), présente une homologie avec les produits des ORFs de *S. cerevisiae*, YBR182C (Demolis N. L. , *et al.* 1994), Smp1 (second Mef2-like protein 1). Ces deux protéines représentent les homologies avec Mef2 de *S. cerevisiae*. En effet, il y a une redondance fonctionnelle entre Rlm1 et Smp1. Rlm1 et Smp1 possèdent des spécificités liés à Mef2 et peuvent dimérizer en solution. Par contre SMP1 ne semble pas fonctionner dans la voie Mpk1. Cependant, l'activité des gènes reporteurs contrôlés par la séquence consensus de Rlm1, dépend strictement de Rlm1 et de Mpk1, qui établit Rlm1 comme effecteur direct de la voie Mpk1 (Figure 19).

3.3. Cascade de Calcineurine et sa Cible directe Crz1

3.3.1. Calcineurine

La calcineurine est une protéine faisant partie de la famille des phosphatases (Gerald R. Crabtree, 2001), c'est-à-dire des protéines qui déphosphorilent leur substrat. Elle est plus précisément une serine/thréonine phosphatase. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, il existe deux phéromones d'accouplement : A – Facteur et MF – Alpha Facteur (Mating Factor – Alpha). Les phéromones d'accouplement se lient à leurs récepteurs comme Ste2 (Stérile/récepteur de Alpha – facteur) et Ste3 (récepteur d'A - facteur). Suite à cette liaison, une protéine G hétérodimérique est activée. Ainsi, l'induction de la dissociation des sous-unités Gpa1 (Alpha-



Figure 21: La voie de Calcineurine/Crz1, montrant la phosphorylation directe de CRZ1 par la Calcineurine. L'inhibiteur FK506, est un inhibiteur connu de la Calcineurine.

Sous-unité), Ste4 (Bêta-Sous-unité), et Ste18 (Gamma-Sous-unité) est mise en jeu. Ces phéromones préparent les cellules en induisant l'étape G1 du cycle cellulaire et aussi augmentent la quantité de Ca2+ intracellulaire et induisent l'activation du complexe de Calcineurin (complexe de protéines Calcium-Dépendant de phosphatase sérine/thréonine) (Figure 20).Chez Saccharomyces cerevisiae ce complexe se compose de quatre protéines : Deux sous-unités de Calcineurin-A, Cna1 (Calcineurin Subunit-A/Type-2B protein Serine/Threonine Phosphatase Catalytic Subunit-A1) et Cna2 (Calcineurin Subunit-A/Type-2B Protein Serine/Threonine Phosphatase); Cnb1 (Calcineurin Regulatory B-subunit) et Rcn1 Regulator of Calcineurin/Calcineurin Inhibitor) qui agit comme un inhibiteur. La calcineurine est impliquée dans la régulation des pompes et des échangeurs de Ca²⁺, responsables de l'homéostasie de Ca²⁺ chez la levure (Maeta K, Izawa S, Inoue Y. 2004). Il maintient l'équilibre cytoplasmique de Ca²⁺. Un des gènes, régulé par la calcineurine est le facteur de transcription CRZ1 (Calcineurin-Responsive Zinc Finger). Crz1 joue un rôle dans l'induction des gènes calcineurin-dépendants pour activer les pompes à Ca²⁺, le Pmc1 (Putative Vacuolar Ca²⁺ ATPase) et le Pmr1 (High affinity Ca2+/Mn2+ P-type ATPase) ; un de deux gènes codant Fks2/Gsc2 (Glucan Synthase of Cerevisiae/1,3-Beta-D-Glucan Synthase Catalytic Component); et le gène pour la pompe de Na+, Pmr2 (P-Type ATPase Sodium Pump). Ceci montre que calcineurine joue un role dans la régulation de la structure de la paroi cellulaire (Rusnak F, Mertz P., 2000).La calcineurine également régule l'état d'affinité du canal de potassium, Trk1 (180 kDa High Affinity Potassium Transporter), Trk2 (Low Affinity Potassium Transport Membrane Protein), du Hal1 (Halotolerance/Polar 32-kDa Cytoplasmic Protein) et inhibent Vcx1 (Vacuolar H⁺/ Ca²⁺ Exchanger) par des mécanismes post-transrationnelles. La transcription dépendante de Ca²⁺ est bloquée par les inhibiteurs immunosuppressives CsA (Cyclosporin-A) et FK506 (Tacrolimus) qui agissent en tant qu'inhibiteurs efficaces de Calcineurin.

3.3.2. Facteur de Transcription Crz1

Une des fonctions critiques de la signalisation calcineurin-dépendante est de contrôler l'expression de gène par l'activation d'un facteur de transcription, Crz1/Tcn1/Hal8 (A.M. Stathopoulos, M.S. Cyert, 1997). Crz1p contient un motif de doigt de zinc et lie spécifiquement à CDRE (Figure 21), (Calcineurin-Dependent Response Element), une séquence d'ADN de 24 pb qui est nécessaire pour diriger l'expression des gènes dépendants de calcineurine. Les recherches ont démontré que Crz1 agit en aval de la calcineurine afin de répondre aux stress dus au changement de calcium (Martha S. Cyert, *et al.* 2003). La calcineurine déphosphoryle Crz1 in vitro, montrant que Crz1 peut être un substrat direct de la phosphatase (A. Stathopoulos-Gerontides, J. Guo, M.S. Cyert, 1999).

Le principe de la régulation de Crz1 peut être résumé ainsi : La calcineurine déphosphoryle le facteur de transcription, Crz1p et régule sa localisation. Quand l'activité de la calcineurine est basse, Crz1 est phosphorylé et s'accumule dans le cytosol dû à un faible taux de



Figure 22 : Modèle pour le rôle de KNR4 en coordination avec l'intégrité cellulaires et de la croissance polarisée par la voie de signalisation PKC1-SLT2. Les flèches à tiret indiquent l'action hypothétique d'un composant à l'autre. Les lignes tirées avec les doubles pointes de flèche indiquent l'interaction génétique, tandis que les traits plein avec de doubles flèches indiquent l'interaction directe de protéine-protéine (Martin-Yken *et al.* 2003).

l'importation nucléaire et d'un taux élevé d'exportation nucléaire. La calcineurine active, déphosphoryle Crz1, qui s'accumule alors rapidement au noyau dû à l'importation nucléaire accrue et exportation nucléaire diminuée. Ainsi, la calcineurine contrôle l'activité de Crz1 principalement par la régulation dû à sa localisation.

Crz1 est le médiateur principal de l'expression de gène calcineurin-régulé chez la levure. En effet, en réponse aux stress, la calcineurine et la Crz1 activent l'expression des gènes qui favorisent la rémodélisation de la surface de cellules. Une étude a établi que l'expression de gène de calcineurin/ Crz1-dépendante est activée en présence des mutations qui compromettent la paroi cellulaire (Lagore, A., *et al.* 2003). De plus, plusieurs gènes de calcineurin/Crz1-dépendante, codent pour des protéines qui ont un rôle dans le transport des ions ou des petites molécules, ainsi cette voie, régule, également des aspects d'homéostasie d'ion (Cunningham, *et al.* 1996). Finalement, l'expression des gènes clé de la signalisation est également élevée après l'activation de la cascade de calcineurine/Crz1, montrant qu'il existe des mécanismes potentiels de la rétroaction et de l'interférence entre la voie de calcineurin et d'autres voies de signalisation.

3.4. Knr4 : Régulateur de Slt2

Le Killer Nine résistant 4 (Knrn4) a été, à l'origine isolé par complémentation d'un mutant hyper résistant à la toxine HM-1 de *Hansenula Mrakii* (Hong Z., *et al.* 1994), dont l'effet cytocidal était dû au dégagement des composants cellulaires par la formation de pore au bout des bourgeons en croissance (Inoue S. B., *et al.* 1995). Plus tard, il a été isolé comme dispositif antiparasite de plusieurs mutants hypersensibles au Calcofluor White (Martin H., *et al.* 1999).

KNR4 code pour une protéine de poids moléculaire de 57,044 kDa (Hong Z. *et coll.*, 1994) qui présente un profil hydrophile, 5 motifs PEST caractéristiques des protéines rapidement dégradées et plusieurs sites de phosphorylation par différentes kinases dont la protéine kinase C (PKC) et la kinase dépendante de la calmoduline (CaM-K) (Martin H., *et al.* 1995).

Il a été montré par des différentes approches doubles hybrides et immunoprecipitation *in vitro* que Knr4 interagit physiquement avec la MAP kinase Mpk1/Slt2. Dans les conditions de choc thermique, Knr4 est requise pour l'activation de Slt2. L'absence de Knr4 modifie la signalisation correcte de Slt2 vers ses substrats (Rlm1 et SBF). L'état d'activation de Rlm1 dans le mutant $\Delta knr4$ a été étudié. Il a été démontré que l'activité du facteur de transcription Rlm1 est réduite de 90% dans une souche mutante $\Delta knr4$ par rapport à la souche contrôle. Par contre, l'activité transcriptionelle de SBF est augmentée d'une façon anormale. Ceci a été prouvé par une phosphorylation accrue de Swi6 dans le mutant $\Delta knr4$, et par une dérégulation de plusieurs gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire. Il semble que Knr4 agisse comme un modulateur de l'activité de Slt2, l'orientant correctement vers ses cibles pour assurer la bonne transmission du message de la Pkc1 en réponse aux sollicitations extérieures (Martin-Yken H. *et al.* 2002; 2003) (Figure 22).

Des mutations ponctuelles et la disruption de KNR4 engendrent des phénotypes caractéristiques des mutants de la paroi: augmentation de la sensibilité cellulaire au SDS, détergent qui désorganise les membranes plasmiques; sensibilité au blanc de Calcofluor, au rouge Congo, à la caféine et à l'acide sorbique et résistance à la toxine killer K9. La disruption du gène KNR4 provoque aussi un arrêt de croissance à 37-38°C, remédiable en présence d'un stabilisateur osmotique comme le sorbitol 1M ajouté dans le milieu. Les diploïdes homozygotes pour la délétion KNR4 ont une sporulation très peu efficace qui peut être due aux modifications de la paroi cellulaire des asques. Une analyse d'une collection des mutants a permis l'identification de 20 gènes provoquant l'augmentation de la sensibilité à la Caspofungine. Onze des gènes identifiés sont impliqués dans la fonction pariétale et membranaire, notamment des gènes de la voie PKC (MID2, FKS1, SMI1/KNR4 et BCK1), et des gènes impliqués dans la biosynthèse de la chitine et des mannane (CHS3, CHS4, CHS7 et MNN10) (Markovich S. et al. 2004). Par ailleurs, la surexpression du gène KNR4 conduit également à des effets apparemment liés à la paroi : la sensibilité au Calcofluor White de certains mutants de la paroi est réduite en présence d'un plasmide multicopie portant le gène KNR4. L'analyse de la composition de la paroi de ces transformants montre une réduction de la teneur en chitine, ce qui est probablement la cause de leur résistance accrue au Calcofluor White. De plus, la surexpression du gène KNR4 a un effet sur le niveau de transcription de certains gènes responsables de la synthèse de la chitine. L'expression des trois gènes codant pour les sous-unités catalytiques des chitines synthases, CHS1, CHS2 et CHS3, est fortement diminuée dans les souches portant le gène KNR4 sur un plasmide multicopie (Martin-Yken H. et al. 1999).

Il est aussi démontré que Knr4 joue un rôle dans la coordination de l'assemblage de la paroi cellulaire avec la croissance cellulaire par son interaction génétique avec Bck2, la protéine requise pendant le stade de transition de la phase G1 à la phase de S en l'absence des cyclines G1 (Martin-Yken, H., *et al.* 2002), et par son interaction physique avec la MAP kinase Slt2 (Martin-Yken, H., *et al.* 2003).



Figure 23 : Schéma simplifié de la paroi d'un champignon filamenteux.

4. Mode d'action des inhibiteurs agissant sur la paroi cellulaire

Les champignons filamenteux sont les principaux agents pathogènes des plantes et sont à l'origine de nombreuses maladies conduisant à des pertes économiques considérables en agriculture. La lutte phytosanitaire, par l'utilisation de fongicides, reste le meilleur moyen de réduire l'impact de ces maladies au champ. L'apparition de souches résistantes aux fongicides commercialisés d'une part, et l'adaptation à l'évolution des critères d'homologation des matières actives d'autre part, contraignent à rechercher de nouvelles molécules présentant de nouveaux modes d'action. Parmi les plus attractifs, la paroi fongique représente une cible prometteuse et spécifique par rapport aux cellules animales et végétales. Les cellules fongiques sont caractérisées par la présence d'une paroi formée en grande partie de polymères polysaccharidiques tels que la chitine, le β -(1,3) glucane ou l' α -(1,2) mannane. Cette structure est essentielle au cours des différentes étapes du développement du champignon comme la germination des spores, la croissance du mycélium ou la formation de nouvelles spores. Le β -(1,3) glucane et la chitine sont absents chez l'homme et la plupart des animaux, ce qui offre la possibilité de développer des molécules anti-fongiques spécifiques inhibant les processus de biosynthèse de ces composés.

Depuis quelques années plusieurs produits anti-mycotiques ciblant ces modes d'action ont été commercialisés ou sont en phase de développement. Les échinocandines (ex : la caspofongine, l'aculéacine et la micafongine) ou certains terpénoïdes inhibent spécifiquement la synthèse de α -(1,3) glucane. La nikkomycine Z ou certaines polyoxines inhibent spécifiquement la synthèse de la chitine. Aujourd'hui aucun fongicide à usage agronomique avec ce type de mode d'action, malgré sa spécificité, n'a encore été commercialisé. La mise en évidence récente des génomes de plusieurs champignons phytopathogènes ainsi que le développement des outils moléculaires appropriés permettent de nouvelles approches afin de mieux connaître les mécanismes de mise en place de la paroi cellulaire fongique ainsi que leur régulation. Outre ces connaissances fondamentales, de nouvelles perspectives s'offrent de développer des fongicides possédant un mode d'action spécifique et parfaitement adapté à l'évolution des profils requis aujourd'hui.

4.1. Inhibiteurs altérants la paroi

Les composants chimiques de la paroi cellulaire fongique (Figure 23) sont divers dans chaque classe de champignons, par exemple, cellulose – glucan chez les Oomycètes, cellulose – chitine chez les Hyphochytridiomycètes, chitosan – chitine chez les Zygomycètes, chitine – glucane chez les Ascomycètes et les Basidiomycètes et mannane – glucane – chitine chez les saccharomycètaceae (Barthai-Garcia, 1968).

Des colorants comme le colorant rouge congo fluorescent ou le calcofluor blanc sont des inhibiteurs de la paroi car ils interférent avec l'assemblage des microfibrilles de polymères pariétaux grâce à leur capacité à se lier à la chitine et au β -(1,3) glucane (Roncero et Duran, 1985).

4.2. Inhibiteurs inhibant la biosynthèse des composants de la paroi

Les inhibiteurs de la paroi affectant cette fois-ci directement la biosynthèse des polymères pariétaux sont décrits. La Nikkomycine Z et les polyoxines sont des inhibiteurs compétitifs qui affectent spécifiquement les activités CHS et donc la biosynthèse de la chitine. Ceux-ci ne se sont pas avérés suffisamment efficaces in vivo pour être agréés en pharmacologie. Bien que la nikkomycine Z ne soit pas utilisée cliniquement, elle montre toutefois une activité significative *in vitro* contre la plupart des champignons ascomycètes. Des inhibiteurs non-compétitifs de l'activité γ -(1,3) GS ont été développés et ciblent donc la biosynthèse du β -(1,3) glucane. Les papulacandines (glycolipides) et les échinocandines (lipopeptides) ; Garcia-Effron *et al.* 2009) sont les 2 familles d'inhibiteurs naturels qui ont été découverts. Des analogues synthétiques des échinocandines sont maintenant commercialisés et utilisés pour le traitement des mycoses invasives : la caspofongine CAS, la micafongine MICA (MYCAMINE, Astellas Pharma) et l'anidulafongine ANIDU (ECALTA, Pfizer).

Bien qu'en agronomie aucune molécule inhibant l'un ou l'autre de ces métabolismes n'est commercialisée à ce jour, les exemples ci-dessus démontrent que ces modes d'actions sont validés. De nombreuses molécules nouvelles, inhibant le métabolisme pariétal fongique, pourraient être trouvées en mettant en place les tests biochimiques ou cellulaires appropriés pour les cribler. Cependant, il existe un phénomène de compensation entre les polysaccharides pariétaux qui représente un obstacle majeur à ce criblage.

De plus, l'observation par immuno-electro-microscopie des hyphes infectieux indique que l' α -1,3glucane est localisé plus extérieurement dans la paroi cellulaire comparée aux β -1,3-glucanes. En effet, les champignons filamenteux ont développé un mécanisme pour empêcher leur reconnaissance par la plante hôte et pour se protéger des attaques immunitaires de l'hôte. L' α -1,3-glucan accumulé interfère avec la digestion de la chitine de la paroi cellulaire par des chitinases. Ainsi, l' α -1,3-glucane masque les β -1,3-glucanes et la chitine dans la paroi cellulaire des hyphes infectieux, suggérant que l' α -1,3-glucane protège la paroi cellulaire fongique contre les enzymes digestives produites par des cellules des plantes pendant l'infection (Rappleye *et al.* 2007).Un dérivé de cire, chez la plante induit l'accumulation de α -1,3-glucan par l'intermédiaire de l'activation de la voie de signalisation Mps1. Ces résultats démontrent que *M. grisea* change, dynamiquement, la composition des polysaccharides de sa paroi cellulaire lors de l'identification de la plante (Takashi Fujikawa *et al.* 2009). Par ailleurs, la prolifération végétative exige la réparation de la paroi cellulaire pour adapter son développement à son environnement. Les composants structuraux principaux responsables de la rigidité de la paroi cellulaire, chez *S. cerevisiae* sont des polymères de β -1,3-glucane (Klis FM, *et al.* 2002). La biochimie du complexe d'enzymes qui catalyse la synthèse des chaînes de β -1,3-glucanes (β -1,3-glucane

synthase) a été étudiée intensivement, et trois composants de ce complexe ont été identifiés. Les agents antifongiques comme l'echinocandine, qui interfèrent avec la production de β -1,3-glucanes, devraient inhiber la β -1,3-glucane synthase. Ils constituent une des principales classes d'inhibiteurs visant à traiter des infections fongiques représentant un danger chez l'homme.



Figure 24: Cycle d'infection de Magnaporthe grisea

5. *Magnaporthe grisea*, un modèle pour l'étude des cascades de signalisation MAP kinases

Chaque année, la production céréalière mondiale subit des pertes considérables dues à l'attaque d'agents pathogènes. Parmi ces agents infectieux, les champignons filamenteux sont responsables des plus sérieuses épidémies chez les plantes des régions tempérées et tropicales causant des pertes d'environ 20 % des récoltes mondiales. La lutte phytosanitaire est par conséquent importante pour limiter ces attaques et les pertes de rendement dans la production agricole. Le principal problème réside dans la durabilité des méthodes de lutte face à l'apparition rapide de variant résistants. Une approche fondamentale constitue un élément clé pour comprendre les mécanismes qui gèrent l'interaction plante pathogène et ainsi identifier de nouvelles cibles pour le développement de fongicides permettant d'améliorer la lutte contre ces maladies.

L'un des agents pathogènes les plus préjudiciables est le champignon filamenteux *Magnaporthe grisea (Pyricularia oryzæ*) responsable de la principale maladie du riz, la pyriculariose. Les avancées des connaissances génétiques et biologiques chez le riz et *M. grisea*, modèle d'agent pathogène des céréales, font de la pyriculariose un système d'étude intéressant pour la compréhension des interactions plantes/pathogènes (Talbot, NJ, 2003). En effet, le riz et *M. grisea* sont actuellement utilisés comme systèmes modèles des monocotylédones et des champignons filamenteux pathogènes (Yuan Q., *et al.* 2001), (Dean R. A., *et al.* 2005), (Sallaud C., *et al.* 2003). La séquence complète des deux génomes, ainsi que les outils moléculaires comme les cartes génétiques et des collections de mutants d'insertion, sont disponibles. *M. grisea* est cultivable *in vitro*, son cycle sexué est maîtrisé en laboratoire (Kato H., 1962) et la plupart des techniques de biologie moléculaire (banque d'ADNc, clonage positionnel, transformation...) sont également utilisables (Valent B., *et al.* 1991), (Zeigler R. S., 1998).

5.1. Systématique de *Magnaporthe grisea*

M. grisea, champignon filamenteux haploïde de la famille des Ascomycètes, infecte plus de 50 espèces de plantes, telles que l'orge, le blé, le riz, le millet (Ou SH, 1985). La pyriculariose cause, chaque année, la perte de 10 à 30 % de rendement des récoltes.

Le cycle sexué a uniquement été observé au laboratoire, ce qui permet l'analyse génétique des souches par croisement tandis que dans la nature, la reproduction se fait de façon asexuée par la formation de spores tri-cellulaires ou conidies (Talbot N. J., 1995).

Le cycle d'infection de *M. grisea* (Figure 24) commence par l'adhésion de la conidie sur les feuilles du riz, possédant une surface hydrophobe due à la présence d'une cuticule cireuse (Howard R. J., *et al.* 1996). L'adhésion s'effectue par l'intermédiaire d'un mucilage sécrété par l'apex du tube germinatif dès l'hydratation de la spore (Valent B., *et al.* 1998). Ce mucilage contient des protéines, des lipides, des glycoprotéines et un disaccharide, le α -1,2-mannose. A l'extrémité du tube germinatif se développe une structure particulière appelée appressorium.



Figure 25: Feuilles infectées par M. grisea

(Talbot, 1995). Le premier est une "phase de reconnaissance" où le tube germinatif choisit la meilleure surface pour s'y attacher. Des composés comme les monomères de cutine, ou les intégrines qui traversent la membrane des tubes germinatifs, semblent être décisifs dans l'induction des appressoria. Pendant la maturation, l'appressorium se mélanise permettant d'établir et de maintenir une pression osmotique interne élevée (Money NP, Howard RJ, 1996).

Chez *M. grisea*, la pression osmotique est due à l'accumulation de glycérol (Terenzi H. F., *et al.* 1999). Des mutants de *M. grisea* déficients en mélanine ne développent pas de pression osmotique élevée et sont non pathogènes (ChumleyF. G., *et al.* 1990). Une fois la mélanisation complète, un hyphe étroit appelé aiguille d'infection se développe et sous l'effet de la pression osmotique élevée, perfore la cellule végétale. Deux types de réactions sont alors observées : si la plante reconnaît le champignon (interaction incompatible), les réactions de défense sont rapidement déclenchées et le champignon est stoppé, si la plante ne reconnaît pas le champignon (interaction compatible) de nouveaux hyphes intra et inter- cellulaires se ramifient dans la plante (phase biotrophe) (Talbot N. J., 2003), (Knogge W., 1998). Puis le champignon se multiplie dans tous les tissus infectés qui se nécrosent (phase nécrotrophe). Des lésions apparaissent 24 à 48 heures après l'infection. Le champignon libère à la fin de son cycle une quantité importante de spores qui sont ensuite disséminées sur d'autres plantes.

5.2. Pyriculariose du Riz

La pyriculariose du riz est provoquée par *Pyricularia oryzæ* qui, dans sa forme télomorphe est appelé *Magnaporthe grisea*. La maladie peut frapper toutes les parties aériennes de la plante (Figure 25). La plupart des infections se produisent sur les feuilles, faisant apparaître des lésions en forme de diamant avec un centre gris ou blanc, ou sur les panicules, qui deviennent blancs et meurent avant d'être remplis de grains (Scardii, *et al.* 1997). *M. grisea* peut aussi survivre sur les graines des plantes. Une fois sur la feuille de riz, le champignon produit rapidement des milliers de spores qui sont portées aisément par l'air, le vent ou la pluie, sur les plantes voisines.

La pyriculariose du riz a été décrite la première fois en Asie il y a trois siècles. Elle est maintenant présente dans plus de 85 pays s'adaptant aux conditions environnementales (Rao K. M., 1994).

5.2.1. Méthodes de Lutte

La lutte contre *M. grisea* repose essentiellement sur l'application de fongicides et sur l'emploi de cultivars résistants. Les fongicides actuels protègent efficacement les parties foliaires, mais sont de moindre efficacité en période de floraison rendant la protection des panicules plus difficile. Les fongicides les plus utilisés sont des inhibiteurs de la voie de biosynthèse de la mélanine, nécessaire à la fonctionnalité de l'appressorium, comme le pyroquilon, le carpropamide (Bayer CropScience) et le tricyclazole (BASF). La mélanine étant indispensable à la fonctionnalité de l'appressorium, l'utilisation intensive de ces produits

depuis 20 ans n'a toujours pas conduit à l'apparition de souches résistantes (Woloshuk CP, Sisler HD, Vigil EL, 1983). Mais ces fongicides n'ont qu'une activité préventive et il est toujours d'actualité de rechercher de nouvelles molécules ayant de nouveaux modes d'action et pouvant être utilisées en association. Au Japon, une alternative utilisée est l'induction des défenses du riz par l'application de probénazole qui possède une activité élicitrice (molécule qui déclenche les mécanismes de défense des plantes). Cependant, la lutte chimique n'est rentable que dans les zones de production où le riz est cultivé sur de grandes surfaces (Amérique du Nord et du Sud) et dans les pays où la plus-value sur le riz est importante (Japon, Corée du Sud, Chine), du fait du coût élevé des traitements.

L'utilisation de cultivars résistants est donc le moyen le plus efficace pour lutter contre la pyriculariose dans les pays en développement, notamment en Asie du Sud-Est. Dans le cadre de la Révolution verte (politique de transformation des agricultures), des programmes de sélection basés sur l'introgression de gènes de résistance ont permis d'aboutir à des variétés présentant une résistance totale à *M. grisea* (Takahashi, 1965). Des souches virulentes apparaissent tout de même régulièrement, 2 à 6 ans après l'introduction des cultivars résistants (Kiyosawa, 1989). C'est pourquoi différentes stratégies permettant d'obtenir des résistances durables sont à l'étude comme l'accumulation de gènes de résistance ou encore l'accumulation de résistances partielles contrôlées par des QTL (locus d'intérêt quantitatif). Mais ces stratégies restent délicates car l'accumulation de gènes de résistance risque de se faire au détriment des caractères agronomiques. Développer des stratégies de lutte prophylactique est donc important, notamment dans les petites exploitations des pays en développement. La gestion des résistances avec des rotations ou l'emploi de mélanges variétaux devrait être préconisée dans ces régions.

5.3. Cascades de signalisation MAP kinase de *Magnaporthe grisea*

D'après la revue de Rispaill *et al.* chez *M. grisea*, il existe trois voies de signalisation connues, MAP Kinase : PMK1 (Pathogenicity MAP Kinase), OSM1 (Osmoregulation MAP Kinase) ; homologues aux FUS3/KSS1, SLT2, HOG1, MPS1 (MAP Kinase for penetration and sporulation) chez *S. cerevisiae*.

5.3.1. Les trois voies de MAPK impliquées dans la cascade de signalisation

5.3.1.1. PMK1

Certains pathogènes fongiques envahissent les plantes utilisant les structures spécialisées d'infection appelées « appressoria » qui différencient des hyphes fongiques entrant en contact avec la surface de la plante. Il est démontré qu'un gène de MAP kinase est essentielle pour la formation d'appressorium et la croissance infectieuse du *M. grisea* Le gène Pmk1, *chez M. grisea*, est homologue des MAP kinases FUS3/KSS1 de chez *S. cerevisiae*. Les mutants Δ*MgPmk1* ne peuvent pas former un appressoria et ne peuvent pas développer des lésions

invasives sur les plantes de riz. Ils répondent aux signaux de cAMP pour le début de la formation d'appressorium. En effet, ces mutants sont non – pathogéniques. Les spores arrivent à s'attacher et à germer de la même façon que celles de la souche sauvage. Le tube germinatif reconnaît la surface hydrophobique et se différencie en des « bodies » gonflées mais n'arrive pas à se différencier en appressoria. Cela suggère que Pmkl est en aval de la voie de signalisation cAMP pour la reconnaissance de la surface et la formation des structures infectieuses. PMK1 est non essentiel pour la croissance végétative ainsi que pour la reproduction sexuelle et asexuelle dans la culture.

Exprimé sous le contrôle du promoteur GAL1, chez *S. cerevisiae*, PMK1 peut restaurer le défaut d'accouplement du double mutant $\Delta kssl\Delta fus3$. Ces résultats démontrent que PMK1 fait partie d'une voie de transduction de MAPK qui agit coopérativement avec la voie de signalisation de cAMP pour la pathogénie fongique.

5.3.1.2. OSM1

Chez *M. grisea*, Osm1 (Osmoregulation MAPK) a une homologie de 79% avec celui de *S. cerevisiae* « Hog1 » (Dixon *et al.* 1999).Osm1, comme Hog1, contrôle l'accumulation de l'arabitol dans le mycélium mais pas l'accumulation du glycérol pour générer la pression de turgescence. Il a aussi un rôle dans la réorganisation de cytosquelette en présence d'une solution concentrée. En effet, les mutants $\Delta MgOsm1$ se développent normalement et sporulent comme la souche sauvage. Par contre, pour le développement du mycélium, ils sont sensibles aux stresses osmotiques. Ils sont également sensibles à la dessiccation et ils ont des différences morphologiques avec les cellules d'hyphes de la souche sauvage. Par contre, il a été constaté que les mutants $\Delta MgOsm1$ sont toujours capable de se régénérer en présence d'une forte pression de turgescence. Ceci suggère qu'une autre cascade plus spécifique, indépendante des mécanismes conservés chez les eucaryotes, est présent chez *M. grisea* (Dixon *et al.* 1999).

En effet, il existe une protéine Ste11, qui a un rôle dans la cascade de Hog1 et Fus3/Kss1 chez la levure et aussi chez *M. grisea* sous le nom de Mst11. Les mutants $\Delta MgMst11$ sont plus sensibles que $\Delta MgPmk1$ et $\Delta MgMst7$ aux stress osmotiques. Ceci suggère que Mst11, comme Ste11 joue un rôle dans la cascade de signalisation dePmk1 et Osm1.

Les homologues des MAP kinases, en aval de Hog1, MAPKKK (Ssk2) et MAPKK (Pbs2) ont été isolés chez *M. grisea*. Les mutants $\Delta MgSsk2$ et $\Delta MgPbs2$ montrent le même phénotype que $\Delta MgOsm1$ (Zhao *et al.* 2005). Il est aussi connu qu'Osm1 empêche l'interaction (cross talk) entre la cascade de stress osmotique et la cascade de Pmk1 (Dixon *et al.* 1999). Il a été suggéré qu'Osm1 empêche l'activation de la cascade de Pmk1 pendant un stress osmotique et ainsi, empêche la formation de l'appressorium (Dixon *et al.* 1999).

5.3.1.3. MPS1

Les mutants de ce gène sont non – pathogènes chez des plantes de riz. Contrairement aux mutants nuls de $\Delta MgPmk1$, ces mutants peuvent infecter les feuilles blessées et peuvent former des appressoria mélanisés sur une membrane de téflon ou sur une surface

	Appressorium formation [®]	Appressorial penetration ^b	Plant defense responses ^e	Invasive hyphal growth ^d
Guyll (WT)	+	+	+	÷
pmk1 Mutants	6.00	<u>199</u>	223	522
osm1 Mutants	-	+	+	+
mps1 Mutants	+		Ŧ	्म

Tableau 3: Comparaison des mutants des gènes encodant les MAPK, chez *M. grisea* :A- la formation d'appressorium est observée sur membrane de Téflon et sur épidermes d'oignon. B – La pénétration d'appressorium est observée sur épidermes d'oignon. C – Comme réponse de la défense de la plante la formation de papilla formation ainsi que l'auto fluorescence sur épidermes d'oignon est observé. D - La formation des hyphes invasives, après la pénétration est observée par infection sur des feuilles blesses.

hydrophobique suite à un ajout de 10 mM de cAMP. Par contre, les appressoria formés par les mutants $\Delta MgMps1$ sont incapable de se différencier en un hyphe de pénétration. De ce fait, on peut présumer que *MPS1* est essentiel pour la pénétration de l'appressorium (Jin-Rong XU, *et al.* 1998). Il est nécessaire pour la sporulation et la maintenance de l'intégrité de la cellule hyphale.

Ces mutants chez *S. cerevisiae* subissent une lyse à haute température et ceux de *S. pombe* sont sensibles au sel et à la température. Ces phénotypes ne sont pas observés chez les mutants $\Delta MgMps1$. Cependant, des phénotypes particuliers sont repérables : la formation de l'hyphe aérienne, la conidiation, la fertilité des femelles, la pénétration des appressoria. Ceci démontre que la voie de signal de *MPS1* est nécessaire pour la rémodélisation de la paroi cellulaire en réponse à des stimuli spécifique de développement. *MPS1* peut aussi être nécessaire pour apporter des modifications aux parois des appressoria en réponse à une augmentation de la pression de turgescence. Les mutants se mélanisent normalement. *MPS1* est, aussi, nécessaire pour la polarisation de l'actine du cytosquelette pour faciliter la formation de la pénétration de l'hyphe.

En conclusion, le tableau 3 résume les divers mutants de MAPK chez *Magnaporthe grisea*. Les différences entre ces mutants montrent que chacune des trois voies de signalisation a un rôle différent, chez *M. grisea*.

5.4. Voies de signalisation impliquées dans le contrôle de l'intégrité pariétale

Chez *M. grisea*, il existe deux voies de signalisation impliquées dans le contrôle de l'intégrité de la paroi cellulaire. Ces deux voies, la voie de MPS1 et la voie de CRZ1, ont été démontrées ayant un rôle important chez *S. cerevisiae* et chez des champignons filamenteux.

5.4.1. MPS1

La protéine MgMps1 est déjà identifiée par Jin-Rong Xu (Jin-Rong Xu, *et al.* 1998). Chez la levure, le mutant nul *Aslt2 (ScMPS1)* a été complémenté avec succès par l'ORF de MgMps1. Ceci montre que ScSlt2 et MgMps1 ont une homologie fonctionnelle. Son arbre phylogénique réalisé à partir de l'alignement des séquences protéiques de ce gène chez *S. cerevisiae, S. pombe* et *M. grisea* montrait que ces protéines sont orthologues. Le mutant *Amps1* obtenu par Xu *et al.* montre une autolyse progressive commençant par le milieu de la colonie, récupérée par l'addition de 1M de sorbitol. De plus ce mutant est hypersensible aux enzymes de dégradation de la paroi, Novozyme. Ces résultats montrent que *MgMPS1* a un rôle similaire du gène *SLT2* chez *S. cerevisae.* En effet, il maintient l'intégrité cellulaire chez *M. grisea*.

5.4.2. CRZ1

Le gène CRZ1 code pour un facteur de transcription, activé en aval de la cascade de signalisation calcineurine de Ca²⁺, chez divers organismes, (Hirayama S., *et al.* 2003). L'orthologue de Crz1, chez *M. grisea*, MgCrz1, ressemble beaucoup à Crz1p de chez *S. cerevisiae* en termes de sa structure, sa localisation nucléaire, et sa régulation. En effet, MgCrz1 a deux motifs de doigt de zinc de type « C₂H₂ » qui sont considérés comme des motifs ADNbinding, semblables à ceux d'autres orthologues de Crz1 chez *Aspergillus fumigatus* (Von Zeska Kress, *et al.* 2008) et *Botrytis. cinerea* (Tudzynski, *et al.* 2008), alors que trois motifs étaient identifiés chez la levure (Cunningham, K. W, *et al.* 1997). Ainsi, la séquence des acides aminées de ce motif est bien conservée chez les champignons et surtout, un domaine putatif de CDD (Conserved Domains Database) et une région riche en serine (SRR) sont identifiés chez *M. grisea.* Cependant, les orthologues Crz1 chez les ascomycètes filamenteux semblent avoir évolué différemment de ceux orthologues de la levure et chez les Basidiomycètes parce qu'on ne trouve pas d'homologie, en dehors de la séquence du motif de doigt de zinc, entre les deux groupes.

Il a été démontré que *MgCRZ1* régule, transcriptionellement, un groupe de gène similaire à ceux, régulés par la protéine, calcineurin/Crz1p, chez d'autres champignons (Munro, C. A., *etal.*, 1997), (Spielvogel, A., *et al.* 2008) et chez la levure *S. cerevisiae* (Cunningham, K. W., *et al.* 1997). En effet, Crz1p induit la transcription de *FKS*2, les gènes de chitine synthase en réponse de calcium. Il a été montré aussi que l'activation transcriptionelle des gènes *FKS1, CHS* et *CHS4,* orthologues de MGG00865.6, MGG01802.6 et MGG09962.6, chez *M. grisea*, est dépendant da l'activation de calcineurine en réponse de calcium et qu'elle est dirigée par *MgCRZ1* (Jinhee Choi, *et al.* 2008). De plus, la croissance mycéliale- du mutant de délétion $\Delta Mgcrz1$ diminue significativement en présence de SDS ou Congo rouge il est hypersensible à la nikkomycin Z et aux enzymes de dégradation de la paroi cellulaire.

Ainsi, *MgCRZ1* semble jouer un rôle majeur dans l'intégrité de la paroi cellulaire de *M. grisea*, comme chez d'autres champignons filamenteux.
PROJET DE THESE

Les travaux entrepris dans le cadre de cette thèse visaient à identifier le rôle de la MAP kinase, impliquée dans la voix de signalisation de la régulation et réparation de la paroi cellulaire, MPS1, chez le champignon pathogène Magnaporthe grisea. La recherche de ces cibles ainsi que leurs rôles consistaient la deuxième partie du projet. Ainsi, différentes étapes ont été retenues.

En effet, la réalisation des mutants nuls de MPS1 ainsi que ces cibles, suite aux recherches bibliographiques, étaient le premier objectif. Par la suite, l'analyse phénotypiques ainsi que le pouvoir pathogène des différents mutants étaient prévus, afin d'analyser les différences entre les différents gènes cibles, le but étant de comprendre le rôle des différents gènes impliqués dans cette cascade de signalisation, une analyse transcriptomique était prévue.

De plus, sachant que cette voie pourrait être une bonne cible des fongicides, des études avec différents inhibiteurs, fongicides étaient programmées. En effet, les champignons sont responsables d'un très grand nombre de maladies des plantes, causant ainsi des pertes considérables dans les cultures, mais affectant en plus les produits végétaux (fruits, légumes, céréales, ...) après la récolte, au moment du stockage. Certains champignons, comme *B. cinerea*, sont capables d'attaquer plus de 250 espèces de plantes différentes tandis que d'autres, comme *M. grisea*, ont un spectre d'hôtes restreint à quelques espèces végétales. Les stratégies infectieuses de ces micro-organismes sont diversifiées et leur résistance croissante aux antifongiques utilisés aujourd'hui est un souci réel en agrochimie. Le laboratoire mixte CNRS-Bayer CropScience (UMR 5240) a mis en place depuis plusieurs années des stratégies moléculaires visant à caractériser des gènes impliqués dans le pouvoir pathogène des champignons et qui sont des cibles potentielles pour le développement de nouveaux fongicides sélectifs et respectueux de l'environnement.

MATERIELS ET METHODES

1. Matériels

1.1. Matériel fongique

Les souches de *Magnaporthe grisea* utilisées sont les souches sauvages P1.2 et Guy11, ainsi que la souche Guy11-*Δku80* qui proviennent du Centre de coopération Internationale pour la Recherche Agronomique et le Développement (CIRAD, Montpellier), conservée sur confettis.

1.2. Cultivars de riz et d'orge

Les plants de riz (*Oriza sativa L*.) utilisés pour les tests de pouvoir pathogène sont de la variété Sariceltik et les plants d'orge (*Hordeum vulgare L*.) de la variété Plaisant.

1.3. Plasmides

Au cours de ce travail, les plasmides suivants ont été utilisés :

Le plasmide pCR4 Blunt-TOPO® (Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit® Invitrogen). Ce vecteur permet le clonage rapide de fragments PCR (ici la construction de remplacement de gène). Il fait appel à la topo-isomérase I du virus *Vaccinia*, liée de façon covalente aux extrémités du vecteur linéarisé. Il possède le gène *ccdB*, létal pour *E. coli*, fusionné à l'extrémité C-terminale du fragment Lac Zα. L'intégration du fragment PCR interrompt l'expression du gène de fusion Lac Zα-ccdB, permettant uniquement la croissance des recombinants après introduction dans *E. coli*. Ce plasmide contient également un gène de résistance à l'ampicilline et à la kanamycine pour la sélection des bactéries transformées.

Le plasmide pFV8 (F. Villalba, Bayer CropScience, Lyon). Ce vecteur contient le gène de résistance à l'hygromycine cloné entre les deux sites SfiIa et SfiIb. Le schéma du vecteur pFV8 est présenté en annexe 4.

1.4. Souches bactériennes

Pour la transformation dans les cellules compétentes, les kits One Shot TOP 10 Competent Cells sont utilisés. Il s'agit de souches d'*E. coli* thermocompétentes cultivées à 37 °C dans le milieu LB (Luria Bertani). Selon le plasmide utilisé, des agents de sélection appropriés sont ajoutés au milieu de culture.

1.5. Amorces pour PCR

Nom	Séquence 5'→3'	Nom	Séquence 5'→3'
Ags1 - 2	TCTTTACCACATTATCACTCGTTC	Mig13	GTGGCGAGGGTGAATTAGTGTCG
Ags1 - 3	GTGAAGGCGGAACCAAAGACCT	Mig1 COMP1	GGTGATGGTGGCGGCAGG
Ags1 - 8	CGTTATCCCACACCCCGTTACTC	Mig1 COMP2	CTCACCCACCGCCACCACAC
Ags1 - 9	CCGAGATATTCGACTTCAACTACAGGAA	Primer mps1 - 2	CACGGCCTGAGTGGCCGATTGCTGTGG T TGCCTCGTTTATT
Ags1 - 13	AGAAAATAGCAACGCCAACGTC	Primer mps1 - 3	GTGGGCCATCTAGGCCTTTGGAGAGGG CATGAGATACTGCT
Cas-2	ATTCGAGGGCCTGAGTGGCCCGGTCGTGT CGCGGTACGA	Primer mps1 - 8	ACCTATCCAGGTCCCATTTCTATCCC
Cas5-3	TAGAGTAGATGCCGACCGGGAACAAGG CACCGCCTTCCATCG	Primer mps1 - 13	TCGGTTCTGTTTGCGGAGTCC
cas-8	CACGGCCTGAGTGGCCGCGAGCCACCCAG	Primer mps1 - 15	AGTTAGTGCTAGTTCTCTCTCTTATGG TGTGG
Cas-9	AGGGCGAGAACCTGTACTACACGAG	MPS COMP1	TCACCAAGGAACTCGGTCAGGG
Cas-13	CGGACCTCAAGACGCCCTTTC	MPS COMP2	ACCAGCGTTCTCCTCAGGGTCC
Cas-15	TGTCTTCTCGTATTTCGGGTTGCTG	Mps1nvo ORF1	AAGTTGAAGGTGGTCGGGCAGTC
CAS COMP1	CCTCGCTCTTGACAGCATCGC	Mps1 nvoOrf2	CGCCCAGATAACTTCAACGAGACC
CAS	GCCTGCGACACATCCCTACCG	Swi4	GTGGGCCATCTAGGCCCCGCACGCCTC C

COMP2		primer 2	GCTACA
Crz1 primer 2	GTGGGCCATCTAGGCCCGAGATGCCTGA GTTGCCCAG	Swi4 primer 3	CACGGCCTGAGTGGCCCGATGATGTCT G GTTTCGCACG
Crz1 primer 3	CACGGCCTGAGTGGCCGCGAAAGCTATGC GGTGGCA	Swi4 primer8	GCCCTCCTGACTGACTTGCGA
Crz1 primer 8	TTGACCACCAACCAGCTCCAGAC	Swi4 primer9	GGTTGGCGTTTGGGATGCG
Crz1 primer 9	GTATCCAAGCAAATCACTGGCAACTG	Swi4 primer 13	CGACTTAGGCTCGTGTTCGTAGACG
Crz1 primer13	CGCCGCCGTTGTGAATTACCTA	Swi4 primer15	GATGAGGATGGCTGAAACGAGGA
Crz1 primer15	ТСААССААТАСССАААТСТТССАСТТС	Swi4/1	ATCGTATTAAGTAGCAGGAAAGGGAG AAA
Crz2dbnew	ATTCGAGGGCCTGAGTGGCCATAGGCCTGAGTGGCC CGAGATGCCTGAGTTGCCCAG	swi4/2	CGGGCAGTGTCCACCTCGTT
Crz3dbnew	TAGAGTAGATGCCGACCGGGAACTGGGC CATCTAGGCCGCGAAAGCTATGCGGTGGCA	SWI4 COMP1	CTTTGATCGTGAACTCGTCTTCGTATG
CRZCOMP1	ACACGGCTCCTCCATTCCCTTC	SWI4 COMP2	TGACGAGGACGACACACCAGATAAC
CRZCOMP2	GAGATTGCTGGGCTGTGCGAC	Swi 6 primer 2	GTGGGCCATCTAGGCCCGATGGGTTGT G ATTCCTTGTTGG
dCGS-hph- end	AGGCTCTCGCTGAACTCCCCAATG	Swi 6 primer 3	CACGGCCTGAGTGGCCACACCACATT GACCCGGACCAC
dCGS-hph- start	CATTGGGGAGTTCAGCGAGAGCCT	Swi 6 primer 8	TCCGAACAGCAACCAAGAGGTCA
hygro1	GGCCACTCAGGCCCTCGAAT	Swi 6 primer 9	AGGTTCTCCTTCCCACGGTTACAAA

hygro2	GTTCCCGGTCGGCATCTACTCTA	Swi 6 primer 13	CGATAAAGGGCAAGCTGGTCGA
IDC12	ATTCGAGGGCCTGAGTGGCCGTACT ACCACATCTAATTCTGTCGAGGGCACGCA TCATAT	Swi 6 primer15	CGAAGCAGCGTACCACACCAGTC
IDC13	TAGAGTAGATGCCGACCGGGAACAGGCT TCCGTGCTTGCCGT	Swi6-2db NEW	ATTCGAGGGCCTGAGTGGCCCCTGAGT GGCCCGATGGGTT
IDC1 primer 8	ACTGTCAAATGTCGCAGAACTGGG	Swi6-3db NEW	TAGAGTAGATGCCGACCGGGAACCCAT CTAGGCCACACCACA
IDC1 primer 9	ACCTGTATGTGCTGTGTGCCGC	SWI6/1	TGTTCGGCAAGGAGCTGCTAATG
IDC1 primer 13	CCCGCATGACTAGCCTTGTTCAG	SWI6/2	TTCTCACTCTTCCAATCTCCAACTCCC
IDC1 primer 15	GCCCAACCCGACAGCATAGGA	Sulf-2	CAACTGTTGGGAAGGGCGATC
IDCCOMP1	CCAGGACTACCCAGCGATGCAG	Sulf-3	GCAATTCCCGTGCAATAATCA
IDCCOMP2	ATTATCCTTCCGTTCTTTGACCACCC	Sulf-4	TGTATCGTGTGCTGAATTCATATATGA C CATGATTACGCCAAGCG
Mig1-2	TAGAGTAGATGCCGACCGGGAACTG CCTGTCTAGGCTGGTGAGCTG	Sulf-5	GGGAGACATAGCTGTGTCTTTATGACG A TGATTACGCCAAGCG
Mig1-3	ATTCGAGGGCCTGAGTGGCCACCGTCTTT CCTCCGTCTTGTCTT	Sulf-6	GACAAGGCGTAGTGATGGCG
Mig1-8	CTCCTGCATGCTACTGGTCA	Т3	ATTAACCCTCACTAAAGGGA
Mig1-9	ATGCAGGGCATGGAGAAAGA	T7	TAATACGACTCACTATAGGG
Mig1-13	GTGGCGAGGGTGAATTAGTGTCG	Knr4 - 2	CAATTAACCACCAACTTGTACTGTCGG G TTCCCGGTCGGCATCTACTCTA

Mig1-15	CCCACTCGTATGCTCCCACGTC	Knr4 - 3	GCTCTAGATATCGATCGTCTTCGGCCA C TCAGGCCCTCGAAT
		knr4-A8	GCAGGCTGTGTTTTAGCACTGCT
		knr4- ORF2	GTCAATTAACTGGCACACCTACCCAAG
		Knr4 - 13	GACGGCACTCATCCCAAACG
		Knr4 - 15	GCTTGTGGAGGTGACCTTATTGGTGT

1.6. Amorces pour qPCR

Nom	Séquence 5'→3'	Nom	Séquence 5'→3'
alpha13gsF	GCCCGCAAGCCCAAGT	CAS5F	CAGCCTCGGTGCCATCAT
alpha13gsR	GTCAGATTTGCCGTCACCAA	CAS5R	CTCCGTCTCAAACTCCAAACG
CRZ1F	AACCCCCAACCGTCTCAAAC	GSKF	CTCAGGAAGGCGGACAACA
CRZ1R	GAGTCGCGTCGAAGGATGA	GSKR CGCTCGGTCGGTGTGTACT	
RLM1F	GGGCGATGACGATGATGAG	SWI4F	GCAAACCCAAGCAACCAAA
RLM1R	GCATCATGTGCGCATCCA	SWI4R	GCTACTGCGCGGGCTTT
SWI6F	TCAACACCCCACCAAGGAA	IDC1F	CGGCAGCACCACATTCTTCT
SWI6R	TCCGCACCTGAATTGTACATCT	IDC1R	GCTAGATGAAGCCATGGACACA
MPS1F	CTGCGGCCTGAAGTACATACAC	FKS1F	TAGCGTACTTGCTGCCATTG
MPS1R	AGCAAGTTTCCGGGTTTCAA	FKS1R	CAGCCCATGGAGTACCACTT
CHS2F	GCACCTTTCAACGACGA	CHS4F	ATCCTGATGTCGTTCTTGC
CH2R	GCCGTGTTTTGGTTCTTTGT	CHS4R	GGTGAGACTGTCGGGGAATA
PMC1F	AGCCGTCTCCTCTGAACAAG	CHS3F	TTCTTCAGCGGCGTCGTT
PMC1R	TTCATGAGACTTGCGTCGTG	CHS3R	GTGGGCGATGGCGTAGAT

CHS8F	CGCAAGGCTGATCTCCTAGAGA	CHSDF	AAGAGCATCGACGTCACTTACAAG
CHS8R	ACTGCGTCGGAGTTGTCAAAG	CHSDR	CTTTTGGCAGTGACGCTTACC
CHS2bisF	TCCGCCGCTGCAGATAA	CHSF	TCTCGGCGTAACATTGACGAT
CHS2bisR	GACTGCGGCGGTTTGC	CHSR	GCTTGCGACAAGGCTATGC
GFAF	GGTGCCTACGGTCTGTTGATC		
GFAR	ATGACAAGTGGCGAACCCTTA		

2. Méthodes Bio-informatiques

2.1. Séquençage de l'ADN

Les séquençages ont été réalisés par la société « Génome Express » (Meylan, France), à partir de plasmides purifiés (3 µg/séquence) ou de produit PCR purifié.

2.2. Analyse des séquences

Pour caractériser les gènes *MPS1, SWI4, SWI6, RLM1, CRZ1, AGS1, IDC1, CAS5*, il a fallu rechercher les séquences génomiques et peptidiques correspondantes, chez *M. grisea*, ainsi que chez *E. coli, N. crassa, A. nidulans, A. thaliana.*

Les alignements de séquences nucléotidiques et peptidiques ainsi que les arbres phylogéniques sont réalisés grâce au logiciel « BLAST » du site NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast), dans la banque de données développée par Bayer Cropscience, (http://bioinfo.evry.fr.bayercropscience/Projects/MAGNA/index.html). Les structures des gènes sont réalisées grâce au logiciel FGENESH, disponible sur le site Softberry (http://www.softberry.com/cgi-bin/programs/gfind/fgenesh.pl); les recherches de motifs et de domaines conservés des séquences peptidiques sont effectués sur le site de NCBI (logiciel Pfam, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast.cgi). Le logiciel Vector NTI [©](In Vitrogen) est utilisé pour le traitement des données issues du séquençage, notamment pour réaliser des alignements de séquences nucléotidiques, protéiques, les arbres phylogénétiques et les cartes de restrictions.

2.3. Alignements des séquences et Arbres phylogéniques

Les alignements des séquences sont réalisés avec ClustalX. Par la suite, les alignements sont mis sous format Phylip, afin de pouvoir réaliser l'arbre phylogénique à l'aide du logiciel PHYML.

3. Méthodes de Biologie Moléculaire

3.1. Extraction de l'ADN génomique

Les extractions d'ADN génomique sont réalisées à partir de 20 à 30 mg de mycélium lyophilisé selon le protocole utilisé au laboratoire.

10 à 15 implants (2x2 mm) d'une colonie sont ajoutés à 5 mL de milieu TNKYE et la culture est effectuée à 26°C sans agitation. Au bout de 5-6 jours, lorsqu'une galette de mycélium a couvert la surface du milieu (et avant la mélanisation du champignon), celle-ci est récupérée, séchée sur du papier absorbant, congelée dans de l'azote liquide, lyophilisée pendant une nuit puis conservée à -80°C. Les mycéliums sont ensuite broyés 2 fois 30 s à 30 agitations par seconde. Le broyat est dissous dans 600 µL de tampon d'extraction (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 100 mM, SDS 0,5%, Acétate de sodium 300 mM pH 6, Protéinase K 50 µg/mL), vortexé puis incubé 1 h à 65°C. 1 volume d'Aquaphénol est ajouté puis les échantillons sont centrifugés à 4°C (5 min, 13000 rpm). Les surnageants sont récupérés puis mélangés à 1 volume de chloroforme/alcool isoamylique. Après centrifugation à 4°C (2 min, 13000 rpm), les polysaccharides sont précipités par l'ajout de 0,5 volume d'acétate d'ammonium 7,5 M et une incubation de 15 min dans la glace puis ils sont éliminés par centrifugation à 4°C (30 min, 13000 rpm). L'ADN présent dans les surnageants est précipité par l'ajout de 0,7 volume d'isopropanol et récupéré par centrifugation à température ambiante (10 min, 13000 rpm). L'ADN est lavé avec 500 µL d'éthanol 70% puis séché à l'air et repris dans 50 µL d'eau. Après 1 h d'incubation à 37°C en présence de 10 μg de RNase, la concentration d'ADN est estimée sur gel d'agarose en comparaison de dépôts de quantités connues.

3.2. Amplification de l'ADN par PCR

La PCR, « Polymerase Chain Reaction » permet d'amplifier un fragment donné d'ADN à l'aide d'un couple d'amorces et d'une polymérase. Au sein du laboratoire, la Taq polymérase (Sigma), la Pfu Turbo (Invitrogen), la Phusion (Finnzymes) sont les polymérases les plus utilisées.

3.3. Extraction d'ADN plasmidique

Les extractions d'ADN plasmidique sont réalisées à l'aide de kits QIAprep spin Mini (ou Midi) prep Kit de Quiagen selon le protocole fourni par le fabriquant. Le principe de cette extraction est une lyse alcaline, suivie d'une précipitation des débris cellulaires à l'aide de sels et d'une purification de l'ADN plasmidique par chromatographie échangeuse d'anions.

3.4. Digestion par des enzymes de restriction

250 ng d'ADN sont digérés dans un volume final de 20μ l avec 1 U d'enzyme de restriction et le tampon spécifique de celle-ci, dans les conditions recommandées par le fournisseur (New



Figure 26 : Principe de ligation à trois voies

England Biolabs) pendant 1 à 2 heures. De la BSA (Bovine Serum Albumine) à 100 μ g/ml est ajoutée si nécessaire.

3.5. Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet la séparation de fragments d'ADN selon leur taille dans un gel horizontal contenant 1 % d'agarose (P/V) dissous dans du tampon TAE 1X contenant du Bromure d'Ethydium (BET 0,2 μ g/ μ l). La visualisation des fragments d'ADN s'effectue par l'émission de fluorescence sous UV.

3.6. Purification des fragments d'ADN

Les bandes d'intérêt découpées du gel sous UV sont purifiées à l'aide du kit «GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit » d'Amersham ou « QIAquick PCR Purification Kit » de Qiagen.

3.7. Ligation des fragments d'ADN

La réaction de ligation entre les régions flanquantes gauche et droite du gène d'intérêt et le gène de résistance à l'hygromycineest réalisée à 18 °C pendant 12 heures avec la T4 DNA ligase (2,5 U, Roche) du bactériophage T4. Le tampon de ligation contient l'ATP nécessaire à la ligase pour la formation des liaisons phosphodiesters entre les trois parties ainsi que les composants utiles à l'activité de l'enzyme.

3.8. Principe de ligation à trois voies

La ligation est réalisée avec 100 ng de chaque fragment de la construction (FG-hygro-FD) pendant une nuit à température ambiante à l'aide de 5 unités de T4-ligase (Roche). Le produit de ligation de la construction *gene* \triangle *hygro* est amplifié par PCR à l'aide des amorces « *geneprimer8*» et «*geneprimer9*» situées à l'intérieur des régions flanquantes. Le produit PCR est isolé et purifié (Figure 26).

3.9. Principe de la PCR double joint

La PCR double joint est une réaction composée de trois étapes (Figure 27).

Les températures d'hybridation des amorces sont calculées sur le site de Finnzymes. La première étape consiste à amplifier des fragments séparés. La séquence de l'une des deux amorces utilisées pour amplifier chaque fragment possède une séquence supplémentaire capable de s'hybrider au fragment auquel il sera rattaché. Les fragments amplifiés sont ensuite purifiés sur gel. Au cours de l'étape 2, les différents fragments amplifiés sont réunis dans les mêmes proportions (1 : 1 : 1). Ce mélange réactionnel est complété d'enzyme, de dNTP, de tampon et d'eau, mais pas d'amorce, et une réaction d'amplification est réalisée. Les zones de recouvrements existantes entre les différents fragments servent d'amorces pour



Figure 27 : Principe de la *PCR* double joint : 1ère étape : Amplification des fragments d'intérêt (PCR 1, PCR 2 et PCR 3). 2ème étape : amplification intermédiaire : les séquences homologues servent d'amorces pour l'amplification du fragment total. 3ème étape : amplification du produit final

l'amplification du fragment d'ADN final. 10 cycles de PCR sont effectués (Tableau 4) et les Tm utilisés dans le programme de PCR sont ceux des régions complémentaires.

	Etape	Conditions de PCR		
1	Dénaturat ion	9 8°C	30 s	
2	Dénaturat ion	9 8°C	10 s	
3	Hybridati on	T m	10 min	
4	Elongatio n	7 2°C	30 s /kb	
5	Elongatio n	7 2°C	10 min	
		4 °C	ω	
		10 cycles de l'étape 2 à 4		

Tableau 4 : Description du programme PCR de l'étape 2 de la *PCR double joint*.

Au cours de l'étape 3, 0,5, 1, 2 ou $4 \mu L$ du mélange PCR précédent sont utilisés pour effectuer une dernière réaction d'amplification avec les amorces internes dans des conditions standard.

3.10. Transformation bactérienne

Les transformations sont réalisées à partir d'un aliquote de bactéries thermocompétentes commerciales «ZeroBlunt® TOPO® PCR cloning Kit de Invitrogen» ou DH 5αT1R et de 5 µl de produit de ligation.

3.11. Southern Blot

Le principe d'un Southern Blot est de visualiser et cartographier un fragment du génome (ADN) dont on possède une sonde.

2 μg d'ADN génomique sont digérés pendant une nuit à 37°C (volume final de 100 μL) par une enzyme de restriction appropriée (100 unités) et soumis à une électrophorèse sur un gel d'agarose 1%. L'ADN est ensuite transféré sur une membrane de nylon (Qbiogene). La membrane est préhybridée dans 25 mL de solution de préhybridation (SSC 6X, SDS 0,1%, Denhardt's 5X) pendant une journée à 65°C. La sonde est préparée en incubant 20 ng d'ADN et 5 μL de primer (« *Megaprime DNA Labelling System* » (Amersham)) 5 min à 99°C puis refroidie à température ambiante. 10 μL de buffer (kit), 2 μL d'enzyme (kit) et 25 μCi de [α-32P]-dCTP sont ajoutés au mélange qui est incubé 20 min à 37°C. Après purification sur colonne (« *ProbeQuant G-50 Micron Columns* » (Amersham)), la sonde est incubée 5 min à 95°C, refroidie dans la glace, brièvement centrifugée puis déposée au fond de l'ampoule avec la membrane. L'ensemble est incubé pendant une nuit à 65°C. La membrane est lavée deux fois 30 min avec 25 mL de solution de lavage (SSC 2X, SDS 0,1%) puis séchée. Le signal est révélé par l'intermédiaire d'un écran de phosphore (Molecular Dynamics), après une exposition de quelques heures ou plus selon l'intensité du marquage, à l'aide d'un PhosphoImager Storm 820 (Molecular Dynamics).

3.11.1. Transfert d'ADN génomique sur membrane de nylon

 $5 \ \mu g d'ADN$ génomique sont dans un premier temps digérés par une ou des enzymes de restriction. Ces enzymes sont choisies de manière à mettre en évidence une partie ou la totalité du gène étudié afin de pouvoir différencier les mutants de délétion des transformants ectopiques. Une séparation par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % des fragments d'ADN est réalisée sur la nuit. A la suite d'un contrôle sous UV de la digestion, le transfert de l'ADN sur membrane de nylon Hybond-N+ (Amersham) est réalisé selon le protocole utilisé au laboratoire.

3.11.2. Marquage de la sonde

Une sonde moléculaire est synthétisée de manière à s'hybrider avec la séquence à mettre en évidence. Le marquage radioactif de cette sonde est réalisé par la méthode d'amorçage aléatoire à l'aide du kit Megaprime DNA labelling System[™] (Amersham) selon le protocole du fournisseur. La sous-unité Klenow de l'ADN polymérase I permet l'incorporation du dCTP³² dans les fragments néo-synthétisés (1,85 MBq/sonde). Les sondes ainsi marquées sont purifiées sur colonne ProbeQuant[™] (Amersham).

3.11.3. Hybridation

La membrane est pré-hybridée dans une solution de SSC 6X / SDS 0,5 % / Denhardt's 5X pendant 30 minutes à 65 °C dans un four à hybridation. La sonde radioactive, dénaturée à 95 °C pendant 5 minutes, est ajoutée au tampon de pré-hybridation. L'hybridation de la membrane avec la sonde radioactive s'effectue à 65 °C pendant 16 à 18 h. Après hybridation, le

tampon d'hybridation est éliminé et deux lavages dans le tampon SSC 2X / SDS 0,1X (10 min à 65 °C) sont réalisées.

3.11.4. Exposition et révélation de la membrane

Après hybridation, la membrane est enveloppée dans un film Sarran-Wrap puis elle est exposée contre un écran photosensible Phosphoimager (Molecular Dynamics). La durée d'exposition varie de 5 à 24 h selon l'intensité des signaux. La lecture est réalisée à l'aide du logiciel ImageQuant[™] (Molecular Dynamics).

3.12. Extraction des ARN totaux de champignon filamenteux

3.12.1. Préparation des échantillons

La préparation commence par une pré-culture de 48 heures. Pour ceci, dans un erlen de 500 ml, une vingtaine d'implants de la souche étudiée est laissé pousser en présence de 200 ml de milieu minimum. Après 48 heures, dans l'infors à 26°C et avec une agitation de120 rpm, cette culture est centrifugée pendant 10 minutes à 1000 rpm et est récupérée dans des falcons de 50 ml. Ensuite le broyat est obtenu, à l'aide d'un blender suite à un broyage de 2 fois 1 minute. 2 ml de ce broyat est ajouté dans un erlen de 100 ml avec 50 ml de milieu minimum. Ainsi commence la deuxième étape, dans l'infor, pendant 16 heures.

Apres 16 heures, cette culture est ré centrifugée et broyée. Suite à une mesure de DO à 620, 5 ml de ce broyat à DO 0.1 est déposé dans les plaques 6 puits. 48 heures après, la dose d'inhibiteurs est ajoutée à cette culture. Les échantillons de 6 puits sont récupérés après 1 heure d'incubation dans l'étuve à 26°C. Les mycéliums sont récupérés suite à une centrifugation pendant 10 minutes à 4000 rpm.

3.12.2. Extraction des ARN totaux

Les échantillons sont congelés dans de l'azote liquide, lyophilisés pendant une nuit puis conservés à -80°C. Les mycéliums sont ensuite broyés 2 fois 30 s à 30 agitations par seconde. Les ARN totaux sont alors extraits suivant le protocole « *Purification of total RNA from plant cells and tissues and filamentous fungi* » du kit « *RNeasy Plant Mini Kit* » (QIAGEN), en utilisant le tampon RLT, avec un traitement sur colonne à la DNase de 45 min à 37°C (au lieu de 15 min à température ambiante). Certains ARN ont aussi été extraits par la méthode du « *Hot Phenol* » (travail réalisé en collaboration).

Les quantités d'ARN obtenues sont dosées par spectrophotométrie (NanoDrop®). La qualité des ARN est vérifiée par électrophorèse capillaire en utilisant le Bioanalyser 2100 (Agilent).

3.13. Transcription Inverse

5 μg d'ARN totaux sont utilisés pour être rétro-transcrits en ADNc grâce au kit *Thermoscript™ RT-PCR System* (Invitrogen). Les ARN dénaturés sont retro-transcrits à l'aide

de la thermoscript RT, les ARN non retro-transcrits sont dégradés avec la RNase H. Les ADNc obtenus sont purifiés et déposés sur gel pour vérification.

3.14. PCR quantitative

La PCR quantitative permet d'analyser le niveau d'expression d'un gène d'intérêt. Au préalable, 2,5 µg d'ARN totaux sont utilisés pour la synthèse des ADNc par transcription inverse à l'aide du kit « *ThermoscripTM RT-PCR system* » (Invitrogen) en suivant les recommandations du fabricant. Une fois la réaction achevée, l'ARN est dégradé par un traitement à la RNAse.

La PCR en temps réel est réalisée selon le protocole du kit « *Power SYBR® Green PCR Master Mix* » (Applied Biosystems) sur un ABI PRISM (Applied Biosystems). La quantification est basée sur la mesure de la fluorescence d'un agent intercalant, le *SYBR Green*. Ce produit émet une fluorescence lorsqu'il est lié à l'ADN double brin et n'inhibe pas la réaction de PCR. La fluorescence mesurée est directement proportionnelle à la quantité de produits générés pendant la réaction de PCR et est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation. La représentation des mesures obtenues en fonction du nombre de cycles donne une courbe sigmoïde. Le nombre minimal de cycles permettant la détection d'une fluorescence significative est appelé Ct (*threshold cycle*) et est fonction de la quantité initiale d'ADNc.

La séquence des amorces utilisées est déterminée par le logiciel « *Primer Express* » (Applied Biosystem). Ce logiciel génère des couples d'amorces dont la température de fusion est comprise entre 58°C et 60°C, pour générer un amplicon de 60 à 100 nt de longueur. La concentration de chacune des amorces est optimisée afin d'obtenir un maximum d'amplification spécifique pour un minimum d'amplification parasite (dimérisation des amorces vérifiée par une amplification sans ADN). L'efficacité des amorces est également vérifiée en amplifiant une gamme de dilution d'ADN génomique. La pente de la courbe obtenue permet d'évaluer l'efficacité de la PCR qui doit être proche de 2 (100%). Les différents essais pour chaque condition analysée sont réalisés. L'analyse des résultats est effectuée en utilisant la formule d'expression relative $2^{-\Delta\Delta Ct}$ où $\Delta\Delta Ct$ = (Ctgène d'intérêt - Ctgène de référence) condition test - (Ctgène d'intérêt - Ctgène référence) condition référence.

3.15. Analyse transcriptomique

3.15.1. Préparation et marquage de l'ARNa

Les ARNa (ou ARN antisens) sont préparés à partir des ARN totaux (500 ng) en utilisant le protocole du kit « *Amino Allyl MessageAmpTM II aRNA Amplification Kit* » (Ambion) selon les recommandations du fabriquant. Cette technique permet l'amplification linéaire de l'ARN selon la méthode d'Eberwine *et al.* (179). Après transcription inverse des ARN en un ADNc double brin, une étape de transcription *in vitro* permet d'obtenir un ARN antisens ou ARNa. Un nucléotide modifié (UTP amino allyl) est incorporé lors de cette étape pour permettre le

couplage ultérieur de sondes fluorescentes Cyanine 3 (Cy3) ou 5 (Cy5) NHS ester (GE Healthcare). Le rendement d'amplification est de 100 à 1000 fois la quantité d'ARNm de départ. Pour le marquage avec les fluorophores, 5 μ g d'ARNa sont utilisés. A partir de ce stade, toutes les étapes sont réalisées à l'abri de la lumière.

3.15.2. Quantification des ARNa marqués

Le programme « *Microarray* » du Nanodrop[®] est utilisé pour quantifier l'incorporation des sondes fluorescentes par mesure des absorbances (550 nm pour Cy3 et 650 nm pour Cy5). Le nombre de molécules de fluorophores incorporées par 1000 bases est donné par la formule : $N = (A_{dye}/A_{260})^*(9010/coef ext)^*1000$ où coef ext est le coefficient d'extinction de chaque sonde. Le volume d'échantillon nécessaire pour l'hybridation correspondant à 50 pmol de fluorophores est ensuite calculé.

3.15.3. Hybridation et lavage des lames (format 22K)

Nous disposons au laboratoire de la technologie Agilent double couleur permettant de mesurer l'expression différentielle des gènes entre deux conditions (dans notre cas, comparaison mutant/sauvage). Les ARNa marqués sont fragmentés selon le protocole d'Agilent. Les ARNa marqués (50 pmol) sont réunis dans un *Eppendorf* 1,5 ml et fragmentés 30 min à 60°C dans un volume final de 250 µL. La fragmentation est arrêtée par addition de 250 µL de tampon d'hybridation avant de déposer le mélange sur les lames « *Magnaporthe grisea V2 Oligo Microarray Kit with SurePrint Technology* » (Agilent). L'hybridation est effectuée dans un four (Robbins Scientific) pendant 17 h à 60°C à 4 rpm. Après hybridation, les lames sont lavées à l'obscurité et sous une hotte à charbon actif pour éliminer toute trace d'ozone qui dégrade spécifiquement le fluorophore Cy5. Trois bains successifs sont utilisés. Tout d'abord, les lames sont plongées dans un bain de « *Wash 1* » (Agilent, composition inconnue) pendant 1 min sous agitation faible, puis transférées 1 min dans un bain de « *Wash 2* » (Agilent). Un dernier lavage de 15 s dans de l'acétonitrile permet de sécher les lames.

3.15.4. Lecture des lames

Les lames sont scannées à l'aide du scanner Agilent placé sous hotte à charbon actif. Les lames sont successivement lues à 100% puis 10% de la puissance des lasers pour obtenir les valeurs des spots saturés lors de la lecture à 100%.

3.15.5. Analyse des résultats

3.15.5.1. « Agilent feature extraction »

Ce logiciel (version 9.1) permet d'extraire les données à partir des images virtuelles des lames scannées. Il s'agit de positionner une grille sur l'image en utilisant des contrôles situés

sur les coins de la puce. Les spots non intégrés dans la grille (mauvaise uniformité de couleur, de taille, de forme...) sont dits masqués. Le logiciel crée également un fichier de contrôle dénombrant le pourcentage de spots non conformes, leur répartition sur la lame et celle des spots différentiellement exprimés. Un fichier de données brutes est enfin généré qui sera utilisé par la suite.

3.15.5.2. « GeneData Expressionnist Refiner Array »

« Refiner » est un programme qui utilise les fichiers issus de l'extraction des données et les rend compatibles avec le logiciel d'analyse (*« GeneData Expressionist Analyst »*). Il crée des fichiers qui regroupent les valeurs des intensités de fluorescence absolues (deux fichiers) et un fichier de ratios. Le logiciel permet également d'apprécier la qualité globale des lames selon des paramètres prédéterminés.

3.15.5.3. « GeneData Expressionist Analyst »

Ce logiciel permet de visualiser et de traiter les données issues des lames, qu'elles soient absolues ou relatives.

4. Méthodes de Biologie Cellulaire

4.1. Conditions de culture

Le champignon est cultivé à l'obscurité à 26 °C en boîte de Pétri, en boîte 4X4 ou en boîte de culture cellulaire sur milieu gélosé. Les différents milieux utilisés sont :

Le milieu riz : Farine de riz 2%, Glucose 1%, KH₂PO₄ 0,2%, KNO₃ 0,3%, Agar 1,5%, pH ajusté à 6, milieu riche utilisé pour la sporulation.

Q Le milieu minimum : Glucose 1%, NaNo₃ 0,2%, KH₂PO₄ 0,2%, MgSO₄ 7H₂O 0,05%, CaCl₂ 2H₂O 0,01%, FeSO₄ 7H₂O 0,0004%, Microéléments 1X, \pm Agar 1,5%, pH ajusté entre 5,5 et 5,8. Milieu dépourvu d'acides aminés permettant de mettre en évidence des mutants auxotrophes pour un acide aminé donné.

Le milieu Tanaka-YE gélosé : Glucose 1%, NaNo₃ 0,2%, KH₂PO₄ 0,2%, MgSO₄ 7H₂O 0,05%, CaCl₂ 2H₂O 0,01%, FeSO₄ 7H₂O 0,0004%, Microéléments 1X, Yeast extract 0,2%, ± Agar 1,5%, pH ajusté entre 5,5 et 5,8. Milieu riche permettant la croissance du champignon mais pas sa sporulation. Il est utilisé additionné d'hygromycine pour la sélection des mutants.

Q Le milieu Tanaka –YE liquide : utilisé pour la culture pelliculée de mycélium en vue des extractions d'ADN et d'ARN.

 Le milieu Tanaka – YE avec saccharose : Milieu utilisé pour aider certains mutants de se développer, avec 1 M de saccharose.

Le milieu Potato Dextrose Agar (PDA) : Potato infusion 0,4%, Glucose 2%, Agar 1,5%, utilisé pour observation sous microscope des mycéliums.

Le milieu Sweigard : Yeast nitrogen base without aa 0,16%, L-asparagine anhydre 0,2%, NH₄NO₃ 0,1%, Glucose 1%, Agar 1,5%, utilisé pour la transformation avec glufosinate.

Le milieu Complet : 50 mL 20x Nitrate salts, 1 mL Trace elements, 10 g D-Glucose,
2 g Peptone, 1 g Yeast, Extract, 1 g Casamino-acids, 1 mL Vitamin solution, pH ajusté à 6,5 avec
NaOH ± 15 g agar. Milieu favorisant la sporulation ainsi que la confetisation.

Q Nitrate salts : 120 g NaNO3, 10.4 g KCL, 10.4 g MgSO4 7HOH, 30.4 g Kh2PO4

Trace elements: 80 mL eau, 2.2g ZnSO4 7HOH, 1.1g H3B03, 0.5g MnCl2 4HOH, 0.5g FeSO4 7HOH, 0.17g CoCl2 6HOH, 0.16g CuSO4 5HOH, 0.15g Na2MoO4 2HOH, 5g Na4EDTA. Il faut ajouter les composés dans l'eau dans l'ordre, faire bouillir, puis faire refroidir à 60 degrés, ensuite, équilibrer à pH 6.5 avec KOH. Enfin, il faut laisser refroidir puis ajuster à 100mL avec de l'eau.

4.2. Obtention et transformation des protoplastes

Des protoplastes issus de la souche P1.2 de *Magnaporthe grisea* sont utilisés pour la transformation. Celle-ci est effectuée selon le protocole utilisé au laboratoire.

4.3. Sélection secondaire des transformants

Chaque transformant primaire est repiqué sur milieu Tanaka–YE en présence d'hygromycine 120 µg/mL. Les transformants stabilisés sont ensuite repiqués sur milieu minimum afin d'observer un phénotype particulier (auxotrophie) et ainsi de les identifier.

4.4. Purification par monospores

Une purification des transformants est nécessaire afin d'éviter les mélanges de souches. Pour cela, les transformants sont repiqués sur milieu riz pendant 8 à 10 jours afin d'obtenir leur sporulation. Un implant de mycélium est prélevé et appliqué sur milieu eau gélosée pour que des spores s'y déposent. Les spores sont incubées à 26 °C pendant 12 à 16 heures afin d'obtenir leur germination. Les spores germées sont prélevées indépendamment puis sont isolées sur milieu Tanaka-YE contenant l'agent de sélection (hygromycine). Les boîtes sont incubées pendant 8 à 10 jours à 26 °C à l'obscurité.

4.5. Conservation des mutants sur confettis

Les transformants stabilisés et purifiés sont repiqués sur confettis (disques de papier filtre) et déposés sur milieu complet. Après incubation à 26 °C à l'obscurité, les disques recouverts de mycélium sporulant sont retirés du milieu de culture et séchés à 37 °C. Les disques sont ensuite conservés dans des sachets stériles scellés sous vide et stockés à -20 °C.

4.6. Tests de pouvoir pathogène

4.6.1. Sur plantes entières de riz et d'orge

Les mutants identifiés et purifiés sont repiqués sur milieu riz puis incubés à 26 °C pendant 7 jours afin d'obtenir leur sporulation. Une suspension de 1.10³ spores réalisée à partir de ces cultures est répartie sur milieu riz puis incubée pendant 10 à 14 jours afin d'obtenir des spores synchrones. Les spores sont récupérées en raclant la surface des boîtes en présence d'eau. Elles sont ensuite centrifugées 10 minutes à 1000 rpm à 4 °C puis re-suspendues dans l'eau. Les suspensions de spores sont calibrées à 3.10⁴ spores/ml. 10 ml de suspension additionnée de 0,3 % de gélatine (favorisant la fixation des spores sur les feuilles) sont pulvérisés sur différents cultivars d'orge ou de riz au stade quatre feuilles. Avant inoculation, les plants de riz sont traités au sulfate d'ammonium afin de les rendre plus sensibles à l'infection. Les plantes sont placées une nuit en chambre humide puis sont transférées en serre à 25 °C et 50 % d'humidité relative. Les symptômes sont observés après 7 et 14 jours d'incubation.

4.6.2. Sur feuilles d'orge en survie

Deux gouttes de 35 μ l d'une suspension de spores synchrones calibrée à 3.10⁵ spores/ml sont déposées sur un fragment de feuilles d'orge en survie sur de l'eau gélosée 1 % additionnée de kinétine (2 μ g / μ l) L'apparition des lésions est observée après 4 et 8 jours d'incubation à 26 °C.

4.7. Cytologie

4.7.1. Développement d'appressoria sur membrane de Téflon

Deux gouttes de 35 µl d'une suspension de spores synchrones calibrée à 3.10^5 spores/ml additionnée de 0,5 mM de 1-6 hexadécanediol (produit hydrophobe mimant l'hydrophobicité des feuilles de plantes) sont déposées sur des morceaux de membrane de téflon et mis à incuber à 26 °C. Les observations de cytologie sont effectuées à T = 24h.

4.7.2. Infection d'épiderme d'oignon

Deux gouttes de 35 µl d'une suspension de spores synchrones calibrée à 3.10^5 spores/ml sont déposées sur des fragments d'épiderme d'oignon disposés sur de l'eau gélosée 1 % + 1 % kinétine et mis à incuber à 26 °C. Les observations de cytologie sont effectuées à T = 24 h et T = 40 h.

4.7.3. Observation des hyphes de mycélium

Un implant de mycélium est déposé sur une lame avec un milieu PDA ou TNK-YE. L'observation est réalisée après 48 heures d'incubation, sous un microscope fluorescent avec du calcofluor white.

4.8. Tests avec des inhibiteurs

4.8.1. Tests sur milieu gélosé

La croissance des mutants nuls et de la souche de référence Guy 11 delta-*ku80* est étudiée en présence de différents inhibiteurs. Chaque souche (mutante ou de référence) est cultivée pendant 10 jours sur milieu minimum additionné d'eau, de 1% de DMSO (solvant dans lequel sont dissociées les matières actives) ou des produits à étudiés (dans 1% de DMSO).

Différentes familles de fongicides ont été testées dans cette expérience :

- Tébuconazole à 03, 0.1 et 3 ppm
- Calcofluor white à 10, 30 et 100 ppm
- Nikkomycine de 0.1 à 30 ppm
- Polyoxin D à 10, 30 et 100 ppm
- Aculeacine A de 0,0003 à 0,1 ppm
- Caspofungine à 10, 30 et 100 ppm
- Chlorpromazine à 100, 300 et 1000 ppm
- Pyriméthanil à 10, 30 et 100 ppm
- Iprodione à 10, 30 et 100 ppm

4.8.2. Tests dans milieu liquide

La croissance des mutants nuls, ainsi que la souche sauvage est mesurée à l'aide de *Técan*. La lecture de la densité optique (DO) est lue à 620 nm.

Ce test se déroule en 3 étapes. La première étape consiste à la préparation de la première culture de 48 heures. Pour ceci, dans un erlen de 500 ml, une vingtaine d'implants de la souche étudiée est laissé pousser en présence de 200 ml de milieu minimum. Après 48 heures, dans l'infors à 26°C et avec une agitation de120 rpm, cette culture est centrifugée pendant 10 minutes à 1000 rpm et est récupérée dans des falcons de 50 ml. Ensuite le broyat est obtenu, à l'aide d'un blender suite à un broyage de 2 fois 1 minute. 2 ml de ce broyat est ajouté dans un erlen de 100 ml avec 50 ml de milieu minimum. Ainsi commence la deuxième étape, dans l'infors, pendant 16 heures.

Apres 16 heures, cette culture est ré centrifugée et broyée. Suite à une mesure de DO à 620, 1 ml de ce broyat à DO 0.05 est déposé dans les plaques de 48 puits.

Enfin, la dose d'inhibiteurs est ajoutée à cette culture. Les plaques, ensuite, sont conservées dans l'étuve à 26°C. La lecture des plaques est réalisée toutes les 24 heures.


Figure 28 : Alignement du domaine Pkinase des protéines MgMps1 et ScSlt2. Le domaine est bien conservé entre ces deux espèces

RESULTATS

1. Etude de la MAP kinase Mps1 de M. grisea

Le génome de *M. grisea*, champignon filamenteux pathogène, est entièrement séquencé et annoté (Dean, *et al.* 2005). Une analyse bioinformatique de ce génome (http://www.genome.wi.mi.edu/annotation/fungi/ Magnaporthe) révèle l'existence chez *M. grisea* d'un gène orthologue de Sc*SLT2 (MgMPS1)*. L'analyse bioinformatique et fonctionnelle de *MgMPS1* sera décrite dans les paragraphes suivants.

1.1. Analyse bioinformatique de la MAP kinase encodée par *MgMPS1*

La protéine de *M. grisea* la plus semblable à ScSlt2 est celle encodée par le gène *MgMPS1* (MGG_04943.6; Blastp: e-value de 2e-146). Ce gène comporte 5 exons et il est situé sur le supercontig 22 (position : 832991-834703). MgMps1 est une protéine de 415 acides aminées, qui possède un seul domaine « Pkinase » (IPR017442, 292 aa). Ce domaine de MgMps1 est similaire à celui de ScSlt2 (similarité 84% et une identité de 71%, Figure 28). La séquence protéique de MgMps1 possède un site de phosphorylation (PHO) avec le motif TEY. Ce site, nécessaire pour la phosphorylation de Mps1 par une MAP Kinase, est situé dans un domaine appelé T-Loop, nécessaire pour l'accessibilité du site PHO. Enfin, MgMps1 possède un site NLS qui devrait permettre la migration de Mps1 vers le noyau (Annexe 1).

Nous avons identifié, par Blast, les protéines similaires à MgMps1 chez l'ensemble des champignons ascomycètes analysés (Annexe 2). L'alignement de ces séquences des protéines montre qu'elles sont très conservées, sauf la partie C-terminale (Annexe 1). L'arbre phylogénétique construit à partir de cet alignement montre que ces protéines sont orthologues puisqu'elles ont une phylogénie identique à celles des espèces étudiées. De plus, l'ensemble de ces protéines a le même domaine fonctionnel (Pkinase). L'ensemble de ces arguments suggère que ces différentes protéines ont la même fonction (MAP kinase).

1.2. Construction de mutants nuls du gène MgMPS1

Des mutants nuls du gène *MgMPS1* (Xu, *et al.* 1998) ont déjà été obtenus à partir de la souche sauvage Guy11. Afin d'avoir tous les mutants des gènes de cette voie dans le même fond génétique, nous avons reconstruit le mutant nul du gène *MgMPS1* à partir de notre isolat de référence *Guy11∆ku80*. La fréquence de remplacement de gènes chez *M. grisea* n'est que 5% (Villalba, *et al.* 2007). *KU80* est un gène essentiel pour la réparation des cassures double-brin de l'ADN et sa délétion augmente la fréquence de remplacement de gènes chez les champignons (Ninomiya, *et al.* 2004). Le mutant de délétion *Guy11∆ku80* est disponible au laboratoire (Villalba, *et al.* 2007). Son phénotype et son pouvoir pathogène sont identiques à ceux de la souche sauvage GUY11. Ce mutant a donc été utilisé comme la souche réceptrice pour la construction de mutants, afin d'augmenter la

fréquence de remplacement de gène, et donc la probabilité d'obtenir un mutant par cette stratégie.

1.2.1. Obtention du mutant nul Δmps1

Le vecteur de remplacement de MgMPS1, a été construit par PCR et ligation à trois voies (Matériel et méthode). Les amplifications par PCR ont permis l'obtention de la région « flanquante gauche » de MgMPS1 (amorces mps1-2 et mps1-15), qui contient 556 nt de son promoteur et de la région « flanquante droite » de MgMPS1 (amorces mps1-3 et mps1-13), qui contient 770 nt de son terminateur. Ces cassettes ont été utilisées pour construire un vecteur avec le gène HPH (résistance à l'hygromycine). Dans ce vecteur, l'ORF de Mps1 a été remplacé par l'ORF de HPH. Ce vecteur linéaire de 2,5 kb, a été introduit par transformation dans des protoplastes de la souche Guy $11\Delta ku80$ de *M. grisea*. Les 12 transformants résistants à l'hygromycine obtenus ont été mis à croître sur milieu CM afin de différencier les transformants des mutants puisqu'ils ont un phénotype bien caractéristique (mycélium dépigmente et ras; Xu, 1998). 10 des 12 transformants présentent ce phénotype. Cependant, seul 8 de ces 10 transformants ne contiennent pas l'ORF de MgMPS1. Les 2 faux positifs qui ont encore l'ORF de MgMPS1 et un locus muté pourraient correspondre à des mélanges mutant/sauvage (transformants non purifiés). La fréquence de mutants obtenus par recombinaison homologue pour cette transformation aura donc été de 67% (8/12). Parmi ces transformants, cinq mutants *Guy11∆ku80∆mps1* (T1, T4, T5, T5, T6) ont été retenus, ainsi que deux transformants ectopiques (T2, T3). Nous avons aussi construit des mutants $\Delta mps1$ dans la souche P1.22ku80, car nous n'avons pas pu obtenir des mutants Aswi4 dans la souche Guy112ku80. Pour pouvoir comparer les deux mutants, l'utilisation de la même souche parentale est importante. Ainsi, le même vecteur de remplacement de MgMPS1, a été introduit par transformation dans des protoplastes de la souche P1.2Aku80 de M. grisea. Les 4 transformants obtenus présentent un phénotype, équivalent à celui des mutants *Guy11∆ku80∆mps1*. Les contrôles par PCR et qPCR de leurs ADN génomiques montrent que les transformants purifiés sont dépourvus de l'ORF de *MgMPS1*. La fréquence de mutants obtenus pour cette transformation aura donc été de 100%. Parmi ces transformants, deux mutants (T1, T2,) ont été retenus.

1.3. Croissance, morphologie et sporulation du mutant de gène MgMPS1

Le mutant *Guy11*Δ*mps1* déjà décrit (Xu, *et al.* 1998), a un taux de croissance radiale sur un milieu gélosé semblable à celui de la souche sauvage. Cependant, ce mutant a une réduction très importante de ses hyphes aériens, et de sa pigmentation, ainsi qu'une sporulation réduite de 99%. Les colonies du mutant montrent aussi une autolyse progressive, commençant par la partie centrale de la colonie lors de son vieillissement. L'analyse phénotypique des mutants $\Delta mps1$ a été réalisée avec les différents transformants que nous avons obtenus (Paragraphe 1.2.1).



Figure 29 : Phénotype mycélien du mutant *Guy11∆ku80∆mps1* et de la souche sauvage *Guy11∆ku80*. Le mutant a une croissance équivalente à celle de la souche sauvage. Cependant il présente une réduction du nombre d'hyphes aériens et de sa pigmentation une absence d'hyphe aérienne



Figure 30 : Taux de sporulation du mutant *Guy11Δku80Δmps1* en présence et en absence de G6P. La souche sauvage *Guy11Δku80*, l'ectopique du *Guy11Δku80Δmps1* ainsi que le mutant *Guy11Δku80Δmps1 complémenté, compΔmps1* sporulent normalement en présence du G6P. Le mutant *Guy11Δku80Δmps1* sporule 10⁶ plus avec G6P

Résultats

1.3.1. Morphologie du mycélium, croissance radiale et sporulation des mutants Δmps1 de M. grisea

Les mutants *P1.2* Δ *ku80* Δ *mps1* et *Guy11* Δ *ku80* Δ *mps1* présentent une absence de mycélium aérien et une faible pigmentation (Figure 29). La sporulation des mutants *P1.2* Δ *ku80* Δ *mps1* et *Guy11* Δ *ku80* Δ *mps1* a été étudiée à partir de cultures sur milieu complet gélosé. Ces expériences ont montré une absence totale de sporulation chez ces 2 mutants.

Une expérience de compensation du défaut de sporulation des mutants $P1.2\Delta ku80\Delta mps1$ et *Guy11*Δ*ku80*Δ*mps1* a été réalisée en rajoutant au milieu CM une solution de 10 mM de glucose-6phosphate (G6P), car ce sucre phosphorylé peut compenser partiellement le défaut de sporulation du mutant *Aatg8*, (AuToPhahy 8) de *M. grisea* (Deng, *et al.* 2009). Cette addition permet aux mutants *P1.2* $\Delta ku80\Delta mps1$, *Guy11* $\Delta ku80\Delta mps1$ de produire une quantité de spores significative (10⁶ par boite) mais inférieure au taux de sporulation de la souche sauvage sur un milieu CM (10% du taux de sporulation observé chez les souches *P1.2* Δ *ku80* et *Guy11* Δ *ku80*, Figure 30). Cependant, ce taux de sporulation est suffisant afin d'utiliser ces spores dans des expériences de mesure soit du taux de différentiation appressoriale, soit du pouvoir pathogène. Ces résultats montrent que le G6P complémente significativement le défaut de sporulation des mutants $\Delta mps1$ comme cela a été observé pour le mutant *Aatg8* (Deng, *et al.* 2009). En effet, par comparaison avec la souche sauvage, le mutant *Aatg8* a un défaut de sporulation de -98% sur un milieu complet avec du lactose comme seule source de carbone et de -30% sur un milieu complet avec du glucose comme seule source de carbone. Dans le cas du mutant *Amps1*, le défaut de sporulation est plus fort que celui observé pour le mutant *Aatg8* sur un milieu CM avec du glucose comme seule source de carbone (-100% pour *∆mps1* vs -30% pour *∆atg8* sur le même milieu). L'addition de 10 mM de G6P compense partiellement le défaut de sporulation du mutant $\Delta atg8$ sur un milieu CM avec lactose (-50 % du niveau de sporulation de la souche sauvage, 40 fois par rapport au milieu sans G6P). Cette compensation par le G6P est encore plus marquée chez le mutant $\Delta mps1$, car elle est qualitative (passage de 0 spores à 10⁶ spores par boite), même si le niveau atteint reste inférieur à celui de la souche sauvage (-90%). Il est donc vraisemblable qu'un mécanisme commun impliqué dans la sporulation et compensable partiellement par le G6P, soit altéré chez ces deux mutants. Il a été observé chez le mutant $\Delta atg8$, une accumulation de la protéine Gph1 (enzyme de dégradation de glycogène) dont l'activité enzymatique pourrait être inhibée par le G6P comme cela a été décrit chez la levure S. cerevisiae (François et Parrou, 2001). L'hypothèse émise par les auteurs (Deng, et al. 2009) est que l'accumulation de Gph1 chez le mutant *datg8* perturberait l'homéostasie du glycogène et ainsi conduirait à un défaut de sporulation. Dans le cadre de cette hypothèse, l'addition G6P inhiberait l'activité de Gph1, ce qui rétablirait partiellement la sporulation chez le mutant *Aatg8*. Pour tester cette hypothèse, les auteurs ont construit un mutant $\Delta gph1$ qui sporule normalement. Le double mutant $\Delta gph1\Delta at8$ sporule beaucoup mieux que $\Delta atg8$ (10 fois plus) sur un milieu CM avec lactose. Ainsi, la suppression de la protéine Gph1 conduit à une suppression partielle du défaut de



Figure 31 : Formation des protoplastes chez le mutant Δ*mps1* et la souche sauvage Guy11Δku80Δmps1. Tp50 pour le mutant Guy11Δku80Δmps1 est de 60 minutes, le Tp50 pour la souche sauvage Guy11Δku80, est de 100 minutes

sporulation du mutant $\Delta atg8$. Ces expériences nous ont conduit à émettre l'hypothèse que l'altération de la sporulation observée chez le mutant $\Delta mps1$ pourrait provenir de la sur-expression de Gph1 Cette hypothèse pourrait être testée en mesurant l'expression de *GPH1* chez le mutant $\Delta mps1$ afin de savoir s'il existe un changement du niveau d'expression de ce gène chez ce mutant par rapport à la souche sauvage. Alternativement, le mutant $\Delta mps1$ pourrait être altéré dans le processus d'autophagie, indépendamment de la sur-expression de Gph1. Cette hypothèse pourrait être testée en observant les autophagosomes du mutant $\Delta mps1$ en condition de carence en azote. En effet, dans ces conditions de culture, le mutant $\Delta atg8$ présente une absence d'autophagosomes.

1.4. Altération des parois des mutants Δmps1

Un test de protoplastisation a été réalisé avec les deux mutants P1.21ku801mps1 et *Guy11*Δ*ku80*Δ*mps1* afin de comparer leurs cinétiques de protoplastisation lors d'un traitement par le glucanex (1g/100ml). Les mutants P1.2Aku80Amps1 et Guy11Aku80Amps1 produisent des protoplastes plus rapidement que la souche sauvage, comme cela est montré pour le couple $Guy11\Delta ku80$ et $Guy11\Delta ku80\Delta mps1$ (Figure 31). En 10 minutes, le mutant $\Delta mps1$ et la souche sauvage $Guy11\Delta ku80$ produisent 17% du maximum de protoplastes. Après 30 minutes de traitement enzymatique, la différence de production de protoplastes entre les mutants $\Delta mps1$ et la souche sauvage est de 1,4. Le mutant *Amps1* atteint son maximum de production de protoplastes en 120 minutes; alors que la souche sauvage n'a produit que 60% de protoplastes pendant ce temps de traitement enzymatique. Enfin, la souche sauvage atteint son maximum de production en 240 minutes. D'après la Figure 31, il existe une différente cinétique de production de protoplastes chez le mutant $\Delta mps1$ et la souche sauvage *Guy11\Delta ku80*. Le temps de protoplastisation pour la libération de 50% des protoplastes (Tp50) pour le mutant *Amps1* est 60 minutes, alors que le Tp50 pour la souche sauvage $Guy 11\Delta ku80$ est 110 minutes. Ceci démontre que la paroi des mutants $\Delta mps1$ est très sensible aux enzymes de dégradation de paroi présente dans le glucanex. En effet, ceux-ci sont capables de dégrader la paroi du mutant $\Delta mps1$ deux plus rapidement. Cette propriété suggère que la structure et la composition de la paroi du mutant Δ*mps1* soient fortement modifiées par rapport à la souche sauvage.

Le même test de sensibilité aux enzymes de dégradation de la paroi cellulaire a été déjà réalisé chez le mutant $\Delta mck1$ (Map Kinase Kinase Kinase ; Jeon, *et al.* 2008) et chez le mutant $Guy11\Delta mps1$ (Xu, *et al.* 1998). Les résultats obtenus avec le mutant $\Delta mck1$ et $Guy11\Delta mps1$ sont similaires aux nôtres, et ces mutants commencent à libérer des quantités significatives de protoplastes au bout de 10 minutes de traitement enzymatique comme le mutant $\Delta mps1$ analysé au laboratoire. Ces mutants atteignent leur maximum de production de protoplastes au bout de 60 minutes, alors que les souches sauvages correspondantes n'atteignent ce maximum qu'au bout de 200 minutes. Dans le cas de notre mutant $\Delta mps1$, le maximum de production de protoplastes n'est atteint qu'en 120 minutes. La différence dans les cinétiques de production de protoplastes entre les différents mutants $\Delta mps1$







Figure 33 : Molécule de la caspofongine



Figure 34 : Molécule de la nikkomycine

pourrait provenir de la différence dans le type d'enzyme de dégradation utilisée (glucanex versus novozyme).

1.5. Sensibilité des mutants *Amps1* aux inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi

La voie de signalisation MgMps1 pouvant être impliquée dans la réponse à un « stress » pariétal, nous avons utilisée différents fongicides agissant sur la biosynthèse de la paroi, comme l'aculéacine (Figure 32), la caspofongine (Figure 33) et la nikkomycine (Figure 34). L'aculéacine est un peptide contenant des acides gras, produit par *A. aculeatus* (Mizoguchi, *et al.* 1977). Il agit sur les cellules en croissance, en inhibant la biosynthèse des glucanes de la paroi cellulaire, comme la caspofongine (McCarthy, *et al.* 1985). La caspofongine est le premier médicament d'une nouvelle classe d'antifongiques, les *échinocandines*, qui ont un mode d'action unique. C'est un peptide antifongique qui agit par inhibition non-compétitive de 1,3-ß-D-glucane synthase, qui est un polysaccharide essentiel de la paroi des agents pathogènes fongiques, non présent dans la cellule des mammifères. La cible moléculaire de la caspofongine est un complexe enzymatique hétéromérique. L'inhibition de la synthèse du glucane est à l'origine d'une instabilité osmotique et de la lyse de la membrane fongique (Diffine, 2003). La caspofongine est aussi le produit actif du médicament commercialisé par Merck and Co « Candidas ».

La nikkomycine Z est un analogue de nucléotide (Dahn, *et al.* 1976) qui bloque la synthèse de la chitine fongique, utilisée par le microorganisme pour constituer sa paroi, grâce à sa similarité structurale avec UDP-N-acétylglucosamine. Il est produit à partir de *Streptomyces ansochromogenes* (Liao, *et al.* 2009). Ce produit peut tuer le champignon en augmentant la perméabilité de la paroi cellulaire fongique (Smart, 1996). Elle agit sur la chitine synthase surtout pendant la phase mycéliale (Li et Rinaldi, 1999).

Nous avons mesuré leur effet de ces inhibiteurs sur la croissance de la sa souche sauvage $Guy11\Delta ku80$. Ces mesures de croissances ont été réalisées soit en culture liquide (DO), soit en culture sur milieu gélosé (diamètre des colonies).

1.5.1. Mise au point de la mesure de la sensibilité du mutant *Guy11ΔKU80Δmps1* aux inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi

Des expériences préliminaires ont été réalisées pour définir les concentrations en fongicides inhibant la croissance de *M. grisea*.

1.5.1.1. Sensibilité de *M. grisea* aux inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi : Milieu gélosé 1.5.1.1.1. Mise au point des mesures d'inhibition de croissance sur milieu gélosé

Les mesures de croissance ont été réalisées sur un milieu minimum en boites de Pétri (Diamètre : 90mm). Différentes concentrations de nikkomycine, d'aculéacine et de caspofongine ont été utilisées afin de pouvoir estimer les DI50 et DI80 (Tableau 5 ; Figures 35, 36, 37).





Figure 35: Sensibilité de *M. grisea* à l'aculéacine. Calculs des DI50 et DI80 chez *Guy11∆ku80*. Les mesures sont réalisées au bout de 7 jours (Milieu minimum, gélosé, croissance radiale). DI50 : 0.01 ppm, DI80 : 0.03ppm



Figure 36: Sensibilité de *M. grisea* à la caspofongine. Calcul des DI50 et DI80 chez *Guy11*Δ*KU80*. Le test a été réalisé avec différentes doses de la nikkomycine, les mesures sont réalisées au bout de 7 jours (Milieu minimum, gélosé, croissance radiale). DI 50 : 01 ppm, DI80 : 0.3 ppm



Figure 37: Sensibilité à la nikkomycine. Calcul des DI50 et DI80 chez *Guy11ΔKU80*. Le test a été réalisé avec différentes doses du Nikkomycine, les mesures sont réalisées au bout de 7 jours (Milieu minimum, gélosé, croissance radiale). DI 50 : 0.06 ppm, DI80 : 0.1 ppm

	DI50	DI80
Aculéacine	0.006 ppm	0.03 ppm
Caspofongine	0.200 ppm	0.30 ppm
Nikkomycine	0.050 ppm	0.10 ppm

Tableau 5: Sensibilité de *M. grisea* à l'aculéacine, lacaspofongine et à la nikkomycine

Une cinétique d'inhibition a été réalisée afin de déterminer si l'effet des inhibiteurs est immédiat. Nous avons observé qu'à de doses faibles d'aculéacine (0.001 ppm et 0.003 ppm), la croissance du champignon est bloquée pendant 6 jours. Par la suite, il parvient à se développer avec la même vitesse de croissance que la souche sauvage sans inhibiteur. A plus forte dose (0.006 ppm, DI50), la croissance du champignon est bloquée pendant 6 jours, puis démarre lentement à partir de 6-7 jours. D'après ces mesures, l'aculéacine a un effet immédiat sur la croissance de *M. grisea*. Par ailleurs, l'utilisation de fortes doses (> 0,03 ppm) ne permet pas d'inhiber totalement la croissance (Maximum 90%). La même expérience a été réalisée en présence de nikkomycine. Comparée à l'aculéacine, la nikkomycine ne provoque pas de retard du démarrage de la croissance quel que soit la dose (Figure 38, 39 en Annexe). Par ailleurs, à forte dose de nikkomycine, la croissance est inhibée à 100 % chez la souche sauvage *Guy11Δku80*, comme c'est le cas pour la caspofongine.

1.5.1.1.2. Sensibilité du mutant G*uy11ΔKU80Δmps1* aux inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi : Milieu gélosé

Une fois la gamme de doses des trois inhibiteurs définie, les mêmes expériences ont été réalisées avec le mutant *Guy11∆ku80∆mps1* (Tableau 6). D'après ces résultats, le mutant *Guy11∆ku80∆mps1* est 3 à 5 fois plus sensible à l'aculéacine que la souche sauvage et au maximum 2 fois plus sensible à la nikkomycine que la souche sauvage (Figure 40, 41, 42). Cependant le mutant *∆mps1* n'est pas hyper sensible à la caspofongine

	Guy11∆ku80∆mps1	<i>Guy11∆ku80</i>	Commentaire
Aculéacine DI50	0.0025 ppm	0.006 ppm	2X HS <i>Дтрs1</i>
Aculéacine DI80	0.006 ppm	0.030 ppm	5X HS <i>Дтрs1</i>
Caspofongine DI50	0.100 ppm	0.200 ppm	Pas de différence
Caspofongine DI80	0.300 ppm	0.300 ppm	Pas de différence
Nikkomycine DI50	0.025ppm	0.050 ppm	2X HS <i>Дтрs1</i>
Nikkomycine DI80	0.065ppm	0.100 ppm	Pas de différence

Tableau 6: Sensibilité du mutant *Amps1* aux inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi ; HS : hypersensible



Figure 40: Sensibilité du mutant *Guy11Δku80Δmps1* à l'aculéacine. Test d'inhibition avec l'aculéacine, sur le mutant *Guy11Δku80Δmps1*. Le test a été réalisé avec différentes doses de l'aculéacine. Les mesures sont réalisées au bout de 7 jours. DI 50 : 0.003 ppm, DI80 : 0.006 ppm (Milieu minimum, gélosé)



Figure 41 : Sensibilité du mutant *Guy11*Δ*ku80*Δ*mps1* à la caspofongine. Test d'inhibition avec l'aculéacine, sur le mutant *Guy11*Δ*ku80*Δ*mps1*. Le test a été réalisé avec différentes doses de la caspofongine. Les mesures sont réalisées au bout de 7 jours. DI 50 : 0.1 ppm, DI80 : 0.3 ppm (Milieu minimum, gélosé)

Nikkomycine 7 jours 100 80 60 KU80 Inhibition z 40 MPS1 Inhibition 20 0 0 0,003 0,01 3 10 0,03 0,1 0,3 1 ppm

Figure 42: Sensibilité du mutant *Guy11Δku80Δmps1* à la nikkomycine. Test d'inhibition avec l'aculéacine, sur le mutant *Guy11Δku80Δmps1*. Le test a été réalisé avec différentes doses de la nikkomycine. Les mesures sont réalisées au bout de 7 jours. DI 50 : 0.03 ppm, DI80 : 0.1 ppm (Milieu minimum, gélosé)

Aux fortes doses d'aculéacine (>0.01 ppm), une inhibition à 90 – 100% de la croissance du mutant $\Delta mps1$ est observée, alors que chez la souche sauvage l'inhibition n'est que de 80%, à ces fortes concentrations (DI80). Nous avons testé la survie de *M. grisea* à ces fortes concentrations. Des implants du mutant *Guy11Δku80Δmps1* récupéré 7 jours après son contact avec un milieu contenant 0.03 ppm d'aculéacine, sont transférés sur un milieu minimum sans fongicides. Ces implants poussent normalement, ce qui signifie que le mutant *Guy11Δku80Δmps1* est encore vivant après un contact prolongé avec l'aculéacine (Tableau 7). Dans le cas de nikkomycine, à fortes doses, (1 ppm), nous observons une inhibition totale (100%) de la croissance du mutant *Δmps1*. A cette dose le mutant *Δmps1* n'est pas mort puisque l'implant récupéré de ce milieu après 7 jours de contact avec 1 ppm de nikkomycine, pousse normalement sur un milieu sans inhibiteurs. En présence d'1 ppm de caspofongine, une inhibition de 100 % a été observée (Tableau 7). A cette concentration, l'implant mycélien ne repousse pas sur un milieu sans caspofongine. Ainsi, la caspofongine tue le mutant *Guy11Δku80Δmps1* dès 1 ppm. Pour obtenir cette mortalité avec la souche sauvage *Guy11Δku80*, il faut 3 ppm de caspofongine (pas d'effet à 1 ppm). Le mutant *Δmps1* est donc hypersensible à l'effet toxique des fortes concentrations de la caspofongine.

	Aculéacine	Caspofongine	Caspofongine	Nikkomycine
	0.03 ppm	1ppm	3ppm	1 ppm
Guy11∆ku80	SURVIE	SURVIE	MORT	SURVIE
Guy11∆ku80∆mps1	SURVIE	MORT	MORT	SURVIE

Tableau 7 : Viabilité de *M. grisea* après un traitement par les fortes doses d'inhibiteurs. A fortes doses d'aculéacine et de nikkomycine, le mutant et la souche sauvage survivent. A la dose de 1 ppm de caspofongine, le mutant $\Delta mps1$ est mort. A très forte dose de caspofongine (3 ppm), la souche sauvage est morte.

1.5.1.2. Sensibilité de *M. grisea* aux inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi : Milieu liquide

Les tests d'inhibition ont été également réalisés dans un milieu liquide. Pour ceci, un protocole particulier a été mis en place (voir Matériels et méthodes). La même concentration de mycélium broyé utilisé comme inoculum est cultivée en plaques de 96 puits contenant 1 ml de milieu minimum avec différentes concentrations d'inhibiteur. La croissance fongique est mesurée par l'augmentation de la DO au cours du temps (0 à 7 jours).

1.5.1.2.1. Mise au point des mesures d'inhibition en milieu liquide

Comme pour les expériences en un milieu gélosé, deux inhibiteurs ont été utilisés, l'aculéacine et la nikkomycine. Nous avons calculé la cinétique de la croissance de la souche sauvage en absence et en présence d'aculéacine. La même expérience a été réalisée en présence et en absence de nikkomycine



Aculéacine 4-6 jours

Figure 43: Pourcentage d'inhibition, dans un milieu liquide, chez *Guy11Δku80*, en présence de différentes concentrations de l'aculéacine, mesuré d'après la croissance entre le quatrième jour et le sixième jour





Figure 44: Pourcentage d'inhibition, dans un milieu liquide, chez *Guy11*Δ*KU80*, en présence de différentes concentrations de Nikkomycine, mesuré d'après la croissance entre le quatrième jour et le sixième jour

Aculéacine 4 jours



Figure 45 : Calculs des DI50 et DI80 de la souche sauvage en présence de l'aculéacine, dans un milieu liquide, avec une mesure au quatrième jour. DI50 : 0.001 ppm, DI80 : 0.003 ppm

Nikkomycine 4 jours



Figure 46 : Calculs des DI50 et DI80 de la souche sauvage en présence de la nikkomycine, dans un milieu liquide, avec une mesure au quatrième jour. DI50 : 0.3 ppm, DI80 : 1 ppm

	<i>Guy11∆ku80</i>	Milieu Liquide	Milieu Liquide	Commentaire
		D04*	ΔDO4-6**	
Aculéacine	DI50	0.002 ppm	0.002 ppm	pas de différence
Aculéacine	DI80	0.003 ppm	0.003 ppm	pas de différence
Nikkomycine	DI50	0.600 ppm	0.300 ppm	X2
Nikkomycine	DI80	1.000 ppm	1,000 ppm	pas de
				différence-

(Tableau 8). Le calcul d'inhibition de la croissance a été réalisé, à partir ces deux cinétiques, de deux manières différentes.

Tableau 8: Influence de la méthode de mesure de la croissance de *M. grisea* sur les valeurs d'inhibition de croissance par l'aculéacine et la nikkomycine. * DO4 : mesure de la DO à 4 jours. ** Δ DO4-6 : accroissement de la DO entre 4 et 6 jours

Tout d'abord, l'inhibition a été calculée à partir des valeurs de la croissance (DO) de la souche sauvage *Guy11∆ku80* à 4 jours. Puis, nous avons utilisé la différence de la croissance entre 4 et 6 jours pour les calculs d'inhibition de la croissance (Δ DO4-6, Figure 43, 44, 45, 46). Les valeurs de DI50 et DI80 obtenus avec ces deux méthodes de mesures de la croissance sont équivalentes (Tableau 8). Nous avons gardé la mesure à 4 jours pour la suite de nos expériences. En effet, ce type de mesure à un temps, bien que moins précis que l'accroissement (4-6 jours) est comparable aux mesures réalisées avec des cultures gélosées à un seul temps (7 jours).

	<i>Guy11∆ku80</i>	Milieu Liquide à 4 J	Milieu Gélosé à 7 J	Commentaire
Aculéacine	DI50	0.002 ppm	0.006 ppm	R x 3 gélosé
Aculéacine	DI80	0.003 ppm	0.030 ppm	R x 10 gélosé
Nikkomycine	DI50	0.600 ppm	0.050 ppm	S x 10 gélosé
Nikkomycine	DI80	1.000 ppm	0.100 ppm	S x 10 gélosé

Tableau 9: Comparaison de la sensibilité de *M. grisea* à l'aculéacine et à la nikkomycine en milieu liquide (DO4dpi) et en milieu gélosé (diamètre à 7 dpi). R : Réduit, S : Sensible

Nous avons obtenus des valeurs d'inhibition de la croissance très différentes suivant les conditions de culture (Tableau 9). Ainsi, *M. grisea* est plus sensible à l'aculéacine en milieu liquide qu'en milieu gélosé. En liquide, *M. grisea* pourrait facilement être en contact avec l'aculéacine. En conséquence, les hyphes pourraient absorber plus facilement l'aculéacine en milieu liquide qu'en milieu gélosé. Au contraire, *M. grisea* est 10 fois plus sensible à la nikkomycine en milieu gélosé qu'en milieu liquide. Cela pourrait résulter de la résistance des hyphes à la nikkomycine en milieu gélosé ou d'une plus forte adsorption de nikkomycine sur les parois des plaques de microtitration que celles des boites de Petri.



Figure 47: Sensibilité du mutant *Guy11∆ku80∆mps1,* à l'aculéacine, mesuré d'après la croissance au quatrième jour, en milieu minimum, liquide



Figure 48: Sensibilité du mutant *Guy11Δku80Δmps1*, à la nikkomycine, mesuré d'après la croissance au quatrième jour, en milieu minimum, liquide

En conclusion, il existe une différence importante entre les concentrations nécessaires à l'inhibition de la croissance de *M. grisea* par l'aculéacine et la nikkomycine en fonction des protocoles utilisés (culture liquide vs gélosée). Ainsi, les comparaisons des sensibilités des mutants de *M. grisea* par rapport à la souche sauvage seront réalisées avec un protocole en de croissance mycélienne en milieu gélosé, qui nous semble être le protocole le plus fiable.

1.5.1.2.2. Sensibilité du mutant G*uy11Δku80Δmps1* aux inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi : milieu liquide

Les cinétiques de croissance du mutant $\Delta mps1$ ont été réalisées en présence et en absence d'inhibiteurs, pendant sept jours. Les courbes de croissance réalisées, en présence d'aculéacine et de nikkomycine montre que l'effet ce produit est visible à partir du quatrième jour. Les pourcentages d'inhibition ont été calculés avec les DO du quatrième jour. En présence d'aculéacine, $Guy11\Delta ku80\Delta mps1$ présente une DI50 de 0.0006 ppm et une DI80 de 0.002 ppm (Figure 47). En présence de nikkomycine, $Guy11\Delta ku80\Delta mps1$ présente une DI50 de 0.1 ppm et une DI80 de 0.3 ppm (Figure 48).

	<i>Guy11∆ku80∆mps1 Guy11∆ku80</i>		Commentaire
Aculéacine Liquide DI50	0.001 ppm	0.002 ppm	4X HS <i>∆mps1</i>
Aculéacine gélosé DI50	0.003 ppm	0.006 ppm	2X HS <i>∆mps1</i>
Aculéacine Liquide DI80	0.002 ppm	0.003 ppm	pas de différence
Aculéacine gélosé DI80	0.006 ppm	0.030 ppm	5X HS <i>Дтрs1</i>
Nikkomycine Liquide DI50	0.100 ppm	0.600 ppm	6X HS <i>∆mps1</i>
Nikkomycine gélosé DI50	0.030 ppm	0.050 ppm	2X HS <i>∆mps1</i>
Nikkomycine Liquide DI80	0.300 ppm	0.100 ppm	2X HS <i>∆mps1</i>
Nikkomycine gélosé DI80	0.100 ppm	0.100 ppm	pas de différence

Tableau 10 : Sensibilité du mutant *Amps1* à l'aculéacine et à la nikkomycine (milieu liquide et gélosé).HS : hypersensible

Le tableau ci-dessus (Tableau 10) récapitule les DI50 et DI80 calculées à partir des expériences réalisées avec le mutant et la souche sauvage, en milieu gélosée et en milieu liquide. Cette analyse montre que le mutant $\Delta mps1$ est 2 à 4 fois plus sensible à l'aculéacine et 2 à 3 fois à la nikkomycine. L'hypersensibilité de mutant $\Delta mps1$ à l'aculéacine varie beaucoup entre DI50 et DI80 (2 à 5). Cette différente pourrait provenir de fait qu'une inhibition de 100% n'est pas atteinte avec cet inhibiteur. De plus, à DI80, il y a une grande variation entre milieu gélosé et milieu liquide (0 à 5). L'hypersensibilité du mutant à la nikkomycine est encore plus instable entre DI50 et DI80 (2 à 6) et entre différentes conditions de culture (2 à 6). Ainsi pour la suite de nos expériences, nous avons

décidé de baser sur les DI50 qui sont plus fiables. Les résultats obtenus avec les DI50 sont plus constants, donc, plus fiables.

1.5.2. Sensibilité de *M. grisea* à un mélange de fongicides d'aculéacine et de nikkomycine

Les résultats des tests de croissance en présence d'un inhibiteur de la biosynthèse de la paroi montrent que le mutant *Guy11∆ku80∆mps1* n'est pas fortement hypersensible à l'aculéacine ou à la nikkomycine. Cette faible hypersensibilité pourrait provenir de phénomènes de compensation. En effet, de tels phénomènes de compensation ont été observés chez les levures. Ainsi, il a été montré qu'un traitement de *C. albicans* par la caspofongine (inhibiteur de la biosynthèse des glucanes), conduit à une augmentation significative du contenu en chitine de la paroi (Stevens et al. 2006; Walker, et al. 2008), afin de vraisemblablement compenser l'altération de la paroi par manque de glucanes, par un accroissement de la biosynthèse de chitine. Il a été aussi montré (Sandovsky-Losica, et al. 2008) que la caspofongine et la nikkomycine ont un effet synergique sur la croissance et la viabilité de C. albicans. La MIC (la quantité minimale nécessaire pour commencer à inhiber la croissance, DI100) de C. albicans pour la caspofongine est de 0,26 mg/L et la MIC pour la nikkomycine est de 10,4 mg/L. Lors d'un mélange caspofongine avec la nikkomycine, la MIC des deux inhibiteurs chute à 0,006mg/L pour la caspofongine (1/50 de la MIC caspofongine seule) et à 1,9mg/L pour la nikkomycine (1/10 de la MIC nikkomycine seule). Ces expériences démontrent l'efficacité des mélanges d'inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi chez *C. albicans*. En se basant sur ces résultats, nous avons décidé d'utiliser un mélange d'inhibiteurs (aculéacine – nikkomycine) pour inhiber la croissance de M. grisea. Dans le cadre de cette hypothèse, nous attendons une hypersensibilité de la souche sauvage à ce mélange. Nous avons choisi comme doses du mélange celles correspondants à une DI20 pour chaque produit utilisé seul chez la souche sauvage en milieu gélosé (Tableau 11).

	Aculéacine DI20	Caspofongine DI20	Nikkomycine DI20
<i>Guy11∆ku80</i>	0.001 ppm	0.100 ppm	0.010 ppm

Tableau 11 : Concentration équivalentes à la DI20, chez M. grisea, en milieu gélosé

A ces concentrations d'aculéacine ou de nikkomycine, aussi bien la souche sauvage que le mutant $\Delta mps1$ présente une faible inhibition de leur croissance (10 à 20%, Figure 40, 42). Le mélange d'aculéacine et de nikkomycine ne conduit pas à une hypersensibilité chez la souche sauvage (inhibition de la croissance de 20%). Ce résultat est très différent de celui observé chez *C. albicans* (Sandovsky-Losica, *et al.* 2008). Cette absence d'hypersensibilité de la souche sauvage de *M. grisea* à un mélange d'aculéacine et de nikkomycine pourrait provenir soit d'une absence des phénomènes de compensation équivalents à ceux décrits chez les levures et chez les champignons filamenteux, soit de l'existence d'une autre voie de compensation des modifications de paroi indépendante des voies



Figure 49 : Représentation graphique des inhibitions avec un mélange de l'aculéacine et de la nikkomycine à DI20 sur la souche sauvage et le mutant *Guy11∆ku80∆mps1*. Le test a été réalisé avec 0.01 ppm de la nikkomycine et 0.001 ppm de l'aculéacine. Ces doses correspondent aux doses de DI20. D'après les mesures, une inhibition de 100% est observée pour le mutant *Guy11∆ku80∆mps1*. Ainsi, il existe une synergie entre l'aculéacine et la nikkomycine



Figure 50: Test d'infection sur feuille d'orge coupée du mutant *P1.2\Deltaku80\Deltamps1.* Le test est réalisé sur feuille blessée et non blessée. Le mutant *P1.2\Deltaku80\Deltamps1* ne cause aucune lésion sur une feuille d'orge, même blessée

de biosynthèse de la chitine et des β -1,3 glucanes. Cette voie pourrait correspondre à la voie de biosynthèse des α -1,4 glucanes qui est importante pour la réparation de la paroi chez les champignons filamenteux et qui n'existe pas chez les levures. Cette voie de biosynthèse dépend d'enzymes apparentées aux enzymes de biosynthèse de l'amidon (Damveld, *et al.* 2005) qui pourraient être insensibles à l'aculéacine.

Par contre, le mélange d'aculéacine et de nikkomycine (0.001 ppm et 0.010 ppm) induit un arrêt total de a croissance du mutant $\Delta mps1$ (100%), alors que ces concentrations n'ont qu'un effet inhibiteur très faible sur la souche sauvage. Nous avons réalisé une expérience similaire, en diminuant par 3 les concentrations des deux fongicides. Dans ces conditions (0.0003 ppm d'aculéacine et 0.004 ppm de nikkomycine), nous n'avons observé aucune inhibition de croissance de la souche sauvage. Par contre, le mutant $\Delta mps1$ présente une inhibition de 50% de sa croissance. Cette expérience doit être répétée, mais elle suggère que le mutant $\Delta mps1$ présente une forte hypersensibilité au mélange (1/10 de la DI50 de la souche sauvage).

En conclusion, le mutant $\Delta mps1$ est fortement hypersensible au mélange de fongicides alors que la souche sauvage ne l'est pas (Figure 49). Ce résultat suggère que *M. grisea* ne possède pas de mécanisme de compensation de l'altération de la biosynthèse de la paroi équivalent à celui de *C. albicans*, car la souche sauvage n'est pas hypersensible à un mélange d'aculéacine et de nikkomycine. Par contre, M. grisea possède des mécanismes de compensation qui sont strictement dépendants de la voie de signalisation *MPS1* et sans doute indépendants des voies de biosynthèse de la chitine et des β -1,3 glucanes.

1.6. Pouvoir pathogène du mutant *Amps1*

Nous avons étudié le pouvoir pathogène des mutants $\Delta mps1$ dans différentes conditions expérimentales et sur différentes plantes hôtes (orge, riz).

1.6.1. Pouvoir pathogène des mutants *Δmps1* pour l'orge

Le pouvoir pathogène des mutants $\Delta mps1$ a d'abord été étudié en utilisant l'orge comme plante hôte. Dans un premier temps, des implants de mycélium des souches sauvages (*P1.2Δku80* et *Guy11Δku80*) et des mutants (*P1.2Δku80Δmps1* et *Guy11Δku80Δ mps1*) ont été déposés sur des feuilles en survie de l'orge. En effet, sur milieu complet, les mutants $\Delta mps1$ ne sporulent pas. Le seul moyen de réaliser ce test de pathogénie est l'utilisation des implants sur les feuilles en survie. Les implants des souches sauvages *P1.2Δku80* causent 100% des lésions, comparables aux lésions causées par une suspension de spores. De ce fait, l'utilisation des implants est un moyen efficace pour tester la pathogénie des mutants ne sporulant pas. Les implants du mutant *P1.2Δku80Δmps1* (Figure 50) n'ont causé aucune lésion, ni sur feuilles blessées, ni sur feuilles non blessées, ce qui montre que ce mutant est non pathogène.

Par la suite, nous avons inoculés des plantes d'orge avec une suspension de spores obtenues sur des milieux gélosés en présence de G-6-P (3.10⁴ spores/ml). Aucunes lésions n'étant visibles sur des

plantes d'orges infectées par les spores des mutants $P1.2\Delta ku80\Delta mps1$ et $Guy11\Delta ku80\Delta mps1$. Ces résultats montrent, non seulement, que le mutant $\Delta mps1$ est non pathogène pour l'orge mais aussi que les spores des mutants $\Delta mps1$ obtenus à partir d'un milieu avec G6P sont non pathogènes. La G6P complémente la sporulation mais pas la pathogénie. Ainsi nous avons obtenus les mêmes résultats de pouvoir pathogène en utilisant deux différentes méthodes (implant – spore) sur l'orge. Ceci démontre, aussi, la fiabilité des implants déposés sur feuilles afin de tester le pouvoir pathogène.

1.6.2. Pouvoir pathogène des mutants *Amps1* pour le riz

Le pouvoir pathogène des mutants $\Delta mps1$ vis-à-vis du riz a ensuite été étudié. Trois cultivars de riz montrant des résistances différentes à *M. grisea* étaient disponibles au laboratoire : la variété CO39 est moyennement résistante, la variété Maratelli est faiblement résistante et enfin la variété Sariceltik est la plus sensible. Les solutions de spores (3.10⁴ spores/ml) des souches sauvages (*P1.2Δku80* et *Guy11Δku80*) ainsi que des mutants (*P1.2Δku80Δmps1* et *Guy11Δku80Δ mps1*) ont été utilisées pour infecter les différents cultivars de riz. Avec les trois différents cultivars, le mutant $\Delta mps1$ a, toujours, une réduction 100% de pathogénie (Tableau 12) :

	CO39	Maratell	Sariceltik
		i	
<i>Ρ1.2Δku80</i>	30*	32	40
P1.2∆ku80∆mps1	0	0	0
<i>Guy11∆ku80</i>	38	35	36
Guy11∆ku80∆ mps1	0	0	0
Réduction de	-100%	-100%	-100%
pathogénie			

Tableau 12: Pathogénie des mutants $\Delta mps1$ pour le riz

* Nombre de lésions par feuille provoquées par les mutants $\Delta mps1$ sur des feuilles de riz 7 jours après inoculation, (3.10⁴ spores/ml). Il y a 100% de réduction du pouvoir pathogène chez les mutants $\Delta mps1$

1.6.3. Différentiation appressoriale du mutant Δmps1

La formation des appressoria ainsi que des hyphes de pénétration a été analysée grâce à des spores obtenues sur un milieu gélosé, en présence de G-6-P. Des fragments d'épiderme d'oignons infectés par une solution de spores du mutant $\Delta mps1$ ont été déposés sur des boîtes d'eau gélosée additionnée de kinétine. Nous avons observé la formation d'appressoria chez la souche sauvage, et chez le mutant $\Delta mps1$ (80%) avec la même fréquence. Par contre, les appressoria du mutant $\Delta mps1$ ne sont pas capables de pénétrer et former des hyphes infectieux, alors que la souche sauvage pénètre efficacement dans la cellule d'épiderme d'oignon.

1.7. Conclusion sur la caractérisation du mutant *Amps1* de *M. grisea*

Nous avons obtenu deux mutants Amps1 dans deux souches différentes P1.2Aku80 et *Guy11*Δ*ku80.* Le mutant présente une autolyse que nous pouvons complémenter par un ajout de 1M de sorbitol, une absence d'hyphes aériens, une réduction de sa pigmentation et une absence de sporulation. L'addition de 10 mM de glucose-6-phosphate permet de compenser partiellement son défaut de sporulation. L'hypersensibilité des mutants $\Delta mps1$ aux inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi est faible (2-3 fois par rapport aux souches sauvages P1.2Aku80 et Guy11Aku80 en milieu gélosé, DI50). Cependant, ces mutants présentent une forte hypersensibilité (x 10) au mélange d'aculéacine et de nikkomycine par rapport à la souche sauvage. De plus, leur paroi cellulaire est hypersensible aux enzymes de dégradation de la paroi présents dans le glucanex. Ces deux derniers phénotypes suggèrent que la structure de la paroi des mutants $\Delta mps1$ est significativement altérée. Enfin, les mutants *Amps1* sont non pathogènes pour l'orge et pour le riz. Les spores de ces mutants obtenues sur un milieu G6P sont aussi incapables d'attaquer l'orge et le riz. Par contre, ces spores mutantes sont capables de former des appressoria qui ne pénètrent pas dans l'épiderme d'oignon et ne forment pas d'hyphes infectieux. L'ensemble de ces résultats démontre que MPS1 joue un rôle essentiel dans la formation des hyphes aériens, la sporulation, la biosynthèse et/ou la réparation de la paroi et le pouvoir pathogène.

	Sporulation	Compensation défaut de sporulation	Hyphes aériens	Hyper sensibilité au glucanex	Hyper sensible à l'acu	Hyper sensible à la nikko	Hyper sensibile au mélange Acu-Nikko	Pathogénie
Δmps1 Ant, 2010	0%	G6P	-	Oui	2 X	2 X	100%	0
<u> 4</u> mps1 Xu, 1998	2%	Nd	-	Oui	Nd	Nd	Nd	0
<i>∆mck1</i> Jeon 2008	5%	Nd	-	oui	Nd	Nd	Nd	0

Tableau 13 : Résumé récapitulatif des phénotypes des mutants *Δmps1* et *Δmck1*. Tous les deux mutants présentent un défaut très important de sporulation et une absence de pouvoir pathogène

Ces phénotypes (Tableau 13) sont soit identiques (mycélium aérien, hypersensibilité aux enzymes de dégradation de la paroi, pouvoir pathogène), soit similaires (sporulation) à ceux déjà décris pour le mutant nul $\Delta mck1$ du gène encodant la MAPKKK, *MCK1*, qui est la première kinase du module MAP kinase de la voie Mps1 chez *M. grisea* (Jeon, *et al.* 2008), et le mutant $\Delta mps1$ (Xu, *et al.* 1998). La seule différence observée pour le mutant $\Delta mck1$ est qu'il présente une autolyse de son mycélium qui n'est pas complémenté par un ajout de 1M de sorbitol au contraire des mutants $\Delta mps1$ (Xu *et al.*

1998, nos mutants). Enfin, les défauts de sporulation des mutants $\Delta mck1$ et $\Delta mps1$ sont quantitatifs alors que nos mutants sont incapables de sporuler sur les mêmes milieux. Il est possible que ces différences proviennent d'un effet lié à la souche sauvage utilisée. Nos travaux ont aussi permis d'identifier de nouveaux phénotypes chez le mutant $\Delta mps1$ comme son hypersensibilité à un mélange d'aculéacine et de nikkomycine, et la complémentation partielle de son défaut de sporulation par le G6P.

1.8. Utilisation de mutants nuls conditionnels pour étudier les fonctions cellulaires contrôlées par *MgMPS1*

Etant donné les effets pléiotropes de la délétion du gène MPS1 (absence de sporulation, autolyse, conservation difficile), l'utilisation de mutants conditionnels du gène *MPS1* permettra de faciliter l'étude génétique de cette voie de signalisation, et en particulier, d'obtenir des quantités suffisantes de spores des mutants de ce gène. Deux stratégies sont possibles pour construire de tels mutants conditionnels. La première consiste à placer le gène d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur qui module son expression selon des conditions connues (promoteur nitrate réductase, pNIa). La deuxième stratégie consiste à remplacer le gène d'intérêt par un gène codant pour une protéine modifiée, ayant la même activité que la protéine sauvage, mais qu'il est possible d'inhiber spécifiquement. L'inhibition est alors provoquée par une molécule agissant uniquement sur la protéine modifiée.

1.8.1. Principe de mutant conditionnel avec un promoteur pNia

Cette méthode consiste à utiliser des promoteurs fongiques particuliers pour contrôler l'expression d'un gène. Parmi ces promoteurs, un des promoteurs utilisés pour contrôler l'expression des gènes est le promoteur du gène encodant la nitrate réductase (pNIA1). Ce promoteur contrôle l'expression du gène NIA1 (*NIT1 N. crassa, NiaD A. fumigatus*) par une induction de la transcription en présence de nitrate et sa répression en présence d'ammonium ou de glutamate dans le milieu de culture (Punt, *et al.* 1995 ; Feng, *et al.* 1998 ; Scazzocchio, 2000). Nous testerons le promoteur du gène *MgNIA1* encodant le nitrate réductase de M. grisea, isolé au laboratoire par F. Villalba et M-H Lebrun (non publié). En effet, suite à la transformation d'un mutant nul d'un gène, avec l'ORF de ce gène, suivi de ce promoteur pNia, l'expression du gène sera contrôlée. Ce promoteur est opérationnel en présence de nitrate, dans le milieu, ainsi, le gène en question est exprimé. Par contre, en présence de glutamate, le promoteur est inhibé, ainsi que le gène en question.

1.8.2. Construction et caractérisation du mutant conditionnel *pNia::Mps1* chez le mutant *Guy11Δku80Δmps1*

Pour réaliser cette construction, le vecteur pSB1637 (annexe 4), possédant la résistance à la nourséothricine, a été utilisé. Le vecteur pSB5 (annexe 4) un vecteur qui permet de contrôler l'expression de l'allèle sauvage du gène *MgMPS1* en fonction de la source d'azote présente dans le milieu a été obtenu.

La transformation du mutant *Guy11∆ku80∆Mps1* a permis d'obtenir 24 transformants résistants à la nourséothricine. Mis en culture sur MM avec glutamate, seules deux souches avaient le phénotype attendu (Absence d'hyphes aériens, faible pigmentation et absence totale de sporulation) : un taux de complémentation de 8,3%. Ces transformants ont été dénommé [$\Delta mps1$ (pNIA1::MPS1)] 8 et 13. Le transformant [$\Delta mps1$ (pNIA1::MPS1)], cultivé sur MM avec du glutamate comme source d'azote



Figure 51: Phénotype du mutant *Guy11∆ku80-pNiaMps1* en présence de nitrate ou glutamate. En présence de nitrate *MPS1* est exprimé par ailleurs, en présence de glutamate *MPS1* n'étant pas exprimé, le mutant a un phénotype du mutant *Guy11∆ku80∆mps1*



Figure 52 : Taux de sporulation du mutant *Guy11∆ku80-pNiaMps1* comparé à la souche sauvage

présente le même phénotype mycélien qu'une souche *Guy11Δku80Δmps1*. La même souche cultivée sur un MM nitrate présente un phénotype sauvage. En effet, *MPS1* n'est exprimé qu'en présence de nitrate qui induit l'expression de gène *MPS1* sous le contrôle du promoteur pNia (Figure 51). Nous avons observé la présence de défaut de sporulation et l'absence de pouvoir pathogène sur le transformant, [$\Delta mps1$ (pNIA1::MPS1)]. La souche sauvage *Guy11Δku80* et la souche complémenté sporulent de la même façon, sur MM avec nitrate (Figure 52). Par contre le transformant [$\Delta mps1$ (pNIA1::MPS1)] sporule 100 fois moins que la souche sauvage. Cette différence de 10² de taux de sporulation, sur MM avec nitrate, entre la souche sauvage et le transformant [$\Delta mps1$ (pNIA1::MPS1)] pourrait provenir de la souche du mutant *Guy11Δku80ΔMps1* utilisé lors de la transformation. Le mutant *Guy11Δku80Δmps1* complémenté par le gène de MPS1 avec son promoteur et son terminateur sporule comme la souche sauvage. Ceci montre que le défaut de sporulation du mutant *Guy11Δku80ΔMps1* pourrait être complémenté complètement. Par contre, le mutant *Guy11Δku80ΔMps1* ne sporulant pas du tout sur milieu avec nitrate, on peut souligner, ainsi, que le promoteur pNIa induit bien le gène de *MPS1*, chez le transformant [$\Delta mps1$ (pNIA1::MPS1)], en présence de nitrate.



Figure 53: Stratégie pour sensibiliser une kinase à un inhibiteur spécifique. Un inhibiteur conventionnel bloque de multiples kinases dans la cellule. Une mutation dans une kinase crée une nouvelle poche où un inhibiteur spécifique peut se lier. L'inhibiteur spécifique ne peut pas se lier sur kinase sauvage, permettant une inactivation spécifique de la kinase mutée. D'après Gregan et *al.*, 2007



Figure 54 : Structure chimique de l'inhibiteur 1-NM-PP1



Figure 55: Alignement des séquences des MAP kinases Fus3, Kss1, Hog1 et Slt2 chez S. cerevisiae et leurs homologues chez *M. grisea.* Acide aminé entouré (E pour Mps1) est l'acide aminé (Site active) qu'il faut muter pour changer la configuration de la poche

1.9. Utilisation des mutants avec un allèle de *MgMPS1* sensible à des inhibiteurs spécifiques

1.9.1. Principe de mutants cible-spécifiques

Une méthode génétique permettant d'inhiber spécifiquement une protéine kinase a été développée récemment (Bishop, et al, 2001). Cette stratégie consiste à introduire une mutation fonctionnellement silencieuse au niveau du site actif d'une kinase pour la rendre spécifiquement sensible à un inhibiteur qui n'agit pas sur les kinases non-mutées. Cette méthode a été utilisée avec succès sur des kinases très différentes (Src, Abl, kinases cycline-dépendantes, MAP kinase et kinases de Ca2+/calmodulin-dépendent). Cette stratégie a été surtout utilisée en santé humaine (Gallion et al. 2005; Koch, et al. 2010), mais aussi chez les champignons S. cerevisae (Westfall, et al. 2006), C. albicans (Goyard, et al. 2008) et S. pombe (Gregan, et al. 2007). Cette technique consiste à élargir le site de fixation de l'ATP de cette enzyme en modifiant un seul acide aminé de ce site. Cette modification permet à des inhibiteurs d'entrer spécifiquement dans le site élargi (pas d'entrée de ces inhibiteurs dans le site normal) et d'inhiber uniquement les kinases modifiées, en interférant avec la fixation de l'ATP (Figure 53). L'inhibiteur que nous avons choisi de l'utiliser conçu à partir de l'inhibiteur PP1 qui est une pyrimidine synthétique dérivée du pyrazolo [3,4-d]. C'est un inhibiteur de kinases de la famille des SRC (Gregan, et al. 2007). PP1 se fixe au niveau du site actif des kinases en prenant la place de l'adénine de l'ATP. C'est à partir de cette molécule qu'à été conçu le 1-NM-PP1 (1'-naphthylmethyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine, NM sur la figure 54). Un résidu naphthyl-methyl conduit à un analogue de PP1 incapable d'entrer dans le site de fixation de l'ATP des kinases, sauf celles dont le site a été agrandi par une mutation spécifique (Gregan, et al. 2007).

1.9.2. Construction et caractérisation d'un allèle de *MgMPS1* sensible à des inhibiteurs spécifiques

La construction de ces mutants commence par la recherche de l'acide aminé à modifier dans la séquence protéique de la kinase étudié, par alignement avec les kinases de la levure. Pour ceux-ci on peut prendre comme exemple le Mps1 et Pmp1. Pour ceci, on utilise le site http://sequoia.ucsf.edu/ksd/. Subséquemment on trouve l'emplacement de l'acide aminé à muter ainsi que l'alignement du gène avec le même gène chez différentes espèces (Figure 55).

La transformation des protoplastes *Guy11* Δ *ku80* Δ *mps1* avec le vecteur pSB2, a permis d'obtenir 30 transformants résistants à la sulfonylurée. Seuls quatre transformants (3, 5, 6 et 15) ont montré un phénotype sauvage (hyphes aériens, mélanisation, sporulation) soit 13% de transformants obtenus.

Après avoir été purifiée, les deux transformants MPS1* (3.3 et 6.2) et un ectopique, (4.3) sont mises en culture sur MM contenant différentes concentration de 1-NMPP-1 pour tester leur sensibilité. Les transformants sont mis en contact avec 0.005 ; 0.05 ; 0 ,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0.5 ; et 5 ppm de 1-NMPP-1. Tous les transformants, même les témoins sauvages ont une croissance inhibée en



1-NMPP-1 0.05 ppm 1-NMPP-1 0.005 ppm

Guy11AKU80Mps1*

Figure 56: Phénotypes mycélien des mutants *MPS1**: Les photos sont prises, à jour 7. Les implants ont été mis sur MM avec 0, 0.005, 0.05, 0.5 et 5 ppm de 1-NMPP-1. On retrouve le phénotype de *Guy11Δku80Δmps1* avec 0.5 ppm de 1-NMPP-1



Figure 57 : Test de pathogénie en gouttes (3 10⁴spores/ml) sur feuilles d'orge en survie de la souche sauvage *Guy*/11 $\Delta ku80$ et les mutants *MPS*, Comp\Delta mps1* en présence de H₂O, 0,3 ppm ou 0,5 ppm de 1-NM-PP1

Résultats

présence de 5ppm d'inhibiteur. Les transformants MPS1* ont un phénotype équivalent du mutant *Guy11∆ku80∆mps1* en présence de > 0,2 ppm d'inhibiteur. Leur phénotype est semblable au sauvage en présence de concentrations inférieures à 0,1 ppm (Figure 56).

Le pouvoir pathogène des mutants conditionnels MPS1* a été comparé a celui d'une souche sauvage dans des conditions de culture normales ou en présence de 1-NM-PP1. Les infections sont réalisées avec des fragments de feuille d'orge par le dépôt de 35 µl d'une suspension de 3.10^5 spores/ml. Ce test est réalisé avec des solutions contenant soit de l'eau soit l'inhibiteur 1-NM-PP1 (0,3 ppm ou 0,5 ppm). Ces expériences montrent que les mutants conditionnels MPS1* ont un pouvoir pathogène comparable à la souche sauvage en l'absence de 1-NM-PP1 (Figure 57). En présence de 0,3 ppm de l'inhibiteur 1-NM-PP1, les lésions atypiques sont observées (jaunissement local, Figure 57). Ces lésions n'évoluent pas (pas de croissance, ni sporulation du champignon). A 0,5 ppm de 1-NM-PP1 aucune infection n'est observée (pas de lésions ou seulement une légère chlorose locale, Figure 57). L'ensemble de ces résultats montre que la kinase *MPS1* est inhibée spécifiquement par le 1-NM-PP1 dès 0,3 ppm, conduisant à un arrêt de l'infection comme observé dans le cas du mutant $\Delta mps1$.

Les observations concernant la sporulation, le phénotype morphologique et le pouvoir pathogène en présence et en absence de 1-Nm-PP1 sur le mutant MPS1* montrent, tout d'abord, que cette technique est efficace pour caractériser une kinase et pour réaliser des expériences plus ciblées. De plus, les résultats obtenus grâce à ce mutant MPS1* confirme que les phénotypes pléiotropiques, le défaut de sporulation et de pouvoir pathogène chez le mutant $\Delta mps1$ proviennent spécifiquement de l'absence du gène *MPS1*.


Figure 58: Alignement des domaines KilA-N et Ankyrin repeat de la protéine Swi4 chez *M. grisea* et *S. cerevisiea*. Ainsi, les domaines sont bien conservés entre ces deux espèces



Figure 59 : Alignement des domaines KilA-N et Ankyrin repeat de la protéine Swi6 chez *M. grisea* et *S. cerevisiae*. Ainsi, les domaines sont bien conservés entre ces deux espèces

2. Etude des facteurs de transcription Swi4, Swi6 et Rlm1 de M. grisea

2.1. Recherche des gènes de *M. grisea* encodant les orthologues des gènes encodant les facteurs de transcription Swi4, Swi6 et Rlm1 de la levure

2.1.1. Analyse bioinformatique du facteur de transcription MgSWI4

La protéine de *M. grisea* la plus semblable à ScSwi4 *(Baetz et Anrews, 2001)* est celle codée par le gène MGG_08463.6 (Blastp : e-value de 3.2e-33). Ce gène de *M. grisea* est composé de 3 exons et encode une protéine (MgSwi4) de 715 acides aminés. Il est situé sur le supercontig 10 (position : 307592-310146, chromosome V). La protéine MgSwi4 possède deux domaines : le domaine KiL-A, qui intervient dans les interactions protéines – acides nucléiques et le domaine Ankyrin repeat (ANK), qui intervient aussi dans les interactions protéine-protéine (Annexe 1). Ces domaines sont conservés entre *M. grisea* et *S. cerevisiae* comme le montre l'alignement de leurs séquences protéiques (Figure 58). Ces domaines (KilA et ANK) de MgSwi4 et ScSwi4 présentent une similarité de 72% et une identité de 53%.

Nous avons identifié les protéines homologues de MgSwi4, par Blast, chez l'ensemble des champignons ascomycètes analysés (Annexe 2). L'alignement des séquences de ces protéines montre qu'elles ne sont bien conservées qu'au niveau des domaines Kil-A et Ankyrin Repeat (Annexe 1). L'arbre phylogénétique construit à partir de cet alignement montre que ces protéines sont orthologues puisqu'elles ont une phylogénie identique à celles des espèces étudiées. De plus, l'ensemble de ces protéines a les mêmes domaines fonctionnels. L'ensemble de ces arguments suggère que ces différentes protéines ont la même fonction (Facteur de transcription de la famille SBF).

2.1.2. Analyse bioinformatique du facteur de transcription MgSWI6

La protéine de *M. grisea* la plus semblable à ScSwi6p (Ho, *et al.* 1999) est celle encodée par le gène MGG_09869.6 (Blastp : e-value de 5.57e-33). D'après les informations d'annotation disponibles sur le site de Broad institue, cette protéine comporte 807 acides aminés (Annexe 1). Elle est encodée par un gène (*MgSWI6*), composé de 3 exons et se trouve sur le supercontig 14 (position : 37269-39871).

La protéine MgSwi6 possède deux domaines : le domaine KiL-A, qui intervient dans les interactions protéines – acides nucléiques et le domaine Ankyrin repeat, qui intervient aussi dans les interactions protéine-protéine (Annexe 1). Ces domaines sont conservés entre *M. grisea* et *S. cerevisiae* comme (une similarité de 63% et une identité de 45% ; Figure 59). La recherche de protéines homologues de MgSwi6 dans les génomes fongiques par Blast nous a permis d'identifier des protéines homologues chez l'ensemble des espèces analysées. L'alignement de ces protéines montre qu'elles ne sont bien conservées qu'au niveau des domaines Kil-A et Ankyrin repeat (Annexe 1). L'arbre phylogénétique construit à partir de cet alignement montre que ces protéines ont les mêmes domaines fonctionnels. De plus, on peut dire qu'ils sont orthologues puisqu'elles ont une phylogénie identique à celles des gènes étudiés. De plus, l'ensemble de ces protéines a les mêmes domaines fonctionnels. L'ensemble



Figure 60 : Alignement du domaine MADS de la protéine Rlm1 chez *M. grisea* et *S. cerevisiae*. Le domaine est bien conservé

de ces arguments suggère que ces différentes protéines aient la même fonction (Facteur de transcription de la famille SBF).

2.1.2.1. Comparaison des domaines fonctionnels de Swi4/Swi6

Les protéines ScSwi4 et ScSwi6 comportent chacun trois domaines « ANKyrin repeat », composés d'une répétition de 33 acides aminés, appelé aussi « TPLH repeat ». Il existe un motif consensus de ces motifs pour chaque protéine (Annexe 1). Ces domaines ANK de Swi4 et Swi6 montrent qu'il existe une similarité entre les deux consensus. est impliqué dans l'interaction protéine – protéine. MgSwi4 et MgSwi6 comportent, également, ce domaine. De plus, d'après l'alignement des séquences de ces deux protéines (Annexe 1), le domaine est bien conservé entre MgSwi4 et MgSwi6. Par ailleurs, ce domaine, ne semble pas être impliqué dans l'association de ces deux protéines mais dans l'interaction du complexe avec les sites de fixation à d'autres protéines (Sidorova et Breeden, 1993). Chez *S. cerevisiae*, ce domaine répétitif est présent, surtout dans les protéines de fixation « Cyclin-CDK » (Foord, *et al.* 1999).

2.1.3. Analyse bioinformatique du facteur de transcription MADS box, encodé par MgRLM1

Deux gènes codant de facteur de transcription MADS box (MGG_02773.5 et MGG_01204.5) sont similaires à Sc*RLM1* (Watanabe, *et al.* 1995). Par l'alignement des séquences, nous avons constaté que MGG_02773.5 (MgMcm1 ; Mehrabi, *et al.* 2008) est correctement prédit. Cependant, l'annotation de MGG_01204.5 (appelé *MIG1* pour la protéine à domaine MADS-boîte requise pour la croissance infectieuse ; Mehrabi, *et al.* 2008) est erronée. Le séquençage du cDNA de MGG_01204.5 a, ainsi, montré une erreur de séquençage dans la base de données.

Ainsi, nous avons renommé MgMig1 en MgRlm1 pour la suite de nos analyses. MgRlm1 comporte un domaine fonctionnel : MADS (MCM1, Agamous Deficients) qui appartient à une famille de domaines caractéristiques de facteur de régulateurs transcriptionel. Au milieu de ce domaine, il y a la région de fixation à l'ADN, appelé « MADS box ». L'alignement de ScRlm1 et MgRlm1 montre que ce domaine est bien conservé entre ces deux espèces (Figure 60).

Nous avons construit, d'abord, l'arbre phylogénique, réalisé à partir de l'alignement des séquences protéiques de MgMig1, MgMcm1, NcMig1, NcMcm, AnMig1, AnMcm1 et ScRlm1. Il montre que MgMig1 appartient à une famille de protéines orthologues comportant le domaine MEF2 (PF 9047) des protéines MADS. Par la suite, nous avons identifié les protéines homologues de MgRlm1 dans les génomes fongiques par Blast chez d'autres champignons analysés. La séquence de la protéine correspondante à BcRlm1 est incorrecte car elle est mal annotée à partir de l'acide aminé 200. De même celle de *S. nodorum*, est mal annotée à partir de l'acide aminé 500. Nous avons donc retiré ces séquences de l'alignement. L'alignement de ces protéines montre qu'elles sont relativement bien conservées en particulier au niveau du domaine MADS (Annexe 1). L'arbre phylogénétique construit à partir de cet alignement suggère que ces protéines sont orthologues puisque la topologie de cet

arbre est identique à celle des espèces étudiées. De plus, l'ensemble de ces protéines a les mêmes domaines fonctionnels. L'ensemble de ces arguments suggère que ces différentes protéines aient la même fonction (Facteur de transcription de la famille MADS).

2.2. Construction de mutants nuls des gènes *MgSW14, MgSW16* et *MgRLM1*2.2.1. Obtention des mutants nuls *Guy11Δku80Δswi4*

La même stratégie que la construction du mutant $\Delta mps1$ a été utilisée pour créer le mutant de délétion *Guy11*Δ*ku80*Δ*swi4*. Les amplifications par PCR ont permis d'obtenir la flanquante gauche de MgSwi4 (amorces *swi4-2* et *swi4-15*), qui contient 921 nt de son promoteur et la séquence de la flanquante droite de MgSwi4 (amorces swi4-3 et swi4-13), qui contient 932 nt de son terminateur. La cassette obtenue (2957 nt) a été utilisée pour la transformation des protoplastes Guy11 Δ ku80. Les 84 transformants analysés, présentent les flanquantes de MgSWI4 ainsi que l'ORF du gène. Ceci montre que 100% des transformants sont des transformants ectopiques. Pour la réalisation de cette transformation, nous avons utilisé la souche parentale, comportant la mutation du gène KU80. De ce fait, une fréquence de mutants obtenus de 100% était attendue. Nous avons émis l'hypothèse que ce taux de 0% de mutants obtenus pourrait être du à un problème, chez la souche sauvage GUY11. Ainsi, nous avons décidé d'introduire la même cassette dans des protoplastes de la souche P1.2 de *M. grisea.* L'analyse des 30 transformants purifiés ont montré que tous les transformants contenaient bien l'ORF de MgSWI4. 100% des transformants étaient ectopiques. Nous avons donc introduit cette cassette, dans des protoplastes de la souche P1.24ku80 de M. grisea, afin d'augmenter le taux d'obtention de mutants. Les 4 transformants purifiés ont été analysés par PCR, ainsi que par qPCR. Nous avons identifié 1 mutant sur ces 4 transformants. Ainsi la fréquence de mutants obtenus dans cette transformation est de 25%. Parmi ces souches, un mutant P1.2Aku80Aswi4 (T2) a été choisi, ainsi que trois ectopiques (T1, T3, T4).

2.2.2. Obtention des mutants nuls *Guy114ku804swi6*

Pour la construction du vecteur de délétion, la méthode de PCR « double-joint » a été utilisée, à la place de la ligation à trois voies (Matériel et méthode). Nous avons réalisé les amplifications par PCR de la flanquante gauche (amorces *swi6-2db* et *swu6-15)*, qui contient 976 nt, dont 20 nt de la séquence de la cassette de l'hygromycine, et de la séquence de la flanquante droite (amorces *swi6-3db* et *swi6-13)*, qui contient 900 nt, dont 20 nt de la séquence de la cassette de l'hygromycine aussi. La cassette a été obtenue suite à un PCR « double joint ».

Cette cassette de 4700 nt a été introduite par transformation dans des protoplastes de la souche $Guy11\Delta ku80$ de *M. grisea.* L'analyse moléculaire des ADNg des 55 transformants ont démontré qu'un transformant était dépourvu de l'ORF de *SWI6.* Ainsi la fréquence de mutants obtenus pour cette transformation est de 2%. Parmi ces souches, un mutant $Guy11\Delta ku80\Delta swi6$ (T53) a été choisi, ainsi que trois ectopiques (T1, T3, T4).



Figure 61: Phénotype mycélien des mutants *Guy11Δku80Δswi4, Guy11Δku80Δswi6* et *Guy11Δku80Δrlm1;* comparées à celle de *Guy11Δku80Δmps1* et la souche sauvage *Guy11Δku80*



Figure 62: Taux de Sporulation des différents mutants en comparaison avec la souche sauvage $Guy11\Delta ku80$ et $P1.2\Delta ku80$

2.2.3. Obtention des mutants nuls $Guy11\Delta ku80\Delta rlm1$

Pour la construction de ce vecteur de délétion, la méthode de PCR « double-joint » a été utilisée, à la place de la ligation à trois voies. Nous avons réalisé les amplifications par PCR de la flanquante gauche de *RLM1* (amorces *mig1-2* et *mig1-15)*, qui contient 854 nt, dont 20 nt de la séquence de la cassette de l'hygromycine, et de la séquence de la flanquante droite *RLM1* (amorces *mig1-3* et *mig1-13)*, qui contient 604 nt, dont 20 nt de la séquence de la cassette de l'hygromycine aussi ont été réalisé. La cassette a été obtenue suite à un PCR « double joint ».

Cette cassette de 2700 nt a été introduite dans des protoplastes de la souche *Guy11∆ku80* de *M. grisea*. 8 transformants résistants à l'hygromycine ont été obtenus et repiqués sur milieu TNKYE additionné d'hygromycine à 120 μ g/mL.

Grâce à l'analyse moléculaire, après l'étape de monospore, 1 transformant sur 8 transformants obtenus (le transformant 7) a été validé comme mutant. De ce fait, on a une fréquence de mutants obtenus de 13%. Ainsi, parmi ces souches, un mutant (T7) a été choisi, ainsi que 2 ectopiques (T3, T4).

2.2.4. Complémentation des mutants obtenus

La complémentation des mutants est réalisé en co-transformant les mutants nuls avec d'une part, une cassette d'ADN linéaire, comportant le promoteur – ORF sauvage – terminateur (Annexe 3) du gène enlevé et une cassette linéaire conférant à la résistance au glufosinate. Nous avons obtenu 2 complémentés sur 4 transformants pour le mutant *P1.2Δku80Δswi4*, 1 complémenté sur 5 transformants pour *Guy11Δku80Δswi6* et enfin 1 complémenté sur 3 transformants pour le mutant *Guy11Δku80Δrlm1*.Tous les complémentés, ont le phénotype de la souche sauvage *Guy11Δku80*. Ils sporulent comme la souche sauvage et ils sont pathogènes sur pour l'orge.

2.3. Croissance, morphologie et sporulation des mutants des gènes MgSW14, MgSW16 et MgRLM1

Après 7 jours de culture sur MM, les mutants sont examinés (Figure 61). Le mutant $P1.2\Delta ku80\Delta swi4$ montre une altération dans sa morphologie. En effet, il a une diminution de mycélium aérien. Le mutant *Guy11\Delta ku80\Delta swi6* présente, tout d'abord, une croissance normale au début, suivi d'un arrêt de croissance sans avoir une modification de sa morphologie. Par ailleurs, l'arrêt de croissance n'aboutit pas à un mort cellulaire. Le mutant *Guy11\Delta ku80\Delta rlm1* a une croissance radiale normale et une morphologie identique à celle de la souche sauvage. Par ailleurs, tous les mutants ont une croissance égale à la souche sauvage dans milieu liquide.

La sporulation des mutants *P1.2\Deltaku80\Deltaswi4, <i>Guy11\Deltaku80\Deltaswi6* et *Guy11\Deltaku80\Deltarlm1* ont d'abord été étudiée, sur des boîtes de milieu complet. Les résultats (Figure 62) montrent une forte réduction de la sporulation (90%) chez le mutant *P1.2\Deltaku80\Deltaswi4, une réduction de 40% chez le*

mutant $Guy11\Delta ku80\Delta swi6$ et enfin, une réduction de 85% chez le mutant $Guy11\Delta ku80\Delta rlm1$. La sporulation *in vitro* est donc fortement affectée chez ces mutants.

Le mutant $\Delta rlm1$ a déjà été obtenu chez *M. grisea* (Mehrabi, *et al.* 2008). Ce mutant ne montre aucune différence dans sa morphologie mycéliale, avec la souche sauvage. Par contre, il présente une réduction du niveau de sa sporulation comparé à la souche sauvage. Ce mutant a aussi été obtenu chez *A. nidulans* (Fujioka, *et al.* 2007) et chez *A. niger* (Damveld, *et al.* 2005). Chez ces champignons, le mutant montre les mêmes caractéristiques phénotypiques que celles observée chez *M. grisea* (aucune altération dans leur morphologie mycéliale, forte réduction du niveau de sporulation). Ainsi, les phénotypes du mutant $\Delta rlm1$ restent similaires chez les différents champignons. Ceci pourrait confirmer que Rlm1 soit impliqué dans une fonction importante dans la sporulation chez ces différentes espèces fongiques.

2.4. Altération des parois des mutants des gènes MgSWI4, MgSWI6 et MgRLM1

Un test de protoplastisation a été réalisé avec les trois mutants $\Delta rlm1$, $\Delta swi4$ et $\Delta swi6$ afin de comparer leur cinétique de protoplastisation lors d'un traitement par le glucanex (1g/100ml) avec celle du mutant $\Delta mps1$. Ainsi il a été observé que, comme le mutant $\Delta mps1$, le mutant s $\Delta swi6$ et $\Delta swi4$ commencent à produire des protoplastes dès la dixième minute de traitement enzymatique, et il atteint son plateau de production de protoplastes à 120^{ième} minutes; tandis que la souche sauvage atteint son plateau de production à 240^{ième} minutes. Leur Tp50 (temps correspondant à la formation de 50% des protoplastes, Tableau 14) est de 50 minutes. Ceci démontre que comme le mutant $\Delta mps1$, le mutant $\Delta swi6$ est sensible aux enzymes de dégradation du glucanex. Par contre, le mutant $\Delta rlm1$ présente un retard dans la formation des protoplastes durant les temps courts de traitement (10-30 minutes) par rapport à la souche sauvage. Puis, la formation des protoplastes s'accélère et sa production rejoint celle de la souche sauvage à partir de 60 minutes (Tableau 14). Ce phénomène pourrait provenir d'une résistance de la paroi de ce mutant à des temps de contact brefs avec les aux enzymes de dégradation des protoplastes du su comprendre cette différence de comportement du mutant par rapport à la souche sauvage.

En conclusion, ces expériences montrent que les mutants $\Delta swi6$ et $\Delta swi4$ sont aussi hypersensibles aux enzymes du glucanex que le mutant $\Delta mps1$, tandis que le mutant $\Delta rlm1$ présente une résistance à l'action de ces enzymes.



Figure 63: Représentation graphique des inhibitions avec un mélange d'Aculéacine et Nikkomycine à DI20 sur la souche sauvage et les mutants *Guy11∆ku80∆swi4, Guy11∆ku80∆swi6* et *Guy11∆KU80∆rlm1*. Le test a été réalisé avec 0.01 ppm de la nikkomycine et 0.001 ppm de l'aculéacine. D'après les mesures, aucune hypersensibilité n'a été détectée chez les autres mutants *Guy11∆ku80∆swi6* et *Guy11∆ku80∆rlm1*.Une hypersensibilité, comparable à celle du mutant *Guy11∆ku80∆swi4*

	Tp50 mutant /	
	Tp50 sauvage	Sensibilité au glucanex
<i>Guy11∆ku80∆mps1</i>	50%	2X HS
Guy11∆ku80∆swi6	50%	2X HS
Guy11∆ku80∆rlm1	100%	Retardé temps courts
P1.2∆ku80∆swi4	50%	2 HS

Tableau 14 : Cinétique des mutants *Guy11∆ku80∆mps1, Guy11∆ku80∆swi6, Guy11∆ku80∆rlm1, P1.2∆ku80∆swi4* et les souches sauvages *Guy11∆ku80* et *P1.2∆ku80*. Le Tp50 de différents mutants est calculé d'après une étude réalisée entre 0 minutes et 360 minutes. Le pourcentage est calculé avec le Tp50 du mutant par rapport au Tp50 de la souche sauvage. HS : Hypersensible, R/ Résistant

2.5. Sensibilité des mutants nuls des gènes *MgSW14, MgSW16* et *MgRLM1* aux inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi

Les tests réalisés avec le mutant $Guy11\Delta ku80\Delta mps1$ a mis en évidence que ce mutant n'est pas hypersensible à l'aculéacine, ni à la nikkomycine. Par contre, il montre une forte hypersensibilité au mélange d'aculéacine et de nikkomycine. Ainsi, chez les autres mutants étudiés, seul l'hypersensibilité au mélange d'inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi a été testée afin de comparer les résultats à ceux observés avec le mutant $Guy11\Delta ku80\Delta mps1$ (Paragraphe 1.5.2).

2.5.1. Sensibilité des mutants *P1.2Δku80Δswi4, Guy11Δku80Δswi6, Guy11Δku80Δrlm1* au mélange d'aculéacine et de nikkomycine

Aucune hypersensibilité à l'aculéacine n'a été détectée chez les mutants *P1.2∆ku80∆swi4, Guy11∆ku80∆swi6* et *Guy11∆ku80∆rlm1*. En revanche, une hypersensibilité à la nikkomycine, comparable à celle du mutant *Guy11∆ku80∆mps1* est détectée chez le mutant *P1.2∆ku80∆swi4* (3X) et *Guy11∆ku80∆swi6* (2X), à faibles doses (DI20 ; Figure 63). Une gamme complète avec l'aculéacine pourrait mieux montrer l'hypersensibilité de ces deux mutants à cet inhibiteur de la biosynthèse de la paroi.

L'hypersensibilité au mélange d'aculéacine et la nikkomycine est révélée négative chez les mutants *Guy11\Deltaku80\Deltaswi6 et <i>Guy11\Deltaku80\Deltarlm1*. Par contre, le mutant *P1.2\Deltaku80\Deltaswi4* reproduit la même hypersensibilité au mélange que *Guy11\Deltaku80\Deltamps1*. Ce gène semble avoir un rôle important dans l'intégrité de la paroi.



A

В

С

Figure 64 : Test d'infection, sur feuille d'orge coupée du mutant *P1.2\Deltaku80\Deltaswi4*. Le test est réalisé sur feuille blessée et non blessée. Le mutant *P1.2\Deltaku80\Deltaswi4* ne cause aucune lésion sur une feuille d'orge non blessée. Cependant, sur une feuille blessée, il y a certaines lésions (moindre que sur les feuilles infectées par la souche sauvage *P1.2\Deltaku80*)

Figure 65: Test d'infection, sur feuille d'orge mutant *P1.2Δku80Δswi4*. Le test est réalisé par vaporisation d'une solution de 3.10⁴ spores/ml. Le mutant *P1.2Δku80Δswi4* a une diminution de pouvoir pathogène de 53% par rapport à la souche sauvage *P1.2Δku80*. A : *P1.2Δku80*; B : *P1.2Δku80Δswi4*; C : *P1.2Δku80Δswi4ectopique*



Figure 66: Test d'infection, sur feuille d'orge mutant *Guy11∆ku80∆swi6* et *Guy11∆ku80∆rlm1*. Le test est réalisé par vaporisation d'une solution de 3.10^4 spores/ml. Le mutant *P1.2∆KU80∆swi6* a une diminution de pouvoir pathogène de 35% par rapport à la souche sauvage *P1.2∆ku80*. *Guy11∆ku80∆rlm1* est non pathogène sur une plante d'orge

2.6. Pouvoir pathogène des mutants nuls *MgMps1, MgSWI4, MgSWI6* et *MgRLM1*

2.6.1. Pouvoir pathogène des mutants *P1.2ΔkuU80Δswi4, Guy11ΔkuU80Δswi6* et *Guy11ΔkuU80Δrlm1* pour l'orge

Le pouvoir pathogène des mutants a d'abord été étudié en utilisant l'orge comme plante hôte. Dans un premier temps, comme le mutant $P1.2\Delta ku80\Delta swi4$ présente un défaut de sporulation comme le mutant $P1.2\Delta ku80\Delta mps1$, des implants de mycéliums de la souche parentale et du mutant $P1.2\Delta ku80\Delta swi4$ ont été déposés sur les feuilles en survie (blessées et non blessées) de l'orge. Comme il est montré sur la figure, les implants du mutant $P1.2\Delta ku80\Delta swi4$ (Figure 64) n'ont pas infecté la feuille non – blessées. Par contre, ils ont causé quelques lésions sur feuilles blessées.

Par la suite, nous avons inoculés des plantes d'orge avec une suspension de spores obtenues sur des milieux gélosés en présence de G-6-P (3.10^4 spores/ml), pour le mutant $P1.2\Delta ku80\Delta swi4$ et une suspension sans G6P pour les autres mutants *Guy11\Delta kuU80\Delta swi6* et *Guy11\Delta ku80\Delta rlm1*. Les résultats mettent en évidence une réduction de 90% pour le mutant $P1.2\Delta ku80\Delta swi4$ comparé à la souche sauvage $P1.2\Delta ku80$ et une réduction de 35% pour le mutant *Guy11\Delta kuU80\Delta swi6* comparé à la souche sauvage *Guy11\Delta ku80*. Enfin une réduction de 100% a été observée pour *Guy11\Delta ku80* $\Delta rlm1$ (Figure 65, 66).

2.6.2. Pouvoir pathogène des mutants *P1.2ΔkuU80Δswi4, Guy11ΔkuU80Δswi6* et *Guy11ΔkuU80Δrlm1* pour le riz

Le pouvoir pathogène des mutants vis-à-vis du riz a ensuite été étudié. Trois cultivars de riz montrant des résistances différentes à *M. grisea* étaient disponibles au laboratoire : la variété CO39 est la variété la plus résistante, la variété Maratelli est moyennement résistante et enfin la variété Sariceltik est la plus sensible. Avec les trois différents cultivars, les mutants ont une réduction de pathogénie suivante (Tableau 15) :

	CO39	Maratelli	Sariceltik
Guy11∆ku80	38*	35	36
Guy11Δku80Δ mps1	0	0	0
Guy11∆ku80∆swi6	25	14	16
%Réduction <i>Aswi6</i>	-34%	-60%	-55%
<i>Guy11Δku80Δrlm1</i>	1	0	0
%Réduction Δrlm1	-100%	-100%	-100%

Tableau 15: Pathogénie des mutants *Guy11∆ku80∆swi6* et *Guy11∆ku80∆rlm1* pour le riz * Nombre de lésions par feuille provoquées par les mutants *Guy11∆ku80∆swi6* et *Guy11∆ku80∆rlm1* sur des feuilles de riz 7 jours après inoculation, (3.10⁴ spores/ml). Le mutant *∆rlm1* est non pathogène. Le mutant *∆swi6* a une réduction de pathogénie de 50%.

Le mutant *Guy11Δku80Δrlm1* est le mutant le plus réduit en pouvoir pathogène (100%). Le gène *SWI6* semble être moins impliqué dans le pouvoir pathogénie.

2.6.3. Différentiation appressoriale des mutants P1.2ΔkuU80Δswi4, Guy11ΔkuU80Δswi6 et Guy11ΔkuU80Δrlm1

Tout d'abord, la formation des appressoria ainsi que des hyphes de pénétration ont été analysées. Des fragments d'oignons infectés par une solution de spores des différents mutants ont été déposés sur des boîtes d'eau gélosée additionnée de kinétine. Les spores du mutant *P1.2∆ku80∆swi4* forment des appressoria et ainsi que des hyphes de pénétration qui ne pénètrent pas. 86% les spores du mutant *Guy11∆ku80∆swi6* se différencient en appressoria qui forme des hyphes de pénétrations qui pénètrent. Par contre, seulement 13% des spores du mutant *Guy11∆ku80∆rlm1* se différencient en appressoria.



Figure 67: L'alignement du domaine Zf-C2H2 de la protéine Crz1 chez *M. grisea* et *S. cerevisiae*. Ainsi, le domaine est bien conservé entre ces deux espèces

3. Etude du facteur de transcription Crz1 chez M. grisea

Récemment, le gène codant le facteur de transcription BcCrz1 situé en aval de la voie de signalisation calcium/calcineurine a été identifié chez le champignon ascomycète B. cinerea (Schumacher, et al. 2008). Ce gène est un orthologue fonctionnel de ScCRZ1 de S. cerevisae (Zhao, et al. 1998), car il complète partiellement le mutant de délétion du gène CRZ1 de S. cerevisiae. Les mutants nuls Bccrz1 ne peuvent pas se développer sur le milieu minimum et ils se développent lentement sur des milieux contenant des extraits de plantes. La morphologie des hyphes, la sporulation, et la formation de sclérotes sont altérés chez ce type de mutant. La capacité des hyphes à pénétrer dans la plante est affectée quantitativement chez les mutants. Ainsi *BcCRZ1* est nécessaire pour l'infection du haricot, des tomates et des abricots. Les mutants nuls Bccrz1 sont aussi sensibles aux inhibiteurs de calcineurine que la souche sauvage, suggérant que BcCRZ1 n'est pas la seule cible de la calcineurine (Schumacher et al. 2008). L'intégrité de paroi cellulaire, la réponse aux stress (pH extrêmes (3 et 9), H₂O₂, Ca²⁺, Li⁺) sont affectées chez les mutants nuls Bccrz1. Les mutants sont hypersensibles aux enzymes de dégradation (glucanex et β -glucanase). Les mutants nuls Bccrz1 produisent 3 fois plus de protoplastes que leur souche sauvage en présence des enzymes de dégradation au bout de 1,5 heure de traitement. Les auteurs (Schumacher et al. 2008) ont donné l'hypothèse que *BcCRZ1* a un impact sur la composition des glucanes.

D'après ces résultats, *BcCRZ1* a un rôle important dans l'intégrité de la paroi chez *B. cinerea*. De ce fait, nous avons décidé d'étudier le gène orthologue de *BcCRZ1*, chez *M. grisea* afin d'observer son rôle dans l'intégrité de la paroi.

3.1. Etude bioinformatique du gène de M.grisea encodant l'orthologue de ScCRZ1

La protéine de *M. grisea* la plus semblable à BcCrz1 est celle codée par le gène MgCRZ1 (MGG_05133.6 ; Blastp, e-value de 2e-172). Ce gène de *M. grisea* composé de 2 exons, encode une protéine de 727 acides aminés. Il est situé sur le supercontig 22 (position : 1512321-1515689). La protéine MgCrz1 possède un domaine fonctionnel Zf-C2H2 (IPR007087) qui intervient dans la fixation des protéines à l'ADN (Annexe 1). Ce domaine est aussi présent dans les protéines ScCrz1 de *S. cerevisiae* et BcCrz1 de B cinerea (Figure 67 ; ScCRZ1 : 85% de similarité et 66% d'identité). Nous avons identifié par BlastP des protéines montre qu'elles sont relativement bien conservées en particulier au niveau du domaine Zf-C2H2 (Annexe 1). Ces protéines sont codées par des gènes orthologues puisqu'elles ont une phylogénie identique à celles des espèces étudiées. De plus, ces protéines possèdent toutes un domaine fonctionnel Zf-C2H2. L'ensemble de ces arguments suggère que ces différentes protéines ont la même fonction (facteur de transcription de la famille Crz1).



Figure 68 : Phénotype mycélien du mutant $Guy11\Delta ku80\Delta crz1$ comparé à la souche sauvage $Guy11\Delta ku80$



Figure 69 : Taux de sporulation chez le mutant *Guy11\Deltaku80\Deltacrz1* comparé à la souche sauvage : Le mutant *Guy11\Deltaku80\Deltacrz1* a, seulement, 22% de diminution de sporulation

3.2. Construction de mutants nuls *Guy11∆ku80∆crz1*

Pour la construction du vecteur de délétion de pour obtenir le mutant $\Delta crz1$, nous avons utilisé la méthode de PCR « double-joint » (Matériel et méthode). Nous avons réalisé les amplifications par PCR de la région flanquante gauche de *MgCRZ1* (amorces *crz1-2* et *crz1-15)* de 1044 nt, et de la séquence de la région flanquante droite de *MgCRZ1* (amorces *crz1-3* et *crz1-13)* de 942 nt. La casette de 3358 nt a été introduite par transformation dans des protoplastes de la souche *Guy11* $\Delta ku80$ de *M. grisea.* 61 transformants résistants à l'hygromycine ont été obtenus. L'analyse moléculaire de leurs ADNg par PCR a montré que 5 des 61 transformants étaient dépourvus de l'ORF de *MgCRZ1*. Ainsi la fréquence de mutants obtenus est de 8%. Deux mutant s*Guy11* $\Delta ku80\Delta crz1$ (T8 et T15) a été choisi, ainsi qu'un transformant ectopique (T11).

3.3. Croissance, morphologie et sporulation du mutant nul *Guy114ku804crz1*

L'analyse morphologique des mutants a été réalisée avec les différents transformants obtenus. Les résultats étant identiques pour tous les mutants *Guy11∆ku80∆crz1*, seuls les résultats des analyses phénotypiques obtenues avec un mutant sont présentés. Pour mettre en évidence le phénotype des mutants, ceux-ci sont mis en culture sur milieu minimum (MM). Après 7 jours, les mutants sont examinés et pris en photo (Figure 68). Ainsi, le mutant *Guy11∆ku80∆crz1* ne présente pas de différence morphologique au niveau mycélien par rapport à la souche sauvage. De plus, le mutant a une croissance égale à la souche sauvage en milieu gélosé et liquide. Ces résultats sont différents de ceux obtenus avec le mutant *∆crz1* de Zheng, *et al.* (2009) qui présente une réduction de sa pigmentation. Cette différence pourrait provenir soit du contexte génétique chez lequel a été construit leur mutant qui peut différer du notre (*Guy11∆ku80*), soit de différences dans les méthodes et de milieux de cultures (peu probable). La sporulation du mutant *Guy11∆ku80∆crz1* a été étudiée *in vitro* sur milieu complet. Les résultats obtenus (Figure 69) montrent que le mutant présente une diminution de 22% de sa sporulation, par rapport à la souche sauvage *Guy11∆ku80*. La sporulation est donc légèrement affectée chez ce mutant. Ces résultats sont différents de ceux obtenus avec le mutant $\Delta crz1$ de Zheng *et al.* (2009) montrent que le mutant présente une diminution de 22% de sa sporulation, par rapport à la souche sauvage *Guy11∆ku80*. La sporulation

3.4. Sensibilité des mutants nuls du gène MgCRZ1 aux inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi 3.4.1. Altération de la paroi du mutant Guy11Δku80Δcrz1

Un test de protoplastisation du mutant $\Delta crz1$ a été réalisé avec des enzymes de dégradation des parois fongiques (Glucanex, 1g/100ml) dans le but de comparer la cinétique de protoplastisation de ce mutant avec le mutant $\Delta mps1$ et la souche sauvage *Guy11* $\Delta ku80$. Le mutant $\Delta crz1$ commence à libérer des protoplastes plus tardivement que la souche sauvage, et sa production de protoplastes est globalement retardée. Ainsi, le temps nécessaire pour produire 50 % des protoplastes (Tp50) est le double de celui de la souche sauvage. Le retard du mutant $\Delta crz1$ à produire des protoplastes pourrait provenir de modifications de sa paroi le rendant plus résistant aux enzymes de dégradation du glucanex (Tableau 16).



Figure 70 : Représentation graphique des inhibitions avec un mélange de l'aculéacine et de la nikkomycine à DI20 sur la souche sauvage et le mutant *Guy11\Deltaku80\Deltacrz1*. Le test a été réalisé avec 0.01 ppm de la nikkomycine et 0.001 ppm de l'aculéacine. D'après les mesures, aucune synergie n'a été détectée chez le mutant *Guy11\Deltaku80\Deltacrz1*

Le mutant $Guy11\Delta ku80\Delta mps1$ est 2 fois plus hypersensible que la souche sauvage à l'enzyme de dégradation, le glucanex contrairement au mutant $Guy11\Delta ku80\Delta crz1$ est 2 fois plus résistant. Les deux gènes *CRZ1* et *MPS1* sont importants pour l'intégrité cellulaire.

	Tp50 mutant/	Sensibilité au
	Tp50 sauvage	glucanex
<i>Guy11∆ku80∆mps1</i>	50%	2X HS
<i>Guy11Δku80Δcrz1</i>	200%	2X R

Tableau 16 : Cinétique de protoplastisation du mutant *Guy11Δku80Δcrz1*. Tp50 de ce mutant est de 220 minutes. Le pourcentage est calculé avec le Tp50 des mutants par rapport à Tp50 de la souche sauvage. HS : Hypersensible, R : Résistant

3.4.2. Sensibilité du mutant *Guy11∆ku80∆crz1* au mélange d'aculéacine et de nikkomycine

Un test d'hypersensibilité aux inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi a été réalisé avec le mutant *Guy11∆ku80∆crz1*, en utilisant le mélange d'aculéacine (0.001ppm) et la nikkomycine (0.01 ppm; Figure 70). Le mutant *Guy11∆ku80∆crz1*, est aussi sensible à l'aculéacine et à la nikkomycine que la souche sauvage. De plus aucune hypersensibilité au mélange aculéacine et nikkomycine n'a été détecté chez ce mutant.

3.5. Pouvoir pathogène du mutant *Acrz1*

3.5.1. Pouvoir pathogène du mutant *Guy11∆ku80∆crz1* pour l'orge et le riz

Après l'analyse de la croissance et de la sporulation chez le mutant, son pouvoir pathogène a été étudié dans différentes conditions et sur différentes plantes hôtes. Le pouvoir pathogène des mutants *Guy11Δku80Δcrz1* a d'abord été étudié en utilisant l'orge comme plante hôte. Dans un premier temps, des implants de mycéliums de la souche parentale et du mutant *Guy11Δku80Δcrz1* ont été déposés sur les feuilles en survie blessées et non blessées d'orge. Comme il est montré sur la Figure 71, les implants du mutant *Guy11Δku80Δcrz1* (Figure 71A) n'ont causé aucune lésion, ni sur feuilles blessées, ni sur feuilles non-blessées. Par la suite, des tests de pathogénie ont été réalisés par pulvérisation de suspension de spores sur des plantes d'orge. Apres une semaine, les lésions apparues sur les feuilles sont comptées. Les résultats mettent en évidence une réduction de 96% du nombre de lésions chez le mutant *Guy11Δku80Δcrz1* comparé à la souche sauvage *Guy11Δku80* (Figure 71B). Le pouvoir pathogène des mutants *Guy11Δku80Δcrz1* vis-à-vis du riz a été étudié avec la variété Sariceltik, qui est une des plus sensibles à *M. grisea*. Les tests de pathogénie ont été réalisés par pulvérisation de suspensions de spores sur des plantes au stade 3 feuilles. Dans ces conditions expérimentales, le mutant *Guy11Δku80Δcrz1* présente une forte réduction de son pouvoir pathogène (-90 %, Tableau 17).



Figure 71 A : Photo d'infection sur feuille d'orge coupée du mutant du mutant *Guy11Δku80Δcrz1* et la souche sauvage *Guy11Δku80*. Le test est réalisé sur feuille blessée et non blessée. Le mutant *Guy11Δku80Δcrz1* ne cause aucune lésion sur une feuille d'orge, même blessée. Les taches observées sur feuilles blessées ne sont pas des lésions dues à *M. grisea*



Figure 71 B : Photo d'infections sur plante d'orge, du mutant *Guy11∆ku80∆crz1*et la souche sauvage *Guy11∆ku80*. Les photos sont prises à 7 jours. Les plantes sont infectées avec 3.10^4 spores/ml. Une réduction de 96% est observable

	Orge	Sariceltik - Riz
<i>Guy11∆ku80</i>	75*	36
<i>Guy11Δku80Δcrz1</i>	3	4
%Réduction	- 96 %	- 90 %

Tableau 17 : Pathogénie du mutant $\Delta crz1$ pour le riz *Nombre de lésions par feuille provoquées par le mutant $\Delta crz1$ sur des feuilles de riz 7 jours après inoculation, (3.10⁴ spores/ml). Le mutant $\Delta acrz11$ présente une diminution quantitative de sa pathogénie

En conclusion, le gène CRZ1 est nécessaire pour le pouvoir pathogène de *M. grisea*, aussi bien pour l'attaque de feuilles d'orge que de riz.

3.5.2. Différentiation appressoriale du mutant *Acrz1*

La formation d'appressoria ainsi que des hyphes de pénétration a été analysée. Des fragments d'oignons déposés sur des boîtes d'eau gélosée additionnée de kinétine ont été inoculés par une solution de spores du mutant $\Delta crz1$. L'observation au microscope de ces fragments d'oignon après 48 heures a mis en évidence le fait que le mutant forme des appressoria et ainsi que des hyphes de pénétration. Ceci montre que le mutant $\Delta crz1$ pénètre aussi bien que le souche sauvage dans la plante. Ainsi, son défaut de pathogénie ne serait pas du à un défaut de pénétration, mais sans doute à un blocage précoce de la colonisation de la plante.

4. Etude du gène AGS1 dont l'expression est contrôlée par MPS1 chez M. grisea

Les α -(1-3) glucanes sont des composants importants de la paroi cellulaire des champignons synthétisés par des α - (1-3) glucane synthases qui ont des protéines modulaires qui possèdent un domaine de type GH appartenant à la famille GH13 et deux autres domaines de type GT appartenant aux familles GTX et GTY (Xiao-Lian, et al. 2008). Ces α -(1-3) glucane synthases ont été identifiées chez les champignons ascomycètes, basidiomycètes et arché-oascomycètes, mais pas chez les hémiascomycètes (Damveld et al. 2005 ; Xiao-Lian, et al. 2008; Fujikawa, et al. 2009). Chez A. fumigatus, il existe trois gènes encodant des α - (1-3) glucane synthases (Beauvais, *et al.* 2005; Maubon, *et al.* 2006). Les deux mutants nuls d'AfAGS1 et d'AfAGS2 ont des morphologies altérées et présentent une réduction de leur sporulation, tandis que le mutant nul d'AfAGS3 sporule normalement. Seul le mutant $\Delta ags1$ d'A. fumigatus présente une réduction significative (-50%) de la teneur en γ (1-3) glucanes dans sa paroi cellulaire (Beauvais, et al. 2005; Maubon, et al. 2006). La protéine Ags1 semble donc impliquée dans la biosynthèse de ce type de composant de la paroi (Beauvais, et al. 2005). Chez A. nidulans, deux gènes encodant des α -(1,3) glucane synthases ont été identifiés (AGSA, AGSB; Damveld, et al. 2005). AnAGSA est l'orthologue d'AGSD d'A. niger et d'AfAGS2 d'A fumigatus, tandis qu'AnAGSB est l'orthologue d'AfAGS1 (Damveld, et al. 2005). Seul AnAGSA est exprimé qu'en réponse à un stress pariétal (SDS, calcofluor, inhibiteur de la synthèse des parois ; Damveld, et al. 2005), et cette expression différentielle dépend de la voie de signalisation An MPK1 (équivalente à la voie MgMPS1; Fujioka, et al. 2007).

Un seul de gène encodant une α -(1-3) glucane synthase a été identifié dans le génome de *M. grisea* (*AGS1*; Fujikawa *et al.* 2009). L'immuno-détection des α -(1-3) glucanes chez M. grisea montre que ceux-ci ne sont pas présents dans les parois du mycélium et des spores, mais s'accumulent dans les parois des appressoria et des hyphes infectieux. L'accumulation différentielle des α -(1-3) glucanes dans les parois de *M. grisea* est corrélée à l'expression différentielle de *MgAGS1*. De plus l'expression de *MgAGS1* dépend de la voie de signalisation Mps1 (pas d'expression de *MgAGS1* chez le mutant nul *MgMPS1*), Ainsi, comme chez *A. nidulans*, *MgAGS1* est un gène dont l'expression est induite lorsque la voie Mps1 est activée. Nous avons choisi d'étudier ce gène comme marqueur de l'activation de la voie Mps1 et de construire un mutant nul afin d'évaluer son impact dans les fonctions cellulaires contrôlées par la voie Mps1.

4.1. Etude bioinformatique du gène AGS1 de M. grisea

Chez *M. grisea*, il n'existe qu'un seul gène codant une α -(1-3) glucane synthase (*AGS1*; Fujikawa, *et al.* 2009). Ce gène de *M. grisea* est composé de 4 exons et il est situé sur le supercontig 8 (position : 382352-389353). Il encode une protéine membranaire de 2251 acides aminés qui possède trois domaines caractéristiques des α -(1-3) glucane synthases : un domaine Glycosyl Hydrolase extracellulaire de type alpha-amylase (GH13, IPR006047) et deux domaines Glycosyl Transferases intracellulaires de type glycogène synthase (GT1 IPR013534, IPR001296) qui sont les domaines



Figure 72: L'alignement des domaines Alpha-amylase, Glycosyltransferase et GlgA de la protéine Ags1 chez *M. grisea* et *S. pombe*. Ainsi, les domaines sont bien conservés entre ces deux espèces



Figure 74 : Phénotype mycélien du mutant $Guy11\Delta ku\Delta ags1$ comparé à la souche sauvage $Guy11\Delta ku80$

catalytiques de la glucane synthase (Annexe 1). Ces domaines sont conservés entre MgAgs1 et l' α -(1-3) glucane synthase 1 de *S. pombe* comme le montre leur alignement (Figure 72 ; 74% de similarité et 60% d'identité).

Nous avons identifié par Blast les gènes similaires à MgAGS1 chez les différentes espèces fongiques analysées. La séquence de la protéine similaire à MgAgs1 chez C. immitis, étant mal annotée (manque d'un exon à partir de l'acide aminé 1780) elle n'a pas été incluse dans cette analyse. Chez *S. cerevisae*, *C. albicans* et *A. gossypi* il n'y a pas de gènes encodant des α -(1-3) glucane synthases. L'alignement des séquences de ces protéines montre qu'elles sont très bien conservées en particulier au niveau des domaines Alpha-amylase et Glycogène synthase (Annexe 1). L'ensemble de ces protéines a donc les mêmes domaines fonctionnels. Par contre, les liens d'orthologie au sein de cette famille de protéines sont relativement complexes (Figure 73 - annexe 1). En effet, il semble exister dans la plupart des génomes fongiques plusieurs gènes encodant des α -(1-3) glucane synthases appartenants à des familles de gènes orthologues dont la distribution est variable suivant les espèces. Ainsi, chez les plectomycètes (*Aspergillus, Penicillium*), il existe de 2 à 5 gènes encodant des α -(1-3) glucane synthases, dont certains appartiennent à un clade spécifique de ces espèces. A l'opposé, M. grisea ne possède qu'un gène encodant une α -(1-3) glucane synthase apparenté à une des deux familles de gènes présentes dans les génomes apparentés (N. crassa, P. anserina, S. macrospora). En dehors de *M. grisea*, les seules espèces fongiques ne posséde qu'un seul gène codant une α -(1-3) glucane synthase sont *B. cinerea, S. sclerotiorum*, et *Tuber melanosporum*.

4.2. Construction de mutants nuls *Guy11Δku80Δags1*

La construction de la cassette de délétion de *MgAGS1* a été réalisée par la méthode de PCR « double-joint ». Les amplifications par PCR nous ont permis d'obtenir une séquence de la région flanquante gauche de *MgAGS1* (amorces *ags1-2* et *ags1-15*) de 1177 nt, et une séquence de la région flanquante droite de *MgAGS1* (amorces *ags1-3* et *ags1-13*) de 1553 nt. La casette de remplacement de gène a été amplifiée (3949 nt) par PCR avec les amorces internes *ags1-8* et *ags1-9* et vérifié par séquençage. Elle a été introduite par transformation dans des protoplastes de la souche *Guy11Δku80* de *M. grisea.* 20 transformants résistants à l'hygromycine ont été purifiés par isolement monospore. L'analyse moléculaire des ADNg de ces transformants ont démontré que 11 d'entre eux (T1, T2, T3, T4, T6, T8, T9, T11, T12, T15, T16) ne comportaient plus l'ORF du gène de *MgAGS1*, (55% de mutants). Deux mutants *Guy11Δku80Δags1* (T8 et T15) ont été choisis pour les analyses phénotypiques, ainsi qu'un transformant ectopique (T11).

4.3. Croissance, morphologie et sporulation du mutant nul *Guy11Δku80Δags1*

L'analyse de la morphologie des mutants a été réalisée avec les différents mutants obtenus. Les résultats étant identiques pour tous les mutants analysés, seuls les résultats d'un seul mutant sont présentés. Le mutant *Guy11* Δ *ku80* Δ *ags1* mis en culture sur milieu minimum pendant 7 jours, présente une légère réduction de croissance et de mélanisation (Figure 74). Cependant, ce mutant a



Figure 75 : Taux de sporulation chez le mutant *Guy11\Deltaku80\Deltaags1* comparé à la souche sauvage : Le mutant *Guy11\Deltaku80\Deltaags1* a 68% de diminution de sporulation



Figure 76 : Représentation graphique des inhibitions avec un mélange de l'aculéacine et de la nikkomycine à DI20 sur la souche sauvage et le mutant *Guy11\Deltaku80\Deltaags1.* Le test a été réalisé avec 0.01 ppm de la nikkomycine et 0.001 ppm de l'aculéacine. D'après les mesures, aucune synergie n'a été détectée chez le mutant *Guy11\Deltaku80\Deltaags1*

une croissance équivalente à la souche sauvage en milieu liquide. Le mutant *Guy11∆ku80∆ags1* présente une diminution de sa sporulation de -70%, par rapport à la souche sauvage *Guy11∆ku80* (Figure 75). Par contre, les spores de ce mutant différencient normalement des appressoria sur une membrane de téflon.

4.4. Sensibilité des mutants nuls des gènes *MgAGS1* aux inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi 4.4.1. Altération de la paroi du mutant nul *Guy11∆ku80∆ags1*

Le test de protoplastisation a été réalisé en présence d'enzymes de dégradation des parois (Glucanex, 1g/100ml) avec le mutant $\Delta ags1$, dans le but de comparer la cinétique de protoplastisation de ce mutant avec celui de la souche sauvage $Guy11\Delta ku80$ et du mutant $\Delta mps1$. Le mutant $\Delta ags1$ libère des protoplastes plus rapidement que la souche sauvage. Ainsi, le Tp50 (temps correspondant à la formation de 50% des protoplastes) du mutant $\Delta ags1$ deux fois plus court que celui de la souche sauvage (Tableau 18). La rapidité du mutant $\Delta ags1$ à produire des protoplastes pourrait provenir de modifications de sa paroi, le rendant plus sensible aux enzymes de dégradation du glucanex. Enfin, le mutant $\Delta ags1$ est aussi hypersensible à l'enzyme de dégradation du glucanex que le mutant $\Delta mps1$.

	Tp50 mutant /	
	Tp50 sauvage	Sensibilité au glucanex
<i>Guy11Δku80Δmps1</i>	50%	2X HS
Guy11∆ku80∆ags1	50%	2X HS

Tableau 18: Cinétique de protoplastisation du mutant *Guy11∆ku80∆ags1*. Le Tp50 de ce mutant est de 55 minutes, contrairement à celui de la souche sauvage qui est de 110 minutes. Le pourcentage est calculé avec le Tp50 des mutants par rapport à Tp50 de la souche sauvage. HS : Hypersensible ; Tp50 : temps correspondant à la formation de 50% des protoplastes

4.4.2. Sensibilité du mutant nul *Guy11\Deltaku80\Deltaags1* à un mélange d'aculéacine et de nikkomycine

La mesure de la sensibilité du mutant $\Delta ags1$ au mélange d'aculéacine (0,001 ppm) et de nikkomycine (0,01 ppm) a été réalisée en milieu gélosé. Aucune hypersensibilité aux inhibiteurs seuls ou en mélange, n'a été détectée chez ce mutant (Figure 76). Ce résultat est inattendu. En effet, le profil d'expression de ce gène chez *A. niger* et *M. grisea* (voir introduction) ainsi que son activité enzymatique prédite, suggère qu'*AGS1* encode une enzyme importante pour la réparation de la paroi fongique lors de son altération par des inhibiteurs. Dans le cadre de cette hypothèse, le mutant nul $\Delta ags1$ devrait être plus sensible à des inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi, ce qui n'est pas le résultat observé. Cette situation inattendue pourrait provenir, soit de l'existence d'un autre gène non directement apparenté à *AGS1* mais encodant une enzyme ayant une activité α -(1-3) glucane





Figure 77: Photo d'infections sur l'orge du mutant *Guy11\Deltaku80\Deltaags1* et la souche sauvage *Guy11\Deltaku80*. Les photos sont prises à 7 jours. Les plantes sont infectées avec 3.10⁴ spores/ml.Une réduction n'est pas observable synthase résiduelle, , soit du fait que l'activité enzymatique d'Ags1 n'est pas essentielle à la réparation de la paroi en présence d'un inhibiteur.

4.5. Pouvoir pathogène du mutant Δags1

Le pouvoir pathogène des mutants $\Delta ags1$ a d'abord été étudié en utilisant l'orge comme plante hôte. Les mesures de pathogénie ont été réalisées par la pulvérisation de suspension de spores sur des feuilles d'orge. Une semaine après inoculation, les lésions apparues sur les feuilles sont comptées. Les résultats montrent que le mutant $\Delta ags1$ est aussi pathogène que la souche sauvage *Guy11* $\Delta ku80$ (Figure 77). Le pouvoir pathogène des mutants a ensuite été étudié avec le cultivar de riz Maratelli (Tableau 19). Ces expériences montrent le mutant $\Delta ags1$ présente une réduction de son pouvoir pathogène, car il ne forme que 50% des lésions provoquées par la souche sauvage.

	Maratelli
Guy11∆ku80	35*
Guy11∆ku80∆ags1	14
Réduction de pathogénie	-50%

Tableau 19: Pathogénie du mutant $\Delta ags1$ pour le riz *Nombre de lésions par feuille provoquées par le mutant $\Delta ags1$ sur des feuilles de riz 7 jours après inoculation, (3.10⁴ spores/ml). Le mutant $\Delta ags1$ présente une diminution quantitative de sa pathogénie

4.6. Conclusions sur le mutant *Δags1* de *M. grisea*

Nous avons obtenu onze mutants *Guy11Δku80Δags1*. Ces mutants présentent une légère diminution de leur croissance mycélienne et de leur mélanisation. Cependant, ces mutants présentent une diminution significative de leur sporulation (-70%). Ces mutants ont vraisemblablement une paroi modifiée, car ils présentent une hypersensibilité aux enzymes de dégradation de parois comme le glucanex. Par contre, ces mutants ne sont pas hypersensibles à un mélange d'inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi (aculéacine et nikkomycine). Leur pouvoir pathogène est légèrement diminué uniquement dans le cas d'attaque du riz (-50%). L'ensemble de ces résultats montre que Mg*AGS1* joue un rôle important dans la sporulation, et la réparation de la paroi, mais un rôle mineur dans le pouvoir pathogène. L'importance de l'accumulation d' α -1,3-glucanes dans les parois des hyphes de M. grisea au cours de l'infection a été suggérée par Fujikawa, *et al.* (2009). Ces auteurs ont montré que cette accumulation dépendait de l'activation de la voie de signalisation Mps1 (absence d'accumulation chez le mutant $\Delta mps1$). Ils ont donc émis l'hypothèse que la non-pathogénie du mutant $\Delta mps1$ pouvait découler de l'absence d' α -1,3-glucanes dans ses parois. Cette absence d' α -1,3 glucanes, démasquerait les composants de la paroi (chitine) reconnu par les systèmes de défense de la plante, et conduirait à une réaction rapide de la plante en réponse à

l'attaque fongique. En effet, les plantes sont connues pour induire la sécrétion de divers enzymes qui dégradent les parois fongiques, par exemple β -1,3- glucanase et chitinase, en réponse à l'infection fongique comme mécanisme de défense (Van Loon, et al. 2006). Ces enzymes empêchent l'infection fongique non seulement par le blocage développement des hyphes infectieux (Mauch, et al. 1988 ; Mauch et Staehelin, 1989 ; Toyoda, et al. 1991), mais également en libérant MAMPs des hyphae (Ryan et Fermier, 1991 ; Felix, et al. 1993 ; Vander, et al. 1998). Il a été décrit que la chitine est deacetylaté au chitosane dans la paroi des hyphes infectieux pour éviter la génération de MAMPs chez certains champignons pathogènes de plante, par exemple chez P. gramini (pathogène de blé), C. graminicola (pathogène de maïs) (El Gueddari, et al. 2002). En fait, les oligomères de Nacetylglucosamine, produits de la chitine, fonctionnent comme MAMP dans le blé, tandis que les oligomères de N-glucosamine produits du chitosane ne font pas (Vander et al. 1998). Ainsi, la composition de la paroi cellulaire des pathogènes fongiques joue un rôle important dans l'interaction des plantes - champignons. Selon cette hypothèse, le mutant Δags1 devait être non pathogène comme le mutant $\Delta mps1$. La faible réduction du niveau de pathogénie du mutant $\Delta ags1$ que nous avons observé montre que cette hypothèse est sans doute trop simple. Ainsi, l'absence probable d' α -1,3 glucanes chez le mutant $\Delta ags1$ n'est pas suffisante pour permettre une reconnaissance du mutant par les systèmes de défense de la plante. Il faudra toutefois vérifier le contenu en α -1,3-glucanes des appressoria et des hyphes infectieux du mutant $\Delta ags1$ avant de conclure définitivement.

Les phénotypes des mutants $\Delta ags1$ de *M. grisea* sont assez semblables à ceux des mutants d' α -1,3glucane synthases déjà obtenus chez *A. fumigatus* (Beauvais, *et al.* 2004 ; Maubon *et al.* 2006). En effet, les mutants $\Delta Afags1$ et $\Delta afags2$ présentent une réduction importante de leur sporulation (-75%) comme le mutant $\Delta Mgags1$. Les deux mutants $\Delta Afags1$ *et* $\Delta afags2$ sont toujours virulents pour la souris (Beauvais, *et al.* 2004). Le mutant $\Delta Afags3$ sporule plus rapidement que la souche sauvage et il présente plus forte mélanisation de ses spores. Enfin, il est plus virulent que la souche sauvage pour la souris. Les auteurs (Maubon *et al.* 2006) expliquent ce résultat inattendu par un phénomène de compensation chez le mutant $\Delta Afags3$, qui se manifeste par sur-expression du gène AfAGS1 et par une hypermélanisation.



Figure 78 : Alignement du domaine WD40 de la protéine Idc1 chez *M. grisea* et *P. anserina*. Ainsi, le domaine est conservé entre ces deux espèces

Résultats

5. Etude du rôle du gène candidat *MgIDC1* orthologue de *PaIDC1*, dans la voie de signalisation Mps1 chez *M. grisea*

Le gène *IDC1* a été identifié pour la première fois chez le champignon ascomycète *P. anserina* (Jamet-Vierny, *et al.* 2007). Plusieurs arguments expérimentaux suggèrent qu'*IDC1* est un élément essentiel de la voie de signalisation MAP Kinase PaMpk1 (voie équivalente à la voie Mps1 de *M. grisea*). Ainsi, l'analyse phénotypique des mutants nuls d'*IDC1* montre que ce gène est nécessaire à la différenciation des fructifications sexuelles, la défense hyphale qui est un mécanisme de défense contre d'autres micro-organismes lié à l'accumulation de peroxydes, et le développement du phénomène de dégénération de type CG qui provient d'une activation anormale de la voie PaMpk1 (Kicka, *et al.* 2006). Tous ces phénotypes sont équivalents à ceux des mutants nuls des gènes *PaNOX1, PaASK1, PaMKK1* et *PaMPK1.* De plus, il a été montré qu'Idc1 n'est pas nécessaire à l'activation de PaMpk1 par phosphorylation, mais qu'il est indispensable pour la localisation nucléaire de PaMpk1. Ainsi, Idc1 est un élément essentiel pour le fonctionnement de la voie PaMpk1 (Jamet-Vierny, *et al.* 2007).

5.1. Etude bioinformatique du gène *IDC1* de *M. grisea* encodant l' orthologue d'*IDC1* de *Podospora anserina*

Le gène de *M. grisea* la plus similaire à *PaIDC1*, est le gène *MgIDC1* (MGG_06673.6, BlastP, 53% d'identité et 65 % de similarité, e-value : 00). MgIdc1 est une protéine de 1633 acides aminés, encodée par un gène comportant 5 exons et situé sur le supercontig 18 (position : 2284267-2289593). La protéine MgIdc1 possède un domaine WD40 qui est retrouvé dans PaIdc1 (Figure 78). Nous avons identifié les protéines similaires à MgIdc1 que chez certaines espèces fongiques. Ainsi il existe des gènes orthologues de *MgIDC1/PaIDC1* chez tous les Pezizomycotina mais aucun chez les Saccharomycotina (*S. cerevisiae, Y. lipolytica*) et les Taphrinomycotina (*S. pombe*). Il semble exister une variation dans la taille de ces protéines chez certaines espèces. Ainsi, chez *M. graminicola* et *S. nodorum*, des protéines similaires à *MgIDC1* avec un domaine WD40 ont été identifiées, mais ces protéines sont deux fois plus courtes (950 acides aminés <) que les protéines de la famille Idc1 des autres ascomycètes. L'alignement des séquences de l'ensemble des protéines de la famille Idc1 montre qu'elles ne sont bien conservées qu'au niveau du domaine WD40 (Annexe 1, 70 à 250 aa) et d'une région située entre 515 à 890 aa qui pourrait avoir une rôle fonctionnel. L'arbre phylogénétique construit à partir de cet alignement montre que ces protéines sont encodées par des gènes orthologues, puisque leur phylogénie est identique à celles des espèces étudiées.

5.2. Construction de mutants nuls *Guy11∆ku80∆idc1*

Pour la construction du vecteur de remplacement de ce gène, la méthode de PCR « double-joint » a été utilisée. Nous avons obtenu par PCR une région flanquante gauche de *MgIDC1* (amorces *idc1-2NVO* et *idc1-15)* de 787 nt et une région flanquante droite de *MgIDC1* (amorces *id1-c3NVO* et *idc1-*


Figure 79: Phénotype mycélien du mutant $Guy11\Delta ku80\Delta idc1$ comparé à la souche sauvage $Guy11\Delta ku80$. Le mutant $Guy11\Delta ku80\Delta idc1$ a une croissance normale comparée à la souche sauvage mais il a une diminution d'hyphe aérienne



Figure 80 : Taux de sporulation chez le mutant *Guy11\Deltaku80\Deltaidc1, comparé à la souche sauvage : Le mutant <i>Guy11\Deltaku80\Deltaidc1 a 50% de diminution de sporulation*

13) de 956 nt,. La cassette finale de 3000 nt a été introduite par transformation dans des protoplastes de la souche *Guy11* Δ *ku80* de *M. grisea*. L'analyse moléculaire des ADNg des 17 transformants ont démontré que 8 d'entre eux (T1, T4, T5, T6, T8, T9, T13, T17) ne comportaient pas l'ORF du gène *IDC1* (fréquence de mutants de 47%). Parmi ces souches, deux mutants *Guy11* Δ *ku80* Δ *idc1* (T4 et T5) ont été choisis, ainsi qu'un transformant ectopique (T12) pour les analyses phénotypiques.

5.3. Croissance, morphologie et sporulation du mutants nul *Guy11∆ku80∆idc1*

L'analyse phénotypique des mutants $\Delta idc1$ a été réalisée avec les différents transformants identifiés comme étant des mutants de délétion. Les résultats étant identiques pour tous, seuls les résultats du mutant *Guy11* Δ *ku80* $\Delta idc1.4$ sont présentés. *Guy11* Δ *ku80* $\Delta idc1$ a une croissance normale, par rapport à la souche sauvage sur un milieu minimum. Cependant, sa morphologie est différente de la souche sauvage (Figure 79) et ressemble quantitativement à celle du mutant *Guy11* Δ *ku80* Δ *mps1* (pas d'hyphes aériens, dépigmentation). Cependant ces défauts sont moins marqués que ceux du mutant *Guy11* Δ *ku80* Δ *mps1*. Le mutant *Guy11* Δ *ku80* Δ *idc1* présente aussi une diminution de sa sporulation de 50% par rapport à la souche sauvage (Figure 80). Par ailleurs, 74% des spores de *Guy11* Δ *ku80* Δ *idc1* différencient des appressoria comme la souche sauvage correspondante.

5.4. Sensibilité du mutant nul du gène MgIDC1 aux inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi 5.4.1. Altération de la paroi du mutant nul Guy11∆ku80∆idc1

Une mesure de la sensibilité du mutant $Guy11\Delta ku80\Delta idc1$ aux enzymes de dégradation, le glucanex (1g/100ml) a été réalisé en mesurant la cinétique de protoplastisation de ce mutant par rapport à celles du mutant $Guy11\Delta ku80\Delta mps1$ et de la souche sauvage $Guy11\Delta ku80$. Le mutant $Guy11\Delta ku80\Delta idc1$ libère des protoplastes plus rapidement que la souche sauvage. Ainsi, le Tp50 (temps nécessaire à la formation de 50% des protoplastes) du mutant $Guy11\Delta ku80\Delta idc1$ est équivalent à celui du mutant $Guy11\Delta ku80\Delta mps1$ (Tableau 20) et ces valeurs sont deux fois moindre que celles de la souche sauvage. Ainsi, le mutant $Guy11\Delta ku80\Delta mps1$ aux enzymes de dégradation présents dans le glucanex.

	Tp50 mutant /	
	Tp50 sauvage	Sensibilité au glucanex
Guy11∆ku80∆mps1	50%	2X HS
Guy11∆ku80∆idc1	55%	2X HS

Tableau 20 : Sensibilité du mutant *Guy11Δku80Δidc1* aux enzymes de dégradation de la paroi Le Tp50 de ce mutant est de 50 Le pourcentage est calculé avec le Tp50 des mutants par rapport à Tp50 de la souche sauvage. HS : Hypersensible. Tp50 : temps nécessaire à la formation de 50% des protoplastes



Figure 81: Représentation graphique des inhibitions avec un mélange de l'aculéacine et de la nikkomycine à DI20 sur la souche sauvage et le mutant *Guy11∆ku80∆idc1*. Le test a été réalisé avec 0.01 ppm de la nikkomycine et 0.001 ppm de l'aculéacine. D'après les mesures, une inhibition de 70% a été détectée pour le mutant Guy11*∆ku80∆idc1*





Figure 82: Photo d'infections sur l'orge du mutant *Guy11Δku80Δidc1* et la souche sauvage *Guy11Δku80*. Les photos sont prises à 7 jours. Les plantes sont infectées avec 3.10⁴ spores/ml. Une réduction de 63% est observée chez le mutant *Guy11Δku80Δidc1*

5.4.2. Sensibilité du mutant nul *Guy11Δku80Δidc1* à un mélange d'aculéacine et de nikkomycine

Nous avons comparé l'inhibition de la croissance mycélienne du mutant $Guy11\Delta ku80\Delta idc$ 1 en présence de fongicides seuls ou en mélange, par rapport à celle observée chez la souche sauvage $Guy11\Delta ku80$. L'inhibition de la croissance du mutant $Guy11\Delta ku80\Delta idc$ 1 en présence d'un mélange aculéacine/nikkomycine (0.001ppm/0.01ppm) est plus forte (70%) que celle détectée pour la souche sauvage $Guy11\Delta ku80$ (20% ; Figure 81). Le mutant $Guy11\Delta ku80\Delta idc1$ montre ainsi une forte hypersensibilité au mélange d'inhibiteur d'aculéacine et de nikkomycine, qui reste cependant inférieure à celle observée pour le mutant $Guy11\Delta ku80\Delta mps1$ (100% d'hypersensibilité), Ce résultat suggère que Mg*IDC1* ait un rôle dans la réparation de la paroi en présence des inhibiteurs.

5.5. Pouvoir pathogène du mutant *\Deltaidc1*

Le pouvoir pathogène du mutant $Guy11\Delta ku80\Delta idc1$, a été étudié dans différentes conditions et sur différentes plantes hôtes. Le pouvoir pathogène des mutants $Guy11\Delta ku80\Delta idc1$ a d'abord été évalué en utilisant l'orge comme plante hôte. Des tests de pathogénie par pulvérisation d'une suspension de spores sur des feuilles de plantes d'orge ont été réalisés. Une semaine après inoculation, les lésions sont comptées. Les résultats obtenus mettent en évidence une réduction mesurable du nombre de lésions (-63%) provoquées par le mutant $Guy11\Delta ku80\Delta idc1$ par rapport à la souche sauvage $Guy11\Delta ku80$ (Figure 82). Le pouvoir pathogène des mutants vis-à-vis du riz a ensuite été étudié, en utilisant deux cultivars de riz, les variétés CO39 et Maratelli qui sont sensibles. Les mutants $Guy11\Delta ku80\Delta idc1$ présentent une réduction du nombre de lésions de -55% (Tableau 21) équivalente à la réduction observée sur orge. Le mutant $Guy11\Delta ku80\Delta idc1$ présente une réduction de son pouvoir pathogène qui est quantitative et bien moindre que le mutant $\Delta mps1$ (non pathogène).

	Orge	CO39 -	Maratelli -	
		Riz	Riz	
<i>Guy11∆ku80</i>	75*	38	35	
<i>Guy11Δku80Δ idc1</i>	19	18	15	
%Réduction	-63%	-52%	- 57%	

Tableau 21 : Pathogénie du mutant. Guy114ku804idc1

*Nombre de lésions par feuille provoquées par le mutant *Guy11Δku80Δidc1* sur des feuilles de riz et d'orge. Les comptages ont été réalisés 7 jours, après la pulvérisation d'une suspension de 3.10⁴ spores/ml. Le mutant *Guy11Δku80Δidc1* présente une diminution de 50% du nombre de lésions.

5.6. Conclusion sur le mutant *\Deltaidc1* chez *M. grisea*

Les mutants $\Delta idc1$ de *M. grisea* ont une croissance normale par rapport à la souche sauvage sur le milieu minimum. Cependant, leur morphologie est différente de la souche sauvage (diminution des hyphes aériens, dépigmentation, Figure 81) et ressemble à celle du mutant *Guy11∆ku80∆mps1*. Les mutants *Guy11∆ku80∆idc1* présentent aussi une diminution quantitative de leur sporulation (-47%), par rapport à la souche sauvage *Guy11∆ku80*. Les mutants *∆idc1* sont aussi hypersensibles aux enzymes de dégradation, le glucanex (2x HS) et aussi au mélange des inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi d'aculéacine et de nikkomycine (-70%), comme la souche mutante *Guy11∆ku80∆mps1*. Enfin, le pouvoir pathogène des mutants *Guy11∆ku80∆idc1* est diminué de 50% par rapport à la souche sauvage. L'ensemble de ces résultats montre que Mg*IDC1* est impliqué dans la formation des hyphes aériens, la sporulation, la biosynthèse/réparation de la paroi et dans une moindre mesure le pouvoir pathogène. Les phénotypes des mutants *Guy11∆ku80∆idc1* sont similaires à ceux du mutant *Guy11∆ku80∆mps1*.

Chez *P. anserina*, le mutant $\Delta Paidc1$ présente un ensemble de phénotypes caractéristiques : réduction de la pigmentation et absence d'hyphes aériens, stérilité femelle, absence d'interférence hyphale et de développement d'altérations de croissance de type Crippled Growth (Jamet-Vierny, *et al.* 2007). Le mutant $\Delta Mgidc1$ présente certains des phénotypes (réduction de la pigmentation et absence d'hyphes aériens), les autres phénotypes n'ayant pas été testés (stérilité femelle, altération CG). Chez *P. anserina*, le mutant $\Delta Paidc1$ présente les mêmes phénotypes que le mutant $\Delta Pampk1$ (*PaMPK1* est l'orthologue de *MgMPS1*), ce qui n'est pas le cas du mutant $\Delta Mgidc1$. Ces éléments suggèrent que MgIdc1 appartienne bien à la voie de signalisation Mps1 comme PaIdc1 chez *P. anserina*, mais à la différence de PaIdc1 qui est essentiel au fonctionnement de la voie Mpk1, MgIdc1 ne ferait que moduler quantitativement l'activité de cette voie.



Figure 83: Alignement des domaines ZZ, COG5114, SWIRM de la protéine Cas5 chez *M. grisea* et *C. albicans*. Ainsi, les domaines sont conservés entre ces deux espèces

Etude du gène candidat *MgADA2* orthologue de *ScADA2* et de son rôle dans la voie de signalisation Mps1 de *M grisea*

La protéine Cas5 de *Candida albicans* est un régulateur transcriptionel qui possède un domaine avec un doigt de zinc (ZZ domaine, PFAM : IPR000433 ; Bruno *et al.* 2006). Ce gène a été identifié lors d'un criblage de mutants pour leur hypersensibilité à un inhibiteur de la biosynthèse de la paroi fongique, la caspofongine. L'expression de *CaCAS5* est induite par un traitement par la caspofongine. Il a été aussi montré que CaCas5 est impliqué dans le contrôle de l'expression de plusieurs gènes codant des enzymes de réparation de la paroi cellulaire (Bruno *et al.* 2006). L'ensemble de ces données suggère que CaCas5 soit un nouveau facteur de transcription impliqué dans la régulation de la réponse cellulaire à un stress pariétal. Par contre le mutant nul $\Delta Cacas5$ est non pathogène pour la souris (Chamolois *et al.* 2009).

Le coactivateur de *CaCAS5, CaADA2*, est identifié (Bruno *et al.* 2006). Tous les gènes réprimés chez le mutant $\Delta Caada2$ sont réprimés aussi chez le mutant $\Delta cacas5$. De plus le mutant $\Delta Caada2$ est hypersensibles à la caspofongine comme le mutant $\Delta cacas5$. Ainsi les auteurs ont suggéré que *CaADA2* est nécessaire pour l'activation des gènes induits par la caspofongine.

Les auteurs ont supposé que soit CAS5 est un des gènes impliqué dans la cascade de signalisation MAPK Mkc1 (Homologue de Mps1) ; soit il est impliqué dans une nouvelle cascade de signalisation pas encore définie. Ces résultats, nous ont conduit à rechercher si il existait un gène orthologue de *CaCAS5* et *CaADA2* chez *M. grisea* afin d'étudier ses rôles dans les voies de signalisation impliquées dans la réparation de la paroi en réponse à un stress pariétal.

6.1. Etude bioinformatique du gène de *M. grisea* encodant l'orthologue de Ca*CAS5*

Nous n'avons pas trouvé les homologues du gène *CaCAS5* chez M. grisea. Par contre, nous avons identifié un gène homologue de *CaADA2* dans le génome de *M. grisea* (*MgADA2*: MGG_05099.6; 68% d'homologie et 50% d'identité, e-value BlastP: 2^e-89). MgAda2 est une protéine de 392 acides aminés encodée par le gène *MgADA2* composé de 3 exons et localisé sur le supercontig 27. La protéine MgAda2 possède trois domaines : le domaine ZZ (IPR000433) qui est un domaine à doigt de zinc caractéristique des facteurs de transcription, le domaine COG5114 (IPR014778), et le domaine SWIRM (IPR007526) qui est impliqué dans les interactions protéine-protéine (Annexe 1). Ces domaines sont bien conservés entre les deux protéines Ada2 de *M. grisea* et *C. albicans* (Figure 83). Nous avons identifié par Blast des gènes encodant des protéines similaires à MgAda2 dans les génomes fongiques chez l'ensemble des champignons ascomycètes analysés (Annexe 2). L'alignement des séquences de ces protéines montre qu'elles sont relativement bien conservées en particulier au niveau des domaines ZZ, COG5114 et SWIRM (Annexe 1). L'arbre phylogénétique construit à partir de ces séquences protéiques est identique à celles des espèces étudiées. De plus,

Guy11∆KU80∆cas5



Figure 84: Phénotype mycélien du mutant $Guy11\Delta ku80\Delta cas5$ comparé à la souche sauvage $Guy11\Delta ku80$. Le mutant $Guy11\Delta ku80\Delta cas5$ a une croissance équivalente comparée à la souche sauvage



Figure 85 : Taux de sporulation chez le mutant *Guy11\Deltaku80\Deltacas5*, comparé à la souche sauvage : Le mutant *Guy11\Deltaku80\Deltacas5* a 18% de diminution de sporulation

l'ensemble de ces protéines a les mêmes domaines fonctionnels. L'ensemble de ces arguments suggère que ces différentes protéines ont la même fonction.

6.2. Construction des mutants nuls *Guy11Δku80Δada2*

Pour la construction de ce mutant de délétion, la méthode de PCR « double-joint » a été utilisée. Nous avons amplifié par PCR une région flanquante gauche du gène *MgADA2* (amorces *cas5-2* et *cas52-15)* de 1011 nt, et une région flanquante droite du gène *MgADA2* (amorces *cas5-3* et *cas5-13)* de 985 nt. La casette finale de 3315 nt a été introduite par transformation dans des protoplastes de la souche *Guy11* Δ *ku80* de *M. grisea*. L'analyse moléculaire des ADNg de 12 transformants a montré que 2 transformants (T4, T9) ne comportaient pas l'ORF du gène Mg*ADA2* (16% de fréquence de mutants) Ainsi, les deux mutants *Guy11* Δ *ku80* Δ *ada2* (T4 et T9), ainsi qu'un transformant ectopique (T12) ont été analysés au niveau phénotypique.

6.3. Croissance, morphologie et sporulation du mutant nul *Guy11Δku80Δada2*

L'analyse phénotypique des mutants *Guy11∆ku80∆ada2* a été réalisée avec les différents transformants identifiés comme étant des mutants de délétion. Les résultats étant identiques pour tous ces transformants, seuls les résultats du mutant *Guy11∆ku80∆cas52-9* sont présentés. *Guy11∆ku80∆ada2* a une croissance normale par rapport à sa souche sauvage sur un milieu minimum. Sa morphologie est semblable à celle de la souche sauvage (Figure 84). Le mutant *Guy11∆ku80∆ada2* présente une sporulation semblable à celle de la souche sauvage (Figure 85). Pour l'ensemble de ces critères phénotypiques, le mutant *Guy11∆ku80∆ada2* est donc semblable à la souche sauvage et diffère donc aussi bien du mutant *Guy11∆ku80∆mps1* que des mutants *Guy11∆ku80∆swi4, Guy11∆ku80∆swi6 et Guy11∆ku80∆rml1* qui présentent tous des morphologies différentes de la souche sauvage. Le mutant *Guy11∆ku80∆ada2* présente une sporulation semblable à celle de la souche sauvage.

6.4. Sensibilité du mutant nul du gène MgADA2 aux inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi

Nous avons comparé l'inhibition de la croissance mycélienne du mutant *Guy11∆ku80∆ada2* en présence de fongicides seuls ou en mélange, par rapport à celle observée chez la souche sauvage *Guy11∆ku80*. L'inhibition de la croissance du mutant Guy11*∆ku80∆ada2* en présence d'un mélange aculéacine/nikkomycine (0.001ppm/0.01ppm) est plus forte (45%) que celle détectée avec la souche sauvage Guy11*∆ku80* (20%). Le mutant *Guy11∆ku80∆ada2* montre ainsi une certaine hypersensibilité au mélange d'aculéacine et de nikkomycine, qui reste cependant très inférieure à celle observée pour le mutant *Guy11∆ku80∆mps1* (100% d'hypersensibilité).

Ce résultat suggère cependant que Mg*ADA2* ait un rôle dans la réparation de la paroi en présence des inhibiteurs (Figure 86).



Figure 86 : Représentation graphique des inhibitions avec un mélange de l'aculéacine et de la nikkomycine à DI20 sur la souche sauvage et le mutant *Guy11∆ku80∆cas5*. Le test a été réalisé avec 0.01 ppm de la nikkomycine et 0.001 ppm de l'aculéacine. D'après les mesures, une inhibition de 45% a été détectée pour le mutant *Guy11∆ku80∆cas5*



Figure 87: Photo d'infections sur l'orge du mutant *Guy11Δku80Δcas5* et la souche sauvage *Guy11Δku80*. Les photos sont prises à 7 jours. Les plantes sont infectées avec 3.10^4 spores/ml. Une réduction de 19% est observée chez le mutant *Guy11Δku80Δcas5*

6.5. Pouvoir pathogène du mutant *dada2*

Le pouvoir pathogène des mutants $\Delta ada2$ a d'abord été évalué en utilisant l'orge comme plante hôte. Des pulvérisations d'une suspension de spores sur des feuilles de plantes d'orge ont été réalisées. Une semaine après inoculation, les lésions sont comptées. Les résultats obtenus mettent en évidence une réduction de 20% du nombre de lésions pour le mutant *Guy11* $\Delta ku80\Delta ada2$ comparé à la souche sauvage *Guy11* $\Delta ku80$ (Figure 87). Cette réduction du nombre de lésions peut être considéré comme faible, voire peu significative. Il est donc vraisemblable qu'ADA2 ne joue pas un rôle important dans le pouvoir pathogène de *M. grisea*.

6.6. Conclusion sur le mutant *dada2*

Les mutants *Guy11Δku80Δada2* de *M. grisea* ont non seulement une croissance normale par rapport à la souche sauvage sur un milieu minimum, mais leur morphologie (hyphes aériens, pigmentation) et leur sporulation sont semblables à celles de la souche sauvage *Guy11Δku80*. Les mutants *Δada2* sont légèrement hypersensibles au mélange d'inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi (aculéacine et nikkomycine:-45%). Enfin, le pouvoir pathogène des mutants *Guy11Δku80Δada2* est équivalent à la souche sauvage. Ainsi, le mutant *Guy11Δku80Δada2* ne présente que très peu des phénotypes altérés du mutant *Guy11Δku80Δmps1*, et sa seule ressemblance se limite à une hypersensibilité au mélange d'aculéacine et de nikkomycine. L'ensemble de ces résultats suggère que Mg*ADA2* joue un rôle spécifique dans la réparation de la paroi en réponse à un stress. D'autres stress pariétaux devront être analysés, en particulier la sensibilité à des enzymes de dégradation de la paroi. .Sa place dans les voies de signalisation fongiques, en particulier, la voie Mps1, reste à être déterminée, en particulier en étudiant son expression en réponse à des stress pariétaux et dans ces contextes mutants comme celui du mutant *Guy11Δku80Δmps1*.



Figure 88: Alignement du domaine SIM1_KNR4 de la protéine KnrR4 chez *M. grisea* et *S. cerevisiae*. Ainsi, le domaine est conservé entre ces deux espèces

Etude du gène candidat MgKNR4 orthologue de ScKRN4 et de son rôle dans la voie de signalisation Mps1 de M grisea

La protéine Knr4, récemment caractérisée comme étant une protéine intrinsèquement désordonnée de *S. cerevisiae*, impliquée dans la réparation de la paroi cellulaire et la régulation du cycle cellulaire (Gonzalez-Ramos, *et al.* 2009 ; Dagkessamanskaia, *et al.* 2010). Cette protéine est constituée d'un noyau globulaire central avec une extrémité N-terminale peu structurée. La protéine Knr4 a la capacité d'interagir avec de nombreuses protéines (30 protéines à ce jour ; Durand, *et al.* 2008). Ainsi, il a été montré chez *S. cerevisiae* que Knr4 interagit avec Slt2 (Durand, *et al.* 2008). De plus, cette protéine est essentielle pour la viabilité des cellules en l'absence d'une voie Pkc1-Slt2 fonctionnelle chez *S. cerevisiae*. Ces résultats nous ont conduit à rechercher si il existait un gène orthologue de *ScKRN4* chez *M. grisea* afin d'étudier son rôle dans la voie de signalisation Mps1.

7.1. Etude bioinformatique du gène de M. grisea encodant l'orthologue de KNR4

La protéine de *M. grisea* la plus semblable à ScKnr4 est celle encodée par le gène MGG_03970.6 (35 % identité, 53 % similarité, e-value : 1^{E-}41). Le gène de *M. grisea* encodant cette protéine de 556 acides aminés, *MgKNR4*, est composé de 3 exons et il est situé sur le supercontig 12 (position : 1219632-1221987). La protéine MgKnr4 possède un domaine SIM1_KNR4 (IPR018958) similaire à celui de ScKnr4, comme le montre l'alignement des séquences de ces deux protéines (Figure 88). Nous avons identifié les protéines similaires à MgKnr4 chez l'ensemble des champignons ascomycètes analysés (Annexe 2). L'alignement de ces protéines montre qu'elles sont relativement bien conservées en particulier au niveau de domaine SIM_KNR4 (Annexe 1). L'arbre phylogénétique construit à partir de cet alignement montre que les gènes encodant ces protéines sont orthologues puisqu'elles ont une phylogénie identique à celles des espèces étudiées. De plus, l'ensemble de ces protéines a le même domaine conservé. L'ensemble de ces arguments suggère que ces différentes protéines aient la même fonction.

7.2. Construction des mutants nuls *Aknr4*

Pour la construction de ce mutant de délétion, la méthode de PCR « double-joint » a été utilisée. Nous avons obtenue par PCR une région flanquante gauche du gène *MgKNR4* (amorces *knr4-2* et *knr4-15)* de 955 nt, et une région flanquante droite du gène *MgKNR4* (amorces *knr4-3* et *knr4-13)* de 920 nt. Cette casette de 3030 nt a été introduite par transformation dans des protoplastes de la souche *Guy11* Δ *ku80* de *M grisea*. L'analyse moléculaire de 120 transformants résistants à l'hygromycine a confirmé que tous les transformants comportaient l'ORF de *KNR4*. Nous n'avons donc pas réussi à obtenir de mutants par remplacement de gène à ce locus. Le même résultat négatif a été obtenu en utilisant comme souche réceptrice de la transformation, la souche sauvage P1.2 et la souche sauvage *P1.2* Δ *ku80*.

7.3. Conclusion sur le mutant *Aknr4*

Nous n'avons pas réussi à obtenir de mutants par remplacement de gène au locus *MgKNR4*, malgré l'utilisation de deux souches sauvages différentes (P1.2, Guy11) et de deux mutants *Guy11∆ku80* et *P1.2∆ku80*, qui permettent d'obtenir des mutants à haute fréquence (60-100%) à la plupart des loci de *M. grisea* (Villalba, *et a.*/2008). L'incapacité à obtenir ces mutants suggère soit que la délétion de ce gène est létale, soit que ce locus soit déficient pour la recombinaison homologue comme cela a été observé pour le locus *ACE1* (Villalba, *et a.*/2008). Alternativement, il serait intéressant de tenter la suppression de l'expression de ce gène par l'expression d'ARNs double brins spécifiques de ce gène sous le contrôle d'un promoteur inductible. En effet cette méthode pourrait permettre de répondre à cette question (létalité ou locus anti-recombinaison).



Figure 89: L'expression des gènes cible candidats dans la spore, le mycélium et l'appressorium



Figure 90: Représentation graphique des niveaux d'expression des gènes encodant les facteurs de transcription de la voie de signalisation de *MPS1*, chez *M. grisea*. L'analyse des expressions est réalisée chez la souche sauvage *Guy11*Δ*ku80*, traités et non traité par 0.001ppm de l'aculéacine

8. Analyse des réseaux de régulation transcriptionelle contrôlés par MgMPS1

Nous avons utilisé deux approches afin d'étudier les réseaux de régulation transcriptionelle contrôlés par *MPS1*. Tout d'abord nous avons étudié les profils d'expression des facteurs de transcription de cette voie (*SW14, SW16, RLM1, CR21*) au cours du développement fongique et de conditions de stress associées au remodelage de la paroi. La première question était de savoir quels étaient les niveaux d'expression de ces gènes dans le mycélium, les spores ou les appressoria. Ensuite, nous avons cherché a déterminé quels étaient leurs niveaux d'expression en présence ou en absence d'un traitement d'une heure par un inhibiteur de la biosynthèse des glucanes, l'aculéacine (0.001ppm, DI80). Ensuite, nous avons utilisé des gènes candidats dont les orthologues chez *S. cerevisiae* et *A. nidulans* ont une expression en réponse à une stress pariétal qui dépend de la voie Mps1. Les profils d'expression des gènes identifiés ont été analysés par qRT-PCR dans les mêmes conditions que les gènes encodant les facteurs de transcription de la voie Mps1, en présence ou non d'aculéacine. L'objectif de ce travail est de définir les conditions et les gènes de références qui sont induit par un stress pariétal et d'identifier parmi ceux-ci ceux dont l'induction ou la répression dépend de Mps1.

8.1. Analyse de l'expression des gènes encodant les facteurs de transcriptions de la voie de MAP kinase, Mps1

8.1.1. Expression des gènes de la voie Mps1 au cours du développement ou de stress chez *M. grisea*

La première analyse a consisté à analyser les profils d'expression des gènes codant les facteurs de transcription que nous avons étudiés (*SWI4, SWI6, RLM1* et *CRZ1*). Ainsi, l'expression de ces gènes a été mesurée dans le mycélium cultivé sur milieu synthétique, les spores et les appressoria différenciés sur téflon par qRT-PCR. D'après la figure 89, *MPS1* est toujours exprimé au cours de développement, mais il est surexprimé dans l'appressorium par rapport au mycélium (x 10) et aux spores (x 4). Les gènes *SWI4, SWI6, RLM1* et *CRZ1* ne sont quasiment pas exprimés dans le mycélium. Par contre, ils sont significativement exprimés (0,3 à 2 fois ILV5) dans la spore et l'appressorium et présentent le même profil d'expression en fonction des tissus fongiques (maximum d'expression dans les spores) qui diffère de celui de MPS1 (maximum d'expression dans les appressoria). *SWI4* est le gène qui a le plus faible niveau d'expression dans les spores et les appressoria. Par contre, les gènes *RLM1* et *CRZ1* sont tous les deux sur exprimés dans les spores (10 - 20) et les appressoria (5 - 10) par rapport au mycélium, avec un maximum d'expression dans les spores

8.1.2. Analyse de l'expression des gènes candidats en présence de l'aculéacine

Nous avons ensuite analysé l'expression des gènes encodant les facteurs de transcription (Figure 90) *SW14, SW16, RLM1* et *CRZ1* en présence ou en absence d'aculéacine (DI80) chez la souche



Figure 91: Modèle schématique de la régulation transcriptionelle de *MPKA* et des gènes impliqués dans la paroi cellulaire par la voie de MAP kinase MPKA chez *A. nidulans*. (TomonoriFujioka, *et al.* 2007)

sauvage *Guy11∆ku80*. D'après la Figure 90, tous les gènes encodant ces facteurs de transcription ne sont exprimés que faiblement en absence de traitement en accord avec les résultats obtenus précédemment (Figure 89). Par contre, lors d'un traitement à l'aculéacine, l'expression de MPS1 et de *SWI4, SWI6, RLM1* augmentent au moins d'un facteur de deux. Seul, l'expression de *CRZ1* ne change pas en présence de l'aculéacine. Ces résultats montrant que les facteurs de transcription de la voie Mps1 sont surexprimés en présence d'un inhibiteur de la biosynthèse de la paroi, ce qui suggère que l'activation de la voie par un stress pariétal conduit à une induction de l'expression de ces gènes. Par contre, *CRZ1* encodant le facteur de transcription de la voie de Calcineurine n'est pas surexprimé lors de l'aculéacine, suggérant que cette voie ne participe pas à directement à la réponse transcriptionelle de la cellule fongique en réponse à une traitement par l'aculéacine.

8.2. Analyse des gènes candidats cibles de la voie Mps1

Chez la levure, la cascade de signalisation MAP Kinase est activée en réponse à plusieurs stimuli environnementaux (Jung, *et al.* 1999). L'activation de cette voie conduit à l'augmentation de l'expression de nombreux gènes, en particulier des gènes codants pour des protéines de la paroi cellulaire et des enzymes impliquées dans la biosynthèse ou la modification de la paroi, y compris les β -1,3-glucane synthases (Fks1p et Fks2p) et les chitine synthases (Chs3p ; Jung et Levin, 1999). Chez *S. cerevisiae*, l'expression des 25 gènes impliqués dans l'intégrité de la paroi cellulaire, y compris, *CHS3* et *FKS1* sont dépendants du facteur de transcription *RLM1* qui est activé par *MPK1*. Parmi ces 25 gènes, on trouve des gènes encodant des protéines de la famille PIR (Protein Interaction Reporters ; Zhang, *et al.* 2009 ; Pir1, 2, 3 et Cis 3), 7 protéines à encre GPI, *BGL2* encodant une glucane β -1,3-glucosidase, *SPS100* encodant une protéine participant à la matrice glycoprotéique de la paroi (Law et Segall, 1988) et enfin une protéine mannoptransférase (Mnn1).

Chez *A. nidulans*, la cascade de signalisation MAP Kinase contrôle l'induction de l'expression des gènes encodant γ-1,3-glucane synthase (*AGSA* et *AGSB*) en réponse de micafongine (Fujioka, *et al.* 2007; Figure 91). Le gène encodant la fructose-6-phosphate amidotransferase, *GFAA* (Glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase; Smith, *et al.* 1996), dépend, partiellement de *MPKA* et de *RLMA*. Enfin, l'expression des gènes encodant les chitines (*CHSA, CHSB, CHSC, CHS7, CSMA* et *CSMB*) est indépendante de la voie de MAP kinase MPKA.

Ces résultats nous ont conduits à la recherche, chez *M. grisea*, des orthologue de ces gènes d'*A. nidulans et S. cerevisiae*, afin d'étudier les niveaux d'expressions de ces gènes en réponse à un inhibiteur de la biosynthèse de la paroi, l'aculéacine, chez la souche sauvage et chez le mutant *Guy11* Δ *ku80* Δ *mps1*.

8.2.1. Recherche des gènes candidats cibles de la voie Mps1

Nous avons choisi les gènes *FKS1, CHS1-8, CHS7, GSK, GFA1* et *AGS1* (Tableau 22), connus pour être induits lors d'un stress paroi, soit chez *M. grisea* (*AGS1*: Fujikawa, *et a.l*, 2009), soit chez *A. nidulans* (*FKS1, CHS2, GFA1*: Fujioka, *et al.* 2007). *FKS1* code la sous-unité principale de la ß-1,3-D-

glucane synthase de *M. grisea. CHS1-8* et *CHS7* encodent des chitines synthases de *M. grisea. AGS1* est le gène codant pour une α -1-3 glucane synthase chez *M. grisea* (Fujioka *et al*, 2007). *GSK1* encode pour une protéine kinase qui inactive la glycogène synthase (Cartwrigth, 2005). Son expression, chez *M. grisea* semble être sous le contrôle de *MPS1*. En effet, chez le mutant *Amps1*, *GSK3* est surexprimé, surtout, pendant un stress osmotique (Cartwrigth, 2005).

MGG	Nom	FONCTION	GENE chez	Induction par la
			<i>A. n</i>	micafongine A. n
MGG_04145.6	CHS2**	Chitine synthase	CHSA	MPS1 indépendant
		Classe II		
MGG_01802.6	CHS1**	Chitine synthase	CHSB	MPS1 indépendant
		Classe III		
MGG_09551.6	CHS3**	Chitine synthase	CHSC	MPS1 indépendant
		Classe I		
MGG_09962.6	CHS4**	Chitine synthase	CHS7	MPS1 indépendant
		Classe IV		
MGG_06064.6	CHS7**	Chitine synthase	CHS	NT
		Classe IV		
MGG_13013.6	CHS8**	Chitine synthase	CSMA, B	MPS1 indépendant
		Class V, VI		
MGG_09639.6	AGS1*	α -1,3-glucan synthase	AGSA, B	MPS1 dépendant
MGG_00865.6	FKS1****	β -1,3- glucan synthase	FKS1	MPS1 indépendant
		component		
MGG_11597.6	GFA****	glucosamine-fructose-	GFAA	MPS1 indépendant
		6-phosphate		
		aminotransferase		
MGG_07331.6	GEL1***	β-1,3-	GELA	MPS1 indépendant
		glucanosyltransferase		
MGG_06722.6	GEL2****	β-1,3-	GELB	MPS1 indépendant
		glucanosyltransferase		
MGG_12122.6	GSK***	α -glycogen synthase GSK		NT
		kinase 1		

Tableau 22: Listes des gènes cibles candidats d'après l'analyse transcriptomique réalisée chez

* : Fujikawa, *et al.* 2009

** : Odenbach, *et al.* 2009

*** : Cartwrigth, 2005

**** : Fujioka, et al. 2007

8.2.2. Réponse transcriptionelle de *M. grisea* en réponse à l'aculéacine

L'expression des gènes candidats cibles de la voie Mps1 a été mesurée chez le mutant $Guy11\Delta ku80\Delta mps1$ et chez la souche sauvage $Guy11\Delta ku80$; en présence ou non d'aculéacine (0.001 ppm) (Tableau 23). Nous avons calculés le rapport du degré d'expression pour chaque gène, chez la souche sauvage et le mutant traités et non traités.



Figure 92A : Expression des gènes chez la souche sauvage *Guy11Δku80* et le mutant *Guy11Δku80Δmps1* traités et non traités par un traitement à l'aculéacine à 0.001ppm



Figure 92B : Expression des gènes chez la souche sauvage *Guy11Δku80* et le mutant *Guy11Δku80Δmps1* traités et non traités par un traitement à l'aculéacine à 0.001ppm



Figure 92C : Expression des gènes chez la souche sauvage *Guy11Δku80* et le mutant *Guy11Δku80Δmps1* traités et non traités par un traitement à l'aculéacine à 0.001ppm

		Guy11∆ <i>ku80</i>		Guy11∆ <i>ku80</i> ∆ <i>mps1</i>		MPS1 Dépendant
Α	CHS4	1.2*	=	0.8**	=	
Α	CHS8	0.8	=	0.8	=	
A	GNA1	1.2	=	1	=	
В	CHS2	1.4	≯	0.2	\checkmark	MPS1 Dépendant
В	FKS1	1.5	≯	0.6	*	MPS1 Dépendant
В	AGS1	1.5	≯	0.7	*	MPS1 Dépendant
В	GFA1	1.75	≯	1	=	MPS1 Dépendant
В	PMC1	2.5	≯	1	=	MPS1 Dépendant
В	GSK3	1.6	≯	1.3	=	MPS1 Dépendant
С	CHS3	0.4	K	1.8	\checkmark	MPS1 Dépendant
С	CHS7	0.4	*	1.6	↗	MPS1 Dépendant
C	CHS1	0.6	K	2		MPS1 Dépendant
	MPS1	1.5	≯	0	0	

Tableau 23 : Tableau récapitulatif des degrés d'expression des gènes candidats.

*: L'expression de la souche sauvage traitée par 0.001 ppm d'aculéacine pendant 1 heure / l'expression de la souche sauvage non traitée

** : L'expression du mutant Amps1 traité par 0.001 ppm d'aculéacine pendant 1 heure / l'expression du mutant Amps1 non traitée

Ainsi, nous avons pu classifier les gènes en 3 groupes :

- A. Les gènes indépendant de *MPS1*, dont l'expression est stable en présence de l'aculéacine : Ce groupe comporte les gènes dont leur expression ne changent pas en présence d'un traitement à l'aculéacine, ni chez la souche sauvage, ni chez le mutant $\Delta mps1$: *CHS4*, *CHS8*, *GNA1*.
- B. Les gènes induits par un traitement à l'aculéacine, dont leur expression dépend de MPS1: Ce groupe comporte, tout d'abord, les gènes qui sont induits, chez la souche sauvage par un traitement à l'aculéacine. Par contre, chez le mutant, l'expression des gènes de cette catégorie sont réduits ou stables. Ce qui montre que l'expression de ces gènes est dépendante de MPS1: CHS2, GSK3, FKS1, AGS1, GFA1, PMC1.
- C. Les gènes réduits par un traitement à l'aculéacine, dont l'expression dépend de *MPS1*: Ce groupe comporte les gènes dont l'expression est réduite chez la souche sauvage, par un traitement à l'aculéacine. Par contre, leur expression est induite chez le mutant $\Delta mps1$ traité par l'aculéacine. Ainsi, les gènes de cette catégorie sont dépendants de *MPS1*: *CHS1*, *CHS3*, *CHS7*. Dans ce groupe on ne trouve que certains gènes encodant les chitines.

D'après les figures 92A, B, C, chez la souche sauvage certains gènes de la biosynthèse encodant les composants de la paroi sont surexprimés d'un facteur de 1.5 (*CHS2, FKS1, AGS1*). De plus, *GFA1*, le précurseur de la voie de biosynthèse de la paroi, est surexprimé d'un facteur de 1.75. Ces résultats

montrent que lors d'un traitement avec l'aculéacine il pourrait avoir une augmentation de la biosynthèse des composants de β -1,3 et α -1,3-glucanes et de chitines via des composants particuliers comme Chs2. Une diminution de la biosynthèse de certains chitines est observée aussi (Chs1, Chs3, CHS7). L'expression de ces gènes est réprimée chez le mutant *Amps1* traité par l'aculéacine. Ces résultats obtenus chez *M. grisea* diffèrent de ceux obtenus chez *A. nidulans* et *S. cerevisiae*. Chez *A. nidulans* lors d'un traitement par la micafongine, l'expression des gènes *FKSA, GELA, GELB*, et *GFAA* sont surexprimés chez la souche sauvage et chez le mutant *Ampka* (Fujioka, *et al.* 2007). Seule l'expression d'*AGSA* est dépendante de *MPKA* (orthologue de *MgMPS1*). Chez la souche sauvage l'expression d'*AGSA* reste stable lors du traitement, contrairement observé chez le mutant *Ampka*. Chez *S. cerevisiae* la même analyse a été réalisé par un traitement de la caspofongine, un autre inhibiteur de la biosynthèse des glucanes (Markovich, *et al.* 2004). D'après cet analyse, les gènes *FKS1, CHS4* sont surexprimés lors de ce traitement.

Ainsi, chez *M. grisea* et *S. cerevisiae* certains gènes codant des protéines de glucanes et chitines sont surexprimés lors d'un inhibiteur de la biosynthèse des glucanes. Par contre, chez *A. nidulans*, seul les gènes encodant des protéines de glucanes sont surexprimés.

IV. DISCUSSION

Ce travail a permis d'identifier et d'étudier un ensemble de gènes candidats de M. grisea participant à la cascade de signalisation MAP kinase Mps1 impliquée dans le contrôle de l'intégrité de la paroi cellulaire. Ces gènes correspondent principalement aux facteurs de transcriptions (SWI4, SWI6 et RLM1) potentiellement activés par la MAP kinase Mps1, par analogie avec la voie Slt2 de la levure S. cerevisiae. La construction de mutants nuls et l'analyse de leurs phénotypes aussi bien au niveau morphologique et pathologique qu'au niveau de leur sensibilité à des fongicides inhibant la biosynthèse de la paroi ont permis de formuler des hypothèses sur le fonctionnement de cette voie de signalisation qui ont pu être en partie vérifiées au niveau moléculaire. Cette analyse génétique a été étendue à des gènes potentiellement impliqués dans cette voie de signalisation déjà identifiés soit chez d'autres champignons filamenteux (IDC1, AGS1), soit chez les hémi-ascomycètes (ADA2, KNR4). Enfin, nous avons étudié le gène codant le facteur de transcription Crz1 impliqué dans la voie de signalisation calcium/calcineurine afin de préciser son rôle dans le contrôle de l'intégrité de la paroi. La discussion abordera tout d'abord l'analyse bioinformatique des gènes étudiés (MPS1, SWI4, SWI6, RLM1, CRZ1, AGS1, IDC1, ADA2 et KNR4). Ensuite, nous discuterons des problèmes rencontrés lors de la construction de leurs mutants de délétion respectifs par remplacement de gène. Par la suite, nous avons réalisé une analyse comparative des différents phénotypes de ces mutants, afin de discuter de leur rôle et leur importance dans cette voie de signalisation. Enfin l'analyse de l'expression différentielle de gènes candidats de cette voie chez le mutant $\Delta mps1$ et la souche sauvage en réponse à un inhibiteur de la biosynthèse de la paroi permet d'aborder une analyse des relations fonctionnelles entre les différents éléments de cette voie. A partir de ces analyses nous proposons de discuter sur l'importance de cette cascade dans le contrôle de l'intégrité de la paroi, mais aussi dans la sporulation et le pouvoir pathogène de *M. grisea.*

1. Analyse bioinformatique de la voie MAP kinase Slt2/Mps1 chez les champignons ascomycètes et hémi-ascomycètes

L'analyse bioinformatique du gène *MPS1* de *M.* grisea et ses orthologues chez d'autres espèces fongiques a permis d'identifier les domaines et acides aminés fonctionnels caractéristiques de cette famille de MAP kinase chez les ascomycètes. Nous avons recherché les facteurs de transcription qui pourraient être activés par la MAP kinase Mps1 chez *M. grisea* à partir des connaissances accumulées sur la voie la voie Slt2 de la levure (voie équivalente à la voie Mps1). Chez *S. cerevisiae* les facteurs de transcription ScSwi4, ScSwi6 et ScRlm1 sont les cibles directes de Slt2. Ainsi nous avons identifié les gènes orthologues correspondants chez *M. grisea* : *MgSWI4, MgSWI6* et *MgRLM1.*

Ensuite nous nous sommes intéressés à des gènes impliqués dans cette voie de signalisation mais qui ne sont pas des cibles directes de *MPS1* ou des facteurs de transcriptions *SWI4* et *RLM1*. Nous avons identifié les gènes *de M. grisea* orthologues de *ADA2, IDC1* et *KNR4* qui interfèrent avec la voie de signalisation impliquée dans l'intégrité de la paroi cellulaire respectivement chez *Candida albicans*

				IDC1	AGS1	MPS1
Ascomycete	Pezizomycotina	Eurotiomycete	Aspergillus nidulans Aspergillus oryzae	+++	+++++	++++
		Dothideomycete	Mycosphærella græminicolla Stagonospora nodorum	+ +	+ +	+ +
		Sordariomycete	Chaetomium globosum Fusarium graminearum Magnaporthe grisea Neurospora crassa Podospora anserina Trichoderma reesei	+ + + + +	+ + + +	+ + + + +
		Leotiomycete	Sclerotinia sclerotiorum	+	+	+
	Saccharomycotina		Saccharomyces cerevisiae Yarrowia lipolytica	1	1	+
	Taphrinomycotina		Schizosaccharomyces pombe	-	+	+
Aasidiomycete F	Agaricomycotina		Coprinus cinereus Laccaria bicolor	1	+	+
	Pucciniomycotina		Puccinia graminis	-	+	+
	Ustilaginomycotina		Ustilago maydis	-	+	+
Other			Batrachochytrium dendrobatidis Phycomyces blakesleeanus	1	+ +	+

Figure 93 : Présence d'*IDC1, AGS1* et *MPS1* chez différentes espèces de champignons : Cette figure est réalisée d'après les blasts réalisés sur le site du NCBI et d'après le site de « http://embg.igmors.u-psud.fr/cfog ». + : Présence du gène ;

- : Absence du gène.

(*ADA2*, adaptateur impliqué dans la cascade de l'intégrité de la paroi ; Chamilos G. *et al.* 2009) ; *Podospora anserina (IDC1*, voie PaMPK1 équivalente à Mps1 ; Jamet-Vierny C. *et al.* 2007) et *Saccharomyces cerevisiae (KNR4*, régulateur impliqué dans la cascade de l'intégrité cellulaire et dans le point de contrôle de la morphogenèse ; Adilia Dagkessamanskaia *et al.* 2010).

Par la suite, nous avons recherché le gène *MgAGS1*, à l'aide de la séquence du gène *AGS2* d'*Aspergillus fumigatus* (A. Beauvais, *et al.* 2005), dont l'expression dépend de la MAP kinase Mpk1 (voie équivalente à la voie Mps1). Ce gène est un des cibles des facteurs de transcription activés par la voie Mps1/Slt2/Mpk1 (Fujioka, *et al.* 2007). Bien que ce type d'enzymes soit encodé par des gènes paralogues chez la plupart des ascomycètes, nous n'avons identifié qu'un seul gène dans le génome de *M. grisea*. Cette situation est favorable à l'utilisation d'une approche génétique pour étudier le rôle de *MgAGS1* dans la réparation de la paroi de *M. grisea*.

Nous avons vérifié que toutes les protéines correspondantes possèdent bien tous les domaines fonctionnels identifiés dans les espèces chez lesquels ils ont été décrits. Nous avons ainsi montré que les gènes *MPS1, SWI4, SWI6, RLM1, CRZ1, KNR4* et *ADA2* sont présents chez tous les Pezizomycotina, Saccharomycotina et Taphyrinomycotina (Figure 93). Cette distribution suggère que les fonctions cellulaires associées à ces gènes soient conservées chez les champignons. Par contre, les gènes *IDC1* et *AGS1* ont une distribution discontinue au sein des espèces fongiques. Ainsi, le gène *AGS1* codant pour une enzyme de la biosynthèse des α -1,3 glucanes, est présent chez tous les Pezizomycotina et Basidiomycotina analysé et absent chez les Saccharomycotina. La présence paralogue d'*AGS1* chez les Taphrinomycotina (*S. pombe*; Alina Vos *et al.* 2007) suggère que ce gène ait été perdu spécifiquement chez les Saccharomycotina (Figure 93). Le gène *IDC1* codant pour une protéine nécessaire à la localisation de PaMpk1 dans le noyau, n'existe pas chez les Saccharomycotina et les Taphrinomycotina, ce qui suggère que cette fonction cellulaire n'existe que chez les Pezizomycotina.

Au cours de l'évolution des champignons, les gènes de cette voie de signalisation Slt2/Mps1 présentent un degré de conservation très variable suivant leur place dans la voie (Rispail, *et al.* 2009). Ainsi les récepteurs membranaires sont les moins conservés. Mid2 et Zeo1 ne sont présents que les Saccharomytina, alors que Wsc1, 2, 3 ne sont présents que chez les Pezizomycotina. La machinerie (toutes les protéines participants à cette voie de signalisation comme les activateurs, les modulateurs phosphatases, les effecteurs et les cibles des effecteurs) et le module de MAP kinase (Bkc1, Mkk1, Slt2) sont très conservés chez les différentes espèces de champignons étudiés, ainsi que les facteurs de transcription. Enfin, les cibles des facteurs de transcription présentent un degré de conservation moins conservées. Nous avons montré qu'*AGS1* dont l'activation au niveau transcriptionelle dépend de *MPS1* n'est présent que chez les Pezizomycotina et les Taprinamycotina (absent chez les Saccharomycotina). De plus *AGS1* et *FKS1* ont une ou plusieurs copies, selon l'espèce. Pst1 n'est pas présente chez les Basidiomycètes. Cette observation peut être étendue aux éléments régulant cette voie comme le gène *IDC1* qui n'est présent que chez les Pezizomycotina.



Figure 94 : Schéma de la cascade de signalisation Mpk1/Slt2 et la cascade de calcium : Les champignons analysés sont : *Saccharomyces cerevisiae, Ashbya gossypii* et *Candida albicans* (saccharomycotina), *Schizosaccharomyces pombe* (taphrinomucotina), *Aspergillus fumigatus, Fusarium graminearum, Magnaporthe grisea* et *Neurospora crassa* (sordariomycètes), *Rhizopus oryzae* (zygomycetes) et *Ustilago maydis* (basidiomycètes). Code couleur : Bleu: Les protéines détectées chez toutes les espèces ; Vert : Les protéines détectées chez toutes les espèces sauf les zygomycètes ; Orange : Les protéines détectées chez toutes les espèces sauf les zygomycètes et les taphrinomucotina ; Rouge : Les protéines détectées chez toutes les espèces sauf les espèces sauf les sordariomycètes ; Violet : Les protéines détectées seulement chez les ascomycètes ; Jaune : Les protéines détectées seulement chez les ascomycotina (Rispail *et al.*, 2009)

(Alic, et *al.* 2003; Staleva, *et al.* 2004), même si elle ne gère pas la réponse face au stress oxydatif. Chez M. grisea cette voie a un rôle dans l'intégrité de la paroi, la pathogénie et la sporulation.

On connaît certaines des cibles directes de cette voie dont *RLM1* (Jung *et al.* 2002), ainsi que *SWI4* (Baetz et Anrews, 2001) et *SWI6* (Ho, *et al.* 1999). Les mutants $\Delta ScrIm1$ sont sensibles à la caféine et présentent une résistance accrue au Calcofluor White (CW) et à la zymolyase 100T, deux agents qui affaiblissent la paroi cellulaire (Dodou et Treisman, 1997). Finalement, les mutants $\Delta Scswi4$ lysent à 37° C et ce phénotype est corrigé par l' ajout de sorbitol 1M dans le milieu. Ils sont de plus sensibles à la présence de CFW ou de SDS dans le milieu (Igual *et al.*1996). Ainsi, chez *S. cerevisiae RLM1* a un rôle plus important que *SWI4*, dans l'intégrité de la paroi. Par contre, chez *M. grisea* les phénotypes du mutant $\Delta swi4$ sont plus importants que ceux du mutant $\Delta rlm1$.

De ce fait, les rôles majeurs de cette voie de signalisation Slt2/Mps1 chez ces deux espèces sont communs. Par contre l'implication des facteurs de transcription diffère selon *M. grisea* ou *S. cerevisiae*.

3. L'importance de la voie de signalisation Mps1 chez *M. grisea* chez les ascomycètes

Chez les hémi-ascomycètes, deux voies de signalisation sont impliquées dans la réparation de la paroi fongique en réponse à un stress : la voie de signalisation Slt2/Mps1 et la voie de impliquant la Calcineurine. Chez les champignons filamenteux ces deux voies sont aussi impliquées dans la réparation de la paroi que dans la sporulation des champignons filamenteux, et dans le pouvoir pathogène de certains champignons filamenteux vis-à-vis des plantes mais pas dans le pouvoir pathogène vis-à-vis des animaux.

Cependant les phénotypes des mutants du gène homologues de *MPS1*, chez différents champignons ont été étudiés. Même si le gène est très bien conservé chez différentes espèces, les phénotypes diffèrent selon l'espèce (Tableau 35).

obtenus un pourcentage de mutants de délétion supérieur à celui couramment observé chez *M. grisea* en l'absence de la mutation $\Delta ku80$ (5%, Villalba *et al.* 2007). Cependant, ces pourcentages restent variable (16-100 %) en fonction du gène analysé (Tableau 24), suggérant des variations dans les niveaux de recombinaison suivant les loci.

Souche	Transformants	Mutants nuls	Pourcentage de mutants nuls
Guy11∆ku80∆swi6	55	1	2%
Guy11∆ku80∆rlm1	8	7	88%
Guy11∆ku80∆crz1	61	5	8%
Guy11∆ku80∆ags1	20	11	55%
Guy11∆ku80∆ada2	12	2	16%
Guy11∆ku80∆idc1	17	8	47%
Guy11∆ku80∆knr4	50	0	0
<i>P1.2Δku80Δmps1</i>	4	4	100%
Guy11∆ku80∆mps1	12	8	67%
P1.2∆ku80∆swi4	4	1	25%
Guy11∆ku80∆swi4	30	0	0

Tableau 24 : Pourcentage d'obtention de mutants de délétion des gènes *MPS1, SWI4, SWI6, RLM1, CRZ1, KNR4, ADA2, IDC1* et *AGS1* chez *M. grisea*

Nous n'avons obtenu qu'un ou aucun mutant à trois loci (*KNR4, SWI4, SWI6*). Ainsi, nous n'avons pas pu obtenir de mutants de délétion pour le gène *KNR4*. Cela peut avoir deux raisons. Tout d'abord, la mutation pourrait être létale. Cependant, l'obtention d'un mutant nul *Δknr4* chez *S. cerevisiae* (Martin-Yken H, *et al.* 2003) démontre que ce gène n'est pas essentiel pour la survie chez cette espèce. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que la délétion de ce gène n'est pas létale chez *M. grisea*. Alternativement, nous pouvons supposer que le locus *KNR4* est réfractaire au remplacement de gène. Ce phénomène a déjà été observé à un autre locus de *M. grisea* (*ACE1*, Collemare *et al.* 2007). Le locus du *KNR4* pourrait avoir une capacité réduite pour la recombinaison homologue qui ne peut être améliorée par l'absence de la voie de réparation « NHEJ » d'ADN.

Dans le cas du gène *SWI4* nous n'avons réussi à obtenir un seul mutant que chez la souche parentale *P1.2\Deltaku80* et aucun chez la souche *Guy11\Deltaku80*. Ce phénomène pourrait être expliqué de deux façons. Tout d'abord, la délétion de ce gène pourrait être létale mais uniquement chez la souche *Guy11\Deltaku80 de M. grisea*. Une telle différence entre les souches Guy11 et P1.2 est peu probable car nous n'avons observé de copie supplémentaire de Swi4 chez P1.2 d'après les analyses de PCR.

Alternativement, le locus de *SWI4* pourrait être réfractaire au remplacement de gènes avec des variations quantitatives suivant les souches. Cette deuxième hypothèse est la plus vraisemblable.

Enfin, la fréquence de remplacement des gènes *SWI6* et *CRZ1* est très basse même si nous avons utilisé la souche *Guy11\Deltaku80*. Comme des mutants ont été obtenus, malgré la basse fréquence, seul, un locus à une capacité réduite pour une recombinaison homologue pourrait expliquer ce phénomène.

Chez les champignons, la fréquence de remplacement de gène cible varie considérablement selon le locus (P. Hasty *et al.* 2004). Ces variations peuvent être liées aux propriétés spécifiques du locus qui pourraient empêcher ou stimuler la recombinaison homologue, localement. En particulier, les différences de structure de la chromatine pourraient modifier l'accessibilité des protéines nucléaires selon l'ADN, affectant localement l'efficacité de la réparation des coupures d'ADN de double- brin et la recombinaison homologue (J.D. Moore et J.E. Krebs, 2004).

3. Analyse phénotypique des mutants des gènes candidats de la voie de signalisation Mps1 chez *M. grisea* (Morphologie et Sporulation)

3.1. L'analyse morphologique du mutant *Amps1*

Le mutant *Guy11* Δ *mps1* déjà obtenu (Jin-Rong Xu, *et al.* 1998) a une croissance semblable à celle de la souche sauvage. Cependant, ce mutant a une réduction très importante des hyphes aériens, et de sa sporulation (-99%). Les colonies du mutant Δ *mps1* montrent aussi une autolyse progressive, commençant par la partie centrale de la colonie qui est supprimée par le sorbitol. En se basant sur ces résultats, l'analyse phénotypique du mutant *Guy11* Δ *ku80* Δ *mps1*, obtenu dans le laboratoire, a été réalisée.

Les deux mutants, obtenus indépendamment, dans deux laboratoires avec des souches stocks GUY11 différentes, montrent les mêmes phénotypes. Cependant, les mutants que nous avons obtenus (*Guy11∆ku80∆mps1* et *P1.2∆ku80∆mps1*), ne sporulent pas, alors que le mutant de Xu, *et al.* sporule très légèrement. Cette différence entre ces mutants *Δmps1* pourrait, tout d'abord, provenir de l'utilisation, dans notre cas, de la souche *Δku80*. Cependant, nous avons complémenté le mutant *Guy11∆ku80∆mps1* avec l'ORF de *KU80*. Le nouveau mutant *Guy11∆ku80∆mps1* ne sporule pas comme le mutant *Guy11∆ku80∆mps1*. Ainsi, la différence n'est pas causée par la délétion du gène *KU80*. La deuxième hypothèse est l'utilisation de deux stocks différents de Guy11, donc, cela pourrait être du un effet de background. Enfin, l'utilisation de différentes conditions de cultures et différents milieux pourrait être la réponse de la différence de sporulation. Afin de valider cette hypothèse, un test de culture et de sporulation, du mutant de Xu, *et al.* dans les conditions de notre laboratoire pourrait être efficace (Tableau 25).
Mutant	Obtenu par	Sporulation	Mélanisation	Croissance	Pathogénie
		СМ			
<i>Guy11Δku80Δmps1</i>	Jin-Rong Xu, <i>et al.</i>	-99%	Absence	+	Absence
<i>Guy11∆ku80∆mps1</i>	Cemile	Absence	Absence	+	Absence
<i>Р1.2∆ku80∆mps1</i>	Cemile	Absence	Absence	+	Absence

Tableau 25 : Tableau récapitulatif des phénotypes du mutant Amps1 obtenu dans deux différents laboratoires

3.2. Analyse morphologique des mutants cibles de MPS1

La morphologie de tous les mutants obtenus a été analysée. Nous avons divisés en deux groupes les mutants obtenus : Les mutants nuls des facteurs de transcription *SWI4, SWI6, RLM1* et les mutants nuls des modulateurs *AGS1, ADA2, IDC1* et du facteur de transcription *CRZ1*. Nous avons étudié la différence de leur morphologie entre eux et avec le mutant $\Delta mps1$. Le tableau 26 montre les phénotypes observés.

Souche	Morphologie mycélium aérien	Croissance mycélium	Mélanisation mycélium	Sporulation	Morphologie des spores	Арр
<i>Guy11Δku80Δmps1</i>	0	+	-	0	+	+
P1.2Δ ku80Δmps1	0	+	-	0	+	+
Guy11∆ ku80∆swi6	+	Arrêt de croissance tardif	+	(-60 %)	+	+
P1.2Δ ku80Δswi4	Réduction	+	+	(-95%)	+	+
<i>Guy11∆ ku80∆rlm1</i>	+	+	+	(-90%)	+	+
Guy11∆ ku80∆crz1	+	+	+	(-20%)	+	+
<i>Guy11∆ ku80∆ags1</i>	+	(- 10 %)	-	(-70%)	+	+
Guy11∆ ku80∆ada2	+	+	+	(-20%)	+	+
Guy11∆ ku80∆idc1	+/-	+	+	(-50%)	+	+

Tableau 26: Tableau récapitulatif de la morphologie et de la croissance des mutants : App : Appressorium ; + : Phénotype identique à la souche sauvage ; 0: Absence mélanisation ; +/- : forte diminution ; - : faible diminution

3.2.1. Phénotype des mutants nuls des facteurs de transcription SWI4, SWI6 et RLM1

Les mutants *Guy11∆ku80∆mps1* et *P1.2∆ku80∆mps1* présentent d'importantes altérations de leur morphologie mycélium, leur mélanisation et de leur sporulation

Les mutants $\Delta swi4$, $\Delta swi6$ et $\Delta rlm1$ ne présentent des altérations morphologiques ou développementales aussi importantes que $\Delta mps1$. Cependant, le mutant $\Delta swi4$ est celui qui ressemble le plus à $\Delta mps1$ (réduction du mycélium aérien, diminution de la sporulation de 95%). Les phénotypes du mutant $\Delta swi6$ sont très différents de $\Delta mps1$. En effet, il présente un phénotype, qui n'est pas observé chez $\Delta mps1$, qui correspond à un arrêt de croissance tardif du mycélium (5-6 jours) sans modifications morphologiques. Enfin, le mutant $\Delta rlm1$ est très altéré dans la sporulation (diminution de 90%), comme les mutants $\Delta swi4$ et $\Delta mps1$ mais la ressemblance avec ces mutants est limitée à ce phénotype.

Mutant	Obtenu par	Sporulation	Mélanisation	Croissance
∆Mgrlm1	Cemile	Réduction	+	+
∆Mgmps1	Cemile	Absence	Absence	+
∆Anrlma	Fujioka, et al.	+	+	+
	2007			
∆Anmpka	Valiante, <i>et</i>	+	Réduction	Réduction
	<i>al.</i> 2007			

Tableau 27: Tableau récapitulatif des phénotypes des mutants Δ*rlm1* et Δ*mps1* chez *A. nidulans* et *M. grisea*

Chez *A. nidulans*, le mutant Δ *Anrlma* sporule normalement comme le mutant Δ *Anmpka* (Fujioka, *et al.* 2007). Ainsi, chez *A. nidulans*, la cascade de signalisation de Mpka (orthologue de Mps1/Slt2) ne joue pas un rôle important dans la sporulation (Tableau 27).

Cette analyse montre que les mutants correspondants aux facteurs de transcription potentiellement activés par Mps1 (Swi4, Swi6, Rlm1) ne présentent qu'une partie des altérations du mutant $\Delta mps1$. Ces données suggèrent que ces protéines ne contrôlent qu'une partie des fonctions cellulaires dépendantes de la voie Mps1. Ainsi, Swi4 serait le seul facteur de transcription de cette voie à contrôler des fonctions associées à la morphogenèse (hyphes aériens). Par ailleurs, aussi bien Swi4 que Rlm1 contrôleraient des fonctions impliquées dans la sporulation. Enfin, Swi6 serait principalement impliqué dans le contrôle d'autres fonctions cellulaires que celles dépendants directement de la voie Mps1. Celles-ci pourraient être impliquées dans l'induction de la sénescence (*e.g.* arrêt de la croissance mycélienne à 6 jours sans mort cellulaire). Dans le cadre de cette hypothèse, le mutant $\Delta swi6$ présenterait une sénescence précoce par rapport à une souche sauvage (pas d'arrêt de croissance pendant au moins 15 jours).

Chez la levure, les deux protéines Swi4 et Swi6 forment un complexe SBF nécessaire à l'activité de régulateur transcriptionel de Swi4 (Kim, *et al.* 2010). En utilisant la technologie de double-hybride, il a

été démontré que Swi4 et Swi6 interagit avec Mps1, suggérant l'existence d'un complexe SBF (Carltwrith, 2005). Cependant les phénotypes des mutants $\Delta swi4$ et $\Delta swi6$ sont très différents. En effet, ils ne sont ni similaires, ce qui serait le cas si Swi6 était un co-activateur agissant en coopération avec Swi4, ni opposé si Swi6 était un régulateur négatif du Swi4. Il est donc peu probable que les phénotypes des mutants $\Delta swi4$ et $\Delta swi6$ proviennent du dysfonctionnement d'un complexe Swi4/Swi6. Les phénotypes du mutants $\Delta swi4$ proviendraient vraisemblablement de l'absence de l'action de Swi4 sur les promoteurs de ses gènes cibles, indépendamment de Swi6, comme cela a été déjà montré pour gène cibles de Swi4 chez la levure.

3.2.2. Phénotypes des mutants nuls des modulateurs *AGS1, IDC1, ADA2* et du facteur de transcription *CRZ1*

Le mutant $Guy11\Delta ku80\Delta idc1$ présente une faible réduction des hyphes aériens et une faible réduction de sa sporulation. Ces phénotypes ressemblent à ceux du mutant *Amps1*, mais ils sont quantitatifs et beaucoup moins altérés. Ces résultats montrent que MgIDC1 n'est pas strictement indispensable au fonctionnement de la voie Mps1, car les phénotypes du mutant nul $\Delta idc1$ ne reproduisent que partiellement ceux du mutant *Amps1*. Ces résultats sont différents de ceux obtenus chez *P. anserina.* Les phénotypes du mutant $\Delta Paidc1$ son identique à ceux du mutant $\Delta Pampk1$ (orthologue de MPS1, chez P. anserina) (Corinne Jamet-Vierny, et al. 2007). Cependant, leur phénotypes, chez M. grisea, ne sont que quantitatifs. Ainsi, chez M. grisea, il pourrait exister d'autres gènes responsables de la localisation dans le noyau de MPS1. Chez P. anserina, PaNOX1, encodant une NADPH oxidase, joue un rôle dans la localisation nucléaire de PaMpk1 en parallèle d'IDC1 (Malagnac, *et al.* 2004). Ainsi, le mutant Δ*Panox1*, chez *P. anserina*, présente les mêmes phénotypes (Tableau 28) que les mutants $\Delta Pampk1$ et $\Delta Paidc1$ (Absence de pigmentation et hyphes aériens, stérilité féminine, incapacité de l'interférence et de développer Crippled Growth) (Malagnac et al. 2004). Chez M. grisea, NOX1 pourrait être responsable de la localisation dans le noyau de MPS1. Cependant les mutants $\Delta nox1$ et $\Delta nox2$, ne présentent pas les phénotypes du mutant $\Delta mps1$ (Martin J. Egan, et al. 2007) et ils sporulent normalement. Ainsi, l'hypothèse de l'implication de NOX1 et IDC1 dans la localisation nucléaire du MPS1, chez M. grisea, semble restreinte à MgIdc1 et ceci de manière quantitative. Afin de trouver les gènes impliqués dans la localisation nucléaire de Mps1, une expérience de recherche de ses interactants par un double hybride on Tap tag pourrait être réalisé.

Mutant	Obtenu par	Sporulation	Mélanisation	Croissance	Crippled growht
∆Mgidc1	Cemile	-%55	Réduction	+	
∆Mgmps1	Cemile	Absence	Absence	+	
∆Paidc1	Jamet-	NT	+	+	Présence
	Vierny, <i>et al.</i>				
∆Pampk1	Kicka, <i>et al.</i>	NT	Réduction	+	Présence
	2006				

Tableau 28: Tableau récapitulatif des phénotypes des mutants *Aidc1* et *Amps1* chez *P. anserina* et *M. grisea*

Le mutant $\Delta ags1$ de *M. grisea* présente une diminution importante de sa sporulation (diminution de 70%) et de la mélanisation du mycélium, sans diminution de la formation de ses hyphes aériens. Ces phénotypes ne représentent qu'une partie de ceux du mutant $\Delta mps1$ et sont quantitativement moindre que ceux des mutants $\Delta rlm1$ et $\Delta swi4$. Ces résultats suggèrent que *MgAGS1* ne serait pas impliqué dans la formation des hyphes aériens, et pourrait jouer un rôle quantitatif dans la mélanisation et la sporulation. Il existe trois *AGS* Chez *A. fumigatus*: *AGS1*, *AGS2* et *AGS3* (Tableau 29). Les mutants des deux premiers gènes d' *A. fumigatus*, présentent une réduction de leur sporulation comme le mutant $\Delta Mgags1$. Cependant le mutant $\Delta Afags3$ ne présente pas de réduction de sporulation. Ainsi, *AfAGS1* et 2 seraient impliqués dans la sporulation chez *A. fumigatus* comme *MgAGS1* chez *M. grisea*.

Mutant	Obtenu par	Sporulation	Mélanisation	Croissance	Morphologie hyphale
∆Mgags1	Cemile	Réduction	+	+/-	+
∆Mgmps1	Cemile	Absence	Absence	+	Absence
∆Afags1	A. Beauvais, <i>et</i> <i>al.</i> 2004	Réduction	+	+	+/-
∆AfAgs2	A. Beauvais, <i>et</i> <i>al.</i> 2004	Réduction	+	+	+/-
∆Afags3	<u>Maubon , <i>et al.</i></u> 2006	+	+	+	+
∆Afmpka	Valiante, <i>et al.</i> 2007	+	Réduction	Réduction	Réduction

Tableau 29 : Tableau récapitulatif des phénotypes des mutants *Aags1* et *Amps1* chez *A. fumigatus* et *M. grisea*

Enfin, les deux mutants $\Delta ada2$ et $\Delta crz1$ ne présentent aucun des phénotypes du mutant $\Delta mps1$ au niveau de leur morphologie et de leur sporulation, ce qui suggère qu'ils n'interfèrent pas avec la voie Mps1 pour le contrôle de ce type de fonctions cellulaires.

4. Analyse phénotypique des mutants des gènes candidats de la voie de signalisation Mps1 de *M. grisea* (Modification de la paroi)

4.1. Effet des inhibiteurs sur le mutant Δmps1

La sensibilité des différents mutants aux inhibiteurs des β -1,3-glucane synthases (aculéacine, caspofongine) et des chitines synthases (nikkomycine) a été mesurée par l'inhibition de leur croissance mycélienne en présence d'une gamme de concentration de ces fongicides. En effet, la voie de MAP kinase Slt2/Mps1 est impliquée dans la réparation de la paroi chez les champignons (Fujikawa T. *et al.* 2009 ; Levin, 2005).

En effet, il a été montré, chez *S. cerevisiae* (Garcia, *et al.* 2004) et *C. albicans* (Federico Navarro-Garcia, *et al.* 1998), que l'inactivation de la cascade de signalisation de l'intégrité cellulaire conduit à une hypersensibilité spécifique des mutants $\Delta slt2$ de ce type d'inhibiteurs. Chez *C. albicans*, le mutant $\Delta mkk1$ (Orthologue de SLT2) présente une hypersensibilité de 800 fois à la nikkomycine et d' un facteur de 10 fois à la caspofongine. Chez *S. cerevisiae*, le mutant $\Delta slt2$ présente une hypersensibilité de 4 fois à la caspofongine (Cristina Reinoso-Martín, *et al.* 2003). Le mutant $\Delta mps1$ de *M. grisea* n'est que 2 à 3 fois plus sensible à l'aculéacine et à la nikkomycine que la souche sauvage correspondante, et il n'est pas plus sensible à la caspofongine que la souche sauvage. Ainsi, au contraire des résultats obtenus avec les mutants $\Delta slt2/mps1$ chez des champignons hémi-ascomycètes, nous n'avons pas observé d'hypersensibilité nette du mutant $\Delta mps1$ à l'aculéacine, la nikkomycine et la caspofongine.

Par contre nous avons pu mettre en évidence une hypersensibilité du mutant $\Delta mps1$ de *M. grisea* à un mélange de la nikkomycine et de l'aculéacine. Ainsi, la croissance de mutant $\Delta mps1$ est totalement inhibée à des concentrations d'un mélange inhibant la souche sauvage à 20% (DI20). La diminution d'un facteur 3 de ces concentrations conduit à une forte inhibition du mutant $\Delta mps1$ (-70%), alors que la souche sauvage n'est pas du tout inhibée à ces concentrations.

Les polysaccharides constitutifs majeurs de la paroi cellulaire de *M. grisea* sont α et β -(1-3) glucanes et la chitine. Ainsi, un traitement avec un mélange de l'aculéacine et de la nikkomycine pourrait bloquer la synthèse de la paroi. L'absence de l'hypersensibilité de la souche sauvage à ce mélange pourrait démontrer que chez *M. grisea*, il existe une autre voie qui contrôle la réparation de la paroi. Cependant, le traitement avec l'aculéacine (inhibiteur de glucane synthase) ou la nikkomycine (inhibiteur de chitine synthase) pourrait inhiber complètement le mutant *Amps1*, chez qui le mécanisme de la réparation de la paroi n'est pas fonctionnel. La résistance du mutant en présence d'un inhibiteur laisse supposer qu'il pourrait exister, chez *M. grisea*, un mécanisme de compensation entre chitine et glucane synthase. D'ailleurs, Il a été démontré, chez *S. cerevisiae* qu'il existe un mécanisme de compensation chez les Saccharomycotina (Arthur F. J. Ram, *et al.* 1998), concernant la régulation de la synthèse de glucane et de chitine dans la paroi cellulaire. Il a été démontré, dans cet article, qu'un stress concernant ces composants activait la cascade de signalisation de l'intégrité cellulaire. Chez *C. albicans*, il a été observé que chez les souches résistantes à la caspofongine, il existe un mécanisme de compensation de la paroi cellulaire avec une augmentation forte de la chitine. La synthèse accrue de chitine a déjà été associée à une réduction de la susceptibilité à la caspofongine (Stevens, 2006) ;



Figure 95: Schéma récapitulatif des fonctions des gènes analysés, dans la réparation de la paroi, en présence d'un mélange d'inhibiteur (Aculéacine – Nikkomycine): La largeur de la flèche indique le degré de l'implication du gène.

(Louise A. Walker *et al.* 2008). Il a été aussi montré (Sandovsky-Losica, *et al.* 2008) que la caspofongine et la nikkomycine ont un effet synergique sur la croissance et la viabilité de *C. albicans.* En effet, la MIC (la quantité minimale nécessaire pour commencer à inhiber la croissance, DI100) de *C. albicans* pour la caspofongine est de 0,26 mg/L et la MIC pour la nikkomycine est de 10,4 mg/L. Lors d'un mélange caspofongine avec la nikkomycine, la MIC des deux inhibiteurs chute à 0,006mg/L pour la caspofongine (1/50 de la MIC caspofongine seule) et à 1,9mg/L pour la nikkomycine (1/10 de la MIC nikkomycine seule). Ainsi, l'hypersensibilité au mélange de la nikkomycine (inhibiteur de chitine synthase) et de l'aculéacine (inhibiteur de glucane synthase) pourrait être expliquée par une telle compensation chez *M. grisea*.

4.2. Effets des inhibiteurs sur les autres mutants

Le mélange «Aculéacine – Nikkomycine » a été aussi testé sur les différents mutants des gènes candidats de la voie Mps1, afin d'évaluer leur rôle dans les processus de la réparation de la paroi chez *M. grisea* (Tableau 30). Parmi ceux-ci, seuls les mutants $\Delta swi4$, $\Delta rml1$ et $\Delta idc1$ sont hypersensibles à ce mélange d'inhibiteurs. Le mutant $\Delta swi4$ est aussi hypersensible à ce mélange (-100%) que le mutant $\Delta mps1$, mais le niveau d'hypersensibilité des mutants $\Delta rml1$ et $\Delta idc1$ est moindre (-60 à 70%) que celui du mutant $\Delta mps1$ (Figure 95). Ainsi, *SWI4* mais aussi *RLM1* et *IDC1* semblent jouer un rôle important dans le contrôle de l'intégrité de la paroi cellulaire en réponse à l' inhibition de la biosynthèse de la chitine et de β -(1-3) glucanes.

Souche	Aculéacine DI20	Nikkomycine DI20	Acu-Nikko
<i>Guy11∆ku80Guy11</i>	18%	18%	25%
Guy11∆ku80∆mps1	27%	18%	100%
P1.2∆ku80∆mps1	27%	18%	100%
P1.2∆ku80∆swi4	10%	58%	100%
Guy11∆ku80∆idc1	20%	25%	70%
Guy11∆ku80∆rlm1	0%	22%	60%
Guy11∆ku80∆ada2	22%	22%	42%
Guy11∆ku80∆swi6	7%	35%	40%
Guy11∆ku80∆crz1	0%,	30%	35%
Guy11∆ku80∆ags1	20%	25%	25%

Tableau 30: Tableau récapitulatif de pourcentage d'inhibition au mélange de l'aculéacine, 0.001 ppm et de la nikkomycine, 0,1 ppm »

Le mutant $\Delta ags1$ n'est pas hypersensible ni à l'un des inhibiteurs ni au mélange d'inhibiteurs. Ce résultat est contradictoire avec l'hypothèse d'un contrôle de l'expression de ce gène par la voie de signalisation Mps1 (Fujikawa, *et al.* 2009). Ce résultat pourrait être interprété de deux façons. Il

pourrait exister un autre gène responsable de la biosynthèse des α -(1-3) glucanes chez *M. grisea*. Chez A. fumigatus, trois gènes AGS (AGS1, 2 3) ont été muté (Beauvais, et al. 2004). Le mutant ΔAfags1 présente une réduction signifiante en α -(1-3) glucane dans sa paroi cellulaire. Par contre les mutants $\Delta A fags 2$ et $\Delta A fags 3$ ne présentent aucune modification de leur teneure en α -(1-3) glucane. Seul *AAfags1* est hypersensible aux inhibiteurs de la paroi comme la nikkomycine et Congo red. Ainsi, il a été supposé qu'il existait un mécanisme de compensation entre les AGS1, 2 et 3 (Maubon, et al. 2006). Chez *M. grisea* un seul gène *AGS1* a été identifié. Dans le cadre de cette hypothèse, il postulerait ayant une telle activité, mais différent des gènes AGS, comme par exemple des α -(1-3) glucane like. Le génome de *M. grisea* pourrait comportait un deuxième gène *AGS*, pas identifié encore. Il pourrait aussi exister d'autres protéines, responsables de la synthèse de glucane. Pour vérifier cette hypothèse, une analyse de l'activité des α -(1-3) glucanes et une étude sur la composition de la paroi, chez le mutant $\Delta ags1$ pourrait être nécessaire. La réalisation d'une analyse biochimique chez le mutant $\Delta ags1$ afin de quantifier la quantité des sucres pourrait élucider son implication dans la synthèse des glucanes. Cette analyse pourrait, de même, démontrer la présence d'autres AGS ainsi que d'autres protéines responsables de la synthèse des glucanes. Il pourrait exister une deuxième hypothèse aussi. Les α -(1-3) glucanes pourrait ne pas être impliqués dans la réparation de la paroi comme observé chez A. fumigatus.

4.3. Altération de la paroi des mutants en présence du glucanex

Un test de protoplastisation a été réalisé sur les différents mutants afin de comparer la cinétique de protoplastisation lors d'un traitement par le glucanex qui correspond à une mélange d'enzyme de dégradation dans la paroi fongique (1g/100ml).

	Tp50 mutant /	
	Tp50 sauvage	Sensibilité au glucanex
<i>Guy11Δku80Δmps1</i>	50%	2X HS
Guy11∆ku80∆swi6	50%	2X HS
Guy11∆ku80∆ags1	50%	2X HS
Guy11∆ku80∆idc1	50%	2X HS
Guy11∆ku80∆rlm1	100%	Retardé temps courts
P1.2Δku80Δswi4	50%	2X HS
Guy11∆ku80∆crz1	200%	2X R

Tableau 31 : Cinétique de protoplastisation des mutants. Le pourcentage est calculé avec le Tp50 des mutants par rapport à Tp50 de la souche sauvage. HS : Hypersensible ; Tp50 : temps correspondant à la formation de 50% des protoplastes

D'après le calcul de Tp50 (Temps nécessaire pour la production de 50% des protoplastes), il existe une différence entre le mutant $\Delta mps1$ et la souche sauvage *Guy11* $\Delta ku80$. La production de

protoplastes chez le mutant $\Delta mps1$ est deux fois plus rapide (Tableau 31). Ceci démontre que la paroi des mutants $\Delta mps1$ est très sensible aux enzymes de dégradation présents dans le glucanex. Cette propriété suggère que la structure et la composition de la paroi du mutant $\Delta mps1$ soient modifiées par rapport à la souche sauvage.

La même expérience a été réalisée sur les autres mutants aussi. D'après les calculs de Tp50, dans les mutants de facteurs de transcription cibles de *MPS1*, seul les mutants $\Delta swi6$ et $\Delta swi4$ montrent la même sensibilité au glucanex. Ainsi, *SW16* et *SW14* semblent avoir un rôle important dans la réparation de la paroi en présence des enzymes de dégradation.

Les mutants $\Delta idc1$ et $\Delta ags1$ sont deux fois plus hypersensibles que la souche sauvage à l'enzyme de dégradation, le glucanex comme le mutant $\Delta mps1$. Le mutant $\Delta idc1$ a aussi une hypersensibilité de 70% pour le mélange d'inhibiteur aculéacine – nikkomycine. Ces deux résultats démontrent qu'*IDC1* a un rôle important dans l'intégrité et réparation pariétale. Le mutant $\Delta ags1$ n'est pas hypersensible au mélange d'inhibiteur. Par contre, il est hypersensible au glucanex. Ceci montre qu'*AGS1* a un rôle dans la réparation de la paroi. Cependant, le mutant $\Delta crz1$ montre une résistance à l'enzyme de dégradation de la paroi comme le mutant $\Delta swi4$. *A*insi une analyse transcriptomique pourrait réaliser, de même, sur le mutant $\Delta crz1$ afin de comprendre cette résistance.

5. Analyse phénotypique des mutants des gènes candidats de la voie de signalisation Mps1 chez *M. grisea* (Pouvoir pathogène)

Le pouvoir pathogène des mutants des gènes candidats de la voie Mps1 a été mesuré en inoculant les spores ou un implant de ces mutants sur des feuilles d'orge et feuilles de riz. Les mutants *Guy11Δku80Δmps1, P1.2Δku80Δmps1* sont non pathogènes chez ces deux plantes hôtes quel que soit le mode d'inoculation (implants mycéliens déposés sur des feuilles blessées ou non, inoculation de spores produites sur milieu glucose-6P). Ces phénotypes sont similaires à ceux décrits pour les mutants *Δmps1* déjà obtenus (Xu, *et al.* 1998). Parmi les autres mutants analysés, seul le mutant *Δrlm1* est non pathogène comme le mutant *Δmps1*. Ce phénotype du mutant *Δrlm1* est identique à celui de mutant équivalents obtenus par Mehrabi *et al.* (2008). Les tests de pouvoir pathogène du mutant *ΔSwi4* ne sont réalisés que sur des feuilles et plantes d'orge. D'après ces résultats le mutant a une forte réduction de pathogénie de 90%. Cependant, les feuilles de riz étant plus sensibles, des tests sur des feuilles de riz peuvent valider la diminution de pathogénie du mutant *ΔSwi4*. Le mutant *Δswi6* est réduit de 50 à70% dans son capacité de pouvoir pathogène. Ainsi, Les gènes *RLM1* et *SWI4*, parmi les facteurs de transcription directs, semblent jouer un rôle important dans le pouvoir pathogène.

Le mutant $\Delta crz1$ présente une forte diminution de son pouvoir pathogène (-90%). Les phénotypes du mutant $\Delta crz1$ sont similaires à ceux de mutants équivalents obtenus par Jinhee Choi *et al.* (2009). En effet, ces auteurs avaient observé que leurs mutants $\Delta crz1$ avaient une diminution de pouvoir pathogène de plus de 95%, ce qui est très proche à ce que nous avons observé (réduction de 90%). Enfin, les mutants $\Delta ags1$ et $\Delta idc1$ sont réduit dans leur capacité à attaquer les plantes (-50%)

(Tableau 32). Cette réduction modérée montre que ces gènes ne sont que peu impliqués dans le contrôle de fonctions cellulaires nécessaires à l'infection. Enfin le mutant $\Delta ada2$ est aussi pathogène que la souche sauvage.

Souche	Diminution de	Diminution de
	Pathogénie Orge	Pathogénie Riz
Guy11∆ku80∆mps1	100%*	100%
P1.2Δ ku80Δmps1	100%	100%
Guy11∆ ku80∆rlm1	100%	100%
<i>Guy11∆ ku80∆crz1</i>	95%	90%
P1.2Δ ku80Δswi4	90%	ND
Guy11∆ ku80∆swi6	70%	50%
Guy11∆ ku80∆ags1	0%	50%
Guy11∆ ku80∆idc1	0%	50%
Guy11∆ ku80∆ada2	0%	0%

Tableau 32 : Tableau récapitulatif de pourcentage de diminution de pouvoir pathogène sur plante d'orge et de riz de différents mutants, comparé à la souche sauvage. *% des symptômes (nombre de lésions) par rapport à la souche sauvage

La non pathogénie des mutants $\Delta mps1$ et $\Delta rlm1$ et la forte réduction du mutant $\Delta swi4$ pourrait être expliqué par le rôle de α -1,3- glucane synthase. Les résultats obtenus par Fujikawa (2009) démontrent un changement dynamique dans la composition des polysaccharides de la paroi cellulaire pendant l'infection, chez M. grisea. Les cellules de riz produisent divers enzymes qui hydrolysent la paroi fongique lors d'une infection fongique (Van Loon et al. 2006). Il a été supposé que α -1,3- glucane masque d'autres polysaccharides de la paroi cellulaire; en effet l'accumulation d' α -1,3-glucane contribue dans la protection de la paroi cellulaire contre les enzymes digestives. Ainsi, *M. grisea* peut protéger sa paroi cellulaire contre les enzymes polysaccharide-hydrolytiques sécrétées du riz en masquant sa surface de paroi cellulaire avec α -1,3-glucane pendant l'infection. Davantage d'études sont nécessaires pour clarifier la contribution du chitosane dans la protection de la paroi cellulaire fongique pendant l'infection. Récemment, un rôle original d' α -1,3-glucane a été rapporté dans un pathogène humain, le *H. capsulatum* dans lequel β -1,3-glucane est masqué par α -1,3-glucane pour bloquer la reconnaissance par la hôte, via récepteur dectin-1 (Rappleye *et al.* 2007). Ainsi, comme chez *S. cerevisiae*, les mutants $\Delta mps1$ et $\Delta rlm1$ pourraient être non pathogène due à l'absence des glucanes synthase. Pour confirmer cette hypothèse, un test de pathogénie en présence des suppresseurs des phytohormones des plantes comme ABA, pour empêcher la défense de la plante, pourrait être réalise. Ainsi, les mutants Δ*rlm1* et Δ*mps1* pourraient créer des lésions.

Cependant, le mutant $\Delta ags1$ a une faible réduction du pouvoir pathogène. Ceci pourrait parvenir de l'existence d'une autre protéine qu'Ags1, qui participe à la synthèse des glucanes synthase ainsi que de

la présence d'un autre mécanisme de défense du champignon contre la défense de la plante lors de l'infection. Ainsi, une analyse cytologique pourrait aider à comprendre les changements observés chez le mutant $\Delta ags1$, $\Delta rlm1$ et $\Delta mps1$. De même, une analyse biochimique des concentrations des glucanes chez la souche sauvage et les mutants ainsi qu'une analyse transcriptomique lors d'une infection de la souche sauvage et les mutants $\Delta ags1$, $\Delta rlm1$ et $\Delta mps1$ pourrait élucider si la diminution du pouvoir pathogène des mutants est due à l'absence d' α -1,3-glucane synthase. Cette analyse transcriptomique pourrait, de plus, aider à identifier la présence d'autres gènes responsables du pouvoir pathogène et de la synthèse des glucanes synthèse.

6. Analyse transcriptionnelle du mutant *Amps1*

Les analyses transcriptionelles avaient deux buts distincts. Le premier objectif était de définir les gènes cibles candidats qui sont sous le contrôle de *MPS1*. Ainsi, une analyse bibliographique a permis d'identifier les gènes sous le contrôle de *MPS1*, chez les autres champignons. Ces gènes ont été analysés avec ou sans un traitement avec l'aculéacine. Le principe était d'identifier les gènes qui ne sont pas induits chez le mutant. Le deuxième objectif était d'évaluer le rôle de la voie de signalisation Mps1 dans l'induction de l'expression de ces gènes, en présence de l'aculéacine, inhibiteur des glucane synthases. De plus, cette analyse révèlera si les gènes de la réparation de la paroi sont contrôlés par *MPS1*.

Chez la souche sauvage, tous les gènes cibles candidats (*SWI4, SWI6, RLM1, ADA2, AGS1, IDC1*), sauf *CRZ1* sont induits lors du traitement par l'aculéacine. L'induction de l'expression varie de 2 à 6 fois. Par contre chez le mutant $\Delta mps1$ il n' y a pas d'expression de ces gènes ni en absence ni en présence de l'aculéacine. Ceci montre que ces gènes participent à la biosynthèse de la paroi et ils sont aussi sous le contrôle de *MPS1*.

L'analyse par qPCR des gènes participant à la biosynthèse de la paroi (*CHS1, CHS2, CHS3, CHS4, CHS8, CHS7, CHS, FKS1, AGS1, GNA1, GFA1, PMC1, GSK3*) nous a permis à identifier les gènes dépendants et indépendants de *MPS1*. L'induction observée représente 1,2 fois à 1,9 fois l'expression basale des gènes. En particulier, nous avons observé l'induction des gènes codant pour des β -1,3 et α -1,3 glucanes synthases (*FKS1, AGS1*) et certaines chitines synthases (*CHS2, CHS4*), impliqués dans la synthèse de composants essentiels de la paroi (Tableau 33). L'induction de ces gènes codant des chitines synthases peut être interprété comme un mécanisme de compensation en réponse à l'inhibition de la biosynthèse des glucanes par l'aculéacine, comme décrit chez les levures (Lesage *et al.* 2006 ; Cota *et al.* 2008). Nos résultats suggèrent que ce mécanisme pourrait exister chez les champignons filamenteux.

GENE chez <i>M. g</i>	FONCTION chez <i>M. g</i>	GENE	Induction A. n	Induction <i>M.g</i>
		chez A. n		
CHS2	Chitine synthase 2	CHSA	MPS1	MPS1 dépendant
			indépendant	
CHS4	Chitine synthase 4	CHS7	MPS1	MPS1 dépendant
			indépendant	
AGS1	α -1,3-glucan synthase	AGSA	MPS1 dépendant	MPS1 dépendant
FKS1	1,3-β-glucan synthase	FKS1	MPS1	MPS1 dépendant
	component		indépendant	
GFA	glucosamine-fructose-	GFAA	MPS1	MPS1 dépendant
	6-phosphate aminotransferase		indépendant	

Tableau 33 : Tableau récapitulatif des gènes dépendants de MPS1 chez M. grisea et A. nidulans

Chez le mutant $\Delta mps1$, nous n'observons plus d'induction de l'expression de ces gènes, en réponse à l'inhibition de la biosynthèse des glucanes par l'aculéacine. Ce résultat montre que leur induction dépend de *MPS1*. De plus, l'expression de *CHS1*, *3*, *7* est réduite chez la souche sauvage et induite chez le mutant $\Delta mps1$. Ceci montre que ces gènes sont dépendants aussi de *MPS1*. Par contre leur expression est réduite lors d'un traitement à l'aculéacine. Ce qui suggère qu'ils participent négativement à la biosynthèse de la paroi.

La voie de signalisation Mps1 contrôlerait donc la transcription de nombreux gènes impliqués dans la réparation de la paroi comme des enzymes des voies de biosynthèse des précurseurs de la chitine (*GFA1*), des chitines synthases et des glucanes synthases, mais également d'autres gènes codant pour des protéines dont le rôle reste encore à déterminer.

IV. CONCLUSION

Le but principal de cette thèse était d'identifier les différents gènes potentiellement impliqués dans la cascade de signalisation MAP kinase Mps1 et d'évaluer leur rôle dans cette voie de signalisation par une approche génétique. Nous avons ainsi pu comparer les différents phénotypes des mutants des gènes étudiés par rapport à ceux du mutant de la MAP Kinase *MPS1* (Tableau 34),

	Mycélium	Croissance	Sporulation	Paroi	Paroi	Pathogénie
		mycélium		sensibilité	sensibilité	
				Acu/Nikko	Glucanex	
Souche	Nombreux	Normale	Normale	+	+	Normale
sauvage	hyphes					
	aériens					
∆mps1	-	+	0	HS	HS	0
∆swi4	+/-	+	-95%	HS	R	-90%
∆swi6	+	Arrête	-60%	+	HS	-50%
		tardif				
∆rlm1	+	+	-90%	60%	+	0
∆idc1	+/-	+	-50%	70%	HS	-50%
∆ags1	+	-10%	-70%	+	HS	-50%
∆crz1	+	+	-20%	+	R	-90%
∆ada2	+	+	+	40%		+

Tableau 34 : Tableau récapitulatif des phénotypes des mutants+ : phénotype identique à la souche sauvage - : Absence ; +/- : faible diminution ; HS : hypersensible ; R : résistant

D'après nos résultats, les mutants des facteurs de transcription ont les phénotypes proches du mutant $\Delta mps1$. Surtout le mutant $\Delta swi4$ est celui qui a des phénotypes quasi équivalents du mutant $\Delta mps1$. Tous les deux ont un défaut de mycélium, de sporulation et de pathogénie. Ils ont aussi sensibles aux mélanges d'inhibiteur aculéacine – nikkomycine. Par contre le mutant $\Delta swi4$ est résistant aux enzymes de dégradation de la paroi, la glucanex. Le mutant $\Delta swi6$ a un phénotype différent de $\Delta mps1$: un arrêt de croissance du mycélium après quelque jour. Le mutant $\Delta rlm1$ a un mycélium normal et n'est hypersensible au mélange d'inhibiteur que de 60% mais il est non pathogène.

Parmi les mutants des gènes cibles de *MPS1*, le mutant $\Delta ags1$ a une diminution de croissance mycélium, un important défaut de sporulation et une diminution de pouvoir pathogène. De plus, il est hypersensible aux enzymes de dégradation. Le mutant $\Delta ada2$ ne montre pas des phénotypes importants.



Figure 96: Schéma récapitulatif des fonctions des gènes analysés, dans la sporulation, hypersensibilité au mélange Aculéacine-Nikkomycine et dans le pouvoir pathogène : La largeur de la flèche indique le degré de l'implication du gène. Le mutant $\Delta crz1$, facteur de transcription de la voie de Calcineurine, a un défaut important de pouvoir pathogène et il montre une résistance comme le mutant $\Delta swi4$ aux enzymes de dégradation. Le mutant $\Delta idc1$ montre les mêmes phénotypes que le mutant $\Delta mps1$ mais ses phénotypes sont moins importants que ceux de $\Delta mps1$.

Ainsi, d'après les phénotypes de l'ensemble des mutants obtenus, cette voie de signalisation pourrait jouer un rôle dans la sporulation, la pathogénie, la croissance mycéliale et l'hypersensibilité aux inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi et aux enzymes de dégradation.

1. Schéma de fonctionnement de la voie de signalisation Mps1 chez M. grisea

Les différents rôles possibles des gènes de la voie de signalisation Mps1 sont présentés dans la Figure 96. Dans cette cascade, *MPS1* est la kinase qui active les facteurs de transcription *SW14, SW16* et *RLM1*, en réponse à un stress pariétal. Ces facteurs de transcription vont à leur tour induire ou réprimer l'expression de gènes cibles. Ainsi les gènes *SW14, RLM1* et *IDC1* sont impliqués dans la réparation de la paroi cellulaire et le contrôle de l'intégrité cellulaire. De plus *SW14, RLM1* et *IDC1* avec *CRZ1* sont impliqués dans la pathogénie. Enfin, *SW14, RLM1, IDC1 et CRZ1* sont impliqués dans la sporulation. L'inactivation du gène MgAGS1 conduit à des phénotypes qui ne recouvrent qu'une partie de ceux observés pour le mutant $\Delta mps1$ (absence de la sporulation, hypersensibilité au Glucanex). Ceci montre qu'*AGS1* ne participerait qu'à une partie des fonctions contrôlées par la voie Mps1, celles impliquées dans la sporulation et la résistance de la paroi aux enzymes de dégradation. *SW16* pourrait avoir un rôle dans le cycle cellulaire. Cependant, il ne participe pas à la réparation de la paroi ni à la sporulation.

2. Comparaison des rôles de la voie Mps1 chez M. grisea et la voie Slt2 chez S. cerevisiae

Chez *S. cerevisiae*, les mutants des gènes codant la voie Slt2, présentent des phénomènes de lyse, de sensibilité aux agents qui perturbent la paroi cellulaire et des problèmes de croissance en conditions hypo-osmotiques. Ces défauts sont supprimés par l'ajout d'un osmostabilisant dans le milieu. Ces phénotypes observés chez le mutant $\Delta slt2$ sont comparables à ceux observés chez le mutant $\Delta mps1$. Il a été montré, chez *S. cerevisiae* (Garcia, *et al.* 2004) que l'inactivation de la cascade de signalisation de l'intégrité cellulaire conduit à une hypersensibilité spécifique des mutants $\Delta slt2$ de ce type d'inhibiteurs. Le mutant $\Delta slt2$ présente une hypersensibilité de 4 fois à la caspofongine (Cristina Reinoso-Martín, *et al.* 2003). Le mutant $\Delta mps1$ de *M. grisea* n'est que 2 à 3 fois plus sensible à l'aculéacine et à la nikkomycine que la souche sauvage correspondante, et il n'est pas plus sensible à la caspofongine que la souche sauvage.

Ainsi si chez *S. cerevisiae* son rôle majeur est le maintien de l'intégrité cellulaire, cette voie semble posséder d'autres fonctions, dont le contrôle du cycle cellulaire (Madden *et al.* 1997), elle permet aussi le remodelage cellulaire lors de la formation du bourgeon émergeant lors de la fécondation (Buehrer et Errede 1997). En particulier, il a été montré qu'elle est induite par certains types de ROS

(Alic, et *al.* 2003; Staleva, *et al.* 2004), même si elle ne gère pas la réponse face au stress oxydatif. Chez M. grisea cette voie a un rôle dans l'intégrité de la paroi, la pathogénie et la sporulation.

On connaît certaines des cibles directes de cette voie dont *RLM1* (Jung *et al.* 2002), ainsi que *SWI4* (Baetz et Anrews, 2001) et *SWI6* (Ho, *et al.* 1999). Les mutants $\Delta ScrIm1$ sont sensibles à la caféine et présentent une résistance accrue au Calcofluor White (CW) et à la zymolyase 100T, deux agents qui affaiblissent la paroi cellulaire (Dodou et Treisman, 1997). Finalement, les mutants $\Delta Scswi4$ lysent à 37° C et ce phénotype est corrigé par l' ajout de sorbitol 1M dans le milieu. Ils sont de plus sensibles à la présence de CFW ou de SDS dans le milieu (Igual *et al.*1996). Ainsi, chez *S. cerevisiae RLM1* a un rôle plus important que *SWI4*, dans l'intégrité de la paroi. Par contre, chez *M. grisea* les phénotypes du mutant $\Delta swi4$ sont plus importants que ceux du mutant $\Delta rlm1$.

De ce fait, les rôles majeurs de cette voie de signalisation Slt2/Mps1 chez ces deux espèces sont communs. Par contre l'implication des facteurs de transcription diffère selon *M. grisea* ou *S. cerevisiae*.

3. L'importance de la voie de signalisation Mps1 chez *M. grisea* chez les ascomycètes

Chez les hémi-ascomycètes, deux voies de signalisation sont impliquées dans la réparation de la paroi fongique en réponse à un stress : la voie de signalisation Slt2/Mps1 et la voie de impliquant la Calcineurine. Chez les champignons filamenteux ces deux voies sont aussi impliquées dans la réparation de la paroi que dans la sporulation des champignons filamenteux, et dans le pouvoir pathogène de certains champignons filamenteux vis-à-vis des plantes mais pas dans le pouvoir pathogène vis-à-vis des animaux.

Cependant les phénotypes des mutants du gène homologues de *MPS1*, chez différents champignons ont été étudiés. Même si le gène est très bien conservé chez différentes espèces, les phénotypes diffèrent selon l'espèce (Tableau 35).

Champignon	Gène	Sporulation	Hypersensibilité	Croissance	Pathogénie
			de la paroi		
M. grisea	MPS1	Absence	Aculéacine (2x),	+	Absence
			Nikkomycine		
			(2x)		
M. graminicola	MGSLT2	Réduit	Glucanase,	+	Réduit
			Miconazol(2x),		
			Imazalil (5x),		
			cyproconazole		
			(10x)		
B. cinerea	BMP3	Fortement	+	Réduit	Réduit
		Réduit			
F. graminearum	MGV1	+	Driselase	+	Réduit
A. fumigatus	MPKA	Réduit	Glucanex, SDS,	+	+
			CFW, Congo Red		

Tableau 35 : Tableau récapitulatif des phénotypes du mutant du gène encodant la MAPK Mpk1/Slt2 chez différents champignons : + : Phénotype normale ; (Xinhua Zhao *et al.* 2007), (Nicolas Rispail, *et al.* 2009), (Oliver Rui et Matthias Hahn, 2007), (Mehrabi, *et al.* 2006), (Valiante, *et al.* 2009), (Zhanming, *et al.* 2002), (R. Alonso Monge, *et al.* 2006)

Etant donné les différences de phénotypes chez différentes espèces, on pourrait dire que les rôles de la voie de Mps1 varient selon les espèces. Ils sont plus ou moins réduits en sporulation et en pathogénie. Ainsi, cette cascade joue un rôle important dans la sporulation et la pathogénie des champignons pathogène des plantes comme chez les champignons pathogènes de l'humain. Cependant, tous les mutants ont une hypersensibilité aux inhibiteurs de la paroi, sauf celui de *B. cinerea.* L'hypersensibilité des champignons pathogènes des plantes sont moindre comparé aux Saccharomycotina. Cela pourrait supposer à penser que cette cascade ne participe pas au contrôle de l'intégrité pariétale. Par contre, malgré la faible hypersensibilité aux inhibiteurs de la paroi, les mutants $\Delta mps1$, $\Delta swi4$, $\Delta swi6$, $\Delta ags1$ et $\Delta idc1$ ont un Tp50 plus court par rapport à leur souche sauvage. Ceci démontre que la cascade de signalisation MAP kinase Mps1/Slt2 participe bien à la réparation de la paroi cellulaire chez *M. grisea*.

Perspective

IV. PERSPECTIVES

Afin d'identifier les cibles transcriptionelles de *MPS1* une analyse du transcriptome du mutant *Guy11∆ku80∆mps1* en comparaison de la souche sauvage est en cours de réalisation. Cette analyse permettra d'identifier les gènes différemment exprimés chez ce mutant aussi bien en condition de culture normale, qu'en présence d'un inhibiteur de la biosynthèse des glucanes (Aculéacine). Enfin, l'analyse transcriptionelle des mutants $\Delta swi6$, $\Delta swi4$, $\Delta rlm1$ sera entreprise afin de déterminer quels sont les cibles transcriptionelles de ces facteurs de transcription communes avec celles de la voie Mps1. Cette analyse transcriptionelle comparative devrait permettre de mieux comprendre la voie de signalisation Mps1, en particulier les rôles de différents facteurs de transcription impliqués dans cette cascade. De plus, pour approfondir l'analyse des gènes *RLM1* et *SWI4*, un test plus complet avec les stress paroi pourrait être réalisé. En effet, le but étant de comprendre comment ils interviennent, en présence d'un stress paroi, une analyse transcriptomique, en présence et absence de l'Aculéacine. Ainsi, nous pouvons identifier les gènes impliqués dans la réparation de la paroi, contrôlés par *RLM1* ou *SWI4*.

Cependant, les mutants $\Delta swi4$ et $\Delta rlm1$ ont un pouvoir de pathogénie fortement réduit. Par contre $\Delta ags1$ est toujours pathogène. Ainsi, une analyse génétique des appressoria pourraient démontrer les gènes impliqués dans la pathogénie et surtout une telle analyse pourrait élucider si α - 1,3 glucane synthase est impliqué dans la diminution du pouvoir pathogène.

La construction de mutants conditionnels du gène MPS1 nous permettra aussi de mieux analyser les phénotypes associés à l'inactivation de ce gène, en particulier au niveau des spores et de l'appressorium. En effet des mutants conditionnels du gène MPS1 pourraient permettre d'inactiver Mps1 à des stades de développement particulier évitant les défauts de morphologie et de sporulation du mutant nul. De plus, il devrait être possible d'inactiver cette voie juste avant l'addition de fongicides afin d'analyser en temps réels l'effet de l'absence de cette voie dans la réponse transcriptionelle à ces composés. La méthode de construction de mutants conditionnels du gène MPS1 choisie correspond à l'utilisation des promoteurs fongiques répressibles, afin de contrôler l'expression du gène sauvage MPS1 dans un contexte mutant. Un des promoteurs utilisés pour contrôler l'expression des gènes est le promoteur du gène NIA1 codant pour la nitrate réductase (pNia1). L'expression de ce gène est induite par la présence de nitrate et réprimé par le glutamate (ref). Le promoteur pNia1 peut ainsi être utilisé pour exprimerdes gènes en présence de nitrate et réprimer l'expression de gènes en présence de glutamate. Une autre stratégie a aussi été utilisée dans notre laboratoire pour construire des mutants conditionnels du gène MPS1. En effet, il est possible de construire des formes alléliques de kinases sensibles spécifiquement à un inhibiteur de kinase (NMPP1) normalement inactif vis-à-vis de kinases sauvages. Dans ce cas, l'addition de cet inhibiteur spécifique permet d'inactiver l'enzyme au moment choisi. Les analyses de ces mutants sont en cours et devraient permettre d'étudier l'effet de l'inactivation du gène MPS1 de manière beaucoup plus précise qu'avec le mutant nul pleiotropique.

118

Lors de l'analyse des résultats et de la recherche bibliographique, nous avons observé une redondance des fonctions entre différentes voies de signalisation. Nous avons mis en évidence, dans cette thèse que la voie de Calcineurine et la voie de MAPK Mps1 jouent un rôle très important dans le pouvoir pathogène. Pour mieux élucider cette redondance, un double mutant $\Delta mps1\Delta crz1$ pourrait être utile. Ainsi, nous pouvons confirmer que le pouvoir pathogène est sous le contrôle de ces deux voies. Ainsi qu'une analyse transcriptomique chez le mutant $\Delta mps1$ et $\Delta crz1$ pourrait révéler l'expression des différents gènes impliqués dans le pouvoir pathogène. Nous pouvons de même, étudier l'expression des gènes dépendants de *MPS1*, chez le mutant $\Delta crz1$. De plus, le mutant $\Delta crz1$ présente une résistance à l'Aculéacine. Ainsi, une analyse transcriptomique avec ou sans Aculéacine, pourrait démontrer les raisons de la résistance de ce mutant en présence de l'Aculéacine.

Enfin, la reconnaissance des différents gènes en aval et en amont de MPS1 pourrait nous aider à, tout d'abord, mieux comprendre le mécanisme et tous les gènes impliqués et leur rôle dans ce mécanisme. Ensuite, cette compréhension pourrait être essentielle afin de trouver des cibles potentielles pour des fongicides afin de combattre contre la maladie de pyriculariose.

SOMMAIRES	DES ANNEXES
-----------	--------------------

ANNEXE 1		1 - 37
Identification des domaines fonctionnels et alignements des gènes étudiés		1
1. F	Protéine Mps1	1
1	1.1. Identification des domaines fonctionnels de Mps1	1
1	1.2. Alignement avec les séquences orthologues de MgMps1	2
1	1.3. Arbre Phylogénique	3
2. F	Facteur de Transcription Swi4	4
2	2.1. Identification des domaines fonctionnels de Swi4	4
2	2.2. Alignement avec les séquences orthologues de MgSwi4	5
2	2.3. Arbre Phylogénique	7
3. F	Facteur de Transcription Swi6	8
3	3.1. Identification des domaines fonctionnels de Swi6	8
3	3.2. Alignement avec les séquences orthologues de MgSwi6	9
3	3.3. Arbre phylogénique	11
	Comparaison entre MgSWI4 et MgSWI6	12
4 . F	Facteur de transcription Rlm1	13
4	4.1. Identification des domaines fonctionnels de Rlm1	13
4	4.2. Alignements avec les séquences des orthologues de MgRlm1	14
4	4.3. Arbre phylogénique	16
5. F	Facteur de transcription Crz1	17
5	5.1. Identification des domaines fonctionnels de Crz1	17
5	5.2. Alignements avec les séquences des orthologues de MgCrz1	18
5	5.3. Arbre phylogénique	20
6 . F	Protéine Ags1 (α -1,3-glucan synthase)	21
e	6.1. Identification des domaines fonctionnels d'Ags1	21
e	6.2. Alignement des séquences des orthologues de MgAgs1	22
e	6.3. Arbre phylogénique	26
7 . <i>I</i>	Adaptateur Ada2	27
7	7.1. Identification des domaines fonctionnels d'Ada2	27
7	7.2. Alignement avec mes séquences des orthologues de MgAda2	28
7	7.3. Arbre phylogénique	29
8. F	Régulateur Knr4	30
6	3.1. Identification des domaines fonctionnels de Knr4	30
8	3.2. Alignement avec les séquences des orthologues de MgKnr4	31
8	3.3. Arbre phylogénique	32
9 . I	IDC1	33
	9.1. Identification des domaines fonctionnels d'Idc1	33
------------	--	---------
	9.2. Alignement avec les séquences des orthologues de MgKnr4	34
	9.3. Arbre phylogénique	36
AN	NEXE 2	37
Tab	pleaux récapitulatif des gènes et les champignons étudiés	37
AN	NEXE 3	38 – 50
Sch	éma des constructions des mutants	38
1.	Schéma des constructions du mutant de délétion $Guy11\Delta ku80\Delta mps1$ et	
P1	.2Δku80Δmps1	38
	1.1. Schéma de la construction du mutant de délétion $Guy 11 \Delta ku 80 \Delta mps 1$ et	
	P1.2Δku80Δmps1	38
	1.2. Schéma de la construction des mutants de complémentation	
	<i>Guy11Δku80Δmps1</i> et <i>P1.2Δku80Δmps1</i>	39
2.	Schéma des constructions du mutant <i>P1.2Δku80Δswi4</i>	40
	2.1. Schéma de la construction du mutant de délétion $P1.2\Delta ku80\Delta swi4$	40
	2.2. Schéma de la construction du mutant de complémentation du	
	P1.2Δku80Δswi4	41
3.	Schéma de construction du mutant <i>Guy11Δku80Δswi6</i>	42
	3.1. Schéma de la construction du mutant de délétion $Guy 11 \Delta ku 80 \Delta swi6$	42
	3.2. Schéma de la construction du mutant de complémentation du	
	Guy11Δku80Δswi6	43
4.	Schéma de construction du mutant de délétion <i>Guy11Δku80Δrlm1</i>	44
5.	Schéma de construction du mutant de délétion <i>Guy11Δku80Δcrz1</i>	45
6 .	Schéma de construction du mutant de délétion <i>Guy11Δku80Δags1</i>	46
7.	Schéma de construction du mutant de délétion <i>Guy11Δku80Δada2</i>	47
8.	Schéma de construction du mutant de délétion <i>Guy11Δku80Δidc1</i>	48
9.	Schéma de construction du mutant de délétion <i>Guy11Δku80Δknr4</i>	49
AN	NEXE 4	50 - 53
Sch	éma des vecteurs utilisés	50
1.	Schéma du plasmide pFV8 (-)	50
2.	Construction du mutant conditionnel de <i>Guy11∆KU80∆pNiaMps1</i>	51
3.	Construction d'un allèle de <i>MgMPS1</i> sensible à des inhibiteurs spécifiques	52

ANNEXES

ANNEXE 1

Identification des domaines fonctionnels et alignements des gènes étudiés

1. Protéine Mps1



Figure 1 : Schéma des domaines et acides aminés fonctionnels de Mps1

1.1. Identification des domaines fonctionnels de Mps1

Plusieurs acides aminés sont importants pour l'activité de Mps1 :

> Acides aminés fonctionnels de Mps1 (Figure 2)

PHO : Le site de phosphorylation de Mps1 se trouve au niveau des résidus T 185 et Y 187 (motif TEY) (Levitzki *et al.,* 2001). Cette phosphorylation conduit à l'activation de Mps1.

AA* : L'acide aminé du site actif de l'enzyme conditionnant la taille de la poche de fixation de l'ATP se trouve au résidu 105 (E) («http://sequoia.ucsf.edu/ksd/ »).

T-Loop : La phosphorylation des résidus du site PHO nécessite la présence d'une T-Loop pour une phosphorylation complète chez les protéines kinases. Ainsi, on retrouve le T-Loop, situé, entre les résidus 150 et 182.

NLS : Le site NLS (Nuclear Localisation Signal) de la protéine Mps1, est localisé entre les entre les résidus 76 et 83 pour que, une fois activée, la protéine Mps1 entre dans le noyau.

1.2. Alignement avec les séquences orthologues de MgMps1



Figure 2 : Alignement des séquences des homologues de MgMps1, chez les espèces fongiques étudiés. Les domaines fonctionnels importants sont entourés.

Conservation des domaines chez les différents champignons

Les séquences protéiques homologues de MgMps1 chez *N. crassa, A. nidulans* et *C. albicans* n'ont pas été prises en considération pour cet alignement. En effet, leurs annotations ne sont pas correctes.

La MAP kinase Mps1 de M. grisea possède un domaine « Pkinase, PF00069, (1 à 366 aa) très conservé chez les différents espèces fongiques étudiés. Par ailleurs, la partie C-terminale est variable (360 à 470).

1.3. Arbre Phylogénique



Figure 3 : Arbre phylogénique des orthologues de MgMps1 réalisé par PhyML.

AF : Aspergillus fumigatus, BC : Botrytis cinerea, MG : Mycosphaerella graminicola, MGrisea : Magnaporthe grisea, TR : <u>Trichoderma</u> <u>reesei</u>, AG : Ashbya gossypii, FG : Fusarium graminearum, CP : Coccidioides posadasi, PA : Podospora anserina et SC : Saccharomyces cerevisiae

2. Facteur de Transcription Swi4

			3.				
Query seq.	1 100	200	300	400	500	600	715
Specific hits			ANK				
Superfamilies	KilA-N super		ANK superfa	mily			

Figure 4 : Schéma des domaines et acides aminés fonctionnels de Swi4

2.1. Identification des domaines fonctionnels de Swi4

Plusieurs acides aminés sont importants pour l'activité de Swi4 :

Acides aminés et domaines fonctionnels de Swi4 (Figure 6)

KilA : Ce domaine intervient dans les interactions protéines – acides nucléiques et est l'homologue du domaine « DNA Binding APSES ». Le site de fixation à l'ADN se trouve entre les résidus 71 et 92 (H-T-H motif), au sein du domaine KilA.

ANK : Le domaine « ANKyrin repeat », intervient dans les interactions protéine-protéine. Chez SWI4, il existe 3 domaines ANK à la suite. Dans chaque domaine 33 acides aminés sont conservés entre les 3 domaines.



Figure 5 : Alignement des régions conservées des trois domaines « ANKyrin repeat » chez *M. grisea*

2.2. Alignement avec les séquences orthologues de MgSwi4

	KilA	
M.grisea.s : P.anserina : N.crassa.s : F.graminer : T.reeisi.s : B.cinerea. : M.graminic : S.nodorum. : A.nidulans : C.albicans : S.cerevisi : A.gosypii. :	: MVKAAAAAASAPTGPGIYSATYSCIPVYEYOFGVDLKE HVMRRRVDDWINATHILKAAGFDKPARTRILEREVOKDHEKVQGGYGKYQGTW : MAKGAAPAGVYSATYSCIPVYEYOFGTDLKE HVMRRRADNWVNATHILKAAGFDKPARTRILEREVOKEBHEKVQGGYGKYQGTW : MVKENVAGNPEPGIYSATYSCIPVWEY-OFGVDLKE HVMRRHDDWINATHILKAAGFDKPARTRILERDVOKDHEKIQGGYGKYQGTW : MVKENNAAPPATAPGVYSATYSCIPVYEY-OFGCDLKE HVMRRHDDWINATHILKAAGFDKPARTRILERDVOKDHEKIQGGYGKYQGTW : MVKGNASGGIYSATYSCIPVYEY-OFGCDLKE HVMRRHDDWINATHILKAAGFDKPARTRILERDVOKDHEKIQGGYGKYQGTW : MVKGNASGGIYSATYSCIPVYEY-OFGCDLKE HVMRRRDDWINATHILKAAGFDKPARTRILERDVOKDHEKIQGGYGKYQGTW : MVKGNASGGIYSATYSCIPVYEYOFGCDLKE HVMRRRDDWINATHILKAAGFDKPARTRILERDVOKDHEKIQGGYGKYQGTW : MVKGNASGGIYSATYSNVPYEYOFGCDLKE HVMRRRDDWINATHILKAAGFDKPARTRILERDVOKGVHEKVQGGYGKYQGTW : MASTTAASSIMGDKIYSATYSNVPYEYNIGEN HVMRRSDDWINATHILKVAQ'DKPARTRILEREVOKGVHEKVQGGYGKYQGTW : MPAPDGKIYSATYSNVPYE-CNVEGN HVMRRSDDWINATHILKVAQ'DKPARTRILEREVOKGVHEKVQGGYGKYQGTW : MAAVDFSNVYSATYSNVPYE-CNVEGN SVMRRSDDWINATHILKVAG'DKPARTRILEREVOKGVHEKVQGGYGKYQGTW : MASGIDTOKIYSATYSNVPYE-CNVEG NYMRRSDDWINATHILKVAG'DKPARTRILEREVOKGVHEKVQGGYGKYQGTW : MSSGDTO	92 85 92 85 87 81 81 81 78 78 84
M.grisea.s : P.anserina : N.crassa.s : F.graminer : B.cinerea. : M.graminic : S.nodorum. : A.nidulans : C.immitis. : C.albicans : S.cerevisi : A.gosypii. :	100 * 120 * 140 * 160 * 180 17 PIEACEALAA H.NNTFORTRIFESSP CPDSPPAPRHTSKPKQPK	145 139 143 146 139 140 138 135 134 135 169 170 157
M.grisea.s : P.anserina : N.crassa.s : F.graminer : T.reeisi.s : B.cinerea. : M.graminic : S.nodorum. : A.nidulans : C.albicans : S.cerevisi : A.gosypii. :	* 200 * 220 * 240 * 260 * 280 : NNKARAVAKQAPPPPLHYQP	192 190 193 180 189 190 192 178 184 245 264 240
M.grisea.s : P.anserina : N.crassa.s : F.graminer : T.reeisi.s : B.cinerea. : M.graminic : S.nodorum. : A.nidulans : C.immitis. : C.albicans : S.cerevisi : A.gosypii. :	* 300 * 320 * 340 * 360 * SASY LAED R-PDLSHFS-TGHRKRKR	237 236 238 226 234 232 233 237 227 231 339 358 328
M.grisea.s : P.anserina : N.crassa.s : F.gramine : T.reeisi.s : B.cinerea. : M.graminic : S.nodorum. : A.nidulans : C.albicans : S.cerevisi : A.gosypii. :	380 * 400 *	322 320 312 318 318 319 321 314 314 318 433 448 417

	480 ANK2 *	500 *	520 *	540 * ANK3 60	
M.grisea.s :	VVLKELFHTINI RDLSGCTATHHA	A <mark>ILKGGRVHSPTCSR</mark> YLDNIL	N LQETQHD	PNFVQQLLDAQDIDGNTAVHLAAQ	: 401
P.anserina :	TVLNELFKSVDARDHSGCTVIHHA	AVMKRGRVQSSTCARYYLDIIL	N (LVEVRQ	PEEVQALLDAQD <mark>BE</mark> GNTALHLAAR	: 398
N.crassa.s :	QVMKELFSTIDCRDLSCCTVIHHA	AVMKIGRVNSQSCSRYYLDIIL	NRLQETHH	PEFVQQLLDAQDHDGNTAVHLAAM	: 400
T.reeisi.s :	AVMKELFERVDYRDSOGCTVTHHA	AIMKNGRVYSPSCSRYYLDNIL	N UOEALE	PSAFORLIDVODIDGNTALHLAAM	: 396
B.cinerea. :	LIVKELIGTANEVDSCGATVLHHA	AATTN-MKQKFRCAQYYLDVLL	E FIEIYH	PDEVQRLLDARDINGNTAIHIAAK	: 395
M.graminic :	KLAGLLIR VNHQEWFGSTVFHHI	ANTTE-RKSKYQCAR <mark>Y</mark> YLDCIL	DMSDVLP	pggienvlnit <mark>di</mark> ngdtaiti a ar	: 396
S.nodorum. :	SMVKIFQQTVHLTDWFGSTVFHHI.	ATTSSSNKYVCARWYLDCIIN		PEEVTRLINAOD <mark>O</mark> NGDTAIMIAAR	: 398
A.nidulans :	FLARTIKNUTSPROWEGAN LEHRI.	AQTTK-SKGKWKSSRYYCEVAL	ALTSEMYD	DEEVDLLLSCODSVGDTAVLVAAR	: 391 · 395
C.albicans :	LILDLLKESVLLVDSNGKTVLHHI	VDTDS-KHKREKFAQYYLESLL	EIVDERQEQGDSNGHAMEI	DDLTKDELVTKFINHOD DGNTAFHIAAH	: 526
S.cerevisi :	RIFQLLHETVFDIDSQSQTVIHHI	VKRKSTTPSAV <mark>Y</mark> YLDVVL	S (I KDFSP	QYRIELLLNTQD <mark>I</mark> NGDTALHIASK	: 522
A.gosypii. :	REFULIODEVEDVDSRSQEVVHHIT	VKRKSNTPSALYLDVLL	SILKDFSP	QYRIETLINAODCKGSTPLHIAAM	: 491
	8 I 3 La g II A	, y		8 qu	•
	* 580	*600 *	620	* 640 * 6	
M.grisea.s :	RGSSKCIRALLGRGASTDITNN	ECMIAADLIKELNASKKLRS	VPQRSSSPFAPESARRQVSI	RDALAGDVGAMTIG	: 477
N. crassa.s	RDARKCTRALIGRGASTDIENN	TRAFEL TKELNASTSKSRSN	- PORSSSPEAPETAR- KNG	HEATSESMVTSR	: 475
F.graminer :	RNARKCIRALLGRNASSDLANLI	EGIRAEDLIMDLNATKKDR	GPQRSSSPFAPESQR-HASI	KDALIEKAN	: 457
T.reeisi.s :	RNARKCIRALLGRNASTDIANL	e <mark>clraedlimelnaakkdr</mark>	APQRSSSPFAPDSQR-RATI	RDAFSSGGAGGD	: 469
B.cinerea. :	NKARKCVRALMGRGASTDILNDI	METAEEIIQDLNASRR-SERH	IQQAASSSPFAPDSAR-HISI	HYDDLEQENPR	: 467
S nodorum	NGARKOVRSLUGRSVSVDIPNKI	KCETADDI TREINORRR-MHGR	TROASSSPEQADSSLGPMG	RHRINGHTAAIDGGPLIRUPERSUUSEN	· 487
A.nidulans :	NGVFRLVDLLLSRCP-RAGDLVNKI	RETASSIMQRAHLAERDI	PPPPSSITMGNDHIDGEVG-	-APTSLEPQSVTLH	: 465
C.immitis. :	NGCYRLAEILLKNCP-EAGNLPNKI	HETANEVMMMIQQQQV-PRDY	PHRPSSATQHSVH-EGDIG	GVIERGGENMAQCQL	: 472
C.albicans :	NLNKKCIKVFINYHRFINFGLRNL	V CTVEDYLASHNYVLRLDPVE	HDQSNNSDGDEDIMEDYTNI	ENQSFETQLHNSKMAIN	: 608
S.cerevisi :	NGDVVFFNTLVKMGALTTISNKI	ELTANELNNQQYEQMMIQNGT	NGHVNEENTDLNIHVNTNN	LETKNDVNSMVIMSPVS	: 602
A.gosypii		g a 6	SSS	INSASAAGGAVPASLIN	. 504
		- 			
Mariano a .	60 * 680		* 720	* 740 *	
P.anserina :	KLOLSYOSEAANTVOSR	TPLULOKLODISOSYDSEFNE	TDEAEKEARH LANTOA	INNERSIAELESR	: 541
N.crassa.s :	KNSQPNYSSDAANTVQNR	ITPLVLQKLKDLTATYDSEFKE	KDDAEKEARRILNKTQSI	LKALTASIDDYNSR	: 547
F.graminer :	RQSPVVFQSAAANTVQSR	I SPL <mark>I</mark> MEKFQD <mark>L</mark> AKSYEDEFRE	KDIAESEAKRLLSNTQQ	LITSWRQSITDVEGQ	: 529
T.reeisi.s :	SKVRKPAPSFQSAAATTVHSR	SPLIMEKFQQLAKSYDEEWHE	KDVAEAEARRILTNTQA	SLNLWRQQITELEAQ	: 544
M.graminic :	GTSRGLEHSADVYRSEAALA TSS	MEVIENKARDIASSIDAEIAE	KDAELAEAER AALRROI	IDALKROAEE ROKEAE	: 568
S.nodorum. :	MVAREPVQYRSQTASHLMTK	VAPTLLEKCEELAAAYESELQE	KEAESEDAERVVKRRQAI	LEAVRKQVAELQNMGNGLH	: 556
A.nidulans :	HESSPATAQLLSQ	IGAIMAEASRK <mark>I</mark> TSSYGAAKPS	QKDSDDVANPEALYEQLEQI	DRQK <mark>H</mark> RRQYDALAAK	: 534
C.immitis. :	SCKNPVAAALLKK	SAIMDDANGKITQAYGEVKSR	PQSFDGKSHPRE YEQLEA	RETIRKDKTDTLSK	: 541
S.cerevisi :	PSDYTTYPSOTATNISR	I DSELSERDEVILTIERVLSQI	HDNETKSLOKTLKSTSK	KTOWSLKTLEVILKESSKDENGEAOTNDD	: 687
A.gosypii. :	TGDMYPSQSATSVSR	AIFEVINLMKDMADSYQFLYED	RNQEVQDLVKMLKSMSA	TVTSLDMKVLEILEVKDMNNIT	: 640
		рб б		6	
	760 *	780 * 8	100 * 1	320 * 840	
M.grisea.s :	LLPPEQAFGIDGELETATG	kvkavvctlnrlh <mark>v</mark> eglverel	DASMN		: 601
P.anserina :	IEADDQASKTEEEVAAAKK	QVLA FRROTO ALEKA EQNL	ASVTNG		: 588
F.graminer :	LEPEEAASKOSTEANLAKH	OVLSLITHOSRINIORAVDSEL	SRIN		: 574
T.reeisi.s :	LEPDDVAAKVMSEANLVRHI	NVLSLITHONRLHIOQAVENEM	SKLNGNASG		: 594
B.cinerea. :	EEGEENSIAAKAHLVGLQE	RVQSLVERQQQLL <mark>L</mark> LSRTQHEG	SKINGHGGG		: 586
M.graminic :	AASRGDERDEELIAELQELIA	ECEGITEDEQDIALKEL SEEE	RALEHAPQDDIL		: 623
A.nidulans :	EAAEESSDAOLGRYEOMRDI	YYESII EOIORARIKERI	1PQP		: 571
C.immitis. :	EAESVPFEDLVSRHDGAKQ	KYASLLEGTQELTLSKRIGPHG	GNIAPPETENNKPERLDGA	\TTT	: 605
C.albicans :	QQVTDDDDPTSVHGNYLHLDF	KRDHILQEEIYRL W NDLTYQEL	HQQDELDKVEHSYR		: 741
S.cerevisi :	FEILSRLQEQNTEKLRKRLIRYKR	LIKOKLEYROTVLINKLIEDET	QATTN		: 738
A.gosypii. :	IEMDSDAENIAGLAQAESEAQA	6	.VAI 6 2		: 009
M.ariges e	× 860 *	880 *	900 *	920 * 940 Smvctgektdoverternetge-tarn	: 665
P.anserina :		QQQEEEDDSPEERLKLAAQ	LHAMLVEQEAAEVEYVEAR(MLGTGKKIDQYRHLLCSCLPPEDQDM	: 653
N.crassa.s :	AEHPDPPAAQAHQQQPGPSSQDTE	VEDQDREEEEDDYTHRLSLAAE	LRSILQEQRSAENDYVEAR	MLGTGERIDKYKHLLMSCLPPDEQEN	: 728
F.graminer :		GEGGGQEESYDKRLRLARE	ISSLLAEQRKAEAEYVEAL	SMVGTGDKIEKYKKLLNRCLDTKEAES	: 639
T. reelsl.s : B cineres		GDGGGGDDSYEERLALARQ -OVNGSADLEESENERTMWAOU	SQMLMEQRQAETEY DAL:	MACGODEGELYKRYLVRDLCVDECECT	: 659 · 655
M.graminic :		-MDDDDDEEGNSVNHKMMI VRE	LQDLMQQRKTLFKTIVONL	VAGLGDROGEYKRLITGALGVKEEDV	: 690
S.nodorum. :		NKTNSPVDVSEKLRLALL	LHRAQLERRELVREVVGNL	SVAGMSERQGTYKKLIAKALGEREEDV	: 665
A.nidulans :	AST PVPTQT	AVIGSSSPEQDRLLTTFQLSRA	LCSEQKIRRAAVKELAQQR	ADAGVSTKEDVHRKIVALATGLKEEELDP	: 650
C.albicane	TTTTAAAAT.	AAAPPSSEKENELAQKIELIRK RLHEKVLDASSEVIDOTHOOCN	HEOLELAKOLOVET KPK	ADAGEDARLNVHRRUVAMATRLPEQDLDP AT VDET SKLUKNVPTDEN DNSKUTTDUVD	: 684
S.cerevisi :		NTVEKDNNTLERLEL	AQELTMLQLQRKNKLSSLV	KFEDNAKIHKYRRIIREGTEMNIEEVDS	: 801
A.gosypii. :		VIAAPADDATHSSKETLADD	RELTVLQLRRKHKINRLI	SLLCGNSKIHKFRKMISQGTDMDISEVDN	: 757
				g 6	

Figure 6 : Alignement des séquences des homologues de MgSwi4, chez les espèces fongiques étudiés. Les domaines fonctionnels importants sont entourés

Conservation des domaines chez les différents champignons

Le facteur de transcription Swi4 de M. grisea possède un domaine « KilA-N » (0 à 140 aa) très bien conservé et un domaine « Ankyrine repeat » (380 à 620), moins conservé mais qui existe chez différents espèces fongiques. Par ailleurs, à partir de l'acide aminé 620, la protéine est très peu conservée.

2.3. Arbre Phylogénique



Figure 7 : Arbre phylogénique des orthologues de MgSwi4 réalisé par PhyML

AN: Aspergillus nidulans, BC: Botrytis cinerea, CA: Candidas albicans, MG: Mycosphaerella graminicola, MGrisea: Magnaporthe grisea, TR: <u>Trichoderma reesei</u>, SN: Stagonospora nodorum, AG: Ashbya gossypii, CI: Coccidioides immitis, FG: Fusarium graminearum, PA: Podospora anserin, SC: Saccharomyces cerevisiae et NC: Neurospora crassa

3. Facteur de Transcription Swi6

												4.																			
Query seq.	t i	i i	į.	125	2	į,	í.	2	50	- 1	1	375	1	-le	ŭ	5	00	0			625	a.		1	4	750		4	a.	1	895
Specific hits																		ANI	(_	MIZ									
Superfamilies				6	i18-M	1 sup)									ANK	(si	uper	fan	nil	J NK su	Perf	am								
Multi-domains																				E				3	9 3	SMC	C_p	ro	k_B	\$	K

Figure 8 : Schéma des domaines et acides aminés fonctionnels de Swi6

3.1. Identification des domaines fonctionnels de Swi6

Plusieurs acides aminés sont importants pour l'activité de Swi6 :

> Acides aminés et domaines fonctionnels de Swi6

KilA : Ce domaine intervient dans les interactions protéines – acides nucléiques et est l'homologue du domaine « DNA Binding APSES ». Le site de fixation à l'ADN se trouve entre les résidus 71 et 92 (H-T-H motif), au sein du domaine KilA.

ANK : Le domaine « ANKyrin repeat », intervient dans les interactions protéine-protéine. Chez Swi6, il existe 3 domaines ANK à la suite. Dans chaque domaine 33 acides aminés sont conservés entre les 3 domaines.



Figure 9 : Alignement des régions conservées des trois domaines « ANKyrin repeat » chez MgSwi6

3.2. Alignement avec les séquences orthologues de MgSwi6

	*	20	*	40	*	60	*	80	*	
M.grisea.s		MSOTGSOPOPS	08	SFRSYSDON		-VP00	P	OEAS		- : 31
P.anserina		MQLSQQMTASQQS	HQY-PQE	SSQQPFSMSQE	SSQTLNLQSS	Y	RQYTDPAP	Q		- : 50
F.graminea	:	MSQQS	QS	GMGNSFRGGY-			NGDP	DNS		- : 24
T.reesei.s		MsQQs	QI	GRTASFNRGY-			-SGTVEGP			- : 24
B.cinerea.		MSISMSQGSQPGG	LMMQE	GGPFRQYDSTG	;	A	MNRRDMAP			- : 38
A.fumigatu		MSYSQSSLGSANG	-IAFSQS	OMGSFNASOSV	ASTPRATEPPI	KSSQQ-SMS	FSYPNSLP	GGARGSFGGE	DDTNGYG-SMV	Q: 77
A.nidulans	MTTSNHHQQRPSLS	MSYSOGSIGSANG	-MSFSQS	OMSSLNASOSV	ASTPRATEPPI	KSSQQSAMS	FNYSNGLP	NGARASFSGE	EDMNGYG-TMI	- : 91
N.crassa.s		MOPPOLGGASOOS	OF	SSOOSFSMSO-	SSOSVYROYT	DPPNR	LHNDHAVP			-: 48
M.graminic	:MPPTPC	OSYOHMAOOSPOY	OT-SSO	AAHSSYPNHGY	SVSFDAGOHP	ASOPA	PNYAOSEP	NGPVSNPGFS	RSFGDONMKOM	R: 81
S.nodorum.		MPPAPDG								-: 7
C.albicans	MDSE	IHIGDLTTOSIOC								- : 17
S.cerevisi		MALEEVVR								-: 8
A.gossypii		MSAGSAVSAT-								- : 10
2 11		-								
			KilA							
	100	*120		* 14	10 1	* 1	60	*	_180	
M.grisea.s	:PIYTAVY	SNVEV-YEFEVNG	YAVMKRI	.G <mark>dsk</mark> lnatQII	JKVAGVE <mark>KG</mark> KRI	TK <mark>I</mark> LEKEIÇ	T <mark>GE</mark> HEKVQ	GGYGKYQGTW	IKYERALEVCR	Q : 117
P.anserina	:PAEHALY	SGVGV-YE TEA NG	TVMRR	2SD <mark>G</mark> WLNATQII	JKVA <mark>GVE</mark> K <mark>G</mark> RR'	TK <mark>I</mark> LEKEIÇ	TGEHEKVQ	GGYGKYQGTW	IPFERGLEVCR	Q : 136
F.graminea	:GIYSASY	SGVDV-YEMEVNN	AVMRRF	R <mark>N</mark> D <mark>S</mark> WLNATQII	JKVA <mark>GVD</mark> K <mark>G</mark> KR'	TK <mark>I</mark> LEKEI <mark>C</mark>	TGEHEKVQ	GGYGKYQGTW	IKFERGLQVCR	Q : 110
T.reesei.s	:QIYSASY	SGVDV-YEMEVNN	AVMRRE	RHD <mark>S</mark> WLNATQII	JKVAGVDK <mark>G</mark> KR'	TKILEKEIÇ	I <mark>ge</mark> hekvq	GGYGKYQGT%	IKFDRGVEVCR	Q : 110
B.cinerea.	:QIYSAVY	SGVDV-YEMEVNR	AVMRRE	RKD <mark>S</mark> WLNATQII	JKVAGIEK <mark>G</mark> KRI	TKVLEKEI <mark>I</mark>	IG <mark>D</mark> HEKVQ	GGYGKYQGTW	RFERGVEFCK	Q : 124
A fumigatu	: YQEEYRPQIYKAVY	SNVSV-YEMEVNG	YAVMKRF	RSD <mark>SWLNATQ</mark> II	JKVA GVV K <mark>A</mark> RR'	TK <mark>T</mark> LEKEI <mark>A</mark>	A GEHEKVQ	GGYGKYQGTW	VNYQRGVELCR	E : 170
A.nidulans	: YHEEFKPQIYRAVY	SNVSV-YEMEVNG	YAVM KRF	RS <mark>dG</mark> WLNATQII	JKVA GVV K <mark>A</mark> RR'	TK <mark>T</mark> LEKEI <mark>A</mark>	A G E HEKVQ	GGYGKYQGTW	VNYQRGVELCR	E : 184
N.crassa.s	:TIYSATY	SGVGV-YEMEVNN	VAVMRR	2KD <mark>G</mark> WVNATQII	JKVA <mark>NID</mark> K <mark>G</mark> RR'	TK <mark>I</mark> LEKEIÇ	I <mark>ge</mark> hekvq	GGYGKYQGTW	IPFERGLEVCR	Q : 134
M.graminic	: GGYAPEPQIYTAVY	SGVSV-YELEVHN	AVMRRF	RSD <mark>G</mark> WLNATQII	JKVA <mark>GVD</mark> K <mark>G</mark> KR'	tk <mark>v</mark> lekei <mark>i</mark>	PG <mark>E</mark> HEKVQ	GGYGKYQGTW	ISYQRGREFCR	Q: 174
S.nodorum.	:KIYSATY	SNVPV-YECNVNG	HVMRRF	ADDWINAT <mark>H</mark> II	KVADYDK PA R'	TRILEREVÇ	K <mark>ga</mark> hekvq	GGYGKYQGTW	PLEEGRHLAE	R I : 93
C.albicans	KLFETHI	NNNNK-NKTINNN	CANESTI	YSSIYSGVKT	QÎTMKLDS	DKNNN	NNNNNDL	KFDNKSHEEI	UVLRRVQDSFV.	N I : 97
S.cerevisi	TLGPH	NEIPLTLTRDSET	CHFILK	IFLPILQQYHDI	GNINETNEDS	FPTDEERNK	LLAHYGIA	VNTDDRGEL	IELEKCLQLLN	MI: 93
A.gossypii	QIYSAKY	SGVEV-YEFLHPT	SIMKRE	ADDWVNATHII	KAAKFAKAKR'	TRILEKEVI	KDTHEKVO	GGFGKYQGTW	MPLDIARR AQ	к: 96
	а у	s ye n	6	d w nat i	ka kr	t le e	g hek q	gg gkyqgtv	16	
	* 200	*	220	*	240	*	260	*	200	
M grigos g	VOULT VOU	PNDDCGVCOAN	TNUTTER	OAMAAODEEMS	NGCA-DODM	NNCCCT	ERKNIGOR	ацеамиратеи	- AREDSTOR	202
D opcorino	VOWURVIUNII TUUR	DCODCCGNDD	VDTTTT	OAMAAQKIIIII	MACCOPCD		E FIGHE SQ1	ACUATMATCE	- AREDSEGERG	- · 202
F.anserina E.grominos	. YOVERTIBETIEVE	MCODCCVACB-CD	TNUTTER	O MA A O PEPTY	NOGVDCDV		ERVNICTO	ACUAVAATO	AREBSEAFAN	223 c . 107
r.graminea	YOVERLIPDIT	MGQDGGVAGR-GL	ENDERKE	OAMAAQARADI	NACADGRAD		FERNICOU	AGUAVAALDI	AREDSEGERS	8.197 - 106
D. giporeo	YOURFLIDDIICYE	MGQDGGVAGR-GL	TDURDER	OAMAAQKKKMI	NAGADGRPI	NGLSGI	FERNISSI	AGRAVAALDI	AREGSEGERN	190 . 210
A fumigatu	. TOVEBEEERFEEFE	MCDNCTANACADT MCDNCTANACADT		O MA A O PEPTY	CVDNP	CMGODOOCT		A DE AVALATOR		210
A nidulang	VUVERITEDITEVE	MNDNGTAASCODS	LDTEIKE	OAMAAORKELI OAMAAORKELI	SGVDNR	SMSQFQQGI	DEONIGET	ATAVNALS	ARTERSTAR	200 272
N craeca e	YOWEFLISKLUTHN	RCORGETCN	VDTEIKE	OAMAAORKRMY	NASSOFNR	5115020001 CTCSTCT	FEGNISRI	ASTAVAATSI	-APEDSPARKG	- · 218
N.Crassa.s	. TOWEBEEFSKEETINK	VGADCEGCDCA	ORTITE	OMMA AORIGNI	MAGACODDDD	NCODOSNET	EPCMICDE	TOTAL A MALE	A A DI MS DD DD D	245
g nodorum	NOWLHKMRDIEDVA	PC	RCDEDAD	KHATAASMEME	DDDO	NGQEQDNGE	CE SHODEL	MAAMAARNE	KNAVGLEATOS	. 200 R · 156
C albicana		VI.DTSOVDNYFDN	FTISNIE	YEGSSNEDO	LDLR	KHONT		YDKAWNT.AL	EDT ETTKKLE	г. · 179
C.arpicans	TNIECI FODARREE		CKI MEME	TEGSSSNIEQ	GKDIN	INIQUE	ODMGTDGD	AUDEL CODIE	EDITEITRADE ETETDEGVIDA	D . 175
A cogevnii	REWIERTROIPE	PRDCSFSDDOA	DKUUUU	PADGARKETTR	STREEN STREET	AT. DKBBCBE		VANVACOTON	VEDEDEDETDV	g · 188
A.gossypii	6	KKDGDEDEEQ A	D	a a v	SEFLENGQLDA 7	ABERRIORE	EINNINDDD	a a k	T D	5 . 100
			r							
	*	300	*	320	*	340	*	360	*	
M.grisea.s	: RNGPTRAPSFQRQI	STQSIDDFHG	GNSQASN	IFAENF PPQ-	DVNMAF SA	GSEF	QPGGLNGT	EPPRKRQRMI	MT PANS F GAYA	N : 283
P.anserina	: RNPPSRAPSFQRQE	SMQDAGDFPE	-NSQHS-	FVSNYGAP-	ESAFGS	QETÇ	PVVNETVE	-PARKRQRI-	LTPAHSFGGLT	P : 298
F.graminea	: RNGASRTASFSRQA	SMQNGDDFPS.	-NSQQS-	FASDYGQQ-	VDSATSTO	QQAN	NSVQMTEP	DPPRKRQRVI	MTPAESFNGYG	- : 274
T.reesei.s	: RNGPTRAPSFSRQE	SMQNGDDFPG	-NSQQS-	YASDYTNP-	ASSQHQQ	PQLN	GSVSMPDN	EPPRKRARVI	MTPADSFASYS	- : 273
B.cinerea.	: RNGSARPPTFSRQS	SQQMSQETTF	PNSQQSM	IQSFASNEGLTN	IGDSAYAN	QSQFQFSHT	GREDGDFQ	EPPRKRRES	LEPLNDSQQSM	N : 298
A.fumigatu	:ADSRRSSIMRKS	SHQIGSQESQLPT	FSSQQSM	IYSVASDSGFGS	NAQSNGRENG	PDVA	TFETEESI	EPPRKRIRSS	SNQMPSFGLQR	E : 345
A.nidulans	:GDSRRLSVIRKE	SQQMGSQDAQPP-	FGSQQSE	YSAASDSGFAS	NIPTNGRYAP	QDAM	SFEQEEPM	EPPRKRIRSS	QAFSLPI	D : 354
N.crassa.s	: RSGPSRAPSFNRQS	SMQDVADFP-	-NSQQS-	LVSTEYATÇ	TQNADSGEGS	QTTC	PLAGDGLE	QPPRKRQRV-	LTPARSEGGQT	P: 298
M.graminic	STTRRPSSQQDE	AGSQYSDVDR			LESGYNT	QP	NG	EPPRKRMRHI	DQDMGP	- : 314
S.nodorum.	VTNASQQSQVSEDE	YEASQT			RSQIERE	ET				- : 185
C.albicans	: VDVHDFDKLPKANK	RLYEED			ANSDSDI	LD		SESKKQKLDF	KSKKDL F SNGK	A : 230
S.cerevisi	: SDSTPNTARGKPND	DINKGP			SGDNENNG	TD	DNDR	TAGPIITFTH	IDLTSDFLSSPL	K : 231
A.gossypıı	SISSNQLP <u>S</u> LQSTI	HRSISIEHNRNKA	.PPQ		PNHKMEE	LDIEDGLSS	DIETSICT	NMVYAGHSNA	RLPMNTSLLPD	K : 264
								h v		
	380 *	400	*	420	*	440	I	* 4	60	*
M.grisea.s	N-SQMQAYA	DAF PGS PTE PNDS	FIYTQHA	AANDTLLQQQH	IDQQT PLQP	LPYEQSVEA	ENKRSMLM	SIFMNDG	-MSEQARVDTL	R : 365
P.anserina	: TYPS <mark>MNPYA</mark>	ENF PGS PTE PNES	FIYSRN-	EPEYAPO	PLRP	LPYETAPEA	EAKRSMLM	QLFLNTA	-GPDENQKSIL	R : 372
F.graminea	:QNVDMYA	AAYPGSPTEPNES	FMYTQSA	IHDR-SPIEEG	NGPLEP	LPYEMSPDV	ENKRNVLM	GLFLETT	-GTDPTKNDTL	R : 352
T.reesei.s	QNIDPYG	SNFAGS PTE PNES	FVYTQNI	LNDRDAVVDEG	NGPSP	LPYEMSPDV	EMKRSMLM	GLFMDS	-ATEELSHDML	Q : 351
B.cinerea.	: GGYNMSLR	EPSPTEPNDS	FFYRQEI	GLSQEI	EAPMPLPP	LPENQHNGK	KGLTLI	SLFHNENSYI	GTNEHNDQEAF	R : 374
A.fumigatu	: H-SS <mark>I</mark> SMQ	EPTPTEPNDS	FYQEMDO	PASMADGNRHG	;TDP	LPPATTPER	FQKMKLIM	TLFLDKR	-TKDFSNHPAL	ь: 418
A.nidulans	: G-TSMSMS	EPTPTEPNDS	FYQDME	LHHIDEG-RHG	;LDP:	LPPATTPER	FQKMKLIM	TLFLDKT	-TKDFSTHPAL	I : 426
N.crassa.s	GHQP DPFNAGNIA	NGDSGS PTE PSNS	FNYDQVI	ANDGDASYAL	PLRE	L PYENNADA	EAKRGMLM	GLEMDAN	-GPEEAIQAAL	c : 382
M.graminic	:PELPLDA	SMRSMTPTEPNES	FLYEHAI	MQDSVNSAGEI	IALPE	LPNPTTEEC	QEKMNLII	DLFAEQG	-RTDYASHPAL	Q : 392
S.nodorum.		PDNE TVVSES	MLGDHDM	ILDASQYSTGSF	KRKRGVDQ	SMLDQQHC	IWADALLD	YFMLLDH	EAACAWP	E : 253
C.albicans	ITKKLIAS	SVSQNSNYF	FTLPAVI	IDNSNSEIAND	DIK	VKLGDVFKR	DDEKPDG	SFEDVKS	AFADALS	r : 299
S.cerevisi	: IMKALPSP	VVNDNEQKMKLEA	FLQRLLE	PEIQEMPTSLN	INDSSNRI	NSEGGSSNÇ	QQQHVSFD	SILQEVN	DA	F : 303
A.gossypii	EEPGESSS	LPSSPSEFSAF	MVFDTQF	MGSATSPLGSM	ILPRYMAPSRPI	RTSELDQKA	NEYLSKLV	DYFINCEVQ-	NNGAVPMELLN	P: 349
		pe s	f		p			f		

		500 *	520	* 540	∗ANK 2 560
M.grisea.s P.anserina F.graminea T.reesei.s B.cinerea. A.fumigatu A.nidulans N.crassa.s M.graminic S.nodorum. C.albicans S.cerevisi A.gossypii	QIHPRI LDMPID SQCHTALHMAAT NMIPOE LIGPIDAOSNTALIMAAT GFTPLELMPID LQSHTALHMAAT TFTPLE LMPID POSHTALHMAAT TMSGVE LDIPID KSANTAVHWAAT QLIGEI EE PLDEYRNNALHMAAM NVSPOE LSPID TOSHTALHMAAT QLIMEI F.MPLDASANNALHWAAT PPPSIN LIRPID KSANNALHWAAT STPETIT DID KSGOTALHAST PNTQLA INI PVDEHGNT ELMILTS PHSSPIISMID SEHHTAFHWACA PDD a hSaa	LSRMTILRRDIEAGA SI LARMPLIRALVEAGS SI LARMPLIRALVAGS SI LARMPLIRALVAGS SI LARMPLIRALVAGS SI LARMPLIRALVAGS SI LARMPLVKALVKKGV SI LARMPLVKALVKKGV SI LARMPLIRALTIHAGS NI LARMPLIRALTIHAGS SI MGDVGVKEDIHRGS SI MGDVGVKEDIHRGS SI MGDVGVKEDIHRGS SI MGDUGVKEDIHRGS SI MGDUGVKEDIHRGS SI MGDUGVKEDIHRGS SI MGDUGVKEDIHRGS SI S 6 66 16 G	PFRVNTSGETPLMRA PRVNASGETALURA PARVNGSGETALURA PRVNASGETALURA IYRVNLRGETALURA IYRVNLRGETALURA IYRVNCGETALURA URGNAAGSPLURA URGNAAGSPLURA IDGISNNIBTPLMRA IDGISNNIBTPLMRA PRGNAGSTPLMRA RAUGOMGESCLVKA PRALNQAGETPLMRA I G23 L G	CIVTNSHDNDSMBATTD- CNATNSMEHGC FDLLD- CLVTNSQDHNSFDDLE- CLVTNSMDQGSFDDLE- CLVTNSMDQGSFDDLE- VGTRNLDYRSFRLDQ- CTVTNSMENNFFRLDQ- CTVTNSMENNFFRLDQ- VLVSNCKEHSC FEVLE- VLVSNCKEHSC FEVLE- VMFTNNFDKEMSSTKTSLSM VKSVNNJDSGTEALLD- SLVHNSYTKRTYERIFQ- N p 6	IGNIN EVRPSKERTVI HHI : 457 IGGTIDVRDKGRVVI HHI : 464 IGGTIBARDHKGRTVI HHI : 464 IGSTIEFRDHKGRTVI HHI : 443 IGNIGFONRGRTVI HHI : 443 IGNIGFONRGRTVI HHI : 446 IGNIGFONRGRTVI HHI : 510 IGCTIDVTDKGRTVI HHI : 510 IGCTIDVTDKGRVVI HHI : 474 IGPLEVRDVGRTII HHI : 474 IGPLEVRDVGRTII HHI : 349 IVPONHRTDRFSIVE HHI : 349 IVPONILDKRKRTVE HHI : 3441
Mariano a			* 620		10 ANK 3 \star 6
<pre>H.gribea.s P.anserina F.graminea T.reesei.s B.cinerea. A.fumigatu A.fumigatu A.nidulans N.crassa.s M.graminic S.nodorum. C.albicans S.cerevisi A.gossypii</pre>	ALVSAVQ-CRNVCTRYVESUJB ALVSAVQ-CRNACTRYVESUJB AVTSAVK-CRNAASRYVESUJB AVTSAVK-CRNAASRYVESUJB AVTSAVK-CRNAASRYVESUJB AVMAATGGCGHVSAKHVEALDEF AVMAATGGCGHVSAKHVEALDEF AVTSAVK-CRHYASRYYESUJB AVTSAVK-CRHYASRYYESUJB ATTSSS-NKYVCARMYJDCIIK TQIDKNDFREYTKIDY ITTSGMT-CSAAAKYYDIIMG VKRKSNTPSALYYEDVLSK a g YI 55	VVR.GSNPSSQS VVR.GSNPSQS VVR.GSVPNSQA IVRIGSPNGQS IVRIGGTSISQHAP IVRIGGTSINQQS IVRIGGTSINQQS IVRIGGAPSQE IVRIGARANGS IVRIGARANGSQE IVRIGARANGSQE IVRIGARANGSQE IVRIGSARANGSQE IVRI	TINGGAT USANA TYGSNGLAS FQTNGNGPSNSQAAS FQINGHGLNGSQS-I JINEPNF NGVEGTDGN-KTRTG (STASQPGMPLSN VGIGDRKG AAQEASQESSSQEAR	IR DUGAR MGE UNAOINE PEMGLAREMEE UNAOINE PEMGLAREMEE UNAOINE HAMDICREMEEUNAOINE EVITLGREISE IVNLRIDO EVITLGREISE IVNLRIDO REMGLAREMEE UNAOINE GEVSUVELSE UNAOINE GEVSUVELSE UNAOINE ENDDEWITLANDAOINE ENDDEWITLANDAOINE - DES POYRIET LINAOINE f 66NaqD	SDTAINYAARIGNASIISO 547 SDTAINYAARIGNASIISO 547 GDTALNIAARIGNASIISO 532 SDTAINYAARIGNASIISO 546 SDTAINYAARIGNASIISO 552 SDTAINYAARIGNASIISO 572 SDTAINIYAARIGNASIISO 488 STPINANIYAARIGNASIISO 500 GTAODAARINAARIGNASIISO 500 GTAODAARI 500 GTAODAARI 500
	60 * 680	* 700) *	720 *	740 *
M.grisea.s P.anserina F.graminea T.reesei.s B.cinerea. A.fumigatu A.nidulans N.crassa.s M.graminic S.nodorum. C.albicans S.cerevisi A.gossypii	LLEVCASEHLANRS SIRTDEGIG LIEVCADERIANTA SIRTDEGIG LLEVCADERIANTA SIRTDEGIG LLEVCADERIANRA SIRTDEGIG LLEVCADERIANRA SIRTDEGIG LLEVCADERIENNS KIRTSDEGIG LLEVCADERIENNS KIRTSDEGIG LLEVCADERIENNS VCARDEGIG LLEVCADERIENNS VCARDEGIG LLETHADISIENNS CARDEGIG LLERIHADISIENNS CRADEGIG LLERIHADISIENNS CRADEGIG LLERISTINIS	VDSDGAMKTK LAHGHSA-SGETGERN-/ SENAENKINGEANVEN-(GENAEGKINGEANVEN) UDMVDPNAQSQQGGSI VDMVDPNAQSQQGGSI VDMVDPGSSQPAGSI IADAETN-DDPAQEKTG/ VDEPCEQFYENGGLASQOI LNQRRRMHGRTRQASSSI RDLGSIENDDQIFDLISI RSLQNTNGGDENSKMVS RFVKTIQPTQRGNYHENH	DDSGGDVENGDVGGS APQGSRQKSRENSDE SVVGTNQRSRESSDE DARGSNQRSRESSDE PDKRGNKATRETSGE KNDSFIDHLAKTKKE SSDTFLAQLAKTRKE ATTGSGHKSRETSDE DMDASNMHPSQVSSD PFAPPLEHRLNGHIA FGLEFLNKRLEIGGE SKGDYDQKNGKAKK RASHSPLNSASAAGG	SQKT	
	760 *	780 *	800	* 820	* 840
M.grisea.s P.anserina F.graminea T.reesei.s B.cinerea. A.fumigatu A.nidulans N.graminic S.nodorum. C.albicans S.cerevisi A.gossypii	: EBIKNKQANIDSIHATIKI GEIKKKQASIDTIHSIKT SEIKAKQASIDTIHSIKTRT (EIKAKQASIDTIHATIRT KEVBAKQASIDTIHAKIRE KEIATDISKKOEKFEHWHSKIRET KEIAASITSKQEKFEHWHSKIRET ELIRNKQESIDTIHSQIRT KVAFTLIEKCELAAAYESEIQEK KVAFTLIEKCELAAAYESEIQEK KIFNSIQOLISNTNVEYENIINSK KDYENETVQYNEKIEKIHKEINEQ RAIPEVINIMKDMADSYQFIYEDR	TTDVNDLREKLDEAQAR SAQVGEAR:NLEALQAR STULGEAR:SLEHLSAT STULGEAR:SVEOITAT SASLGEER:AMEAKQER AKARQIEO:RLDLKSK: AKARQIEO:RLDLKSK: SSQVGDAR:TLESLQEK SAIGREEVEOLHERKER EAESFDAE:VVKRQAE] REDIKQLD:ALHDATIV? REELANSREOLANVKQLE NQEVQLVMLKSMSAT 6	VKAQQLARQK VTILC LTAQQLARQK VAILT LKKQQLARQK VAILT URQREBRLIKIANIT SSNRVELSRIKINE SIDRTETSRRIKNE LKAQQLARQKIVE VRLREBRQVKIANIR LEAVRKQVAELQING CANNRFNTKKITEKL KDEYSLMQBQITNIK TSLDMKVLELEK	IRAEERERYR	: 67 : 697 : 697 : 665 : 666 : 666 : 745 : 745: 745 :
	* 860 *	880	* 900	* 920	* 940
M.grisea.s P.anserina F.graminea T.reesei.s B.cinerea. A.fumigatu A.niulans N.crassa.s M.graminic S.nodorum. C.albicans S.cerevisi A.gossypii	LTQLEQTTGRRD 	IASANG "BAE SNTIFAT] LGEBQD "AAELRAVITEA -NPSSS"ETELSAMIEAA -NPSSS"ETELSAMIEAA MFTFSD "KAAVEROYGRI ADQDSGVDMTEFDAIPH VASANA "BMELESALEIV RDVVPG"LSEGAQNVLSY RDVVPG"LSEGAQNVLSY IDDTKE DADAPFI TPQJ YDADE PSKVEFLSDFLBI KVLVSLLEKSQRVT RK(INATTNA RQQAADD ADDTSD RGSNRNYGKDLEAC STFDPTSG VKTQSP VKTQSP LCHNTPQP VLQKLKKGKDP VKLQKNYEGDISKLL CVEEEKKAIES		PDADAKIPSSALIRATIE : 729 PHPAARIPSAAVLRATIR : 767 rGGEGLIPSAAVLAATRA : 711 rASEGMIPSATIRATRA : 712 MASEGMIPSATIRATRA : 712 MASEGMIPSATIRATRA : 721 MASEGMIPSATIRATRA : 721 MASEGMIPSATIRATRA : 702 SAFLKSITSPETIQOTK : 806 PDSRPSIPSAAVLAATRA : 745 PDSRPSIPSAAVLAATRATK : 745 PDSRPSIPSAAVLAATRATK : 745 PDSRPSIPSAAVLAATRATK : 745 PDSRPSIPSAAVLAATRATKA : 726 PADDATHSKETIAADLE : 713 1 : 6

Figure 10 : Alignement des séquences des homologues de MgSwi6, chez les espèces fongiques étudiés. Les domaines fonctionnels importants sont entourés

> Conservation des domaines chez les différents champignons

Le facteur de transcription Swi6 de *M. grisea* possède un domaine « KilA-N » (125 à 190 aa) très bien conservé et un domaine « Ankyrine repeat » (478 à 670 aa), moins conservé mais qui existe chez différents espèces fongiques. Par ailleurs, la protéine, en dehors des domaines n'est pas bien conservée.

3.3. Arbre phylogénique



Figure 11 : Arbre phylogénique des orthologues de MgSwi6 réalisé par PhyML

BC : Botrytis cinerea, CA : Candidas albicans, MG : Mycosphaerella graminicola, MG : Magnaporthe grisea, TR : <u>Trichoderma reesei</u>, SN : Stagonospora nodorum, AG : Ashbya gossypii, CI : Coccidioides immitis, FG : Fusarium graminearum, PA : Podospora anserin, SC : Saccharomyces cerevisiae et NC : Neurospora crassa

> Comparaison entre MgSWI4 et MgSWI6

La comparaison entre les séquences de MgSwi4 et MgSwi6 confirme les données obtenues sur le site de Broad institue :

Les deux protéines ont une e value de 1.6 10 -22 avec 65% d'identité et 99% de similarité.



Figure 12 : Alignement des protéines MgSwi4 et MgSwi6

4. Facteur de transcription Rlm1

	1					200			300			400			500			600		. 3	702
Query seq. DNA binding sit	e	н																			
putative phospho dimerization inter	rylation rface 🗼 🎽	site 🛓																			
Specific hits	MADS_ME	F2_lik	e																		
Superfamilies	MADS su	Iperfam	i																		

Figure 13 : Schéma des domaines et acides aminés fonctionnels de Rlm1

4.1. Identification des domaines fonctionnels de Rlm1

Plusieurs acides aminés sont importants pour l'activité de Rlm1 :

Acides aminés fonctionnels de Rlm1 (Figure 14)

PHO : Le site de phosphorylation de Rlm1 se trouve au niveau des résidus Y 55 et Y 57 (motif YEY), chez *M.grisea*. Cette phosphorylation conduit à l'activation de Rlm1.

SF : Le site de la fixation à l'ADN se trouve entre les acides aminés 1 à 40.

MADS : Le domaine MADS (MCM1, Agamous Deficiens)) appartient à une famille de domaines caractéristiques de facteur de régulateurs transcriptionelle. Au milieu de ce domaine, il y a la région de fixation à l'ADN, appelé « MADS box ».

MAD:	S SF			Site de pl	hosphor	ylation					
M.grises.r : : P.anserina : F.graminea : : T.reesei.r : A.fumigatu : A.fumigatu : A.nidulens : M.graminic : N.crassa.r : :	IGRRKIEIKAIKI KGRRKIEIKAIK GGRRKIEIKAIR KGRRKIEIKAIR KGRRKIEIKAIR KGRRKIEIKAIRI IGRRKIEIKAIRI	DRNRSVTFLKRKG DRNRSVTFLKRKG DRNRSVTFLKRKG DRNRSVTFLKRKG DRNRSVTFLKRKG DRNRSVTFLKRKG DRNRSVTFLKRKG	GLFKKAHEI GLFKKAHEI GLFKKAHEI GLFKKAHEI GLFKKAHEI GLFKKAHEI GLFKKAHEI	40 SVLCSVDVAV SVLCSVDVAV SVLCSVDVAV SVLCSVDVAV AVLCSVDVAV SVLCSVDVAV SVLCSVDVAV	IFGTIKFI IFGSIKFI IFGNIKFI IFGNIKFI IFGHIKFI IFGHIKFI IFGNIKFI IFGNIKFI	60 Y SYSSGDMRE Y SYSSCDMRE Y SYSSADMRE Y SYSSKDMGC Y SFSSCDMQI Y SFSSCDMQI Y SYSSSDINE Y SYSSS 16	* LITRYTY- LITRYTYV LITRYQY- LITRYQY- TLGRYQY- ALYRHKF- TVGRFQY- TLQRYTY- 6 R 5	80 CFKFRSPVLI	SLANMSÇ	* HGGA HGGP HGGP YGP YGP YGA YGGA YGGP YGGP ggp	: 75 : 94 : 75 : 75 : 75 : 75 : 75 : 75
M.grisea.r : 7 P.anserinea : 8 F.graminea : 8 T.reesei.r : 1 A.fumigatu : 1 A.nidulans : 1 M.graminic : 1 N.grassa.r : 1	100 PEHKGPSDENCG- SEHKGPADENCG- SEHKGPADENCG- HEHKGPEDENCK- BEHKGPEDENCK- BEHKGPCDEADEK HEHKGPCDEADEK HKGPD5ng	* 120 -DDDDEEEDD-GT -ADDDEEEDDENGT -NDDDDEEEGDENGT -NDDDDEEEGDGT -RDDDDDDEBET -RDDDDDDEBEA GGGDDEDEGGA -ADDDDDDENGT Ddd gt	PEPLDQP PEPGSEV PEPRGADG PEPRGADG PAPEEMQPT FAPEEMQPT FAPEFHAP GEDHGEERG NSQGE P	* 140 MDAHMMPPHFC MDAPMLHPHFC VENQMMPPHFS MEAHMMPAHYQ TQNPPAVVPAF SQNPPQMMAVI TPDHSMLQHAQ QHMMYQ) QQQPFPPP QQQPFPP QQPPQFP IIPSHPGFQ PHPGFQ MGNHPGFQ QPNPPVSYP	* 1 VMRHYTPSAS HIRHHTPSAS QIRHQTPSAS QIRHQTASAS HVNHAP-SAS HVNHAP-SAS HVNHAP-SAS HVRHGTPSGS FIRHTSISDS 6rH SAS	60 PPIPNG PPIGNGG- PPVPNG PPISNG PPING PPIPNGA- PPVPNG PPVPNG PP6 NG	* -MFGPGP GPFQAHPGH GPFQAHPGHPF IFFDF MPFDP MPFDP MPGPQFN -AFGPQPGH(pf	180 SVPRGHTE RGHTE PVQRTHTE HLQRSLTE RHGTE RHGTE RGPSE DMSRAHTE R 3E	POPQML POPSIG POPSIG POPQGA POPQGA POPQGA POPQGA POPPFV PQP	: 160 : 174 : 164 : 162 : 156 : 154 : 161 : 155
M.grisea.r : P.anserina : F.graminea : T.reesei.r : A.fumigatu : A.fumigatu : M.graminic : N.crassa.r : J	* 200 REGSENDAREN RESENDTREN RESENDEREN RESENDEREN RESENDEREN RESENDEREN RESENDEREN RESENDEREN RESENDEREN	* -Q PMGPQ -PGMVQPPP-PP -SNLGPQHHGTPF -SNLGPPHHGTPF -SNLGPPHHGTPF -SNLGPPHHGTPF -SNLGPPHHGTPF 	220 C S PQVNG C P P PQAVNG C P P QAVNG C P PQHPA C P P PQNG P P P PQNG C P P PQNG C C V A QE L QNR G	* YAFMEQEALYN MNYMATEPLYN ITYMETEPLYN FAYLENESLYH YAYSENEPEN YAYSENEPEN YAYSENEPEN YAYSENEPEN YAYSENEPEN SAFVESEPTYN 5 p p 5m	240 PNTTMPP PHNAP SPHPPS PAAS-NQS PNANP PAAS PQS SQPPA	* HMPPQMAPGE NMPPNASHGI GILPQHAPHE SIMPFQ-PGE NIAQQP-PGE NMSQQPPRPE SMAPTHGI	260 PF PY PQ P QY QFA QFA PTQL	- HPQHPPH PQY PYPG GY HQQ P Y YQ P Y G- H HYGHH HYGHH HYGHH HYQ PFQ - Y P		280 HPQQPH PHPQHH	: 242 : 244 : 232 : 229 : 223 : 223 : 235 : 205 : 225
M.grisea.r : (P.anserina : - F.graminea : - T.reesei.r : - A.fumigatu : - A.fumigatu : - A.nidulans : (M.graminic : - N.crassa.r : -	* POMOQOFIEDGR -OHOQHPOHOPO LPPHATP LPPHATP DMPHASVPE 	300 RATM PANF APH PF RSSVPPNY PPOAQ HQQHQPQHQOHQF 	* PPHGPMGMQ QGPPAP PHQP IAHPQQHH PHPAH	320 RHSVS PPQQHI RHSVS PPRPQ- RHSTS PPELL-	* PHHVPQLPP APQLPH GPY PY PQHPQ QPQHPQ p	340 QQ PQQHPHSS QL PAQL PPRT ME DRRS PMPS ME ERRPS HL PQHP-HPI HH PQHPPHAI -QQQQP QQ-VHRHSAS	* PPQPOHHQ MPSHM P-MPPAYS APPAFS AQQTPAMG AQPPTTMA GQPSPRLT PQVHQ	360 MQS PFQ PMVH VPS PFQ SQPPS QG AHP PFQ P LSQ PFHA MSQ PFHA QQQR FT P QQQR FT P PP	* KFESPQQI	LEPPQH 	: 336 : 314 : 289 : 254 : 272 : 297 : 236 : 293
M.grisea.r : (P.anserina : F F.graminea : I T.reesei.r : (A.fumigatu : I A.nidulans : I M.graminic : I N.crassa.r : I	380 DHQQQPEPQEPRE HPMQSPPQPQQHI PARP-TPSPQPNQ SPRTENPSPQPPF PQVAQPFLPEQGF PHVAQPYMADQ PQ	* 400 EQQQQQQS QSQ APPPSHELP TRF QQHPTSTYS MSF QLLPP SMF VISIPPAFPT QSC FHP 	* PPOPEPOSEP POPEPOSEPO PPOPERRL PHTSPOPAR PRFVSLPD PORTASLPE ONEFASPP OOOPOSMPI P	420 ARSLPPPPP PAPVETMA QDLPPPPPPP RHLDPQPPPPP VSSADQMVGPI AQ-SDQLQANI IP NQNLQPPAP	* LEVKTELAP KPELVD /EIKTEPQE /EPRADAPE LKVETSPSP QPRP PKPESME	440 PAQPGRIPQE RPRQE RPQPPI KPKAPI PHQRPI PLIK RPRRLI	SLLDTAVK PLLDTAIK INTDSAIK INTDTAIK PALNTSVK	* KLPROKOHSI KAPPRKGGSI KLPQRKSHSI SLS-SKSRSI PLSNAKSRSI LPANAKSHSI NPGQGS k S(460 FTPID-F FTPID-F FTPIE-F FTPID-I FTPID-I FTPID-I VFTPIEPE	* ENR SIL ENR SIL ENR SIL DRG SVL DHG SVL DSR SLL ENK SIL S6L	: 429 : 395 : 377 : 339 : 350 : 363 : 275 : 377

4.2. Alignements avec les séquences des orthologues de MgRlm1



Figure 14 : Alignement des séquences des homologues de MgRlm1, chez les espèces fongiques étudiés. Les domaines fonctionnels importants sont entourés.

Conservation des domaines chez les différents champignons

Le facteur de transcription Rlm1 de M. grisea possède un domaine « MADS » (0 à 70 aa) très bien conservé chez différents espèces fongiques. En dehors de ce domaine, il existe 4 domaines très conservés de fonction inconnue, situés entre des différentes zones de la protéine (457 – 470, 575 – 584, 627 – 651, 676 – 744). Les deux derniers domaines, sont conservés à 80% chez les ascomycetes étudiés et ils présent la particularité d'être riche en proline. Ainsi, ces domaines peuvent jouer un rôle dans l'interaction protéine – protéine.

De plus, il y a un motif de 11 acides aminés, très bien conservé ente les acides aminés 788 à 818. Par ailleurs, la protéine, en dehors des domaines n'est pas bien conservée.

Les séquences de la protéine correspondante à MgRlm1 chez *B. cinerea,* est mal annotée à partir de l'acide aminé 200. Ainsi que celle de *S. nodorum,* à partir de l'acide aminé 500. C'est pour cette raison elles ne sont pas présentes dans l'alignement.

Par ailleurs, la séquence de Rlm1 chez *S. cerevisiae* et *C. albicans*, ne s'alignent que sur le domaine de MADS.

4.3. Arbre phylogénique



Figure 15 : Arbre phylogénique des orthologues de MgRlm1 réalisé par PhyML. AF : *Aspergillus fumigatus*, AN : *Aspergillus nidulans*, MG : *Mycosphaerella graminicola*, MGrisea : *Magnaporthe grisea*, TR : <u>Trichoderma</u> <u>reesei</u>, FG : *Fusarium graminearum*, PA : *Podospora anserin*, et NC : *Neurospora crassa*

5. Facteur de transcription Crz1

	ŧ.		125			250			375			500			625		726
Query seq. Superfamilies												zf-	c				

Figure 16 : Schéma des domaines et acides aminés fonctionnels de Crz1

5.1. Identification des domaines fonctionnels de Crz1

Plusieurs acides aminés sont importants pour l'activité de Crz1 :

Acides aminés et domaines fonctionnels de Crz1 (Figure 17)

Zf : Le domaine « Zf-C2H2 » (Zinc Finger, type C2H2), IPR007087, est le domaine classique de la famille de doigts de zinc. En effet, la forme en pince et les quatre charges positives des atomes de Zn du domaine en font un chélateur du grand sillon de l'ADN, molécule chargée négativement. Ainsi, ce domaine est un domaine de fixation à l'ADN.
5.2. Alignements avec les séquences des orthologues de MgCrz1

	*	20	*	40	*	60	*	80	*	
M.grisea.c :	MDQLQHHQG	PGRARSPSAASTO	GAAFQQQHQEHP	QPHIRSHSPAR	PAPQSESSP	DHNGLGLG	IEHSQS	FSGFNPNPS	DFLNPQ :	81
P.anserina :	MDQQLPQ	ARGRELSAASTO	GGGHHHQQP	PNIIRDHSPSE	PARFPNPNDA	AVVSSIGLGLG	LVDQQFP1	FAQPDYSAYNANSN	SFLNNH :	84
F.graminea :	MDQQAQA	-HRGRSLSTG	НQQ	PHINHSHSPSI	PSPYQHND	-PSVGLGLTLD	QSAQQS	YESFNNSG-	-FLSPQ :	66
T.reesei.c :		-MRGRSPSAG	GFQ	SDINQSHSPAF	RSPLAPTNE(PSAGLGVGLG	QQQQRAFAAI	PLHPNYDSFGANG-	-FLGAQ :	69
B.cinerea. :	MDS	-QRGRSPSGS		HQHIRNHSPSI	PHAFQDGMN	GLGIALDPSSI	NNHQQFQN	NFNAQNTTLE	AYVDNN :	66
A.fumigatu :	MASQEMF P	-ELGQSP-APGVH	KSRGVSRSPHPH	QQQQQQQHQTC	GLDLDSSIA	FASSFANSSFD	PNSNNVSPSA	AESYGYTAAGYLSG	TPASQT :	89
A.nidulans :	MDPQDTLQ	-DLGQAP-AAHIN	I-RSASPSAHAH	QQYNNNHNI	DLTIDPSVTS	SNSSYPPSSFA	NNSAPGS	SEAFAYSSS-YLT-	-PATAT :	80
C.immitis. :	MDVPHQ	- GRGRS PSVAGDE	ENQHINPSDPMN	PAAQTYQDRAI	TLALDPALS	VSPSP-SGFP	GSNPTTSGA	ADAYAINNSFIHN-	STTL :	84
S.nodorum. :	MDIQ	RGRSP-SAGSH	HANNIRSSPSPH	AFPNNLSP	YDPSIHI	PTSSFPATSSG	FDSNQFLAS	FQPQQFAQQ	GL :	70
N.crassa.c :	MDQQYTD	-ARGRSLSAASTO	GGGQVHDQQQ	QSHIRNHSPSI	PTPFPNSNDO	GVNNGLGLG	LIDPSASQ-H	HFQPEFSYGGPNP-	FQQH :	81
C.albicans :				MI	LSTMSNLPIV	VAGISTTATTG	TTSTTTAST	STSGSVNTTATNNN	NNTSAS :	50
S.cerevisi :	MSFSNGNMASYI	MTSSNGEEQSINN	IKNDIDDNSAYR	RNNFRNSSNGS	SHTFQLSDLI	DLDVDMRMDSA	NSSEKISKNI	LSSGIPDSFDSNVN	SLLSPS :	94
A.gossypii :			MCF	EDYLNAQ T V	-SDVSPDKAH	RMNSSNKANGG	MRMQEKEGSI	PAYDMESEMTADGV	SLENSE :	60
	100	* 1	120	* 140)	* 16	10	* 180	-	
M.grisea.c :	PSQTFPS	QGQ	-LDPSSFDATQP	FDSNQAQPO	JYSQEFLNN	VNNFGGSDFSL	FPPATTE(QLSTPLFVTGDNQÇ	OBBOT2 :	157
P.anserina :	QPSPQPFSQ:	PGLSDPSNVPTFI	DLNQSFTDPLKP	ENSSFTSAPSI	[YPQPQTLL]	APSEGDADETI	FPPTPG-ES(QYDAPLFVG-DSQC	@LN :	171
F.graminea :	QSPSFLP	PAH	-QQQNNSFGQAN	LSDPATSLPFN	NQSQAAYL	SPNLNDNDFSL	FPNTSGQGD	QFNAPLFNQ	STLN :	139
T.reesel.c :	ANAVDP	TNG	-FDPSASFGQQP	ATGP-STLSLN	VAQAQHNYLS	SPNLHDGDFSL	FPSAAEQGD	QYNAPLFEQ	PPLG :	140
B.cinerea. :	EFLNPTQQFTQ	SGLGDAN	VFAPSQTQDYTQ	YKQEDSFAPPÇ	2RSFTQELL:	SANFDG-DFSL	YPNSGQ-NE(JEDQSYEMN-ELPE	QSGNPS :	151
A. rumigatu :	DQNYAN	SL(DIPOSIGLETAN	OLNESHÖÖDSI	LDDNFSDLLF	ISNATEY FNT	VYQTHSPSSI	VTAPEYDSSLLLDE	'Q :	163
A nidulans :	DHNFAR.	PSL(DIPOSEDQGLS-	HQP-A	AEENFSNLLP	VSNTGDFDFS-	LYQGSSPN-1	VTGSDY PSSGLLDF	QQSGNQ :	150
C.immitis. :	DDNLLR	ANIPSDPLER	VQPQSYSQSFEA	SLKAHSG		PSDQLGFEDFG	MYSNNr	NUASEFGSSLLLDE	vyvsyss :	162
s.nodorum. :	DOSELO	ANP:	SLSQHNTPQFRP	QGNDI	LOPDHLNIAN	ATSSPDFASFF	AGSDLNQNNA	ALN PTYLGS-TLDE	QLLESQ :	143
N.crassa.c :	SPESQ.	PGTI	DENÖCLENÖPEN	QDNSFGLSQPA	AYSPNLMA	ASNEGDADYGI	FPTTTA-AG	JENGSLEIT-DNQS	IN :	152
C.albicans :	N			STSASS	STTANGGTST	PNSGNSLUYYY	TGNNTSNSVI	JGNKISLPSIIFTE	Q :	100
s.cerevisi :	SGSISADLNIQ:	STIKEI	DEBUDORDOUT		JUUUUUKUT P1 TRCEDEOUT	FLKVEQS <u>m</u> teQ Corronnetne	OBDIECONC	VUHRPSLINUFLSF	WARGED :	101
A.gossypii :	HTN		PHTHLTVPQ	ATTREIDÖDES	SECTETORE	-QFEQAPTINI	QTPLEGAVG:	SHALDMSSPMNLPQ	IXAEGID :	131
	* 20	o *	220	*	240	*	260	*	290	
Maricos a :			C GANOSINGE	NOUOBCEBBAE	DUCDUNCT	RADIL DOON-	DM8CT		v <mark>s</mark> nves ·	241
D organino .	CANANM NUNO	I PPHALKPEPAQI		NOHOR DEP CI	MORNAGE CI	PRANTIPGQV-	DwsGi	OROCUDECESE	TSDVSS . Repued .	241
P.anserina :	DUDMNUMUUGD	T P P R L R O V P C O U	PGSAQUSESE.	NONORGE PPP-GP	NASKN VSLGI	ADDITENCTA	DWIRA		redves : Vedves :	200
E.graminea .	DINAMHOGD		SARQSEAF	NDHORGED-DE	HERNASLGI	RANTIRGIA			YCDVCC ·	243
P ciporos :	TNDARINAURD		STÖSELE.	NARQE SSEFEI	NGRUNGT CI	PRADEPSOIG	DCDWGWMD		YGDTCC ·	220
A fumidatu	-VHOOGHGHGG	TEPSILIQEDINKEP	AGG DC DMG DCCG		HSRHASIG	AT AFT. TONT	HEDWOAVMC	JSAAROCHERADSE	VSPISS .	254
A nidulana :	AVNOVDI.DHOS		SSPGPHS QGS	S DGTIDYT DC	HSPHTSLDI	ASAYMTNVS	HDEMOAVMNI	J-SAFHCHERADSE	VSEVSS ·	238
C immitie :	DHT.NOST DHN D'	TODHT.ADDFCHDC	SDRDTSDVS	₽₽©₽₽¥₩₽₽0	HSRHTSLD	SSATTICHC	HSDWOGMLGN	V DAFNORHRRAFSE	HSDVSS .	250
S nodorum :	Ending String .		SE REISEVS	TEOLETEE ?	Stories and the store that	000-271 T T OILO	mp De Compor	 EDE Communication 	11 1 20 120 N 120 20 1	
billodor dani i		L B B H P P P P P P P P P P P P P P P P P	NH- PS PHASENM	NOGAR PSP0	HSRHASTO	-SAAYGDAS-		CORAPSET	YSDVSS ·	217
N cragga c :	QQQNQSISHTP: NDDDNM_SHSD	TPPHLLPTMNNH, FDDHLLGDFTN	ON-PSPHASENM	NQGAE PSPG AOGRE PMATCE	SHSR <mark>HA</mark> SLDI RHSRNASICI	P-SAAYGPAS-		GQRAPSET	YSDVSS :	217
N.crassa.c : C.albicans :	QQQNQSISHTP NPDPNM-SHSP DSTN	TPPHLLPTMNNHÇ EPPHLLSPEIN NTSHTYNPYTTVS	2N – PSPHASENM SPAF. 3GAVTPON	NQGAF PSPG AQGRF PMATGF YOLDY SOSSTA	GHSR <mark>HA</mark> SLDI RHSRNASLGI WNNYOFTLI	P-SAAYGPAS- PEAALLPGQD- PNOOLSSPOO-		GQRAPSET QFQGHRRSASE OQYNRS	YSDVSS : LSDVSS : YSNSLM	217 228 165
N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi :	QQQNQSISHTP NPDPNM-SHSP DSINI TTRSSGINYSD	TPPHLLPTMNNHÇ EPPHLLSPEIN NTSHTYNPYTTVS TESNYHTPYLYP(2N – PSPHASENM SPAF. SGAVTPQN DDLVSSPAM	NQGAF PSPC AQGRF PMATGF YQLDY SQSSTV SHUTANNDDFI	GHSRHASLDI RHSRNASLGI VNNNYQFTL DDLLSVASMI	P-SAAYGPAS- PEAALLPGQD- PNQQLSSPQQ- ASNYLLPVNSH		GQRAPSET QFQGHRRSASE QQYNRS -YKHISNLDELDDI	YSDVSS : LSDVSS : YSNSLM : LSLTYS	217 228 165 263
N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A gossvpij	QQQNQSISHTP NPDPNM-SHSP DSINI TTRSSGINYSD VDOLBLP-NTP	TPPHLLPTMNNH, EPPHLLSPEIN NTSHTYNPYTTV: TESNYHTPYLYPÇ NRDSYLSASMSD(2N-PSPHASENM SPAF 3GAVTPON 2DLVSSPAM	NQGAF PSPG AQGRF PMATGF YQLDY SQSSTV SHLTANNDDFI NAHS PETAHFT	SHSRHASLD RHSRNASLG /NNNYQFTL DDLLSVASM LRHONVAVS	P-SAAYGPAS- PEAALLPGQD- NQQLSSPQQ- NSNYLLPVNSH	WSHMP	GQRAPSET QFQGHRRSASE QQYNRS -YKHISNLDELDDI	YSDVSS : LSDVSS : YSNSLM : LSLTYS : HSGTTE :	217 228 165 263 203
N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii :	QQQNQSISHTP NPDPNM-SHSP DSINI TTRSSGINYSD VDQLRLP-NTP	TPPHLLSPIMNNH EPPHLLSPEIN NTSHTYNPYTTV: TESNYHTPYLYPÇ NRDSYLSASMSDÇ	2N-PSPHASENM SPAF 3GAVTEON 2DLVSSEAM 2SVSAY 5	NQGAFPSPC AQGRFPMATGF YQLDMSQSST\ SHLTANNDDFI NAHSPETAHFI	SHSRHASLD RHSRNASLG VNNYQFTL DDLLSVASMN LRHQNVAVS hsr s 1	P-SAAYGPAS- PEAALLPGQD- PNQQLSSPQQ- NSNYLLPVNSH PQVSYLRTGND	WSHMP	CQRAPSET QFQCHRRSASE QQYNRS -YKHISNLDELDDI DFDELLSI grss	YSDVSS : LSDVSS : YSNSLM : LSLTYS : HSGTTE : S s	217 228 165 263 203
N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii :	QQQNQSISHTP NPDPNM-SHSP DSINI TTRSSGINYSD VDQLRLP-NTPI	TPPHLLPTMNNH EPPHLLSPEIN NTSHTYNPYTTVS TESNYHTPYLYP(NRDSYLSASMSD(2N – PS PHAS ENM SPAF. 3GAVT PQN 2DLVSS PAM 2SVSAY. P	NQGAFPSPC AQGRFPMATGF YQLDYSQSSTV SHLTANNDDFI NAHSPETAHFI	SHSRHASLD RHSRNASLG VNNNYQFTL DDLLSVASMI LRHQNVAVS hsr s p	P-SAAYGPAS- PEAALLPGQD- PQQLSSPQQ- NSNYLLPVNSH PQVSYLRTGND P	WSHMP 	CQRAPSET QFQGHRRSASE QQYNRS -YKHISNLDELDDI DFDELLSI g r s	YSDVSS : LSDVSS : YSNSLM : LSLTYS : HSGTTE : S S	217 228 165 263 203
N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii :	QQQNQSISHTP NPDPNM-SHSP DSINI TTRSSGINYSD VDQLRLP-NTPI	TPPHLLPTNNH EPPHLLSPEIN NTSHTYNPYTTVS TESNYHTPYLYPÇ NRDSYLSASMSDÇ 300	2N-PSPHASENM SPAF 3GAVTPQN 2DLVSSPAM 2SVSAY p *	NQGAFPSPC AQGRFPMATGF YQLD×SQSSTV SHLTANNDDFI NAHSPETAHFI 320	SHSRHASID RHSRNASIG VNNNYQFTI DDLLSVASMN LRHQNVAVS hsr s p *	- SAAYGPAS- PEAALLPGQD- NQQLSSPQQ- NSNYLLPVNSH QVSYLRTGND o a 340	WSHMP G	CQRAPSET QFQCHRRSAE QQYNRS -YKHISNLDELDDI DFDELLSI g r s 360 *	YSDVSS : LSDVSS : YSNSLM : LSLTYS : HSGTTE : S s	217 228 165 263 203
N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : M.grisea.c :	QQQNQSISHTP NPDPNM-SHSP DSINI TTRSSGINYSD VDQLRLP-NTPI * VAPSENIVSHO	TPPHLLPTNNHC EPPHLLSPEIN NTSHTYNPYTTVS TESNYHTPYLYPC NRDSYLSASMSDC 300 SPDHIEHSPMC	2N-PSPHASENM 	NQGAP PS PC AQGRE PMATGE YQLDY SQSSTV SHLTANNDDE NAHS PE TAHFI 320 ELHGLGNE SLA	SHSRHASID RHSRNASIG VNNNYQFTL DDLLSVASMI LRHQNVAVS hsr s p * ADPPPPHAHS	- SAAYGPAS- EEAALLPGQD- NQQLSSPQQ- NSNYLLPVNSH QVSYLRTGND a 340 SPDLRGREES	WSHMP G	CQRAPSET QFQCHRRSASE -yKHISNLDELDDI grs 360 * PECCLPDMNQE	YSDVSS: LSDVSS: YSNSLM: LSLTYS: HSGTTE: S: S: S: S: S: S: S: S: S: S: S: S: S:	217 228 165 263 203 324
N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : M.grisea.c : P.anserina :	QQQNQSISHTP NPDPNM-SHSP DSINI TTRSSGINYSD VDQLRLP-NTPI * VAPSPNLVSHD AAPSPLLVSSD	TPPHLLPTNNHC EPPHLLSPEIN NTSHTYNPYTTVS TESNYHTPYLYPC NRDSYLSASMSDC 300 SPDHIEHSPMC SPDHIEHSPMC	2N-PSPHASENM SGAVTEQN 2DLVSSEAM 2SVSSY P * 2RPVDTAGLYQ- /RPQD-AGLYQ-	NQGAP PSPC AQGR PMATCH YQLD YSQSST YSLTANNDDFI NAHSPETAHFI 320 ELHGIGNP SIA ELHGIGNP SIA	SHSRHASID RHSRNASIG /NNNYQFTI DDLLSVASMM LRHQNVAVS hsr s p * ADPPPPHAHS SDHGAHSPNF	- SAAYGPAS- EAALLPGQD- ENQQLSSPQQ- SNYLLPVNSH QVSYLRTGND a 340 SPDLRGRSPSH HPGARSPSH	WSHMP G		YSDVSS : LSDVSS : YSNSLM : LSLTYS : LSLTYS : HSGTTE : S S NS : NN :	217 228 165 263 203 324 333
N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : M.grisea.c : P.anserina : F.graminea :	VAPSPLVSAP	TPHLLFTMNNA EPPHLLSPEIN NTSHTYNPYTVS TBSNYHTPYLYP(NRDSYLSASMSD(300 SFDHIEHSPM SFDHIEHSPM SFDHIEH-SPM	2N-PSPHAS FNM 3GXVP FQN 2DLVS SEAM 2SVSAY p 2RPVDTAGTYQ- 4RPSD-AGUYQ- 4RPSD-GGYQ-	NQGAP PS PC AQGRP PMATGF YQLDY SQSSTV SHLTANNDPF NAHSPETAHFI 320 ELHGI GNP SI ELHGI GSP SI EVI SI GNP SI S	SHSRHASID RHSRNASIG WNNYQFIL DDLLSVASM LRHQNVAVS hsr s n * ADPPPPHAH: SDHGAHSPNI	P-SAAYGPAS- EAALLPGQD- NQQLSSPQQ- NSNYLLPVNSH QVSYLRTGND A 340 SPDLRGRSFSH JPGARSFSH SPGHQGRSFSH	WSHMP G	CQRAPSET QQARRSASE QQARRS -YKHISNLDELDDI DFDELLDI g r s 360 * PPOCLPDMNQE LPOCLPDVNQ- VPOCMPDLNQI	YSDVSS : LSDVSS : YSNSLM : LSLTYS : LSLTYS : HSGTTE : S : NS : NS : NQNS :	217 228 165 263 203 324 333 307
N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : M.grisea.c : P.anserina : F.graminea : T.reesei.c :	VQONOSISHTP NPDPNM-SHSP DSINI TTRSSGINYSD VDQLRLP-NTPI * VAPSPLIVSHD VAPSPLIVSSD VAPSPLIVSSD	TPHLLFTMNR EPPHLSPEIN NTSHTYNPYTVY TESNYHTPYLYP NRDSYLSASMSD(SEDHIEHSPM SEDHIEHSPM SEDTDIGGHSPA SEDTDIGGRSPA	2N-PSPHASPNM SPAP: 2GAVFQN 2DLVSSEAM 2SVSAY: P * 2RPVDTAG.YQ- /RPQD-AGUYQ- 3RPAD-VSLYQ-	NQGAP PSP AQGRP PMATGR YQLDY SQSSTV SHLTANNDDFI NAHSPETAHFI 320 ELHGI GNP SIJ ELHGI GSP SIJ EVI SI GSP SIJ	SHSRHASD RHSRNASLG ZHNNYQFTL DDLLSVASM LRHQNVAVS hsr s j * AD PPPPHAHS SDHGAHSPNI SDFQIGG ADHGS	- SAAYGPAS- BAATLLPGQD- NQQLSSPQQ- NSNYLLPVNSH QVSYLRTGND a 340 SPDLRGRSESH PGARSPSH SPGHQGRSESH SPGYGRSESH	* SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI	CQRAPSET QQYNRS DQYNRS -YKHISNLDELDDI DFDELLGI grs 360 * PPOCLPDMNQF LOCLPDMNQF VPOCMPDINQI	YSDVSS : LSDVSS : YSNSLM : LSLTYS : LSLTYS : HSGTTE : S : NS : NS : NQNS : NS : NS :	217 228 165 263 203 324 333 307 294
N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : M.grisea.c : P.anserina : F.graminea : T.reesei.c : B.cinerea. :	VAPS PNLVSBD AAPS PNLVSBD AAPS PNLVSBD AAPS PNLVSBD AAPS PNLVSBD AAPS PNLVSBD AAPS PNLVSBD AAPS PNLVSBD	TPHLLFTMNNA, EPPHLSPBIN NTSHTYNPYTVY TBSNYHTPYLYP NRDSYLSASMSDO SEDHIEHSPM SEDHIEHSPM SEDHIGHSFA SEDUGHSFI SEEGIDQCHSPI SEEGIDQCHSPM	2N-PSPHAS PNM 3GAVT PQN 2DLVS PAM 2SVSAY P * 2RPVDTAGLYQ- /RPQD-AGLYQ- 4RPSD-GGLYQ- 2RPAD-VSLYQ- 2NPAD-SLYQ-	NQGAP PS PC AQGRE PMATGF YQLDM SQSSTV SULTANNDDPI NAHS PETAHFI 320 ELHGT GNF STA ELHGT GNF STA EVT GT GSF STA EVT GT GSF STA DVI AT GSF STA	HSRHASID REFNASIG VNNNYQFTL DDLLSVASM LRHQNVAVS hsr s p * ADPPPPHAH SDPQIGG ADPSPI	- SAYGPAS- PAGLSPQD- NQQLSSPQD- NQQLSSPQD- SYYLLPVNSH QVSYLRTGND A 340 SPDLRGRSPSH HPGARSPSH SPGHQGRSPSH HAGISPAH	WSHMP	CQRAPSET 	YSDVSS : LSDVSS : YSNSLM : LSLTYS : HSGTTE : 8	217 228 165 263 203 324 333 307 294 314
N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : M.grisea.c : P.anserina : F.graminea : T.reesei.c : B.cinerea : A.fumigatu :	VAPSPHLVSBD AAPSPLISH	TPHLLFTMNNA, EPHLLSPEIN NTSHTYNPYTVS TESNYHTPYLYP NRDSYLSASMSDC SEDHIEHSPM SEDHIEHSPM SEDHIGGHSPA SEDTDIGGHSPA SEDTDIGGHSPA SEDTDQSSESPA SEDGVDNNFSPI	N-PSPHAS PNM 3GVVP PQN 2DLVS PAM 2SVSAY P 2RPVDTAGLYQ- 7RPQD-AGLYQ- 1RPSD-GGLYQ- 1RPSD-GGLYQ- 3RPAD-VSLYQ- JAPQNDPSLYD-	NOGAR PSPC AOGRE PMATGE SHLTANNDDFI NAHSPETAHFI S20 ELHGIGNESIA ELHGTGSFS1 EVISIGNESIS EVIGSESIA SANGIENETIS	SHSRHASID RESPNASIC VNNNYQFIL DDLLSVASM hsr s p * AD PPPPHAH SDPQIGG ADHGG ADHGG ADHGG	- SAAYGPAS- PAAILPGQD NQOLSSPQQ- NSNYLLPVNSH QVSYLRTGND a 340 SPDLRGRSFSH HPGARSFSH SPGHQGRSFSH HAGISAH	WSHMP		YSDVSS : LSDVSS : LSLTYS : LSLTYS : LSLTYS : HSGTTE : S :	217 228 165 263 203 324 333 307 294 314 334
N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : P.anserina : F.graminea : T.reesei.c : B.cinerea. : A.fumigatu : A.nidulans :	VQONOSISHTP NPDPNM-SHSP DSINI TTRSSGINYSD VDQLRLP-NTPI * VAPSPNLVSHD AAPSPLVSSD VAPSPNLVSAE VAPSPNLVSAE AAHSPNLGHHD AAPSPYLSQHE AAHSPYLPQHD	TPHLLFTMNNA, EPHLLSPEIN NTSHTYNPYTVS TBSNYHTPYLYP NRDSYLSASMSDO SEDHIEHSPM SEDHDG-HSPM SEDTDIGGHSPA SEDTDIGGHSPA SEDGVDNPSPI SEDGVDNPSPI SEDGVDNPSPI	2N-PSPHAS FNM 3GVYP FQN 2DLVS FAM 2SVSAY P 2RPVDTAGLY Q- (RPQD-AGLYQ- IRPSD-GGLYQ- 2RPAD-VSLYQ- 2HPQD-SLYQ- 2HPQD-SLYQD- 2AAQNDPSLYDN	NQGAP PSP AQGRP PMATGP YQLDYSQSST SHLTANNDDFI NAHSPETAHFI 320 ELHGIGN FSIA ELHGIGSSI EVIGSPSIA DVIAIGSSIA AAIGTESFII AAIGTESFII	HISCHASID HISCHASIC HISCHASH HISC	- SAAYGPAS- PAATLIPGOP NQUSSPOO- NSNYLLPVNSH OVSYLRTGND 0 a 340 SPDIRGR S SSI SPGHQGR S SSI SPGHQGR S SSI SPGYHGR S SSI HAGIS PAH QHQGF S PAH QTQGI S FH	WSHMP		YSDVSS : LSDVSS : LSLTYS : LSLTYS : LSLTYS : S S NN : NQNS : N : N : N : N : N :	217 228 165 263 203 324 333 307 294 314 334 320
N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : M.grisea.c : P.anserina : F.graminea : T.reesei.c : B.cinerea. : A.ridulans : C.immitis. :	VADS PHLVSSD VADS PHLVSSD VADS PHLVSSD VADS PHLVSSD AAPS PHLVSSD AAPS PHLVSSD AAPS PHLVSSD AAPS PHLVSD AAPS PHLVSD AAPS PHLVSD AAPS PHLVSD AAPS PHLVSD AAPS PHLVSD AAPS PHLVSD AAPS PHLVSD AAPS PHLVSD VADS PHLVSD	TPHLLFTMNNA, EPPHLSPEIN NTSHTYNPYTYY TBSNYHTPYLYP NRDSYLSASMSD(SPDHIEHSPM SPDHIEHSPM SPDTDIGHSPA SPDTDIGHSPA SPDGNSSPT SPDADNPSPT APDISENNHSPT	2N - PS PHAS PNM 3G AV T PQN 2D LVS PAM 2S VSAY P * 2R PVD T AG LY Q- /R PQD - AG LY Q- IR PSD - GG LY Q- 2R PAD - VS LY Q- 2H PQD - S LY Q- 2H PQD - S LY Q- 2A PQD PS LY D- S LAQND PS LY DN	NQGAP PSPC AQGRE PMATCH YQLDYSQSSTV SHLTANNDDFI NAHSPETAHFI 320 ELHGIGN SII EVISIGN SII EVISIGN SII SAUGTESFII SAUGTESFII NAUGTSFII	HISHASID HISHASID HISHASID HISHASHASH HIST S I * ADPPPPHAH: SDHGAHSPN ADHGG ADHGS ADPSPI SEQHQ SEHHQP SDQDQ	- SAAYGPAS- - BAATLPGQD- NQQLSSPQQ- NSNYLLPVNSH - QVSYLRTGND - A 340 SPDLRGR - SS SPDLRGR - SS SPGYGRS - SS SPGYHGR SS QHQGF S - SH AF S - AH AF S - AH	WSHMP	CQRAPSET QQVNRS DQVNRS DFDELLOI g r s 360 * PPOQLPDNNQE LPOCLPDVNQ- VPOQMPDNNQI 1POCMPDTNQF 3POCIPDTNQF 3POCIPDTNQF 4POC_GQEMMPNVF 4POC_GQEMMPNVF 4POC_PGGDLGPDFT	YSDVSS : ISDVSS : YSNSLM : LSLTYS : LSLTYS : HSGTTE : S : NS : NS : N : 	217 228 165 263 203 324 333 307 294 314 320 329
N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : M.grisea.c : P.anserina : F.graminea : T.reesei.c : B.cinerea. : A.fumigatu : A.nidulans : C.immitis. : S.nodorum. :	VAPSPNLSHTP VAPSPNLSHT VAPSPNLSHT AAPSPLVSBT VAPSPNLSHT AAPSPLVSST VAPSPNLSHT AAPSPLSHTST AAPSPLSHTST AAPSPLSHT AAPSPLSHT AAPSPLSHT AAPSPLSHT AAPSPLSHT AAPSPLSHT	TPHLLFTMIN TESNTHTYNPTTVS TESNTHTPLTVS NRDSYLSASMSDC SEDHIEHSEM SEEQHDG-HSEM SEDTDIGCHSEA SEEGIDQCHSEN SEEGIDQCHSEN SEEGIDQCHSEN SECOQUNNPSEN SECOQUNNPSEN SECOQUNNPSEN SECOQUNNPSEN SECOQUNNPSEN	2N-PS PHAS PNM 3GAV F PON 2DLVS 2 EAM 2SVSAY P * 2R PVD TAG V 4R PSD-GG V 2R PAD-VS LV 2R PAD-VS LV 2A PON DPS LV D- JAAOND PS V DN. JAAOND PS V DN. JAAOND PG LF QD	NOGAE PSPC AOGRE PMATCE YOLDYSOST SHLTANNDDFI NAHSPETAHFI S20 ELHGIGSESI EVISIGNESI EVISIGNESI SAIGIENETI SAIGIENETI SAIGIESETI PVIQEGOFTI	ALERHASID ALERHASID ALERHANASIG ALEXASMI ALEXASM	- SAAYGPAS- BAAILPGQB NQCLSSPQ- NSNYLLPVNSH QVSYLRTGND A S40 SPDLRGRSFSH BPGA-RSFSH SPGHQGRSFSH AGISFA QHQGFSFA 	WSHMP		YSDVSS : ISDVSS : YSNSLM : SST : SST : NQNS : N : NQNS : N : Y : Y : F : F : F : F :	217 228 165 263 203 324 333 307 294 314 320 329 296
N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : P.anserina : F.graminea : T.reesei.c : B.cinerea. : A.fumigatu : A.fumigatu : S.nodorum. : N.crassa.c :	VAPSPNICSDP APSPNICSDP VAPSPNICSDP VAPSPNICSDP VAPSPNICSDP VAPSPNICSDP VAPSPNICSDP AAPSPISOHE	TPHLLFTMNNA, SPPHLSPEIN NTSHTYNPYTVS TESNYHTPYLYP NRDSYLSASMSDC SPDHIEHSPM SPDHIEHSPM SPDTDIGGHSPA SPDTDIGGHSPA SPGUDQHSPM SPGUDQHSPM SPGUDQHSPM SPGUDQHSPM SPGVADNNPSPI SPD-ENCPSPI SPDPIENNHSPI SPDPIENNHSPI	N-PSPHAS FNM VX PQN 20LVS FAM 20LVS FAM 20LVS FAM 20LVS FAM 20LVS FAM 20VSAY P 20	NOGAR PSPC AOGREPMATCH YOLDYSSST SHLTANNDDFI NAHSPETAHFI S20 ELHGIGNESIA ELHGIGNESIA ELHGIGSESIA SAIGTENETIA AAUGTESETI NAHGIGSETI NAHGIGSETI OLNGISNESIS	ALSCHASTO ALSCHAST AD PPPPHAH SD PPPPHAH SD PPPPHAH SD PQIGS AD PSP SD QQ SD QQ SD QQ SD QQ	- SAAYGPAS- PAATLPGQD- NAOLSSPQQ- NSNYLLPVNSH QVSYLRTGND 9 a 340 SPDLRGR SPSH HGARSPSH SPGHQGR SPSH HAGISPAH -QHQGF SPAH -QHQGF SPAH 	WSHMP		YSDVSS : ISDVSS : YSNSLM : ISLTYS : ISLTYS : ISLTYS : S S NS : NS : 	217 228 165 263 203 324 333 307 294 314 320 329 296 306
N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : M.grisea.c : P.anserina : F.graminea : T.reesei.c : B.cinerea. : A.fumigatu : A.fumigatu : A.nidulans : C.immitis. : S.nodorum. : N.crassa.c : C.albicans :	VAPSPHUSSE VAPSPHUSSE VAPSPHUSSE VAPSPHUSSE VAPSPHUSSE VAPSPHUSSE VAPSPHUSSE AAHSPHUSSE AAHSPHUSSE AAHSPHUSSE VAPSPHUSSE AAHSPHUSHE VAPSPHUSSE VAPSPHUSSE VAPSPHUSSE VAPSPHUSSE VAHSPYLPOHD VAHSPYLPOHD VAHSPYLPOHD VAHSPYLPOHD	TPHLLFTMNNA, EPPHLSPEIN NTSHTYNPYTYY TSSNYHTPYLYP NRDSYLSASMSD(SPDHIEHSPM SPDHIGHSPA SPDTDIGGHSPA SPDGUNSPSPI SPDGUNNSSPI AFDISENNHSPL SPDZENNHSPL INANVGSNTSPQ	2N-PSPHAS FNM 3GVYP FQN 2DLVS SEAM 2SVSAY P * 2RPVD-AGUYQ- RPSD-GGLYQ- RPSD-GGLYQ- RPAD-VSUYQ- DHPQD-SIYQ- LAPONDPSLYD- LAAONDPSLYDN MAQPDPAYYS- LHAQNDPOLFQD 2GPQA-DALYS- LSNSNTPNPISF	NQGAP PSP AQGRP PMATGP YQLDYSQSSTV SHLTANNDDFI NAHSPETAHFI 220 ELHGTGSPSI EVTSTGNPSI EVTGTGSPSI EVTGTGSPSI AANGTSSFTI AANGTSSFTI PVMQFQOFTI PVMQFQOFTI VLIPDKDNPSI	HISRHASID HISRHASIG VINNYQFTL DDLLSVASM LRHQNVAVS hsr s m * AD PPPPHAH: SDHGAHSPNI SDHGAHSPNI SDFQI-GG: ADHG: ADHG: SDQU SEQHQ SDQD SDQD NDGTS		WSHMP		YSDVSS : ISDVSS : YSNSLM : ISLTYS : HSGTTE : S : NS : NS : NS : S : S : F : 	217 228 165 263 203 324 333 307 294 314 320 329 296 306 237
N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : M.grisea.c : P.anserina : F.graminea : T.reesei.c : B.cinerea. : A.fumigatu : A.nidulans : C.immitis. : S.nodorum. : N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi :	VAPS PNLVSHD AAPS PLVSAP AAPS PLVSAP AAPS PLVSAP AAPS PLVSAP AAPS PLVSAP AAPS PLVSAP AAPS PLVSAP AAPS PLVSAP AAPS PLOEN AAPS PLOEN AAAS PUPOPD VAPS PLOEN AAAS PUPOPD VAPS PLOEN AAAS PUPOPD	TPHLLFTMNNA, SEPHLSPEIN NTSHTYNPYTYYS TESNYHTPYLYPC NRDSYLSASMSDO SEDHIEHSPM SEBOHDG-HSPM SEBOHDG-HSPM SEBOLOGHSPH SEBOLOGHSPH SEBOLOGHSPH SEBOLOGHSPH SEDVANNPSPH SED-ENNHSPH SED-ENNHSPH SEDFENNHSPH SEDFENNHSPH SEDFENNHSPH	NN-PSPHAS PNM 3GAVT PQN 2DLVS PAF 3GVSAY P 2DLVS P 2DLVS P P 2DLVS P P 2DLVS P P 2DLVS P P P 2DLVS PAG P P P 2DLVS P P P P 2DLVS P P P P P P P P P P P P P P	NOGAL PSP AOGREPMATCS VILDYSOST SHLTANNDDFI NAHSPETAHFI 320 EUHGIGSESI EUHGIGSESI EUHGIGSESI EVISIGNESI EVISIGSESI SANGIENETI AANGIESTI PVIOFQOTIN DUNGTOSETI PVIOFQOTIN SKUGTNOKMII	3 H H S H S H S H S H S H S H S H S H S H S H S H S H S H S H S H S H S S H S S H S	- SAAYGPAS- PAALLPGQF PAQLSSPQ- NSNYLLPVNSH QVSYLRTGND a 340 SPDLRGRSPS SPDLRGRSPS SPGHQGRSPS AGISPA -QHQGFSPA -QHQGFSPA 	WSHMP G		YSDVSS : ISDVSS : YSNSLM : LSLTYS : HSGTTE : S : NS : N : N : Y : F : GF : GF : H : H : EDDGTL :	217 228 165 263 203 324 333 307 294 314 320 3296 306 237 350
N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : P.anserina : F.graminea : T.reesei.c : B.cinerea. : A.fumigatu : A.fumigatu : A.nidulans : C.immitis. : S.nodorum. : N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii :	VAPSPNICK VAPSPNICK VAPSPNICK VAPSPNICK VAPSPNICK VAPSPNICK VAPSPNICK VAPSPNICK VAPSPNICK VAPSPNICK AARSPNICK AARSPNICK VARSPN	TPHLLFTNNN TSHTYNPYTVS TSSNYHTPYLYP NRDSYLSASMSDC SEDHIEHSEM SEEQHDG-HSEM SEEQHDG-HSEM SEEGIDQCHSEN SEEGIDQCHSEN SEEGIDQCHSEN SEEGIDQCHSEN SEEGIDQCHSEN SEEGIDQCHSEN SEEGIDQCHSEN SEECIDQCHSEN SEECIDQCHSEN SEECIDQCHSEN DUNDNUSSINSEI INANVGSNTSEQI DENNSNISIINF	NN-PSPHAS FNM 3GAV FQN DDLVS PAN DDLVS PAN P P * CRPVDTAGUY CRPD-AGUY CRPD-AGUY CRPD-AGUY CRPAD-VSLY DRPAD-VSLY DRPAD-SSTY LAAONDPSLYD- LAAONDPSLYD- LAAONDPSLYD- LAAONDPSLYD- LAAONDPSLYD- LAAONDPSLYD- LAAONDPGLFQD CGPQA-DALYS- LSNSNTPNPS F	NOGAL PSPC AOGREPMATCS YOLDYSOST SHLTANNDDFI NAHSPETAHFI 320 ELHGIGSPSI ELHGIGSPSI EUTSIGNESI SAIGTENFTI SAIGTENFTI SAIGTENFTI SAIGTENFTI SAIGTENFTI SAIGTENFTI SAIGTENFTI SAIGTENFTI SAIGTENFTI SAIGTENFTI SAIGTENFTI SAIGTENFTI SAIGTENFTI SAIGTENFTI SAIGTENFTI SAIGTENFTI	HSRHASID HSRHASID HSRNASID HSRNASID CHUNYQFTL DDLLSVASM hsr SDPQI-GGS DPPPPHAHS SDHGAHSPNI SDHGAHSPNI SDHQI-GGS DPP-GS DPP-GS DPSP-GS SDHQ		WSHMP		YSDVSS : ISDVSS : YSNSLM : ISLTYS : ISLTYS : ISTTE : S : NN : NN : 	217 228 165 263 203 324 333 307 294 334 320 329 296 306 237 350 279
N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : P.anserina : F.graminea : T.reesei.c : B.cinerea. : A.fumigatu : A.nidulans : C.immitis. : S.nodorum : N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii :	VAPSPNICS VAPSPNICS VAPSPNICS VAPSPNICS VAPSPNICS VAPSPNICS VAPSPNICS VAPSPNICS VAPSPNICS VAPSPNICS AAHSPYLPOHD VAHSPYLPOHD VAHSPYLPOHD VAHSPNICS NSSYFQHDVD SP	TPHLLFTMNNA, SOU SOU SOU SOU SOU SOU SEDHIEHSENG SEQHDG-HSEN SEDTDIGGHSEN SEDTDIGGHSEN SEGUDQHSEN SEGUDQHSEN SEGUDQHSEN SEGUDQHSEN SEGUDQHSEN SEGUDQHSEN SEDCONNESEI SEDCENOPSEI SED-ENOPSEI SEDPIENNHSEI DENNSNNGINTE DNNSNNGINTE MALLDNVHE f SP	NN-PSPHAS FNM SGVVFPQN 2DLVS FAM 2DLVS FAM 2DLVS FAM 2DLVS FAM PVDTAGLYQ- RPPD-AGLYQ- HRPSD-GGLYQ- HRPSD-GGLYQ- DHPQD-SLYQ- JAPONDPSLYDN JAPON	NOGAE PSPC AOGREPMATCE YOLDISOSST SHLTANNDDFI NAHSPETAHFI S20 ELHGIGNESIA ELHGIGSESI EVISIGNESIS EVISIGNESIS ANGIENETIC AAIGIESTIS AAIGIESTIS NAHGISESTIS ONGISNESIS VIDPUKDNTYN SKUGTNOKMI F	HISCHASID HISCHASIC HISCHAST HISC	P = SAAYGPAS- PAATLPGQD- NAULPVNSH QVSYLRTGND 9 a 340 SPDLRGR SPSH HGAR SPSH SPGHQGR SPSH HAGIS PAH 	* G		YSDVSS : ISDVSS : YSNSLM : LSLTYS : LSLTYS : NQNS : NS : NS : 	217 228 165 263 203 324 333 307 294 334 320 329 296 306 237 2350 279
N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : M.grisea.c : P.anserina : F.graminea : T.reesei.c : B.cinerea. : A.fumigatu : A.fumigatu : A.nidulans : C.immitis. : S.nodorum. : N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii :	VQDONOSISHTP NPDPNM-SHSP DSINI TTRSSGINYSD VDQLRLP-NTPI * VAPSPNLVSHD AAPSPLVSSD VAPSPNLVSAE VAPSPNLVSAE VAPSPNLVSAE VAPSPNLVSAE AAHSPNLGHD AAPSPLPQEN AAHSPYLPQEN AAHSPYLPQEN AAHSPYLPQEN VAHSPYLPQEN VAHSPYLPQEN VAHSPYLPQEN SP 200	TPHLLFTMNNA, SPPTLSPEIN NTSHTYNPYTVS TESNYHTPYLYPC SPDHIEHSPM SPDHIEHSPM SPDHIGHSPA SPDGHSPA SPDGHSPA SPDGHSPA SPDGHNSPI SPDADNPSPI ACDISENNHSPL INANVGSNTSPI DINSNNGINYF I SP	NN-PSPHASPNM SGAVTPQN DDLVSPAM DDLVSPAM DSVSAY P * CRPVDTAGLYQ- /RPDD-AGLYQ- RPDD-AGLYQ- DPDD-SLYQ- DHPQD-SLYQ- DAQDDPSLYDN MAQPDPATYE- SNSNTPNFISP ADTONSTAINK YYSPHTGDSEDA	NQGAP PSP AQGRP PMATGP YQLDYSQSST SHLTANNDDFI NAHSPETAHFI 320 ELHGIGN FSIA ELHGIGSSIS EVISIGNESI EVIGTGSSIS ANGTENPTI AANGTESFTI VANGTSTIP VIGFGQTTIN VUTPDKDNTYN SKNGTNCKMI F	HISRHASID HISRHASIG UNNNYQFTL DDLLSVASM LRHQNVAVS hsr s r * ADPPPPHAH: SDHGAHSPNI DPQI-GG ADHGS DPQI-GG SBCHQ		* SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPY-ISPO SPY-ISPO SPH-ISPRI SPA-VSPRI YPSMTMNCI HAAPUT PIR APLINVHKY SP Pr6		YSDVSS : ISDVSS : YSDSIM : YSDSIM : LSLTYS : ISTS : NS : NN : NN : NN : N : 	217 228 165 263 203 333 307 294 314 320 329 296 306 237 3500 279
N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : M.grisea.c : P.anserina : F.graminea : T.reesei.c : B.cinerea. : A.ridulans : C.immitis. : S.nodorum. : N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii :	VAPS PNLVSAP VAPS PNLVSAP VAPS PNLVSAP VAPS PNLVSAP AAPS PLUVSSD VAPS PNLVSAP AAPS PNLVSSD VAPS PNLVSSD AAPS PNLVSSD AAPS PNLVSSD AAPS PNLVSSD AAPS PNLVSSD AAPS PNLOEN AAPS PNLOEN AAPS PNLOEN AAPS PNLOEN AAPS PNLOEN SPULSASNNS NSEYF QLHUVD SP 380	TPHLLFTMNNA, SEPHLSEPEIN NTSHTYNPYTYYS TESNYHTPYLYPC 300 SEDHIEHSPM SEBCHDG-HSPM SEBCHDG-HSPM SEBCIDQHSPM SEB	N-PSPHAS PNM 3GAV PQN DDLVS PAP 3GVSAY P * 2R PVDTAGLYQ- /R PDD-AGLYQ- R PSD-GGLYQ- 2R PAD-VSLYQ- DAPOD-STYQ- LAPONDPSLYD- LAPONDPSLYDN LAPONDPSLYDN LAPONDPSLYDN LAPONDPSLYDN SNSNTPNPISP ADTONSTIAINK YYSPHTGDSEDA	NOGAE PSPC AOGRE PMATGE YOLDYSOSST SHLTANNDDFI NAHSPETAHFI 320 ELHGIGSEST EUHGIGSEST EVISIGNEST EVISIGNEST SAIGIENETIS AAIGIENETIS AAIGIENETIS AAIGIENETIS YUNOFGOETIN OLNGISNEST PVIOFGOETIN OLNGISNEST F VITPDKDNTN SAIGIENETIS SAIGIENETIS F 420	HERHASID HERHASID HERNASIG VINNYQFTI DDLLSVASM HERNAVAS her s p * AD PPPPHAH: SDHGAHERNI SDHGA SDHG	- SAAYGPAS- BAAILPGQB PAQLISSPOC- VSNYLLPVNSH QVSYLRTGND A 340 SPDLRGRSFSH SPGHQGRSFSH SPGHQGRSFSH - QHQGFSFAH - QHQGFSFAH FSFAH FSFAH FSFAH FSFAH FSFAH FSFAH FSFAH FSFAH 	WSHMP G SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPI-ISPRI SPI-ISPRI HAAPVTPI APLINVHRM SP PI6		YSDVSS : ISDVSS : ISDVSS : ISLTYS : ISLTYS : ISTTE : S : NS : 	217 228 165 263 203 307 294 314 320 306 229 296 306 237 350 279
N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : P.anserina : F.graminea : T.reesei.c : B.cinerea : A.fumigatu : A.nidulans : C.immitis : S.nodorum : N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : M.grisea.c : P.graeine :	VAPSPNLSSD VDQLRLP-NTPI * VAPSPNLVSHD AAPSPLVSSD VAPSPNLVSSD VAPSPNLVSSD AAPSPLVSSD AAPSPNLCHHD AAPSPLSQHE AAPSPLSQHE AAPSPLSQHE NAPSPLSQHE SPNLGEDV SP	TPHLLFTMNNA, SOUTHERSTORESSION STREET SENTHTPYLYPC NRDSYLSASMSDC SEDHIEHSEM SEEQHDG-HSEM SEEQHDG-HSEM SEEGIDQCHSEM SEEGIDQCHSEM SEEGIDQCHSEM SEEGIDQCHSEM SEEGIDQCHSEM SEECIDQCHSEM SECIDQCHSEM SECIDQCHSEM SECID	N-PSPHAS PNM SGAV FQN DDLVS PAM DDLVS PAM DDLVS PAM DDLVS PAM P P P P P P P P P P P P P	NOGAE PSPC AOGREPMATCE YOLDYSOSST SHLTANNDDFI NAHSPETAHFI 320 ELHGTGSFSI EUNGTGSFSI EVISIGNESI EVISIGNESI EVISIGNESI SAIGTENETI SAIGTESETI NAIGTESETI UNICISNESI FUIPDRDNTT QUNCISNESI F 420 HGLAQMAL TEDNOME	HSRHASID HSRHASIG HSRNASIG HSRNASIG HSRNASIG HSRNASIG HSRNASH HSRNAS		<pre>WSHMP G</pre>		YSDVSS : ISDVSS : ISDVSS : ISLTYS : ISLTYS : ISTYS :	217 228 165 263 203 324 333 307 294 334 320 329 296 6237 350 279 279 404
N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : P.anserina : F.graminea : T.reesei.c : B.cinerea. : A.fumigatu : A.nidulans : C.immitis. : S.nodorum : N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : M.grisea.c : P.anserina : P.anserina :	VAPSPNICS VAPSPNICS VAPSPNICS VAPSPNICS VAPSPNICS VAPSPNICS VAPSPNICS VAPSPNICS VAPSPNICS AAPSPNICS AAPSPNICS AAPSPNICS AAPSPNICS VAPSPNICS AAPSPNICS VAPSPN	TPHLLFTMNNA, SEPHLLSPEIN NTSHTYNPYTYS TESNYHTPYLYP NRDSYLSASMSDO SEDHIEHSPM SEDTDIGGHSEA SEDTDIGGHSEA SEDTDIGGHSEA SEGIQONSEN SEGIQONSEN SEGIQONSEN SEGIQONSEN SED-ENOPSEN	NN-PSPHAS FNM SGVVF PON 2DLVS FAM 2DLVS FAM 2DLVS FAM 2DLVS FAM 2DLVS FAM PVDTAGLY Q- (RPSD-GGLY Q- (RPSD-GGLY Q- 1RPSD-GGLY Q- 1RPSD-GGLY Q- 1RPSD-SYQ- LAAONDPSLY DD- LAAONDPSLY DD- LAAONDPSLY DD- LAAONDPSLY DD- SNST PNFIS DA 2GPQA-DALY S- SNST PNFIS DA 1 * SAFPQLPQ	NQGAP PSP AQGRP PMATGF YQLDYSQSST SHLTANNDDFI NAHSPETAHFI 320 ELHGIGNESIA ELHGIGSESI EVIGSPSI EVIGSPSI AALGIESFII AALGIESFII AALGIESFII AALGIESFII AALGIESFII AALGIESFII EVIGFORTI OLNGISNESI YLTPDKDNTYI SKVGTNOKMI F 420 HGLAQMAJ	ALSCHASTIC ALSCHASTIC ALSCHART AD APPPHAHS SDHGAHSPNI SDHGAHSPNI SDHGAHSPNI SDHGALSPNI SDHGALSPNI SDHGALSPNI SDHGASSAN SDHGASSAN SDHQI		* G		YSDVSS : ISDVSS : ISDVSS : ISLTYS : ISLTYS : ISTYS :	217 228 165 263 203 324 333 307 294 334 320 329 296 306 329 237 350 237 257 279
N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : M.grisea.c : P.anserina : F.graminea : T.reesei.c : B.cinerea. : A.fumigatu : A.fumigatu : A.fumigatu : A.fumigatu : S.nodorum. : S.nodorum. : N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : M.grisea.c : P.anserina : F.graminea : T.reaminea : T.reaminea :	VAPS PNLVSHD AAPS PLVSHD AAPS PLOEM AAPS PLOEM AAPS PLOEM AAPS PLOEM AAPS PLOEM SPLSHD SP 380 SFMLOGONGFG' PLLSOGON-GG' PLLSOGON-GG'	TPHLLFTMNNA, SO STDHIFN-SPIN- SDHIFN-SPIN- SDHIFN-SPIN SDHIFN-SPIN SDHIFN-SPIN SDHIFN-SPIN SDHIFN-SPIN SDUADNESPI ACDISENNESPIN SDVADNESPI ACDISENNESPI SDVADNESPI ACDISENNESPI SDVADNESPI ACDISENNESPI SDVADNESPI ACDISENNESPI CONSNIGINT DINAILDDNVH f sp * 400 TPOIA-LQSO LPSTYPDVAPY	NN-PSPHAS PNM 3GVX PQN 2DLVS PAN 2DLVS PAN 2DLVS PAN 2DLVS PAN 2DLVS PAN 2DLVS PAN 2D-AGLY Q- AR PSD-GGLY Q- AR PSD-GGLY Q- DHPOD-SIY Q- DHPOD-SIY Q- DAONDPSLY DN AMA OPDATYE- DHAONDPATYE- SAF POLPO SAF PSL PQETEN 3AF PSL	NQGAP PSPC AQGREPMATGE YQLDYSQSST SHLTANNDDFI NAHSPETAHFI 320 ELHCIGNFSI EUNTSIGNESI EVISIGNESI EVISIGNESI ANIGIESFI ANIGIESFI ANIGIESFI PVNQFQCTI PVNQFQCTI PVNQFQCTI F VIIPDKDNTYN SKNGTNCNMI F 420 HGLAQMAA ITPNQMP	HISRHASID HISRHASIG HISRHASIG HISRHASIN HISRISTIN HISRISTIN HISRISTIN HISRISTIN HISRISTIN HISRIGA		* SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-VSPRI HAAPVTPII AFLINVHRY SP pr6 GRPM-MDS QPKS-LDVD TPRSMDDD		YSDVSS : ISDVSS : ISLTYS : ISLTYS : HSGTTE : S : NN : NN : S : N : F : GSF : F : GSF : NH : YL : EDDGTL : YL : RAVTDP : RAVTDP : RAVTDP : RAVTDP :	217 228 165 263 203 324 333 307 294 334 329 296 306 237 350 279 279 404 419 395
N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : P.anserina : F.graminea : T.reesei.c : B.cinerea. : A.fumigatu : A.fumigatu : A.fumigatu : S.nodorum. : N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : M.grisea.c : P.anserina : F.graminea : T.reesei.c : B.cinerea.	VAPSPNLSSD VAPSPNLSSD	TPHLLFTMNNA, SO 300 SEDHIF-SENT- SEDHIF-SENT SEDHIF-SENT SEDHIF-SENT SEDHIF-SENT SEDHIF-SENT SEDHIF-SENT SEDHIF-SENT SEDHIF-SENT SEDHOGHSENT SEGEIDQHSENT SEGEIDQHSENT SEDVADNNESPI SED-ENQPSPI SED-ENQPSPI SEDNNSNGINT JENNSNNGINT MAILDDNVHI f SP ×4.00 TPQLA-LQSSC IPSTYPDVNAPVI GVSGYPDLQPSH	NN-PSPHAS PNM 3GAV FQN DDLVS PAP 3GVSAY DDLVS PAP 2SVSAY P * 2R PVDTAGLY Q- /R PSD-GGLY Q- 2R PAD-VSLY Q- 2R PAD-VSLY Q- 2R PAD-VSLY Q- AAQ NDPSLY D- AAQ NDPSLY D- AAQ NDPSLY D- SN SNT PNPIS P DATONSTTAINK YYS PHTGDS DA AF PSLPQ SF PSLSGG SF PSLSGG SF PSLSGG SF PSLSGG	NQGAB PSPC AQGRE PMATGE YQLDYSQSST SHLTANNDDFI NAHSPETAHFI 320 ELHGTGSPSI ELHGTGSPSI ELHGTGSPSI EVISTGNPSI EVISTGNPSI SATGTENFTI SATGTENFTI SATGTENFTI SATGTENFTI SATGTENFTI SATGTENFTI FVMQFQCFTI QLNGTSNPSI F VI PDKDNTYI SXGTQKMI HQLPVNDISAS f 	HSRHASID HSRHASIG HSRNAS	P SAAYGPAS- PRALLPGQPAS- PROLISSPO- NSNYLLPVNSH QVSYLRTGND A 340 SPDLRGRSPSH SPGHQGRSPSH SPGHQGRSPSH SPGHQGRSPSH 	* SPA-ISPRI SPA-		YSDVSS : ISDVSS : YSNSLM : SSTTE : SSTTE : NQNS : NN : NQNS : N : 	217 228 165 263 203 324 337 294 314 329 296 329 296 329 279 279 279 279 279 279 279 279 279 2
N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : P.anserina : F.graminea : T.reesei.c : B.cinerea. A.fumigatu : A.fumigatu : A.fumigatu : S.nodorum : N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : M.grisea.c : P.anserina : F.graminea : T.reesei.c : B.cinerea. : A.fumigatu : A.gosigatu : A.gosigatu : A.gosigatu : A.gosigatu : A.gosigatu : F.graminea : T.reesei.c : B.cinerea. :	VAPSPNLSEN VAPSPNLSEN VAPSPNLSEN VAPSPNLSEN VAPSPNLSEN VAPSPNLSEN AAPSPLSEN AAPSPLSEN AAPSPNLSEN AAPSPNLSEN AAPSPNLSEN AAPSPNLSEN VAPSPNLSEN S	TPHLLFTMNNA, SOU SOU SOU SOU SOU SOU SOU SOU	N-PSPHAS FNM SGAV FQN DDLVS FAM DDLVS FAM DDLVS FAM DDLVS FAM DDLVS FAM DDLVS FAM P DRPOD-AGUYQ- RPOD-AGUYQ- RPOD-AGUYQ- RPOD-SUYQ- LAPONDPSLYD- LAPONDPSLYD- LAONDPSLYDN. MAQPDPALYS- LANDPDFUPSLYD- LANDPOLPQLYS- SNFPNFSDFAM D * SAFPSLPQET SFPSLPQET SFPSLPQET SFPSLPQET	NQGAP PSP AQGRP PMATGF YQLDYSQSST SHLTANNDDFI NAHSPETAHFI 320 ELHGIGNESI EUTSIGNESI EUTSIGNESI EUTSIGNESI SANGISHTI AANGISSTI SANGISHTI AANGISSTI SANGISHTI GLNGISNESI VIPUNOFGETI QLNGISNESI T 420 HGLAQMAA SGADLSSM SGADLSSM SGADLSSM 	HSRHASID HSRHASID HSRNASIG HSRNASIG HSRNASIG DDLLSVASM LHONVANS hsr DPPPHAH3 SDHGAHSPNI SDHGAHSPNI SDHGAHSPNI SDHGANG SDHGANG MDPPPHAH3 SDHQIGG3 MDPSPG3 SDQQG3 SDQQ	P S AYGPAS- PAALLPGOD- PAOLSS POO- NSNYLLPVNSH OVSYLRTGND A 340 SPDLRGR S PSH SPGHQGR S PSH SPGHQGR S PSH HAG	<pre>WSHMP G SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPY-ISPRI SPY-ISPRI SPY-ISPRI SPY-ISPRI SPY-ISPRI SPA-VSPRI APLINVHRVI SP pr6 * GRPM-MDSD QPKS-LDVD PPKSALDOP PPFSALDOP PPFSALDOP</pre>		YSDVSS : ISDVSS : ISDVSS : ISLTYS : ISLTYS : ISTYS :	217 228 165 263 203 307 294 314 329 294 314 329 294 314 329 296 300 279 279 279 279 279 279 279 279 279 279
N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : M.grisea.c : P.anserina : T.reesei.c : B.cinerea. : A.fumigatu : A.nidulans : C.immitis. : S.nodorum. : N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : M.grisea.c : P.anserina : F.graminea : T.reesei.c : B.cinerea. : A.fumigatu : A.niungatu : A.niungatu :	VAPSPHLVSAP VAPSPHLVSAP VAPSPHLVSAP VAPSPHLVSAP VAPSPHLVSAP VAPSPHLVSAP VAPSPHLVSAP VAPSPHLVSAP VAPSPHLVSAP VAPSPHLVSAP VAPSPHLVSAP AAHSPNLGHHD AAFSYLSOPH VAHSPYLOOH VAHSPYLOOH VAHSPYLOOH VAHSPYLOOH VAHSPYLOOH SP SFMLOGONGSG FMLLSASNNSI SFMLOGONGSG FMLLSAPNAP	TPPHLLFTMNNA, SO SID SEPHLLSPEIN NRDSYLSASMSD(SID SEDHIEH SEDHIEH SEDHIGHSSAMSD(SEDHIEH SEDTDIGHSSAMSD(SEDTSENTSSAMSD(SEDTS	N- PS PHAS PNM 3G AV F QN 2D LVS PFA 2S VSAY P 2S VSAY P 2R PVD TAG Y Q- /R PQD - AG Y Q- R PSD - GG Y Q- 2D POD - SI Y Q- SI SI Y Q- SI SI Y Q- SI SI S	NQGAP PSP AQGRP PMATGP AQGRP PMATGP SQLD1SQSST SHLTANNDDFI NAHSPETAHFI 320 ELHGTGSFI EUTSIGNESI EVIGSFSI AAGTSFSI AAGTSFSI AAGTSFSI AAGTSFSI AAGTSFSI AAGTSFSI AAGTSFSI AAGTSFSI AAGTSFSI AAGTSFSI AAGTSFSI AAGTSFSI AAGTSFSI SKUGNKMI F 420 HGLAQMAJ 	HSRHASID HSRHASID HSRNASIG HSRNASIG HSRNASIG DDLLSVASM LHQNVANS hsr s r * DPPPHAH3 SDHGAHSPNI SDHGANSPNI SDHQI-GG3 SBHQPGG3 SBCHQGG3 SDHQI-GG3 SDQOGG3 SDQOGG3 SDQOGG3 SDQOGG3 SDQOG1 SDQO		* SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-VSRI SPA-VSRI HAAPVTPII APLINVHRVI SP PRS GRPM-MDSP QPKS-LDVD TPKSRMDQD PPKSALDQD S-EPASNLDQD		YSDVSS : ISDVSS : ISDVSS : ISLTYS : ISLTYS : ISTE : S : NS : NS : NS : N : N : 	217 228 165 263 203 203 203 204 334 334 320 329 296 237 350 279 404 419 395 583 383 389 399 425
<pre>N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : M.grisea.c : P.anserina : F.graminea : T.reesei.c : B.cinerea. : A.fumigatu : A.fumigatu : A.fumigatu : C.immitis. : S.nodorum. : N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : M.grisea.c : P.anserina : F.graminea : T.reesei.c : B.cinerea. : A.fumigatu : A.fumigatu</pre>	VAPS PNLVSHD * VAPS PNLVSHD AAPS PLLVSSD VAPS PNLVSHD AAPS PLLVSSD VAPS PNLVSHD AAPS PLLVSSD VAPS PNLVSHD AAPS PLLVSSD VAPS PNLVSAD AAPS PYLPOPN AAHS PYLPOPN AAAS PYLPOPN VAHS PYLPOPN VAHS PYLPOPN SPLGED SPLGED SFML0GQ00GEG FML0SQGN-YG FML0SQGN-YG FML0SQGN-YG FMLDSQCN-YG FNLTPPNGPD LSGPAPNT0PP LSGPAPNT0PP	TPHLLFTMNNA, SO SEDHIEHSPM SEDHIEHSPM SEDHIEHSPM SEDHIEHSPM SEDHIGH-SPM SEDHIGH-SPM SEDUGHSPM	NM - PS PHAS PINM SG AV F QN SG AV F QN DD LVS PEA SG VSAY P DR PVD TAGLY Q- /R PSD - GGLY Q- QR PAD - VSLY Q- QR PAD - VSLY Q- AAON DPSLY Q- LAAON DPALY E- LHAON DPALY E- LHAON DPALY E- LHAON DPALY E- AAT PSLPOETAN SAF PQL PQ SAF PSLPOETEN AAF PSLPOETEN SAF PSLSGG-S- SF PSLSGGHN-S SMNMM SQGTHPS	NQGAP PSP AQGRP PMATGP AQGRP PMATGP YQLDYSQSST SHLTANNDDFI NAHSPETAHFI 320 ELHGIGSPSI ELHGIGSPSI ELHGIGSPSI EVISIGN SI EVISIGNESI EVISIGNESI SAIGIENEII SAIGIENEII SAIGIENEII PVMQFQQETIN QLNGISPSI F 420 	HERHASID HERHASID HERMASIG HERMASIG VINNYQFTID DDLLSVASM LEHONVANS hsr AD PPPPHAH: SDHGAHSPNI SDPQIGG ADHPSPHAH: SDPQIGG ADHSPSBODSBODSBODSBODSBODSPATTSPATTSPATTSPATTSPATTSPATTSPATTSPATTSPATTSPATTSPATTSPATT	P SAAYGPAS- PRALLPGOP PAQLSSPO- NSNYLLPVNSH QVSYLRTGND PA 340 SPDLRGRSFSH BPGA-GRSPSH SPGHQGRSFSH SPGHQGRSFSH 			YSDVSS : ISDVSS : ISDVSS : ISLTYS : ISLTYS : ISTTE : S : NS : 	217 228 1655 263 203 307 294 334 320 307 294 306 207 279 404 419 395 383 399 395 383 399 395
N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : P.anserina : F.graminea : T.reesei.c : B.cinerea : A.fumigatu : A.nidulans : C.immitis : S.nodorum : N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : M.grisea.c : P.anserina : F.graminea : T.reesei.c : B.cinerea : A.fumigatu : A.nidulans : C.immitis : S. nodorum :	VAPSPNLSSD VDQLRLP-NTPI * VAPSPNLVSHD AAPSPLVSSD VAPSPNLVSSD VAPSP	TPHLLFTMNNA, SO SO SO SO SO SO SO SO SO SO	NM - PS PHAS FNM SG AV F QN SG AV F QN DD LVS S FAM QS VSAY P R POD - AGLY Q- R PSD - GGLY Q- QR PAD - VSLY Q- AR SD - GGLY Q- LAPON DPSLY D- LAAOND PSLY D- LAAOND PSLY D- LAAOND POLF QD QCPOA - DALYS - LSN SNT PNPIS P DATON STIAINK YS PHIGD SEDA AF PSLPQETEN AAF PSLPQETEN SF PSLSGG SS FPQMQHSN -S SMMMIMSQCT PS	NQGAP PSP AQGRP PMATGF YQLDY SQSST SHLTANNDDFI NAHSPETAHFI 320 ELHGIGSP SI ELHGIGSP SI ELHGIGSP SI SAIGTENFI SAIGTENFI SAIGTENFI SAIGTENFI SAIGTESFI UNAFGSSI SAIGTENFI SAIGTENFI SAIGTESFI UNAFGSSI SAIGTENFI SAIGTESFI SAIGTENFI SAIGTESFI SAIGTESSI SAIGTENFI SAIGTESSI SAIGTENFI SAIGTESSI SAIGTENFI SAIGTESSI SAIGTENFI SAIGTESSI SAIGTENFI SAIGTESSI SAIGTENFI SAIGTESSI SAIGTENFI SAIGTESSI SAIGTENFI SAIGTESSI SAIGTENFI SAIGTESSI SAIGTESSI SAIGTENFI SAIGTESSI SAIGTE	HSRHASID HSRHASID HSRNASIG HSRNASIG HSRNASIG DDLLSVASM LHONVANS hsr DPPPHAH3 SDHGAHSPHI SDHGAHSPHI SDHQI-GG3 ADPSP-GG3 ADPSP-GG3 DQUGTS-GG3 SDQUG-STANDSP SDQUG-STANDSP SDQUG-STANDSP SDQUG-STANDSP SDQTTTPTS SPATT-STANDSP APESINIDF APESINIDF APESINIDF APESINVEF PSINVEF SPSTNVEF	P SAAYGPAS- PAALLPGOD- PACLES POO- NSNYLLPVNSH QVSYLRTGND A SPDLRGR SPSH SPDLRGR SPSH SPGHQGR SPSH SPGHQGR SPSH HAG	<pre>- WSHMP G</pre>		YSDVSS : ISDVSS : ISDVSS : ISLTYS : ISLTYS : ISTYS : ISTYS : NQNS : NN : N : 	217 228 165 263 203 307 294 314 320 306 306 306 306 237 350 279 404 419 395 383 3999 425 383 3997 425
N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : P.anserina : F.graminea : T.reesei.c : B.cinerea. : A.fumigatu : A.nidulans : C.immitis. : S.nodorum. : N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : M.grisea.c : P.anserina : F.graminea : T.reesei.c : B.cinerea. : A.fumigatu : A.nidulans : C.immitis. : S.nodorum. :	VAPSPNJSKI VAPSPNJSKI	TPPHLLFTMNNA, 300 SFDHILFTNFX SFDHIFH-SPLYPC SFDHIFH-SPLYPC SFDHIFH-SPLYPC SFDHIFH-SPLYPC SFDHIFH-SPLYPC SFDHIFH-SPLYPC SFDHIFH-SPL SFDHIFH-SPL SFDTAINS SFDCUDHSPL SFDCUDHSPL SFDVADNSS SFDTANNS SFDTANS SFDTANS SFDTANS SFDTANS SFDTANS STONS	N-PSPHAS FNM 3GVTP QN 2DLVS PAM 2DLVS PAM 2DLVS PAM 2DLVS PAM 2DLVS PAM 2DLVS PAM 2DLVS PAM 2D	NQGAB PS PC AQGRE PMATGF YQLDY SQSST SHLTANNDDFI NAHS PETAHFI 320 ELHGIGNE SIA ELHGIGS SI ENT SIGNE SIA SAIGIENETI AAN GIESETI NAIGIESETI SAIGIESETI AAN GIESETI AAN GIESETI SAIGIESETI AAN GIESETI AAN GIESETI AAN GIESETI SAIGIESETI SAIGIESETI 	HSRHASID HSRHASID HSRNASIG HSRNASIG HSRNASIG DDLLSVASM LHUNVANS hsr SDDDLSVASM SDDDLSVASM SDDQI-GGS ADPPPHAHS SDPQI-GGS ADPSP-GGS SDHGANSPNI SDDQU-GGS SDDU-GGS ADPSP-STR SDDU-STR SDDU-STR SDD-STR	P S AYGPAS- PAALLPGOD- PAOLSSPQQ- NSNYLLPVNSH QVSYLRTGND A 340 SPDLRGRSPSH PGA-RSPSH SPGHQGRSPSH HAG	WSHMP G G SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-ISPRI SPA-VSPRI PSPNSPRI SPA-VSPRI APLINVHRM SP pr6 * GRPM-MDSD QPRS-LDVD * GRPM-MDSD QPRS-LDVD SFSRDQD PPSSMDQD PPSSMDQD PPSSMDQD STRGEGGKD F-READMO		YSDVSS : ISDVSS : ISDVSS : ISLTYS : ISTYS : ISTYS : ISTYS : NQ-NS : NQ-NS : 	217 228 165 263 203 203 307 294 314 320 329 296 237 350 279 296 237 350 279 404 419 395 383 399 425 539 399 425 397 419 385 397 419
N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : M.grisea.c : P.anserina : T.reesei.c : B.cinerea. : A.fumigatu : A.fumigatu : A.nidulans : C.immitis. : S.nodorum. : N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : M.grisea.c : P.anserina : F.graminea : T.reesei.c : B.cinerea. : A.nidulans : C.immitis. : S.nodorum. : N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii :	VADS PNL SHEP VADS PNL SHEP VADS PNL VSHD AAPS PL POEN AAPS PL POEN AAPS PL POEN AAPS PL POEN VHS PL POEN SP VSHD SP VSH	TPHLLFTMNNA, SO SIDHIEHSEN SIDHIEHSEN SIDHIEHSEN SIDHIEH-SEN SIDHIEH-SEN SIDHIEH-SEN SIDHIGHSEN SIDHIGHSEN SIDGUDGHSEN SIDGUDGHSEN SIDEGUDQHSEN SIDVADNESEN SIDNANNSINSINT TOLANVSNISINT TOLANVSNISINT TYOLA-LQSSO SISNIY-NQGO SISNIY-NQGO TPPTEGYPNQGD SGSEAXAMKTEN QQCMGVYNSAA	NN-PSPHAS PNM SGVX PQN CDLVS PAN CDLVS PAN CDLVS PAN CDLVS PAN CDLVS PAN CDLVS PAN CD	NQGAE PS PC AQGRE PMATGE AQGRE PMATGE YQLDYSQSST SHLTANNDDFI NAHSPETAHFI 320 ELHGIGSESI ELHGIGSESI ELHGIGSESI EVISTGN SI EVISTGN S	HIERHASID HIERHASID HIERNASIG HIERNASIG VINNYQFTL DDLLSVASM LEHQNVANS hsr AD DPDFAH: SDHGAHSPHI SDPQI-GGG ADHPSPGGG SDHQAHQP SEHQPGGG SDQDQ SDQDY VDGTS	P SAAYGPAS- PRALLPGOD- PAQLSSPQC- NSNYLLPVNSH QVSYLRTGND P a 340 SPDLRGRSPSH SPDLRGRSPSH SPGHGRSPSH SPGHGRSPSH 			YSDVSS : ISDVSS : ISLYS : ISLTYS : ISLTYS : ISTTE : S : NS : NS : NS : N : N : 	217 228 165 263 203 203 204 314 334 320 329 296 237 350 279 206 237 350 279 404 419 395 389 399 425 397 419 386 399 386
N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : P.anserina : F.graminea : T.reesei.c : B.cinerea. : A.fumigatu : A.fumigatu : A.fumigatu : A.nidulans : S.nodorum. : N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : P.anserina : F.graminea : T.reesei.c : B.cinerea. : A.fumigatu : A.nidulans : S.carevisi : S.nodorum : N.crassa.c : C.albicans : S.nodorum : N.crassa.c : C.albicans : S.nodorum : N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi :	OQONOSISHTP NPDPM-SHSP DSINI TTRSSGINYSD VDQLRLP-NTPI * VAPSPNLVSHD AAPSPLVSSD VAPSPNLVSSD VAPSPNLVSSD AAPSPNLVSSD AAPSPNLVSSD AAPSPNLSSD AAPSPNLSSD AAPSPNLSSD AAPSPNLSSD NSEYFQHDVD SP 380 SFMLQSQGN-YG FMLDSQGN-YG FMLDSQGN-YG FMLSSGCH-YG FMLSSGCH-YG FMLSSCG-YG SD FMLSSCG-YG SD SMLQSGCH-YG FMLSSCG-YG SD STANGSPN SFMLSSCS GLDPNMINOFG FMLHTPANSGG OPSQYQYSMV	TPHLLFTMNNA, SO 300 SEDHIF-SPIN- NRDSYLSASMSDO SEDHIEH-SPIN SEDHIEH-SPIN SEDHIEH-SPIN SEDHIEH-SPIN SEDHIEH-SPIN SEDOLGHSPIN SEDOLGHSPIN SEDEQUARS SEDEDIGHSPIN SEDUGHSPIN SEDUGHSPIN SEDVANNSPIN SEDVANNSPIN SEDVANNSNGINT DENNSNNGINT DINANISNNGINT TPOLASSO SONYLQSSO IPSTYPDVNAPVI GVSGYPLQPSMGED SGPSEAYAMKTET QCMGVYNSGAE PATYMQPOQ QYMQPYTHNEPOD	N-PSPHAS PNM 3GVX PQN 2DLVS PAM 3GVX PQN 2DLVS PAM 2DLVS PAM 2DLVS PAM 2DLVS PAM 2DVSAY 2D	NQGAB PS PC AQGRE PMATGE YQLDY SQSST SHLTANNDDFI NAHSPETAHFI 320 ELHGT GSF SI ELHGT GSF SI ELHGT GSF SI ELHGT GSF SI ENT GT GSF SI EVT ST GNE SI SATGT ENFTI SATGT ENFTI SATGT ENFTI SATGT ENFTI SATGT ENFTI SATGT ENFTI SATGT ENTI SATGT	HSRHASID HSRHASID HSRNASIG HSRNAS	P - SAAYGPAS- PAALLPGOD- PAOLSSPOO- NOULSSPOO- NOULSSPOO- NOULSPOO- SPOLEGESPOO- SPOLESPOO- SPOL			YSDVSS : ISDVSS : YSNSLM SSTTE : SST NS : ISLTYS : ISLTYS : ISLTYS : ISLTYS : NS : N : 	217 228 165 263 203 307 294 314 320 306 207 279 404 419 395 383 3997 419 395 397 419 395 397 314
N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii : P.anserina : F.graminea : T.reesei.c : B.cinerea. : A.fumigatu : A.fumigatu : A.fumigatu : A.nidulans : C.immitis. : S.nodorum. : N.crassa.c : C.albicans : F.graminea : T.reesei.c : B.cinerea. : A.fumigatu : A.fumigatu : A.nidulans : C.immitis. : S.nodorum. : N.crassa.c : C.albicans : S.nodorum. : N.crassa.c : C.albicans : S.nodorum. : N.crassa.c : C.albicans : S.cerevisi :	VAPSPNLSSD VDQLRLP-NTPI * VAPSPNLVSHD AAPSPLVSHD AAPSPLVSSD VAPSPNLVSAD AAPSPLVSSD VAPSPNLVSAD AAPSPLVSSD VAPSPNLVSAD AAPSPLSHD AAPSPLSHD AAPSPLSHD AAPSPLSHD AAPSPLSHD AAPSPLSHD PNYHYNNTTN DNNLLSASNNSI NSEYFQLHDVD SP 380 SFMLQSQNGFG FMLLSASNNSI NSEYFQLHDVD SP 380 SFMLQSQNFGG FMLLPNGGPD FGLATPHNFG FNLTPNGGPD FGLATPHNFG FNLTPNGGPD SPLSGAPNTOVP ISAPATNSAV SGLOVNNQFG FMLTPANSFG QESQQVQYSMU	TPHLLFTMNN, 300 300 SDHIEHSPM SDHIEHSPM SDDIGHSEN SDDIGH	NN-PSPHAS PNM SGAV FQN DDLVS PAM SGVSAY P P P P P P P P P P P P P	NQGAP PSP AQGRP PMATGP AQGRP PMATGP AQGRP PMATGP SHLTANNDDFI NAHSPETAHFI S20 ELHGTGSPST ELHGTGSPST EVISIGNESI EVISIGNESI EVISIGNESI SAIGIENETI SAIGTESFT QUNCISNESI TUP PMOFGETTI QUNCISNESI F 420 HGLQMAA 	HSRHASID HSRHASID HSRNASIG HSRNASIG HSRNASIG DDLLSVASM HSRNASIG DDLLSVASM HSRNASIG DDLLSVASM SDPQI-GGS JDHGHSPHAM SDHGAHSPHI SDHGAHSPHI SDHGAHSPHI SDHQU-GGS JDHGSS JDHGSS JDGTS	P - SAAYGPAS- PRAALPGOD- PAOLSSPOO- NSNYLLPVNSH QVSYLRTGND A SPDLRGRSPSG SPDLRGRSPSG SPGHQGRSPSG SPGHQGRSPSG HAG	- WSHMP G		YSDVSS : ISDVSS : ISDVSS : ISLTYS : ISLTYS : ISTYS : ISTYS : NQNS : NN : N : N : N : 	217 228 165 263 203 203 203 307 294 306 207 279 404 419 395 383 399 425 383 397 419 386 307 419 386 307 419 387 316 443 316

	480	* 500	*	520	*	540	* 5	60	
M.grisea.c :	: YANGSTAPLPRPI	LGTASLSPSPGLSSR-	DSSRSI	SPLDRSIPP	-NKRRQSTS <mark>A</mark>	V PNNVMA <mark>L</mark> RLAD	P <mark>EFAAQGSGDG</mark> I	KRVQKH :	485
P.anserina :	INTSGALLGSHRSP:	SATGSLSPNSASDGRS	DISRSI	SPLDRSGAS	PNRRROSTSS	VPNNVIAL RLAD	EYNGGVAGEG	KRVQKH :	504
T.reesei.c :	EHPGSGILPPGN	VLGSSLGVDLAA	RSDTASRSI	SPLDRSGTSSP	ASERROSTS	VPNNVTALRLAD	EYONSOEAS	KRMOKH :	464
B.cinerea. :	NSPRSHSPS	SNASPLMRSSLSPIGH	IDSS-ASRSI	SPNDRSGATS-	PGRRRQSTSS	LPNRDYILGLAD	DYQAVSSDN-A	KRVQKH :	481
A.fumigatu :	YAHPSTSRLRSS	STSSSLDPLAPTTPRS	LSPFDSFGRQQQS	NPSSRDPSPS-	RSNRRLSTSS:	I <mark>dsrnyi</mark> lglad	PQRPG-ASPND	KRVQKH :	515
A.nidulans :	: YAVSISRPRSPS:	SPSASLDALAASSPRS	LSPFN-VGRHPYS	NPSSREPSPA-	RSARRLSTSS'	V DSRNYI<mark>L</mark>GLAD	PQRPG-SNNTD:	KRVQKH :	486
C.immitis. :	EAQSMSRSLSASA	ALTAPF PSMPHD-PRS	LSPFP-RSTGTLS	TPSSREVSPA	AKNRROSTSS	IDSRNYILDLAD	PORPG-SNAGD	KRVQKH :	507
N.crassa.c :	FNNSGYRSPS	SPSGSLSPSSAADLRE	SSARSI	SPMDRSGAGSI	NSRRROSISS	VPNNVIALRLAD	NYNGSGENI	RRAOKH :	475
C.albicans :	LSMMIN		н	DSTNNGTTSTS	TTTRSSTSS	ATSSSIG <mark>V</mark> AAAD	S	:	357
S.cerevisi :	MADLLPSSENDNNR	ERYDNDSKTSYNTINS	SNFNEDNNNNLL	TSKPKIESGIV	NIKNELDDTS	GQF E QK <mark>V</mark> GF KN	DDNHENNDNGTV	TNNRKN :	537
A.gossypii :	LAALHIP	NSSSANS	LSP	TSLGPSTGPAE	TSSPADHSAP	DEGETANNISG	NTRRK	SLOKN :	421
	76		8		rr s s	ь та	p	r qkn	
	Zf * 58	BO *	600	* 6	20	*640	*	6	
M.grisea.c :	PAIFQCSLCPKRETE	RAYNLRSHLRTHTDEF	PFVCTVCGKAFAR	QHDRKRHE <mark>G</mark> LH	SGEKKEVCKG	DLK-ACGQWGCG	RRFARADALGRI	HFRSEAG :	578
P.anserina :	PAIFQCTLCPKRETE	RAYNLRSHLRTHTDEF	PEVCTVCGKAFAR	OHDRKRHEGLH	SGEKKEVCKG	DLK-SESQWGCG DLK-Vecowgcg	RRFARADALGRI	HFRSEAG :	597
T.reesei.c :	PATEOCTLOPKRETE	RAINLESHLETHTDEF	PEVCTVCGKAFAR	OHDRKRHESTH	SGEKKEVCKG	DEK-TEGONGOG. DEK-TEGONGOG	REFARADALGRI	IFRSEAG :	557
B.cinerea. :	PAIFQCTLCPKRFT	RAYNLRSHLRTHT	PFVCTVCGKAFAR	QHDRKRHEGLH	SGEKKFVC <mark>K</mark> G	ELK-QHGQWGCG	RRFARADALGRI	IFRSEAG :	574
A.fumigatu :	PAIFQCNLCPKRETE	RAYNLRSHLRTHTI <mark>)</mark> EF	PFVCTVCGKAFAR	QHDRKRHE <mark>G</mark> LH	SGEKKFVC <mark>Q</mark> G	ELS-RGGQWGCG	RRFARADALGRI	HFRSEAG :	608
A.nidulans :	PAIFQCTLCPKRFT	RAYNLRSHLRTHTDEF	PFVCTVCGKAFAR	OHDRKRHEGLH	SGEKKFVCRG	DLS-RGGQWGCG	RRFARADALGRI	IFRSEAG :	579
C.immitis. :	PATEQONLOPKRETE DATEOOSI ODVRETE	RAYNLRSHLRTHTIEF	PFVCTVCGKAFAR	OHDRKRHEGLH	SGEKKEVCRG	DLT-REGOWGCG.	REFARADALGEI	IFRSEAG :	552
N.crassa.c :	PATFOCKVCPKRFTF	RAYNLRSHLRTHTDEF	PFKCTVCDKAFAR	OHDRKRHEGLH	SGERKFICKG	ELPVACOONGCG	RRFARADALGRI	IFRSEAG :	569
C.albicans :	:EPCPQCNKVEQB	K <mark>P</mark> YNLKSHMKTHSI <mark>T</mark> EF	PYHCNICFKRFAR	SHDKKRHELLH	QGVKNFKCQG	YLNDGVT SWGCG	KTFARSDALSRI	IFRTE <mark>TG</mark> :	448
S.cerevisi :	PANEACDVCGKKETE	RPYNLKSHLRTHTIEF	PFICSICGKAFAR	QHDRKRHEDLH	TGKKRYVCGG	KLK-DCKPWGCG	KKFAR <mark>S</mark> DALGRI	HEKTESG :	630
A.gossypii :	PAIMSONLODKKETE	R PMNIKSHIRMAN DIS 4 avnt 4 sh64th 31 r 4	BESCSVOCKABAR D5 C 6Cakarar	OHDRERED OHDAKRHE LH	isekkryvegei I cak 5 c c	K uk -geat mede L q NGCG	KKEARSDALCRI 4 FARADALGRI	HERHESCE :	514
	pacode oprires	HainDibiloinoinoinoin	ro e ocgnaran	iquidantinit di	. Gen 5 C G	ш д шаса	i IANaDADGNI	II ISEAG	
	60 *	680	* 700	*	720	*	740	*	
M.grisea.c :	RICIKPLIDEEIMER	RORIWQEO	RMQAAQHQQHMMM	IPPPGIDPN-TG	YPVDAAGNYS	LPAAILAQYPAL	AQUNWGTAGGG:	IDGGSGI :	663
F.graminea :	RICIKPLIDEEMMER	RORLWOEO	RMOHNMAOSMVAA	SGMPMDGPV	YPMDPTGNPM	LPAALLAOY PAL	AOUNWSTI	PDVNSGM :	650
T.reesei.c :	RICIKPLLDEEMVER	RORQWQEQ	RMQQNMAQNMANE	QVMGMDAG-PA	YPMDASGNYT	LP <mark>Q</mark> ALLAQY PAL	AQMNWSA	DMGGGL :	638
B.cinerea. :	RICIKPLLDEEALEF	RQRLWQEQ	RMQNMHMQQ	QPMGQDANG	FAVDSSGNYG	L P <mark>A</mark> ALLAQY PAL	ANISWSEII	PQGDNNI :	651
A.fumigatu :	RICIKPLLDEESQEF	RERSLMDOQQH	HLQF	LPQQVMVP	VDNPHAGNEV	LPAALLAQYPAL	QTUQWDQIA/	ASADDPS :	683
C.immitis. :	RVCIKPLLDEEAAEF	RERTEMSODOOODEE	OOOOORVTGHLOF	VNQFLMLFGQG VPOTMTVOG1	MDGOHP-AFT	LPAALLAOYPAL	OTIONDOIA	COPDDIS :	689
S.nodorum. :	RVCIR PLLEEEAQE	GGWDGQQQMANGTGM	IFQQMPAQNYGPGM	MSQSGFEPFPQ.	AGMSQAPAQF	lp <mark>a</mark> allaqypal	AGIQWDQLP	GNPEEM :	644
N.crassa.c :	RICIRPLLEAENREF	RORQYAEAMQN	AAQGMMQQQGGMM	MSPGMDPN-GE	FQMDPFV	L P <mark>Q</mark> ALLAQY PAL	ALLPAGPAAN	IGDGAGL :	652
C.albicans :	WICIRPIMEEAKRI	EEEEQQRQ			QQAQQQ	QQVPQQS Q VSEQ:	IGWNVGEIH	(FNDEYY :	503
A. dossvoji	RECTAPIYDEASKE	35GQE5			LTENDOFM	s			546
5 31	r CI PL ee e	q				lp a laqypal		-	
	760	* 700	*	800	*	820			
M.grisea.c :	EDDISGRSSEDASD-	YDDADDGEYVS	GPGTGEGOG	GMNEGFGEMGY.	ASDYGGR		: 715		
P.anserina :	EDDISGRSSYDASD-	YDDEADGCYVS	GPGTGFGPG	GMQENFGEIGY.	ASDYGGR		: 736		
F.graminea :	DDEVSGRSSFDASD	YDENDDGGYVS	GPGTGFGEG	GMGQGFGEMGY.	ASDFGGR		: 702		
B cinerea	DDBLSGRSSFDASD-	SEYYDECDDCCY	S-GPAPOHCY DOD	OMTERY-NACY	SSDMSGR		: 661 · 788		
A.fumigatu :	DIGGRSSFDASS	GNEFGF-EDDDSGLSS	VSGINAGYS	AAGNFY			: 725		
A.nidulans :	DIGGR <mark>NSFDAS</mark> SC	GGEFGF-DDDESGIS-	VSGMSTGYAS-	DQGNIYNVDAQ	GQMLGVN PGE.	AGYAN PNWGK-	: 724		
C.immitis. :	DLRGGGRSSFDASSC	GGEFGFGDDDDTGLSS	GYVSGPGPGRAAS	SQDQLLGVSSS	GGGWHPHA	GGWSSDYDGVK	: 762		
s.nodorum. :	: EGDISGRSSEDAS <mark>S</mark> C	- CEIEEDE2DIÓ⊑ÓÓB	-VIAGNEGGWAS-	DQGYH			: 690		
N crassa c .	EEDLGSNYPASD-	YDDVERCEVVS	GPGTGFCPC	SMORGYGELCY	ASDYGGR		• 702		
C.albicans :	: EEDLGSNYEASD- DNSNFIKKLLQSNK-	YDDVEEGCYVS	GPGTGFGPG	SMQEGYGELGY.	ASDYGGR		: 702 : 517		
N.Crassa.c : C.albicans : S.cerevisi :	EEDLGSNYEASD DNSNFIKKLLQSNK-	YDDVEEGGYVS	GPGTGFGPG	SMQEGYGELGY.	ASDYGGR		: 702 : 517 : -		
N.Crassa.C : C.albicans : S.cerevisi : A.gossypii :	EEDLGSNYEASD DNSNFIKKLLQSNK-	YDDVEEGCYVS	GPGTGFGPG	SMQEGYGELGY.	ASDYGGR		: 702 : 517 : - : -		

Figure 17 : Alignement des séquences des homologues de MgCrz1, chez les espèces fongiques étudiés. Les domaines fonctionnels importants sont entourés

> Conservation des domaines chez les différents champignons

Le facteur de transcription Crz1 de M. grisea possède un domaine « Zf – C2H2» (570 à 595 aa) très bien conservé chez différents espèces fongiques. Par ailleurs, la protéine, en dehors des domaines n'est pas bien conservée.

5.3. Arbre phylogénique



Figure 18 : Arbre phylogénique des orthologues de MgCrz1 réalisé par PhyML.

AF : Aspergillus fumigatus, AG :Ashyba gossypii AN : Aspergillus nidulans, BC : Botrytis cinerea, CA : Candidas albicans, MGrisea : Magnaporthe grisea, TR : <u>Trichoderma reesei</u>, SN : Stagonospora nodorum, AG : Ashbya gossypii, CI : Coccidioides immitis, FG : Fusarium graminearum, PA : Podospora anserin, SC : Saccharomyces cerevisiae et NC : Neurospora crassa

6. Protéine Ags1 (α-1,3-glucan synthase)

 \succ

Query seq.	1	250	500	750	1000	1250	1500	1750	2000	2250 2387
Superfamilies	Alpha	<u> </u>				Glycosyltransf	erase_GTB_type)		
Multi-domains	The	-anytase super	tamily						GI	gA

Figure 19 : Schéma des domaines et acides aminés fonctionnels de Ags1

6.1. Identification des domaines fonctionnels d'Ags1

Plusieurs acides aminés sont importants pour l'activité d'Ags1 :

Acides aminés et domaines fonctionnels d'Ags1 (Figure 20)

GH : Le domaine « Alpha-amylase », IPR006047 d'après l'annotation de pfam, est de la famille 13 de glycosyl hydrolase, (son Enzyme Commission est : EC 3.2.1.)

La réaction de catalyse de l'enzyme Ags1 peut se résumer ainsi :

UDP-glucose + [alpha-D-glucosyl-(1-3)]n \rightarrow UDP + [alpha-D-glucosyl-(1-3)]n+1

GT1 : Le domaine « Glycosyltransferase», IPR013534, est un domaine catalytique caractéristique des glycogènes synthases qui utilise ADP glucose comme substrat. Ce domaine est caractéristique de l'activité enzymatique par des liasons entre l'alpha-1,4-glucose (EC 2.4.1.x).

GT2 : Les protéines possédant le domaine « GlgA », IPR001296, transfère UDP, ADP, GDP ou CMP, attaché à un sucre à une variété de substrat comme le glycogène, le fructose-6-phosphate et les lipopolysaccharides.

6.2. Alignement des séquences des orthologues de MgAgs1

M.grisea.a : P.anserina : N.crassa.a : B.cinerea. A.fumigatu : A.nidulans : M.graminic :	* MAP? NIRP] NGRLQLS;	20 FHNVFLLAVTLFT PFFSNALLVTLLT. MLARTFVALCSVL AGWRLVGSLLAFF 3GLKAI-ALLTF-	* TISLVPALKTDV ATTIVQGLR.DP -MEMSWGCQPPI LSTQVDALR.BE AATSI-AWP.DE AATSI-AWP.DE AATAT-CWP.DE MAYR.DE	40 VDF - VD <mark>WNLNT</mark> CDEE - NWNLNT VARSIEVNLNR EEF - VGYNLNT SL- VDYNVNT SEL - VDYNVNT PEY - TE <mark>YNLN</mark> C SN6N	* INRLATNELEY IKKSAKTELEY INGTATSELDY INGTATSEFDY INKQASNEAEY INKSATNEADY INGFTENELEY IN A P Y	60 TGNRDKTN DYDVSLRPEN WGDRTEDDPN YGKWEDHE STDGPGHF WGGWSDHF WGYWHEDAAL	* IHT KSPTNWI ITTYMESPTNWI FF-OSPDNWI TF PSPDNWI TH PSPENWI YT PSPENWI SPNWI	80 REPYTIFLDR RMEVYTUFLDR RFEYSFFLDK RFEYTUFLDR RFEYTUFLDR RMEYTUFLDR R FY3F6D4	* EVNGDP : WVNGEP : EVNGDP : EVNGDP : EVNGDP : EVNGDP : EVNGDP :	80 85 68 77 76 81 61
M.grisea.a : P.anserina : N.crassa.a : B.cinerea. : A.fumigatu : A.nidulans : M.graminic :	100 TNDDINGTYPE NNDDINGTLYE DNDNANGTLFE TNDDINGTKFE TNDNINGTLFE YNDEINGTAFE ND iNGT SE	* DDMTSNQLRHGGD TDMMSTQLRFGGD DDMNSNQLRFGGD TDFMQTQLRHGGD HDLNSNQMRHGGD HDLNSNQMRHGGD D S Q6R GGD	120 LOGVIDSLDYIC LEGIRDSLDYIA VDGIIDSLDYIC LOGLIDSLDYIC VAGLUDTLDYLC LOGLIDTLDYLS 6 G6 D3LDY6	* 14 GMGVKGIYIA GMGAKAIYIA GMGIKGIYIA GMGIKGIYIA GMGIKGIYIA GMGIKALYIA GMGIKALYIA GMGIKALYIA	O CSETNAPWG CSETNLPWG CSETNLPWG CSETNAPWG CSTLLNOPWG CSETLMOPWG CSETNOPWG CSETNOPWG CSAPNOPWG	* 16 ADAYS IDDI ADSYS IDDI ADSYS IDDI ADOYS IDDI ADOYS IDT SDGYS IDT YDOYS IDDI YDOYS IDDI YDOYS IDDI	N PLLDKHFGDIKI MLDKHFGHIRI LLDKHFGNIKI LLDQHFGDID: LLDQHFGTIQ LLEPHFGTLE SDLC HFG 5	180 MOOKTIQATHD SWQEVIHEIHE CWGEALDATHD WRKTTTAIHD SWRDAISEIHR WRDAITEIHK FWRRAIMEIHK WILH	RGMYVI : RMMWVI : HGMWVI : RGMYVM : RGMYVV : RGMYVL : RGMYVI :	173 178 161 170 169 174 154
M.grisea.a : P.anserina : N.crassa.a : B.cinerea. : A.fumigatu : A.nidulans : M.graminic :	* IDOTMATMEDLI IDNTMATMEDLI MDNTMATMEDLI IDNTMETMEDLI FDNTIATMEDLI IDNTIATLEDLI DNTIATLEDLI	COO * LGF BCH IND STPF I GF BCF INETTPF I GF BCF INT STPF I GF BCF INT TPF I GF BCF INT TPF I GF BCF INT STPF I GF BCF IN STPF	220 TEKBHKVVWKS RTEBHKVVWKS IVEBHKVVWKS TITBHKVVWKS SSKBHKALWKS SSKBHKALWKS TVKBHRAQWKT TVKBHRAQWKT	* - RRYIDFDIG - RRYIDFDIG NRQYIDFSFG - RRYIDFFFG - RRYIDFDIG - RRYIDFDFG K I DE G	240 MDYNBTCNYE SNEYNBTCDYE SNTYNKTCDYE SNTYNBTCNYE SNTYNBTCDYE SNTYNBTCDYE SNTYNBTCTYE	* VPYNDNGFPE EPWYDGF EFWYEDGF RFWLDTGYT RFWNDTGWP\ RFWYDGMP\ RFWYDGMP\ RFWNDTGYPI	260 TAETLSKIKG RIKP-PGLKG KELVTDLMNG DQSVRDQLNG NESLTAGLVG DQPIRDQLVG	* CYNS DFDQYGD CYNS DFDQYGD CYDS DFDQYGD CYDS DFDQYGD CYDS DFDQYGD CYDS DFDQYGD CYDS DFDQYGD CYDS DFDQYGD	28 IEAFG\ : IEAFG\ : IEAFG\ : IEAFG\ : REAFG\ : IEAFG\ : IEAFG\ :	265 267 250 263 261 266 246
M.grisea.a : P.anserina : N.crassa.a : B.cinerea. : A.fumigatu : A.nidulans : M.graminic :	0 * F PDWKRQLAKF/ F PDWQRQLAKF/ F PDWQRQLAKF/ F PDWQRQLSKF/ Y PDWQRQLAKF/ W PDWKRQLAKF/ Y PDWRRQL	300 ASVQDRLREWHPS ASVQDRLREWHPS ASVQDRLREWVPS ASVQDRLREWNPS ASVQDRLREWNPP ASVQDRLREWNPP ASVQDRLREWHPP	* VMARLKVFSCLA VAARLEHFSCM VTARLAFFSCM VRTKEIFTCM VRORLTRHSCM VRORLTRHSCM VRORLTRHCM VRAKLENFYCM	320 AT QMIDFDGYR WRAIDTDAFR TGMIDVDGFR TQQIDTDCFR TGAIDTDCFR TASFDTDCTR TAQIDTDCFR	* TI DKAMOVT LE TI DKAVOVT VI TI DKAVOVT VI WDKATOIT VI WDKATOIT VI WDKATOAT VI WDKATOAT VI WDKATOGT PI	340 AQAEWSSAME AQASFSSAME AQAHFSSAME ALGSFSHATE ALGEMSLAYE ALGDMSKAYE ATAAMSASFE A S 3 5	* ACAKE-VGKD KCATE-ICKT KCAKEKFNKD ECARC-VGKN ECARA-VGKN ECARA-VGKB ECARR-HGKO	360 IEMVVGEITSC IEAVFGEITSC IEMVTGEITSC IEMVTGEITSC IEFTSGEITSC IEFTAGEITSC IEFTAGEITSC IEFTAGEITSC IEFTAGEITSC	* NVLCSV: NTLCSI: NTFCSI: NTFCSI: NTFCSI: NTFCSI: NTFCSI: NTFCSI:	357 359 343 355 353 358 338
M.grisea.a : P.anserina : N.crassa.a : B.cinerea. : A.fumigatu : A.nidulans : M.graminic :	380 YLGRGRQ PDMKJ YIGRGRE PGAAN YLGRGRQ PDMLJ YLGRGRQ PDQLJ YLGRGRQ SNQVI YVGRGRQ PDQLJ Y6GRGR2p	* PDLTTALSI ENLHPEKAMNM EELSDDPVKALTL PSS-MADAVKL KS-ALDAMNM DSVGN-IYDAMKL PEN-LTQAVTL A6 6	400 KGSI – DKKYEI DSDWKNNQDLEV GNAITDTSKYEV TSNS – SLAYEI TNLS – DHQYEI TNLS – DHQYEI KHNS – SHQYEI F6	* 4 RE PGN SALDG RE PGN SALDG REKGN SALDA RDHDQNALDS REHGHEATDA REVGHEATDA RAEQE SAMDS SR A6D	20 GAPHYS YRY GAPHYS YR AGAPHYS YR AAPHYS YR GAPHYS YR GAPHYS TYR AFHYS YR	* 4 LTKFLGLQC MTRFLGLSCH MTRFLGMSCA LTRFLGMDCA LTRFLGMDC LTRFLGMDC AT4FLG6 G	40 LOAGFDLETD LOAGFDLSVD TRAGYDLETD LAGGYDTETN LAGGYDTEVD LEAGYDVELD LEAGYDAERN L AG5D p 1	* 46 DMATFWNDMIQ WVMTWHEWIK WTETWHEMIK WDAWNEMIV WTDAWNIWYI WVQAWGNMTVI WVQAWGNMTVI W W 6	O SNDFYN : TNDMYN : TNDFWN : TNDFVN : SNDMIN : TNDLIN : TNDMTN : 3ND N	444 449 435 442 440 447 425
M.grisea.a : P.anserina : N.crassa.a : B.cinerea. : A.fumigatu : A.nidulans : M.graminic :	* ANTGEFDPRHLY ANTGKFDPRHLY ANTGVFDPRHMY ANTGKFDPRHMY ANTGKFDPRHMY ANTGCFDPRHMY ANTGDFDPRHMY	480 (GATNQDVFRWPG (GATNQDVFRWPS (GVSNQDVFRWPA (GVSNQDVFRWPA (GVTNQDVFRWPA (GVTNQDVFRWPA (GVTNQDVFRWPA (G 3NQDVFRWP	* 500 IKOGTERWNIGH VVOCMEROLLAY IEKGTERMILLAY IEKGTOKOLLGH IEWCVEROLLAI IEWCVEROLLAI IEWCVEROLLAI IEWCVEROLLAI IERCULHROLVGH 6 G 4 6	* FIITLLPGA FIITFLPGA FITTFLPGA FITTHLPGI FITTLHLPGI FITTLMPGT FITTLMPGT	520 PLVFYGEEQF PIHYYGEEQF PLLIWGEEQA PLLIWGEEQA PLLIWGEEQA PLLIWGEEQA FKLIWGEEQA P 6 5GEEQ	* FYVLDNSAEN LYALDGTAAN FYVLDNTADN FYTLDATASN FYVLDATASN FYVLDSTNSN Y LD 3a N	540 IYVFGRQAFSP IYVFGRQAMAP IYVFGRQAMAP IYIFGRQAMSP IYIYGRQAMSP IYIYGRQAMSS IYIFGRQASS IYMFGRQPLSA IY65GRQa	* PANMOHACYK SPANKAHCCFO SPANKAHCCFO SOAMOTHCCFS SOAMOTHCCFO ATANKTHCCFO ATANKTHCCFO ATANOTHCCYG AW HgC5	5 ODNEVY : INVTQY : IENDLY : IGSGTY : IESSOY : IESSOY : IDSTOY : I Y	537 542 528 535 533 540 518
M.grisea.a : P.anserina : N.crassa.a : B.cinerea. : A.fumigatu : A.nidulans : M.graminic :	60 VDm PVEKSRTG IGM PVEKGRLGG VDm PVTKAKDG YQM PVTKAKDG YQM PICKGRQGG YQM PLEAARNG P GG	 580 TDITVSYDHRDP DDDGVARDHRDP KDKSVGMDHRNP KDKSVGMDHRDP HDETATYDHRDP NDETVTYDHRDP NDETVTSQDHRDP D DHR1P 	* SAIDRNM KHME AAQLRNTEKHME AAPVRNILKNME SHEVRNIKKMM SHEVRNIKHMM SHEVRNIKHMM SAFVRNILRRM PGRN 4 MS	600 OMRE QIPS AIRDHLRS AMRNSSQLGV OMRE NYLV OMRE NYLV OMRE VYPV ORE VYPV OR 6R	* TEHENLYQKI TDHENYIKTI TEHENLUEKI TITDEAFTROI TUNDENTUCKI TUNDEFTQOI 6 G 6 I	620 ANOTRFELLE AKOTEEIWLI SNOTDFTLLE SNOTIEILLE SNOTEPVYYE SNMTEGMVYF QT	* CS-SSPSFG CS-TNFTFG CS-GDPTERG CSNGTATFTG CSNGTATFTG CSNGTETETG CSSGVVTDTG CSS GV	640 IMG ARGLMIP IWSVGRGT-SN IWSVVRGLPPG IWSTRRGYTPG IWSTRRDTPG IWSVRRDTF- 5WS R	* PAOKANE : ITOLE : VODKLK : IODLSK : IOSLGS : TODFGS : -VDSAI : q	627 629 620 626 624 631 606

M.grisea.a P.anserina N.crassa.a B.cinerea. A.fumigatu A.nidulans M.graminic	660 : SEPVVULV: : DK-PVVEV: : AGGQANQSVVMVV: : DKDQPVULV: : SDNRETWLV: : ANRNANLETWLI	* HNEAVEKTYTED SNRNKTHTYEED HNRENTTTYKEN HNNYDTVTYSED QNENHTVDYKED SNMNRTHDYTED TNLNETKREEN	680 CNS-QA-EHVAF CSNPDTF-NKGAF CDQREGAF CSSNETSL CSSNETAL CSDNETAL CSDNETAL	* 700 VAPEDSCDKVVNI IAPEDACTNIRDV LSPEDACAKVKNI VAPELCCVTVKNI VAPEASCTTVRNI IAPESCERVRNI ISPYPACTKIKNI	* EDKSDVLTDGSSA EEDGPEITLEASE MDDGDVITSSSA FYPYEEVIKAGI SYPHDEHVLKDGE SHPYDTLTUGDGE SHPYDEHVLKDG	720 VKNGFTGSA-SA VKNEFDNSTKNA FOLGIANOTGFN KKLGLNGSSDTN KKLGLNGSSDTN VKLGLNGSSTELV QTLYISNSTEPN	* 740 SCISSITMKPYEF SCLSKIVMPPYGF SCLSEVTLNPEF SCLDSITLVPYBYF SCLDSITLVPYBYF SCLDSITLKPFEF SCLRELEVPEFGP	AYV : 712 MYV : 717 VYV : 703 AYV : 714 AYV : 710 AYV : 717 AYV : 699
M.grisea.a P.anserina N.crassa.a B.cinerea. A.fumigatu A.fumigatu A.nidulans M.graminic	 6W 6S 	760 IITG IPGPSDNP IITK BEG IITS SEG IITS SEG IITS SEG IITK QPGDEAN VITK SEG	C a * 780 GKHDSSFDST HDMSTDST HDVPTDST HDARLVSTVAP HDARLSTVAP G-HDSPLRSTVAP HDASTLST HD	* FADGRIDIRLESS GKGGVIPIRLESS KANGRIDISFEB GQGETIFIFEFG8 DABEIDVSIJE DASETWRITLOS -RDKWEWOLESS 6 6 F	ff tL 800 VEMADOLSITKA HEM-DOLSVKAJ ITEM-DOLSVKAJ AEM-KOSDIJSK AEM-COLSVTAS EAM-COLSVTAS (OS) DOLNMTRS M C	* 820 TILTTKDGEGT(NA-VLTVDHSGI TV-NLTQDGV VITSATEDGQ SFNSSTETGK TFSSSTETGK TFSSSTETGK	C 6 6 p5 5 * SSSARITQVI ANEKLDITWDNNA IDETOISWTKEN Y-AT-LANATGEYS I-PS-VDSKSAS I-PS-IDASTVC RET-VDRTIF 6	YV GGL : 796 GGT : 796 GL : 780 GTL : 793 GRK : 787 GGN : 800 GGA : 773 C
M.grisea.a P.anserina N.crassa.a B.cinerea. A.fumigatu A.nidulans M.graminic	840 : IONPTKRDLYI : FTP-SEKSEYI : FTPQDADKIKYT : LPSA-VNVTEFV : IP-A-TD-TOWT : ITEV-AN-SNAT : IANP-ENSTLVA	860 FVPSLEF SAKI SIESTOKITGKI AINSANG NATI SIPTMOTIKGNI OLFNVØV TCKI HIPGKOQAADI IFSANF SAKI 565 L	* TSLADGI HKVVVEI TNVODGI IKLSVR TNVADGI IKLTLD TNVSNGVHSITLA TGVYNGI HRVTVN RGVYNGI HRVTVN RNVEDGYHRLTVP 6 1G6 6 6	880 NAPAKKTGS-TAA PATREDGSASIN PTAAKGKVTKG -NITSNSENSSIG -NASDSACTSAIN -NASNADGDDSIF -VVKTLSGSQLFK G C	* 900 ARDVELFRFCKLI IANDHELIRFCKP TRDHELLRICKPF ATDTELFRVCOVI IAIDHELFRVCOVI ISRDHELFRVCOVI OFL R G	* NPVVM PQVANYS NPVVG MDATYNI NPIAF PGSANFT NPVVG MDATYNI NPVVFT - SANYS NPVVFT - SANYS NPIVFT - SANYS NPFV5 AN5	920 PTLVSGTK-DAMS TLLH-FDGNRMA NDLLQSVSNNLYR RELLHKYDNGTLY SSLLHEHENGTFF SSLLHEKEDGTFY SSLLHEKEDGTFY L6	* THS: 885 NHS: 885 KHN: 873 SHK: 884 QHH: 875 QHH: 875 QHH: 863 SH
M.grisea.a P.anserina N.crassa.a B.cinerea. A.fumigatu A.nidulans M.graminic	940 : APGATKWRYTINN : AAGATHERESID : APGATKWRYSIN : AAGADREKYSIN : AAGADKYRYSIN : AAGADLERYSIN : AGA 545311	* GSLMGSDMQPYTG GSLMGSMFPADA GSSTMSKMVDYDG GSSSGSSMSEMLPYVG IGSSFSDMMDYVG GTSSDMTPYTG GTSSDMTPYTG GTSSDMTPYTG	960 EQTV-SISPM EKTYQEVDAMYRDI KETSVTGQQ GNTTLEPQA GNTTIELP GNDTITMLP GMTEVEKQP	* 980 VNSGTAKOCME NTLNTGRELOKME NSGTALOADE NTGRSKOKME NSGTEKOADE NSGTKKOADE WGT QW	* GTHVTVQYHSAPI GKHLQVQYFSKPI GKHIQVQYFSKPI GHVIMQYFSKL1 GHVRVEYFSKL1 GHHIRVEYFSRF GHVRVEYFSRF G H6 62Y S	1000 GSSSIKQHGDLN- GSSGFIQHADSN- GSSAFIQHSDKG- GSSDVVQHADLE- GSSDVVQEGBSGH GSSSHVQEGBSGH GSSDHVQADLD- GSS Q D	* 1020 WGT PRRL PHVFI -DITFERHVPHIRI -IDYQRVF PHIKI -TNKWSRRLPHIF WSRR PRRP PHFF WKYKT PRRF PHAFF SKPRRLPNFI R Ph	HGP : 970 HGP : 977 HGP : 957 NGP : 969 NGP : 961 NGP : 961 NGP : 975 NGP : 946 GP
M.grisea.a P.anserina N.crassa.a B.cinerea. A.fumigatu A.nidulans M.graminic	* FNKMGYDACULN: YNKMGYDACLPG; FNKMGYDTGLPG; YNCYGYDTGLDN; YNCYGYDACLDN; YNGYGYDACLDN; SN 5GYD G6	1040 MALAGAGL MDLVGHNT FTDNKKDSL VQLGDGL IKLDAGAGGDGY FKLSNDGE L	* 1060 WEKHEYYEWPAN WELHYMYEWPAN WSIHYMYEWPAN WRFRFVAEWPA WRFRFVAEWPA WSIFWMTEWSASG WSIFWMTEWSASG W5 EWPA	* FQFNIWGINPI FQINIWGINPI MQVNWGMNPI 	1080 COPDATFINGDVI NOPDVGFINGDII NOPDVSFIEGDII COPDCSFVEGDAI COPDOSFVEGDAI COPDOSTVEGDII COPDOTIVEGDII O 2PD 6 GD I	* 110 NDGVADRLPPSS NDGIVDRLPPSS GDHVVDRLPPSS MDGVLDRMPPSS MDGVLDRMPPSS GDSVLDRLPPSS OD 6 DR6PPSS) * LANNVVNITSGP P LANNVINITEAPPI STALINITDPP T STALINITROPS LSTTLINITDHPT SATLINITDHPT L 66NIT Pp	EYW : 1056 POL : 1063 PAL : 1043 PYL : 1055 PHL : 1047 PYI : 1065 PHL : 1035 P
M.grisea.a P.anserina N.crassa.a B.cinerea. A.fumigatu A.nidulans M.graminic	1120 : SWKIQFDDTNIT: AYKLVYNDATWR : AWKVFYNDATWT : GYKIAIDGNYR : AWVIHIDDSTIQ : SWKLYINDATMR : AWKIAVNDGNMR Sk6 1D	* 1140 EXEVENCEHIAVOV EYIETCHIGIOV HLERACNNNVOI VOIPYCNRSYOM OLEETCSRAAOM YLIBACHOSCOI ALIETCNMWHOL PGQ6	* IMFULATGSVIL VLFILLATIPVLL ALFULFATLPVAL LMVVLFWIVPVLS AAFFLWITPVLS TLYVLFWITPLLS TLYVLWTVPLIT CT1	1160 AAVSGUIYVAGEY AVLAGUIYMHSFY ACLAGUIYMFSFY GGLSIWLENKSFY GAACVYGEKKSFY GSACVYLENKSFY AALSAWVFVLGEY 5 5 FY	* 1186 KVKVNKSGFS QVKINKSGFS QVKINKSGFS QVKENVKVK QVKENVGVK KVKENKIGATE KVKENKIGATE VKN G) * 	1200 NISSVNIMSREKEF NISKIDFRNIGF UISKINIANVGF KLK-REKKEDPSF KKIK-RADEEL RMK-QLASGNGKN KPLR-KLFHRRTPS	GMG : 1143 G-G : 1148 G : 1127 KE- : 1143 GEP : 1132 GEPS : 1157 SER : 1124
M.grisea.a P.anserina N.crassa.a B.cinerea. A.fumigatu A.nidulans M.graminic	* 1220 : MEMATVTPSPMV(: VEMSPMPPPP : VEMAITPPP : MTVMGGLHSMI : MNPLVRFANRSSI : FNPLMRLAEKSGI : FLQEVAKPS	* IT PAPGGAAAAA PSAALVPF PSSALSPL 'HENATQLGLQAD 'VQSRSAFN MQSTTALAG LENSLE	1240 GKDGKREKVLIAT GSGGGGFTVLIAT VAATGRETVLIAT EGTLKRETVLIAT AASGKREMVLIAT NGETVLIAT	* 1260 MEYNIDDEKISIK MEYNIDDEKIKK MEYDIEDWAIKIK MEYDIEDWAIKIK MEYDIEDWAIKIK MEYDIEDWGIKIK MEYDIEDWGIKIK	* IIGGLGVMAKLMST IIGGLGVMACLMAN IIGGLGVMACLMAN IIGGLGVMACLMGF IIGGLGVMSCLMGF IIGGLGVMSCLMGF IIGGLGVMSCLMGF	1280 ADEHCDIIWVVP SADKHMNLIWVP NICHODLIWVVP NICHODLIWVVP NICHOLIWVVP NICHODLIWVVP OLIGHODLIWVVP OLIGHODLIWVVP OLIGHODLIWVVP	* 130 AVGDVEYEVDTE WGDVTYEFSMOA AVGDVTYEFSMOA VGGTDYEISHOA VGGTDYEISOF VGGVDYEESOF VGGVDYEVTE VGGUDYEISE VGGUDYEISE	ABE: : 1234 ABE: : 1234 ABE: : 1213 ABE: : 1213 ABE: : 1232 ADE: : 1219 ABE: : 1245 APE: : 1199

	*	1320	*	1340	*	1360	*	1380	*	
M.grisea.a P.anserina N.crassa.a B.cinerea. A.fumigatu A.nidulans M.graminic	: MFVNINGSSY : MYVOVMGOPY : MYVDVMGOPY : MOVTILGNSY : MFVTVLGNSY : MTVTILGOAY : MIVTILGSTY MVVTILGSTY M V 66G Y	EVKVOYHYHE BIEVYYYTVN BIEVYYYVVN TVOVOYHTIR EVNVOYHVIN OVNVOYHVIN TVNVOYHTVN CONVOYHVNN	NITYVILDAPVF NITYVLLDAPIF NITYVLLDAPIF NITYVLLDAPVF NITYVLLDAPVF NITYVLLDAPVF NITYVLLDAPVF NITYVLLDAPVF	RTQTKADP RKQTKADP RAQSKSEP RQQTKTEP RQQTKSEP RKQTKAEP R Q3K P	(TARMDDIESC (TARMDDIESA (TARMDDIESA (BARMDDIDSA (BARMDDIDSA (BARMDDIDSA (BARMDDMESA (ARMDD6 Sa	ILYAAWNSCI ILYAAWNSCI ILYAAWNYCI VYYSAWNOCI IYYSAWNOCI VYYSAWNOCI IYYSAWNOCI IYYSAWNOCI 6 Y AWN CI	LADAURRES-E LADURREP-V LADSIRREP-V LADSIRREP-V LADAIRRES-V LADAIREP-V LADAIOREPU LA I RF V	DIYHINDYHG DIYHINDYHG DIYHINDYHG DLYHINDYHG ELYHVNDYHG DIYHINDYHG DIYHINDYHG dIYHINDYHG	AAAPLYLLPOTI AAAPLYLLPOTI AAAPLYLLPOTI AVAPVHLLPOTI SIAPLYLLPOTI SVAPLYLLPOTI TVAPLYLLPGTI AP6yLLP TI	: 1326 : 1326 : 1305 : 1324 : 1311 : 1337 : 1292
M.grisea.a P.anserina N.crassa.a B.cinerea. A.fumigatu A.nidulans M.graminic	1400 ECLISTINA ECCISTINA ECCISTINA ECCISTINA ECCISTINA ECCISTINA ECCISTINA ECCISTINA ECCISTINA ECCISTINA	* F QGLW FMR I FI F QGMW FMR I FI F QGLW FMR I Q F QGLW FMR I Q	1420 BOREVCEVENT BAKEVCEVENT KERSEVCEVENT KEKEEVCSVENT KEKEEVCSVENT E EGC V5n6	* PPEVVRDY PPEVVRDY DLDVASRY DVEVVRNY DVDVVRNY V	1440 VQYCSVFNLLH VQYCSVFNLLH VQFCSVFNLLH VQFCSVFNLLH VQFCSVFNLLH VQFCSVFNLLH VQFC	* AGASYLRIH AGASYLRIH AGSYLRIH AGSYLRIH AGASYLRIH AGASYLRIH AGASYLRIH AGASYLRIH AGASYLRIH	1460 RGFGAVGVS RGFGAVGVS RGFGAVGVS GGFGAVGVS OGFGAVGVS GGFGAVGVS GFGAVGVS	* KYGDRSLARY KYGDRSLARY KYGKRSWARY KYGKRSYARY KYGKRSYARY KYG RS ARY	1480 FIFWSIKNICOL FIFWSIKNICOL FIFWSIKNICOL FIFWGISKICNI FIFWGIKKYCNI FIFWGIRKICNI FIFWGIRKICNI	: 1419 : 1419 : 1398 : 1417 : 1404 : 1430 : 1385
M.grisea.a P.anserina N.crassa.a B.cinerea. A.fumigatu A.nidulans M.graminic	* 15 : PNPDPSDRDL : PNPDPSDTAD : PNPDPSDTAD : PNPDPSDTGF : PNPDPSDTGF : ONPDPSDLGA pNPDPSD	00 DPSQAAEQQ DPSQAAEQQ DPSQDANDQ NDFSQDANDQ NDFQD-ST NGEPTRQ TKEDSLIKD TEEPSDTP W	* 1520 QPED QTDEAS S-KEIEIDSFE A-KGVEVDOAAS SKIVNODFE SDIKVDAFE BDIKVDEFE ADIKVDEFE 61 E	AKRGDURR EKRGDURR EKRGEYRR SQRADUKR ASRGEFKR AGRAELKR OSRLOURM R 4r:	* 154 DAGEWAGLEVD DAQEWAGLEVD DAQEWAGLEVD DAQEWAGLEON DAQEWAGLEON DAQEWAGLDON SAGEWAGLDON CAQEWAGL 1	0 PLADLEVFV0 PTABLEVFV0 PSABLEVFV0 PNADLLVFV0 PDADLLVFV0 PNABLFVFV0 P A L VFV0	* 156 SRWSLQKGVDI SRWSLQKGVDI SRWSLQKGVDI SRWSMQKGIDI SRWSMQKGIDI SRWSMQKGVDI SRWSMQKGVDI GRWS6QKG6DI	0 IADIFESVLE IADIFESILE IADLEESILE IADVMEAVLE IADVMEAVLE IADVMEAVLE IADAFESTLE IAD P 6LE	* 1580 KYEKTQLIAVGE KYEKTQLIAVGE EMENVQLICVGE ARSNVQLICVGE ARSNVQLICVGE KNENVQLICVGE p QLI 6GP	: 1512 : 1511 : 1490 : 1506 : 1493 : 1493 : 1521 : 1474
M.grisea.a P.anserina N.crassa.a B.cinerea. A.fumigatu A.nidulans M.graminic	* VIDLYGKFAA VIDLYGRFAA VIDLYGRFAA VIDLYGKFAA VIDLYGKFAA VIDLYGKFAA VIDLYGKFAA	1600 LIKLEKIMCKY LIKLEKIMCKY LIKLEKIMCKY LIKLORMMELY LIKLORMMELY LIKLORIMEKY LIKL 6M Y	* PGRVFSKPEPTS PRVVSKPEPTO EKRVFSKPEFTA PGRVFSRPEFTA PGRVFSRPEFTA PGRVCSKPMTO PRVS4PEFT	1620 LPPYIFSG LPPYIFSG LPPFIFSG LPPFIFSG LPPFIFSG LPPVIFSG LPPCVFTG LPP 6F3G	* APPALTPSRDE APPALTPSRDE APPALTPSRDE APPALTPSRDE APPALTPSRDE APPALTPSRDE APPALTPSRDE	1640 PFGLVAVEFO PFGLVAVEFO PFGLVAVEFO PFGLVAVEFO PFGLVAVEFO PFGLVAVEFO	* GRKGALGVGAR GRKGALGVGAR GRKGALGIGAR GRKGALGIGAR GRKGALGIGAR GRKGALGVGAR GRKGALGVGAR	1660 VGGLGQMPGF VGGLGQMPGF VGGLGQMPGW VGGLGQMPGW VGGLGQMPGW VGGLGQMPGW VGGLGQMPGW VGGLGQMPGS	* MYTVESTSPOHL MYTVESMTPSHL MYTVESMTPSHL METVESTTTTHM MYNVESTTTSHL MYNVESVSTSHL METVESTSTSHM MS VES 3 H6	: 1605 : 1604 : 1583 : 1599 : 1586 : 1514 : 1567
M.grisea.a P.anserina N.crassa.a B.cinerea. A.fumigatu A.nidulans M.graminic	1680 LYOFEHAITE LOOFROATUS LHOFROATUS LHOFROATES LHOFROATES LHOFROATES LHOFROATES LHOFROATES COF AT	* ALKCKTKKRA ALDCKHNKRO ALACKHNKRA ALSKLETRO ALDSKEKVRA ALSSKTETRA AMASSFETRA AG k R	1700 LMRAWSAKORFP VMRAWSAKORFP LMRARSAKORFP LMRARSAKORFP MRARSAKORFP MRARSAKORFP MRA SAKORFP	* VAQWRMQI VAQWLKQL VAQWVKQL VAQWVKDL VAQWVEDL VAQWVEDL VAQWRKEL VAQW 6	1720 DSTYDOSTRIH DEUXESIRIH DIVSESTRIH SILOSKAIKIH SILOSTAIRIH BILOSTAIRIH DEUSKAIRMH L S I 6H	* NKEAAKKKKS QKEAKKKKFI IKEQKKKKLF DK-EEAK SK-ELAKS EK-EVSRGHA DKIRNRKSMC K 4	1740 GGRSGGLFPLS DALSPSPMGTR VLSPGLTVPG HSGR SSGQT-LT AGGRPM-TPMT GSSSTA-STLV	* PSVQSPNPNT PSSRASNISN ASSRAS PRSRGRDGGN PSGCNTPSGT PSGATTPSGM PSEPSLPSEP PS	1760 RLIGSNSP TYVDPTGGAHTP -YADPGSGRSSP IFYSSAKR-LSS MTPPVAGN-LTP MTPTTGSRGLKP SLSSETSLSP P	: 1694 : 1697 : 1671 : 1681 : 1671 : 1671 : 1705 : 1657
M.grisea.a P.anserina N.crassa.a B.cinerea. A.fumigatu A.nidulans M.graminic	* 1 : LSPIPGSSAG : -GITPSPSPG : -GPLAVPSR- : FG-TSFA :TGIQTP- : LS-QGVGMGI : PA-SAAASRF	780 PSPGADASR PEQGLMTPRL PVTPTLRD-L PUTPTLRD-L SUTPHSRESSY SVPHSRESSY	* 180 TRSLIGPT PTSP ASPEAL PT PTAP ASPD-LPTPGAP SQLDVASTIGGS SNASRLSVLGPQ SNLNRLSE SEEDGLNMSSRS	0 GLMSPYGA -WAGGMKS -WAGG-RS T QRNTIVYS YV RRYS-ST	* 18 PDDGPRLSAPR NSPRESVAS ESPGARDSTAS RPSSPTRVEQP RDPSPGMIEKP AQKTFGE-SQP SQVSSLEVSDE	20 FPWTDLPSSM SINGNTLYAN SIAGN-FYL(PAGGGLSRKI KSGLSRQI RESSGLQRSI DDVRGHPGG-	* 18 NNRDSTISVMT NPA-AQSSTVS DPGGARESTMS DSLGVRASFNT LSLGVRSFNT LSLGVRSF	40 TDSTGFRAQS VDSFAIRAQK VDSFAIRAQN PGSPGLESPG PLSPT-STG PMSPG-TPP PDLPPIPAPA S	* 1860 EGAEGDML DGMHSPGLAPSD GGFMSPGLGP-D TPGAHDSLLP VTEADDAIFP -SVEOTLLP RYSTSNMSSLSP	: 1783 : 1785 : 1756 : 1753 : 1754 : 1777 : 1739
M.grisea.a P.anserina N.crassa.a B.cinerea. A.fumigatu A.nidulans M.graminic	* -GMPTPPPKS : NGLSLPRP-A : GGLAFPRP-A : PPSIFGAGGC : PARRMLEPAN : PPKP-FAAAL : LPRTESSF	: 1880 SFYQQSRNSSM AFGNANRNSSI AFTQAHRNSSI INANRASM IPSHRLSSASV AGNRLSSASV RISRLPTE 3	* LSIKDVVGBRHD LSIPDVVGDRHD LSIPSVIGPRHD LSVSSVIGPRHD LSVDSIVGRKRD LSIDSVVGGKRD LSMEKVVGBRHD LS6 66G 4 D	1900 FKLQKVDQ FKLQVDQ FKLQKVDQ FKLQKVDP YRLQRVDP YRLQKVDP YNLQEVDP LQ VD	* IPTDSNEFFYY IPNDTNGEYYA IPNDTNGEYYA IPTDTOGEYYA IPTDTOGEYYA IPTDSNGTPFK IPTDSNGTPFK IPTDSNGTPFK	1920 EFSAMIDDN EFEDMIE-T EFEQMIE-A QFARNID-N IFEKKIE-T NFEQQIE-N KFEKMIE-N F L I	* SAGNSTTEMC TASNSSSDLC DGKNSEGOLC NGSNSESOLC NGKNSESOLC NGKNSESNC L NS C	1940 IESFLKKSEK IETFLKRSEK IETFLKRSEK IEEYLIKSEK IEEYLVKSER IEEFLVKSER IEEYLLKSEK IE 5L 4SE4	* EMP ARYENAKLG EMP ARYEDAKLG EMP ARYEDAKLG KOP DRF EDAKLG KOP DRF EDARLG DO ASNVENARLG Wf RIA4LG	: 1875 : 1876 : 1847 : 1842 : 1846 : 1868 : 1827



Figure 20 : Alignement des séquences des homologues de MgAgs1, chez les espèces fongiques étudiés. Les domaines fonctionnels importants sont entourés

> Conservation des domaines chez les différents champignons

La protéine Ags1 de M. grisea possède trois domaines « Alpha-amylase », IPR006047 (158 à 370 aa); « Glycosyltransferase», IPR013534 (1242 à 1640 aa) et « GlgA », IPR001296(2035 à 1475 aa). Tous les trois domaines sont bien conservés chez différents espèces fongiques.

Les séquences de la protéine correspondante à MgAgs1 chez *C. immitis,* est mal annotée. En effet, à partir de l'acide aminé 1780, il y a un exon qui n'est pas annoté chez ce champignon. Chez *S. cerevisea, C. albicans* et *A. gossypii* cette protéine est inexistante puisque celle-là a un rôle dans la synthèse de γ (1-3) glucane, un composant qu'on ne trouve pas chez la levure.

6.3. Arbre phylogénique



Figure 21 : Arbre phylogénique des orthologues de MgAgs1 réalisé par PhyML. AF : *Aspergillus fumigatus*, AN : *Aspergillus nidulans*, BC : *Botrytis cinerea*, MG : *Mycosphaerella graminicola*, MGrisea : *Magnaporthe grisea*, PA : *Podospora anserin*, et NC : *Neurospora crassa*

7. Adaptateur Ada2

Query seq.	es M AA M AA	75	150	225	300	375	450	525 546
zinc cluster zinc clu ve hydrophobic binding su ive charged binding surfa	1 A A A A A A A A A A A A A A A A A A A							
Specific hits	ZZ_ADA2							
Superfamilies	ZZ superfamily						SHIRM	superfamily)
Multi-domains			COG	5114				

Figure 22 : Schéma des domaines et acides aminés fonctionnels d'Ada2

7.1. Identification des domaines fonctionnels d'Ada2

Plusieurs acides aminés sont importants pour l'activité d'Ada2 :

Acides aminés fonctionnels d'Ada2 (Figure 23)

ZZ : Le premier domaine est le domaine de doigt de zinc. La présence d'une copie simple de ZZ démontre que la protéine en question est une protéine d'adaptateur transcriptionelle comme la protéine Ada2 chez *S. cerevisiea*. En effet, la protéine Cas5, chez *C. albicans*, joue le même rôle que la protéine Ada2 chez *S. cerevisiea*.

COG : « COG5114 », encode pour un complexe d'histone acétyltransférase, SAGA/ADA ; une sousunité d'Ada2.

SWIRM : Le domaine, « SWIRM » est un petit domaine de 85 acides aminés, présent dans les protéines chromosomales. Il est impliqué dans l'interaction protéine-protéine, pendant l'assemblage des complexes protéine-chromatine.

M.grisea.c : P.anserina : N.crassa.c : T.reesei.c : C.immitis. : M.graminic : F.graminea : A.fiduigatu : A.nidulans : C.albicans : A.gossypii :	* 20 * MGVIRF-KTAAR-AEGEVIN CDVCSADITSINK MGVIRF-KTAAR-GEGVIN CDVCSADITSINK MGVIRF-KTAAR-GEGVIN CDVCSADITSINK MGVIRF-KTAR-GEGVIN CDVCSCDISIN MGVIRF-NNAAR-TDG-TIN CDVCSCDISIN MGVIRF-KTAR-TEG-TIN CDVCSDISIN MGVIRF-KTAR-TEG-TIN CDVCSDISIN MGVIRF-KTAR-TEG-TIN CDVCSDISIN MGVIRF-KTAR-TAATIN CDVCSDISIN	40 * 60 * 80 * TR AHSANDYDUCVN FAQ SSSSNIG AH P R. BON SF DT EREDMGADES ILLEG 93 TR AHSANDYDUCVN FAQ SSSSNIG AH P R. BON SF DT EREDMGADES ILLEG 93 TR AHSANDS DLCVQ FAQ SSSSNAHQ QT PYRI BON SF DT DREMGADES ILLEG 93 TR AHSANDS DLCVQ FAQ SSSSNAHQ QT PYRI BON SF DT DREMGADES ILLEG 93 TR ABDA SD DLCVP FGK BSNAHQ QT PYRI BON SF DT DREMGADES ILLEG 93 TR ABT HS DLVP FGK SSNAHQ QT PYRI BON SF DT DREMGADES ILLEG 93 TR ABT HS DLVP FGK SSNAHQ QT PYRI BON SF DT DREMGADES ILLEG 93 TS AHSA HS DLVP FGK SSNAHQ QT PYRI BON SF DT DDREMGADES ILLEG 93 TS ASKS DPD DL CT FAQ GNNHH HD KSSN PYRI BON SF DT PDRMGADES ILLEG 93 TS AHAA HS DD LCVP FAA GHERN DF AH AR V BON SF DT AREMGADES ILLEG 93 TS AHAA HS DD LCVP FAA SS SOF GAAF HS PRIVE BON SF DT AREMGADES ILLEG 93 TS AHAA HS DD VP FAA SS SOF GAAF HS PRIVE BON SF DT AREMGADES ILLEG 93 TS AHAA HS DU VP FAA ST SS SOF GAAF HS PRIVE BON SF DT AREMGADES ILLEG 93 TS AHAA HS DU VP FAA ST SS SOF GAAF HS PRIVE BON SF DT AREMGADES ILLEG 93 TS AHAA HS DU VP FAA ST SS SOF GAAF HS PRI
M.grisea.c : P.anserina : N.crassa.c : T.reesei.c : S.nodorum. : C.immitis. : M.graminic : F.graminea : A.fidulgatu : A.nidulans : C.albicans : A.gossypii :	100 * 120 ABTYGLGSWADIADHIGGYRHRDEVR HY'INAYU ABTYGLGSWADIADHIGGYRBADEVR HY'INAYU ABTYGLGSWADIADHIGGYRBADEVR HY'INYY ABTYGLGSWADIADHIGGYRBADEVR HY'INYY ABTYGLGSWADIADHIGGYRRBEVR HY'INYY ABTYGLGSWADIADHIGGYRRBEVR HY'INYY ABTYGLGSWADIADHIGGYRRBEVR HY'INYY ABTYGLGSWADIADHIGGYRRBEVR HY'ISYYI CBTYGLGSWADIADHIGGYRRBEVR HY'ISYYI CBTYGLGSWADIADHIGGYRRBEVR HY'ISYYI CBTYGLGSWADIADHIGGYRRBEVR HY'ISYYI CBTSGLGWADIADHIGGYRRBEVR HY'ISYYI CBTSGLGSWADIADHIGGYRRBEVR HY'ISYYI CBTSGLGWADIADHIGGYRRBEVR HY'ISYYI CBTSGLGWADIADHIGGYRRBEVR HY'ISYYI CBTSGLGWADIADHIGGYRRBEVR HY'ISYYI CBTSGLGWADIADHIGGYRRBEVR HY'ISYYI CBTSGLGWADIADHIGGYRRBEVR HY'ISYYI CBTSGLGWADIADHIGGYRRBEVR HY'IYYI CBTSGLGWADIADHIGGYRRBEVR HY'YYI CBTSGLGWADIADHIGGYRRBEVR HY'YYI CBTSGLGWADIADHIGGYRRBEVR HY'YYI CBTSGLGWADIADHIGGYRRBEVR HY'YYI CBTSGLGWADIADHIGGYRRBEVY HY'YYYI CBTYGLGSSADIADHIGGYRRBEVY HYYYYYI CBTYGLGSSADIADHIGYRRBEVY HYYYYYYYI CBTYGLGSSADIADHIGYRRBEVY HYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYY	* 140 * 160 * 160 NS PRE PLEKKCS HDNE AND IT KEEF AKKKOKIESKE DAAKNAPALOK-TKETASVE : 186 ESNE PLEKKCS HDNE AND ISKEEF SKKKRIESKE AAKNAPALOK-TKETASVE : 186 OS PNFPLEKKCS HDNE AND ISKEEF AKKKRIESKE AAKNAPALOK-TKETASVE : 186 OS PNFPLEKKCS HDNE AND ISKEEF AKKKRIESKE AAKNAPALOK-TKETASVE : 174 NS PNFPLEKASKE SKEEF AKKKRIESKE AAKNAPALOK-TKETASVE : 174 NS PNFPLEKASKE SKEEF AKKKRIESKE AAKTAPATE-OKFTASVE : 188 DS PAPPLEKASKE SKEEF AKKKRIESKE AAKTAPATE-OKFTASVE : 188 DS PAPPLEKASKE SKEEF AKKKRIESKE AAKTAPATE-OKFTASVE : 188 DS PAPPLEKASKE SKEEF AKKKRIESKE AAKAAPTTE-OKFTASVE : 188 DS PAPPLEKASKE SKEEF AKKKRIESKE AAKAAPTTE-OKFTASVE : 188 DS PAPPLEKASKE SKEEF AKKKRIESKE AAKAAPTTE-OKFTASVE : 188 DS PAPPLEKASKE DTE-OKSISKEF AKKKRIESKE AAKAAPTTE-OKFTASVE : 188 DS PAPPLEKASKE DTE-OKSISKEF AKKKRIESKE AAKAAPTTE-OKFTASVE : 188 DS PAPPLEKASKE DTE-OKSISKEF AKKKRIESKE AAKAAPTTE-OKFTASVE : 188 DS PNFIJEKADE DTE-OKSISKEF AKKKRIESKE AAKAAPTTE-OKFTASVE : 189 DS PKFIJEKADE DTE-OKSISKEF AKKKRIESKE AAKAAPTTE-OKFTASVE : 186 ESKYPIJEKASKE DTE-OKSISKEF AKKKRIESKE AAKNAPALOK-TKETASVE : 189 DS PKFIJEKADE DTE-OKSISKEF AKKKRIESKE AAKNAPALOK-TKETASVE : 189 DS PKFIJEKADE DTE-OKSISKEF AKKKRIESKE AAKNAPALOK-TKETASVE : 189 DS PKFIJEKADE DTE-OKSISKEF AKKKRIESKE AAKNAPETE-OKFTASVE : 189 DS PKFIJEKADE DTE-OKSISKEF AKKKRIESKE AAKNAPETE-OKFTASVE : 180 DS PKFIJEKADE DTE-OKSISKEF AKKKRIESKE AAKNAPETE-OKFTASVE : 180 DS PKFIJEKADE DTE-OKSISKEF AKKKRIESKE AAKNAPETE-OKFTASVE : 180 DS PKFIJEKADE DTE-OKSISKEF AKKKRIESKE AFKREAKAAPTTE-OKFTASVE : 180 DS PKFIJEKADE DTE-OKSISKEF AKKKREESKE AAKNAPETE-OKFTASVE : 180 DS PKFIJEKADE DTE-OKSISKEF AKKKREESKE AAKNAPETE-OKFTASVE : 150 KSDFYIJEDTK-DIKVOJABEEEKKREAKEREFEREKENDEKENNEPHO PREKENDESVE S SP6P P 1 1 • FQ T4KKREE T4 A PK KPTASVE
M.grisea.c : P.anserina : N.crassa.c : T.reesei.c : S.nodorum. : C.immitis. : M.graminea : A.graminea : A.nidulans : B.cinerea. : C.albicans : A.gossypii :	* 200 * 220 SCH510 GYMEGRLEF515 BAAN ARE AVOLMOOD SCH510 GYMEGRLEF515 BAAN ARE AVOLMOOD SCH510 GYMEGRLEF515 GANARE AVOLMOOD SCH510 GYMEGRLEF515 FANDAE AVOLMOOD SCH510 GYMEGRLEF515 FANDAE AVOLMOOD ACHAVGCYMEGRLEF515 FANDAE AVOLMOOD CHACGCMEGRLEF515 FANDAE AVOLMOOD CHACGCMEGRLEF51	* 240 * 260 * 260 COCINERT CELEPCTER KITYMETYNC RICCRVSRKVTFENNLD YRE SKIEKKRSKE : 280 COCINERT CELEPCTER KITYMETYNC RICCRVSRKVTFENNLD YRE SKIEKKRSKE : 280 COCINERT CELEPCTER KITYMETYNC RICCRVSRKVTFENNLD YRE SKERKKSKE : 280 COCINERT CELEPCTER KITYMETYNC RICCRVSRKVTFENNLD YRE SKOEKKRSKE : 280 COCINERT CELEPCTER KITYMETYNSRID RAVSRKKTFEN SKOEKKRSKE : 280 COCINERT CELEPCTER KITYMETYNSRID RAVSRKKTFEN SKOEKKRSKE : 280 COCINERT CELEPCTER KITYMETYND RICCRVSRKKTFENNLD YRE SKOEKKRSKE : 280 COCINERT CELEPCTER KITYMETYND RICCRVSRKKTFENNLD YRE SKOEKKRSKE : 280 CACETN - CETD AMERIKAN YND YNSRID RARSRKKTFENNLD YRE SKRSKTE : 280 CACETN - CETD AMERIKAN YND YNSRID RARSRKKTFENNLD YRE SKRSKTE : 242 COCYNERT CETD AMERIKAN YND YNSRID RARSRKSKTFENNLD YR SKRSKTE : 280 COCYNERT CETD AMERIKAN YND YNSRID RARSRKSKTFENNLD YR SKRSKTE : 280 COCYNERT CETD AMERIKAN YND YNSRID RARSRKSKTFENNLD YR SKRSKTE : 242 COCYNERT CETD AMERIKAN YND YNSRID RARSRKSKTFE : 242 COCYNERT CETD AMERIKAN YN SKITT RARSRKSKTFE : 243 COCYNERT CETD AMERIKAN YN SKITT RARSRKSKE : 243 COCYNERT CETD AMERIKAN YN SKITT RARSKRSKE : 243 COCYNERT CETD AME
M.grisea.c : P.anserina : N.crassa.c : T.reesei.c : S.nodorum. : C.immitis. : M.graminic : F.graminea : A.fumigatu : A.nidulans : B.cinerea. : C.albicans : A.gossypii :	* 300 * SR DINRAK PARMINEDE AFSOLUEUN SR DINRAK PARMINEDE AFSOLUEUN SR DINKAK PARMINEDE AFSOLUEUN SR DINKAK PARMINEDE OFCOLOEDIN SR DINKAK PARMINEDE ETK SEVENN SR DINKAK PARMINEDE ETK SEVENN SR DINKAK PARMINEDE ENKSEVENN SK DINKAK PARMINEDE SK SK DINSK SK SK DINKAK SK	320 * 340 * 360 *
M.grisea.c : P.anserina : N.crassa.c : T.reesei.c : S.nodorum. : C.immitis. M.graminic : F.graminea : A.fidmigatu : A.nidulans : B.cinerea. : C.albicans : A.gossypii :	380 * 400 * PPPPDPSG-AALVAE BISTRNGSTVNGKEK PPPPDPSG-AALVAE BISTRNGSTVNGKEK PPPPDPSG-AALVAE BISTRNGTPSKHK OPPPEPSG-ASLVAELITRNGHSP-AK APPFCOSA-ATALHNN CONSTSGNSTSK -OOPEGSA-ATALHNN CONSTSGNSTSK -OOPEGSA-ATALHSN CONSTSGNSTSK -OOPEGSA-ATALHSN CONSTSGNSTSK -OOPEGSA-ATALHSN CONSTSGNSTSK -OOPEGSA-ASUTTEBISTRNGTPOPARSK LFVRLYSPPHPYPTSSSTR TOOPEGSA-ASUTTEBISTRNGTPOPARSK NOOSEOFA-NOTTEBISTRNGSLTNGIKKEP NG-HR-NKES	TELOPIP IT LOUTDONAPOLIHLITPESKLEELIRIOPKPYTMIKEOLIKEALKINTI : 460 EFELOPIP IT LOUTDONAPOLIHLITPESKLEETIRIOPKPYTMIKEOLIKEAVKSNCS : 456 SLPOPIP IOELSISQDNAPOLIHLITPESKLEETIRIOPKPYTMIKEOLIKEAVKSNCS : 458 YVPOPIS VFELOITOENAPOTHLITPESKLEEVIRIOPKPYTMIKEOLIKEAVKSNCS : 458 YVPOPIS VFELOITOENAPOTHLITPESKLEEVIRIOPKPYTMIKEOLIKEAVKSNCS : 456 EVVPPIN SLASKLENDKAPOTHLITESVOLCAVIRINKEVILKEHLIKEAVKSNCS : 456 ISLOPIN SLASKLENDKAPOTHLITKSVOLCAVIRINKEVILKEHLIKEAVKSNCS : 456 EVVPPIN SLASKLENDKAPOTHLITKSVOLCAVIRINKEVILKEHLIKEAVKSNCS : 457 ISLOPIP IT ELHWDEESAPDWOLLMPERDLOSKIRIHEKAVFVIKETLIKESVKSS : 457 ISLOPIN VITSKLENEGAPOLIHLITKSVOLCAVIRINKEVIKETLIKESVKSS : 458 ISVOPIN VITSKLENEGAPOLIHLITKSVELONVIHLOPKYTVIKETLIKESVKSS : 458 ISVOPIN VITSKLENEGAPOLIHLITKSVELONVIHLOPKYTVIKETLIKESVKSS : 458 ISVOPIN VITSKLENEGAPOLIHLITKSVELONVIHLOPKYTVIKETLIKESVKSS : 456 ISVOPIN VITSKLENEGAPOLIHLITKSVELONVIHLOPKYTVIKETLIKESVKSS : 456 ISVOPIN VITSKLENEGAPOLIHLITKSVELONVIHLOPKYTVIKETLIKESVKSS : 456 ISVOPIN VITSKLENEGAPOLIHLITKSVELONVIHLOPKYTVIKETLIKESVKSS : 460 ISVOPIN VITSKLENEGAPOLIHLITKSVELONVIHLOPKYTVIKETLIKESVKSS : 460 ISVOPIN VITSKLENEGAPOLIHLITKSVELONVIHLOPKYTVIKETLIKESVKSS : 460 ISVOPIN VITSKLENEGAPOLIHLITKSVELONVIHLOPKYTVIKETLIKESVKS : 460 ISVOPIN VITSKLENEGAPOLIHLITKSVELONVIHLOPKYTVIKESVKS : 460 ISVOPIN VITSKLENEGAPOLIHLITKSVELONVIHLOPKYTVIKESVKS : 460 ISVOPIN VITSKLENEGAPOLIHLITKSVELONVIKESVKS : 460 ISVOPIN VITSKLENEGAPOLIHLITKSVELONVIKESVKS : 460 ISVOPIN VITSKLENEGAPOLIHLITKSVELONVIKS : 400 ISVOPIN VITSKLENEGAPOLIHLITKSVELONVIKSVIKESVKS : 400 ISVOPIN VITSKLENEGAPOLIHLITKSVELONVIKSVKS : 400 ISVOPIN VITSKLENEGAPOLINGAPOLIHLIKSVKSKS : 400 ISVOPIN VITSKLENEGAPOLINGAPOLINGAPOLINGKS : 400 ISVOPIN VITSKLE
M.grisea.c: P.anserina: N.crassa.c: T.reesei.c: S.nodorum: C.immitis: M.graminic: F.graminea: A.fumigatu: A.fumigatu: A.fumigatu: B.cinerea. C.albicans: A.gossypi:	LKKKDARAICK LKKKDARBICSLDTOKGGRIFDFFVNSGWUKA LKKKDARBICSLDTOKGGRIFDFMVNAGWUKA LKKKDARBICSUDOKGGRIFDFMVNAGWUKA LKKKDARBICSIDGOKGGRIFDFFNAGWUKA LKKKDARMCK LKKKDARMCK LKKKDARAICK LKKKAKAKAK	493 489 491 490 479 466 490 - 467 429 493 443 443 435

7.2. Alignement avec mes séquences des orthologues de MgAda2

Figure 23 : Alignement des séquences des homologues de MgAda2, chez les espèces fongiques étudiés. Les domaines fonctionnels importants sont entourés

> Conservation des domaines chez les différents champignons

L'adaptateur Ada2 de M. grisea possède deux domaines « ZZ », IPR000433 (18 à64 aa) et « COG5114 » (0 à 344) bien conservés chez différents espèces fongiques. Le troisième domaine « SWIRM » (424 à 503 aa) n'est pas bien conservé chez *F. graminearum*. Cela peut être dû à une mal-annotation de la séquence protéique.

La séquence de la protéine correspondante à MgAda2 chez *S. cerevisea* n'est pas présente dans cet alignement. En effet, chez ce champignon, cette protéine n'existe pas, la protéine Adq2 remplace cette protéine chez ce dernier.

7.3. Arbre phylogénique



Figure 24: Arbre phylogénique des orthologues de MgAda2 réalisé par PhyML.

AF : Aspergillus fumigatus, AN : Aspergillus nidulans, BC : Botrytis cinerea, MG : Mycosphaerella graminicola, MGrisea : Magnaporthe grisea, PA : Podospora anserin, et NC : Neurospora crassa

8. Régulateur Knr4

Query seq.	ŧ.,		100		_	200					300			_	400			500		. •	71
Superfamilies					S	MI1.	_KNF	R4 s	supe	erfa	ami]	ly									

Figure 25 : Schéma des domaines et acides aminés fonctionnels de Knr4

8.1. Identification des domaines fonctionnels de Knr4

Plusieurs acides aminés sont importants pour l'activité de Knr4 :

> Acides aminés et domaines fonctionnels de Knr4 (Figure 26)

SIM1 : Les protéines possédant le domaine « SIM1_KNR4 », IPR018958 (136 à 325 aa), sont impliquées dans la régulation de l'activité de 1,3-beta-glucan synthase et la formation de la paroi cellulaire.

8.2. Alignement avec les séquences des orthologues de MgKnr4

M.grisea.k P.anserina T.reesei.k B.cinerea. A.fumigatu A.nidulans S.nodorum. M.graminic N.crassa.k C.albicans A.gossypii	* 20 	* 40 	* 60 GGGGGGGT SVATASESRAVI INGINSLATASDSRAVI INTERLSVATASESRAVI INTERLSVATASESRAVI INTERPLSVATASESRAVI INTERPLSVATASESRAVI INTERALSSVASA ISKA-SSTNDSALEINNIJ INTVVGGEPPDTSNASSION Sa sr d6	* 80 SS PYIEDGLRLTR-TGTAY SS PYEDBSTRPSA-HEDAAY. HS PYFDDSAAPST-QGS PT- VS PYFEDBGRQSTSALNCAA TDTFE-DDQFKGSTSSNSNG TS PYE-DECANG SS PYQHDELATSNGFIGS NE SYLQGDCRGSTMSFDTAY. NNSQYSLDNSTG	*APNTPGLPMS : 6'APNTPGLPMS : 6'
M.grisea.k P.anserina T.reesei.k B.cinerea. A.fumigatu A.nidulans S.nodorum. M.graminic N.crassa.k C.albicans A.gossypii	100 * GINRPYSPCIRCESAKR-TTF PSCRPYSPCIRSINTRASVPI NGNRYYSPCIRSQNVNK GPQSPYSPCIRSISQN-RR: SPSRPYSPCIRSISQA-RR: SPSRPYSPCIRSISQA-TAI SPTGYASPROSLQRQG-SA(ANGGDYSPCIVSQRSSVH(AAGF_RPCIKSSQ	120 * CONTRACTOR STATES CONTRACTOR STATES CONTRACTOR STATES CONTRACTOR STATES CONTRACTOR STATES CONTRACTOR CON	140 * CRAPPY HN SONNET A MARED 140 PH HN SONNET A MARED 140 PH AN SO	160 H PEDYOVCE CHN VINE H PEDYOVCE CHN VINE H PEDYOVE CHE AN VIDAD VIENTONES CHN VIDAD VIENTONES CHN VIDA VIENTONES CHO VIDAD VIENTONES CHO VIENTONES VIENTONES CHO VIDAD VIENTONES CHO VIENTONES VIENTONES CHO VIDAD VIENTONES CHO VIENTONES VIENTONES CHO VIENTONES VIENTONES VIENTONES CHO VIENTONES VIENTONES VIENTONES VIENTONES VIENTONES VIENTONES VIENTONES VIENTONES VIENTONES VIENTONES VIENTONES VIENTONES VIENTONES VIENTONES VIENTONES VIENTONES VIENTONES	180 DEHODOCS - 45 : 163 DEHODOCS - 45 : 173 DEHODOCS - 45 : 173 DEHODOCS - 45 : 163 DEHODOCS - 45 : 173 DEHODOCS - 45 : 173 DEHO
M.grisea k P.anseri ha T.reesei k B.cinere h A.fumiga u A.fumiga u A.funiga u A.funiga u A.funiga u A.funiga u A.gramin.c N.gramin.c N.crassa k C.albica is A.gossyp i	* MDVRSIMINGOSREG ODVRSIMINGOSREG ODVRSIMINGOSRG MEVRSIMINGOSRG LEVRSIMINGOSRG MEVRSIMINGOSRG ODRSIMINGOSRG ODROSIOINGOSRG ODROSIOINGOSRG ODROSIOINGOSRG ODROSIOINGOSRG ODROSIOINGOSRG ODROSIOINGOSRG ODROSIOINGOSRG ODROSIOINGOSRG ODROSIOINGOSRG ODROSIOINGOSRG ODROSIOINGOSRG	PTGIISSILDCS FIVENEN PTGIISSILDCS FIVENEN PTGIICSNLDCS FIVENEN PTGIICSNLDCS FIVENEN PTGIICSNLDCS FIVENEN PTGVICCILDCS FIVENEN PTGVICLLDCS FIVENEN PTGVICCILDCS FIVENEN PTGVICCILDCS FIVENEN PTGVICCILDCS FIVENEN PTGLISSILDCS MVCENEN	011 EKNNHEFILDTRVPS-AL WEKNNOFILDEATFPR-DA WEKNNOFILDEATPR-DA WEKNNOFILDEATNHEP WEKNNOFILSEFILS WENNEFILSESTVNPDL WENNOF	900 + MPSKALGGS SQASSSRAEA VPSKILGGS HASTSAASSS IPS	200 SSASPAP 20D : 251 SAPVSPON COE : 265 SSSSSNGP COD : 241 QNP COD : 265 CANPL COE : 245 ASNTNPL COE : 245 SNTNPL COE : 266 SSGRPQ CDE : 265 SNTNPL COE : 245 SNTNPL COE : 261 SQGRVQ COE : 261 SQGKVDNQ: ALD : 203
M.grisea k P.anseri ha T.reesei k B.cinere i. A.fumiga u A.fumiga u A.funiga u A.funiga u A.funiga u A.funiga u M.gramin.c N.crassa k C.albica us A.gossyp.i	* 300 THAK OD CVP INSIG VYR HE THAK OD CVP INSIG VYR HE THAK OD CVP INSIG VYR HE THAK OD CVP INATO VYR HE THOS COC OD CANCOLAX HE THOS COC OD CANCOLAX HE THAK OD CVP IAATO (AAX HE THOS COC OD CANCOLAX HE THOS COC	* 320 WILD LAND CONNEL AND A PERA WILD AND CONNEL AND A PERA	* 340 CT COVIL CR DTK VV CK COVIL CR DTK VV CK COVIL CR DTK VV CK COVIL CR DTC KVV CK COVIL CR DTC KVV CR COVIL CR DTC KVV CR COVIL CR DTC KVV CR COVIL CR DTC KVV CR COVIL CR DTK VV CR COVIC CR CV VI	* 360 ARSINGATIVALDINTS CKII ARSINGATIVALDINS CKII ARSINGATIVAL	* 345 TODEGEL UR : 345 TODEGEL UR : 345 FUDERNEL UR : 345 VOSENEL UR : 365 VOSENEL UL : 337 FUDERNEL UR : 344 FUDERLE UR : 344 VOSENEL UR : 355 FUDERLE UR : 345 FUDERLE UR : 34
M.grisea.k P.anserina T.reesei.k B.cinerea. A.fumigatu A.nidulans S.nodorum. M.graminic N.crassa.k C.albicans A.gossypii	380 * EFRASRVE SVEDILRIRDO EFRASRVE SVEDILRIRDO EFRASRVE SVEDILRIRDO EFRASRVE SVEDILRIRDO EFRASRVE SVEDILRIRDO EFRASVE PULELRIRDO EFRASVE PULELRIRDO EFRASVE PULELRIRDO EFRASVE ANIDLIRRSO EFRASVE ANIDLIRRSO EFRASVE MULELRIRDO EGUVEVDINNLAVLKRSM efk ep V 664wR d	400 * 42 RYCR TANK RSMAPPASGA- KH GRAAARF QSQGPSQTASK KYCR TNYR RSAPFVNGNG- KYCR ARR APRGLGLNTNS KYCR -ARR APRGLGLNTNS RYCR RAPARK APNGLGLSTGS KH GR PQAKR PNSGLRVNFNA KYCR - TANK KSMAPSMASAS KYCLSEKKQOPQOKSSGSGSS K GSTKQART QGYSPMVPGAS	:0 * 4 	40 * 4 SPAD PRCP LOR LS OS FL SONA PRCP SLOR LS OS FL DSTGDVRGR SMORL RDSAPL ABIG PRCP SMORL RDSAPL ABIG PRCP SMORL RGAPL TO SERCR SPH PNRG	60 * VPPNR9CK : 43: PPIRPGVCK : 44: PPMRNGLCKPQ : 43: PPNRPGVCK : 44: STQSPKTOFG-V : 41: SAQSPKMOPG-I : 41: KKGVSPRCK-L : 44: AHAPSPFRGTK : 44: SPIRPGVCK : 44: TGAGNTKNKPPV : 41: SAAAEAPEPPKK : 39:
M.grisea.k P.anserina T.reesei.k B.cinerea. A.fumigatu A.nidulans S.modorum. M.graminic N.crassa.k C.albicans A.gossypii	480 * MSPLARVTS TSIDE-SEL ASPLARVTS TSIDE-ATN- SELAQVAD GSGSG-TKW SSPLAVAD GSGSG-TKW SSPLAVAD TSATSPVNTSAR SSPLARVTS VSSPVHGSAB3 SSPLARVAD TAQPITWHTDI GSPLARVAD TAQPITV-SLT PSPLARVAD TAPPTT-SLT PSPLARVAD TASDANVDTH pla ee	500 * FPSSPLAINGSIKHK-ENLIEL SIKVP-EKLVEV TIDIPSTKLVDV EVVDEGNKHGTKESQAEDLLEV DSRAGAGVDNLISV ISNASLEAKAADNLMEL EEKEDKQEVSSSEKATVESKDEI LLDSKNTETNEDTRATNTAHSMA	520 * DT PF PSVSTEDSSNAAATR: DT PRBSGEENKESAPRI QT PR PSEENKSSDRPI VT PO ISGKENGD APOKASGKENEA DT PRSGDSDF PATR: NT PRTSGEHSKEDIKVI ET VKVSVNTDKEKPESKAE: PT VSSAITDLTAIDE PVAT,	540 * LEALESSETNGONSKEANGT LAALAANGEVSPPPEVT FIESESPNENKENEKASEKV LEEQPPANKADT-ERSQKRE LEQQPANKADT-ERSQKRE LSQGSDKENKSVKEETEKAP NEDSPAKERTSEDKEKKPET LEEVKADDKESEEIKVTKES AGKPKDTEKTDDAKDVHERAI	560 TSPTNISTVTTV : 52: TETEPSQTNGTSS : 51: TGLGLVSG : 50: STPG : 51: STFG : 49: AVKS : 49: AVKS : 51: SETTDTSEVETR : 50: ESKSDRDSKTNN : 48:
M.grisea.k P.anserina T.reesei.k B.cinerea. A.fumigatu A.nidulans S.nodorum. M.graminic N.crassa.k C.albicans A.gossypii	* 580 AEVNIGKSVKANGKOPAVIEEX APOSKRSSKQAT-VVEVEETI 	* KKTIDI : 551 LKTIEI : 540 : - NKKTIEI : 536 KKNTAI : 515 KKVVAI : 511 LKTVEI : 527			

Figure 26 : Alignement des séquences des homologues de MgKnr4, chez les espèces fongiques étudiés. Les domaines fonctionnels importants sont entourés

> Conservation des domaines chez les différents champignons

Le régulateur Knr4 de M. grisea possède un domaine « SIM1_KNR4 », IPR018958 conservés chez différents espèces fongiques.

La protéine a un motif conservé entre les acides aminés 18 à 64. Par ailleurs, le reste de la protéine est variable selon le champignon. La séquence de la protéine correspondante à MgKnrR4 chez *S. cerevisea* n'est pas présente dans cet alignement. En effet, d'après NCBI, la séquence protéique chez ce champignon et celle chez *M. grisea* ont une homologie de 35% d'homologie avec 53% de similarité.

8.3. Arbre phylogénique



Figure 27 : Arbre phylogénique des orthologues de MgKnr4 réalisé par PhyML.

AF : Aspergillus fumigatus, AN : Aspergillus nidulans, BC : Botrytis cinerea, CA : Candidas albicans, MG : Mycosphaerella graminicola, MGrisea : Magnaporthe grisea, TR : <u>Trichoderma reesei</u>, SN : Stagonospora nodorum, AG : Ashbya gossypii, PA : Podospora anserin, et NC : Neurospora crassa

9. IDC1

ŧ.,	1 5 1	250	 500	750	1000	1250	1500 1587
Query seq. structural tetrad	A 254 244 A	4/3					
Superfamilies	HD40 superfami	ily					

Figure 28 : Schéma des domaines et acides aminés fonctionnels d'Idc1

9.1. Identification des domaines fonctionnels d'Idc1

Plusieurs acides aminés sont importants pour l'activité d'Idc1 :

> Acides aminés et domaines fonctionnels d'Idc1 (Figure 29)

WD40 : Le domaine WD40, annoté cd00200 d'après NCBI, est présent dans plusieurs protéines ayant des fonctions comme adaptateur, régulateur dans la traduction du signal.

9.2. Alignement avec les séquences des orthologues de MgIdc1



M.grisea.i : P.anserina : F.graminea : T.reesei.i : B.cinerea. : A.nidulans :	940 * SYDYSNNNINEAEAIGRAATAS BY PIEPPS-FAARGLD MRPS AS BS TSG-NDNMMFGTAL GRAATAS BY KSSAPONMATGLATORAATAS BY AGQYASEAEAEPLOLS-SATY BY EPEDDLGLIPSARYDPE-EGFKBSI t P	960 * MRDSHRREPDPP MKQQSRNQPPP MREHAQRVVQPSEGDYPP MREDYQRAVOGYGGERPP KNRPTTPMTQKKIANPLP QTAVQATADKFATIKGLP P;	980 * SEBASMAMIMDAQGE PEDAAVAISMOQAG PEDAAVMISMQQ-ASR SEDINIMSRIQEVHS SESEDIFTLKKQDD SEDIFTLKKQRS SP	1000 TSENCEDNEIDOLTDICL RENCERDEIDECTDISLE NULNCERDEIDLOLTDISLE ACENCERDEIDLOLTDI RENCERDEIDLOLTDI ENLESENERIDNULIN- rng R R P 6 6	* 1020 DPIEPPNQSS-DVTS SGLKDTHPEDVTS DSGVSHDEVTS DTMQPPSMDAMS PMESIITGD-YMTS FLP s	: 962 : 946 : 861 : 854 : 963 : 934
M.grisea.i : P.anserina : F.graminea : T.reesei.i : B.cinerea. : A.nidulans :	* 1040 PP GSVA-SST FHTPSRRGPGSV PP BAG-SSV THTPSRRGPGSA PD HSVT-SSN THTPSRRGPGSA PD HSVT-SSN THPSRGTGPS PD SVSSHDN TNSIGDPLNSAA GSSHDEVOS-GSLAAS	* 1060 YAS VT SATS SVAKAH AG VAS SLASA SQASQAS -A VT S SVT AS SAGRSL SAS VAGSMTS TS SAGRSH LS AA VSAS SNAR SPA FR SPP TANSFSTT S S	* 1080 RARGYGHPCKTI SVRCYRCY-RPQENKSI RHQAVRNREDYIHSI KSNARQRDDYIHSI SETSFRTFSPVQHCRSI KSPSVSGRSIDQVINSI 36	* 1100 DYIHSMDNTGER DYIHNLDNAGER DAANHFSKRQRSRQR EAAQHYSRRAGERTG QYINSLDATYHKKQQR BASYHSRKTSGH d	* RATSRGRGRDSSKT RGTSRENRTNARDT HSRIRDTSRSRPGS TERIRDASTGRHAS ROASRDRSGRARSS RGRENTDDSTMLS R 3	: 1039 : 1031 : 943 : 939 : 1056 : 1008
M.grisea.i : P.anserina : F.graminea : T.reesei.i : B.cinerea. : A.nidulans :	1120 * 1140 RRSGS BASLDHOQ-RGRETS GYT SSSEKDG MAEKQ-RGRETS GYT RERNARS EPSEERGRASARST RERT SSDPEERGRASASST SR PFASDPEEDRGRASASST SR PFASDPEEDRGRASASST CR PFASDPEEDRGRASASST CR PFASDPEED-RGRASASST CR PFASDPEED-RGRASAST CR PFASDPEED-RGRASASST CR PFASDPEED-RGRASAST CR PFASDPEED-RGRASASST CR PFASDPEED-RGRASAST CR	* 116 PRAGKRSERSPVMSEE PRAGKRSERSPVMSEE KAKRSETSPVMSEE RPKRSETSPVMSEE PAKRSETSPVMSEE PAKSESSPVSMSEE KRSP SP6pMSEE	* INI ST FKTNDARRGED INI AT FNHDAEHQYYL LNI ST FRHGQVG LANI SNRTF DNSV IRDI GAAISD SEVMIOD LAQYAVKQTSKA L 1	1180 * GSVIEIATD NHRNKMLDVSTDELEPAS 	1200 IPSTVRRUSSS IPSTVRRVGYANRET IPSTVRRASTS PLTIRRASVA ASRVRRQSPE SSRVERPRSR S GRK	: 1118 : 1122 : 1006 : 1002 : 1137 : 1072
M.grisea.i : P.anserina : F.graminea : T.reesei.i : B.cinerea. : A.nidulans :	* 1220 * QI HASE T-RANGCS PSF SRTARSS NASGT-RGTSRA SPSF TM PGSRGSSRAGRR SPS FG TSGTSS FG TSGTSS R ISBOTSRNPSR PASI R	1240 * GRRTASPERIGER SNVPAPLNIRS SAN EQ RSRPAALTLRG SQG EG RG EG DARLGGRDARG SAG SG -ADTTEQSTRG SAD QG r r	1260 SSCRASPSSVPMSA- SKRSTFSOPPPPP TORSPSSELELEV SVPRSPSELELEV SVPRSPSELELEV SVPRSPSELETEV SVRSSSELETEV LRNTSPSSELETTN STSPSPP	* 1280 IPRD S C E E MSADLIR POR E C E D TAH O C E D TAH O C E D TALH O C E D TALH O C E D 	* 1300 NDYMRATEAKERFR BEDFRAMMAQEEFR BEDFRAMMAQEEFR BEDFRAMRAQEAFR FEDLRAAKADQLAFR TRHFSRSRRPSA d r a fr	: 1192 : 1212 : 1083 : 1056 : 1216 : 1148
M.grisea.i : P.anserina : F.graminea : T.reesei.i : B.cinerea. : A.nidulans :	* 1320 KANTR SSRGFRNASPGS CRNR ASTNRDRAGGTSPMSVRSF NAHSR SASRGINSPAMSK ARHSR VCHNVNSPAVSR LSSSRTIBERCTSAVRGSSPSGRRF SRELEADGRRTRPGSRTRQDADSF 4 s	* 1340 AWSSRDAGREKPEGIRRT 	* 1360 ASHRLMSDRR TSHAGTDGSSRRVKVAA DNRRRANSEVANLE ESRRKEATETREAAPVV LEGQRSFYLTRDGTESQ ETNPAVNE	* 1380 PKESAGFGEAEDAVSSDF PLOT PAPMQLVADDSGDL GPMSVHGRAASTEHAGDL LSQTVYGRAASTEHAGDL SHLRTQSESVQRAPEQOK PAEKPQAVNEANHNVSP	* RIKDEROLKKBAAA VUTKDEROLKKBAAA QMKDERORKKBOAA KMKDERORKKBOAA IDAKDERALKREOAA ATAEMR <mark>RKELA</mark> kder 44E AA	: 1253 : 1305 : 1152 : 1128 : 1299 : 1212
M.grisea.i : P.anserina : F.graminea : T.reesei.i : B.cinerea. : A.nidulans :	1400 * 1420 RELEGREK SLARR PAAB PI DH FDD RELEGREK SLARR PAY PI MIFDO RELEGREK SLARRAOT BSI DH PNB RELEGREK SLARROLGERI DH FSO AELEARRISLARN PSABNI BF GBI RELEGREK SLAR PI NF 2	* 14 SPIVTRGPAFFES-A. FPSRRSPTLGG SPGRPEVLVEAD GGLSPLAYRPSTNPFEQ QYTRGVLESPPFSVQ	40 * LPSTAFVPERDLETE LPSTVYEPERKEDLES PKELPDDIPER GSATSYSPERASPAPE SFTPRTPG-RTVL r	1460 * SRTVEGESRSMYANF SASUDAGRSMYANF SATEPORSMYAR SATEPERAAEPPRSMYAO QOTTNNTSPNSCFOSAI PPKTSEDYPSSEENSSRS S P S	1480 RQPLIGLPATPKA RGPHIGLPATPKA GGPVIGLPATPKA REP-CIGLPATPKA RESSVOIGLPATPRA RGGPVGLPATPRA 6GLPATP4A	: 1335 : 1387 : 1226 : 1207 : 1291 : 1295
M.grisea.i : P.anserina : F.graminea : T.reesei.i : B.cinerea. : A.nidulans :	* 1500 * MELIE PETGGVPGVBET MELIE PETGGVPPMBAT MELIEGNHDQSGSTPRPEMEMT MELIEGNHDQSGSTPRPEMEMT MEHFKYDPEGNGADRIP-OVPQIE MEHFKYDPEGNGADRIP-OVPQIE MEHFKYSGPSESEFMPPPPEPPEPP MR P p	1520 * 	1540 PTOSNASIRHSLEKS PNVTQCSIRHSLKKV PETSIQOSLERL PQNSIQVSLKYT NS-SSDS_HDTFG_LPK APLLLSDARYQGAAERI SP P	* 1560 EAVARADSECTKAPCENLI EPEEPROEDGGL/ EPSAEPSLTLLP LGSSEPSLTLLPST TVYQASQPPRMPPRSAS/ PRSMSVPVPEVQPPSRPLI	* 1580 JILIPSTVIS MULPSTVIT - PPS STVIQ YQLPSSTVIQ APIPESSFK NMIP MPLHPHYNP Y P	: 1406 : 1457 : 1288 : 1273 : 1482 : 1371
M.grisea.i : P.anserina : F.graminea : T.reesei.i : B.cinerea. : A.nidulans :	* 1600 PVR PISK CMSAPPEDLAP HNSRIAADIGR SMSAPPRDLVMPQG PSR PIPRSMSAP PSR PMIPRSMSAP AGLPLHPAPQTIIPSSSSRTPDTF 	* 1620 	* 1640 QSSSRQANDRMS DTNAIPSGRRPSDAGM PGQRPARFGKSS PPHAIRYGRSS SSRRQLSGDPHGESGSR RNRSIHHRROS	* 1660 TPDVSSDRQAGNMRT ARCPSQDTNVMTLGNSHD VGRIEEIVPG ANEGGLDDIVET SGSPVYASGPVNVLT SRELSAAGGSHDYGS) * IDDMLANNTQRPTHE NMMLGNMGRPSHD ERRSHED EWRR-QVN IDETIEANQAMFMHH SPV	: 1477 : 1550 : 1336 : 1322 : 1561 : 1409
M.grisea.i : P.anserina : F.graminea : T.reesei.i : B.cinerea. : A.nidulans :	1680 * 170 SQGMPPPPPDPVLXE PVLXE AG-NNNLTPPPPPPIVP-PVLXE PVLXE DPLPPPPPA PVLXE NL	0 * 1 Lohlai peppersessi Lohlai peppersessi Lohlai pepperselen Lohlav pepperselen Lohlau peppersessi Lohlau pepperses Lohlaur pepper	720 * QKS-QQPOYYCGR AASGAKPIYYG QRSOHGCAI RRQPFVA-TL NAN-TNSMYS-VSSGSG MASLSGTGSQRES g	1740 *TAGN T SIVMDD0ASGNI SIVMDD0ASGNI SIVMDD0ASGNI SIVMDD0 ISGVSSG: GVI SIVMD 0 SGI SIVMD 0 S	1760 DQIPPPPPPP PQQ-QIPPPPPP	: 1546 : 1627 : 1391 : 1382 : 1643 : 1469
M.grisea.i : P.anserina : F.graminea : T.reesei.i : B.cinerea. : A.nidulans :	* 1780 * PMTMSAP PVSEATVPILS PAPE ISSGNDQASEAS PAFS ISSGNDQASEAS PAFS ISSSNSSI PPPIPI NLGR PFIPI P P	1800 * PKSNIQRGRSSIDNSIGS SENGENRGRSSVDNSIGA SHRGHGRGRSIGDSSISG PVKGHNGGSLGGGSSISG PVKGHNGGSLGGGSSISG HITTHNGGSETDNSISN PALNSNTANIETRPSIG- h rgr3 86	1820 RISCVTDRVESASSET RISCATERIESASSEA RIHKATERLESGSSER REFEATERLESASSC RESEATERLESASSC RMSLEHRRNRSVNESE R R IS SI I	* 1840 NSSMLSRKSPELANG KSBEIQYAPYESVPMIPQ SPPFESPYESVPMPRQI SPPLEMYGGECNANSLNQJ DKGVTKSPIENGGSPYESJ SSKIRNLTRRSSRGSDA	* 1860 DISPYESIGPYSES MGGGE-RGPYSMS JRSPDPYSFN JRSPVAGNPPYLYD ISPPTWSVPDPINRS WGSPTGPG <mark>PSSSYG</mark> Pp	: 1635 : 1712 : 1469 : 1466 : 1729 : 1547
M.grisea.i : P.anserina : F.graminea : T.reesei.i : B.cinerea. : A.nidulans :	* 1880 VQQ-C NYRGMNNQVLQQVQAQMA-AQQAF PDVLRSPIDSN RDAIRSPIEGHG ATTTPSSGMQMERHE NGYGLDN	* 1900 QRTQTCIQPSENF : DEVITCIHQSENI : KKMSSTCIHONENI : RKMSSGHENGNF : UEVRAAYHGTMEGGII : RVSHEGYPAPDADGRI : g m	1658 1748 1494 1491 1760 1570			

Figure 29 : Alignement des séquences des homologues de MgIdc1, chez les espèces fongiques étudiés. Les domaines fonctionnels importants sont entourés
Conservation des domaines chez les différents champignons

La protéine Idc1 de M. grisea possède un domaine « WD40 » (70 à 250 aa) bien conservé chez différents espèces fongiques sauf chez *F. graminearum* et *T. reesei*. Etant donné la suite de l'alignement, une mal annotation de cette protéine chez ces deux espèces peut être la cause. Entre les acides aminés 515 et 890, il existe un site bien conservé. Par contre, le reste de la protéine est variable. La séquence de la protéine correspondante à MgIdc1 n'est trouvée que chez certaines espèces. Une mauvaise annotation de la protéine chez eux peut expliquer cette absence.

Par ailleurs, chez *M. graminicola* et *S. nodorum*, la protéine existe avec le domaine WD40, bien conservé Par contre, son annotation semble être erronée car elle ne fait que 950 aa, à la place de 1600.



9.3. Arbre phylogénique

Figure 30 : Arbre phylogénique des orthologues de MgIdc1 réalisé par PhyML. AN : *Aspergillus nidulans*, BC : *Botrytis cinerea*, MGrisea : *Magnaporthe grisea*, TR : <u>*Trichoderma reesei*</u>, FG : *Fusarium graminearum* et PA : *Podospora anserin*

L'arbre est réalisé par la méthode de boostrap, ainsi, plus la valeur est élevée plus la fiabilité de la branche est importante.

ANNEXE 2

Tableaux récapitulatif des gènes et les champignons étudiés

Les analyses des gènes sont réalisées à partir des gènes identifiés par Blast, chez différents champignons étudiés. Dans le tableau ci-dessous, on peut voir les numéros d'accessions des gènes homologues aux gènes étudiés chez *M. grisea*.

M. grisea	A. fumigatus	А. доѕѕурії	A. nidulans	B. cinerea	C. albicans	C.immitis	F. graminearum	M. graminicola	N. crassa	P.anserina	S. cerevisiae	S. nodorum	T. reessi
MPS1	MPKA	AAS52913	EMENI_AN5666	BC1G_07144	CA5865	CIMG_01981	FGSG_10313	ESTEXT_GWP_GW1.C_13063	NCU11376	XP_001912152	SLT2	SNU05764.1	C_360018
SWI4	AFU3G13920	AFR600C	EMENI_AN3154	BC1G_13808	CA2953	CIMG_00075	FGSG_10384	GW.1.278.1	NCU07246	PA_2_14120	YDL056W	SNU10392.1	5664
SWI6	AFU7G05620	AFR690C	EMENI_AN6715	BOFUT4_P132610.1	CA1605	CIMG_05472	FGSG_04220	ESTEXT_FGENESH2_PG.C_120224	NCU07587	PA_3_250	YLR182W	SNU05807.1	53484
RLM1	Af293		EMENI_AN2984	BOFUT4_P040740.1		CIMG_07638	FGSG_09339	ESTEXT_FGENESH2_PM.C_50239	NCU02558	PA_1_6600	YPL089C		68097
CRZ1	AFU1G06900	ADL198W	EMENI_AN5726	BOFUT4_P049220.1	CA5657	CIMG_04025	FGSG_01341		NCU07952	PA_3_1720	YNL027W	SNU05002.1	36391
AGS1	AFU2G11270		EMENI_AN3307	BOFUT4_P114550.1		CIMG_08204		E_GW.1.1945.1	NCU08132	PA_5_2730			
CAS5	AFU2G10640	AER318C	EMENI_AN10763	BOFUT4_P060710.1	CA3340	CIMG_07914	FGSG_12781	FGENESH2_PG.C_SCAFFOLD_17000164	NCU04459	PA_6_6550	YDR448W	SNU13610.1	123619
IDC1			EMENI_AN2701	BOFUT4_P062870.1		CIMG_09777	FGSG_10835		NCU11226	PA_3_8520		SNU06709.1	67350
KNR4	AFU5G05770	ADL139W	EMENI_AN8846	BOFUT4_P033920.1	CA1740	CIMG_06246	FGSG_06998	ESTEXT_GENEWISE.C_61150	NCU04189	PA_2_10930	YGR229C	SNU09238.1	27719

Figure 31 : Tableau récapitulatif des gènes identifiés chez différents champignons étudiés

ANNEXE 3

Schéma des constructions des mutants

1. Schéma des constructions du mutant de délétion *Guy11∆ku80∆mps1* et

P1.2Δku80Δmps1

- 1.1. Schéma de la construction du mutant de délétion *Guy11∆ku80∆mps1* et
- *P1.2Δku80Δmps1*



Guy114ku804mps1

Primer mps1 - 2	CACGGCCTGAGTGGCCGATTGCTGTGGTTGCCTCGTTTATT
Primer mps1 - 3	GTGGGCCATCTAGGCCTTTGGAGAGGGCATGAGATACTGCT
Primer mps1 - 8	ACCTATCCAGGTCCCATTTCTATCCC
Primer mps1 - 13	TCGGTTCTGTTTGCGGAGTCC
Primer mps1 - 15	AGTTAGTGCTAGTTCTCTCTCTTATGGTGTGG

1.2. Schéma de la construction des mutants de complémentation

Guy11Δku80Δmps1 et *P1.2Δku80Δmps1*



2. Schéma des constructions du mutant *P1.2Δku80Δswi4*

2.1. Schéma de la construction du mutant de délétion *P1.2Δku80Δswi4*





Swi4 primer 2	GTGGGCCATCTAGGCCCCGCACGCCTCCGCTACA
Swi4 primer 3	CACGGCCTGAGTGGCCCGATGATGTCTGGTTTCGCACG
Swi4 primer8	GCCCTCCTGACTGACTTGCGA
Swi4 primer9	GGTTGGCGTTTGGGATGCG
Swi4 primer 13	CGACTTAGGCTCGTGTTCGTAGACG
Swi4 primer15	GATGAGGATGGCTGAAACGAGGA

2.2. Schéma de la construction du mutant de complémentation du

P1.2∆ku80∆swi4



3. Schéma de construction du mutant *Guy11Δku80Δswi6*

3.1. Schéma de la construction du mutant de délétion *Guy11∆ku80∆swi6*



Guy11∆ku80∆swi6

Swi 6 - 8	TCCGAACAGCAACCAAGAGGTCA
Swi 6 - 9	AGGTTCTCCTTCCCACGGTTACAAA
Swi 6 - 13	CGATAAAGGGCAAGCTGGTCGA
Swi 6 - 15	CGAAGCAGCGTACCACCAGTC
Swi6-2dbNEW	ATTCGAGGGCCTGAGTGGCCCCGATGGGTT
Swi6-3dbNEW	TAGAGTAGATGCCGACCGGGAACCCATCTAGGCCACACCACATTGAC

3.2. Schéma de la construction du mutant de complémentation du







4. Schéma de construction du mutant de délétion *Guy11Δku80Δrlm1*



Mig1-2	TAGAGTAGATGCCGACCGGGAACTGCCTGTCTAGGCTGGTGAGCTG
Mig1-3	ATTCGAGGGCCTGAGTGGCCACCGTCTTTCCTCCGTCTTGTCTTT
Mig1-8	CTCCTGCATGCTACTGGTCA
Mig1-9	ATGCAGGGCATGGAGAAAGA
Mig1-13	GTGGCGAGGGTGAATTAGTGTCG
Mig1-15	CCCACTCGTATGCTCCCACGTC

5. Schéma de construction du mutant de délétion *Guy11∆ku80∆crz1*





Crz1 primer 2	GTGGGCCATCTAGGCCCGAGATGCCTGAGTTGCCCAG
Crz1 primer 3	CACGGCCTGAGTGGCCGCGAAAGCTATGCGGTGGCA
Crz1 primer 8	TTGACCACCAACCAGCTCCAGAC
Crz1 primer 9	GTATCCAAGCAAATCACTGGCAACTG
Crz1 primer13	CGCCGCCGTTGTGAATTACCTA
Crz1 primer15	ТСААССААТАСССАААТСТТССАСТТС

6. Schéma de construction du mutant de délétion *Guy11Δku80Δags1*





Ags1 - 2	TCTTTACCACATTATCACTCGTTC
Ags1 - 3	GTGAAGGCGGAACCAAAGACCT
Ags1 - 8	CGTTATCCCACACCCCGTTACTC
Ags1 - 9	CCGAGATATTCGACTTCAACTACAGGAA
Ags1 - 13	AGAAAATAGCAACGCCAACGTC
Ags1 - 15	TGCCCGTCTTGCCACGTCTC

7. Schéma de construction du mutant de délétion *Guy11Δku80Δada2*





Cas-2	ATTCGAGGGCCTGAGTGGCCCGGTCGTGTCGCGGTACGA
Cas5-3	TAGAGTAGATGCCGACCGGGAACAAGGCACCGCCTTCCATCG
cas-8	CACGGCCTGAGTGGCCGCGAGCCACCCAGTCAAG
Cas-9	AGGGCGAGAACCTGTACTACACGAG
Cas-13	CGGACCTCAAGACGCCCTTTC
Cas-15	TGTCTTCTCGTATTTCGGGTTGCTG

8. Schéma de construction du mutant de délétion *Guy11∆ku80∆idc1*



Guy 11∆ku80∆idc1

IDC12	ATTCGAGGGCCTGAGTGGCCGTACTACCACATCTAATTCTGTCGAGGGCACGCATCATAT
IDC13	TAGAGTAGATGCCGACCGGGAACAGGCTTCCGTGCTTGCCGT
IDC1 primer 8	ACTGTCAAATGTCGCAGAACTGGG
IDC1 primer 9	ACCTGTATGTGCTGTGTGCCGC
IDC1 primer 13	CCCGCATGACTAGCCTTGTTCAG
IDC1 primer 15	GCCCAACCCGACAGCATAGGA

9. Schéma de construction du mutant de délétion *Guy11Δku80Δknr4*





Knr4 - 2	CAATTAACCACCAACTTGTACTGTCGGGTTCCCGGTCGGCATCTACTCTA
Knr4 - 3	GCTCTAGATATCGATCGTCTTCGGCCACTCAGGCCCTCGAAT
knr4-A8	GCAGGCTGTGTTTTAGCACTGCT
knr4-ORF2	GTCAATTAACTGGCACACCTACCCAAG
Knr4 - 13	GACGGCACTCATCCCAAACG
Knr4 - 15	GCTTGTGGAGGTGACCTTATTGGTGT

ANNEXE 4

Schéma des vecteurs utilisés

1. Schéma du plasmide pFV8 (-)



2. Construction du mutant conditionnel de *Guy11*ΔKU80ΔpNiaMps1





3. Construction d'un allèle de *MgMPS1* sensible à des inhibiteurs spécifiques

IV. **"REFERENCES**

1. **A.M. Stathopoulos, M.S. Cyert,** (1997) Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast, Genes Dev. 11 3432–3444.

2. Abe MK, Kahle KT, Saelzler MP, Orth K, Dixon JE, Rosner MR (2001) ERK7 is an autoactivated member of the MAPK family. J Biol Chem. Jun 15;276(24):21272-9.

3. Abramova N, Sertil O, Mehta S, Lowry CV. (2001) Reciprocal regulation of anaerobic and aerobic cell wall mannoprotein gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*183: 2881-2887.

4. Adilia Dagkessamanskaia, Karim El Azzouzi, Yo Kikuchi, Ton Timmers, Yoshikazu Ohya, Jean-Marie François, Hélène Martin-Yken (2010) Knr4 N-terminal domain controls its localization and function during sexual differentiation and vegetative growth. YeastSpecial Issue: Special Issue of Yeast on Fungal Cell WallsVolume 27, Issue 8, pages 563–574, August.

5. Aguilar-Uscanga B. et Francois J. M., (2003) A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. Lett.Appl.Microbiol. 37:268-274.

6. Alepuz, P. M., de Nadal, E., Zapater, M., Ammerer, G. and Posas, F.(2003) Osmostress-induced transcription by Hot1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA Pol II. *EMBO J.* 22, 2433-244.

7. Alic N, Higgins VJ, Pichova A, Breitenbach M, Dawes IW (2003) Lipid hydroperoxides activate the mitogen-activated protein kinase Mpk1p in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem. 2003 Oct 24;278(43):41849-55. Epub 2003 Aug 11.

8. Alimardani P, Regnacq M, Moreau-Vauzelle C (2004) SUT1-promoted sterol uptake involves the ABC transporter Aus1 and the mannoprotein Dan1 whose synergistic action is sufficient for this process. *Biochem J*381: 195-202.

9. Alina Vos, Nick Dekker, Ben Distel, Jack A. M. Leunissen, and Frans Hochstenbach, (2007)Role of the Synthase Domain of Ags1p in Cell Wall _-Glucan Biosynthesis in Fission Yeast. JBC Papers in Press, April 30, 2007, DOI 10.1074/jbc.M605147200.

10. Anderson, N. G, J. L. Maller (1990) Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase Nature 651-653.

11. **Andrew D. Sharrocks, Shen-His Yang and Alex Galanis**(2000) Docking domains and substratespecificity determination for MAP kinases Trends in Biochemical SciencesVolume 25, Issue 9, 1 September, Pages 448-453.

12. **Andrews, B. J., and L. A. Moore** (1992) Interaction of the yeast Swi4 and Swi6 cell cycle regulatory protein *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11852–11856.

13. Arthur F. J. Ram, Johan C. Kapteyn, Roy C. Montijn, L. Heleen P. Caro, Jeroen E. Douwes, Walter Baginsky, Paul Mazur, Herman van den Ende, and Frans M. Klis (1998) Loss of the Plasma embrane-Bound Protein Gas1p in *Saccharomyces cerevisiae* Results in the Release of 1,3-Glucan into the
Medium and Induces a Compensation Mechanism To Ensure Cell Wall Integrity. J Bacteriol, March, p. 1418-1424, Vol. 180, No. 6.

14. Arthur F. J. Ram, Robbert A. Damveld, Patricia A. vanKuyk, Mark Arentshorst, Frans M. Klis, Cees A. M. J. J. Van den Hondel (2004) Expression of *agsA*, one of five 1,3-alpha-D-glucan synthase-encoding genes in *Aspergillis niger*, is induced in response to cell wall stress. Fungal Genetic of Biology 42, 165 – 177.

15. Ashton Breitkreutz and Mike Tyers (2002) MAPK signaling specificity: it takes two to tango. Trends in Cell BiologyVolume 12, Issue 6, 1 June, Pages 254-257.

16. Aylon, Y., Kupiec, M. (2004) DSB repair: the yeast paradigm. DNA Repair 3 (8-9), 797–815.

17. **Baetz, K., J. Moffat, J. Haynes, M. Chang, and B. Andrews** (2001) Transcriptional coregulation by the cell integrity mitogen-activated protein kinase Slt2 and the cell cycle regulator Swi4. Mol. Cell. Biol. 21:6515–6528.

18. Banuett F. (1998) Signalling in the yeasts: an informational cascade with links to the filamentous fungi Microbiol Mol Biol Rev. Jun;62(2):249-74.

19. **Barthi-Garcia**, **S**. (1968) Ann. Rev. Microbid., 22.87.

20. Beauvais A, Bruneau JM, Mol PC, Buitrago MJ, Legrand R, Latge JP. (2000) The glucan synthase complex of *Aspergillus fumigatus*. J Bacteriol; 83: 2273-2279.

21. Beauvais A, D. Maubon, S. Park, W. Morelle, M. Tanguy, M. Huerre, D. S. Perlin et J. P. Latge (2005) Two alpha-(1-3) Glucan Synthases with Different Functions in *Aspergillus fumigatus* Applied and envrinonmental microbiology, Mar. p. 1531–1538 Vol. 71, No. 3.

22. Bell M, Capone R, Pashtan I, Levitzki A& Engelberg D (2001) Isolation of hyperactive mutants of the MAPK p38/Hog1 that are independent of MAPK kinase activation. J Biol Chem 276, 25351–25358.

23. Bishop Anthony C., Oleksandr Buzko and Kevan M. Shokat (2001) Magic bullets for protein kinases, Trends in Cell Biology Vol.11 No.4 April.

24. Borkovich KA, Alex LA, Yarden O, Freitag M, Turner GE (2004) Lessons from the genome sequence of Neurospora crassa: Tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. Microbiol Mol Biol Rev 68:1–108.

25. Bowman SM, Free SJ. (2006) The structure and synthesis of the fungal cell wall. BioEssays; 28: 799-808.

26. **Breeden, L.** (1996) Start-specific transcription in yeast. Curr. Top. Microbiol.Immunol. 208:95–127.

27. Bromley, Michael, John, (2007) Système promoteur, WO/2007/091073, 16.08.2007.

28. **Buehrer BM, Errede B** (1997) Coordination of the mating and cell integrity mitogen-activated protein kinase pathways in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol Nov;17(11):6517-25.

29. Burnett G & Kennedy E.P (1954) "The enzymatic phosphorylation of proteins" J. Biol. Chem. 211, 969 – 980.

30. Cabib E, Bowers B, Sburlati A, Silverman SJ. (1988) Fungal cell wall synthesis: the construction

of a biological structure. Microbiol Sci 5:370–375.

31. Chaffin WL, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martínez JP.(1998) Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, nd expression. Microbiol Mol Biol Rev; 62: 130-180.

32. Chamilos G, Nobile CJ, Bruno VM, Lewis RE, Mitchell AP, Kontoyiannis DP. (2009) Candida albicans Cas5, a regulator of cell wall integrity, is required for virulence in murine and toll mutant fly models. J Infect Dis. Jul 1;200(1):152-7.

33. Carltwrith (2005) Thesis University of Exeter,

34. Chattaway FW, Holmes MR, Barlow JE. (1968) Cell wall composition of the mycelial and blastospore forms of *Candida albicans*. J Gen Microbiol; 51: 367-376.

35. Choi J, Kim Y, Kim S, Park J, Lee YH. (2009) MoCRZ1, a gene encoding a calcineurin-responsive transcription factor, regulates fungal growth and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*. Fungal Genet Biol. Mar; 46(3):243-54.

36. Choi, K. Y., B. Satterberg (1994) Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in S.cerevisiae Cell 78: 499-512.

37. Choquer, M., M. Boccara, I. R. Gonçalves, M.-C. Soulié, and A. Vidal-Cros (2004) Survey of the *Botrytis cinerea* chitin synthase multigenic family through the analysis of six euascomycetes genomes. Eur. J. Biochem. 271:2153-2164.

38. Christian Müller, Carsten M. Hjort, Kim Hansen and Jens Nielsen (2002)Altering the expression of two chitin synthase genes differentially affects the growth and morphology of *Aspergillus oryzae* Microbiology 148, 4025-4033.

39. Chun Zhao, Un Sung Jung, Philip Garett – Engele, Taiyun Roe, Martha S. Cyert et David E. Levin (1998) Temperature – induced Expression of yeast FKS2 is under dual control of protein kinase C and calcineurine. Mol Cell Biol, February, p: 1013 – 1022, Vol: 18, No: 2.

40. **Chumley FG, Valent B** (1990) Genetic analysis of melanin-deficient, nonpathogenic mutants of *Magnaporthe grisea*. Mol Plant-Microbe Interact3: 135-143.

41. Cid V. J., Duran A., del Rey F., Snyder M. P., Nombela C., et Sanchez M. (1995) Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol.Rev. 59:345-386.

42. Collemare, J., Pianfetti, M., Houlle, A.-E., Morin, D., Camborde, L., Gagey, M.-J., Fudal, I., Lebrun, M-F Bohnert, H.U., (2008). Magnaporthe grisea avirulence gene ACE1 belongs to an infection specific gen cluster involved in secondary metabolism. New PhytologistVolume 179, Issue 1, 22 Apr.

43. Cook, J.G., Bardwell, L., Thorner, J. (1997) Inhibitory and Activating Functions for MAPK Kss1 in the S. cerevisiae filamentous-growth signalling pathway. Nature 390: 85-88 November 6.

44. Cristina Reinoso-Martín, Christoph Schüller, Manuela Schuetzer-Muehlbauer, and Karl Kuchler (2003) The Yeast Protein Kinase C Cell Integrity Pathway Mediates Tolerance to the Antifungal Drug Caspofungin through Activation of Slt2p Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. Eukaryot Cell. December; 2(6): 1200–1210.

45. Dahn U., Hagenmaiehr H., Koing W. A., Wolf G et Zahnerh H. (1976) Stoffwechselprodukte mikroorganismen 154 Mitteilung. Nikkomycin ein neuer Hemmstoff der Chitinsynthase bei Pilzen Archives of Microbiology 197, 143-1 60.

46. Dallies N., Francois J., et Paquet V.(1998) A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutants of Saccharomyces cerevisiae. Yeast. 14:1297-1306.

47. Damveld, R. A., M. Arentshorst, A. Franken, P. A. vanKuyk, F. M. Klis, C. van den Hondel, and A. F. J. Ram. (2005) The *Aspergillus niger* MADS-box transcription factor RlmA is required for cell wall reinforcement in response to cell wall stress. Mol. Microbiol. 58305-319.

48. **Daniel Diffine** (2003) Mémoire de Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie 25 novembre.

49. David J. Adams. (2004) Fungal cell wall chitinases and glucanases Microbiology, 150, 2029–2035.

50. David W Denning (2003) Echinocandin antifungal drugs. The Lancet, Vol 362, October 4.

51. Deng Yi Zhen, Maribu Ramos-Pamplona and Naweed I. Naqvi (2009) Autophagy-assisted glycogen catabolism regulates asexual differentiation in *Magnaporthe oryzae* [Autophagy 5:1, 33-43; 1 January]; ©Landes Bioscience.

52. Deng Yi Zhen, Marilou Ramos-Pamplona et Naweed I. Naqvi (2008) Methods for Functional Analysis Macroautophagy in Filamentous Fungi. Methods in Enzymology, Volume 451.

53. De Groot PWJ, De Boer AD, Cunningham J(2004) Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. *Eukaryot CelB*: 955-965.

54. De Groot PWJ, Ram AF, Klis FM. (2005) Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genet Biol*42: 657-675.

55. De Nobel JG, Klis FM, Priem J, Munnik T, Van den Ende H. (1990) The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae. Yeast*6: 491-499.

56. Dean RA, Talbot NJ, Ebbole DJ, Farman ML, Mitchell TK, Orbach MJ, Thon M, Kulkarni R, Xu JR, Pan H, Read ND, Lee YH, Carbone I, Brown D, Oh YY, Donofrio N, Jeong JS, Soanes DM, Djonovic S, Kolomiets E, Rehmeyer C, Li W, Harding M, Kim S, Lebrun MH, Bohnert H, Coughlan S, Butler J, Calvo S, Ma LJ, Nicol R, Purcell S, Nusbaum C, Galagan JE, Birren BW (2005) The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature*434: 980-986.

57. Dehoux Baudoin Cecile, Gorrichon Liliane (2000) Approaches towards asymmetric synthesis of polyoxin J and analogs, Thèse, Université de Toulouse 3, Toulouse, France.

58. Demolis, N., L. Mallet, and M. Jacquet (1994) A 12-5-kb fragment of the yeast chromosome-II contains 2 adjacent genes encoding ribosomal-proteins and 6 putative new genes, one of which encodes a putative transcriptional factor. Yeast 10:1511–1525.

59. Denhardt, D. T. (1996) Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling. Biochem.J. 318 , 729-747.

60. Denning, D. W. (1997). Echinocandins and pneumocandins-a new antifungal class with a novel mode of action. J. Antimicrob. Chemother. 40:611-614.

61. Dodou E, Treisman R. (1997) The Saccharomyces cerevisiae MADS-box transcription factor Rlm1 is a target for the Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway. Mol Cell Biol. Apr;17(4):1848-59.

62. Dominij Odenbach, Eckhard Thinies, Heidrun Anke, Andrew J. Foster (2009) The *Magnaporthe grisea* class VII chitin synthase is required for normal appressorial development and function. Molecular Plant Pathology Volume 10, Issue 1, Pages 81-94, January.

63. Dongqing Huang, Wayne A. Wilson and Peter J. Roach (1997) Glucose-6-P Control of Glycogen Synthase Phosphorylation in Yeast September 5, The Journal of Biological Chemistry, 272, 22495-22501.

64. Douglas CM, Foor F, Marrinan JA, Morin N, Nielsen JB, Dahl AM, Mazur P, Baginsky W, Li W, el-Sherbeini M, Clemas JA, Mandala SM, Frommer BR, Kurtz MB. (1994) The *Saccharomyces cerevisiaeFKS1 (ETG1)* gene encodes an integralmembrane protein which is a subunit ofß-1,3-D-glucan synthase. Proc Natl AcadSci USA; 91: 12907-12911.

65. Durand F., Dagkessamanskaia A., Martin – Yken H., Graille M., Van Tilbeurgh H., UverskyVN., François JM. (2008) Structure – function analysis of Knr4/Sim1, a newly member of intrinsically disordered proteins family, indespensable in the absence of a functional PKC1 – SLT2 pathway in Saccharomyces cerevisiae. Yeast, Aug; 25 (8): 563 – 76.

66. El Gueddari, N.E., Rauchhaus, U., Moerschbacher, B.M., and Deising, H.B. (2002) Developmentally regulated conversion of surface-exposed chitin to chitosan in cell walls of plantpathogenic fungi. New Phytol 156: 103–112.

67. **Elion, E. A.** (2000) Pheromone response, mating and cell biology. Curr.Opin.Microbiol. 3 , 573-581.

68. Elion, E. A. (2001) The Ste5p scaffold J.Cell Sci.114_: 3967-3978.

69. **Errede,B., Caik,R.M., Yashar,B.M., Kamada,Y., Levin,D.E., Irie,K and Matsumoto,K.** (1995) Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. Mol. Reprod. Dev., 42, 477–485.

70. Evdokia Dodou ans Richard Treisman (1997) The *Saccharomyces cerevisiae* MADS-Box Transcription Factor Rlm1 is a Target for the Mpk1 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Molecular and cellular biology apr., p. 1848–1859.

71. Federico Navarro-Garcia, Rebeca Alonso-Monge, Jesus Pla, Rafael Sentandreu et Cesar Nombela (1998) A role for the MAP kinase gene *MKC7* in cell wall construction and morphological transitions in *Candida albicans.*

72. **Felix, G, Regenass, M., and Boller, T.** (1993) Specificperception of subnanomolar concentrations of chitinfragments by tomato cells: induction of extracellular alkalinization, changes in protein phosphorylation, and establishmentof a refractory state. Plant J 4: 307–316.

73. Feng B., Marzluf Ga. (1998) Interaction between major nitrogen regulatory protein NIT2 and pathway-specific regulatory factor NIT4 is required for their synergistic activation of gene expression

in Neurospora crassa, Mol Cell Biol, 18(7), 3983-90.

74. Ficarro S. B., McCleland M. L., Stukenberg P. T., Burke D. J., Ross M. M., Shabanowitz J., Hunt D. F., et White F. M. (2002) Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to Saccharomyces cerevisiae. Nat.Biotechnol. 20:301-305.

75. Fishel B. R., Sperry A. O., et Garrard W. T. (1993) Yeast calmodulin and a conserved nuclear protein participate in the in vivo binding of a matrix association region. Proc.NatlAcad.Sci.U.S.A. 90:5623-5627.

76. Fleet G. H. (1991). Cell Walls. In The Yeast (2 ed). Academic Press, London. 199-277.

77. Foord Rachel, Ian A. Taylor, Steven G. Sedgwick et Stephen J. Smerdon (1999) X-ray structural analysis of the yeast cell cycle regulator Swi6 reveals variations of the ankyrin fold and has implications for Swi6 function. Nature Structural Biology 6, 157 – 165.

78. Fortwendel, J. R., P. R. Juvvadi, N. Pinchai, B. Z. Perfect, J. A. Alspaugh, J. R. Perfect, and W. J. Steinbach (2009) Differential effects of inhibiting chitin and 1,3-{beta}-D-glucan synthesis in Ras and calcineurin mutants of *Aspergillus fumigatus*. Antimicrob. Agents Chemother. 53:476-482.

79. François, J. and J. L. Parrou (2001) Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol *Rev.* 25:125-145.

80. François Villalba, Jerome Collemare, Patricia Landraud, Karine Lambou, Viviane Brozek, Benedicte Cirer, Damien Morin, Christophe Bruel, Roland Beffa, Marc-Henri Lebrun (2007) Improved gene targeting in Magnaporthe grisea by inactivation of MgKU80 required for non-homologous end joining. Fungal Genetics and Biology 45, 68–75.

81. Fujikawa T, Kuga Y, Yano S, Yoshimi A, Tachiki T, Abe K, Nishimura M. (2009) Dynamics of cell wall components of Magnaporthe grisea during infectious structure development. Mol Microbiol Aug; 73 (4) : 553-70. Epub, Jul 7.

82. **Fujioka T, Mizutani O, Furukawa K, Sato N, Yoshimi A, Yamagata Y, Nakajima T, Abe K**. (2007) MpkA-Dependent and -independent cell wall integrity signaling in *Aspergillus nidulans*. Eukaryot Cell. 2007 Aug;6(8):1497-510. Epub 2007 Jun 29.

83. G. S. May, T. Xue, D. P. Kontoyiannis et M. C. Gustin (2005) Mitogen activated protein kinases of Aspergillus fumigatus Medical Mycology Supplement 1, 43, S83_/S86.

84. Gallion SL., Qian D. (2005) Chemical genetic approaches to kinase drug discovery, Curr Opin Drug Discovery and Developement, 8(5), 638-45.

85. García R, Bermejo C, Grau C, Pérez R, Rodríguez-Peña JM, Francois J, Nombela C, Arroyo J. (2004) The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway.J Biol Chem. Apr 9; 279(15):15183-95. Epub Jan 21.

86. Garrington TP, Johnson GL. (1999) Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways Curr Opin Cell BiolApr;11(2):211-8.

87. Gerald R. Crabtree (2001) Calcium, Calcineurin, and the Control of Transcription. Jour of Biolo Chem. jan 21; 276(4) 2313-2316.

88. Gerard Manning (2005) Genomic overview of protein kinases, WormBook, December 13.

89. Gonzalez – Ramos D., Quiros M., Gonzalez R. (2009) Three different targets for the genetic modification of wine yeast strains resulting in improved effectiveness of betonite rining. J. Agric. Food Chem. September. 23, 57 (18) : 8373 – 8.

90. Goyard S., Knechtle P., Chauvel M., Mallet A., Prevost Mc., Proux C., Coppee Jy., Schwartz P., Dromer P., Park H., Filler Sg., Janbon Sg., D'enfert C. (2008) The Yak1 kinase is involved in the initiation and maintenance of hyphal growth in *Candida albicans*, Mol Biol Cell, 19(5), 2251-66.

91. Gooday, G. W. (1995). Cell walls. In the Growing Fungus, pp. 43–62. Edited by N. A. R. Gow & G. M. Gadd. London: Chapman & Hall.

92. Govindsamy Vediyappan, Tristan Rossignol et Christophe d'Enfert (2010) Interaction of *Candida albicans* Biofilms with Antifungals: Transcriptional Response and Binding of Antifungals to Beta-Glucan. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, May, p. 2096-2111, Vol. 54, No. 5.

93. Gray JV, Ogas JP, Kamada Y, Stone M, Levin DE, Herskowitz I. (1997) A role for the Pkc1 MAP kinase pathway of Saccharomyces cerevisiae in bud emergence and identification of a putative upstream regulator. EMBO J. Aug 15;16(16):4924-37.

94. Gregan J., Zhang C., Rumpf C., Cipak L., Li Z., Uluocak P., Nasmyth K., Shokat Km. (2007) Construction of conditional analog-sensitive kinase alleles in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, Nature Protocols, Vol. 2, N°11, 2996-3000.

95. Guillaume Lesage and Howard Bussey (2006) Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Mol Biol Rev. June; 70(2): 317–343.

96. Gustin, M.C., Albertyn, J., Alexander, M. and Davenport, K. (1998) MAP Kinase Pathways in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 1264–1300.

97. H. Sandovsky-Losica, R. Shwartman, Y.Lahat et E. Segal (2008) Antifungal activity against *Candida albicans* of nikkomycin Z in combination with caspofungin, voriconazole or amphotericin B. J. Antimicrob. Chemother. 62 (3): 635-637.

98. Haizhen Zhang, Xiaoting Tang, Gerhard R. Munske, Nikola Tolic, Gordon A. Anderson et James E. **Bruce** (2009) Identification of Protein-Protein Interactions and Topologies in Living Cells with Chemical Cross-linking and Mass Spectrometry. March 1, Molecular et Cellular Proteomics, 8, 409-420.

99. Hamer JE, Howard RJ, Chumley FG, Valent B (1988) A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. Science15: 288-290.

100. Heitman J. (2005) Cell biology. A fungal Achilles'heel. Science; 309: 2175-2176.

101. Helene Martin-Yken, Adilia Dagkessamanskaia, Fadi Basmaji, Arnaud Lagorce and Jean Francois(2003) The interaction of Slt2 MAP kinase with Knr4 is necessary for signalling through the cell wall integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Molecular Microbiology 49 (1), 23–35.

102. Hernandez-Lopez, M.J., Panadero, J., Prieto, J.A., Randez-Gil, F. (2006) Regulation ofsalt tolerance by *Torulaspora delbrueckii* calcineurin target Crz1p. Eukaryot. Cell 5, 469-79.

103. Hirayama, S., Sugiura, R., Lu, Y., Maeda, T., Kawagishi, K., Yokoyama, M., Tohda, H., Giga-Hama, Y., Shuntoh, H., Kuno, T. (2003) Zinc finger protein Prz1 regulates Ca2+ but not Cl- homeostasis in fission yeast. Identification of distinct branches of calcineurin signaling pathway in fission yeast. J. Biol. Chem. 278, 18078-84.

104. Ho Yuen, Michael Costanzo, Lynda Moore, Ryuji Kobayashi, and Brenda J. Andrews (1999) Regulation of Transcription at the *Saccharomyces cerevisiae* Start Transition by Stb1, a Swi6-Binding Protein. Mol Cell Biol. 1999 August; 19(8): 5267–5278.

105. Hong Z., Mann P., Brown N. H., Tran L. E., Shaw K. J., Hare R. S., et Didomenico B. (1994) Cloning and characterization of KNR4, a yeast gene involved in (1,3)-beta-glucan synthesis. Mol.Cell Biol. 14:1017-1025.

106. Hong Z., Mann P., Shaw K. J., et Didomenico B. (1994) Analysis of beta-glucans and chitin in a Saccharomyces cerevisiae cell wall mutant using high-performance liquid chromatography. Yeast. 10:1083-1092.

107. Howard RJ, Valent B (1996) Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. Annu Rev Microbiol50: 491-512.

108. Huang, W. & R. L. Erikson (1994) Constitutive activation of Mek1 by mutation of serine phosphorylation sites Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8960-8963.

109. Hunter, T. (2000) Signaling and beyond. Cell 100, 113–127

110. Hwang PK, Tugendreich S, Fletterick RJ. 1989 Molecular analysis of GPH1, the gene encoding glycogen phosphorylase in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol 1; 9:1659-66.

111. Iavarone C, Acunzo M, Carlomagno F, Catania A, Melilb RM, Carlomagno SM, Santoro M, Chiarielb M. (2006) Activation of the Erk8 mitogen-activated protein (MAP) kinase by RET/PTC3, a constitutively active form of the RET proto-oncogene. J Biol Chem. Apr 14;281(15):10567-76.

112. Igual, J. C., A. L. Johnson, and L. H. Johnston (1996) Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor SWI4 and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. EMBO J. 15:5001–5013.

113. Inoue SB, Takewaki N, Takasuka T, Mio T, Adachi M, Fujii Y, Miyamoto C, Arisawa M, Furuichi Y, Watanabe T. (1995) Characterization and gene cloning of 1,3-beta-D-glucan synthase from Saccharomyces cerevisiae Eur J Biochem. Aug 1;231(3):845-54.

114. J V Gray, J P Ogas, Y Kamada, M Stone, D E Levin, and I Herskowitz (1997) A role for the Pkc1 MAP kinase pathway of Saccharomyces cerevisiae in bud emergence and identification of a putative upstream regulator EMBO J. 1997 August 15; 16(16): 4924–4937.

115. J.D. Moore and J.E. Krebs (2004) Histone modifications and DNA double-strand break repair, Biochem. Cell Biol.82 (4) pp. 446–452).

116. Jamet-Vierny C, Debuchy R, Prigent M, Silar P. (2007) IDC1, a pezizomycotina-specific gene that belongs to the PaMpk1 MAP kinase transduction cascade of the filamentous fungus Podospora anserina., Fungal Genet Biol 2007 Dec;44(12):1219-30. Epub Apr 19.

117. Jason M. Cota, Jodi L. Grabinski, Robert L. Talbert, David S. Burgess, P. David Rogers, Thomas D.

Edlind,⁴ and Nathan P. Wiederhold (2008) Increases in *SLT2* Expression and Chitin Content Are Associated with Incomplete Killing of *Candida glabrata* by Caspofungin. Antimicrob Agents Chemother. March; 52(3): 1144–1146.

118. Jeon J, Goh J, Yoo S, Chi MH, Choi J, Rho HS, Park J, Han SS, Kim BR, Park SY, Kim S, Lee YH (2008) A putative MAP kinase kinase kinase, MCK1, is required for cell wall integrity and pathogenicity of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. Mol Plant Microbe interact.May;21(5):525-34.

119. Jinhee Choi, Yangseon Kim, Soonok Kim, Jongsun Park, and Yong-Hwan Lee (2009) *MoCRZ1*, a gene encodingacalcineurin-responsive transcription factor, regulates fungal growth and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*, Fungal Genet Biol. Mar;46(3):243-54. Epub Dec 10.

120. Jin-Rong Xu, Christopher J. Staigner et John E. Hamer (1998) Inactivation of the mitogenactivated protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses Proc. Natl. Acad. Sci. *USA* Vol. 95, pp. 12713–12718, October.

121. John W. Edmunds and Louis C. Mahadevan (2004) MAP kinases as structural adaptors and enzymatic activators in transcription complexes Journal of Cell Science 117, 3715-3723 Published by The Company of Biologists.

122. Jorge JA, Polizeli MLTM, Thevelein JM, Terenzi HF (1997) Trehalases and trehalose hydrolysis in fungi. FEMS Microbiol Lett154: 165-171.

123. Julia Schumacher, Inigo F. de Larrinoa, and Bettina Tudzynski (2008) Calcineurin-Responsive Zinc Finger Transcription Factor CRZ1 of *Botrytis cinerea* Is Required for Growth, Development and Full Virulence on Bean Plants, Eukaryotic cell, Apr., p.584–601 Vol. 7, No. 4.

124. Julia Sidorova et Linda Breeden (1993) Analysis of the SWI4/SWI6 Protein Complex, Which Directs G1/S-Specific Transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and Cellular Biology, Feb., p. 1069-1077.

125. Jung Un Sung; Sobering Andrew K. ; Romeo Martin J. ; Levin David E (2002) Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase, Molecular microbiology ISSN 0950-382X vol 46, n°3, pp. 781-789.

126. Jung US, Levin De. (1999) Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. Mol Microbiol Dec;34(5):1049-57.

127. Mizoguchi Junzo, Tetsu Saito, Kimio Mizuni etKazuo Hayano (1977) On the mode of action of a new antifungal antibiotic, aculeacin A: inhibition of cell wall synthesis in Saccharomyces cerevisiae. The journal of Antibiotics, April.

128. K. Cunningham, G.R. Fink (1996) Calcineurin inhibits VCX1-dependent Hþ/Ca2þ exchange and induces Ca2þ ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*, Mol. Cell. Biol. 16 2226–2237.

129. K., **M. Saitoh** (2002) Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by the stressinduced activating phosphorylation of pre-formed oligomer Tobiume, J. Cell Physiol. 95-104.

130. Kamada Y, Qadota H, Python CP, Anraku Y, Ohya Y, Levin DE (1996) Activation of yeast protein kinase C by Rho1 GTPase. J Biol Chem. 1996 Apr 19;271(16):9193-6.

131. Kanetsuna F, Carbonell LM, Moreno RE, Rodriguez J. (1969) Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. J Bacteriol; 97: 1036-1041.

132. Kant S, Schumacher S, Singh MK, Kispert A, Kotlyarov A, Gaestel M. (2006) Characterization of the atypical MAPK ERK4 and its activation of the MAPK-activated protein kinase MK5. J Biol Chem. 281 (46): 35511–9. doi:10.1074/jbc.M606693200. PMID 16973613.

133. Katherine P. Dixon, Jin-Rong Xu, Nicholas Smirnoff, and Nicholas J. Talbot (1999) Independent Signaling Pathways Regulate Cellular Turgor during Hyperosmotic Stress and Appressorium-Mediated Plant Infection by *Magnaporthe grisea*, Plant Cell, Vol. 11, 2045-2058, October, Copyright ©, American Society of Plant Physiologists.

134. Kato H, Yamaguchi T. (1982) The perfect state of *Pyricularia oryzae* Cav. from rice plants in culture. Phytopathol48: 607-612.

135. Kicka, S., C. Bonnet, A. K. Sobering, L. P. Ganesan, and P. Silar (2006) A mitotically inheritable unit containing a MAP kinase module, *Proc. Natl Acad Sci. USA*103, pp. 13445–13450.

136. Kitagaki H, Shimoi H, Itoh K. (1997) Identification and analysis of a static culture-specific cell wall protein, Tir1p/Srp1p in *Saccharomyces cerevisiae*. Eur J Biochem249: 343-349.

137. Kiyosawa S. (1989) Breakdown of blast resistance in rice in relation to general strategies of resistance gene deployment to prolong effectiveness of disease resistance in plants. Plant disease epidemiology, Volume II: Genetics, resistance and management, Leonard K. J. and Fry W. E., McGraw-Hill Publishing Co, New York, USA. 251-283.

138. Ki-Young Kim, Andrew W. Truman, and David E. Levin (2008) Yeast Mpk1 Mitogen-Activated Protein Kinase Activates Transcription through Swi4/Swi6 by a Noncatalytic Mechanism That Requires Upstream Signal Molecular cellular and biology, Apr., p. 2579–2589 Vol. 28, No. 8.

139. Ki – Young Kim, David E. Levin (2010) Transcriptional reporters for genes activated by cell wall stress through a non-catalytic mechanism involving Mpk1 and SBF. Yeast Special Issue: Special Issue of Yeast on Fungal Cell Walls Volume 27, Issue 8, pages 541–548, August.

140. Ki-Young Kim, Andrew W. Truman, Stefanie Caesar, Gabriel Schlenstedt, and David E. Levin (2010)Yeast Mpk1 Cell Wall Integrity Mitogen-activated Protein Kinase Regulates Nucleocytoplasmic Shuttling of the Swi6 Transcriptional Regulator MBoC in Press Vol. 21, Issue 9, 1609-1619, May 1.

141. Klis FM, Mol P, Hellingwerf K, Brul S. (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol Rev. Aug;26(3):239-56.

142. Knogge W. (1998) Fungal pathogenicity. Curr Opin Plant Biol1: 324-328.

143. Kobayashi O, Yoshimoto H, Sone H. (1999) Analysis of the genes activated by the *FL08* gene in *Saccharomyces cerevisiae. Curr Genet*36: 256-261.

144. Koch A., Hauf S. (2010) Strategies for the identification of kinase substrates using analog-sensitive kinases. Eur J Cell Biol., 89(2-3), 184-93.

145. Koch, C., and K. Nasmyth. (1994) Cell cycle regulated transcription in yeast.Curr. Opin. Cell Biol. 6:451–459.

146. Kristin Baetz et Brenda Anrews (1999) Regulation of Cell Cycle Transcription Factor Swi4 through Auto-Inhibition of DNA Binding. Molecular and Cellular Biology, Oct., p. 6729–6741 Vol. 19, No. 10.

147. Kyriakis, J. M. (1999) Making the connection: coupling of stress-activated ERK/MAPK (extracellular-signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase) core signalling modules to extracellular stimuli and biological responses. Biochem.Soc.Symp. 64:29-48., 29-48.

148. Lagorce, N.C. Hauser, D. Labourdette, C. Rodriguez, H. Martin-Yken, J. Arroyo, J.D. Hoheisel, J. **Francois** (2003) Genomewide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast.

149. Laverdière M, Lalonde RG, Baril JG, Sheppard DC, Park S, Perlin DS. (2006)Progressive loss of echinocandin activity following prolonged use for treatment of *Candida albicans oesophagitis*. J Antimicrob Chemother. Apr;57(4):705-8. Epub, Feb 7.

150. Law, D.T., and Segall, J. (1988) The SPS100 gene of Saccharomyces cerevisiae is activated late in the sporulation process and contributes to spore wall maturation. Mol Cell Biol 8: 912–922.

151. Lee, J. T., Jr. and McCubrey, J. A. (2002) The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. Leukemia 16, 486-507.

152. Levene P.A. & Alsberg C.L. (1906) "The cleavage products of vitellin" J. Biol. Chem. 2, 127 – 133.

153. Levin DE, Bowers B, Chen CY, Kamada Y, Watanabe M. (1994)Dissecting the protein kinase C/MAP kinase signalling pathway of Saccharomyces cerevisiae Cell Mol Biol Res.;40(3):229-39.

154. Levin, D.E. (2005) Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae.* Microbiol Mol Biol Rev 69: 262–291.

155. Li, R. K., Rinaldi, M. G. (1999) In vitro antifungal activity of nikkomycine Z in combination with fluconazole or itraconazole. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 1401-1405.

156. Liao G, Li J, Li L, Yang H, Tian Y, Tan H. (2009) Selectively improving nikkomycin Z production by blocking the imidazolone biosynthetic pathway of nikkomycin X and uracil feeding in Streptomyces ansochromogenes. Microb Cell Fact. Nov 23;8:61.

157. Lipmann F.A. & Levene P.A. (1932) "Serinephosphoric acid obtained on hydrolysis of vitellinic acid" J. Biol. Chem. 98, 109 – 114.

158. Louise A. Walker, Carol A. Munro, Irene de Bruijn, Megan D. Lenardon, Alastair McKinnon, and Neil A. R. Gow (2008) Stimulation of Chitin Synthesis Rescues *Candida albicans* from Echinocandins. April, Plos Pathogen Volume 4, Issue 4.

159. M., **Noguchu, E., Hayashi,N., and Nishimoto,T.** (1998) Nuclear protein import, but not mRNA export, is defective in all *S.cerevisiea* mutants that produce temperature sensitive forms of the Ran GTPase homologue Gsp1p, Oki ; Mol. Gen. Genet. 257 :624 – 634.

160. Madden, K., Y. J. Sheu, K. Baetz, B. Andrews, and M. Snyder. (1997) SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway. Science 275:1781–1784.

161. Maeta K, Izawa S, Inoue Y. (2005) Methylglyoxal, a metabolite derived from glycolysis, functions as a signal initiator of the high osmolarity glycerol-mitogen-activated protein kinase cascade and

calcineurin/Crz1-mediated pathway in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem. Jan 7;280(1):253-60. Epub 2004 Nov 1.

162. Malagnac F, Lalucque H, Lepère G, Silar P. (2004) Two NADPH oxidase isoforms are required for sexual reproduction and ascospores germination in the filamentous fungus *Podospora anserina*. Fungal Genet. Biol. 41, 982–997.

163. Markovich S., Yekutiel A., Shalit I., Shadkchan Y., et Osherov N. (2004) Genomic approach to identification of mutations affecting caspofungin susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*. Antimicrob.Agents Chemother. 48:3871-3876.

164. Martha S. Cyert, (2003) Calcineurin signaling in Saccharomyces cerevisiae: how yeast go crazy in response to stress. Biochemical and Biophysical Research Communications 311 1143–1150.

165. Martijn Rep, Vladimír Reiser, Ulrike Gartner, Johan M. Thevelein, Stefan Hohmann, Gustav Ammerer, and Helmut Ruis (1999) Osmotic Stress-Induced Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae* Requires Msn1p and the Novel Nuclear Factor Hot1p Mol Cell Biol. August; 19(8): 5474–5485.

166. Martin H, Dagkessamanskaia A, Satchanska G, Dallies N, François J. (1999) KNR4, a suppressor of *Saccharomyces cerevisiae* cwh mutants, is involved in the transcriptional control of chitin synthase genes. Microbiology. Jan;145 (Pt 1):249-58

167. Martín H, Rodríguez-Pachón JM, Ruiz C, Nombela C, Molina M.(2000) Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem. Jan 14;275(2):1511-9.

168. Martin J. Egan, Zheng-Yi Wang, Mark A. Jones, Nicholas Smirnoff, and Nicholas J. Talbot (2007) Generation of reactive oxygen species by fungal NADPH oxidases is required for rice blast disease Proc Natl Acad Sci U S A. July 10; 104(28): 11772–11777.

169. Markovich S, Yekutiel A, Shalit I, Shadkchan Y, Osherov N (2004) Genomic approach to identification of mutations affecting caspofungin susceptibility in Saccharomyces cerevisiae. Antimicrob Agents Chemother. Oct;48(10):3871-6.**Martin-Yken H, Dagkessamanskaia A, Basmaji F, Lagorce A, Francois J.** (2003) The interaction of Slt2 MAP kinase with Knr4 is necessary for signalling through the cell wall integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Microbiol Jul;49(1):23-35.

170. Martin-Yken H, Dagkessamanskaia A, De Groot P, Ram A, Klis F, François J. (2001) *Saccharomyces cerevisiae* YCR017c/CWH43 encodes a putative sensor/transporter protein upstream of the BCK2 branch of the PKC1-dependent cell wall integrity pathway. Yeast. Jun 30;18(9):827-40.

171. Martin-Yken H, Dagkessamanskaia A, Talibi D, Francois J. (2002) KNR4 is a member of the PKC1 signalling pathway and genetically interacts with BCK2, a gene involved in cell cycle progression in Saccharomyces cerevisiae. Curr Genet. Aug;41(5):323-32. Epub Jul 23.

172. Matheos, D. P., Kingsbury, T. J., Ahsan, U. S., Cunningham, K. W. (1997). Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Genes Dev. 11, 3445–58.

173. Maubon D, Park S, Tanguy M, Huerre M, Schmitt C, Prévost MC, Perlin DS, Latgé JP, Beauvais A. (2006) AGS3, an alpha(1-3)glucan synthase gene family member of Aspergillus fumigatus, modulates mycelium growth in the lung of experimentally infected mice. Fungal Genet Biol. May;43(5):366-75. Epub 2006 Mar 13.

174. Mauch, F., and Staehelin, L.A. (1989) Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinaseand b-1,3-glucanase in bean leaves. Plant Cell 1:447–457.

175. Mauch, F., Mauch-Mani, B., and Boller, T. (1988) Antifungalhydrolases in pea tissue. Plant Physiol88: 936–942.

176. Mazur P, Morin N, Baginsky W, El-Sherbeini M, Clemas JA, Nielsen JB, Foor F. (1995) Differential expression and function of two homologous subunits of yeast ß1,3-D-glucan synthase. Mol Cell Biol; 15: 5671-5681.

177. McCarthy Peter J., Peter F. Troke, Keith Gull (1985) Mechanism of Action of Nikkomycin and the Peptide Transport System *Candida albicans.* Journal of' General Microbiology, 131, 775-780.

178. Mehrabi R, Ding S, Xu JR. (2008) MADS-box transcription factor mig1 is required for infectious growth in Magnaporthe grisea. Eukaryot Cell. May;7(5):791-9. Epub Mar 14.

179. Mehrabi R, Van der Lee T, Waalwijk C, Gert HJ. (2006) MgSlt2, a cellular integrity MAP kinase gene of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*, is dispensable for penetration but essential for invasive growth.Mol Plant Microbe Interact. Apr;19(4):389-98.

180. Mohamed Fadi Basmaji, (2005) Caractérisation de la protéine Knr4 et recherche de ses partenaires fonctionnels pour la compréhension de son rôle dans la synthèse pariétale chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, Thèse.

181. Money NP, Howard RJ (1996) Confirmation of a link between fungal pigmentation, turgor pressure, and pathogenicity using a new method of turgor measurement. Fungal Gent Biol20: 217-227.

182. Muhammad Badaruddin, Lucy J. Hokombe, Zheng-Yi Wang, Darren M. Soanes et Nicholas J. Talbot (2009) Investigating the role of glycogen metabolism during infection related development in *Magnaporthe oryzae.* Molecular Biology of pathogens Plant XX.

183. Munro, C. A., Selvaggini, S., de Bruijn, I., Walker, L., Lenardon, M. D., Gerssen, B., Milne, S., Brown, A. J., Gow, N. A. (2007) The PKC, HOG and Ca2⁺ signaling pathways co-ordinately regulate chitin synthesis in *Candida albicans*. Mol. Microbiol. 63, 1399–1413.

184. Nakamura T, Ohmoto T, Hirata D, Tsuchiya E, Miyakawa T. (1996) Genetic evidence for the functional redundancy of the calcineurin and Mpk1-mediated pathways in the regulation of cellular

events important for growth in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and General Genetics, Volume: 251, Issue: 2, Pages: 211-219.

185. Nguyen T. H., Fleet G. H., et Rogers P. L. (1998) Composition of the cell walls of several yeast species. Appl.Microbiol.Biotechnol. 50:206-212.

186. Nicolas Rispail, Darren M. Soanes, Cemile Ant, Robert Czajkowski, Anke Grünler, Romain Huguet, Elena Perez-Nadales, Anna Poli, Elodie Sartorel, Vito Valiante, Meng Yang, Roland Beffa, Axel A. Brakhage, Neil A.R. Gow, Regine Kahmann, Marc-Henri Lebrun, Helena Lenasi, José Perez-Martin, Nicholas J. Talbot, Jürgen Wendland, Antonio Di Pietro (2009) Comparative genomics of MAP kinase and calciumcalcineurin signalling components in plant and human pathogenic fungi, Fungal Genetics and Biology 46 287–298.

187. Nimrichter L, Rodrigues ML, Rodrigues EG, Travassos LR.(2005) The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall. Microbes Infect; 7: 789-798.

188. Ninomiya, Y., Suzuki, K., Ishii, C., Inoue, H. (2004) Highly efficient gene replacements in *Neurospora*strains deficient for non-homologous end joining. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(33), 12248–53.

189. Nonaka H, Tanaka K, Hirano H, Fujiwara T, Kohno H, Umikawa M, Mino A, Takai Y.(1995) A downstream target of RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in Saccharomyces cerevisiae. EMBO J. Dec 1;14(23):5931-8.

190. Norman, C., M. Runswick, R. Polbck, and R. Treisman (1988) Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the *c-fos* serum response element. Cell 55:989–1003.

191. Oliver Rui et Mathias Hahn (2007) The Slt2-type MAP kinase Bmp3 of *Botrytis cinerea* is required fornormal saprotrophic growth, conidiation, plant surface sensing andhost tissue colonization. Molecular plant pathology (2), 173–184.

192. Osumi M. (1998) The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. Micron29: 207-233.

193. Ou SH (1985) Blast. In Rice Diseases, 2nd Edition, Commonwealth Mycological Institute, CAB International, Kew, UK, pp. 109-201.

194. P Garrett-Engele, B Moilanen and MS Cyert (1995) Calcineurin, the Ca2+/calmodulin-dependent protein phosphatase, is essential in yeast mutants with cell integrity defects and in mutants that lack a functional vacuolar H(+)-ATPase. Mol. Cell. Biol, Aug 1995, 4103-4114, Vol 15, No. 8.

195. P. Hasty, M. Crist, M. Grompe and A. Bradley (1994) Efficiency of insertion versus replacement vector targeting varies at different chromosomal loci, Mol. Cell. Biol. **14** (12) pp. 8385–8390.

196. Pardo, M., Monteoliva, L., Pla, J., Sanchez, M., Gil, C., et Nombela, C. (1999) Two-dimensional analysis of proteins secreted by Saccharomyces cerevisiae regenerating protoplasts a novel approach to study the cell wall. Yeast **15** :459–472.

197. Pascal Hersen, Megan McClean, Sharad Ramanathan (2008) Analyse dynamique de la signalisation cellulaire : L'exemple de la réponse osmotique chez *Saccharomyces* cerevisiae Nouvelles.indd M/S n° 11, vol. 24, novembre .

198. Payne, D.M. (1991) Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogenactivated protein kinase (MAP kinase). EMBO J, 10(4): p. 885- 92.

199. Pazos C, Moragues MD, Quindós G, Pontón J, del Palacio A. (2006) Diagnostic potential of detection of (1-3)-ß-D-glucan and antibodies to *Candida albicans* germ tubes for diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis in neutropenic adult patients. Rev Iberoam Micol; 23: 209-215.

200. Philip B, Levin DE. (2001) Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1.Mol Cell Biol. Jan;21(1):271-80.

201. Popob, L. Gualtieri, T., and Ragni, E. (2001) The yeast cell-wall salvage pathway. Med Mycol.39:111-121.

202. Posas, F., Wurgler-Murphy, S. M., Maeda, T., Witten, E. A., Thai, T. C., and Saito, H. (1996) Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. Cell %20;86, 865-875.

203. Pouyssegur, J., Volmat, V., and Lenormand, P. (2002) Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. Biochem.Pharmacol. 64, 755-763.

204. Printen, J. A. & G. F. Sprague, Jr. (1994) Protein-protein interactions in the yeast pheromone response pathway: Ste5p interacts with all members of the MAP kinase cascade Genetics 138: 609-619.

205. Punt Pj;, Strauss J., Smit R., Kinghorn JR., Van Den Hondel Ca;, Scazzocchio C. (1995) The intergenic region between the divergently transcribed niiA and niaD genes of Aspergillus nidulans contains multiple NirA binding sites which act bidirectionally, Mol Cell Biol, 1995, 15(10), 5688-99.

206. Qadota H, Python CP, Inoue SB, Arisawa M, Anraku Y, Zheng Y, Watanabe T, Levin DE, Ohya Y. (1996) Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of ß1,3-glucan synthase. Science; 272: 279-281.

207. QiageN

208. R J Smith, S Milewski, A J Brown, and G W Gooday (1996) Isolation and characterization of the GFA1 gene encoding the glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase of Candida albicans. J Bacteriol 1996 April; 178(8): 2320–2327.

209. R. Alonso Monge, E. Román, C. Nombela and J. Pla (2006) The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans.* Microbiology 152 (2006), 905-912

210. Rahim Mehrabi, Shengli Ding, and Jin-Rong Xu (2008)MADS-Box Transcription Factor Mig1 Is Required for Infectious Growth in *Magnaporthe grisea*, Eukaryotic cell, May, p. 791–799 Vol. 7, No. 5.

211. Rak, J., Yu, J. L., Klement, G, and Kerbel, R. S. (2000) Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth. J.Investig.Dermatol.Symp.Proc. 5, 24-33.

212. Rao KM (1994) In *Rice Blast Disease*: Biological Control of Rice Leaf Blast, in Zeigler RS *et al.*, eds, Daya Publishing House, Delhi, India, pp. 1-2.

213. Rappleye, C.A., Groppe Eissenberg, L., and Goldman, W.E. (2007) Histoplasma capsulatum α -(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the β -glucan receptor. Proc Natl Acad Sci USA 104: 1366–1370.

214. Reiser, V., Ammerer, G., and Ruis H. (1999) Nucleocytoplasmic traffic of MAP kinases., Gene Expr.7 :247 – 254.

215. Richard A Wilson, Joanna M Jenkinson, Robert P Gibson, Jennifer A Littlechild, Zheng-Yi Wang, et Nicholas J Talbot (2007) Tps1 regulates the pentose phosphate pathway, nitrogen metabolism and fungal virulence. EMBO J. August 8; 26(15): 3673–3685.

216. Robbins, D.J. (1993) Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro. J Biol Chem, 268(7): p. 5097-106.

217. Robinson, M. J. and Cobb, M. H. (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. Curr.Opin.Cell Biol. 9, 180-186.

218. Roncero & Duran (1985) Effect of Calcofluor White and Congo Red on fungal cell wall morphogenesis: In vivo activation of chitin polymerization. Journal of Bacteriology 3: 1180-1185.

219. Rusnak F, Mertz P. (2000) Calcineurin: form and function. Physiol Rev. Oct;80(4):1483-521.

220. Ryan, C.A., and Farmer, E.E. (1991) Oligosaccharide signalsin plants: a current assessment. Annu Rev Plant PhysiolPlant Mol Biol 42: 651–674.

221. S. Kicka (2006) A mitotically inheritable unit containing a MAP kinase module, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*103, pp. 13445–13450.

222. S.F. Gabby Krens, Herman P. Spaink and B. Ewa Snaar-Jagalska (2006) Functions of the MAPK family in vertebrate-development FEBS Letters Volume 580, Issue 21, 18 September, Pages 4984-4990.

223. Sabbagh W Jr, Flatauer LJ, Bardwell AJ, Bardwell L (2001) Specificity of MAP kinase signaling in yeast differentiation involves transient versus sustained MAPK activation. Mol Cell 8: 683–691.

224. Sacks DB (2006) The role of scaffold proteins in MEK/ERK signalling Biochem Soc Trans.Nov;34(Pt 5):833-6.

225. Sallaud C, Lorieux M, Roumen E, Tharreau D, Berruyer R, Svestasrani P, Garsmeur O, Ghesquiere A, Notteghem JL (2003) Identification of five new blast resistance genes in the highly blast-resistant rice variety IR64 using a QTL mapping strategy. *Theor Appl Genet*106: 794-803.

226. Scardaci SC, Webster RK, Greer CA, Hill JE, Williams JF, Mutters RG, Brandon DM, McKenzie KS, Oster JJ (1997) In Rice Blast: A New Disease in California, Agronomy Fact Sheet Series 1997-2, Department of Agronomy and Range Science, University of California, Davis.

227. Scazzocchio C. (2000) The fungal GATA factors. Curr Opin Microbiol. 3(2), 126-31.

228. Schluter U., Seiffert G. (1989) Chitin synthesis inhibition by nikkomycin in the integument of Manduca sexta: an ultrastructural and fluorescence microscopic study Journal of invertebrate pathology, vol. 53, n°3, pp. 387-391.

229. Schumacher, J., de Larrinoa, I.F., Tudzynski, B. (2008) The calcineurin-responsive zinc finger transcription factor CRZ1/'CRaZy' of *Botrytis cinerea* is required for growth, development and full virulence on bean plants. Eukaryot. Cell 7, 584-601.

230. Scrimale, T., Didone, L., de Mesy Bentley, K. L., and Krysan, D. J. (2009) The unfolded protein response is induced by the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase signaling cascade and is required for cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Biol. Cell 20, 164–175.

231. Sette, C., C. J. Inouye (2000) "Mutational analysis suggests that activation of the yeast pheromone response mitogen-activated protein kinase pathway involves conformational changes in the Ste5 scaffold protein Mol. Biol. Cell 11: 4033-4049.

232. Shaun M. Bowman and Stephen J. Free (2009) The structure and synthesis of the fungal cell wall, BioEssays, Volume 28, Issue 8(p 799-808).

233. Silar, P. (2005) Peroxide accumulation and cell death in filamentous fungi induced by contact with a contestant. Mycol. Res. 109, 137–149.

234. Smart Theo (1996) Treatment Issues (GMHC), vol10, N°10, Octobre.

235. Soriani, F.M., Malavazi, I., da Silva Ferreira, M.E., Savoldi, M., Von Zeska Kress, M.R., de Souza Goldman, M.H., Loss, O., Bignell, E., Goldman, G.H. (2008)Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* CRZ1 homologue, CrzA. Mol. Microbiol. 67, 1274-1291.

236. Spielvogel, A., Findon, H., Arst, H. N., Araujo-Bazan, L., Hernandez-Ortiz, P., Stahl, U., Meyer, V., Espeso, E. A. (2008) Two zinc finger transcription factors, CrzA and SltA, are involved in cation homoeostasis and detoxification in *Aspergillus nidulans*. Biochem. J. 414, 419–29.

237. Staleva L., Hall A., Orlow S. J. (2004) Oxidative stress activates FUS1 and RLM1 transcription in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an oxidant-dependent Manner. *Mol Biol Cell*. 15:5574-5582.

238. Stark, M. J. (1996) Yeast protein serine/threonine phosphatases: Multiple roles and diverse regulation. *Yeast* 12: 1647–1675.

239. Stathopoulos-Gerontides, J. Guo, M.S. Cyert (1999) Yeast calcineurin regulates nuclear localization of the Crz1p transcription factor through dephosphorylation, Genes Dev. 13 798–803.

240. Steven K. Hanks (1994) Vanderbilt University.

241. Stevens D.A. (2006) Escape of Candida from caspofungin inhibition at concentrations above the MIC (paradoxical effect) accomplished by increased cell wall chitin; evidence for beta-1,6-glucan synthesis inhibition by caspofungin. Antimicrob. Agents Chemother. 50:3160–3161.

242. Straver MH, Kijne JW. (1996) A rapid and selective assay for measuring cell surface hydrophobicity of brewer's yeast cells. *Yeast*12: 207-213.

243. Taddei A, Hediger F, Neumann FR.(2004) Separation of silencing from perinuclear anchoring functions in yeast Ku80, Sir4 and Esc1 proteins. EMBO J ; 23 : 1301-12.

244. Takahashi Y (1965) Genetics of resistance to rice blast disease. The rice blast disease, Proceedings of a symposium at IRRI, July 1963, Edition IRRI, Johns Hopkins Press, Baltimore, USA. 303-329.

245. Takashi Fujikawa, Yukari Kuga, Shigekazu Yano, Akira Yoshimi, Takashi Tachiki, Keietsu Abe, Marie Nishimura (2009) Dynamics of cell wall components of *Magnaporthe grisea* during infectious structure development Molecular MicrobiologyVolume 73, Issue 4, pages 553–570, August.

246. Takuji Tanoue, Eisuke Nishida (2003) Molecular recognitions in the MAP kinase cascades Cell Signal.May;15(5):455-62.

247. Talbot NJ (1995) Having a blast: exploring the pathogenicity of Magnaporthe grisea. Trends Microbiol3: 9-16.

248. Talbot NJ (2003) On the trail of a cereal killer: exploring the biology of *Magnoporthe grisea*. Annu Rev Microbiol3: 9-16.

249. Taylor, I. A., P. B. McIntosh, P. Pala, M. K. Treiber, S. Howell, A. N. Lane, and S. J. Smerdon (2000) Characterization of the DNA-binding domains from the yeast cell-cycle transcription factors Mbp1 and Swi4. Biochemistry 39:3943–3954.

250. Tibbles, L. A. and Woodgett, J. R. (1999) The stress-activated protein kinase pathways. Cell Mol.Life Sci. 55, 1230-1254.

251. Tokunaga M, Kusamichi M, Koike H. (1986). Ultrastructure of outermost layer of cell wall in *Candida albicans* observed by rapid-freezing technique. *J Electron Microsc (Tokyo)*35: 237-246.

252. Tomonori Fujioka, Osamu Mizutani, Kentaro Furukawa, Natsuko Sato, Akira Yoshimi,Youhei Yamagata, Tasuku Nakajima, and Keietsu Abe (2007) MpkA-Dependent and -Independent Cell Wall Integrity Signaling in *Aspergillus nidulans* Eukaryot Cell. August; 6(8): 1497–1510.

253. Tony Hunter and Gregory D. Plowman (1997) The protein kinases of budding yeast: six score and more, Trends in Biochemical SciencesVolume 22, Issue 1, January, Page 18.

254. Truman AW, Kim KY, Levin DE (2009) Mechanism of Mpk1 mitogen-activated protein kinase binding to the Swi4 transcription factor and its regulation by a novel caffeine-induced phosphorylation. Mol Cell Biol.Dec;29(24):6449-61. Epub Oct 5.

255. USPTO Application #: 20060141473 Title: Erk7 and erk8, novel diagnostic markers for cancer.

256. Valent B, Farrall L, Chumley FG (1991) *Magnaporthe grisea* genes for pathogenicity and virulence identified through a series of backcrosses. Genetics127: 87-101.

257. Van Loon, L.C., Rep, M., and Pieterse, C.M.J. (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annu Rev Phytopathol 44: 135–162.

258. Vander, P., Varum, K.M., Domard, A., Eddine El Gueddari, N., and Moerschbacher, B.M. (1998) Comparison of theability of partially *N*-acetylated chitosans and chitooligosaccharidesto elicit resistance reactions in wheat leaves. Plant Physiol 118: 1353–1359.

259. Verna J, Lodder A, Lee K, Vagts A, Ballester R. (1997) A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in Saccharomyces cerevisiae. Proc Natl Acad Sci U S A. Dec 9;94(25):13804-9.

260. Vignesh Muthuvijayan and Mark R. Marten (2004) *In silico* reconstruction of nutrient-sensing signal transduction pathways in *Aspergillus nidulansIn Silico* Biology 4, 0050 (2004); Bioinformation Systems e.V.

261. Vincent M. Bruno, Sergey Kalachikov, Ryan Subaran, Clarissa J. Nobile, Christos Kyratsous, Aaron P. Mitchell (2006) Control of the C. albicans Cell Wall Damage Response by Transcriptional Regulator Cas5, PLoS Pathogens March Volume 2 Issue 3 | e21.

262. Vito Valiante, Radhika Jain, Thorsten Heinekamp et Axel A. Brakhage (2009) The MpkA MAP kinase module regulates cell wall integrity signaling and pyomelanin formation in *Aspergillus fumigatus*. Fungal Genetics and Biology Volume 46, Issue 12, December, Pages 909-918.

263. Walker LA, Munro CA, de Bruijn I, Lenardon MD, McKinnon A, Gow NA (2008) Stimulation of chitin synthesis rescues Candida albicans from echinocandins. Plos Pathogens 4: e1000040.

264. Watanabe, Y., K. Irie, and K. Matsumoto. (1995) Yeast *RLM1* encodes a serum response factorlike protein that may function downstream of the Mpk1 (Slt2) mitogen-activated protein kinase pathway. Mol. Cell. Biol. 15:5740–5749.

265. Westfall Pj., Thorner J. (2006) Analysis of Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Specificity in Response to Hyperosmotic Stress: Use of an Analog-Sensitive *HOG1* Allele, Eukaryotic Cell, 5(8), 1215–1228.

266. Whitmarsh, A. J. & R. J. Davis (1998) Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals Trends Biochem. Sci 23 :481-485.

267. Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Tournier, C., Yasuda, J., and Davis, R. J. (1998) A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. Science 281, 1671-1674.

268. Woloshuk CP, Sisler HD, Vigil EL (1983). Action of the antipenetrant, tricyclazole, on appressoria of Pyricularia oryzae. Physiol Plant Pathol. 22: 245-259.

269. Xiao-Lian Yuan,; Kaaij, Rachel M. Van der; Hondel Cees A.M.J.J. van den; Punt, Peter J.; Maarel, Marc J.E.C van der; Dijkhuizen, Lubbert; Ram, Arthur F.J. (2008) Aspergillus niger genome – wide analysis reveals a large number of novel alpha – glucan acting enzymes with unexpected expression profiles. Mol. Genet. Genomics. June; 279 (6): 545 – 561.

270. Xinhua Zhao, Rahim Mehrabi, and Jin-Rong Xu (2007) Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways and Fungal Pathogenesis Eukaryotic Cell, October, p. 1701-1714, Vol. 6, No. 10.

271. Xinhua Zhao, Yangseon Kim, Gyungsoon Park and Jin-Rong Xu (2005)A Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade Regulating Infection-Related Morphogenesis in *Magnaporthe grisea* The Pl*a*nt Cell 17:1317-1329.
272. Yablonski, D., I. Marbach (1996) Dimerization of Ste5, a mitogen-activated protein kinase cascade scaffold protein, is required for signal transduction Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 : 13864-13869.

273. Yin QY, de Groot PWJ, Dekker HL (2005). Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: identification of proteins covalently attached via glycosylphosphatidylinositol remnants or mild alkali-sensitive linkages. J Biol Chem280: 20894-20901.

274. Yoshito Fukushima, Youji Sakagami and Shingo Marumo (1995) Beta-glucan biosynthesis inhibitors isolated from fungi as hyphal malformation inducer, Bioorganic and medical chemistry letters, Vo1.3. No.6, pp. 1219-1222 1993.

275. Yu, Y. T., R. E. Breitbart, L. B. Smoot, Y. Lee, V. Mahdavi, and B. Nadal-Ginard (1992) Human myocyte-specific enhancer factor 2 comprises a group of tissue-restricted MADS box transcription factors. Genes Dev. 6:1783–1798.

276. Yuan Q, Quackenbush J, Sultana R, Pertea M, Salzberg SL, Buell CR (2001) Rice bioinformatics analysis of rice sequence data and leveraging the data to other plant species. Plant Physiol125: 1166-1174.

277. Yuen Ho, Michael Constanzo, Lynda Moore, Ryuji Kobayashi et Brenda J. Anrews (1999) Regulation of Transcription at the *Saccharomyces cerevisiae* Start Transition by Stb1, a Swi6-Binding Protein. Molecular and Cellular Biology. Aug., p. 5267–5278 Vol. 19, No. 8.

278. Zachary James Cartwright (2005) Investigating the role of the Mps1 MAP kinase pathway in pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*, Thèse, University of Exeter, England octobre.

279. Zanke, B. W., Rubie, E. A., Winnett, E., Chan, J., Randall, S., Parsons, M., Boudreau, K., McInnis, M., Yan, M., Templeton, D. J., and Woodgett, J. R. (1996) Mammalian mitogen-activated protein kinase pathways are regulated through formation of specific kinase-activator complexes. J.BiolChem. 271, 29876-29881.

280. Zarzov, P., Mazzoni, C., and Mann, C. (1996) The SLT2 (MPK1) MAP kinase is activated during periods of polorized cell growth in yeast. EMBO J. 15:83-91.

281. Zeigler RS (1998) Recombination in *Magnaporthe grisea*. Annu Rev Phytopathol36: 249-275.

282. Zhang H, Zhao Q, Liu K, Zhang Z, Wang Y, Zheng X. (2009) MgCRZ1, a transcription factor of Magnaporthe grisea, controls growth, development and is involved in full virulence. FEMS Microbiol Lett. Apr;293(2):160-9. Epub Mar 2.

283. Zhanming Hou, Chaoyang Xue, Youliang Peng, Talma Katan, H. Corby Kistler et Jin-Rong Xu (2002) A Mitogen-Activated Protein Kinase Gene (*MGV1*) in *Fusarium graminearum* Is Required for Female Fertility, Heterokaryon Formation, and Plant Infection. November 2002, Pages 1119-1127 Volume 15 Number11.

284. Zotnik H, Fernandez MP, Bowers B, Cabib E. (1984) *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. J Bacteriol159: 1018-1026.