



**HAL**  
open science

# 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.

## 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 CONTRÔLE DE L'INTEGRITE DE LA PAROI**

---

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

**Mme Breton Christelle**

Professeuse, 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, Institut 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-Joséphée 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

<b>I. INTRODUCTION</b>	1 - 32
1. La paroi cellulaire	3
1.1. Ses rôles	3
1.2. Chez le modèle <i>Saccharomycètes 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 altérant la paroi	25
4.2. Inhibiteurs inhibant la biosynthèse des composants de la paroi	26
5. <i>Magnaporthe grisea</i> , un modèle pour l'étude des cascades de signalisation MAP kinases	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



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



<b>3.15.1.</b>	Préparation et marquage de l'ARNa	46
<b>3.15.2.</b>	Quantification des ARNa marqués	46
<b>3.15.3.</b>	Hybridation et lavage des lames (format 22K)	46
<b>3.15.4.</b>	Lecture des lames	47
<b>3.15.5.</b>	Analyse des résultat	47
<b>3.15.5.1.</b>	« <i>Agilent feature extraction</i> »	47
<b>3.15.5.2.</b>	« <i>GeneData Expressionist Refiner Array</i> »	47
<b>3.15.5.3.</b>	« <i>GeneData Expressionist Analyst</i> »	47
<b>4.</b>	Méthodes de Biologie Cellulaire	47
<b>4.1.</b>	Conditions de culture	47
<b>4.2.</b>	Obtention et transformation des protoplastes	48
<b>4.3.</b>	Sélection secondaire des transformants	48
<b>4.4.</b>	Purification par monospores	48
<b>4.5.</b>	Conservation des mutants sur confettis	48
<b>4.6.</b>	Tests de pouvoir pathogène	49
<b>4.6.1.</b>	Sur plantes entières de riz et d'orge	49
<b>4.6.2.</b>	Sur feuilles d'orge en survie	49
<b>4.7.</b>	Cytologie	49
<b>4.7.1.</b>	Développement d'appressoria sur membrane de Téflon	49
<b>4.7.2.</b>	Infection d'épiderme d'oignon	50
<b>4.7.3.</b>	Observation des hyphes de mycélium	50
<b>4.8.</b>	Tests avec des inhibiteurs	50
<b>4.8.1.</b>	Tests sur milieu gélosé	50
<b>4.8.2.</b>	Tests dans milieu liquide	50
<b>III.</b>	<b>RESULTATS</b>	49 - 97
<b>1.</b>	Etude de la MAP kinase Mps1 chez <i>M. grisea</i>	49
<b>1.1.</b>	Analyse bioinformatique de la MAP kinase, encodée par <i>MgMPS1</i>	49
<b>1.2.</b>	Construction de mutants nuls du gène <i>MgMPS1</i>	49
<b>1.2.1.</b>	Obtention du mutant nul $\Delta mps1$ chez <i>M. grisea</i>	50
<b>1.3.</b>	Croissance, morphologie et sporulation du mutant de gène <i>MgMPS1</i>	50
<b>1.3.1.</b>	Morphologie du mycélium, croissance radiale et sporulation des mutants $\Delta mps1$ de <i>M. grisea</i>	51
<b>1.4.</b>	Altération des parois des mutants $\Delta mps1$	52
<b>1.5.</b>	Sensibilité des mutants $\Delta mps1$ aux inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi	53
<b>1.5.1.</b>	Mise au point de la mesure de la sensibilité du mutant <i>Guy111<math>\Delta</math>KU80<math>\Delta</math>mps1</i> aux inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi	53
<b>1.5.1.1.</b>	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 <i>Guy11ΔKU80Δmps1</i> aux inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi : Milieu gélosé	54
1.5.1.2. 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 <i>Guy11Δku80Δmps1</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. Pouvoir pathogène du mutant <i>Δmps1</i>	59
1.6.1. Pouvoir pathogène des mutants <i>Δmps1</i> pour l'orge	59
1.6.2. Pouvoir pathogène des mutants <i>Δmps1</i> pour le riz	60
1.6.3. Différentiation appressoriale du mutant <i>Δmps1</i>	60
1.7. Conclusion sur la caractérisation du mutant <i>Δmps1</i> de <i>M. grisea</i>	61
1.8. Utilisation de mutants nuls conditionnels pour étudier les fonctions cellulaires contrôlées 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 <i>pNia::Mps1</i> chez le mutant <i>Guy11Δku80Δmps1</i>	63
1.9. Utilisation des mutants avec un allèle de <i>MgMPS1</i> sensible à des inhibiteurs spécifiques	65
1.9.1. Principe de mutants cible-spécifiques	65
1.9.2. Construction et caractérisation d'un allèle de <i>MgMPS1</i> sensible à des inhibiteurs spécifiques	65
2. Etude des facteurs de transcription Swi4, Swi6 et Rlm1 de <i>M. grisea</i>	67
2.1. Recherche des gènes de <i>M. grisea</i> encodant les orthologues des gènes encodant les facteurs de transcription Swi4, Swi6 et Rlm1 de la levure	67
2.1.1. Analyse bioinformatique du facteur de transcription <i>MgSWI4</i>	67
2.1.2. Analyse bioinformatique du facteur de transcription <i>MgSWI6</i>	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. Construction de mutants nuls des gènes <i>MgSWI4</i> , <i>MgSWI6</i> et <i>MgRLM1</i>	69
2.2.1. Obtention des mutants nuls <i>Guy11Δku80Δswi4</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.	Croissance, morphologie et sporulation des mutants des gènes <i>MgSWI4</i> , <i>MgSWI6</i> et <i>MgRLM1</i>	70
2.4.	Altération des parois des mutants des gènes <i>MgSWI4</i> , <i>MgSWI6</i> et <i>MgRLM1</i>	71
2.5.	Sensibilité des mutants nuls des gènes <i>MgSWI4</i> , <i>MgSWI6</i> et <i>MgRLM1</i> aux inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi	72
2.5.1.	Sensibilité des mutants <i>P1.2Δku80Δswi4</i> , <i>Guy11Δku80Δswi6</i> , <i>Guy11Δku80Δrlm1</i> au mélange d'aculéacine et de nikkomycine	72
2.6.	Pouvoir pathogène des mutants nuls <i>MgMps1</i> , <i>MgSWI4</i> , <i>MgSWI6</i> et <i>MgRLM1</i>	73
2.6.1.	Pouvoir pathogène des mutants <i>P1.2ΔkuU80Δswi4</i> , <i>Guy11ΔkuU80Δswi6</i> et <i>Guy11ΔkuU80Δrlm1</i> pour l'orge	73
2.6.2.	Pouvoir pathogène des mutants <i>P1.2ΔkuU80Δswi4</i> , <i>Guy11ΔkuU80Δswi6</i> et <i>Guy11ΔkuU80Δrlm1</i> pour le riz	73
2.6.3.	Différentiation appressoriale des mutants <i>P1.2ΔkuU80Δswi4</i> , <i>Guy11ΔkuU80Δswi6</i> et <i>Guy11ΔkuU80Δrlm1</i>	74
3.	Etude du facteur 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.	Construction de mutants nuls du gène <i>MgCRZ1</i>	76
3.3.	Croissance, morphologie et sporulation du mutant nul <i>Guy11Δku80Δcrz1</i>	76
3.4.	Sensibilité des mutants nuls du gène <i>MgCRZ1</i> aux inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi	76
3.4.1.	Altération de la paroi du mutant <i>Guy11Δku80Δcrz1</i>	76
3.4.2.	Sensibilité du mutant <i>Guy11Δku80Δcrz1</i> au mélange d'aculéacine et de nikkomycine	77
3.5.	Pouvoir pathogène du mutant <i>Δcrz1</i>	77
3.5.1.	Pouvoir pathogène du mutant <i>Guy11Δku80Δcrz1</i> pour l'orge et le riz	77
3.5.2.	Différentiation appressoriale du mutant <i>Δcrz1</i>	78
4.	Etude du gène <i>AGS1</i> dont l'expression est contrôlée par <i>MPS1</i> chez <i>M. grisea</i>	79
4.1.	Etude bioinformatique du gène <i>AGS1</i> de <i>M. grisea</i>	79
4.2.	Construction de mutants nuls du gène <i>MgAGS1</i>	80
4.3.	Croissance, morphologie et sporulation du mutant nul <i>Guy11Δku80Δags1</i>	80
4.4.	Sensibilité 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>Guy11Δku80Δags1</i> à un mélange d'aculéacine et de nikkomycine	81
4.5.	Pouvoir pathogène du mutant <i>Δags1</i>	82



4.6.	Conclusions sur le mutant <i>Δags1</i> 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 <i>Podospora anserina</i>	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 <i>MgIDC1</i> 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 nikkomyicine	86
5.5.	Pouvoir pathogène du mutant <i>Δidc1</i>	86
5.6.	Conclusion sur le mutant <i>Δidc1</i> 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 <i>MgADA2</i> aux inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi	89
6.5.	Pouvoir pathogène du mutant <i>Δada2</i>	90
6.6.	Conclusion sur le mutant <i>Δada2</i>	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 <i>Δknr4</i> chez <i>M. grisea</i>	92
8.	Analyse des réseaux de régulation transcriptionnelle contrôlés par <i>MgMPS1</i>	93
8.1.	Analyse de l'expression des gènes encodant les facteurs de transcriptions de la voie de MAP kinase, Mps1	93
8.1.1.	Expression des gènes de la voie Mps1 au cours du développement ou de stress 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 transcriptionnelle de <i>M. grisea</i> en réponse à l'aculéacine	95
IV.	DISCUSSION	98 - 113



1. Analyse bioinformatique de la voie MAP kinase Slt2/Mps1 chez les champignons ascomycètes et héli-ascomycètes	98
2. Construction des mutants de délétion des gènes candidats de la voie de signalisation Mps1 chez <i>M. grisea</i>	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</i> , <i>SWI6</i> et <i>RLM1</i>	104
3.2.2. Phénotypes des mutants nuls des modulateurs <i>AGS1</i> , <i>IDC1</i> , <i>ADA2</i> 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
<b>V. CONCLUSION</b>	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
<b>VI. PERSPECTIVES</b>	118
<b>VII. ANNEXES</b>	



## ABBREVIATIONS

AA :	Acide aminé
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPc :	Adénosine MonoPhosphate cyclique
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
BET :	Bromure d'Ethidium
CDD :	Conserved Domains Database
DI :	Dose Inhibitrice
dNTP :	Désoxy Nucléotide TriPhosphate
ERKs :	Extracellular Signal Regulated Kinases
GABA :	Acide $\gamma$ -amino-n-butérique
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 Kinase 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

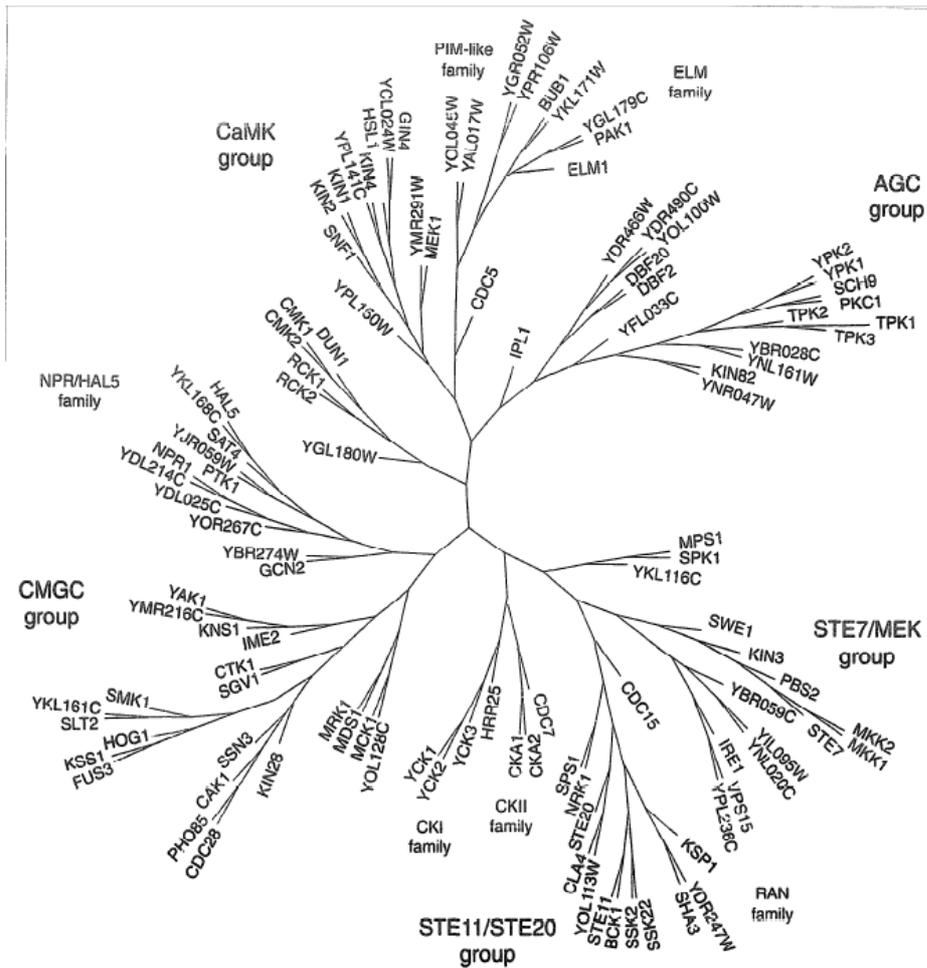


Figure 1 : Dendrogramme de la superfamille des kinases chez la levure

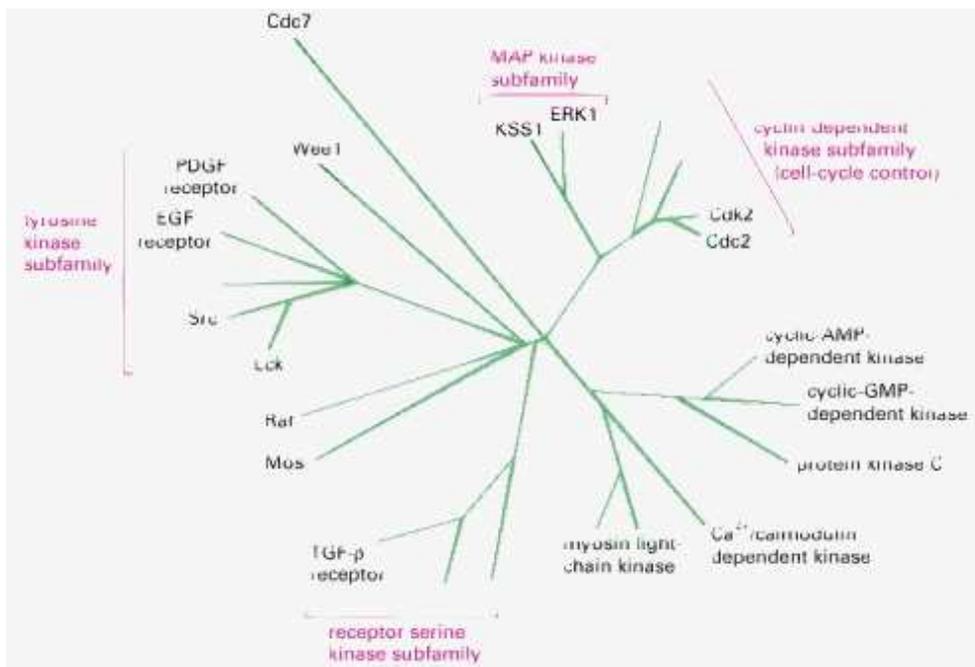


Figure 2 : Arbres de l'évolution des protéines kinases

## 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 différenciation.

(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 hétérotrimériques) 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 peptidoglycane, 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			
<b>Plante</b>	Cellulose	glycoprotéines	Glucomannanes, Xyloglucanes	Lignine, Cutine
<b>Bactérie</b>	Acides téchoïques	peptidoglycane	Phospholipides, Lipopolysaccharides	
<b>Algue</b>	Silicium	Alginique acidifiant	Xylanes, Mannanes	Polysaccharides sulfonés
<b>Champignon</b>	Chitine	$\beta$ -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 élevée 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 flocculer, 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 peuvent, 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 semblent être spécifiquement impliquées dans la réparation de 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.

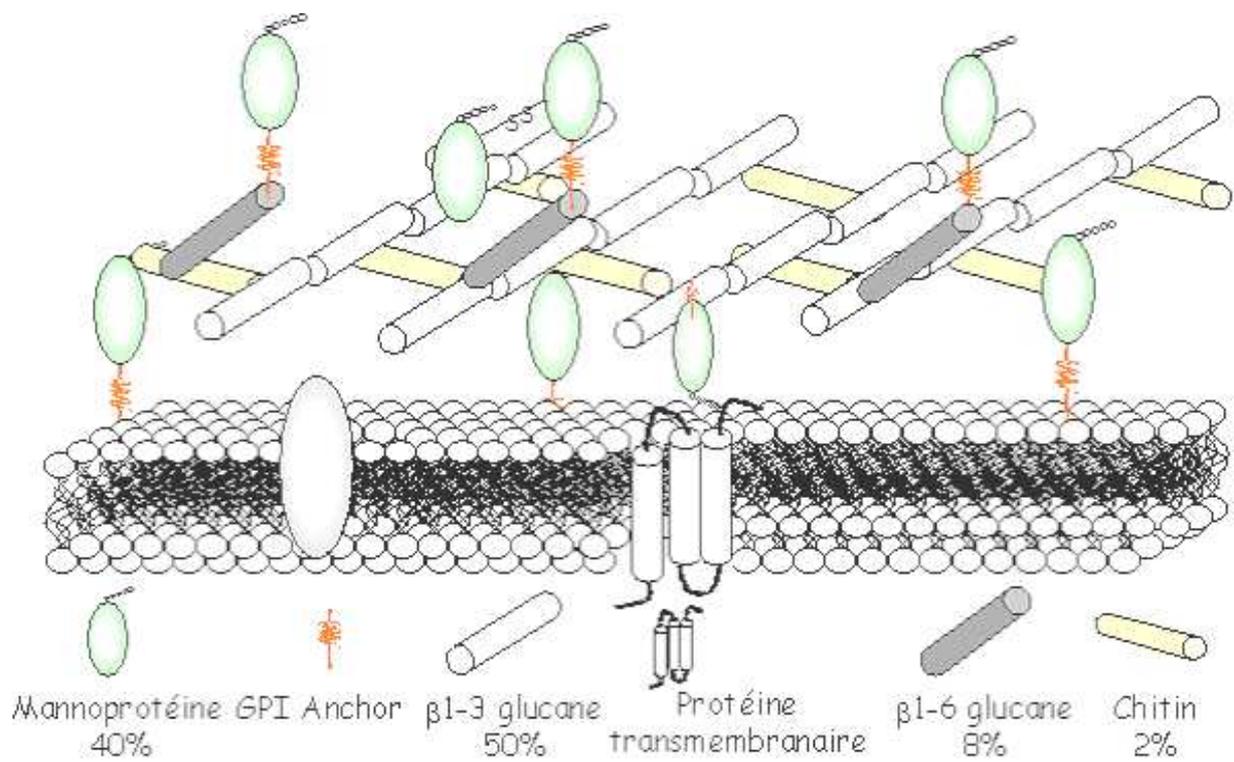


Figure 3 : Représentation schématique de la structure moléculaire de la paroi cellulaire chez *S. cerevisiae* (Basmaji, 2005)

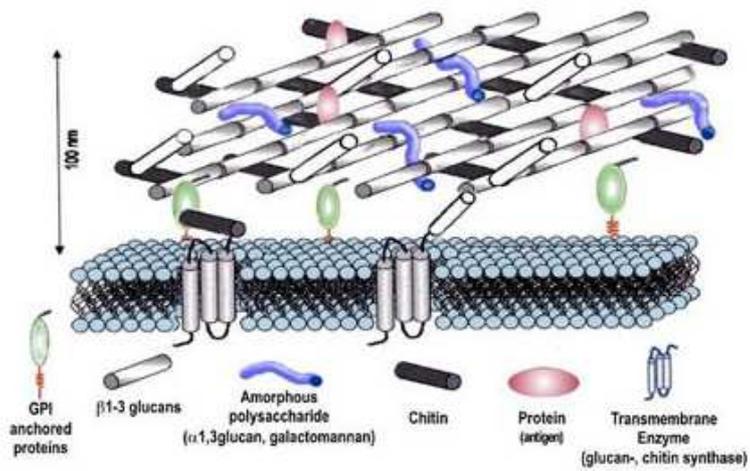


Figure 4: la paroi cellulaire d'*A. fumigatus* (Latgé, et al. 2003)

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

### 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  $\beta$ -1,3-D-glucane et de  $\beta$ -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	$\beta$ -1,3-glucane	$\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -glucanes et les mannanes, 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 mannanes 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 O 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

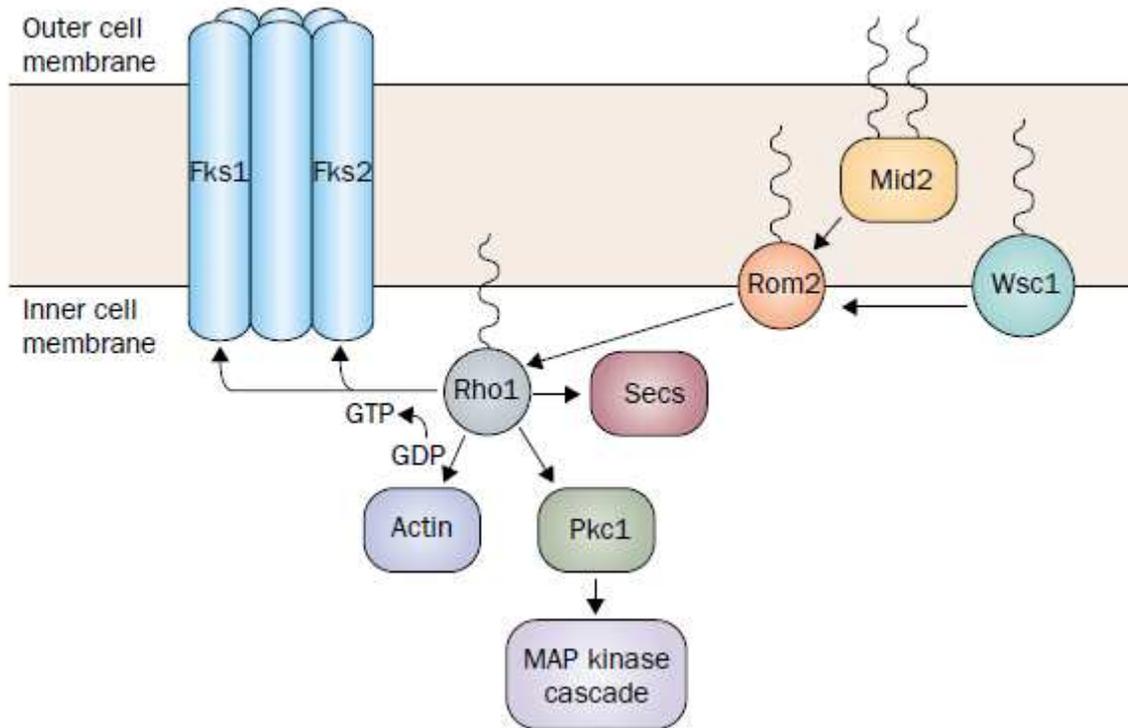


Figure 5 : Schéma représentatif de la membrane cellulaire chez les champignons. Les protéines du complexe  $\beta$ -1,3-D-glucane synthase (Fks1 and Fks2) sont montrées avec les protéines impliquées dans l'activation de ces gènes

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 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  $\beta$ -1,3 (65 – 90%) bien qu'il existe aussi des liaisons  $\beta$ -1,6 (chez *Candida* mais pas chez *Aspergillus*),  $\beta$ -1,4,  $\alpha$ -1,3 et  $\alpha$ -1,4. Le  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -1,3. Dans ces chaînes, chaque 40-50 résidu de glucose sont liés de nouvelles unités de glucose par des liaisons  $\beta$ -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  $\beta$ -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 *FKS2* 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  $\beta$ -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).

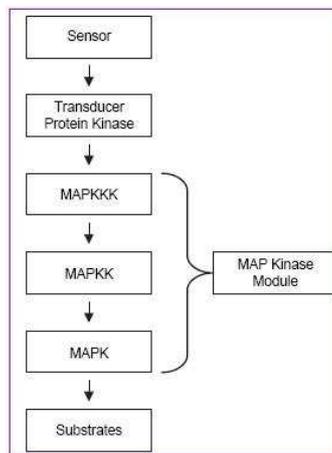


Figure 6: La cascade de signalisation MAPK

## 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 MAP-kinase-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 devienne 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).

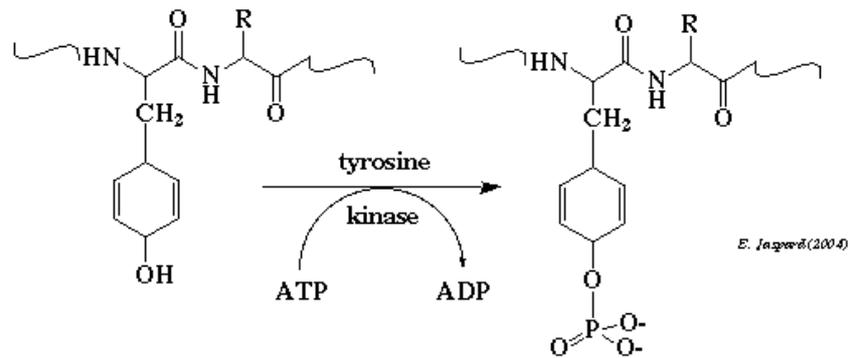


Figure 7 : Exemple d'une réaction de phosphorylation

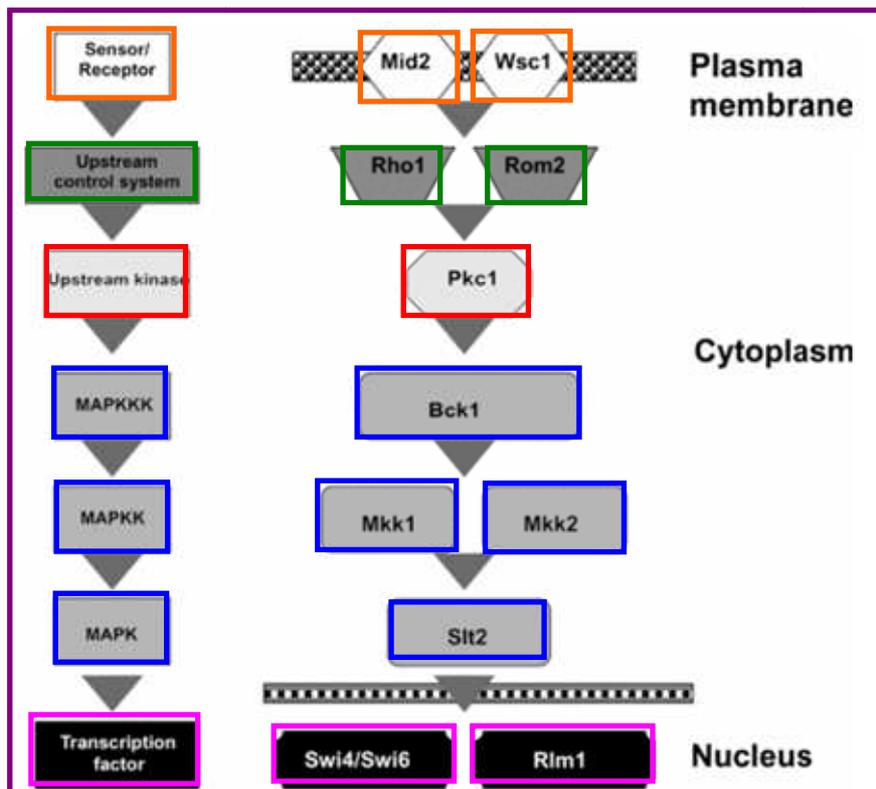


Figure 8: Schéma général de la cascade de signalisation avec l'exemple de la cascade SLT2

### 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

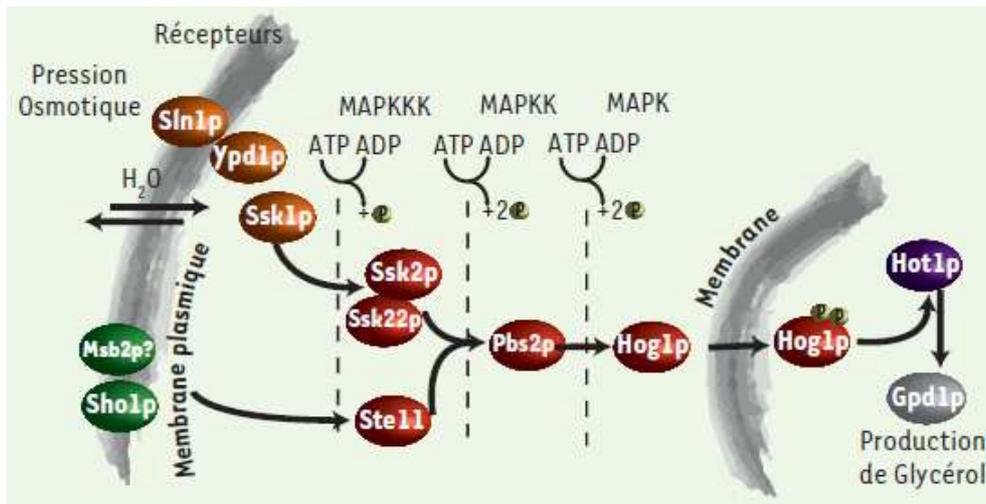


Figure 9: Représentation de la cascade de signalisation HOG chez *Saccharomyces cerevisiae*. Deux sous cascades distinctes (initiées par les protéines Sho1 et Sln1) permettent d'activer successivement les MAPKKK, les MAPKK et finalement Hog1, la MAP Kinase qui est transférée dans le noyau, par Gsp1,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

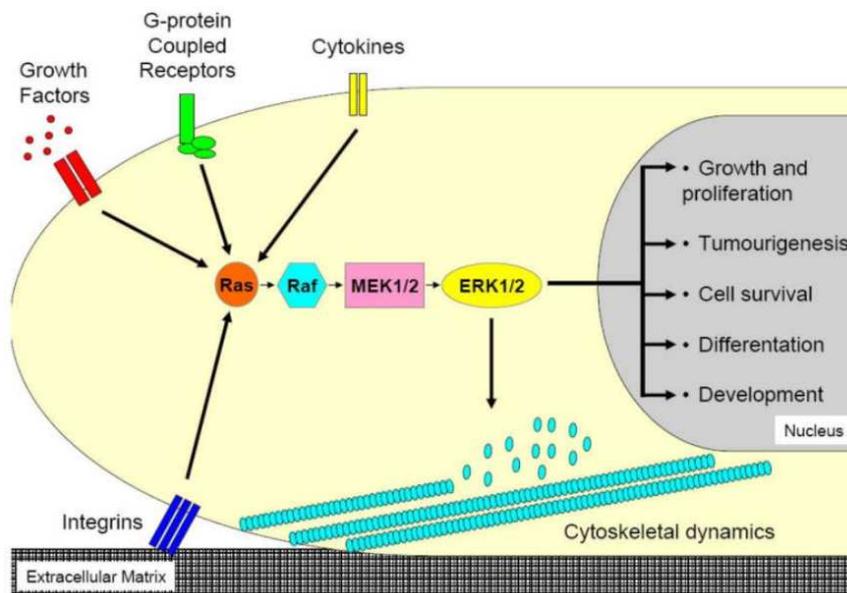


Figure 10: Les divers signaux extracellulaires stimulent la cascade de Ras/Raf/MEK/ERK chez les mammifères et chacune peut obtenir des résultats cellulaires distincts

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 spatio-temporelle 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

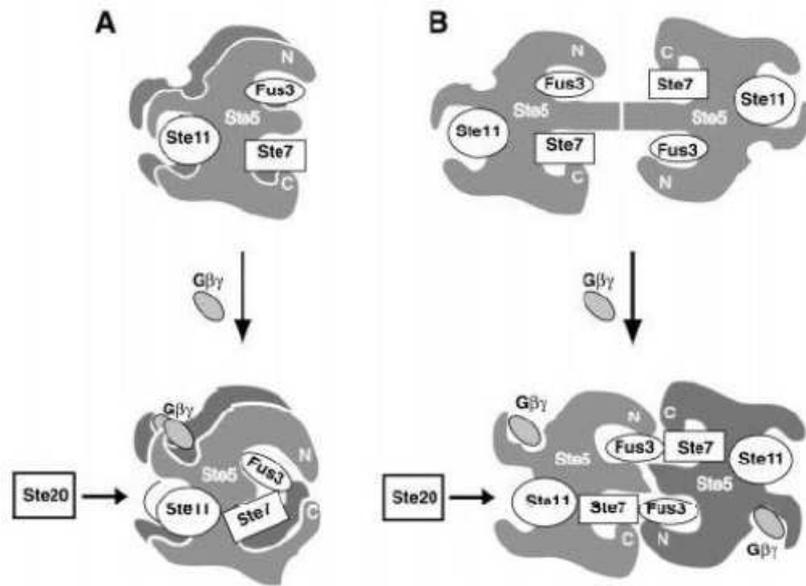


Figure 11: Les protéines d'échafaudages. A : sous sa forme monomérique, Ste5 lie Ste11, Ste7 et Fus3, lors de la liaison à la protéine G, Ste11 est accessible à la kinase Ste20, et la transmission du signal est favorisée par le rapprochement stérique de Ste7 et Fus3. B : modèle basé sur la formation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

protéines d'échafaudages spécifiques permettent la mise en place d'un complexe multi-protéique 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 dimériser (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 différenciation. A nos jours, chez les mammifères, ont été décrits cinq modules MAP kinases qui partagent des composantes structurellement 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  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , et  $\delta$ , 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

Schéma

Exemple

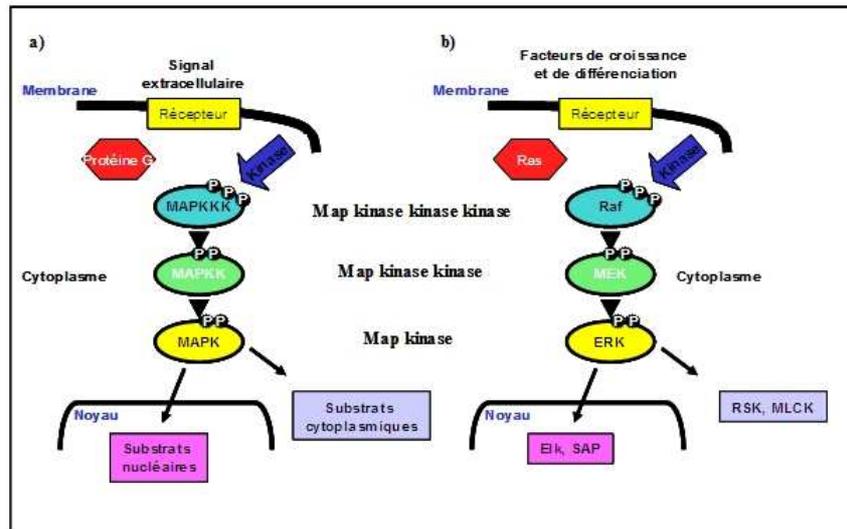


Figure 12: Les composantes kinases de base de la voie ERK/MAP kinase. a). Schéma général d'une signalisation MAP kinase. b). la voie ERK/MAPK.

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 différenciation 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 différenciation 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).

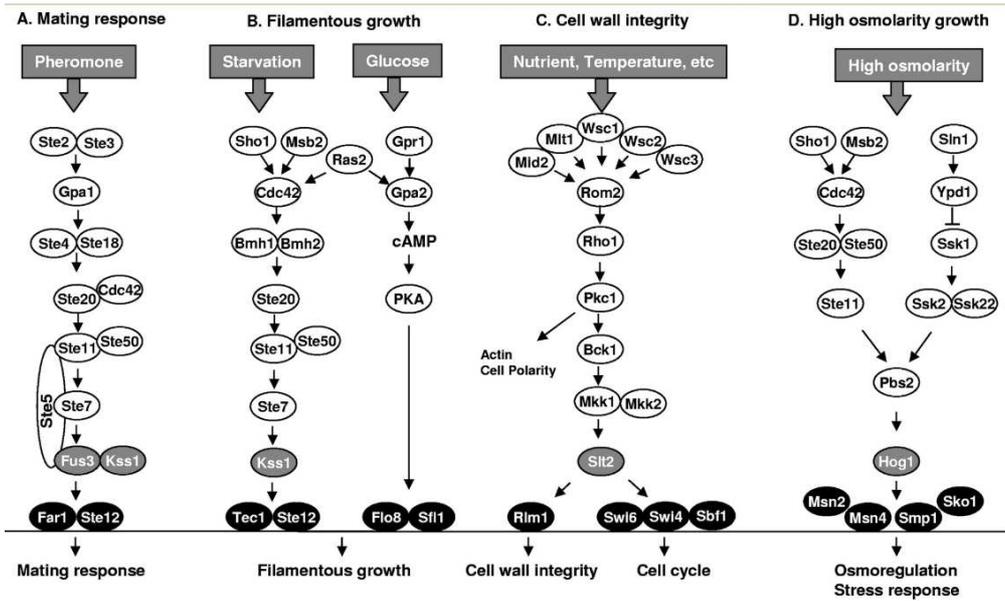


Figure 13 : Représentation schématique des voies de signalisation MAPK chez *S. cerevisiae* (Popolo L., et al. 2001)

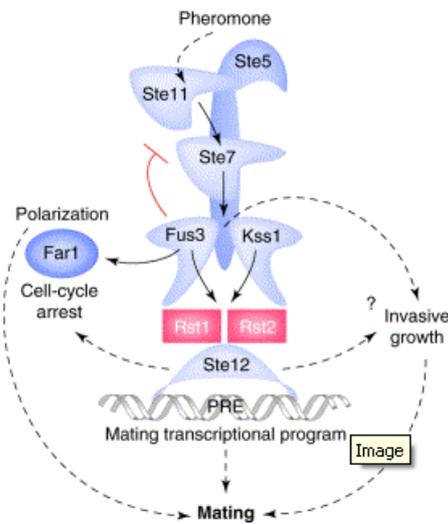


Figure 14: La voie MAP kinase activée par phéromone (Ashton Breitkreutz et Mike Tyers, 2002). Les composants ascendants de la voie activent la kinase Ste11, qui active la kinase Ste7, qui active alternativement le MAPKs Fus3 et Kss1. La protéine d'échafaudage Ste5 lie le module de MAPK aux activateurs ascendants dans la membrane. Une fois qu'activées, la MAPK active les cibles transcriptionnelles, 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'arrêt 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 à son tour active les MAP kinases Kss1 et Fus3, toutes les deux participent à la réponse de phéromone, avec Fus3 jouant le rôle principal (Sabbagh, *et al.* 2001). En outre, Kss1 (Figure 14) régule l'aspect invasif filamentueux (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 à 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

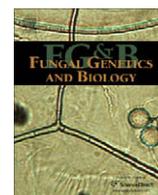
Les études réalisées au sein du groupe SIGNALPATH nous ont aidés à souligner les ressemblances et les différences des cascades de signalisation MAP kinase chez différents champignons filamenteux, comparés à celles de *S. cerevisiae*. En utilisant les bases de données disponibles des génomes, la conservation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





Contents lists available at ScienceDirect

## Fungal Genetics and Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yfgbi](http://www.elsevier.com/locate/yfgbi)

## Review

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

Nicolas Rispaïl<sup>a</sup>, Darren M. Soanes<sup>b</sup>, Cemile Ant<sup>c</sup>, Robert Czajkowski<sup>d</sup>, Anke Grünler<sup>e</sup>, Romain Huguet<sup>b</sup>, Elena Perez-Nadales<sup>a</sup>, Anna Poli<sup>f</sup>, Elodie Sartorel<sup>g</sup>, Vito Valiante<sup>h</sup>, Meng Yang<sup>i</sup>, Roland Beffa<sup>c</sup>, Axel A. Brakhage<sup>h</sup>, Neil A.R. Gow<sup>i</sup>, Regine Kahmann<sup>d</sup>, Marc-Henri Lebrun<sup>c</sup>, Helena Lenasi<sup>f</sup>, José Perez-Martin<sup>g</sup>, Nicholas J. Talbot<sup>b</sup>, Jürgen Wendland<sup>e</sup>, Antonio Di Pietro<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Genética, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba, Spain<sup>b</sup> School of Biosciences, Geoffrey Pope Building, University of Exeter, Exeter EX4 4QD, United Kingdom<sup>c</sup> UMR2847 Centre National de la Recherche Scientifique/Bayer CropScience, 14 Rue Pierre Baizet, 69263 Lyon Cedex 09, France<sup>d</sup> Max-Planck-Institute for Terrestrial Microbiology, Department of Organismic Interactions, Karl-von-Frisch-Strasse, D-35043 Marburg, Germany<sup>e</sup> Carlsberg Laboratory, Yeast Biology, Gamle Carlsberg Vej 10, DK-2500 Valby, Copenhagen, Denmark<sup>f</sup> Institute of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Vrazov trg 2, Ljubljana, Slovenia<sup>g</sup> Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, 28049 Madrid, Spain<sup>h</sup> Department of Molecular and Applied Microbiology, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology – Hans Knöll Institute (HKI), 07745 Jena, Germany<sup>i</sup> 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 (MAPKKK), 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 Ca<sup>2+</sup>-binding protein calmodulin and the calmodulin-dependent serine–threonine phosphatase, calcineurin (Chin and Means, 2000).

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

\* Corresponding author. Fax: +34 957212072.

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



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

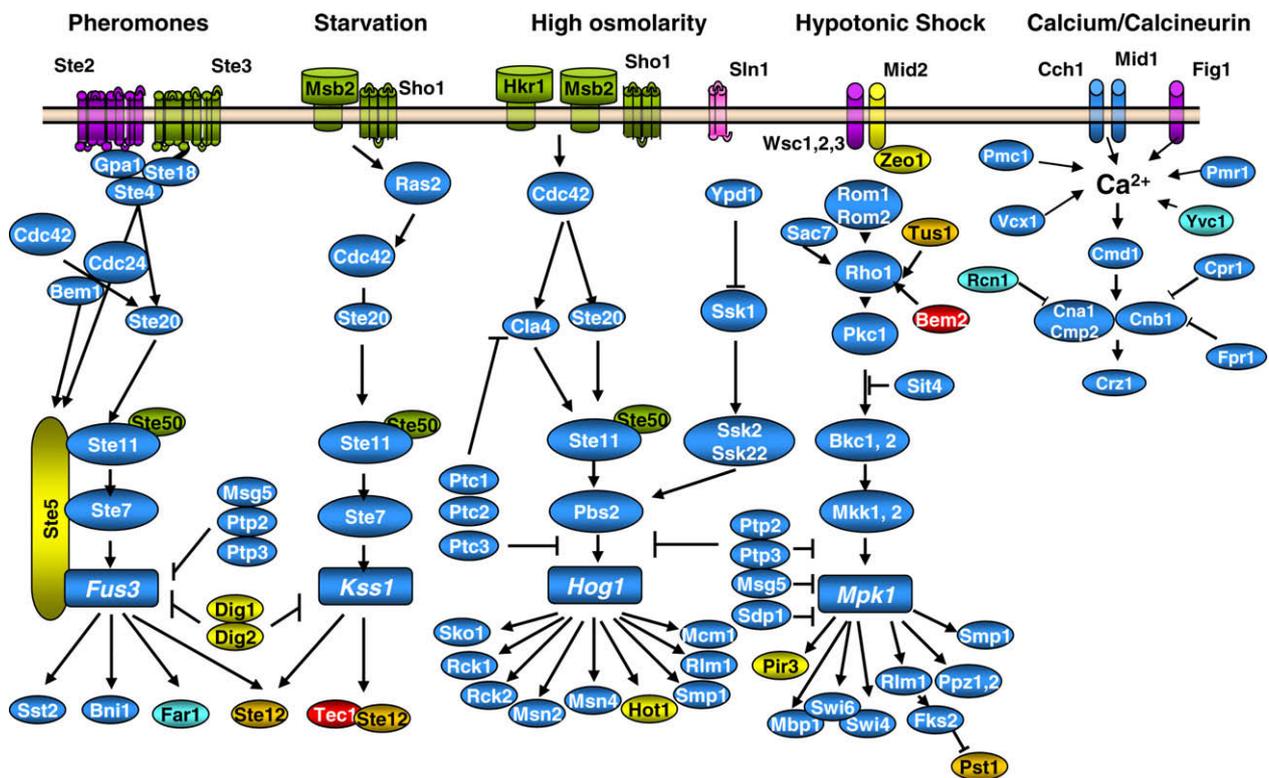
The Fus3 MAPK cascade mating pathway in *S. cerevisiae* has been characterized in detail (Elion, 2000; Gustin et al., 1998; Kurjan, 1993; Wang and Dohlman, 2004). Signalling is initiated when pheromone binds to the cognate cell surface receptors Ste2 or Ste3. Orthologues of Ste2 and Ste3 were identified 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  $\alpha$  pheromones. Analysis in *C. neoformans* provided similar results, suggesting that the duplication of Ste3-like 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  $\alpha$  subunit Gpa1 from the G protein  $\beta\gamma$  subunits Ste4 and Ste18. Fungal G $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\beta$  subunits, RO3G\_06062 and RO3G\_08023, the pre-





**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; 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







Ptc1	Protein phosphatase 2C homolog 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ptc2/3 <sup>a</sup>	Protein phosphatase 2C homolog 2	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1
<i>Mpk1</i> MAPK pathway											
Wsc1	Plasma membrane sensor	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
Wsc2/3 <sup>a</sup>	Plasma membrane sensor	2	1	1	1	1	1	1	1	0	0
Mid2/ Mtl1 <sup>a</sup>	Plasma membrane sensor	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0
Zeo1	Peripheral membrane protein	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Rom1/2 <sup>a</sup>	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 <sup>a</sup>	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/ Mbp1 <sup>a</sup>	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
Smp1/ Rlm1 <sup>a</sup>	MADS-box transcription factor	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1
Fks2	Catalytic subunit of $\beta$ -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 <sup>a</sup>	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/ Sdp1 <sup>a</sup>	MAPK phosphatase	2	1	1	1	1	1	0	1	2	2
Ptp2/3 <sup>a</sup>	Tyrosine-protein phosphatase 3	2	2	2	2	1	1	1	1	2	1
<i>Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-calcineurin pathway</i>											
Cch1	Probable calcium-channel protein	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
Mid1	Putative stretch-activated Ca <sup>2+</sup> channel component	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fig1	Integral membrane protein required for efficient1 mating	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
Cmd1	Calmodulin	1	1	1	2	1	1	1	1	4	1
Cna1/ Cmp2 <sup>a</sup>	Calcineurin subunit A	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1
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	Peptidyl-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
Crz1	Transcriptional regulator	1	1	1	2	1	1	1	1	2	1

<sup>a</sup> 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, signalling 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 shmoo (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. maydis* 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<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 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 Ste-like 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 C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub>-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. oryzae*. 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.

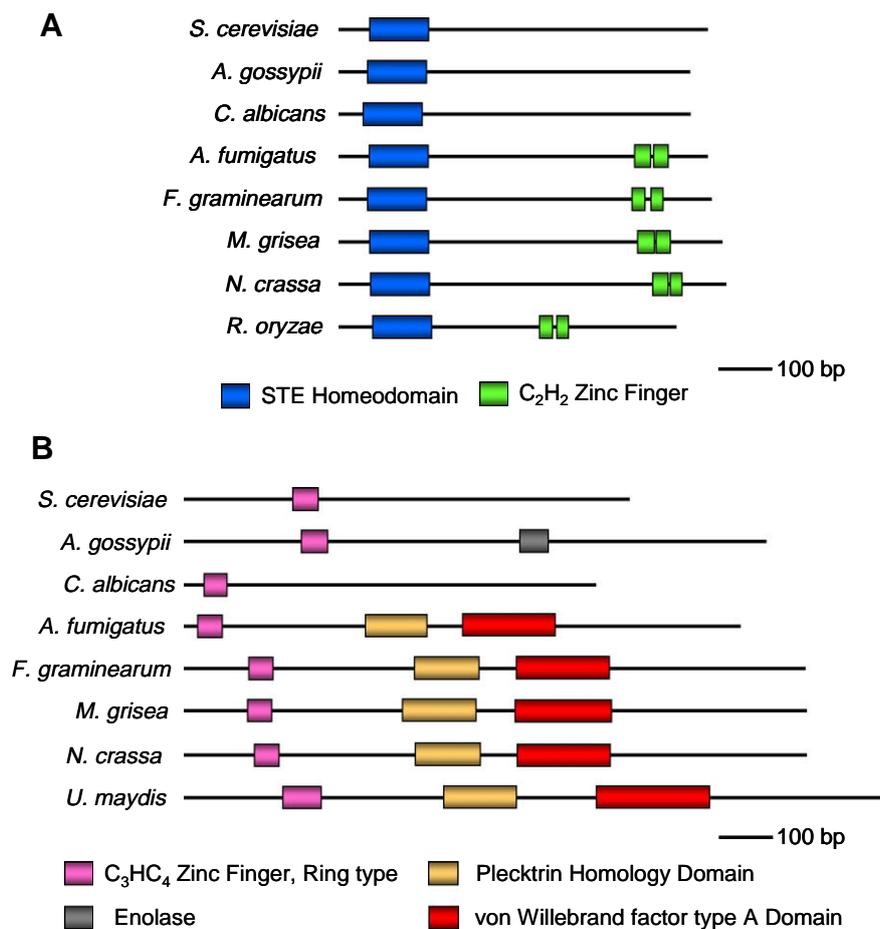
Sst2 is a GTPase-activating regulator of G protein signalling (RGS) for Gpa1, which regulates pheromone desensitization and prevents receptor-independent signalling of the mating pathway (Dohman et al., 1996). Orthologues of Sst2 were identified in all species examined, including two orthologues in *R. 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 N-terminal 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 cytoplasmic 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.





**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 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc finger domain in the C-terminal region. (B) Far1 orthologues all contain a C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> ring type zinc finger domain in the N-terminal region. In addition, filamentous ascomycetes 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 MAPKKs 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 (Cattlett 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 MAPKKs 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 MAPK-dependent 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 O-glycosylated 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<sup>+</sup> 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 dual-specificity 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 Ca<sup>2+</sup>-binding protein calmodulin and the Ca<sup>2+</sup>-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<sup>2+</sup> 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 Ca<sup>2+</sup>-binding protein encoded by *CMD1*, which has both Ca<sup>2+</sup>-dependent and independent targets. One of the major Ca<sup>2+</sup>-dependent targets is calcineurin, a Ca<sup>2+</sup> 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 Ca<sup>2+</sup>, 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-*



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-García, F., Molero, G., Díez-Orejías, 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 two-component 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 Gouveia, 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., Voegli, 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.
- Díez-Orejías, R., Molero, G., Navarro-García, F., Pla, J., Nombela, C., Sanchez-Perez, M., 1997. Reduced virulence of *Candida albicans* MKC1 mutants: a role for mitogen-activated protein kinase in pathogenesis. *Infect. Immun.* 65, 833–837.
- Dixon, K.P., Xu, J.R., Smirnov, N., Talbot, N.J., 1999. Independent signaling pathways regulate cellular turgor during hyperosmotic stress and appressorium-mediated 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., Neuvéglise, 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., Confanioli, F., De Daruvar, A., Despons, L., Fabre, E., Fairhead, C., Ferry-Dumazet, H., Groppi, A., Hantraye, F., Hennequin, C., Jaumiaux, N., Joyet, P., Kachouri, R., Kerrest, A., Koszul, R., Lemaire, M., Lesur, I., Ma, L., Müller, 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.,



- 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* Slr2 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 acid-independent 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 head-blight 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, blights, 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 SH3-domain 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., Poci, 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 Ca<sup>2+</sup> 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 stress-activated 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 pathway-dependent genes. *J. Biol. Chem.* 275, 8290–8300.



- 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.
- Schimke, 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, I.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., Schroppe, 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, CrzaA. *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 mitogen-activated 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 mitogen-activated 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<sup>+</sup> 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.

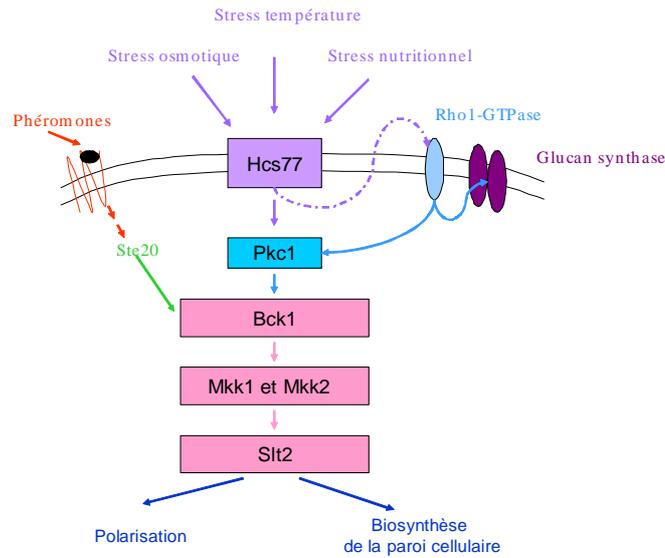


Figure 15 : La voie de PKC régule l'intégrité cellulaire. La cascade de PKC MAPK est activée en réponse à la chaleur et au stress osmotique et au manque d'éléments nutritifs. Hcs77 est un mechano-senseur putatif. Pkc1 semble activer une branche de la cascade (une branche est le MAPK et l'autre est hypothétique).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

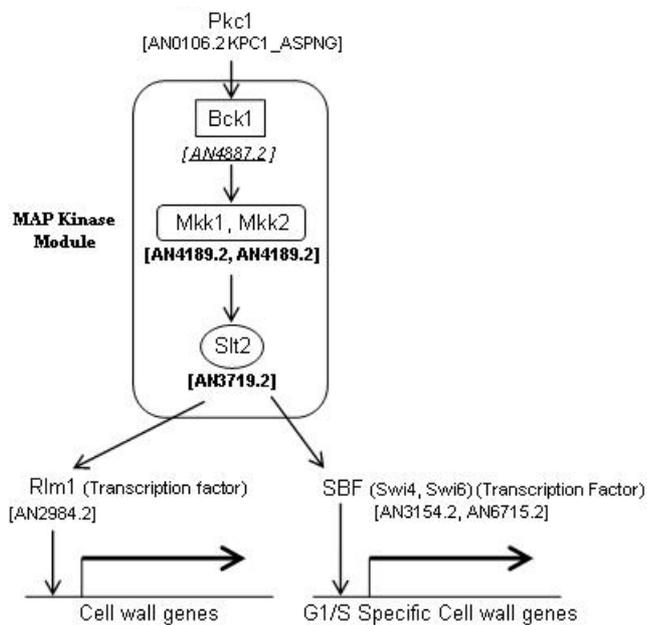


Figure 16: La cascade de signalisation de l'intégrité de la paroi, Sit2, chez *S. cerevisiae*, ainsi que les cibles déterminées de Mapk Sit2 (VigneshMuthuvijayan et Mark R. Marten, 2004)

### 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  $\Delta hcs77$  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  $\Delta hcs77$  sont morts une fois exposés aux rayons  $\alpha$  (J.V.Gray, données non publiées), qui a été noté pour les mutants  $\Delta mpk1$  (Levin, D. E., *et al.* 1995). La délétion de *HCS77* est létale en combinaison avec la délétion de *SWI4*, 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 polymérase (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 polymérase 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 Swi6 qui 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 transcriptionnelle, en présence de stress de paroi cellulaire pendant lequel la Mpk1 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 transcriptionnelle 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 transcriptionnelle 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 transcriptionnelle. 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 Swi4 est le composant de SBF qui se lie spécifiquement à SCB par un domaine N-terminal hélix-turn-hélix 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 SWI4 par 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 « *MluI* 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 » (Breedon, L. 1996).

Il est connu que la surexpression de *Swi4*, chez le mutant nul  $\Delta$ mpk1, ne rétablit pas la déformation de la lyse cellulaire (Madden K. Y., *et al.* 1997). Ainsi, les mutants nuls de  $\Delta$ swi4 et de  $\Delta$ 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 (Iguar, 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)

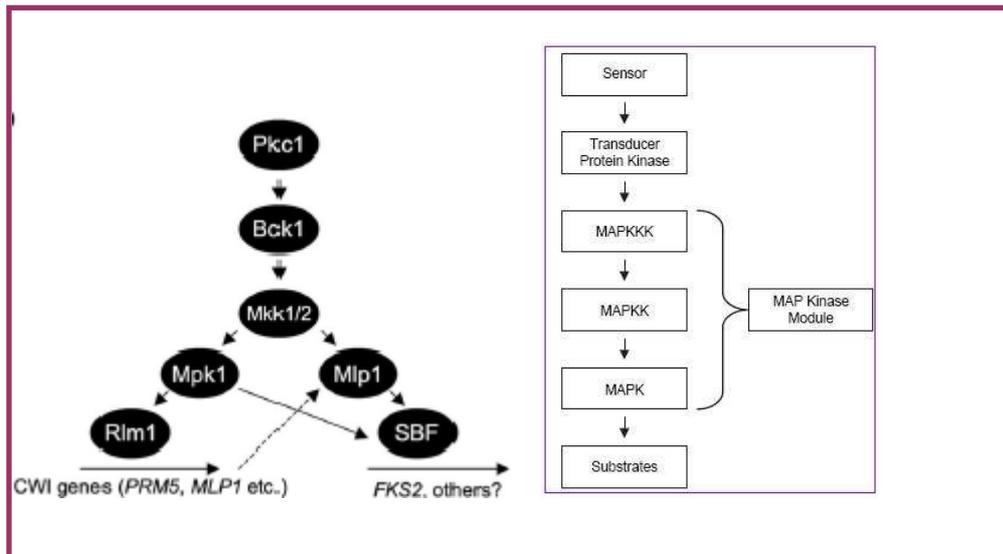


Figure 19: Modèle pour l'activation de la voie de l'intégrité cellulaire

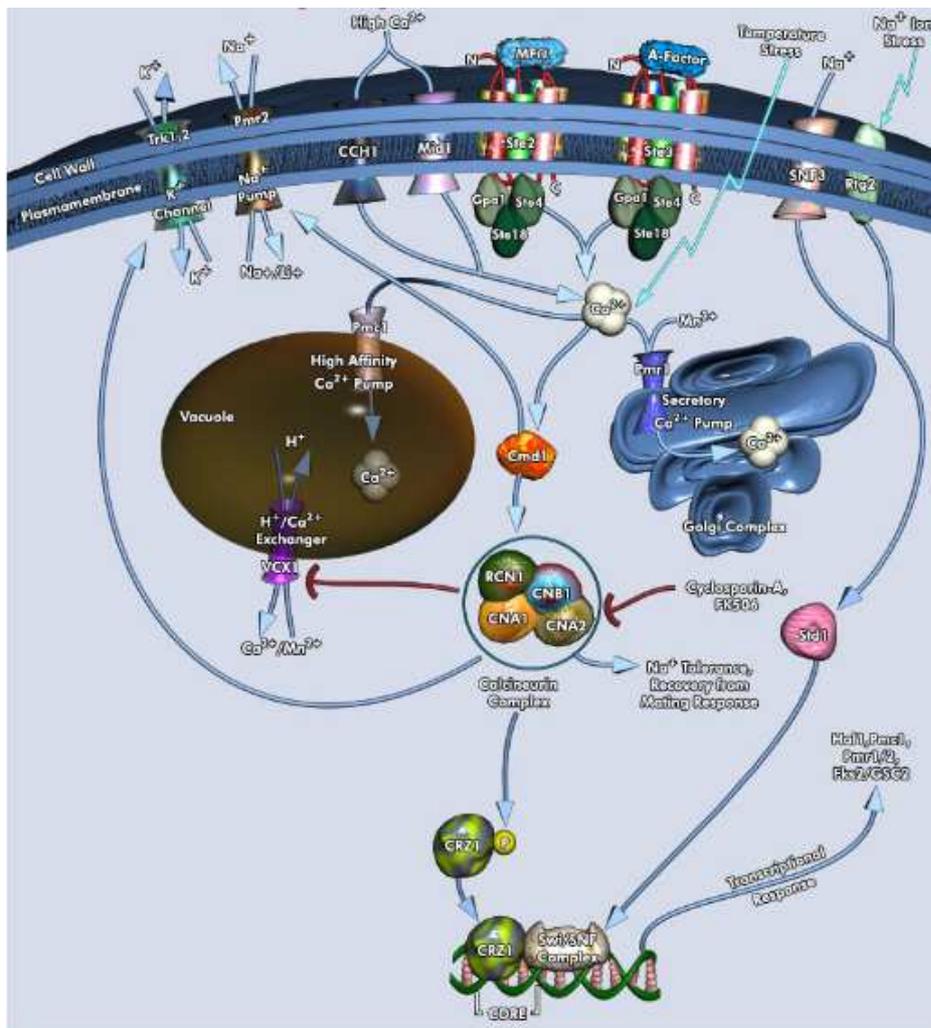


Figure 20: Voie de « Calcium – Calcineurine(Qiagen) » chez *S. cerevisiae*

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 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  $\Delta$ rlm1 ne montrent pas une osmosensibilité accrue, une hypersensibilité nutritive, ni les phénotypes des mutants de délétion des gènes de la voie Mpk1, le phénotype du mutant  $\Delta$ mpk1 peut être partiellement supprimé par l'expression d'une protéine de fusion à laquelle Rlm1 est lié sur le domaine transcriptionnelle 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 dimériser 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-

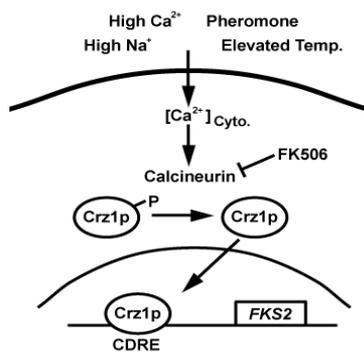


Figure 21: La voie de Calcineurine/Crz1, montrant la phosphorylation directe de CRZ1 par la Calcineurine. L'inhibiteur FK506, est un inhibiteur connu de la Calcineurine.

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  $Ca^{2+}$  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  $Ca^{2+}$ , responsables de l'homéostasie de  $Ca^{2+}$  chez la levure (Maeta K, Izawa S, Inoue Y. 2004). Il maintient l'équilibre cytoplasmique de  $Ca^{2+}$ . 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  $Ca^{2+}$ , le Pmc1 (Putative Vacuolar  $Ca^{2+}$ -ATPase) et le Pmr1 (High affinity  $Ca^{2+}/Mn^{2+}$  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 rôle 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  $H^{+}/Ca^{2+}$  Exchanger) par des mécanismes post-transcriptionnelles. La transcription dépendante de  $Ca^{2+}$  est bloquée par les inhibiteurs immunosuppresseurs 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

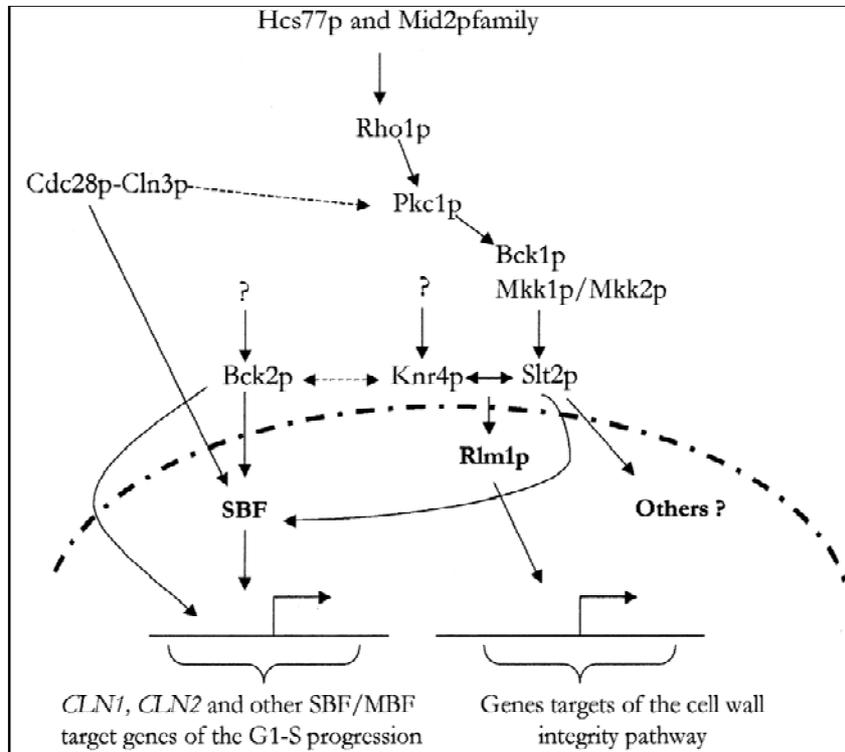


Figure 22 : Modèle pour le rôle de KNR4 en coordination avec l'intégrité cellulaires et de la croissance polarisée par la voie de signalisation PKC1-SLT2. Les flèches à tiret indiquent l'action hypothétique d'un composant à l'autre. Les lignes tirées avec les doubles pointes de flèche indiquent l'interaction 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 remodelisation 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 cytotocidal 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 transcriptionnelle 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).

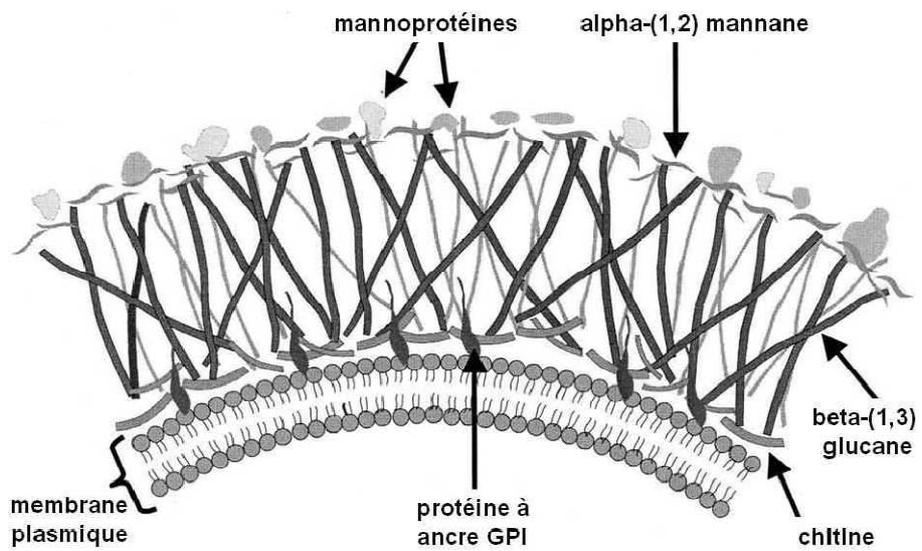


Figure 23 : Schéma simplifié de la paroi d'un champignon filamenteux.

#### 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  $\beta$ -(1,3) glucane ou l' $\alpha$ -(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  $\beta$ -(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  $\alpha$ -(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 saccharomycèteaceae (Barthai-Garcia, 1968).



Des colorants comme le colorant rouge congo fluorescent ou le calcofluor blanc sont des inhibiteurs de la paroi car ils interfèrent avec l'assemblage des microfibrilles de polymères pariétaux grâce à leur capacité à se lier à la chitine et au  $\beta$ -(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  $\gamma$ -(1,3) GS ont été développés et ciblent donc la biosynthèse du  $\beta$ -(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' $\alpha$ -1,3-glucane est localisé plus extérieurement dans la paroi cellulaire comparée aux  $\beta$ -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' $\alpha$ -1,3-glucan accumulé interfère avec la digestion de la chitine de la paroi cellulaire par des chitinases. Ainsi, l' $\alpha$ -1,3-glucane masque les  $\beta$ -1,3-glucanes et la chitine dans la paroi cellulaire des hyphes infectieux, suggérant que l' $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\beta$ -1,3-glucane (Klis FM, *et al.* 2002). La biochimie du complexe d'enzymes qui catalyse la synthèse des chaînes de  $\beta$ -1,3-glucanes ( $\beta$ -1,3-glucane



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

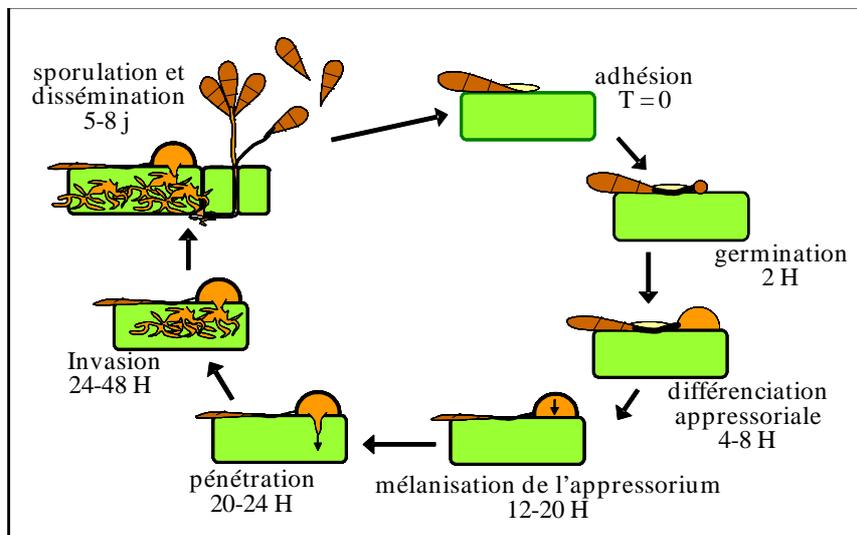


Figure 24: Cycle d'infection de *Magnaporthe grisea*

## 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 oryzae*) 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  $\alpha$ -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 (Chumley F. 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, perce 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 oryzae* 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  $\Delta MgPmk1$  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 Pmk1 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  $\Delta kss1\Delta fus3$ . 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 stress 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 de Pmk1 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

Infection-Related Behavior of <i>Magnaporthe grisea</i> <i>pmk1</i> , <i>osm1</i> , and <i>mps1</i> Mutants				
	Appressorium formation <sup>a</sup>	Appressorial penetration <sup>b</sup>	Plant defense responses <sup>c</sup>	Invasive hyphal growth <sup>d</sup>
Guy11 (WT)	+	+	+	+
<i>pmk1</i> Mutants	-	-	-	-
<i>osm1</i> Mutants	+	+	+	+
<i>mps1</i> Mutants	+	-	+	+

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  $\Delta slt2$  (*ScMPS1*) a été complété 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  $\Delta mps1$  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. cerevisiae*. 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  $Ca^{2+}$ , 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 « C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> » qui sont considérés comme des motifs ADN-binding, 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 aminés 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, transcriptionnellement, 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 *FKS2*, les gènes de chitine synthase en réponse de calcium. Il a été montré aussi que l'activation transcriptionnelle des gènes *FKS1*, *CHS* et *CHS4*, orthologues de MGG00865.6, MGG01802.6 et MGG09962.6, chez *M. grisea*, est dépendant de 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  $\Delta Mgcrcz1$  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 voie 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- $\Delta ku80$  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 Z $\alpha$ . L'intégration du fragment PCR interrompt l'expression du gène de fusion Lac Z $\alpha$ -*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	GTGAAGGCCGAACCAAAGACCT	Mig1 COMP1	GGTGATGGTGGCGGCAGG
Ags1 - 8	CGTTATCCCACACCCCGTTACTC	Mig1 COMP2	CTCACCCACCGCCACCACAC
Ags1 - 9	CCGAGATATTCGACTTCAACTACAGGAA	Primer mps1 - 2	CACGGCCTGAGTGGCCGATTGCTGTGG T TGCCTCGTTTATT
Ags1 - 13	AGAAAATAGCAACGCCAACGTC	Primer mps1 - 3	GTGGGCCATCTAGGCCTTTGGAGAGGC CATGAGATACTGCT
Cas-2	ATTTCGAGGGCCTGAGTGGCCCGTCTGT CGCGGTACGA	Primer mps1 - 8	ACCTATCCAGGTCCCATTCTATCCC
Cas5-3	TAGAGTAGATGCCGACCGGAACAAGG CACCGCCTTCCATCG	Primer mps1 - 13	TCGGTTCTGTTTGGGAGTCC
cas-8	CACGGCCTGAGTGGCCGAGCCACCCAG TCAAG	Primer mps1 - 15	AGTTAGTGCTAGTTCTCTCTTATGG TGTGG
Cas-9	AGGGCGAGAACCTGTACTACACGAG	MPS COMP1	TCACCAAGGAACTCGGTACGGG
Cas-13	CGGACCTCAAGACGCCCTTTC	MPS COMP2	ACCAGCGTTCTCCTCAGGGTCC
Cas-15	TGTCTTCTCGTATTTCCGGTTGCTG	Mps1nvo ORF1	AAGTTGAAGGTGGTCGGGCAGTC
CAS COMP1	CCTCGCTCTTGACAGCATCGC	Mps1 nvoOrf2	CGCCCAGATAACTTCAACGAGACC
CAS	GCCTGCGACACATCCCTACCG	Swi4	GTGGGCCATCTAGGCCCGCACGCCTC C



<b>COMP2</b>		<b>primer 2</b>	GCTACA
<b>Crz1 primer 2</b>	GTGGGCCATCTAGGCCCGAGATGCCTGA GTTGCCAG	<b>Swi4 primer 3</b>	CACGGCCTGAGTGGCCCGATGATGTCT G GTTTCGCACG
<b>Crz1 primer 3</b>	CACGGCCTGAGTGGCCGAAAGCTATGC GGTGGCA	<b>Swi4 primer8</b>	GCCCTCCTGACTGACTTGCGA
<b>Crz1 primer 8</b>	TTGACCACCAACCAGCTCCAGAC	<b>Swi4 primer9</b>	GGTTGGCGTTTGGGATGCG
<b>Crz1 primer 9</b>	GTATCCAAGCAAATCACTGGCAACTG	<b>Swi4 primer 13</b>	CGACTTAGGCTCGTGTTCGTAGACG
<b>Crz1 primer13</b>	CGCCGCCGTTGTGAATTACCTA	<b>Swi4 primer15</b>	GATGAGGATGGCTGAAACGAGGA
<b>Crz1 primer15</b>	TCAACCAATACCCAAATCTTCCACTTC	<b>Swi4/1</b>	ATCGTATTAAGTAGCAGGAAAGGGAG AAA
<b>Crz2dbnew</b>	ATTCGAGGGCCTGAGTGGCCATAGGCCTGAGTGGCC CGAGATGCCTGAGTTGCCAG	<b>swi4/2</b>	CGGGCAGTGTCCACCTCGTT
<b>Crz3dbnew</b>	TAGAGTAGATGCCGACCGGAACTGGGC CATCTAGGCCGAAAGCTATGCGGTGGCA	<b>SWI4 COMP1</b>	CTTTGATCGTGAACCTCGTCTTCGTATG
<b>CRZCOMP1</b>	ACACGGCTCCTCCATTCCCTTC	<b>SWI4 COMP2</b>	TGACGAGGACGACACACCAGATAAC
<b>CRZCOMP2</b>	GAGATTGCTGGGCTGTGCGAC	<b>Swi 6 primer 2</b>	GTGGGCCATCTAGGCCCGATGGGTTGT G ATTCTTGTGG
<b>dCGS-hph- end</b>	AGGCTCTCGCTGAACTCCCAATG	<b>Swi 6 primer 3</b>	CACGGCCTGAGTGGCCACACCACATT GACCCGGACCAC
<b>dCGS-hph- start</b>	CATTGGGGAGTTCAGCGAGAGCCT	<b>Swi 6 primer 8</b>	TCCGAACAGCAACCAAGAGGTCA
<b>hygro1</b>	GGCCACTCAGGCCCTCGAAT	<b>Swi 6 primer 9</b>	AGGTTCTCCTTCCACGGTTACAAA



<b>hygro2</b>	GTTCCCGGTCCGCATCTACTCTA	<b>Swi 6 primer 13</b>	CGATAAAGGGCAAGCTGGTCCA
<b>IDC12</b>	ATTCGAGGGCCTGAGTGGCCGTACT ACCACATCTAATTCTGTGAGGGCACGCA TCATAT	<b>Swi 6 primer15</b>	CGAAGCAGCGTACCACACCAGTC
<b>IDC13</b>	TAGAGTAGATGCCGACCGGGAACAGGCT TCCGTGCTTGCCGT	<b>Swi6-2db NEW</b>	ATTCGAGGGCCTGAGTGGCCCCTGAGT GGCCCGATGGGTT
<b>IDC1 primer 8</b>	ACTGTCAAATGTCGCAGAACTGGG	<b>Swi6-3db NEW</b>	TAGAGTAGATGCCGACCGGGAACCCAT CTAGGCCACACCACATTGAC
<b>IDC1 primer 9</b>	ACCTGTATGTGCTGTGTGCCGC	<b>SWI6/1</b>	TGTTCGGCAAGGAGCTGCTAATG
<b>IDC1 primer 13</b>	CCGCATGACTAGCCTTGTTCCAG	<b>SWI6/2</b>	TTCTCACTCTCCAATCTCCAACCTCC
<b>IDC1 primer 15</b>	GCCCAACCCGACAGCATAGGA	<b>Sulf-2</b>	CAACTGTTGGGAAGGGCGATC
<b>IDCCOMP1</b>	CCAGGACTACCCAGCGATGCAG	<b>Sulf-3</b>	GCAATTCCTGCAATAATCA
<b>IDCCOMP2</b>	ATTATCCTTCGGTTCTTTGACCACCC	<b>Sulf-4</b>	TGTATCGTGTGCTGAATTCATATATGA C CATGATTACGCCAAGCG
<b>Mig1-2</b>	TAGAGTAGATGCCGACCGGAACTG CCTGTCTAGGCTGGTGAGCTG	<b>Sulf-5</b>	GGGAGACATAGCTGTGTCTTTATGACC A TGATTACGCCAAGCG
<b>Mig1-3</b>	ATTCGAGGGCCTGAGTGGCCACCGTCTTT CCTCCGTCTTGCTTTT	<b>Sulf-6</b>	GACAAGGCGTAGTGATGGCG
<b>Mig1-8</b>	CTCCTGCATGCTACTGGTCA	<b>T3</b>	ATTAACCTCACTAAAGGGA
<b>Mig1-9</b>	ATGCAGGCATGGAGAAAGA	<b>T7</b>	TAATACGACTCACTATAGGG
<b>Mig1-13</b>	GTGGCGAGGGTGAATTAGTGTCCG	<b>Knr4 - 2</b>	CAATTAACCACCAACTGTACTGTCCG G TTCCCGGTCGGCATCTACTCTA



<b>Mig1-15</b>	CCCCTCGTATGCTCCCACGTC	<b>Knr4 - 3</b>	GCTCTAGATATCGATCGTCTTCGGCCA C TCAGGCCCTCGAAT
		<b>knr4-A8</b>	GCAGGCTGTGTTTTAGCACTGCT
		<b>knr4-ORF2</b>	GTCAATTAAGTGGCACACCTACCCAAG
		<b>Knr4 - 13</b>	GACGGCACTCATCCCAAACG
		<b>Knr4 - 15</b>	GCTTGTGGAGGTGACCTTATTGGTGT

### 1.6. Amorces pour qPCR

Nom	Séquence 5'→3'	Nom	Séquence 5'→3'
<b>alpha13gsF</b>	GCCCGCAAGCCCAAGT	<b>CAS5F</b>	CAGCCTCGGTGCCATCAT
<b>alpha13gsR</b>	GTCAGATTTGCCGTACCAA	<b>CAS5R</b>	CTCCGTCTCAAACCTCAAACG
<b>CRZ1F</b>	AACCCCAACCGTCTCAAAC	<b>GSKF</b>	CTCAGGAAGCGGACAACA
<b>CRZ1R</b>	GAGTCGCGTGAAGGATGA	<b>GSKR</b>	CGCTCGGTGCGTGTACT
<b>RLM1F</b>	GGGCGATGACGATGATGAG	<b>SWI4F</b>	GCAAACCAAGCAACCAAA
<b>RLM1R</b>	GCATCATGTGCGCATCCA	<b>SWI4R</b>	GCTACTGCGGGGCTTT
<b>SWI6F</b>	TCAACACACCCACCAAGGAA	<b>IDC1F</b>	CGGCAGCACCATTTCTTCT
<b>SWI6R</b>	TCCGCACCTGAATTGTACATCT	<b>IDC1R</b>	GCTAGATGAAGCCATGGACACA
<b>MPS1F</b>	CTGCGGCCTGAAGTACATACAC	<b>FKS1F</b>	TAGCGTACTTGCTGCCATTG
<b>MPS1R</b>	AGCAAGTTTCCGGGTTTCAA	<b>FKS1R</b>	CAGCCCATGGAGTACCACTT
<b>CHS2F</b>	GCACCTTTCAACGACGA	<b>CHS4F</b>	ATCCTGATGTCGTTCTTGC
<b>CH2R</b>	GCCGTGTTTTGGTTCTTTGT	<b>CHS4R</b>	GGTGAGACTGTCGGGAATA
<b>PMC1F</b>	AGCCGTCTCCTCTGAACAAG	<b>CHS3F</b>	TTCTTCAGCGGCGTCGTT
<b>PMC1R</b>	TTCATGAGACTTGCCTCGTG	<b>CHS3R</b>	GTGGCGGATGGCGTAGAT



<b>CHS8F</b>	CGCAAGGCTGATCTCCTAGAGA	<b>CHSDF</b>	AAGAGCATCGACGTCACTTACAAG
<b>CHS8R</b>	ACTGCGTCGGAGTTGTCAAAG	<b>CHSDR</b>	CTTTTGGCAGTGACGCTTACC
<b>CHS2bisF</b>	TCCGCCGCTGCAGATAA	<b>CHSF</b>	TCTCGGCGTAACATTGACGAT
<b>CHS2bisR</b>	GACTGCGGCGGTTTGC	<b>CHSR</b>	GCTTGCACAAGGCTATGC
<b>GFAF</b>	GGTGCCTACGGTCTGTTGATC		
<b>GFAR</b>	ATGACAAGTGGCGAACCTTA		

## 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<sup>®</sup> (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 fabricant. 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 20 µl avec 1 U d'enzyme de restriction et le tampon spécifique de celle-ci, dans les conditions recommandées par le fournisseur (New

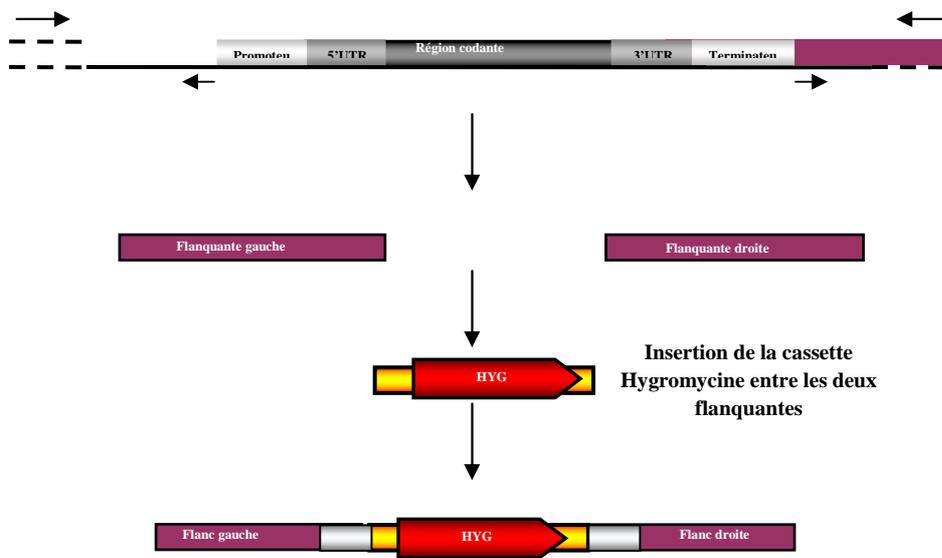


Figure 26 : Principe de ligation à trois voies

England Biolabs) pendant 1 à 2 heures. De la BSA (Bovine Serum Albumine) à 100 µg/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 µg/µl). 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'hygromycine est 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 ligation pour la formation des liaisons phosphodiester 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 *geneΔhygro* est amplifié par PCR à l'aide des amorces « *geneprimer8* » et « *geneprimer 9* » 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

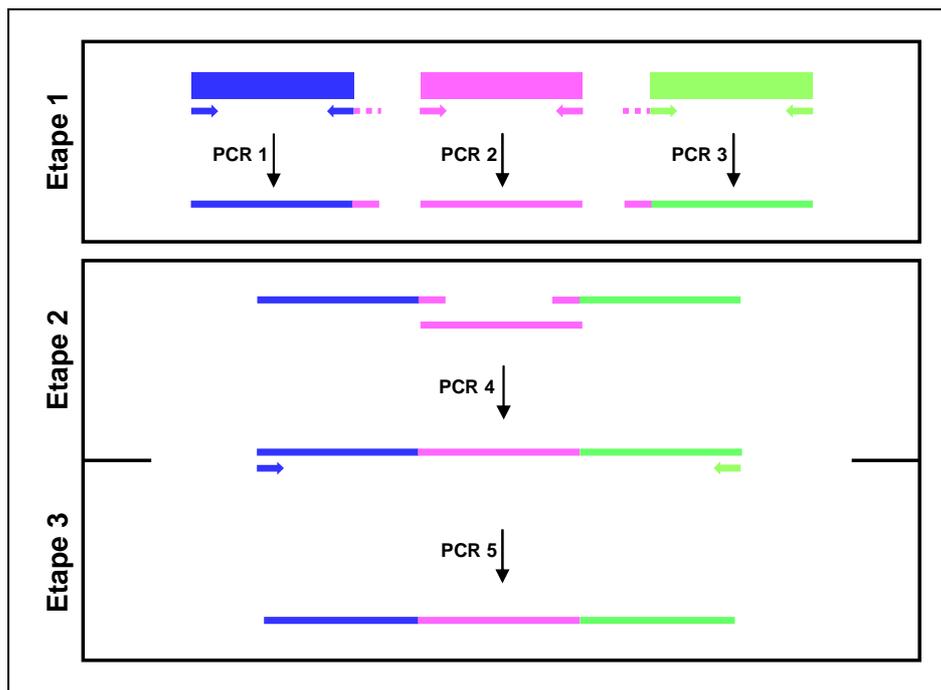


Figure 27 : Principe de la *PCR* double joint : 1ère étape : Amplification des fragments d'intérêt (PCR 1, PCR 2 et PCR 3). 2ème étape : amplification intermédiaire : les séquences homologues servent d'amorces pour l'amplification du fragment total. 3ème étape : amplification du produit final

l'amplification du fragment d'ADN final. 10 cycles de PCR sont effectués (Tableau 4) et les T<sub>m</sub> utilisés dans le programme de PCR sont ceux des régions complémentaires.

	Etape	Conditions de PCR	
1	Dénaturation	9 8°C	30 s
2	Dénaturation	9 8°C	10 s
3	Hybridation	T m	10 min
4	Elongation	7 2°C	30 s /kb
5	Elongation	7 2°C	10 min
		4 °C	∞
		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 µL 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 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-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 PhosphorImager Storm 820 (Molecular Dynamics).

### **3.11.1. Transfert d'ADN génomique sur membrane de nylon**

5 µg 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 dCTP<sup>32</sup> 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'infor à 26°C et avec une agitation de 120 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.

Après 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 rétro-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 « *Thermoscrip™ 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  $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{gène d'intérêt}} - Ct_{\text{gène de référence}})_{\text{condition test}} - (Ct_{\text{gène d'intérêt}} - Ct_{\text{gène de référence}})_{\text{condition référence}}$ .

### 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 MessageAmp™ II aRNA Amplification Kit* » (Ambion) selon les recommandations du fabricant. 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 µg 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 :  $N = (A_{\text{dye}}/A_{260}) * (9010/\text{coef ext}) * 1000$  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 dénombant le pourcentage de spots non conformes, leur répartition sur la lame et celle des spots différenciellement exprimés. Un fichier de données brutes est enfin généré qui sera utilisé par la suite.

### 3.15.5.2. « *GeneData Expressionist 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%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2%,  $\text{KNO}_3$  0,3%, Agar 1,5%, pH ajusté à 6, milieu riche utilisé pour la sporulation.

Ⓢ Le milieu minimum : Glucose 1%,  $\text{NaNO}_3$  0,2%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05%,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,01%,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  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%,  $\text{NaNO}_3$  0,2%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05%,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,01%,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,0004%, Microéléments 1X, Yeast extract 0,2%,  $\pm$  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.

Ⓢ 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.



④ Le milieu Sweigard : Yeast nitrogen base without aa 0,16%, L-asparagine anhydre 0,2%,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,1%, Glucose 1%, Agar 1,5%, utilisé pour la transformation avec glufosinate.

④ 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  $\pm$  15 g agar. Milieu favorisant la sporulation ainsi que la confetisation.

④ Nitrate salts : 120 g  $\text{NaNO}_3$ , 10.4 g KCL, 10.4 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{HOH}$ , 30.4 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

④ Trace elements: 80 mL eau, 2.2g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{HOH}$ , 1.1g  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.5g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{HOH}$ , 0.5g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{HOH}$ , 0.17g  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{HOH}$ , 0.16g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{HOH}$ , 0.15g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{HOH}$ , 5g  $\text{Na}_4\text{EDTA}$ . 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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . 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  $1.10^3$  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  $3.10^4$  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 µl d'une suspension de spores synchrones calibrée à  $3.10^5$  spores/ml sont déposées sur un fragment de feuilles d'orge en survie sur de l'eau gélosée 1 % additionnée de kinétine (2 µg /µl) 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 hexadécane-1,6-diol (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 0,3, 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
- **Casposfungine** à 10, 30 et 100 ppm
- **Chlorpromazine** à 100, 300 et 1000 ppm
- **Pyriméthanol** 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 de 120 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.

Après 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.

```

                *           20           *           40           *           60           *
MgMps1 : YTVKELCGAYGIVCAAVNNQISEG--VAIKKVTNVFSKLLAKRALREIKLLOHFRGHRNITPCLYDMD : 68
ScSlt2 : EQLIKKEIGHGAYGIVCSARFABAEDITVAIKKVTNVFSKLLCKRSLRELKLLRHFRGHKNITPCLYDMD : 70
          5 6 KE6G GAYGIVC A 2 E VAIKKVTNVFSK 6L KR LRE6KLL HFRGH4NITPCLYDMD

                80           *           100           *           120           *           140
MgMps1 : IP-RPD-NFNETYLYEELMEC-DLAAIIRSGQPLTDAHFSQSEIYQILCGLKYIHSANVLHRDLKPGNLLV : 135
ScSlt2 : IVEYFDGSIINGLYLYEELMEC-DMHQLIKSGQPLTDAHYSQSEIYQILCGLKYIHSADVLHRDLKPGNLLV : 139
          I PD N YLYEELMEC D6 II4SGQPLTDAH5QSFIYQILCGLKYIHSAILVLRDLKPGNLLV

                *           160           *           180           *           200           *
MgMps1 : NADCELKICDFGLARGFSVDPBENAGYMTTEYVATRWYRAPEIMLSFQSYTKAIDVWVSGCILAE LGGRE : 205
ScSlt2 : NADCQLKICDFGLARGYSBNFVENSQFLTEYVATRWYRAPEIMLSYQSYTKAIDVWVSGCILAE LGGKE : 209
          NADC2LKICDFGLARG5S 1P EN 56TEYVATRWYRAPEIMLS5Q YTKAIDVWVSGCILAE LGG4P

                220           *           240           *           260           *           280
MgMps1 : EFKGRDYVDQLNQILHLILGTPNEETLSRIGSPRAQCYVRNLEPFMAKKPEETLFPNANPDALDLLDRMLAF : 275
ScSlt2 : IEFKGDYVNQLNQILQVLGTPPEETLSRIGSKNVQDYIHQLGFTPKVPEVNLVFNANSQALDLEQMLAF : 279
          FKG4DYV1QLNQIL 6LGTP ETL RIGS Q Y6 L F6 K PF L5PNAN ALDLL MLAF

                *
MgMps1 : DPSSRISVEQALEHPYL : 292
ScSlt2 : DPQRRTVDEALEHPYL : 296
          DP RI3V 2ALEHPYL

```

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 *ScSLT2* (*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 aminés, 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 *Guy11Δku80*. 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 *Guy11Δku80* 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 *Guy11Δku80* 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 *Guy11Δku80Δmps1* (T1, T4, T5, T5, T6) ont été retenus, ainsi que deux transformants ectopiques (T2, T3). Nous avons aussi construit des mutants *Δmps1* dans la souche *P1.2Δku80*, car nous n'avons pas pu obtenir des mutants *Δswi4* dans la souche *Guy11Δku80*. 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 *P1.2Δku80* de *M. grisea*. Les 4 transformants obtenus présentent un phénotype, équivalent à celui des mutants *Guy11Δku80Δmps1*. 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 *Guy11Δmps1* 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 *Δmps1* a été réalisée avec les différents transformants que nous avons obtenus (Paragraphe 1.2.1).

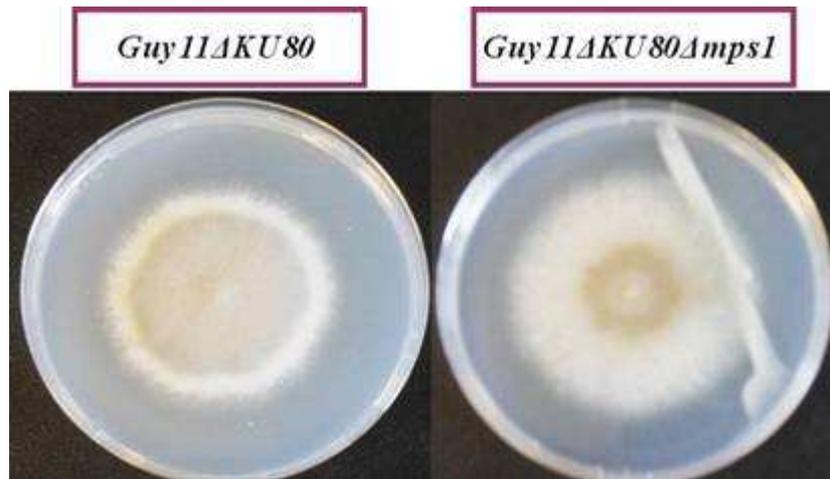


Figure 29 : Phénotype mycélien du mutant *Guy11Δku80Δmps1* et de la souche sauvage *Guy11Δku80*. Le mutant a une croissance équivalente à celle de la souche sauvage. Cependant il présente une réduction du nombre d'hyphes aériens et de sa pigmentation une absence d'hyphes aériennes

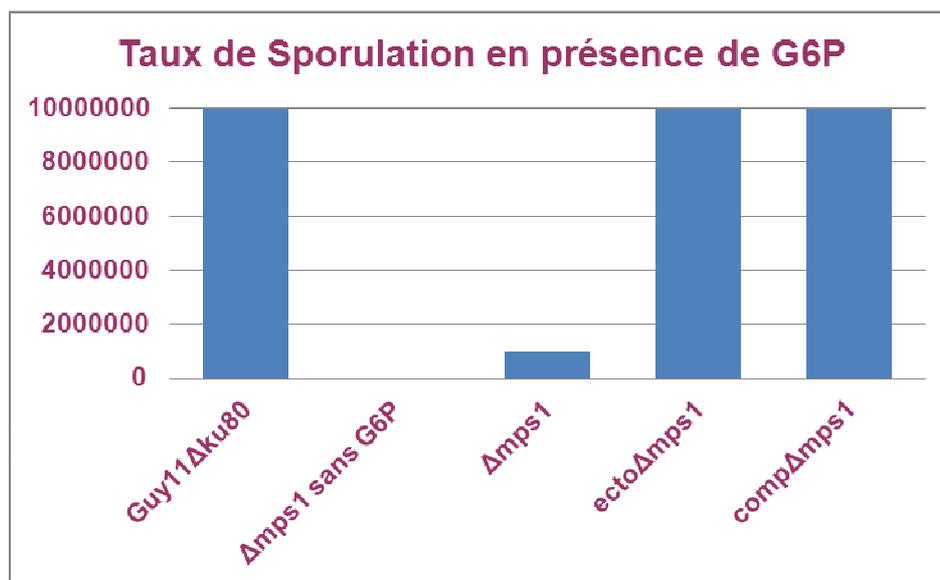


Figure 30 : Taux de sporulation du mutant *Guy11Δku80Δmps1* en présence et en absence de G6P. La souche sauvage *Guy11Δku80*, l'ectopique du *Guy11Δku80Δmps1* ainsi que le mutant *Guy11Δku80Δmps1* complétementé, *compΔmps1* sporulent normalement en présence du G6P. Le mutant *Guy11Δku80Δmps1* sporule  $10^6$  plus avec G6P

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

Les mutants *P1.2Δku80Δmps1* et *Guy11Δku80Δmps1* présentent une absence de mycélium aérien et une faible pigmentation (Figure 29). La sporulation des mutants *P1.2Δku80Δmps1* et *Guy11Δku80Δmps1* 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 *P1.2Δku80Δmps1* et *Guy11Δku80Δmps1* a été réalisée en rajoutant au milieu CM une solution de 10 mM de glucose-6-phosphate (G6P), car ce sucre phosphorylé peut compenser partiellement le défaut de sporulation du mutant *Δatg8*, (AuToPhahy 8) de *M. grisea* (Deng, *et al.* 2009). Cette addition permet aux mutants *P1.2Δku80Δmps1*, *Guy11Δku80Δmps1* de produire une quantité de spores significative ( $10^6$  par boîte) mais inférieure au taux de sporulation de la souche sauvage sur un milieu CM (10% du taux de sporulation observé chez les souches *P1.2Δku80* et *Guy11Δku80*, Figure 30). Cependant, ce taux de sporulation est suffisant afin d'utiliser ces spores dans des expériences de mesure soit du taux de différenciation appressoriale, soit du pouvoir pathogène. Ces résultats montrent que le G6P complète significativement le défaut de sporulation des mutants *Δmps1* comme cela a été observé pour le mutant *Δatg8* (Deng, *et al.* 2009). En effet, par comparaison avec la souche sauvage, le mutant *Δatg8* 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 *Δmps1*, le défaut de sporulation est plus fort que celui observé pour le mutant *Δatg8* sur un milieu CM avec du glucose comme seule source de carbone (-100% pour *Δmps1* vs -30% pour *Δatg8* sur le même milieu). L'addition de 10 mM de G6P compense partiellement le défaut de sporulation du mutant *Δatg8* 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 *Δmps1*, car elle est qualitative (passage de 0 spores à  $10^6$  spores par boîte), 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 *Δatg8*, 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 *Δatg8* 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 *Δatg8*. Pour tester cette hypothèse, les auteurs ont construit un mutant *Δgph1* qui sporule normalement. Le double mutant *Δgph1Δatg8* sporule beaucoup mieux que *Δatg8* (10 fois plus) sur un milieu CM avec lactose. Ainsi, la suppression de la protéine Gph1 conduit à une suppression partielle du défaut de

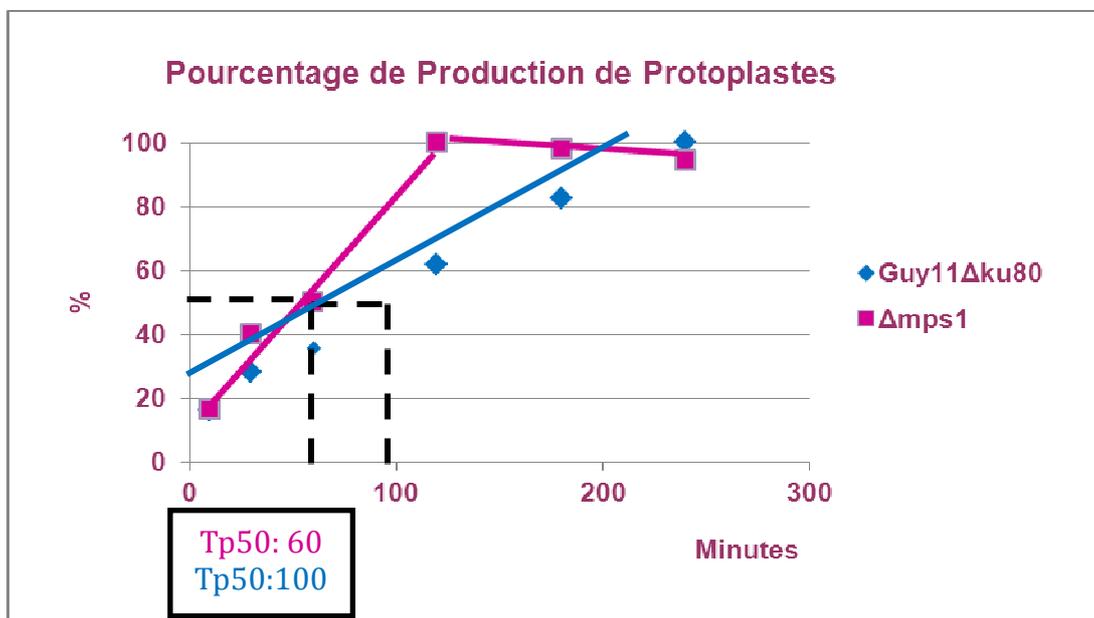


Figure 31 : Formation des protoplastes chez le mutant  $\Delta mps1$  et la souche sauvage  $Guy11\Delta ku80\Delta mps1$ . Tp50 pour le mutant  $Guy11\Delta ku80\Delta mps1$  est de 60 minutes, le Tp50 pour la souche sauvage  $Guy11\Delta ku80$ , est de 100 minutes

sporulation du mutant *Δatg8*. Ces expériences nous ont conduit à émettre l'hypothèse que l'altération de la sporulation observée chez le mutant *Δmps1* pourrait provenir de la sur-expression de Gph1. Cette hypothèse pourrait être testée en mesurant l'expression de *GPH1* chez le mutant *Δmps1* 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 *Δmps1* 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 *Δmps1* en condition de carence en azote. En effet, dans ces conditions de culture, le mutant *Δatg8* présente une absence d'autophagosomes.

#### 1.4. Altération des parois des mutants *Δmps1*

Un test de protoplastisation a été réalisé avec les deux mutants *P1.2Δku80Δmps1* et *Guy11Δku80Δmps1* afin de comparer leurs cinétiques de protoplastisation lors d'un traitement par le glucanex (1g/100ml). Les mutants *P1.2Δku80Δmps1* et *Guy11Δku80Δmps1* produisent des protoplastes plus rapidement que la souche sauvage, comme cela est montré pour le couple *Guy11Δku80* et *Guy11Δku80Δmps1* (Figure 31). En 10 minutes, le mutant *Δmps1* et la souche sauvage *Guy11Δku80* produisent 17% du maximum de protoplastes. Après 30 minutes de traitement enzymatique, la différence de production de protoplastes entre les mutants *Δmps1* et la souche sauvage est de 1,4. Le mutant *Δmps1* 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 *Δmps1* et la souche sauvage *Guy11Δku80*. Le temps de protoplastisation pour la libération de 50% des protoplastes (Tp50) pour le mutant *Δmps1* est 60 minutes, alors que le Tp50 pour la souche sauvage *Guy11Δku80* est 110 minutes. Ceci démontre que la paroi des mutants *Δmps1* 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 *Δmps1* deux plus rapidement. Cette propriété suggère que la structure et la composition de la paroi du mutant *Δmps1* 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 *Δmck1* (Map Kinase Kinase Kinase ; Jeon, *et al.* 2008) et chez le mutant *Guy11Δmps1* (Xu, *et al.* 1998). Les résultats obtenus avec le mutant *Δmck1* et *Guy11Δmps1* 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 *Δmps1* 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 *Δmps1*, 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 *Δmps1*

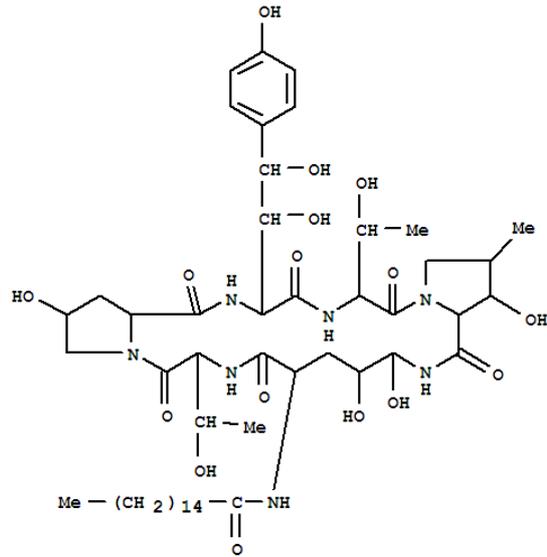


Figure 32 : Molécule de l'aculéacine

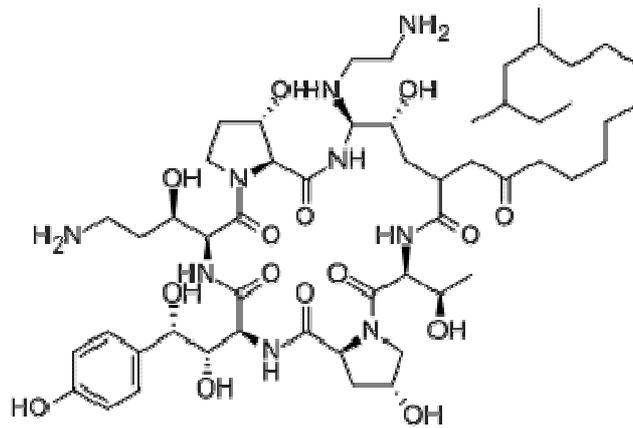


Figure 33 : Molécule de la caspofongine

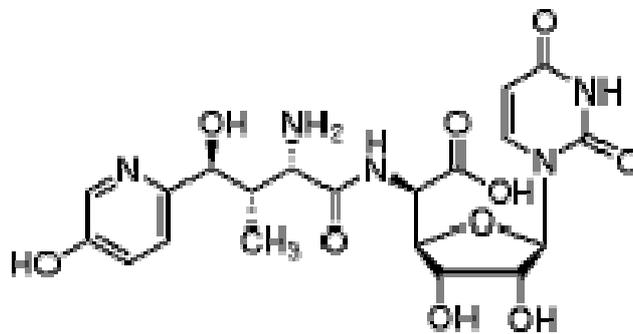


Figure 34 : Molécule de la nikkomyicine

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

### 1.5. Sensibilité des mutants *Δmps1* 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-β-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 *Guy11Δku80*. 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 boîtes 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).

### Aculéacine 7 jours

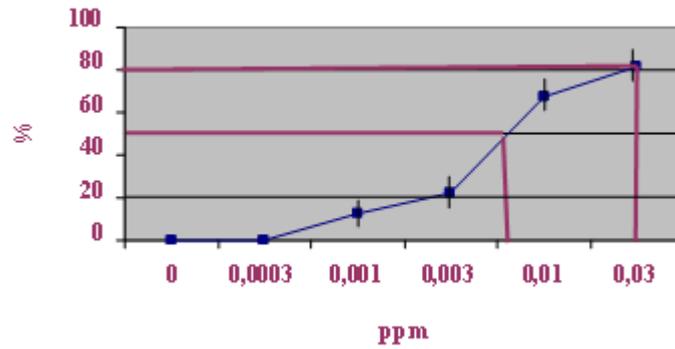


Figure 35: Sensibilité de *M. grisea* à l'aculéacine. Calculs des DI50 et DI80 chez *Guy11Δku80*. Les mesures sont réalisées au bout de 7 jours (Milieu minimum, gélosé, croissance radiale). DI50 : 0.01 ppm, DI80 : 0.03ppm

### Caspofongine 7 jours

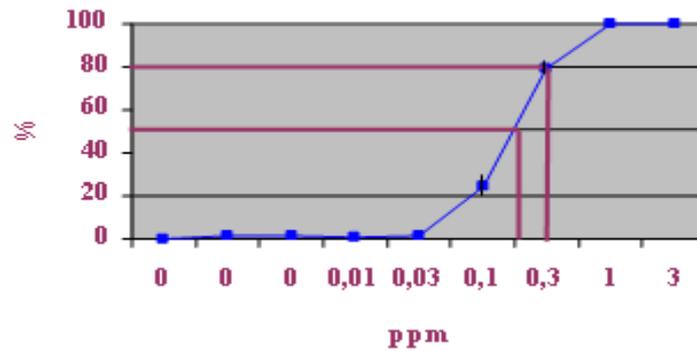


Figure 36: Sensibilité de *M. grisea* à la caspofongine. Calcul des DI50 et DI80 chez *Guy11ΔKU80*. Le test a été réalisé avec différentes doses de la nikkomycine, les mesures sont réalisées au bout de 7 jours (Milieu minimum, gélosé, croissance radiale). DI 50 : 01 ppm, DI80 : 0.3 ppm

### Nikkomycine 7 jours

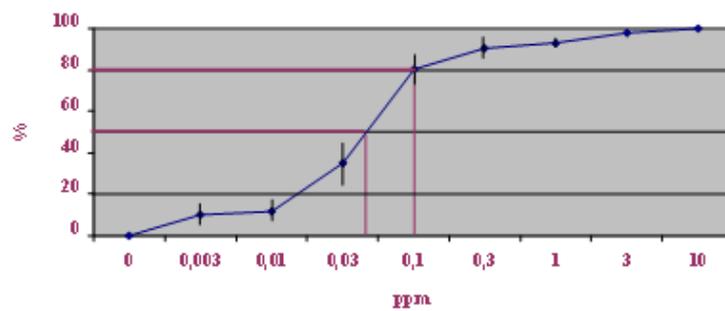


Figure 37: Sensibilité à la nikkomycine. Calcul des DI50 et DI80 chez *Guy11ΔKU80*. Le test a été réalisé avec différentes doses du Nikkomycine, les mesures sont réalisées au bout de 7 jours (Milieu minimum, gélosé, croissance radiale). DI 50 : 0.06 ppm, DI80 : 0.1 ppm

	DI50	DI80
<b>Aculéacine</b>	0.006 ppm	0.03 ppm
<b>Caspofongine</b>	0.200 ppm	0.30 ppm
<b>Nikkomycine</b>	0.050 ppm	0.10 ppm

Tableau 5: Sensibilité de *M. grisea* à l'aculéacine, la caspofongine 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 *Guy11ΔKU80Δmps1* 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 *Guy11Δku80Δmps1* (Tableau 6). D'après ces résultats, le mutant *Guy11Δku80Δmps1* 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 *Δmps1* n'est pas hyper sensible à la caspofongine

	<i>Guy11Δku80Δmps1</i>	<i>Guy11Δku80</i>	Commentaire
<b>Aculéacine DI50</b>	0.0025 ppm	0.006 ppm	2X HS <i>Δmps1</i>
<b>Aculéacine DI80</b>	0.006 ppm	0.030 ppm	5X HS <i>Δmps1</i>
<b>Caspofongine DI50</b>	0.100 ppm	0.200 ppm	Pas de différence
<b>Caspofongine DI80</b>	0.300 ppm	0.300 ppm	Pas de différence
<b>Nikkomycine DI50</b>	0.025ppm	0.050 ppm	2X HS <i>Δmps1</i>
<b>Nikkomycine DI80</b>	0.065ppm	0.100 ppm	Pas de différence

Tableau 6: Sensibilité du mutant *Δmps1* aux inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi ; HS : hypersensible

### Aculéacine 7 jours

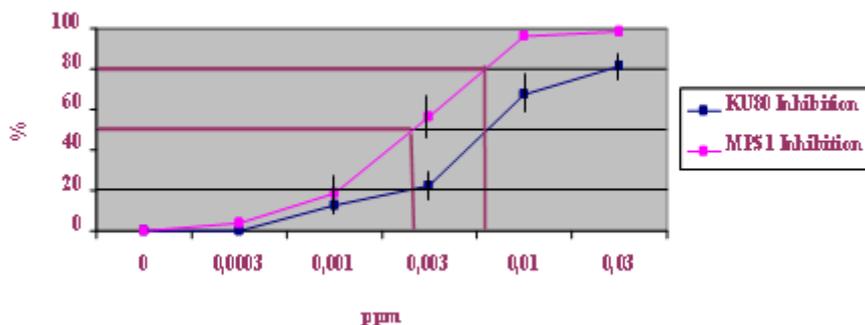


Figure 40: Sensibilité du mutant *Guy11Δku80Δmps1* à l'aculéacine. Test d'inhibition avec l'aculéacine, sur le mutant *Guy11Δku80Δmps1*. Le test a été réalisé avec différentes doses de l'aculéacine. Les mesures sont réalisées au bout de 7 jours. DI 50 : 0.003 ppm, DI80 : 0.006 ppm (Milieu minimum, gélosé)

### Caspofongine 7 jours

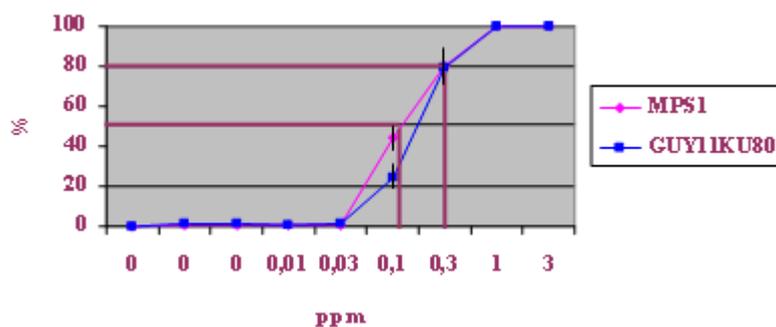


Figure 41: Sensibilité du mutant *Guy11Δku80Δmps1* à la caspofongine. Test d'inhibition avec l'aculéacine, sur le mutant *Guy11Δku80Δmps1*. Le test a été réalisé avec différentes doses de la caspofongine. Les mesures sont réalisées au bout de 7 jours. DI 50 : 0.1 ppm, DI80 : 0.3 ppm (Milieu minimum, gélosé)

### Nikkomyicine 7 jours

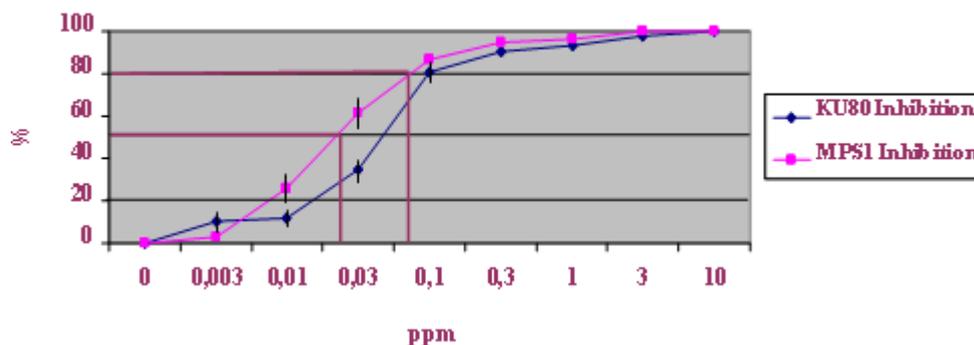


Figure 42: Sensibilité du mutant *Guy11Δku80Δmps1* à la nikkomyicine. Test d'inhibition avec l'aculéacine, sur le mutant *Guy11Δku80Δmps1*. Le test a été réalisé avec différentes doses de la nikkomyicine. Les mesures sont réalisées au bout de 7 jours. DI 50 : 0.03 ppm, DI80 : 0.1 ppm (Milieu minimum,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

Aux fortes doses d'aculéacine (>0.01 ppm), une inhibition à 90 – 100% de la croissance du mutant *Δmps1* 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.

	<b>Aculéacine 0.03 ppm</b>	<b>Caspofongine 1ppm</b>	<b>Caspofongine 3ppm</b>	<b>Nikkomycine 1 ppm</b>
<i>Guy11Δku80</i>	SURVIE	SURVIE	MORT	SURVIE
<i>Guy11Δku80Δmps1</i>	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 *Δmps1* 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**

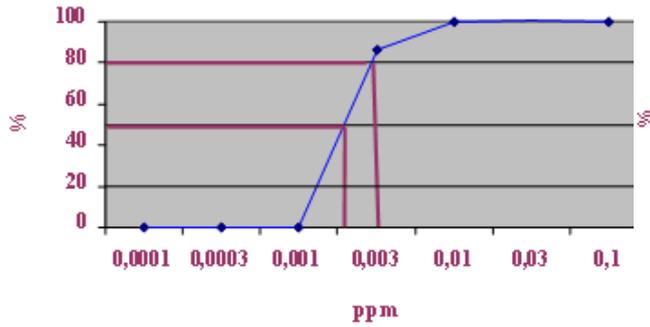


Figure 43: Pourcentage d'inhibition, dans un milieu liquide, chez *Guy11Δku80*, en présence de différentes concentrations de l'aculéacine, mesuré d'après la croissance entre le quatrième jour et le sixième jour

**Nikkomycine 4-6 jours**

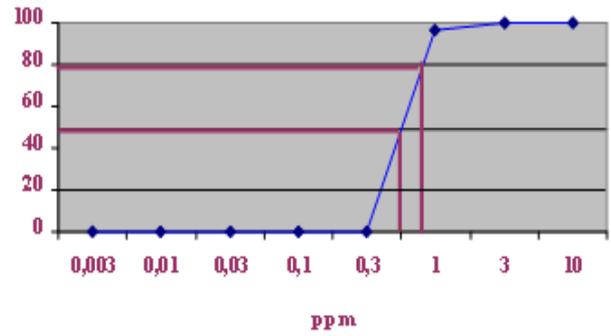


Figure 44: Pourcentage d'inhibition, dans un milieu liquide, chez *Guy11Δku80*, en présence de différentes concentrations de Nikkomycine, mesuré d'après la croissance entre le quatrième jour et le sixième jour

**Aculéacine 4 jours**

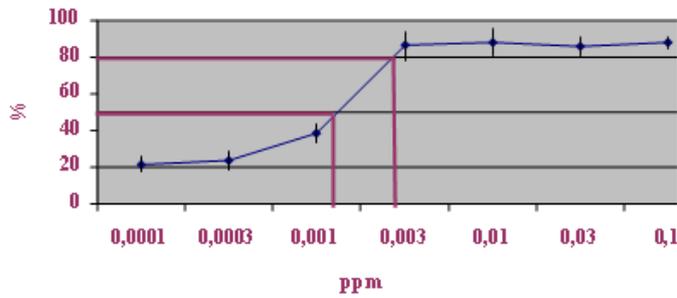


Figure 45 : Calculs des DI50 et DI80 de la souche sauvage en présence de l'aculéacine, dans un milieu liquide, avec une mesure au quatrième jour. DI50 : 0.001 ppm, DI80 : 0.003 ppm

**Nikkomycine 4 jours**

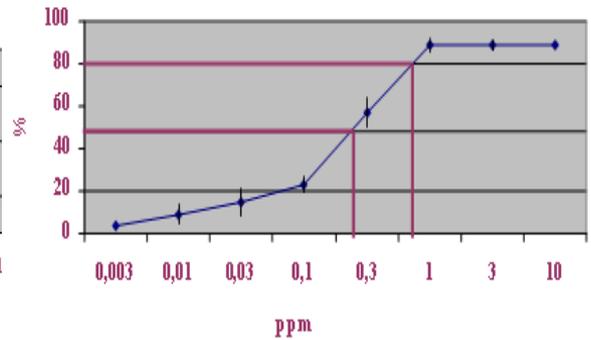


Figure 46 : Calculs des DI50 et DI80 de la souche sauvage en présence de la nikkomycine, dans un milieu liquide, avec une mesure au quatrième jour. DI50 : 0.3 ppm, DI80 : 1 ppm

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

	<i>Guy11Δku80</i>	Milieu Liquide DO4*	Milieu Liquide ΔDO4-6**	Commentaire
<b>Aculéacine</b>	DI50	0.002 ppm	0.002 ppm	pas de différence
<b>Aculéacine</b>	DI80	0.003 ppm	0.003 ppm	pas de différence
<b>Nikkomycine</b>	DI50	0.600 ppm	0.300 ppm	X2
<b>Nikkomycine</b>	DI80	1.000 ppm	1,000 ppm	pas de différence-

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. \*\* ΔDO4-6 : 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 *Guy11Δku80* 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 (ΔDO4-6, 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>Guy11Δku80</i>	Milieu Liquide à 4 J	Milieu Gélosé à 7 J	Commentaire
<b>Aculéacine</b>	DI50	0.002 ppm	0.006 ppm	R x 3 gélosé
<b>Aculéacine</b>	DI80	0.003 ppm	0.030 ppm	R x 10 gélosé
<b>Nikkomycine</b>	DI50	0.600 ppm	0.050 ppm	S x 10 gélosé
<b>Nikkomycine</b>	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 boîtes de Petri.

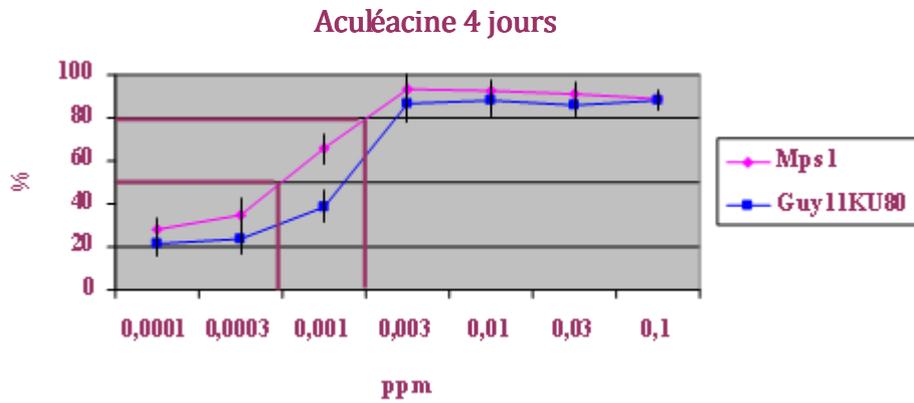


Figure 47: Sensibilité du mutant *Guy11Δku80Δmps1*, à l'aculéacine, mesuré d'après la croissance au quatrième jour, en milieu minimum, liquide

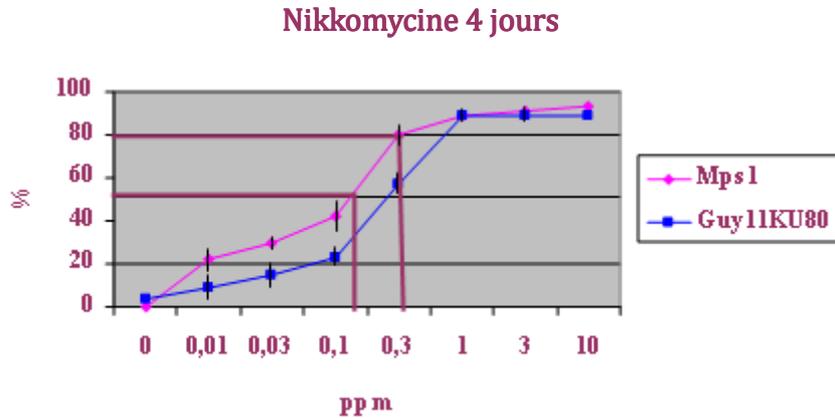


Figure 48: Sensibilité du mutant *Guy11Δku80Δmps1*, à la nikkomycine, mesuré d'après la croissance au quatrième jour, en milieu minimum, liquide

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 *Guy11Δku80Δmps1* aux inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi : milieu liquide

Les cinétiques de croissance du mutant *Δmps1* 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, *Guy11Δku80Δmps1* présente une DI50 de 0.0006 ppm et une DI80 de 0.002 ppm (Figure 47). En présence de nikkomycine, *Guy11Δku80Δmps1* présente une DI50 de 0.1 ppm et une DI80 de 0.3 ppm (Figure 48).

	<i>Guy11Δku80Δmps1</i>	<i>Guy11Δku80</i>	Commentaire
<b>Aculéacine Liquide DI50</b>	0.001 ppm	0.002 ppm	4X HS <i>Δmps1</i>
<b>Aculéacine gélosé DI50</b>	0.003 ppm	0.006 ppm	2X HS <i>Δmps1</i>
<b>Aculéacine Liquide DI80</b>	0.002 ppm	0.003 ppm	pas de différence
<b>Aculéacine gélosé DI80</b>	0.006 ppm	0.030 ppm	5X HS <i>Δmps1</i>
<b>Nikkomycine Liquide DI50</b>	0.100 ppm	0.600 ppm	6X HS <i>Δmps1</i>
<b>Nikkomycine gélosé DI50</b>	0.030 ppm	0.050 ppm	2X HS <i>Δmps1</i>
<b>Nikkomycine Liquide DI80</b>	0.300 ppm	0.100 ppm	2X HS <i>Δmps1</i>
<b>Nikkomycine gélosé DI80</b>	0.100 ppm	0.100 ppm	pas de différence

Tableau 10 : Sensibilité du mutant *Δmps1* 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 *Δmps1* est 2 à 4 fois plus sensible à l'aculéacine et 2 à 3 fois à la nikkomycine. L'hypersensibilité de mutant *Δmps1* à l'aculéacine varie beaucoup entre DI50 et DI80 (2 à 5). Cette différence 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 *Guy11Δku80Δmps1* 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>Guy11Δku80</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 *Δmps1* 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

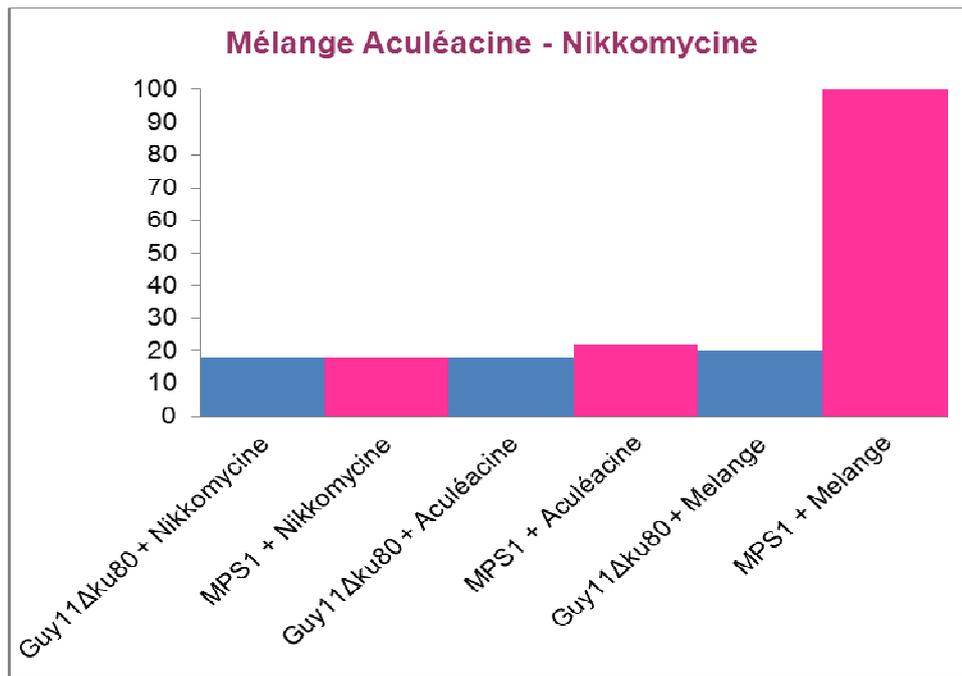


Figure 49 : Représentation graphique des inhibitions avec un mélange de l'aculéacine et de la nikkomycine à DI20 sur la souche sauvage et le mutant *Guy11Δku80Δmps1*. Le test a été réalisé avec 0.01 ppm de la nikkomycine et 0.001 ppm de l'aculéacine. Ces doses correspondent aux doses de DI20. D'après les mesures, une inhibition de 100% est observée pour le mutant *Guy11Δku80Δmps1*. Ainsi, il existe une synergie entre l'aculéacine et la nikkomycine



Figure 50: Test d'infection sur feuille d'orge coupée du mutant *P1.2Δku80Δmps1*. Le test est réalisé sur feuille blessée et non blessée. Le mutant *P1.2Δku80Δmps1* ne cause aucune lésion sur une feuille d'orge, même blessée

de biosynthèse de la chitine et des  $\beta$ -1,3 glucanes. Cette voie pourrait correspondre à la voie de biosynthèse des  $\alpha$ -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 la croissance du mutant *Δmps1* (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 *Δmps1* présente une inhibition de 50% de sa croissance. Cette expérience doit être répétée, mais elle suggère que le mutant *Δmps1* présente une forte hypersensibilité au mélange (1/10 de la DI50 de la souche sauvage).

En conclusion, le mutant *Δmps1* 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  $\beta$ -1,3 glucanes.

## 1.6. Pouvoir pathogène du mutant *Δmps1*

Nous avons étudié le pouvoir pathogène des mutants *Δmps1* 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 *Δmps1* 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 *Guy11Δku80Δmps1*) ont été déposés sur des feuilles en survie de l'orge. En effet, sur milieu complet, les mutants *Δmps1* 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 inoculé 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). Aucune lésion n'étant visible sur des



plantes d'orges infectées par les spores des mutants *P1.2Δku80Δmps1* et *Guy11Δku80Δmps1*. Ces résultats montrent, non seulement, que le mutant *Δmps1* est non pathogène pour l'orge mais aussi que les spores des mutants *Δmps1* obtenus à partir d'un milieu avec G6P sont non pathogènes. La G6P complète 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 *Δmps1* pour le riz

Le pouvoir pathogène des mutants *Δmps1* 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 C039 est moyennement résistante, la variété Maratelli est faiblement résistante et enfin la variété Sariceltik est la plus sensible. Les solutions de spores ( $3.10^4$  spores/ml) des souches sauvages (*P1.2Δku80* et *Guy11Δku80*) ainsi que des mutants (*P1.2Δku80Δmps1* et *Guy11Δku80Δmps1*) ont été utilisées pour infecter les différents cultivars de riz. Avec les trois différents cultivars, le mutant *Δmps1* a, toujours, une réduction 100% de pathogénie (Tableau 12) :

	C039	Maratelli	Sariceltik
<i>P1.2Δku80</i>	30*	32	40
<i>P1.2Δku80Δmps1</i>	0	0	0
<i>Guy11Δku80</i>	38	35	36
<i>Guy11Δku80Δmps1</i>	0	0	0
<b>Réduction de pathogénie</b>	-100%	-100%	-100%

Tableau 12: Pathogénie des mutants *Δmps1* pour le riz

\* Nombre de lésions par feuille provoquées par les mutants *Δmps1* sur des feuilles de riz 7 jours après inoculation, ( $3.10^4$  spores/ml). Il y a 100% de réduction du pouvoir pathogène chez les mutants *Δmps1*

### 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 *Δmps1* 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 *Δmps1* (80%) avec la même fréquence. Par contre, les appressoria du mutant *Δmps1* 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 *Δmps1* de *M. grisea*

Nous avons obtenu deux mutants *Δmps1* dans deux souches différentes *P1.2Δku80* et *Guy11Δku80*. Le mutant présente une autolyse que nous pouvons compléter 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 *Δmps1* aux inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi est faible (2-3 fois par rapport aux souches sauvages *P1.2Δku80* et *Guy11Δku80* 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 *Δmps1* est significativement altérée. Enfin, les mutants *Δmps1* 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 sensible au mélange Acu-Nikko	Pathogénie
<i>Δmps1</i> <i>Ant, 2010</i>	0%	G6P	-	Oui	2 X	2 X	100%	0
<i>Δmps1</i> <i>Xu, 1998</i>	2%	Nd	-	Oui	Nd	Nd	Nd	0
<i>Δmck1</i> <i>Jeon 2008</i>	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 décrits pour le mutant nul *Δmck1* 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 *Δmps1* (Xu, *et al.* 1998). La seule différence observée pour le mutant *Δmck1* est qu'il présente une autolyse de son mycélium qui n'est pas complétement par un ajout de 1M de sorbitol au contraire des mutants *Δmps1* (Xu *et al.*



1998, nos mutants). Enfin, les défauts de sporulation des mutants *Δmck1* et *Δmps1* 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 *Δmps1* 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 la 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 nouséothricine, 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 *Guy11Δku80ΔMps1* a permis d'obtenir 24 transformants résistants à la nouséothricine. 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 complémentarité de 8,3%. Ces transformants ont été dénommés [*Δmps1(pNIA1::MPS1)*] 8 et 13. Le transformant [*Δmps1(pNIA1::MPS1)*], cultivé sur MM avec du glutamate comme source d'azote

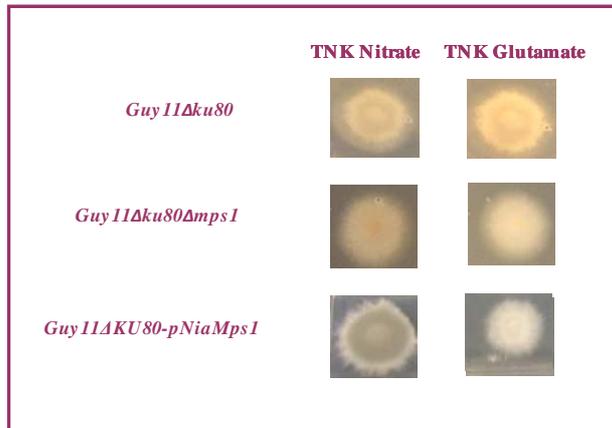


Figure 51 : Phénotype du mutant *Guy11Δku80-pNiaMps1* en présence de nitrate ou glutamate. En présence de nitrate *MPS1* est exprimé par ailleurs, en présence de glutamate *MPS1* n'étant pas exprimé, le mutant a un phénotype du mutant *Guy11Δku80Δmps1*

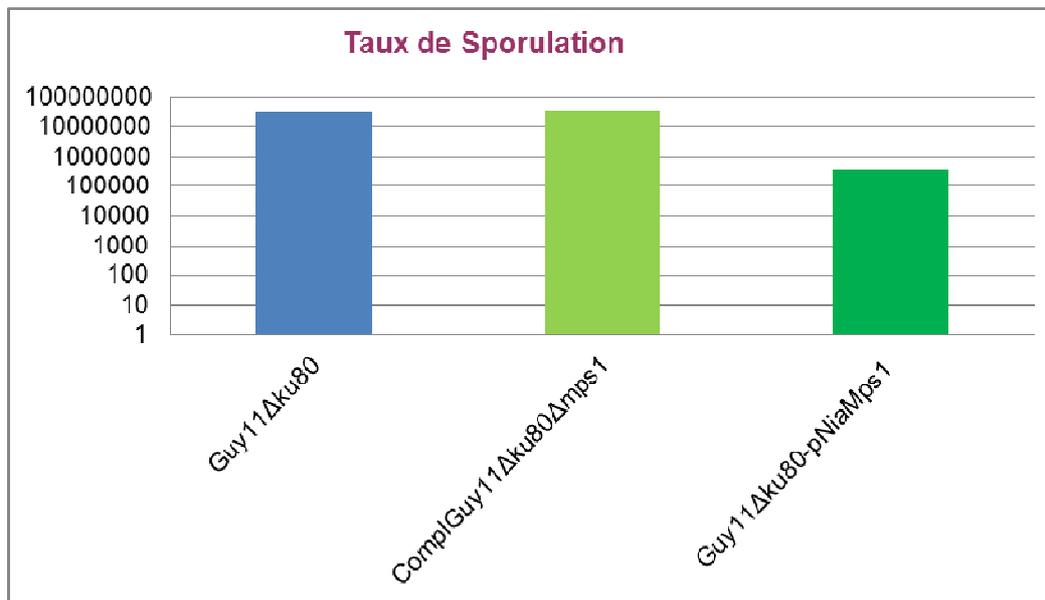


Figure 52 : Taux de sporulation du mutant *Guy11Δku80-pNiaMps1* comparé à la souche sauvage

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, [*Δmps1*(pNIA1::*MPS1*)]. La souche sauvage *Guy11Δku80* et la souche complémente sporulent de la même façon, sur MM avec nitrate (Figure 52). Par contre le transformant [*Δmps1*(pNIA1::*MPS1*)] sporule 100 fois moins que la souche sauvage. Cette différence de 10<sup>2</sup> de taux de sporulation, sur MM avec nitrate, entre la souche sauvage et le transformant [*Δmps1*(pNIA1::*MPS1*)] pourrait provenir de la souche du mutant *Guy11Δku80Δmps1* utilisé lors de la transformation. Le mutant *Guy11Δku80Δmps1* complémente 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 complémente 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 [*Δmps1*(pNIA1::*MPS1*)], en présence de nitrate.

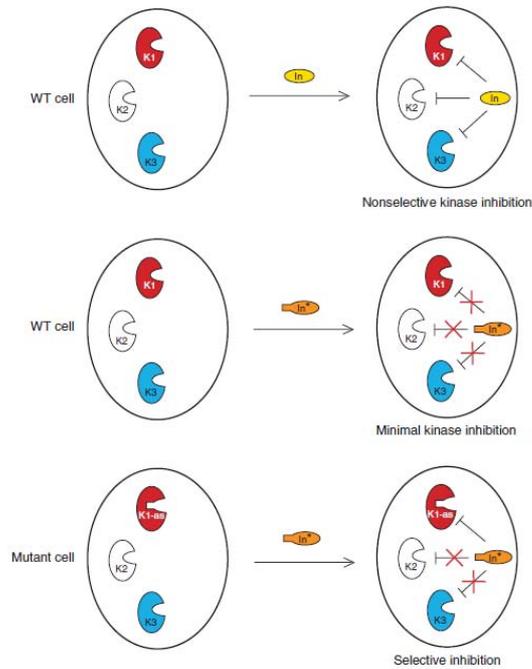


Figure 53: Stratégie pour sensibiliser une kinase à un inhibiteur spécifique. Un inhibiteur conventionnel bloque de multiples kinases dans la cellule. Une mutation dans une kinase crée une nouvelle poche où un inhibiteur spécifique peut se lier. L'inhibiteur spécifique ne peut pas se lier sur kinase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

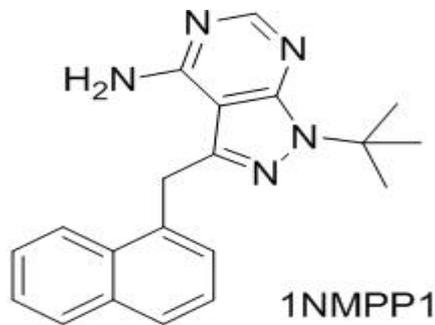


Figure 54 : Structure chimique de l'inhibiteur 1-NM-PP1

```

00          *          120          *          140          *          160          *          180          *
MGFUS3 : YETFPNEYI LQSLMETDMHRVIRIQD-----LSDDHCOVETIYOTLRALKAMHSEANVLRHDLKPSNLLLNACDLKVCDFGLARSA-ASQEDNS----- : 180
FUS3   : FENFENEYI LQSLMQTDLHRVIRIQM-----LSDDHCOVETIYOTLRANVYVLRHDLKPSNLLLNACDLKVCDFGLARITDESAADNSEPTGQ : 175
KSS1   : IDKLNAYI VESLMEEDLQKRVINNQNSGFSTLSDDHCOVETIYOTLRALKSIHSAQVIHRDLKPSNLLLNACDLKVCDFGLARCL-ASSSDSRETL-- : 178
MPS1   : D-NFENEYI YESLMECDLAAAIRSGQP-----LSDAHFOSEETIYQILCCGLKVIHSAQVLRHDLKPSNLLLVNADGELKICDFGLARGYSENVENS----- : 182
SLT2   : DGSINGIYI YESLMECDMHCIRSGQP-----LSDAHFOSEETIYQILCCGLKVIHSAQVLRHDLKPSNLLLVNADGELKICDFGLARGYSENVENS----- : 186
OSM1   : --PLEDEYI VTSLLGTDLHRLLRP-----LEKQFVQVETIYQILCCGLKVIHSAQVLRHDLKPSNLLLVNADGELKICDFGLARIQ--DPC----- : 169
HOG1   : --PLEDEYI VTSLLGTDLHRLLRP-----LEKQFVQVETIYQILCCGLKVIHSAQVLRHDLKPSNLLLVNADGELKICDFGLARIQ--DPC----- : 172
          Y   EL   D6   66          L   Q   F   YQ   6   6K   6Hsa   V6HRD6KP   N6L6N   1C   LK6CDFGLAR

```

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 Ca<sup>2+</sup>/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. cerevisiae* (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 *Guy11Δku80Δmps1* 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

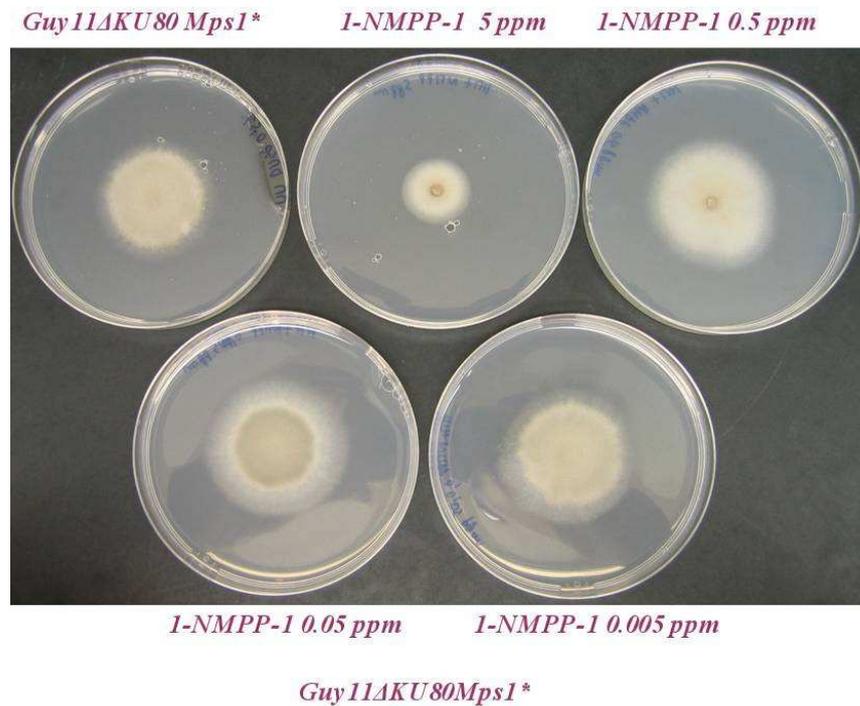


Figure 56: Phénotypes mycélien des mutants *MPS1\**: Les photos sont prises, à jour 7. Les implants ont été mis sur MM avec 0, 0.005, 0.05, 0.5 et 5 ppm de 1-NMPP-1. On retrouve le phénotype de *Guy11Δku80Δmps1* avec 0.5 ppm de 1-NMPP-1

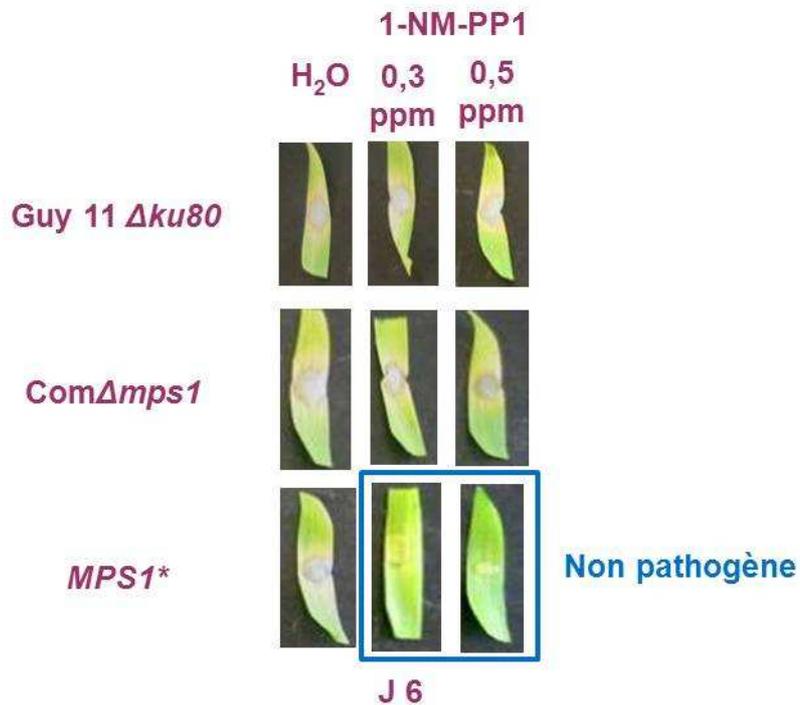


Figure 57 : Test de pathogénie en gouttes ( $3 \times 10^4$  spores/ml) sur feuilles d'orge en survie de la souche sauvage *Guy11Δku80* et les mutants *MPS\**, *CompΔmps1* en présence de H<sub>2</sub>O, 0,3 ppm ou 0,5 ppm de 1-NM-PP1

présence de 5ppm d'inhibiteur. Les transformants *MPS1\** ont un phénotype équivalent du mutant *Guy11Δku80Δmps1* 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 à 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 *Δmps1*.

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 *Δmps1* proviennent spécifiquement de l'absence du gène *MPS1*.

```

      *           20           *           40           *           60           *           80           *
M.grisea.s : K E H V M R R R V D D W I N A T H I L K A A E P D K P A R T R I L E R E V Q K D O H E K V Q G G Y G K Y Q G T W I P L E A G E A L A D O H T A L H W A A S M G D V M I L K O L F Q P N A Q P D : 95
S.cerevisie : T G S I M K R R R D D W I N A T H I L K A A N E A F A K R R T R I L E K E V K E T H E K V Q G G R G K Y Q G T W V P L N I A K Q L A E K T A F H W A S M G N I P L A B A L Y B A G T S I R : 94
      6M4R4 DDW6NATHILKAA F K RTRILE4EV K HEKVQGS6GKYQGTW6PL LA TA HWA SMG16 I L52

      100           *           120           *
M.grisea.s : S R N D G N T A V H L A A Q R G S S K C I R A L L G R C A S T D I T N N : 131
S.cerevisie : S T N N G D T A L H I A S K N G D V V F E N T L V K M C A L T T I --- : 127
      S N1G1TA6H6A G L6 GA T I

```

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

```

      *           20           *           40           *           60           *           80           *
M.grisea.s : -- A V M K R E G D S K L N A T Q I L K V A G V E R C K R R T K I L E K E I Q T G E H E K V Q G G Y G K Y Q G T W I P L E A G E A L A D O H T A L H W A A T I S R M P I L R R L E A G -- : 89
S.cerevisie : T G S I M K R R K K D D W I N A T H I L K A A N E A F A K R R T R I L E K E V D K E T H E K V Q G G R G K Y Q G T W V P L N I A K Q L A E K T A F H W A S M G N I P L A B A L Y B A G T S : 92
      6MKR D 6NAT ILK A K KR T4ILEKE6 HEKVQGG GKYQGTW6 A 26 2 TA HWA 36 6 I L EAG

      100           *           120           *
M.grisea.s : - A S P E R G D T A L N I A A R I G N R S I I S Q L L E V C A S P H I : 123
S.cerevisie : I R S T N N G D T A L H I A S K N G D V V F E N T L V K M C A L T T I : 127
      S GDTAL IA 4 G1 L6 6 A I

```

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

```

      *           20           *           40           *
MgRlm1 : KATDQNRVTFLKRGGLFKRAHELVLCVDVAVDQGNKLYEYSS : 51
ScRlm1 : -KIDQNRVTFLKRGGLFKRAHELVLCVDIAVLDGNITFYEYSS : 50
      I DQNR VTEGKRG GLFKRAHELVLC VD6AV I G3N YE5SS

```

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 *ScRLM1* (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 transcriptionnel. 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 phylogénétique, 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 *MgSWI4*, *MgSWI6* et *MgRLM1*

### 2.2.1. Obtention des mutants nuls *Guy11Δku80Δswi4*

La même stratégie que la construction du mutant *Δmps1* a été utilisée pour créer le mutant de délétion *Guy11Δku80Δswi4*. 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 *Guy11Δku80*. 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 dû 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 *P1.2Δku80* 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 *P1.2Δku80Δswi4* (T2) a été choisi, ainsi que trois ectopiques (T1, T3, T4).

### 2.2.2. Obtention des mutants nuls *Guy11Δku80Δswi6*

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 *Guy11Δku80* 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 *Guy11Δku80Δswi6* (T53) a été choisi, ainsi que trois ectopiques (T1, T3, T4).

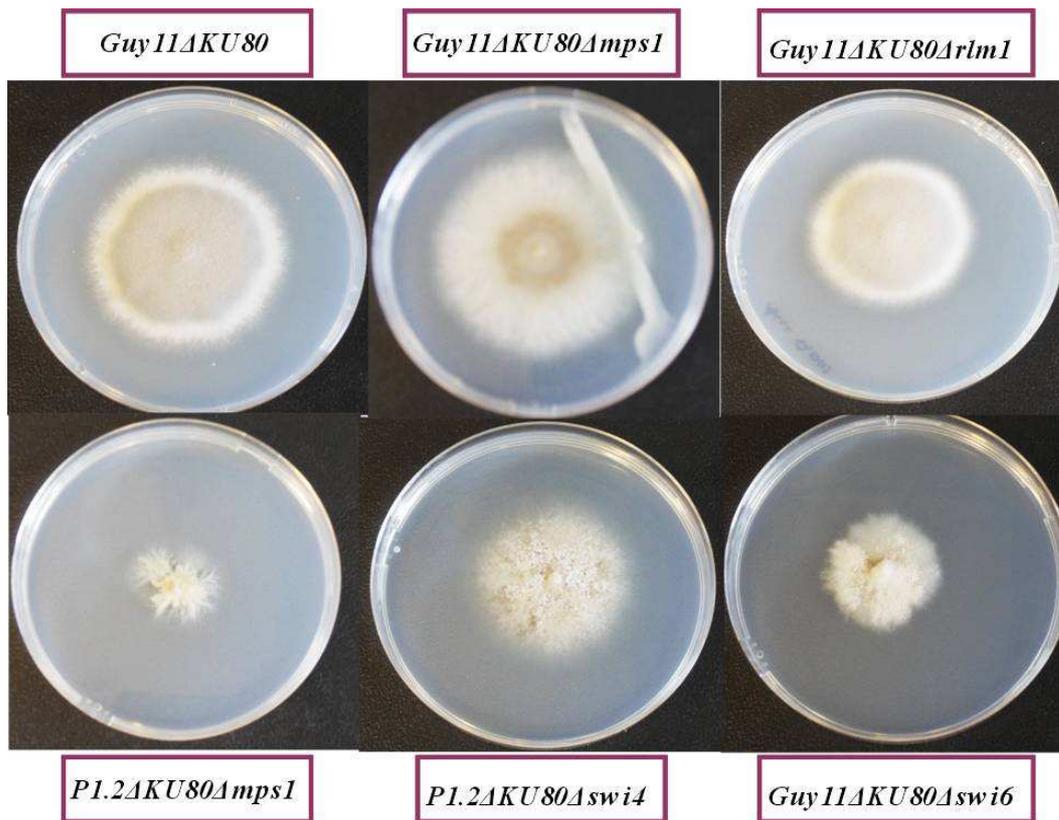


Figure 61: Phénotype mycélien des mutants *Guy11Δku80Δswi4*, *Guy11Δku80Δswi6* et *Guy11Δku80Δrlm1*; comparées à celle de *Guy11Δku80Δmps1* et la souche sauvage *Guy11Δku80*

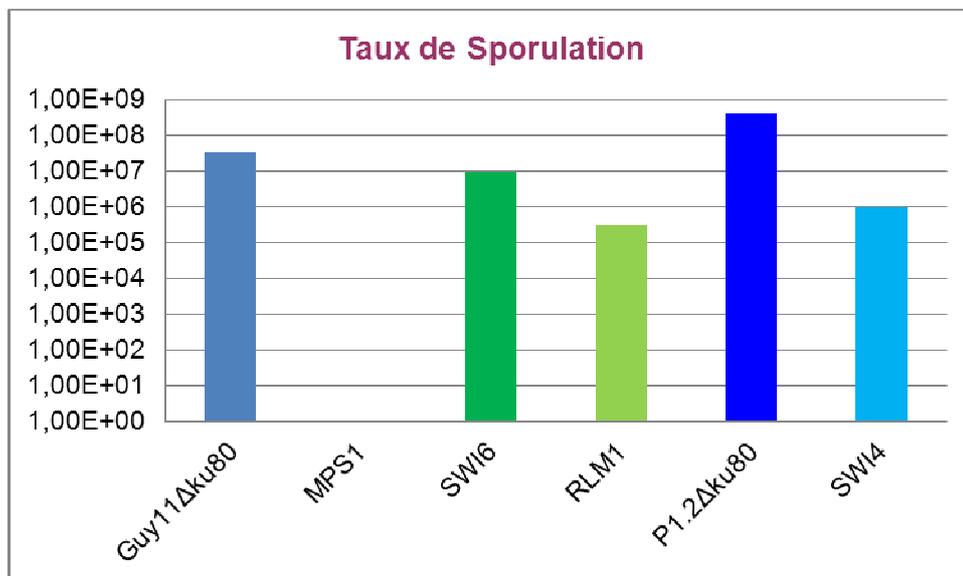


Figure 62: Taux de Sporulation des différents mutants en comparaison avec la souche sauvage *Guy11Δku80* et *P1.2Δku80*

### 2.2.3. Obtention des mutants nuls *Guy11Δku80Δrlm1*

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 réalisés. 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 *Guy11Δku80* de *M. grisea*. 8 transformants résistants à l'hygromycine ont été obtenus et repiqués sur milieu TNKYE additionné d'hygromycine à 120 µg/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

### *MgSWI4*, *MgSWI6* et *MgRLM1*

Après 7 jours de culture sur MM, les mutants sont examinés (Figure 61). Le mutant *P1.2Δku80Δswi4* montre une altération dans sa morphologie. En effet, il a une diminution de mycélium aérien. Le mutant *Guy11Δku80Δswi6* 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 *Guy11Δku80Δrlm1* 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 *P1.2Δku80Δswi4*, *Guy11Δku80Δswi6* et *Guy11Δku80Δrlm1* 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 *P1.2Δku80Δswi4*, une réduction de 40% chez le



mutant *Guy11Δku80Δswi6* et enfin, une réduction de 85% chez le mutant *Guy11Δku80Δrlm1*. La sporulation *in vitro* est donc fortement affectée chez ces mutants.

Le mutant *Δrlm1* 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 *Δrlm1* 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 *Δrlm1*, *Δswi4* et *Δswi6* afin de comparer leur cinétique de protoplastisation lors d'un traitement par le glucanex (1g/100ml) avec celle du mutant *Δmps1*. Ainsi il a été observé que, comme le mutant *Δmps1*, le mutant *Δswi6* et *Δswi4* commencent à produire des protoplastes dès la dixième minute de traitement enzymatique, et il atteint son plateau de production de protoplastes à 120<sup>ème</sup> minutes; tandis que la souche sauvage atteint son plateau de production à 240<sup>ème</sup> minutes. Leur Tp50 (temps correspondant à la formation de 50% des protoplastes, Tableau 14) est de 50 minutes. Ceci démontre que comme le mutant *Δmps1*, le mutant *Δswi6* est sensible aux enzymes de dégradation du glucanex. Par contre, le mutant *Δrlm1* 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 du glucanex. Une étude cytologique de la formation des protoplastes du mutant *Δrlm1* pendant des temps courts de traitements pourrait permettre de mieux comprendre cette différence de comportement du mutant par rapport à la souche sauvage et à *Δmps1*.

En conclusion, ces expériences montrent que les mutants *Δswi6* et *Δswi4* sont aussi hypersensibles aux enzymes du glucanex que le mutant *Δmps1*, tandis que le mutant *Δrlm1* présente une résistance à l'action de ces enzymes.

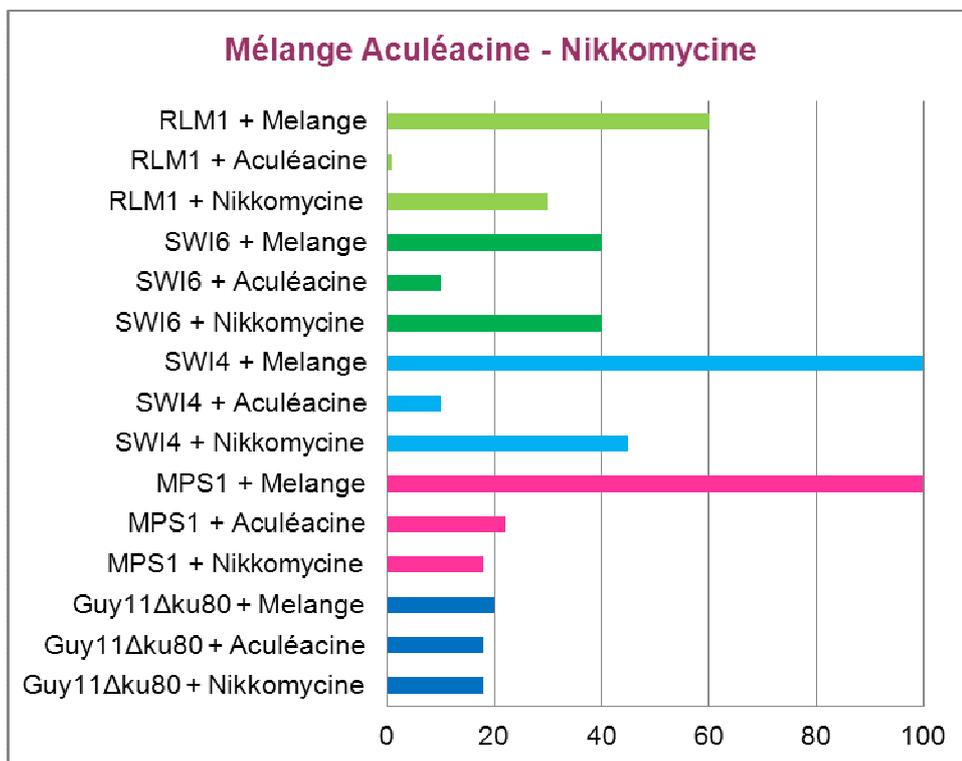


Figure 63: Représentation graphique des inhibitions avec un mélange d'Aculéacine et Nikkomycine à D120 sur la souche sauvage et les mutants *Guy11Δku80Δswi4*, *Guy11Δku80Δswi6* et *Guy11Δku80Δrlm1*. Le test a été réalisé avec 0.01 ppm de la nikkomycine et 0.001 ppm de l'aculéacine. D'après les mesures, aucune hypersensibilité n'a été détectée chez les autres mutants *Guy11Δku80Δswi6* et *Guy11Δku80Δrlm1*. Une hypersensibilité, comparable à celle du mutant *Guy11Δku80Δmps1* est détectée chez le mutant *Guy11Δku80Δswi4*.

	<b>Tp50 mutant / Tp50 sauvage</b>	<b>Sensibilité au glucanex</b>
<i>Guy11Δku80Δmps1</i>	50%	2X HS
<i>Guy11Δku80Δswi6</i>	50%	2X HS
<i>Guy11Δku80Δrlm1</i>	100%	Retardé temps courts
<i>P1.2Δku80Δswi4</i>	50%	2 HS

Tableau 14 : Cinétique des mutants *Guy11Δku80Δmps1*, *Guy11Δku80Δswi6*, *Guy11Δku80Δrlm1*, *P1.2Δku80Δswi4* et les souches sauvages *Guy11Δku80* et *P1.2Δku80*. 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 *MgSWI4*, *MgSWI6* et *MgRLM1* aux inhibiteurs de la biosynthèse de la paroi

Les tests réalisés avec le mutant *Guy11Δku80Δmps1* 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 *Guy11Δku80Δmps1* (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 *P1.2Δku80Δswi4*, *Guy11Δku80Δswi6* et *Guy11Δku80Δrlm1*. En revanche, une hypersensibilité à la nikkomycine, comparable à celle du mutant *Guy11Δku80Δmps1* est détectée chez le mutant *P1.2Δku80Δswi4* (3X) et *Guy11Δku80Δswi6* (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 *Guy11Δku80Δswi6* et *Guy11Δku80Δrlm1*. Par contre, le mutant *P1.2Δku80Δswi4* reproduit la même hypersensibilité au mélange que *Guy11Δku80Δmps1*. Ce gène semble avoir un rôle important dans l'intégrité de la paroi.

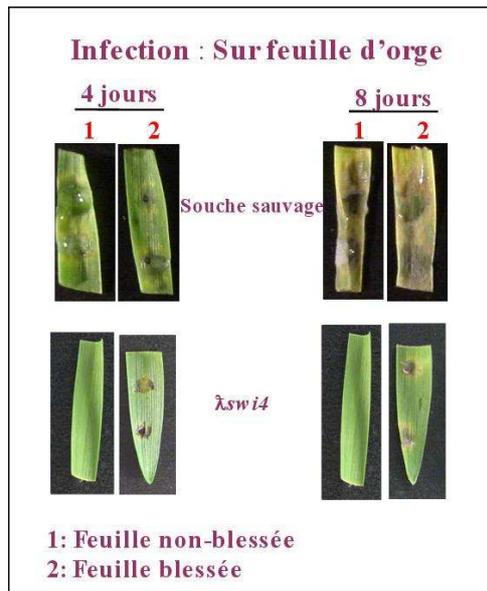


Figure 64 : Test d'infection, sur feuille d'orge coupée du mutant *P1.2Δku80Δswi4*. Le test est réalisé sur feuille blessée et non blessée. Le mutant *P1.2Δku80Δswi4* ne cause aucune lésion sur une feuille d'orge non blessée. Cependant, sur une feuille blessée, il y a certaines lésions (moindre que sur les feuilles infectées par la souche sauvage *P1.2Δku80*)



Figure 65 : Test d'infection, sur feuille d'orge mutant *P1.2Δku80Δswi4*. Le test est réalisé par vaporisation d'une solution de  $3.10^4$  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: *P1.2Δku80Δswi4* ectopique

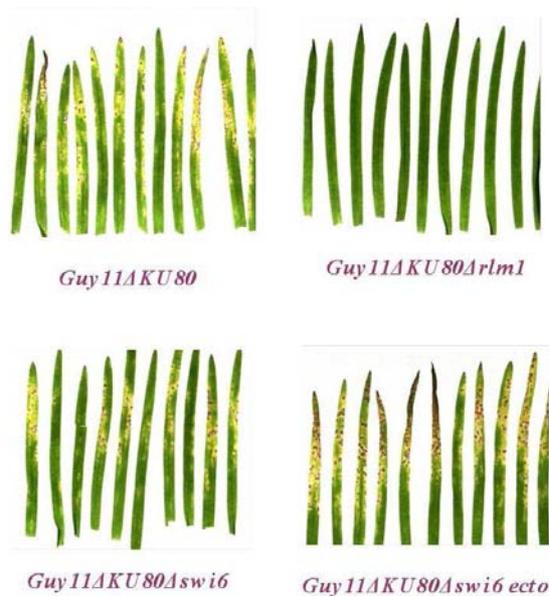


Figure 66: Test d'infection, sur feuille d'orge mutant *Guy11Δku80Δswi6* et *Guy11Δku80Δrlm1*. Le test est réalisé par vaporisation d'une solution de  $3.10^4$  spores/ml. Le mutant *P1.2ΔKU80Δswi6* a une diminution de pouvoir pathogène de 35% par rapport à la souche sauvage *P1.2Δku80*. *Guy11Δku80Δrlm1* 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 *P1.2Δku80Δswi4* présente un défaut de sporulation comme le mutant *P1.2Δku80Δmps1*, des implants de mycéliums de la souche parentale et du mutant *P1.2Δku80Δswi4* 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 *P1.2Δku80Δswi4* (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 *P1.2Δku80Δswi4* et une suspension sans G6P pour les autres mutants *Guy11ΔkuU80Δswi6* et *Guy11Δku80Δrlm1*. Les résultats mettent en évidence une réduction de 90% pour le mutant *P1.2Δku80Δswi4* comparé à la souche sauvage *P1.2Δku80* et une réduction de 35% pour le mutant *Guy11ΔkuU80Δswi6* comparé à la souche sauvage *Guy11Δku80*. Enfin une réduction de 100% a été observée pour *Guy11Δku80Δrlm1* (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 C039 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) :

	C039	Maratelli	Sariceltik
<i>Guy11Δku80</i>	38*	35	36
<i>Guy11Δku80Δmps1</i>	0	0	0
<i>Guy11Δku80Δswi6</i>	25	14	16
%Réduction <i>Δswi6</i>	-34%	-60%	-55%
<i>Guy11Δku80Δrlm1</i>	1	0	0
%Réduction <i>Δrlm1</i>	-100%	-100%	-100%

Tableau 15: Pathogénie des mutants *Guy11Δku80Δswi6* et *Guy11Δku80Δrlm1* pour le riz

\* Nombre de lésions par feuille provoquées par les mutants *Guy11Δku80Δswi6* et *Guy11Δku80Δrlm1* sur des feuilles de riz 7 jours après inoculation, ( $3.10^4$  spores/ml). Le mutant *Δrlm1* est non pathogène. Le mutant *Δswi6* 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 *P1.2Δku80Δswi4*, *Guy11Δku80Δswi6* et *Guy11Δku80Δrlm1***

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 *P1.2Δku80Δswi4* forment des appressoria et ainsi que des hyphes de pénétration qui ne pénètrent pas. 86% des spores du mutant *Guy11Δku80Δswi6* se différencient en appressoria qui forme des hyphes de pénétrations qui pénètrent. Par contre, seulement 13% des spores du mutant *Guy11Δku80Δrlm1* se différencient en appressoria.

```

          *          20
M.grisea.c : F C S L C K R E T R Y N L R S H L R T H : 23
S.cerevisiae : F C D V C K R E T R Y N L R S H L R T H : 23
          F C 6 C K 4 E T R Y N L 4 S H L R T H

```

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. cerevisiae* (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 sclérotas 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), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Ca<sup>2+</sup>, Li<sup>+</sup>) sont affectées chez les mutants nuls Bccrz1. Les mutants sont hypersensibles aux enzymes de dégradation (glucanase et  $\beta$ -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 homologues de MgCrz1 chez différents champignons analysés. L'alignement de ces 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).

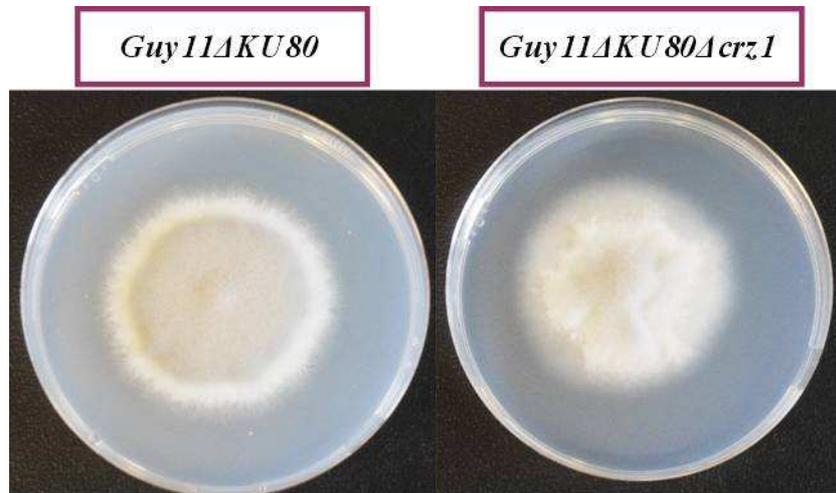


Figure 68 : Phénotype mycélien du mutant *Guy11Δku80Δcrz1* comparé à la souche sauvage *Guy11Δku80*

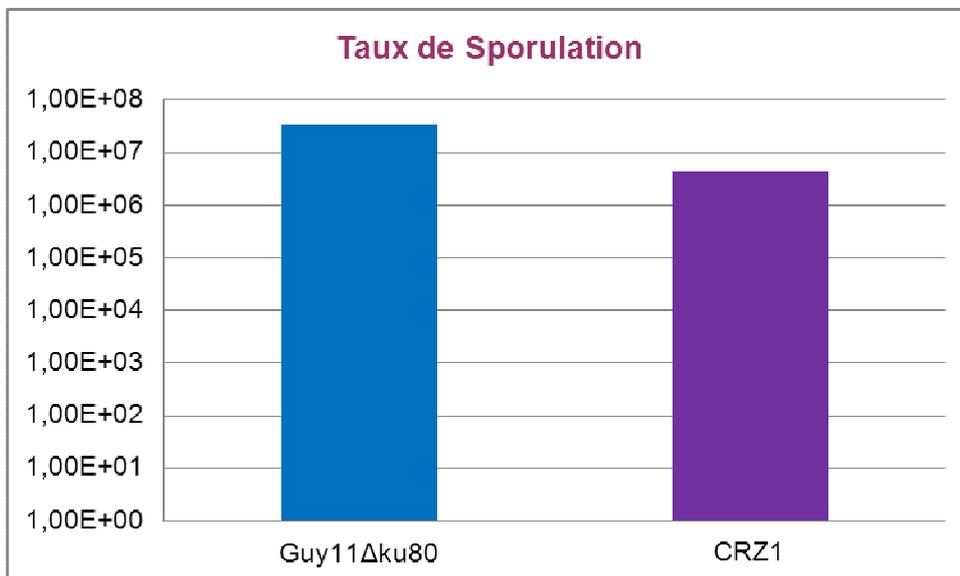


Figure 69 : Taux de sporulation chez le mutant *Guy11Δku80Δcrz1* comparé à la souche sauvage : Le mutant *Guy11Δku80Δcrz1* a, seulement, 22% de diminution de sporulation

### 3.2. Construction de mutants nuls *Guy11Δku80Δcrz1*

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 cassette de 3358 nt a été introduite par transformation dans des protoplastes de la souche *Guy11Δku80* 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 *sGuy11Δku80Δcrz1* (T8 et T15) a été choisi, ainsi qu'un transformant ectopique (T11).

### 3.3. Croissance, morphologie et sporulation du mutant nul *Guy11Δku80Δcrz1*

L'analyse morphologique des mutants a été réalisée avec les différents transformants obtenus. Les résultats étant identiques pour tous les mutants *Guy11Δku80Δcrz1*, 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 *Guy11Δku80Δcrz1* 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  $\Delta crz1$  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 (*Guy11Δku80*), soit de différences dans les méthodes et de milieux de cultures (peu probable). La sporulation du mutant *Guy11Δku80Δcrz1* 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 *Guy11Δku80*. 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) qui présente une forte réduction de sa 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 *Guy11Δku80*. 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).

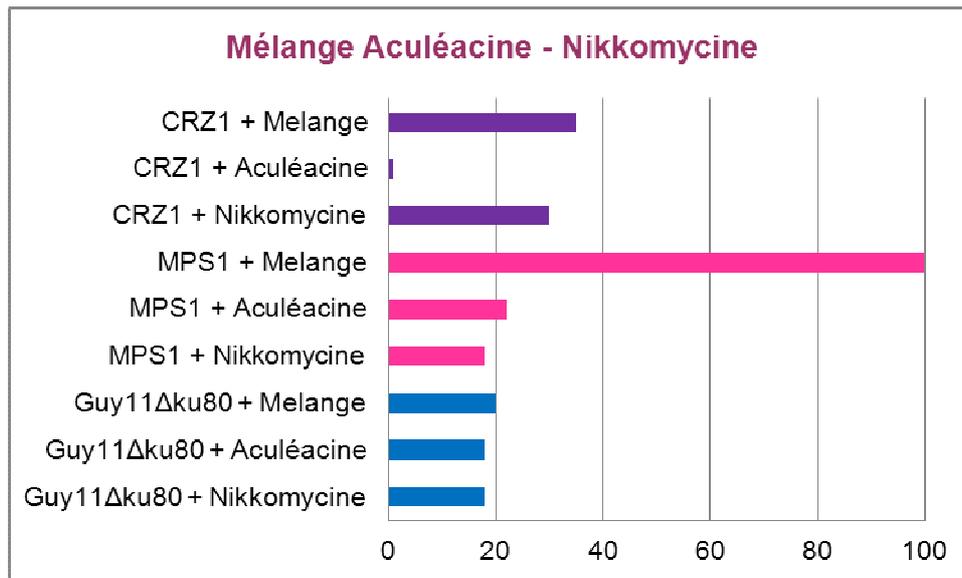


Figure 70 : Représentation graphique des inhibitions avec un mélange de l'aculéacine et de la nikkomycine à DI20 sur la souche sauvage et le mutant *Guy11Δku80Δcrz1*. Le test a été réalisé avec 0.01 ppm de la nikkomycine et 0.001 ppm de l'aculéacine. D'après les mesures, aucune synergie n'a été détectée chez le mutant *Guy11Δku80Δcrz1*

Le mutant *Guy11Δku80Δmps1* est 2 fois plus hypersensible que la souche sauvage à l'enzyme de dégradation, le glucanex contrairement au mutant *Guy11Δku80Δcrz1* est 2 fois plus résistant. Les deux gènes *CRZ1* et *MPS1* sont importants pour l'intégrité cellulaire.

	<b>Tp50 mutant/ Tp50 sauvage</b>	<b>Sensibilité au glucanex</b>
<i>Guy11Δku80Δmps1</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 *Guy11Δku80Δcrz1* 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 *Guy11Δku80Δcrz1*, en utilisant le mélange d'aculéacine (0.001ppm) et la nikkomycine (0.01 ppm ; Figure 70). Le mutant *Guy11Δku80Δcrz1*, 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 *Δcrz1*

### 3.5.1. Pouvoir pathogène du mutant *Guy11Δku80Δcrz1* 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. Après 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).

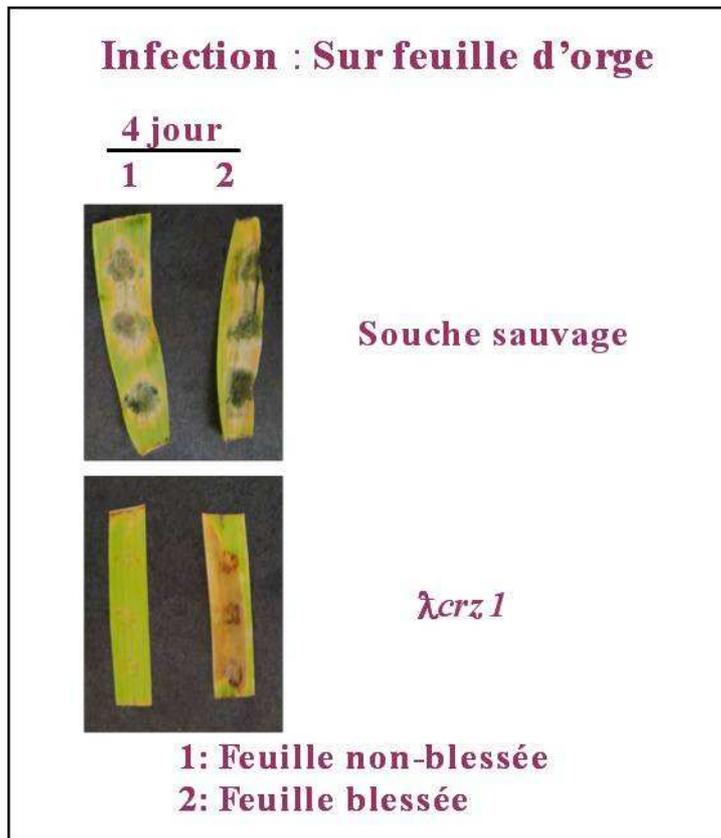


Figure 71 A : Photo d'infection sur feuille d'orge coupée du mutant du mutant *Guy11 $\Delta$ ku80 $\Delta$ crz1* et la souche sauvage *Guy11 $\Delta$ ku80*. Le test est réalisé sur feuille blessée et non blessée. Le mutant *Guy11 $\Delta$ ku80 $\Delta$ crz1* ne cause aucune lésion sur une feuille d'orge, 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 $\Delta$ ku80 $\Delta$ crz1* et la souche sauvage *Guy11 $\Delta$ 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>Guy11Δku80</i>	75*	36
<i>Guy11Δku80Δcrz1</i>	3	4
<b>%Réduction</b>	- 96 %	- 90 %

Tableau 17 : Pathogénie du mutant *Δcrz1* pour le riz

\*Nombre de lésions par feuille provoquées par le mutant *Δcrz1* sur des feuilles de riz 7 jours après inoculation, ( $3.10^4$  spores/ml). Le mutant *Δacrz11* 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 *Δcrz1*

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 *Δcrz1*. 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 *Δcrz1* 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  $\alpha$ -(1-3) glucanes sont des composants importants de la paroi cellulaire des champignons synthétisés par des  $\alpha$ -(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  $\alpha$ -(1-3) glucane synthases ont été identifiées chez les champignons ascomycètes, basidiomycètes et arché-ozomycètes, 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  $\alpha$ -(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  $\gamma$  (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  $\alpha$ -(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 *AnMPK1* (équivalente à la voie *MgMPS1* ; Fujioka, *et al.* 2007).

Un seul de gène encodant une  $\alpha$ -(1-3) glucane synthase a été identifié dans le génome de *M. grisea* (*AGS1* ; Fujikawa *et al.* 2009). L'immuno-détection des  $\alpha$ -(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  $\alpha$ -(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  $\alpha$ -(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  $\alpha$ -(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

```

S.pombe : DVTLLDHLGSLIDQWRSTIIRAHHERGMYLVDVITVATLGGDLTGVMVGHINDTSVVDENLNBYNAMNKTSEYRYVDFEFTNYYNNSCEYPRFWEBCD : 94
M.grisea.a : DVTLLDRLHFGDIKMQKFTIQATHDRGMVYIIDQTMATMGDLGFEHGLNDST--PETERKHKVVKRS-SRRLDLDIIGNDINPTCNIEVVEYNENG : 92
D T6LD H G I W TI A6H RGMV666D T6AT6GDL6G GHIND33 F E 6WK3 RY6DF N YN 3C YP F5 E1G

S.pombe : GPVSLD---FKGCYVSDYDHYGDTFAFCSHPDWRQLSKFASVQDRRLRDMKPDVAEKMLHLSCLVTSMLDVGFRIDKATQMTADFIVDMSMYV : 185
M.grisea.a : FEPVLAELSLKIKGCYNSDDPCYGDLEAPGVFEDWRQLAKFASVQDRRLRDMKESVMARLKVFSCLAIQMLDGDYRIDKAMQVTLQAQAEWSSAM : 187
P 3 2 KGCY SD5D YGD EAPG PDW RQL KFASVQDRRLR W P V 4L SCL I MLD DGSRIDKA Q6T W8 6

S.pombe : EPCAAYNKKNFLLVGYEYTSSSSYVLIATLEYDIDDWKIRIKIGGLGVMAQLMAQHLRHE-DLVWVVPVCGDVVYF-EAEEASPIE---VKLIDQ : 275
M.grisea.a : RACAEVKGKDNFMVVGBIT-SGNKVLIAATMEYNIIDWKISIKIGGLGVMAKLMSTALPE-CDLIWVVEVVDVVEYF----DTEASMFVNIWGS : 276
R CA K NF66VGE6T S VLIAT6EYI1 DWKI IKIGGLGVMA LM L H D66WVVP VGDV YP 3P E V I6

S.pombe : TYTINMYHHYLDNIRYVLLDAPVFRQTSKBPYPARMDDLSATFVSAWNOCTIABVIRR--NPTDIYHINDYHGALAPCYLLPDIIPCALS LHNA : 368
M.grisea.a : SYEVRVQYHHEHTYVLLDAPVFRQTRADPYIARMDDLSGILYAAWNSCIAAIRR--ESPDIYHINDYHGAAABL YLLPQTIEVCLSLHNA : 369
3Y 6 V HY NI YV6LDAPVFR QT PY ARMDD6 S I Y AWN CIAE IRR DIYHINDYHGA AP YLLP IP LSLHNA

S.pombe : EPOGLWPLRTPEEKEEVCAVYNIISQ-RVCTRYVQPGNVENLLHAAVSYVNEKYDILLVFGVGRNRSQKGDILLIADIPSLLE-SYKVLQIIVGPIID : 461
M.grisea.a : EPOGLWPMRTPEESKEVCEVFGIAPETVIOYVOYGAVENLLHAG---ADPDADLIVFGVGRNRSQKGVLDLIADIPSVLBRKYEKQLIIVGPEVID : 460
EPQGLWPGRTPEE EVC V5 6 T YVQ5G VFNLLHA 1 DL VFGVGRNS QKG6DLIADI P86LE K QLI VGP6ID

S.pombe : LYGKFAAEKLDVLOKYPTRVFSQREFTCLPPYIFSGADFALI PSRDEPPGLVAVE : 517
M.grisea.a : LYGKFAAEKLEKLOKYPTRVFSQREFTCLPPYIFSGAEFALI PSRDEPPGLVAVE : 516
LYGKFAA KL L KYP RVFS P FT LPPYIFSGA FALIPSRDEPPGLVAVE

```

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

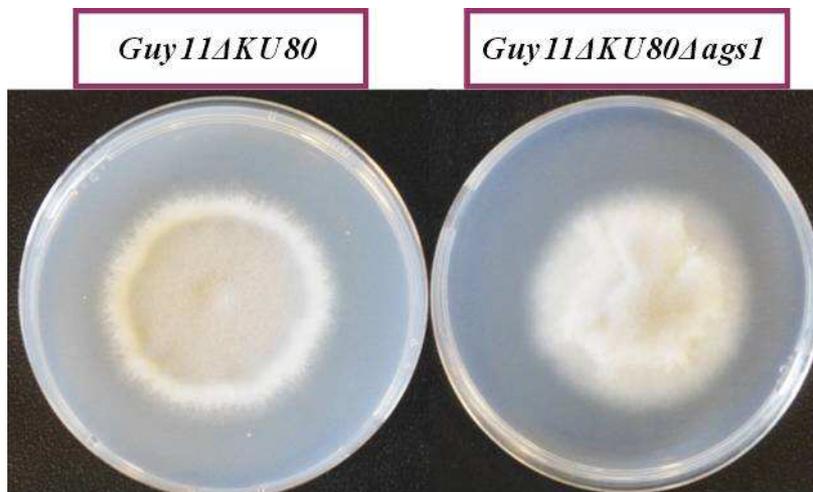


Figure 74 : Phénotype mycélien du mutant *Guy11ΔkuΔags1* comparé à la souche sauvage *Guy11Δku80*

catalytiques de la glucane synthase (Annexe 1). Ces domaines sont conservés entre MgAgs1 et l' $\alpha$ -(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. cerevisiae*, *C. albicans* et *A. gossypi* il n'y a pas de gènes encodant des  $\alpha$ -(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  $\alpha$ -(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  $\alpha$ -(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  $\alpha$ -(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 possédant qu'un seul gène codant une  $\alpha$ -(1-3) glucane synthase sont *B. cinerea*, *S. sclerotiorum*, et *Tuber melanosporum*.

#### 4.2. Construction de mutants nuls *Guy11 $\Delta$ ku80 $\Delta$ ags1*

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 cassette de remplacement de gène a été amplifiée (3949 nt) par PCR avec les amorces internes *ags1-8* et *ags1-9* et vérifiée par séquençage. Elle a été introduite par transformation dans des protoplastes de la souche *Guy11 $\Delta$ ku80* 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 *Guy11 $\Delta$ ku80 $\Delta$ ags1* (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 *Guy11 $\Delta$ ku80 $\Delta$ ags1*

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 $\Delta$ ku80 $\Delta$ 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

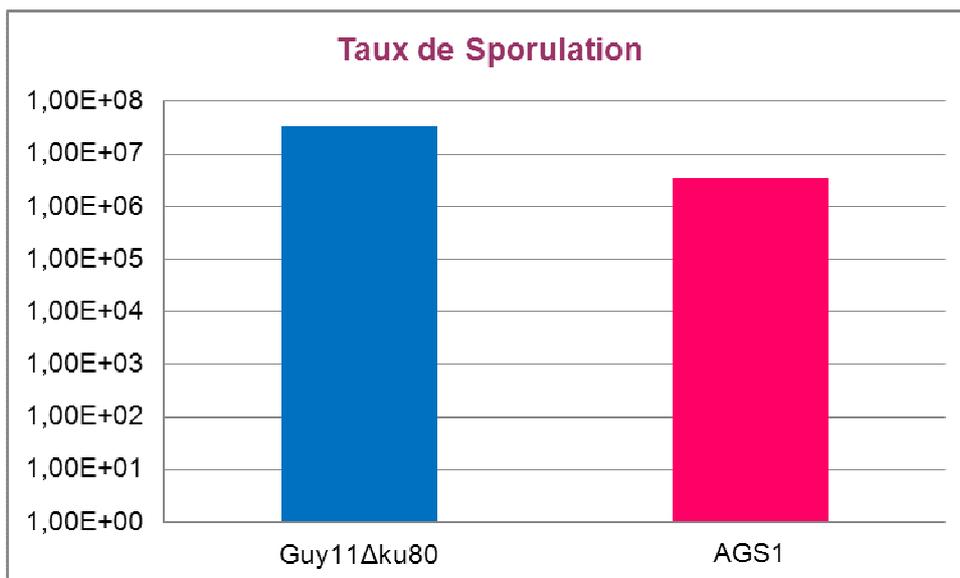


Figure 75 : Taux de sporulation chez le mutant *Guy11Δku80Δags1* comparé à la souche sauvage : Le mutant *Guy11Δku80Δags1* a 68% de diminution de sporulation

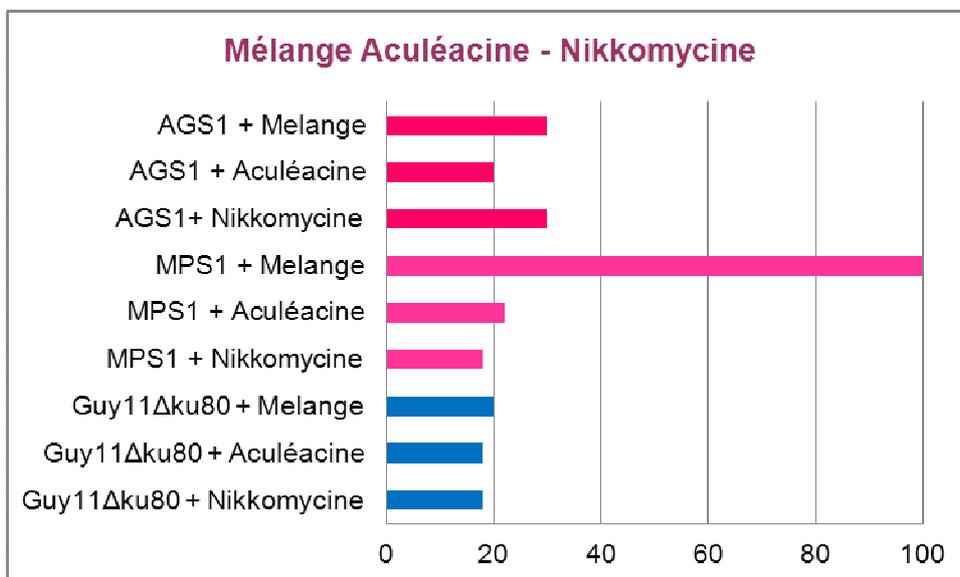


Figure 76 : Représentation graphique des inhibitions avec un mélange de l'aculéacine et de la nikkomycine à DI20 sur la souche sauvage et le mutant *Guy11Δku80Δags1*. Le test a été réalisé avec 0.01 ppm de la nikkomycine et 0.001 ppm de l'aculéacine. D'après les mesures, aucune synergie n'a été détectée chez le mutant *Guy11Δku80Δags1*

une croissance équivalente à la souche sauvage en milieu liquide. Le mutant *Guy11Δku80Δags1* présente une diminution de sa sporulation de -70%, par rapport à la souche sauvage *Guy11Δku80* (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 *Guy11Δku80Δags1*

Le test de protoplastisation a été réalisé en présence d'enzymes de dégradation des parois (Glucanex, 1g/100ml) avec le mutant *Δags1*, dans le but de comparer la cinétique de protoplastisation de ce mutant avec celui de la souche sauvage *Guy11Δku80* et du mutant *Δmps1*. Le mutant *Δags1* libère des protoplastes plus rapidement que la souche sauvage. Ainsi, le Tp50 (temps correspondant à la formation de 50% des protoplastes) du mutant *Δags1* deux fois plus court que celui de la souche sauvage (Tableau 18). La rapidité du mutant *Δags1* à produire des protoplastes pourrait provenir de modifications de sa paroi, le rendant plus sensible aux enzymes de dégradation du glucanex. Enfin, le mutant *Δags1* est aussi hypersensible à l'enzyme de dégradation du glucanex que le mutant *Δmps1*.

	<b>Tp50 mutant / Tp50 sauvage</b>	<b>Sensibilité au glucanex</b>
<i>Guy11Δku80Δmps1</i>	50%	2X HS
<i>Guy11Δku80Δags1</i>	50%	2X HS

Tableau 18: Cinétique de protoplastisation du mutant *Guy11Δku80Δags1*. 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 *Guy11Δku80Δags1* à un mélange d'aculéacine et de nikkomycine

La mesure de la sensibilité du mutant *Δags1* 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 *Δags1* 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  $\alpha$ -(1-3) glucane



*Guy11ΔKU80*



*Guy11ΔKU80Δags1*

Figure 77: Photo d'infections sur l'orge du mutant *Guy11Δku80Δags1* et la souche sauvage *Guy11Δku80*. Les photos sont prises à 7 jours. Les plantes sont infectées avec  $3.10^4$  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 *Δags1* 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 *Δags1* est aussi pathogène que la souche sauvage *Guy11Δku80* (Figure 77). Le pouvoir pathogène des mutants a ensuite été étudié avec le cultivar de riz Maratelli (Tableau 19). Ces expériences montrent le mutant *Δags1* présente une réduction de son pouvoir pathogène, car il ne forme que 50% des lésions provoquées par la souche sauvage.

	Maratelli
<i>Guy11Δku80</i>	35*
<i>Guy11Δku80Δags1</i>	14
<b>Réduction de pathogénie</b>	-50%

Tableau 19: Pathogénie du mutant *Δags1* pour le riz

\*Nombre de lésions par feuille provoquées par le mutant *Δags1* sur des feuilles de riz 7 jours après inoculation, (3.10<sup>4</sup> spores/ml). Le mutant *Δags1* 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 *MgAGS1* 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' $\alpha$ -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 *Δmps1*). Ils ont donc émis l'hypothèse que la non-pathogénie du mutant *Δmps1* pouvait découler de l'absence d' $\alpha$ -1,3-glucanes dans ses parois. Cette absence d' $\alpha$ -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  $\beta$ -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 deacétylaté au chitosane dans la paroi des hyphes infectieux pour éviter la génération de MAMPs chez certains champignons pathogènes de plante, par exemple chez *P. graminei* (pathogène de blé), *C. graminicola* (pathogène de maïs) (El Gueddari, *et al.* 2002). En fait, les oligomères de N-acetylglucosamine, 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  $\Delta$ ags1 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' $\alpha$ -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  $\alpha$ -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' $\alpha$ -1,3-glucane 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.

```

M.grisea.i : DTLTIERRRFRHSEEIQLLAVDTQSETGAGRLVVSYDAGQTAIVWDLMSGDEVARFASYEH-LTAAAMMRN-----GNV----- : 73
P.anserina : ---TIERRRFRHSEEVQLLAVDNQSDMGAGRLVVSYDAGQTAIVWDLITGDEVARFASYEN-LTAAAMMRNGNVAFG-NVQGNVLLPEPTTSEHL : 90
          TIERRF RHSEEGLLAVD QS  GAGRLVVSYDAGQTAIVWDL63DEVARFASYE  LT  AAMMRN          GNV

M.grisea.i : -----100-----*-----120-----*-----140-----*-----160-----*-----180-----* : 112
P.anserina : STRIDQIATTAISPVADCRTEAIGYQNGSLLIATLQPRETTIHNLVTSRGPSPIVTLSEWHASSAKQKTDMLAVQTDGDLRVMSSKAYNTDDE : 185
          WHASS 4QK3DMLAVQT  DGLDR6WSV  K  YN  DP

M.grisea.i : AKVVRILKKTENYLVGNWGMWSKNGRVI-QFSENETLS---WDVTRKHVTQDSIPSLER-VRGLAVYGPGLSLETLGANNNTVOQFD : 194
P.anserina : KVVVRLKRTENYLVGNWGMWSKNGRVI-QFSESEETIS---WDVTRKHVTQDTIPTLET-VRGLTVYGPGLSLETLGANNNTVOQFD : 267
          KVVVRLK4TENYL6GPNWGMWSKNGR6I  QFSE  ET6S  WDVTRKHVT  D3IP3LE  VRGL  VYGPGL  LFTLG  NNTVQQFD

```

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

## 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 *Guy11Δku80Δidc1*

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-*

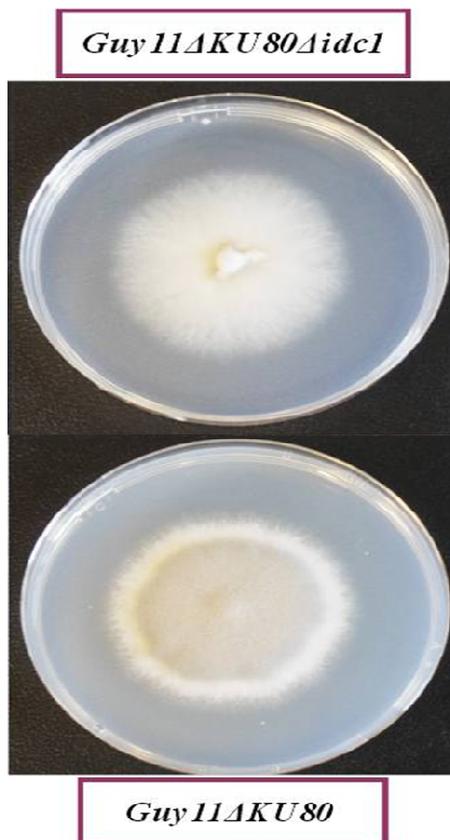


Figure 79: Phénotype mycélien du mutant *Guy11Δku80Δidc1* comparé à la souche sauvage *Guy11Δku80*. Le mutant *Guy11Δku80Δidc1* a une croissance normale comparée à la souche sauvage mais il a une diminution d'hyphe aérienne

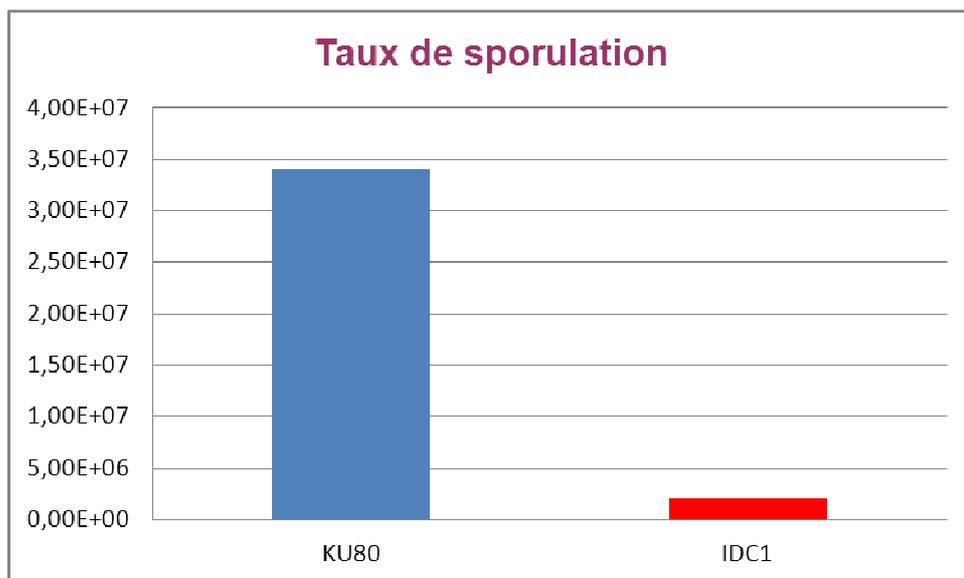


Figure 80 : Taux de sporulation chez le mutant *Guy11Δku80Δidc1*, comparé à la souche sauvage : Le mutant *Guy11Δku80Δidc1* a 50% de diminution de sporulation

13) de 956 nt. La cassette finale de 3000 nt a été introduite par transformation dans des protoplastes de la souche *Guy11Δku80* de *M. grisea*. L'analyse moléculaire des ADN<sub>g</sub> 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 *Guy11Δku80Δidc1* (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 *Guy11Δku80Δidc1*

L'analyse phénotypique des mutants *Δidc1* 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 *Guy11Δku80Δidc1.4* sont présentés. *Guy11Δku80Δidc1* 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 *Guy11Δku80Δmps1* (pas d'hyphes aériens, dépigmentation). Cependant ces défauts sont moins marqués que ceux du mutant *Guy11Δku80Δmps1*. Le mutant *Guy11Δku80Δidc1* présente aussi une diminution de sa sporulation de 50% par rapport à la souche sauvage (Figure 80). Par ailleurs, 74% des spores de *Guy11Δku80Δidc1* 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 *Guy11Δku80Δidc1*

Une mesure de la sensibilité du mutant *Guy11Δku80Δidc1* 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 *Guy11Δku80Δmps1* et de la souche sauvage *Guy11Δku80*. Le mutant *Guy11Δku80Δidc1* libère des protoplastes plus rapidement que la souche sauvage. Ainsi, le Tp50 (temps nécessaire à la formation de 50% des protoplastes) du mutant *Guy11Δku80Δidc1* est équivalent à celui du mutant *Guy11Δku80Δmps1* (Tableau 20) et ces valeurs sont deux fois moindre que celles de la souche sauvage. Ainsi, le mutant *Guy11Δku80Δidc1* est aussi hypersensible que le mutant *Guy11Δku80Δmps1* aux enzymes de dégradation présents dans le glucanex.

	<b>Tp50 mutant / Tp50 sauvage</b>	<b>Sensibilité au glucanex</b>
<i>Guy11Δku80Δmps1</i>	50%	2X HS
<i>Guy11Δku80Δidc1</i>	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

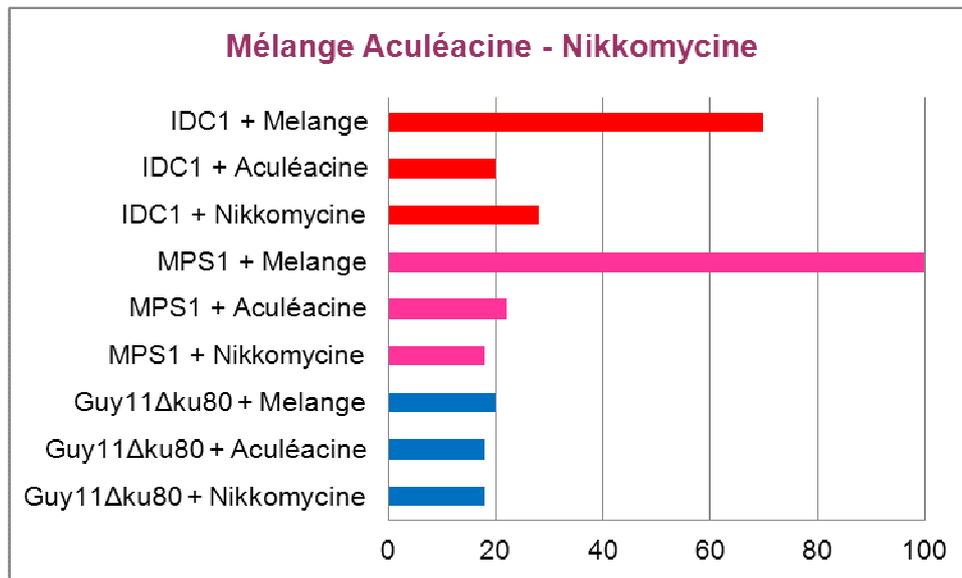


Figure 81: Représentation graphique des inhibitions avec un mélange de l'aculéacine et de la nikkomycine à DI20 sur la souche sauvage et le mutant *Guy11Δku80Aidc1*. Le test a été réalisé avec 0.01 ppm de la nikkomycine et 0.001 ppm de l'aculéacine. D'après les mesures, une inhibition de 70% a été détectée pour le mutant *Guy11Δku80Aidc1*



Figure 82: Photo d'infections sur l'orge du mutant *Guy11Δku80Aidc1* 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 63% est observée chez le mutant *Guy11Δku80Aidc1*

#### 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 *Guy11Δku80Δidc1* en présence de fongicides seuls ou en mélange, par rapport à celle observée chez la souche sauvage *Guy11Δku80*. L'inhibition de la croissance du mutant *Guy11Δku80Δidc1* en présence d'un mélange aculéacine/nikkomycine (0.001ppm/0.01ppm) est plus forte (70%) que celle détectée pour la souche sauvage *Guy11Δku80* (20% ; Figure 81). Le mutant *Guy11Δku80Δidc1* montre ainsi une forte hypersensibilité au mélange d'inhibiteur d'aculéacine et de nikkomycine, qui reste cependant inférieure à celle observée pour le mutant *Guy11Δku80Δmps1* (100% d'hypersensibilité). Ce résultat suggère que *MgIDC1* ait un rôle dans la réparation de la paroi en présence des inhibiteurs.

#### 5.5. Pouvoir pathogène du mutant *Δidc1*

Le pouvoir pathogène du mutant *Guy11Δku80Δidc1*, a été étudié dans différentes conditions et sur différentes plantes hôtes. Le pouvoir pathogène des mutants *Guy11Δku80Δidc1* 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 *Guy11Δku80Δidc1* par rapport à la souche sauvage *Guy11Δku80* (Figure 82). Le pouvoir pathogène des mutants vis-à-vis du riz a ensuite été étudié, en utilisant deux cultivars de riz, les variétés C039 et Maratelli qui sont sensibles. Les mutants *Guy11Δku80Δidc1* présentent une réduction du nombre de lésions de -55% (Tableau 21) équivalente à la réduction observée sur orge. Le mutant *Guy11Δku80Δidc1* présente une réduction de son pouvoir pathogène qui est quantitative et bien moindre que le mutant *Δmps1* (non pathogène).

	Orge	C039 - Riz	Maratelli - Riz
<i>Guy11Δku80</i>	75*	38	35
<i>Guy11Δku80Δ idc1</i>	19	18	15
<b>%Réduction</b>	-63%	-52%	- 57%

Tableau 21 : Pathogénie du mutant. *Guy11Δku80Δidc1*

\*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  $3.10^4$  spores/ml. Le mutant *Guy11Δku80Δidc1* présente une diminution de 50% du nombre de lésions.



### 5.6. Conclusion sur le mutant *Aidc1* chez *M. grisea*

Les mutants *Aidc1* 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 *Guy11Δku80Δmps1*. Les mutants *Guy11Δku80Δidc1* présentent aussi une diminution quantitative de leur sporulation (-47%), par rapport à la souche sauvage *Guy11Δku80*. Les mutants *Aidc1* 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 *Guy11Δku80Δmps1*. Enfin, le pouvoir pathogène des mutants *Guy11Δku80Δidc1* est diminué de 50% par rapport à la souche sauvage. L'ensemble de ces résultats montre que *MgIDC1* 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 *Guy11Δku80Δidc1* sont similaires à ceux du mutant *Guy11Δku80Δmps1*, mais sont quantitativement moins altérés que ceux du mutant *Guy11Δku80Δmps1*.

Chez *P. anserina*, le mutant *ΔPaidc1* 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 *ΔMgidc1* 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 *ΔPaidc1* présente les mêmes phénotypes que le mutant *ΔPampk1* (*PaMPK1* est l'orthologue de *MgMPS1*), ce qui n'est pas le cas du mutant *ΔMgidc1*. 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.

```

M.grisea.c : K Y H C D V C S V I I T S T V R I R C A H S A C N D Y D L C V N C F A Q C S S S S N H Q P W G A D E E L L L E G A E I Y G L G S W A D I A D H I G G Y R H K D E V R D H Y I N F T I D D T : 94
C.albicans : L F H C D V C S S D C T N R I R I Q C A -- I C T D Y D L C V P C F A A C L T T G D H K P W G A D E E L L L I Q C C E T S G L G N W A D I A D H I G - N R S K E V V A B H Y E K P L D I S H A : 92
5 H C D V C S D T 6 R I C A C D Y D L C V C F A G 3 3 1 H P W G A D E E L L L 6 2 G E G L G W A D I A D H I G R K E V H Y 6

100 * 120 * 140 * 160
M.grisea.c : E D L Q V L T P D E V R L C E L L R I Q P K P Y L M I K E O L L K E - A L K P N G T L K K K O A K E I C R L D N A R G S R I F E F F V N S G M V : 165
C.albicans : A D E L L S A B E K Q L C A T L R I L E K P Y L A I K N Q L M R E - A V K N N G V L K K K D A R C A L K I D V N R A S K I Y B E E V H M G W C : 163
D 2 6 L 3 E L C L R I P K P Y L I R Q L 6 4 E A 6 K N G L K K R A 4 2 4 6 D K S 4 I 5 E F F V G W

```

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

## 6. 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 transcriptionnel 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 *CaCAS5*

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<sup>e</sup>-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 montre que ces gènes sont orthologues puisque la phylogénie reconstruite à partir de ces séquences protéiques est identique à celles des espèces étudiées. De plus,



Figure 84: Phénotype mycélien du mutant *Guy11Δku80Δcas5* comparé à la souche sauvage *Guy11Δku80*. Le mutant *Guy11Δku80Δcas5* a une croissance équivalente comparée à la souche sauvage

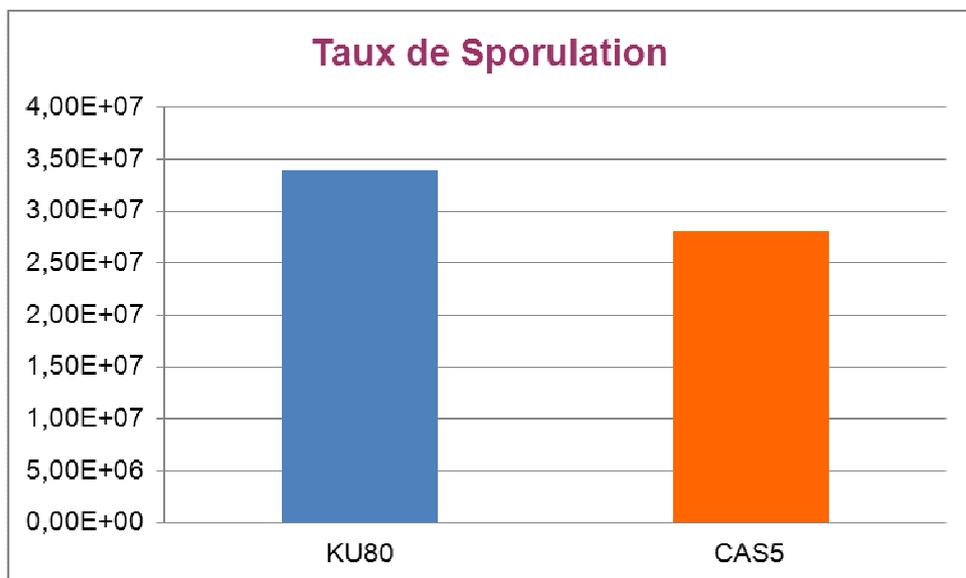


Figure 85 : Taux de sporulation chez le mutant *Guy11Δku80Δcas5*, comparé à la souche sauvage : Le mutant *Guy11Δku80Δcas5* a 18% de diminution de sporulation

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 cassette finale de 3315 nt a été introduite par transformation dans des protoplastes de la souche *Guy11Δku80* de *M. grisea*. L'analyse moléculaire des ADN<sub>g</sub> de 12 transformants a montré que 2 transformants (T4, T9) ne comportaient pas l'ORF du gène *MgADA2* (16% de fréquence de mutants) Ainsi, les deux mutants *Guy11Δku80Δada2* (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 *Guy11Δku80Δada2* 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 *Guy11Δku80Δcas52-9* sont présentés. *Guy11Δku80Δada2* 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 *Guy11Δku80Δada2* présente une sporulation semblable à celle de la souche sauvage (Figure 85). Pour l'ensemble de ces critères phénotypiques, le mutant *Guy11Δku80Δada2* est donc semblable à la souche sauvage et diffère donc aussi bien du mutant *Guy11Δku80Δmps1* que des mutants *Guy11Δku80Δswi4*, *Guy11Δku80Δswi6* et *Guy11Δku80Δrm11* qui présentent tous des morphologies différentes de la souche sauvage. Le mutant *Guy11Δku80Δada2* 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 *Guy11Δku80Δada2* en présence de fongicides seuls ou en mélange, par rapport à celle observée chez la souche sauvage *Guy11Δku80*. L'inhibition de la croissance du mutant *Guy11Δku80Δada2* en présence d'un mélange aculéacine/nikkomycine (0.001ppm/0.01ppm) est plus forte (45%) que celle détectée avec la souche sauvage *Guy11Δku80* (20%). Le mutant *Guy11Δku80Δada2* montre ainsi une certaine hypersensibilité au mélange d'aculéacine et de nikkomycine, qui reste cependant très inférieure à celle observée pour le mutant *Guy11Δku80Δmps1* (100% d'hypersensibilité).

Ce résultat suggère cependant que *MgADA2* ait un rôle dans la réparation de la paroi en présence des inhibiteurs (Figure 86).

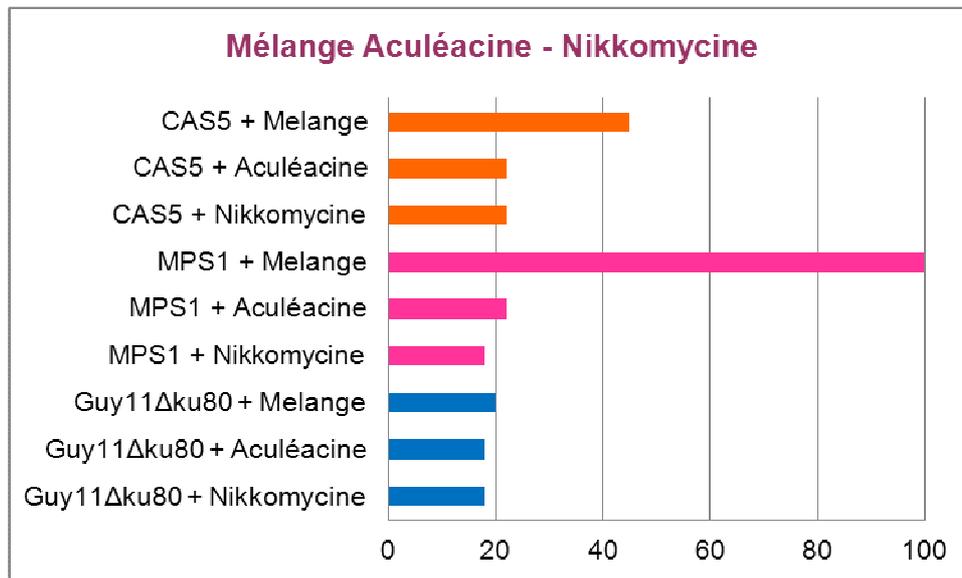


Figure 86 : Représentation graphique des inhibitions avec un mélange de l'aculéacine et de la nikkomycine à DI20 sur la souche sauvage et le mutant *Guy11Δku80Δcas5*. Le test a été réalisé avec 0.01 ppm de la nikkomycine et 0.001 ppm de l'aculéacine. D'après les mesures, une inhibition de 45% a été détectée pour le mutant *Guy11Δku80Δcas5*



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 *Δada2*

Le pouvoir pathogène des mutants *Δada2* 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 *Guy11Δku80Δada2* comparé à la souche sauvage *Guy11Δku80* (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 *Δada2*

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 MgADA2 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*.

```

      *           20           *           40           *           60           *           80           *
M.grisea.k : GCTNNDINLEHQLDCSLQMDVRESLQIHDGQE-RPCTP--TCGIIHSGNLLDCEIIVQEWENWRKVNHEFLDTRVPSPAMESKALGGSSSCASS : 92
S.cerevisiae : ECTNDITTHAEEDLEVSRENPKASERKIHGQEDLESMTGTSGLEFYGFOLMTLDQVAMTCAWRNV-----AKNENKRSQCGLS : 79
      CT ND6  E  L  S  P  V4 S  IHDGQE  6  3G6 5  L6  26V  2  WR  V  K  L  S  Q  S

      100           *           120           *           140           *           160           *           180
M.grisea.k : SRAEASSASPAENRFVNRQDLAKQDCVFPNSTQRVYSHPAWIPLVMDGNNLAIDLAPGPACTWGQVILFGRDYDTKYVVARSTSAFLA : 185
S.cerevisiae : HVTSTGSSSMERLNGNREKLPNIIPDKSIPPNVQVYVYHPAWIPLIDNACNHIQVDLAPGPNCKYAQLITFGRDFDTKFIENNGEFL : 172
      88 8  54  6  Q  6PPN 6Q  VY  HPAMIPL6  D  GN  6  6DLAPGP  G  5  Q6I  FGRD5DTK5V6A  W  FL

```

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

## 7. 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 :  $1E^{-41}$ ). 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 *Δknr4*

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 cassette de 3030 nt a été introduite par transformation dans des protoplastes de la souche *Guy11Δku80* 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 *P1.2Δku80*.



### 7.3. Conclusion sur le mutant *Δknr4*

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 *Guy11Δku80* et *P1.2Δku80*, qui permettent d'obtenir des mutants à haute fréquence (60-100%) à la plupart des loci de *M. grisea* (Villalba, *et al.* 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 al.* 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 (léthalité ou locus anti-recombinaison).

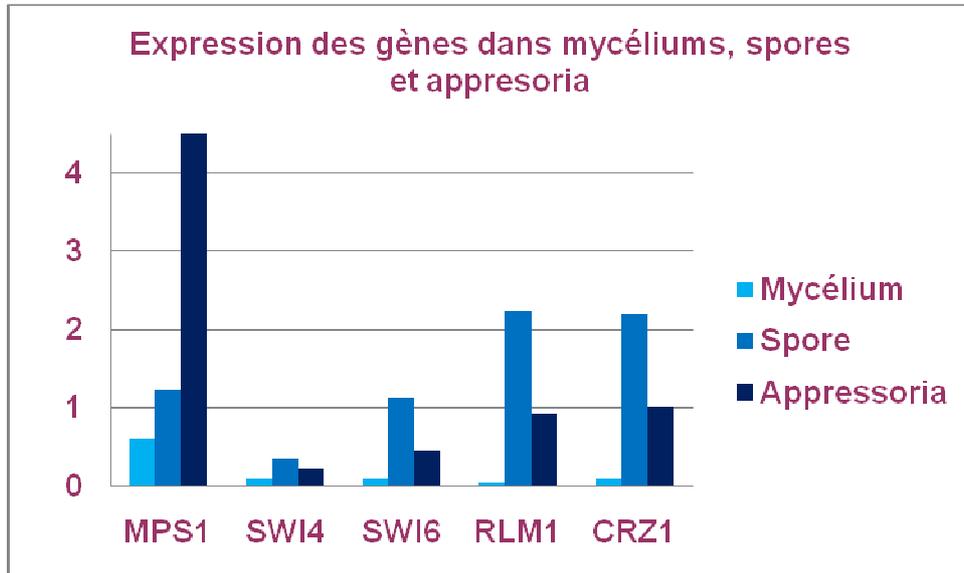


Figure 89: L'expression des gènes cible candidats dans la spore, le mycélium et l'appressorium

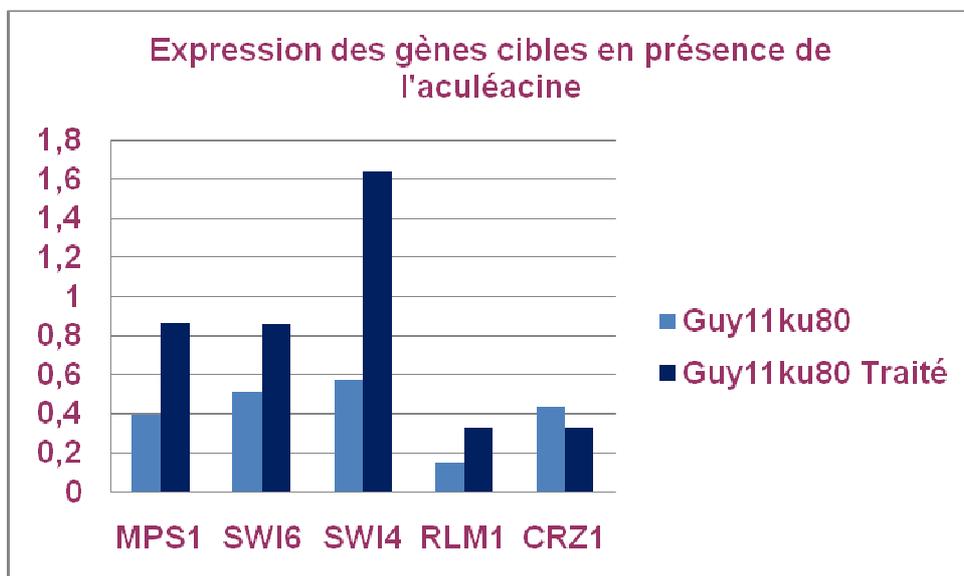


Figure 90: Représentation graphique des niveaux d'expression des gènes encodant les facteurs de transcription de la voie de signalisation de *MPS1*, chez *M. grisea*. L'analyse des expressions est réalisée chez la souche sauvage *Guy11Δku80*, traités et non traité par 0.001ppm de l'aculéacine

## 8. Analyse des réseaux de régulation transcriptionnelle contrôlés par *MgMPS1*

Nous avons utilisé deux approches afin d'étudier les réseaux de régulation transcriptionnelle contrôlés par *MPS1*. Tout d'abord nous avons étudié les profils d'expression des facteurs de transcription de cette voie (*SWI4*, *SWI6*, *RLM1*, *CRZ1*) 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 à déterminer 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 un 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 surexprimés 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) *SWI4*, *SWI6*, *RLM1* et *CRZ1* en présence ou en absence d'aculéacine (DI80) chez la souche

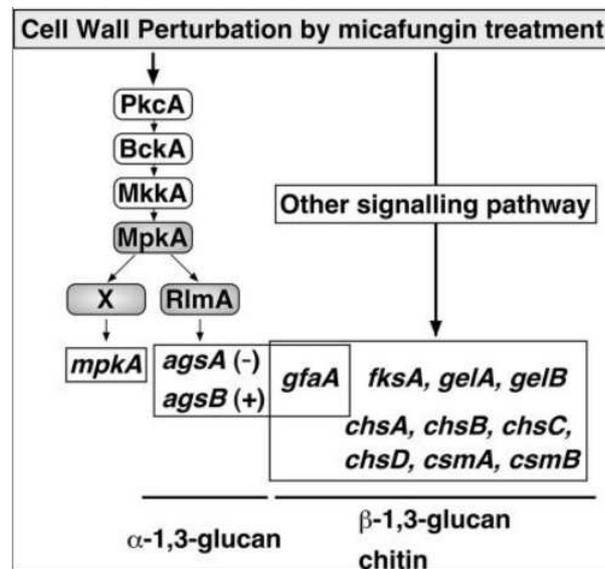


Figure 91: Modèle schématique de la régulation transcriptionnelle de *MPKA* et des gènes impliqués dans la paroi cellulaire par la voie de MAP kinase *MPKA* chez *A. nidulans*. (TomonoriFujioka, *et al.* 2007)

sauvage *Guy11Δku80*. 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 transcriptionnelle 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  $\beta$ -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  $\beta$ -1,3-glucosidase, *SPS100* encodant une protéine participant à la matrice glycoprotéique de la paroi (Law et Segall, 1988) et enfin une protéine mannostransférase (Mnn1).

Chez *A. nidulans*, la cascade de signalisation MAP Kinase contrôle l'induction de l'expression des gènes encodant  $\gamma$ -1,3-glucane synthase (*AGSA* et *AGSB*) en réponse de micafongine (Fujioka, *et al.* 2007 ; Figure 91). Le gène encodant la fructose-6-phosphate amidotransférase, *GFAA* (Glutamine:fructose-6-phosphate amidotransférase ; 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 *Guy11Δku80Δ 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 al.*, 2009), soit chez *A. nidulans* (*FKS1*, *CHS2*, *GFA1* : Fujioka, *et al.* 2007). *FKS1* code la sous-unité principale de la  $\beta$ -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  $\alpha$ -1-3 glucane synthase chez *M. grisea* (Fujioka *et al*, 2007). *GSK1* encode pour une protéine kinase qui inactive la glycogène synthase (Cartwright, 2005). Son expression, chez *M. grisea* semble être sous le contrôle de *MPS1*. En effet, chez le mutant  $\Delta mps1$ , *GSK3* est surexprimé, surtout, pendant un stress osmotique (Cartwright, 2005).

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

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

\* : Fujikawa, *et al* 2009

\*\* : Odenbach, *et al* 2009

\*\*\* : Cartwright, 2005

\*\*\*\* : Fujioka, *et al* 2007

### 8.2.2. Réponse transcriptionnelle 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.

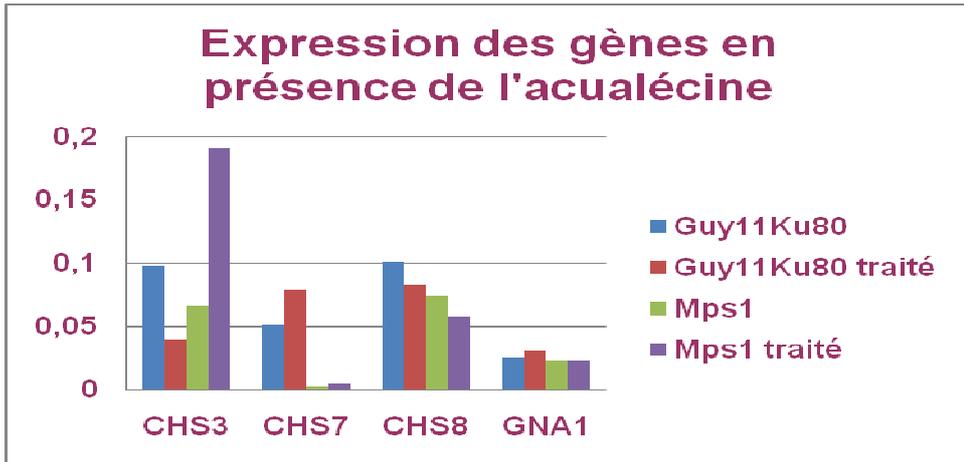


Figure 92A : Expression des gènes chez la souche sauvage *Guy11Δku80* et le mutant *Guy11Δku80Δmps1* traités et non traités par un traitement à l'acualécine à 0.001ppm

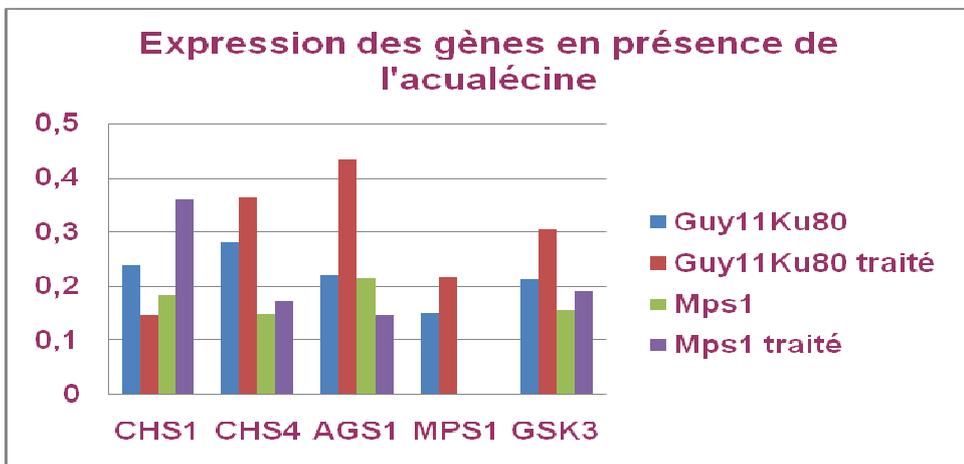


Figure 92B : Expression des gènes chez la souche sauvage *Guy11Δku80* et le mutant *Guy11Δku80Δmps1* traités et non traités par un traitement à l'acualécine à 0.001ppm

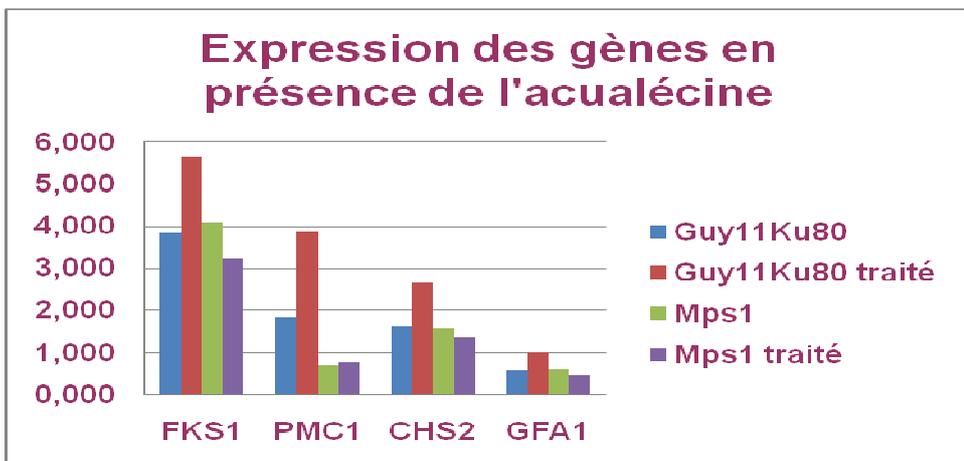


Figure 92C : Expression des gènes chez la souche sauvage *Guy11Δku80* et le mutant *Guy11Δku80Δmps1* traités et non traités par un traitement à l'acualécine à 0.001ppm

		<i>Guy11Δku80</i>		<i>Guy11Δku80Δmps1</i>		<i>MPS1</i> Dépendant
<b>A</b>	<i>CHS4</i>	1.2*	=	0.8**	=	
<b>A</b>	<i>CHS8</i>	0.8	=	0.8	=	
<b>A</b>	<i>GNA1</i>	1.2	=	1	=	
<b>B</b>	<i>CHS2</i>	1.4	↗	0.2	↘	<i>MPS1</i> Dépendant
<b>B</b>	<i>FKS1</i>	1.5	↗	0.6	↘	<i>MPS1</i> Dépendant
<b>B</b>	<i>AGS1</i>	1.5	↗	0.7	↘	<i>MPS1</i> Dépendant
<b>B</b>	<i>GFA1</i>	1.75	↗	1	=	<i>MPS1</i> Dépendant
<b>B</b>	<i>PMC1</i>	2.5	↗	1	=	<i>MPS1</i> Dépendant
<b>B</b>	<i>GSK3</i>	1.6	↗	1.3	=	<i>MPS1</i> Dépendant
<b>C</b>	<i>CHS3</i>	0.4	↘	1.8	↗	<i>MPS1</i> Dépendant
<b>C</b>	<i>CHS7</i>	0.4	↘	1.6	↗	<i>MPS1</i> Dépendant
<b>C</b>	<i>CHS1</i>	0.6	↘	2	↗	<i>MPS1</i> Dépendant
	<i>MPS1</i>	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 *Δmps1* traité par 0.001 ppm d'aculéacine pendant 1 heure / l'expression du mutant *Δmps1* non traité

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

- A. Les gènes indépendants de *MPS1*, dont l'expression est stable en présence de l'aculéacine : Ce groupe comporte les gènes dont leur expression ne change pas en présence d'un traitement à l'aculéacine, ni chez la souche sauvage, ni chez le mutant *Δmps1* : *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 *Δmps1* 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  $\beta$ -1,3 et  $\alpha$ -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 *Δmps1* 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 *Δmpka* (Fujioka, *et al.* 2007). Seule l'expression d'*AGSA* est dépendante de *MPKA* (orthologue de *MgMPST*). Chez la souche sauvage l'expression d'*AGSA* reste stable lors du traitement, contrairement observé chez le mutant *Δmpka*. 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 héli-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 héli-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	<i>Aspergillus nidulans</i>	+	+	+
			<i>Aspergillus oryzae</i>	+	+	+
		Dothideomycete	<i>Mycosphaerella graminicola</i>	+	+	+
			<i>Stagonospora nodorum</i>	+	+	+
		Sordariomycete	<i>Chaetomium globosum</i>	+	+	+
			<i>Fusarium graminearum</i>	+	+	+
			<i>Magnaporthe oryzae</i>	+	+	+
			<i>Neurospora crassa</i>	+	+	+
			<i>Podospora anserina</i>	+	+	+
		Leotiomycete	<i>Trichoderma reesei</i>	+	+	+
	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>		+	+	+	
	Saccharomycotina	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	+	
		<i>Yarrowia lipolytica</i>	-	-	+	
		<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	-	+	+	
Basidiomycete	Agaricomycotina	<i>Coprinus cinereus</i>	-	+	+	
		<i>Laccaria bicolor</i>	-	+	+	
	Pucciniomycotina	<i>Puccinia graminis</i>	-	+	+	
	Ustilaginomycotina	<i>Ustilago maydis</i>	-	+	+	
Other	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	-	+	+		
	<i>Phycomyces blakesleeana</i>	-	+	+		

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 morphogénèse ; 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/Slk2/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  $\alpha$ -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 basidiomycètes. Il est détecté chez tous les Pezizomycotina et il est absent 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 Slk2/Mps1 présentent un degré de conservation très variable suivant leur place dans la voie (Rispaill, *et al.* 2009). Ainsi les récepteurs membranaires sont les moins conservés. Mid2 et Zeo1 ne sont présents que les Saccharomycotina, 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, Slk2) 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 transcriptionnelle dépend de *MPS1* n'est présent que chez les Pezizomycotina et les Taphrinomycotina (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. Cette conservation différentielle est aussi observée dans le cas des autres cascades de signalisation

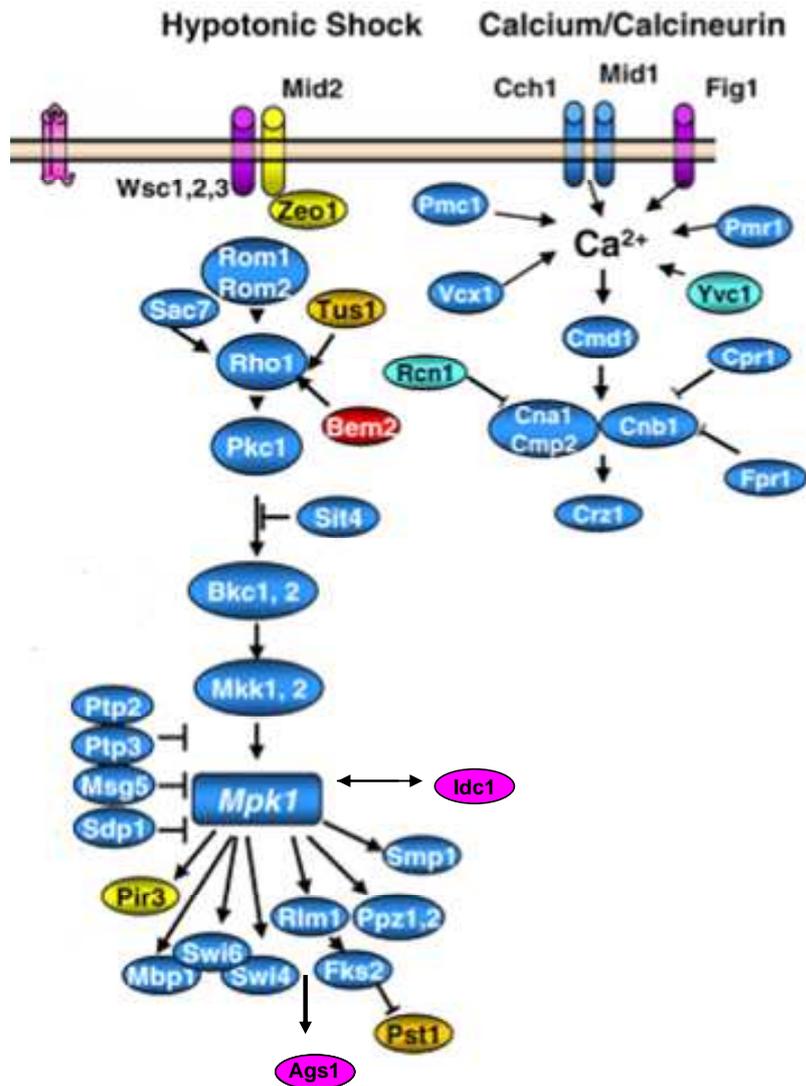


Figure 94 : Schéma de la cascade de signalisation Mpk1/Slit2 et la cascade de calcium : Les champignons analysés sont : *Saccharomyces cerevisiae*, *Ashbya gossypii* et *Candida albicans* (saccharomycotina), *Schizosaccharomyces pombe* (taphrinomucotina), *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium graminearum*, *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 basidiomycètes ; Vert : Les protéines détectées chez toutes les espèces sauf les zygomycètes et les taphrinomucotina ; Rouge : Les protéines détectées chez toutes les espèces sauf les sordariomycètes ; Violet : Les protéines détectées seulement chez les ascomycètes ; Jaune : Les protéines détectées seulement chez les saccharomycotina (Rispaill *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  $\Delta Scrlm1$  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 héli-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 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
<i>Guy11<math>\Delta ku80\Delta swi6</math></i>	55	1	2%
<i>Guy11<math>\Delta ku80\Delta rlm1</math></i>	8	7	88%
<i>Guy11<math>\Delta ku80\Delta crz1</math></i>	61	5	8%
<i>Guy11<math>\Delta ku80\Delta ags1</math></i>	20	11	55%
<i>Guy11<math>\Delta ku80\Delta ada2</math></i>	12	2	16%
<i>Guy11<math>\Delta ku80\Delta idc1</math></i>	17	8	47%
<i>Guy11<math>\Delta ku80\Delta knr4</math></i>	50	0	0
<i>P1.2<math>\Delta ku80\Delta mps1</math></i>	4	4	100%
<i>Guy11<math>\Delta ku80\Delta mps1</math></i>	12	8	67%
<i>P1.2<math>\Delta ku80\Delta swi4</math></i>	4	1	25%
<i>Guy11<math>\Delta ku80\Delta swi4</math></i>	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  $\Delta knr4$  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 $\Delta ku80$*  et aucun chez la souche *Guy11 $\Delta ku80$* . 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 $\Delta ku80$*  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 *Guy11Δku80*. 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 *Δmps1*

Le mutant *Guy11Δmps1* 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 *Δmps1* 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 *Guy11Δku80Δmps1*, 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 (*Guy11Δku80Δmps1* et *P1.2Δku80Δmps1*), 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 complété le mutant *Guy11Δku80Δmps1* avec l'ORF de *KU80*. Le nouveau mutant *Guy11Δmps1* ne sporule pas comme le mutant *Guy11Δku80Δmps1*. 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 CM	Mélanisation	Croissance	Pathogénie
<i>Guy11Δku80Δmps1</i>	Jin-Rong Xu, <i>et al.</i>	-99%	Absence	+	Absence
<i>Guy11Δku80Δmps1</i>	Cemile	Absence	Absence	+	Absence
<i>P1.2Δku80Δmps1</i>	Cemile	Absence	Absence	+	Absence

Tableau 25 : Tableau récapitulatif des phénotypes du mutant *Δmps1* 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 *Δmps1*. Le tableau 26 montre les phénotypes observés.

Souche	Morphologie mycélium aérien	Croissance mycélium	Mélanisation mycélium	Sporulation	Morphologie des spores	App
<i>Guy11Δku80Δmps1</i>	0	+	-	0	+	+
<i>P1.2Δ ku80Δmps1</i>	0	+	-	0	+	+
<i>Guy11Δ ku80Δswi6</i>	+	Arrêt de croissance tardif	+	(-60 %)	+	+
<i>P1.2Δ ku80Δswi4</i>	Réduction	+	+	(-95%)	+	+
<i>Guy11Δ ku80Δrlm1</i>	+	+	+	(-90%)	+	+
<i>Guy11Δ ku80Δcrz1</i>	+	+	+	(-20%)	+	+
<i>Guy11Δ ku80Δags1</i>	+	(- 10 %)	-	(-70%)	+	+
<i>Guy11Δ ku80Δada2</i>	+	+	+	(-20%)	+	+
<i>Guy11Δ ku80Δidc1</i>	+/-	+	+	(-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 *Guy11Δku80Δmps1* et *P1.2Δku80Δmps1* présentent d'importantes altérations de leur morphologie mycélium, leur mélanisation et de leur sporulation

Les mutants *Δswi4*, *Δswi6* et *Δrlm1* ne présentent des altérations morphologiques ou développementales aussi importantes que *Δmps1*. Cependant, le mutant *Δswi4* est celui qui ressemble le plus à *Δmps1* (réduction du mycélium aérien, diminution de la sporulation de 95%). Les phénotypes du mutant *Δswi6* sont très différents de *Δmps1*. En effet, il présente un phénotype, qui n'est pas observé chez *Δmps1*, qui correspond à un arrêt de croissance tardif du mycélium (5-6 jours) sans modifications morphologiques. Enfin, le mutant *Δrlm1* est très altéré dans la sporulation (diminution de 90%), comme les mutants *Δswi4* et *Δmps1* mais la ressemblance avec ces mutants est limitée à ce phénotype.

Mutant	Obtenu par	Sporulation	Mélanisation	Croissance
<i>ΔMgrlm1</i>	Cemile	Réduction	+	+
<i>ΔMgmps1</i>	Cemile	Absence	Absence	+
<i>ΔAnrlma</i>	Fujioka, et al. 2007	+	+	+
<i>ΔAnmpka</i>	Valiante, et al. 2007	+	Réduction	Réduction

Tableau 27: Tableau récapitulatif des phénotypes des mutants *Δrlm1* et *Δmps1* chez *A. nidulans* et *M. grisea*

Chez *A. nidulans*, le mutant *ΔAnrlma* sporule normalement comme le mutant *ΔAnmpka* (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 *Δmps1*. 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* contrôlèrent 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 *Δswi6* 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 transcriptionnel de *Swi4* (Kim, et al. 2010). En utilisant la technologie de double-hybride, il a



été démontré que Swi4 et Swi6 interagissent avec Mps1, suggérant l'existence d'un complexe SBF (Carltrith, 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 opposés 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 des 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 les gènes 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 *Guy111 $\Delta ku80\Delta idc1$*  présente une faible réduction des hyphes aériens et une faible réduction de sa sporulation. Ces phénotypes ressemblent à ceux du mutant  $\Delta mps1$ , 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  $\Delta mps1$ . Ces résultats sont différents de ceux obtenus chez *P. anserina*. Les phénotypes du mutant  $\Delta Paidc1$  sont identiques 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 oxydase, joue un rôle dans la localisation nucléaire de PaMpk1 en parallèle d'*IDC1* (Malagnac, et al. 2004). Ainsi, le mutant  $\Delta Panox1$ , 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 réalisée.



Mutant	Obtenu par	Sporulation	Mélanisation	Croissance	Crippled growht
<i>ΔMgidc1</i>	Cemile	-%55	Réduction	+	
<i>ΔMgmps1</i>	Cemile	Absence	Absence	+	
<i>ΔPaidc1</i>	Jamet-Vierny, <i>et al.</i>	NT	+	+	Présence
<i>ΔPampk1</i>	Kicka, <i>et al.</i> 2006	NT	Réduction	+	Présence

Tableau 28: Tableau récapitulatif des phénotypes des mutants *Δidc1* et *Δmps1* chez *P. anserina* et *M. grisea*

Le mutant *Δags1* 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 *Δmps1* et sont quantitativement moindre que ceux des mutants *Δrlm1* et *Δswi4*. 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 *ΔMgags1*. Cependant le mutant *ΔAfags3* 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
<i>ΔMgags1</i>	Cemile	Réduction	+	+/-	+
<i>ΔMgmps1</i>	Cemile	Absence	Absence	+	Absence
<i>ΔAfags1</i>	A. Beauvais, <i>et al.</i> 2004	Réduction	+	+	+/-
<i>ΔAfags2</i>	A. Beauvais, <i>et al.</i> 2004	Réduction	+	+	+/-
<i>ΔAfags3</i>	Maubon, <i>et al.</i> 2006	+	+	+	+
<i>ΔAfmpka</i>	Valiante, <i>et al.</i> 2007	+	Réduction	Réduction	Réduction

Tableau 29 : Tableau récapitulatif des phénotypes des mutants *Δags1* et *Δmps1* chez *A. fumigatus* et *M. grisea*

Enfin, les deux mutants *Δada2* et *Δcrz1* ne présentent aucun des phénotypes du mutant *Δmps1* 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  $\beta$ -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 *Δslt2* de ce type d'inhibiteurs. Chez *C. albicans*, le mutant *Δmkk1* (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 *Δslt2* présente une hypersensibilité de 4 fois à la caspofongine (Cristina Reinoso-Martín, *et al.* 2003). Le mutant *Δmps1* 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 *Δslt2/mps1* chez des champignons héli-ascomycètes, nous n'avons pas observé d'hypersensibilité nette du mutant *Δmps1* à l'aculéacine, la nikkomycine et la caspofongine.

Par contre nous avons pu mettre en évidence une hypersensibilité du mutant *Δmps1* de *M. grisea* à un mélange de la nikkomycine et de l'aculéacine. Ainsi, la croissance de mutant *Δmps1* 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 *Δmps1* (-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  $\alpha$  et  $\beta$ -(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 *Δmps1*, 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) ;

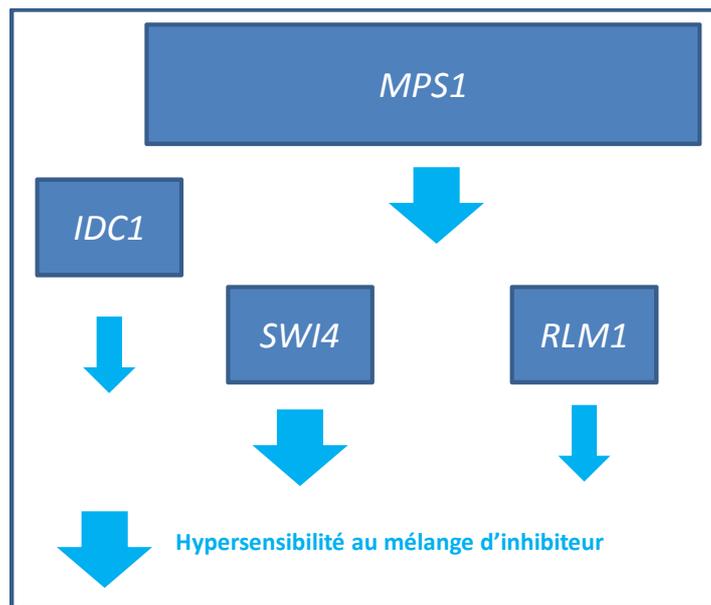


Figure 95: Schéma récapitulatif des fonctions des gènes analysés, dans la réparation de la paroi, en présence d'un mélange d'inhibiteur (Aculéacine - Nikkomycine): La largeur de la flèche indique le degré de l'implication du gène.

(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  $\beta$ -(1-3) glucanes.

Souche	Aculéacine DI20	Nikkomycine DI20	Acu-Nikko
<i>Guy11<math>\Delta ku80</math>Guy11</i>	18%	18%	25%
<i>Guy11<math>\Delta ku80\Delta mps1</math></i>	27%	18%	100%
<i>P1.2<math>\Delta ku80\Delta mps1</math></i>	27%	18%	100%
<i>P1.2<math>\Delta ku80\Delta swi4</math></i>	10%	58%	100%
<i>Guy11<math>\Delta ku80\Delta idc1</math></i>	20%	25%	70%
<i>Guy11<math>\Delta ku80\Delta rml1</math></i>	0%	22%	60%
<i>Guy11<math>\Delta ku80\Delta ada2</math></i>	22%	22%	42%
<i>Guy11<math>\Delta ku80\Delta swi6</math></i>	7%	35%	40%
<i>Guy11<math>\Delta ku80\Delta crz1</math></i>	0%	30%	35%
<i>Guy11<math>\Delta ku80\Delta ags1</math></i>	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  $\alpha$ -(1-3) glucanes chez *M. grisea*. Chez *A. fumigatus*, trois gènes *AGS* (*AGS1*, 2 3) ont été muté (Beauvais, *et al.* 2004). Le mutant  $\Delta$ *Afags1* présente une réduction significative en  $\alpha$ -(1-3) glucane dans sa paroi cellulaire. Par contre les mutants  $\Delta$ *Afags2* et  $\Delta$ *Afags3* ne présentent aucune modification de leur teneur en  $\alpha$ -(1-3) glucane. Seul  $\Delta$ *Afags1* 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  $\alpha$ -(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  $\alpha$ -(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  $\alpha$ -(1-3) glucanes pourraient 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 un mélange d'enzyme de dégradation dans la paroi fongique (1g/100ml).

	<b>Tp50 mutant / Tp50 sauvage</b>	<b>Sensibilité au glucanex</b>
<i>Guy11Δku80Δmps1</i>	50%	2X HS
<i>Guy11Δku80Δswi6</i>	50%	2X HS
<i>Guy11Δku80Δags1</i>	50%	2X HS
<i>Guy11Δku80Δidc1</i>	50%	2X HS
<i>Guy11Δku80Δrlm1</i>	100%	Retardé temps courts
<i>P1.2Δku80Δswi4</i>	50%	2X HS
<i>Guy11Δku80Δcrz1</i>	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 *Guy11Δku80*. La production de



protoplastes chez le mutant *Δmps1* est deux fois plus rapide (Tableau 31). Ceci démontre que la paroi des mutants *Δmps1* 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 *Δmps1* 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 *Δswi6* et *Δswi4* montrent la même sensibilité au glucanex. Ainsi, *SWI6* et *SWI4* semblent avoir un rôle important dans la réparation de la paroi en présence des enzymes de dégradation.

Les mutants *Δidc1* et *Δags1* sont deux fois plus hypersensibles que la souche sauvage à l'enzyme de dégradation, le glucanex comme le mutant *Δmps1*. Le mutant *Δidc1* 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 *Δags1* 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 *Δcrz1* montre une résistance à l'enzyme de dégradation de la paroi comme le mutant *Δswi4*. Ainsi une analyse transcriptomique pourrait réaliser, de même, sur le mutant *Δcrz1* 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 à 70% 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 *Δcrz1* présente une forte diminution de son pouvoir pathogène (-90%). Les phénotypes du mutant *Δcrz1* sont similaires à ceux de mutants équivalents obtenus par Jinhee Choi *et al.* (2009). En effet, ces auteurs avaient observé que leurs mutants *Δcrz1* 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 *Δags1* et *Δidc1* sont réduits 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 *Δada2* est aussi pathogène que la souche sauvage.

Souche	Diminution de Pathogénie Orge	Diminution de Pathogénie Riz
<i>Guy11Δku80Δmps1</i>	100%*	100%
<i>P1.2Δ ku80Δmps1</i>	100%	100%
<i>Guy11Δ ku80Δrlm1</i>	100%	100%
<i>Guy11Δ ku80Δcrz1</i>	95%	90%
<i>P1.2Δ ku80Δswi4</i>	90%	ND
<i>Guy11Δ ku80Δswi6</i>	70%	50%
<i>Guy11Δ ku80Δags1</i>	0%	50%
<i>Guy11Δ ku80Δidc1</i>	0%	50%
<i>Guy11Δ ku80Δada2</i>	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 *Δmps1* et *Δrlm1* et la forte réduction du mutant *Δswi4* pourrait être expliqué par le rôle de  $\alpha$ -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  $\alpha$ -1,3- glucane masque d'autres polysaccharides de la paroi cellulaire; en effet l'accumulation d' $\alpha$ -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  $\alpha$ -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' $\alpha$ -1,3-glucane a été rapporté dans un pathogène humain, le *H. capsulatum* dans lequel  $\beta$ -1,3-glucane est masqué par  $\alpha$ -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 *Δmps1* et *Δrlm1* 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 réalisée. Ainsi, les mutants *Δrlm1* et *Δmps1* pourraient créer des lésions.

Cependant, le mutant *Δags1* a une faible réduction du pouvoir pathogène. Ceci pourrait provenir de l'existence d'une autre protéine qu'Ag1, 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 *Δags1*, *Δrlm1* et *Δmps1*. 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 *Δags1*, *Δrlm1* et *Δmps1* pourrait élucider si la diminution du pouvoir pathogène des mutants est due à l'absence d' $\alpha$ -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 *Δmps1*

Les analyses transcriptionnelles 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 révélera 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 *Δmps1* 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  $\beta$ -1,3 et  $\alpha$ -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 chez <i>A. n</i>	Induction <i>A. n</i>	Induction <i>M. g</i>
<i>CHS2</i>	Chitine synthase 2	<i>CHSA</i>	<i>MPS1</i> indépendant	<i>MPS1</i> dépendant
<i>CHS4</i>	Chitine synthase 4	<i>CHS7</i>	<i>MPS1</i> indépendant	<i>MPS1</i> dépendant
<i>AGS1</i>	$\alpha$ -1,3-glucan synthase	<i>AGSA</i>	<i>MPS1</i> dépendant	<i>MPS1</i> dépendant
<i>FKS1</i>	1,3- $\beta$ -glucan synthase component	<i>FKS1</i>	<i>MPS1</i> indépendant	<i>MPS1</i> dépendant
<i>GFA</i>	glucosamine-fructose- 6-phosphate aminotransferase	<i>GFAA</i>	<i>MPS1</i> indépendant	<i>MPS1</i> dépendant

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),

	<b>Mycélium</b>	<b>Croissance mycélium</b>	<b>Sporulation</b>	<b>Paroi sensibilité Acu/Nikko</b>	<b>Paroi sensibilité Glucanex</b>	<b>Pathogénie</b>
<b>Souche sauvage</b>	Nombreux hyphes aériens	Normale	Normale	+	+	Normale
<i>Δmps1</i>	-	+	0	HS	HS	0
<i>Δswi4</i>	+/-	+	-95%	HS	R	-90%
<i>Δswi6</i>	+	Arrête tardif	-60%	+	HS	-50%
<i>Δrlm1</i>	+	+	-90%	60%	+	0
<i>Δidc1</i>	+/-	+	-50%	70%	HS	-50%
<i>Δags1</i>	+	-10%	-70%	+	HS	-50%
<i>Δcrz1</i>	+	+	-20%	+	R	-90%
<i>Δada2</i>	+	+	+	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 *Δmps1*. Surtout le mutant *Δswi4* est celui qui a des phénotypes quasi équivalents du mutant *Δmps1*. 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 *Δswi4* est résistant aux enzymes de dégradation de la paroi, la glucanex. Le mutant *Δswi6* a un phénotype différent de *Δmps1* : un arrêt de croissance du mycélium après quelque jour. Le mutant *Δrlm1* 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 *Δags1* 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 *Δada2* ne montre pas des phénotypes importants.

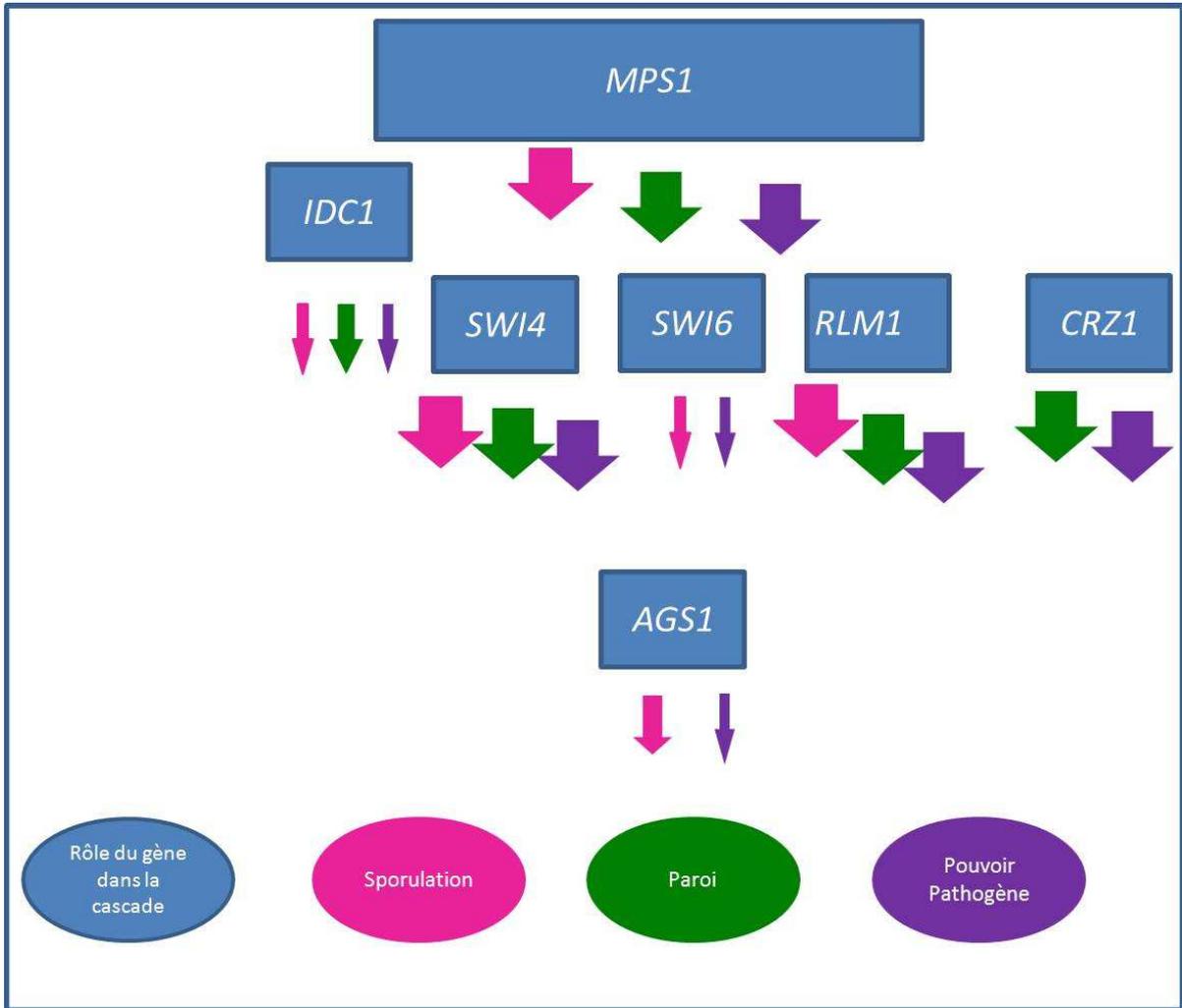


Figure 96: Schéma récapitulatif des fonctions des gènes analysés, dans la sporulation, hypersensibilité au mélange Aculéacine-Nikkomyicine et dans le pouvoir pathogène : La largeur de la flèche indique le degré de l'implication du gène.

Le mutant *Δcrz1*, facteur de transcription de la voie de Calcineurine, a un défaut important de pouvoir pathogène et il montre une résistance comme le mutant *Δswi4* aux enzymes de dégradation. Le mutant *Δidc1* montre les mêmes phénotypes que le mutant *Δmps1* mais ses phénotypes sont moins importants que ceux de *Δmps1*.

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 *SWI4*, *SWI6* 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 *SWI4*, *RLM1* et *IDC1* sont impliqués dans la réparation de la paroi cellulaire et le contrôle de l'intégrité cellulaire. De plus *SWI4*, *RLM1* et *IDC1* avec *CRZ1* sont impliqués dans la pathogénie. Enfin, *SWI4*, *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 *Δmps1* (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. *SWI6* 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 Slr2 chez *S. cerevisiae*

Chez *S. cerevisiae*, les mutants des gènes codant la voie Slr2, 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 *Δslr2* sont comparables à ceux observés chez le mutant *Δmps1*. 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 *Δslr2* de ce type d'inhibiteurs. Le mutant *Δslr2* présente une hypersensibilité de 4 fois à la caspofongine (Cristina Reinoso-Martín, *et al.* 2003). Le mutant *Δmps1* de *M. grisea* n'est que 2 à 3 fois plus sensible à l'aculéacine et à la nikkomyicine 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 émergent 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  $\Delta Scrlm1$  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 héli-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 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 de la paroi	Croissance	Pathogénie
<i>M. grisea</i>	<i>MPS1</i>	Absence	Aculéacine (2x), Nikkomycine (2x)	+	Absence
<i>M. graminicola</i>	<i>MGSLT2</i>	Réduit	Glucanase, Miconazol(2x), Imazalil (5x), cyproconazole (10x)	+	Réduit
<i>B. cinerea</i>	<i>BMP3</i>	Fortement Réduit	+	Réduit	Réduit
<i>F. graminearum</i>	<i>MGV1</i>	+	Driselase	+	Réduit
<i>A. fumigatus</i>	<i>MPKA</i>	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 Rispaïl, *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*.



#### IV. PERSPECTIVES

Afin d'identifier les cibles transcriptionnelles de *MPS1* une analyse du transcriptome du mutant *Guy11Δku80Δmps1* 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 transcriptionnelle des mutants *Δswi6*, *Δswi4*, *Δrlm1* sera entreprise afin de déterminer quels sont les cibles transcriptionnelles de ces facteurs de transcription communes avec celles de la voie Mps1. Cette analyse transcriptionnelle 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 *Δswi4* et *Δrlm1* ont un pouvoir de pathogénie fortement réduit. Par contre *Δags1* 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  $\alpha$ -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 transcriptionnelle 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 exprimer des 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.



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 *Δmps1Δcrz1* 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 *Δmps1* et *Δcrz1* 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 *Δcrz1*. De plus, le mutant *Δcrz1* 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

<b>ANNEXE 1</b>	1 - 37
<b>Identification des domaines fonctionnels et alignements des gènes étudiés</b>	1
<b>1. Protéine Mps1</b>	1
<b>1.1. Identification des domaines fonctionnels de Mps1</b>	1
<b>1.2. Alignement avec les séquences orthologues de MgMps1</b>	2
<b>1.3. Arbre Phylogénique</b>	3
<b>2. Facteur de Transcription Swi4</b>	4
<b>2.1. Identification des domaines fonctionnels de Swi4</b>	4
<b>2.2. Alignement avec les séquences orthologues de MgSwi4</b>	5
<b>2.3. Arbre Phylogénique</b>	7
<b>3. Facteur de Transcription Swi6</b>	8
<b>3.1. Identification des domaines fonctionnels de Swi6</b>	8
<b>3.2. Alignement avec les séquences orthologues de MgSwi6</b>	9
<b>3.3. Arbre phylogénique</b>	11
➤ Comparaison entre MgSWI4 et MgSWI6	12
<b>4. Facteur de transcription Rlm1</b>	13
<b>4.1. Identification des domaines fonctionnels de Rlm1</b>	13
<b>4.2. Alignements avec les séquences des orthologues de MgRlm1</b>	14
<b>4.3. Arbre phylogénique</b>	16
<b>5. Facteur de transcription Crz1</b>	17
<b>5.1. Identification des domaines fonctionnels de Crz1</b>	17
<b>5.2. Alignements avec les séquences des orthologues de MgCrz1</b>	18
<b>5.3. Arbre phylogénique</b>	20
<b>6. Protéine Ags1 (<math>\alpha</math>-1,3-glucan synthase)</b>	21
<b>6.1. Identification des domaines fonctionnels d'Ags1</b>	21
<b>6.2. Alignement des séquences des orthologues de MgAgs1</b>	22
<b>6.3. Arbre phylogénique</b>	26
<b>7. Adaptateur Ada2</b>	27
<b>7.1. Identification des domaines fonctionnels d'Ada2</b>	27
<b>7.2. Alignement avec mes séquences des orthologues de MgAda2</b>	28
<b>7.3. Arbre phylogénique</b>	29
<b>8. Régulateur Knr4</b>	30
<b>8.1. Identification des domaines fonctionnels de Knr4</b>	30
<b>8.2. Alignement avec les séquences des orthologues de MgKnr4</b>	31
<b>8.3. Arbre phylogénique</b>	32
<b>9. IDC1</b>	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
<b>ANNEXE 2</b>	37
<b>Tableaux récapitulatif des gènes et les champignons étudiés</b>	37
<b>ANNEXE 3</b>	38 – 50
<b>Schéma des constructions des mutants</b>	38
1. Schéma des constructions du mutant de délétion <i>Guy11Δku80Δmps1</i> et <i>P1.2Δku80Δmps1</i>	38
1.1. Schéma de la construction du mutant de délétion <i>Guy11Δku80Δmps1</i> et <i>P1.2Δku80Δmps1</i>	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 <i>P1.2Δku80Δswi4</i>	40
2.2. Schéma de la construction du mutant de complémentation du <i>P1.2Δku80Δswi4</i>	41
3. Schéma de construction du mutant <i>Guy11Δku80Δswi6</i>	42
3.1. Schéma de la construction du mutant de délétion <i>Guy11Δku80Δswi6</i>	42
3.2. Schéma de la construction du mutant de complémentation du <i>Guy11Δku80Δswi6</i>	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
<b>ANNEXE 4</b>	50 - 53
<b>Schéma des vecteurs utilisés</b>	50
1. Schéma du plasmide pFV8 (-)	50
2. Construction du mutant conditionnel de <i>Guy11ΔKU80ΔpNiaMps1</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

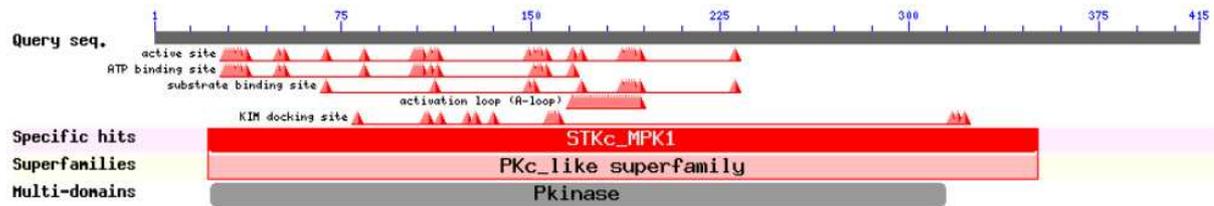


Figure 1 : Schéma des domaines et acides aminés fonctionnels de Mps1

##### 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

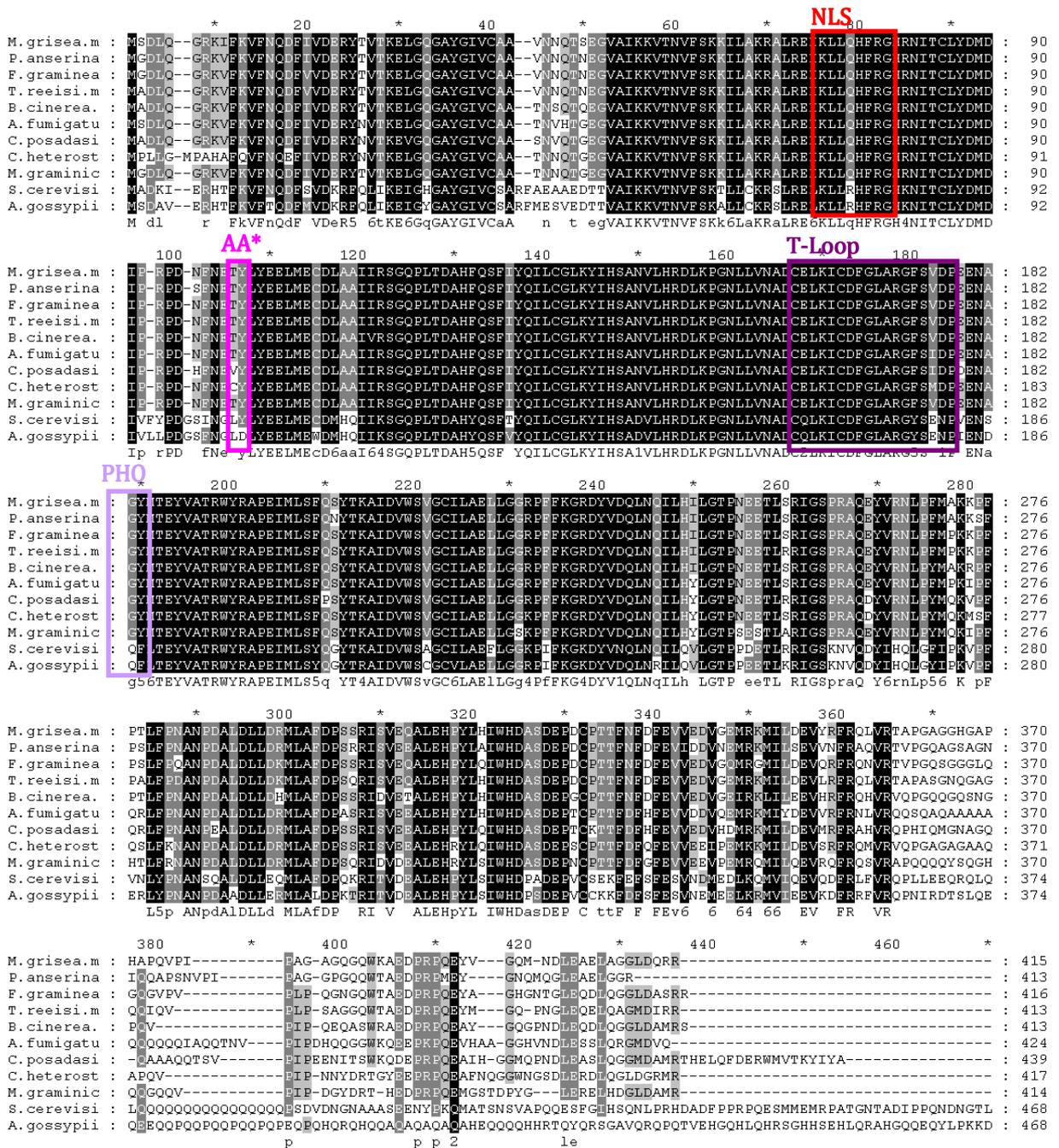


Figure 2: Alignement des séquences des homologues de MgMps1, chez les espèces fongiques étudiés. Les domaines fonctionnels importants sont entourés.

### ➤ 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

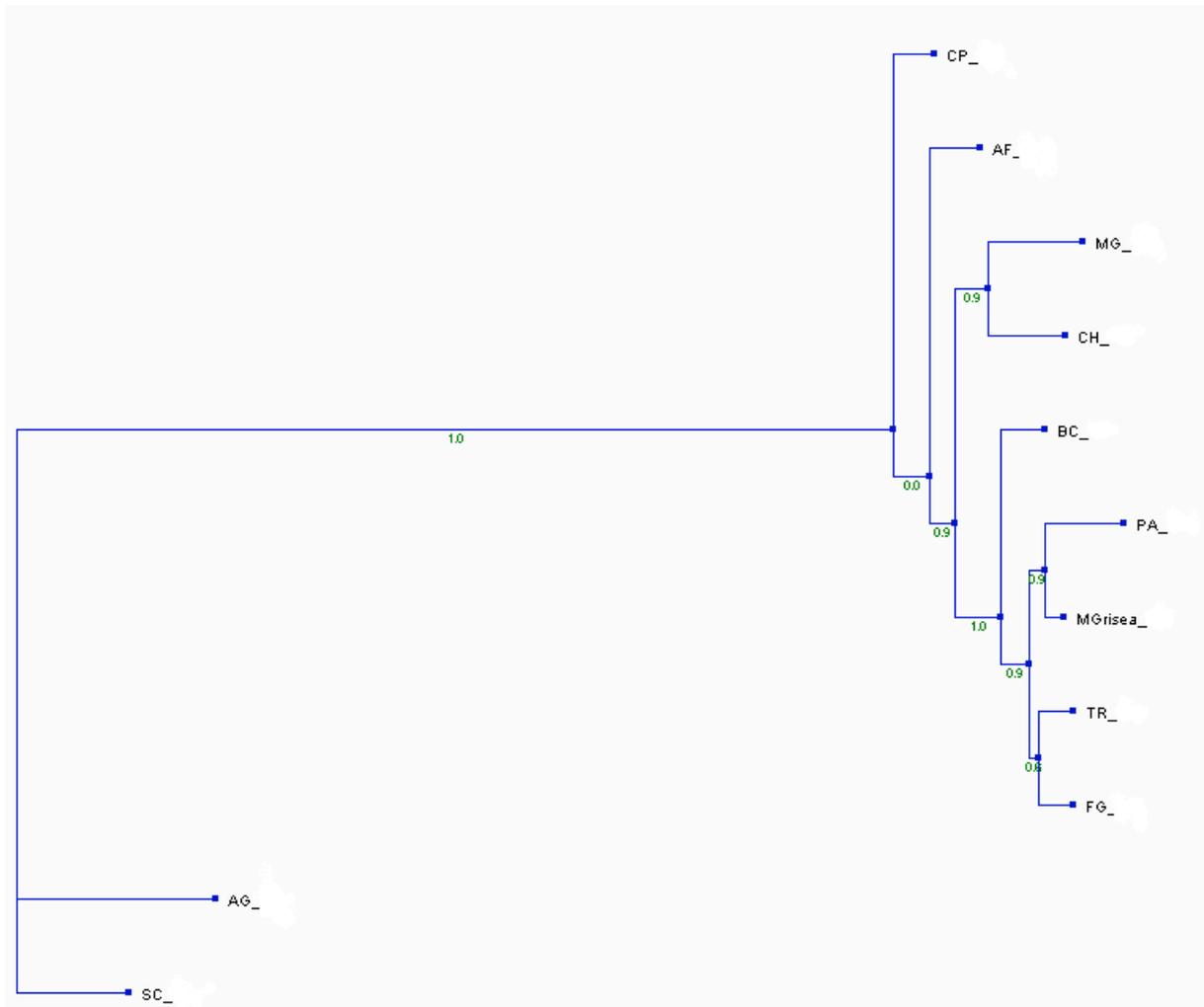


Figure 3 : Arbre phylogénique des orthologues de MgMps1 réalisé par PhyML.

AF : *Aspergillus fumigatus*, BC : *Botrytis cinerea*, MG : *Mycosphaerella graminicola*, MGrisea : *Magnaporthe grisea*, TR : *Trichoderma reesei*, AG : *Ashbya gossypii*, FG : *Fusarium graminearum*, CP : *Coccidioides posadasii*, PA : *Podospira anserina* et SC : *Saccharomyces cerevisiae*

L'arbre est réalisé par la méthode de bootstrap, ainsi, plus la valeur est élevée plus la fiabilité de la branche est importante.



## 2. Facteur de Transcription Swi4

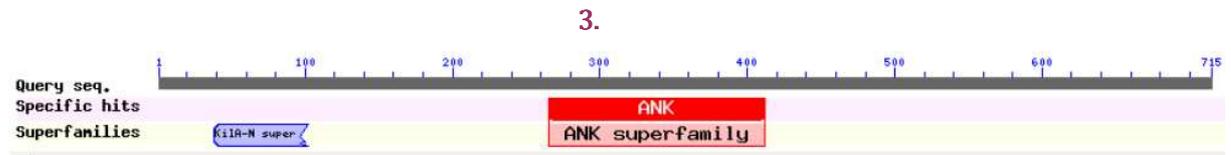


Figure 4 : Schéma des domaines et acides aminés fonctionnels de Swi4

### 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.

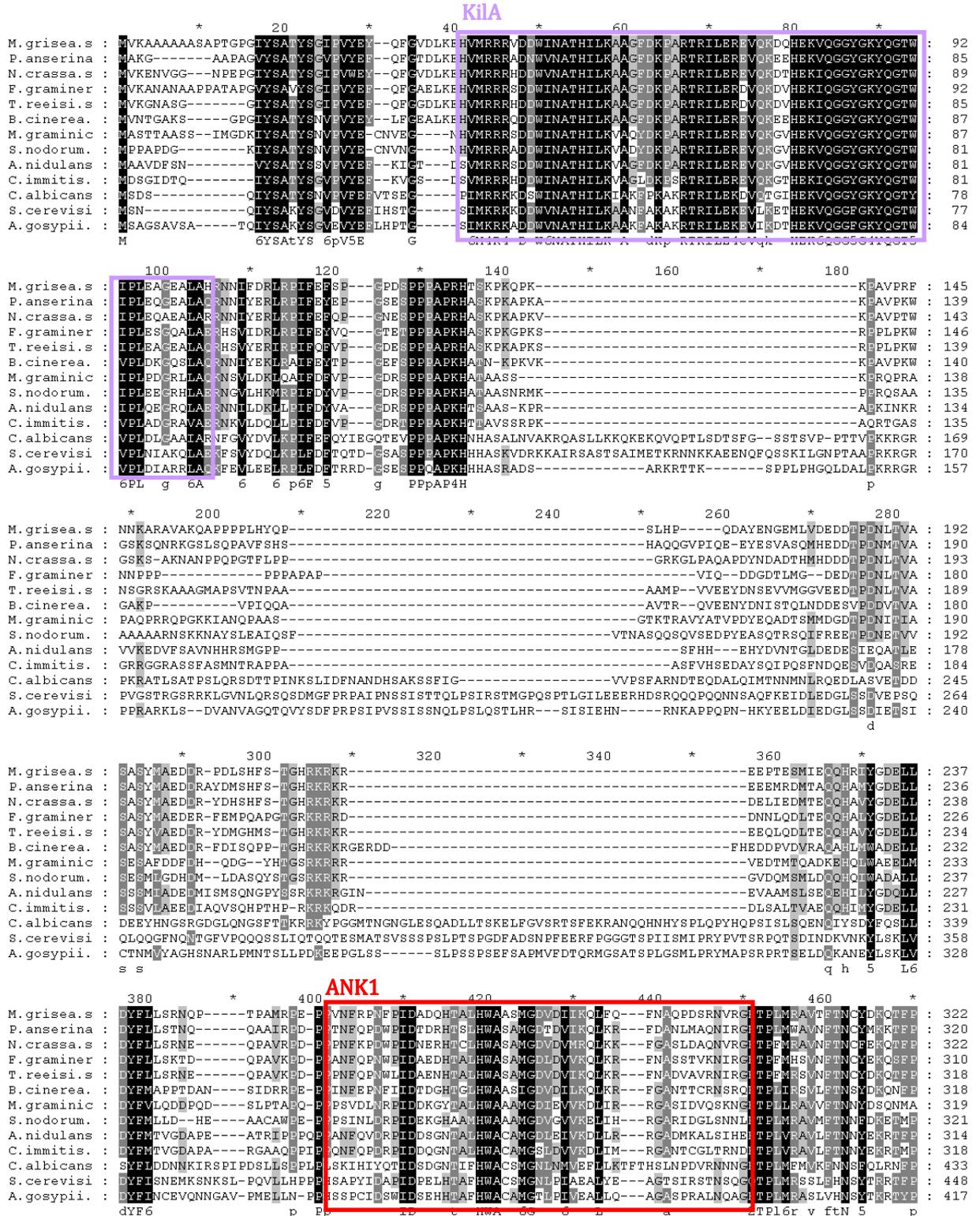
```

      *           20           *
ANK1 : DQHTALHWAASMCDDVDITRQLFQENAOEDSRNV : 33
ANK3 : DCNTAVHLAAQRSSSRCLRALGRCASTDITNN : 33
ANK2 : SECDATLHAAITKGGVHSPTCSSYYLDNIDMR : 33
      dg TA6H AA g i l r a li N
  
```

Figure 5 : Alignement des régions conservées des trois domaines « ANKyrin repeat » chez *M. grisea*



## 2.2. Aligement avec les séquences orthologues de MgSwi4





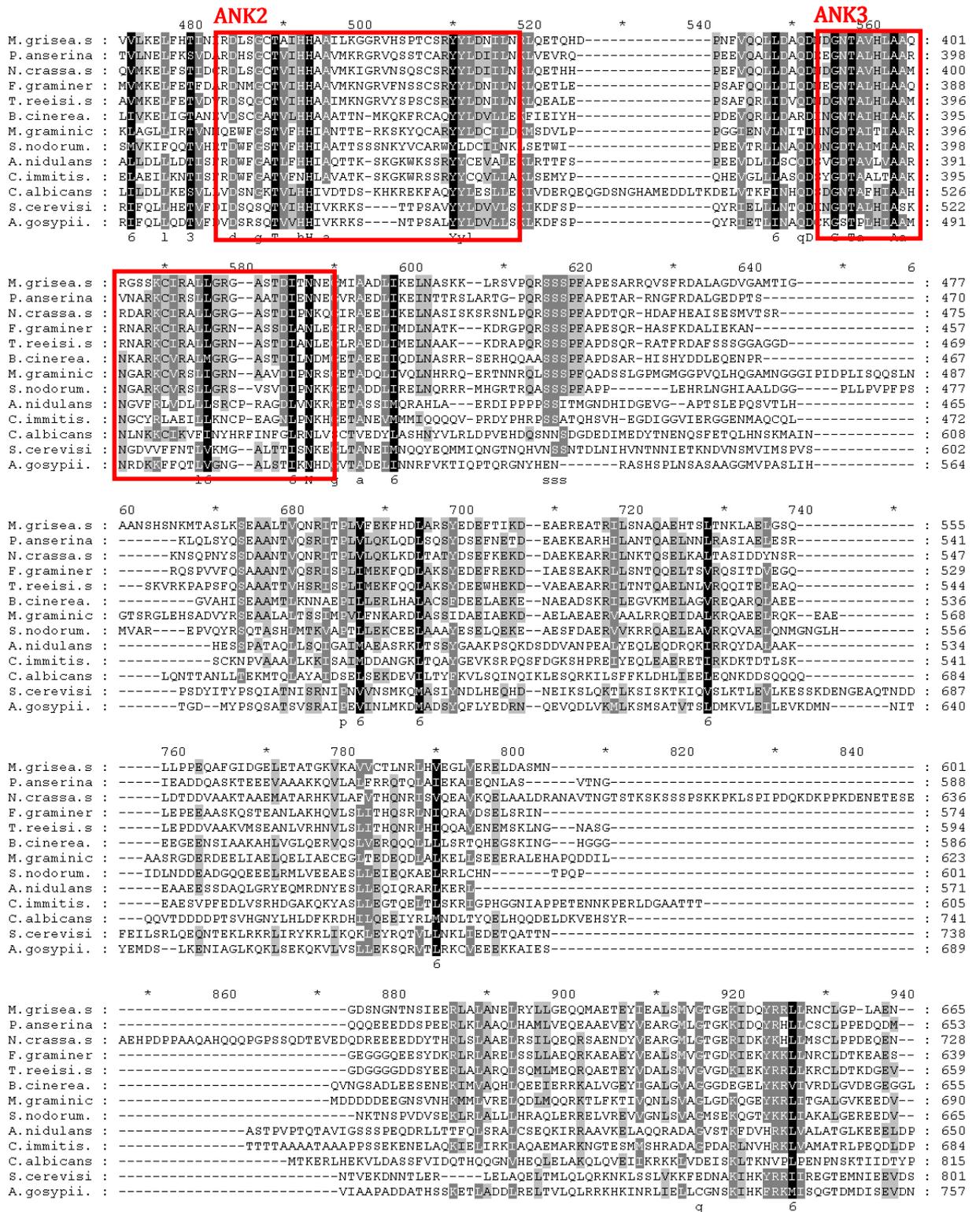


Figure 6: Alignement des séquences des homologues de MgSwi4, chez les espèces fongiques étudiés. Les domaines fonctionnels importants sont entourés



### ➤ 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

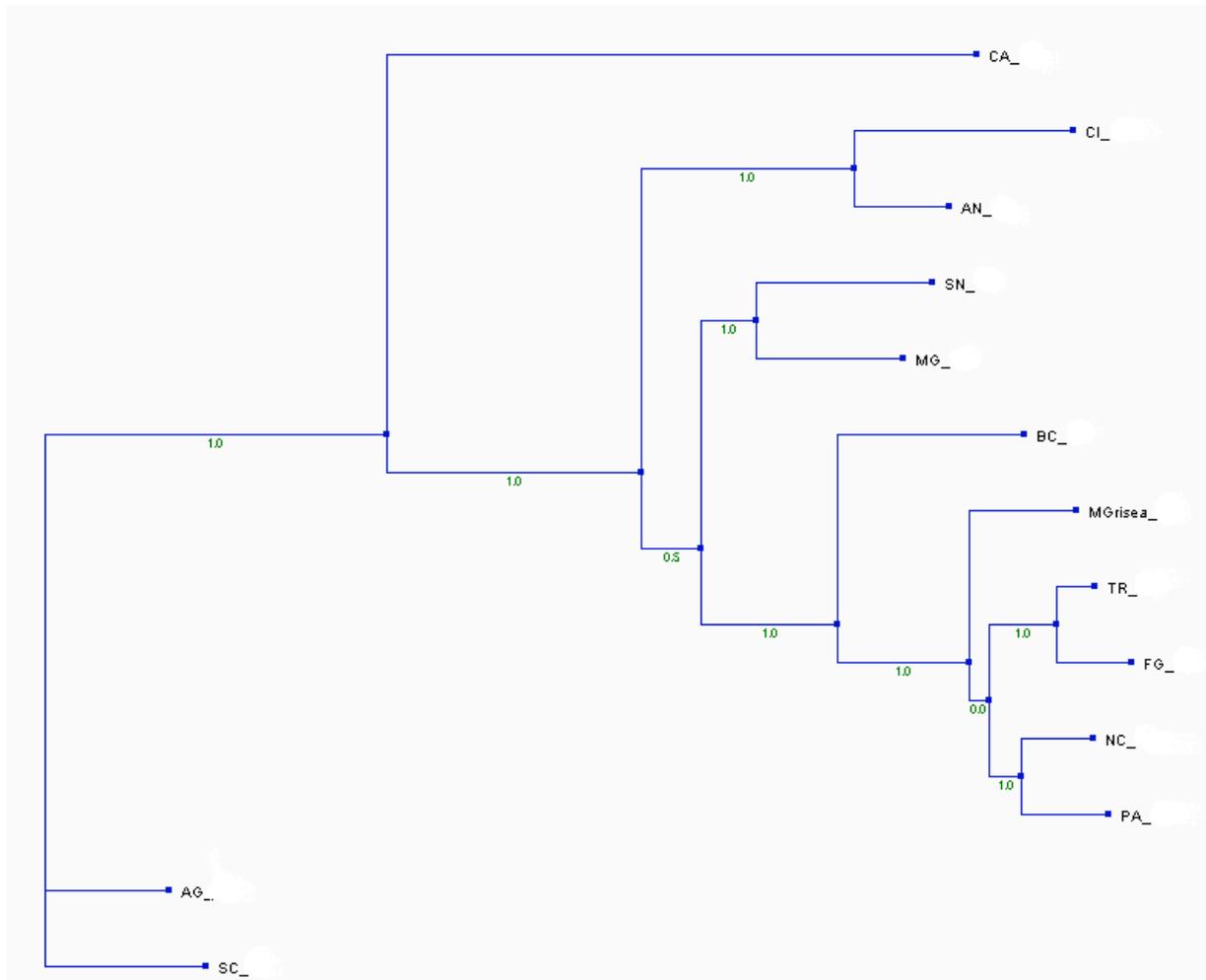


Figure 7 : Arbre phylogénique des orthologues de MgSwi4 réalisé par PhyML

AN : *Aspergillus nidulans*, BC : *Botrytis cinerea*, CA : *Candida albicans*, MG : *Mycosphaerella graminicola*, MGrisea : *Magnaporthe grisea*, TR : *Trichoderma reesei*, SN : *Stagonospora nodorum*, AG : *Ashbya gossypii*, CI : *Coccidioides immitis*, FG : *Fusarium graminearum*, PA : *Podospira anserin*, SC : *Saccharomyces cerevisiae* et NC : *Neurospora crassa*

L'arbre est réalisé par la méthode de bootstrap, ainsi, plus la valeur est élevée plus la fiabilité de la branche est importante.



### 3. Facteur de Transcription Swi6

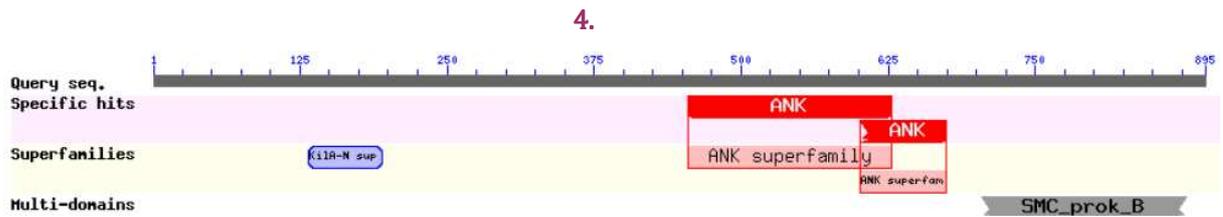


Figure 8 : Schéma des domaines et acides aminés fonctionnels de Swi6

#### 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.

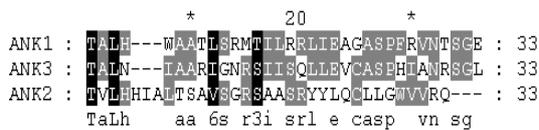


Figure 9 : Alignement des régions conservées des trois domaines « ANKyrin repeat » chez MgSwi6







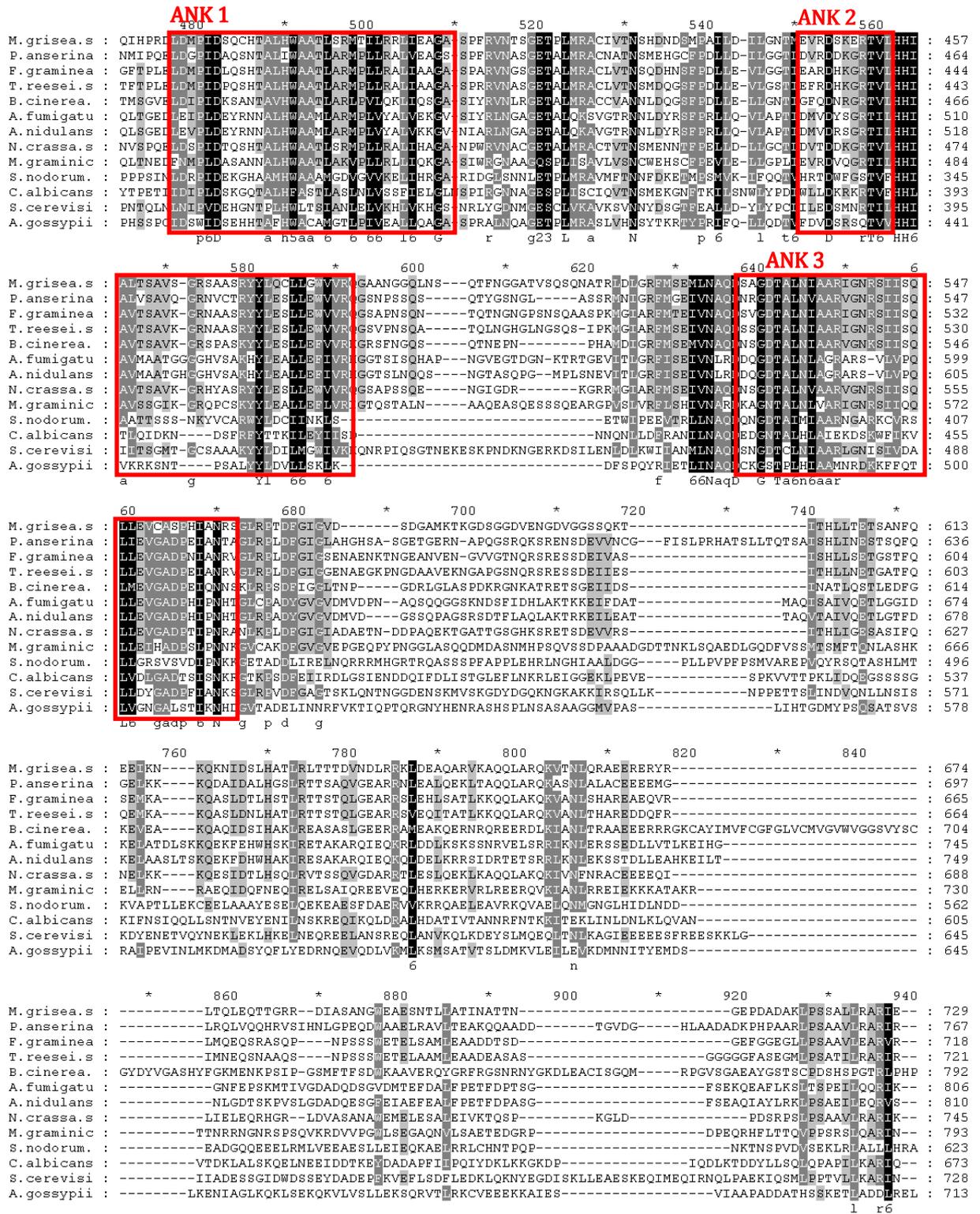


Figure 10: Alignement des séquences des homologues de MgSwi6, chez les espèces fongiques étudiés. Les domaines fonctionnels importants sont entourés

➤ 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

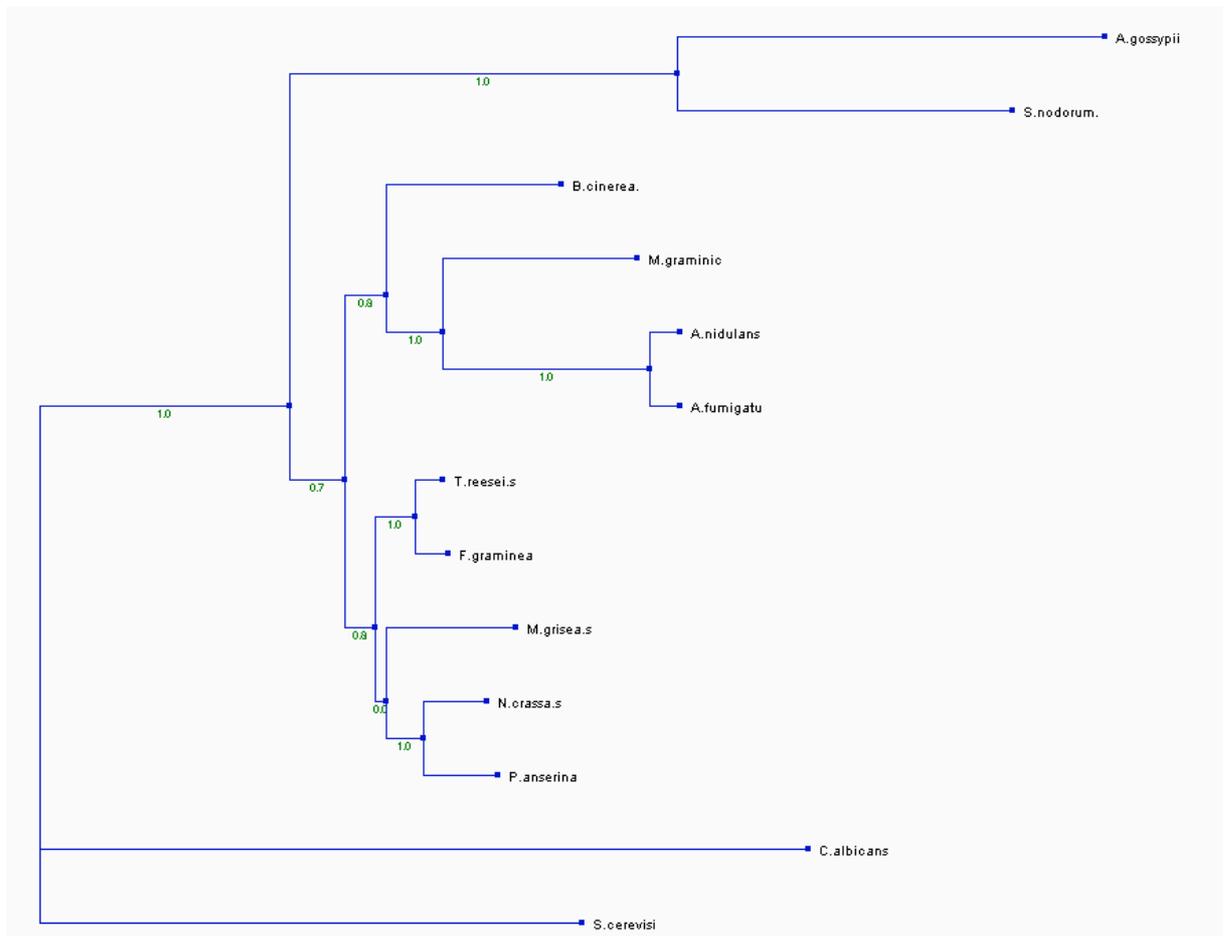


Figure 11 : Arbre phylogénique des orthologues de MgSwi6 réalisé par PhyML

BC : *Botrytis cinerea*, CA : *Candida albicans*, MG : *Mycosphaerella graminicola*, MG : *Magnaporthe grisea*, TR : *Trichoderma reesei*, SN : *Stagonospora nodorum*, AG : *Ashbya gossypii*, CI : *Coccidioides immitis*, FG : *Fusarium graminearum*, PA : *Podospira anserin*, SC : *Saccharomyces cerevisiae* et NC : *Neurospora crassa*

L'arbre est réalisé par la méthode de bootstrap, ainsi, plus la valeur est élevée plus la fiabilité de la branche est importante.



➤ **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  $1.6 \cdot 10^{-22}$  avec 65% d'identité et 99% de similarité.

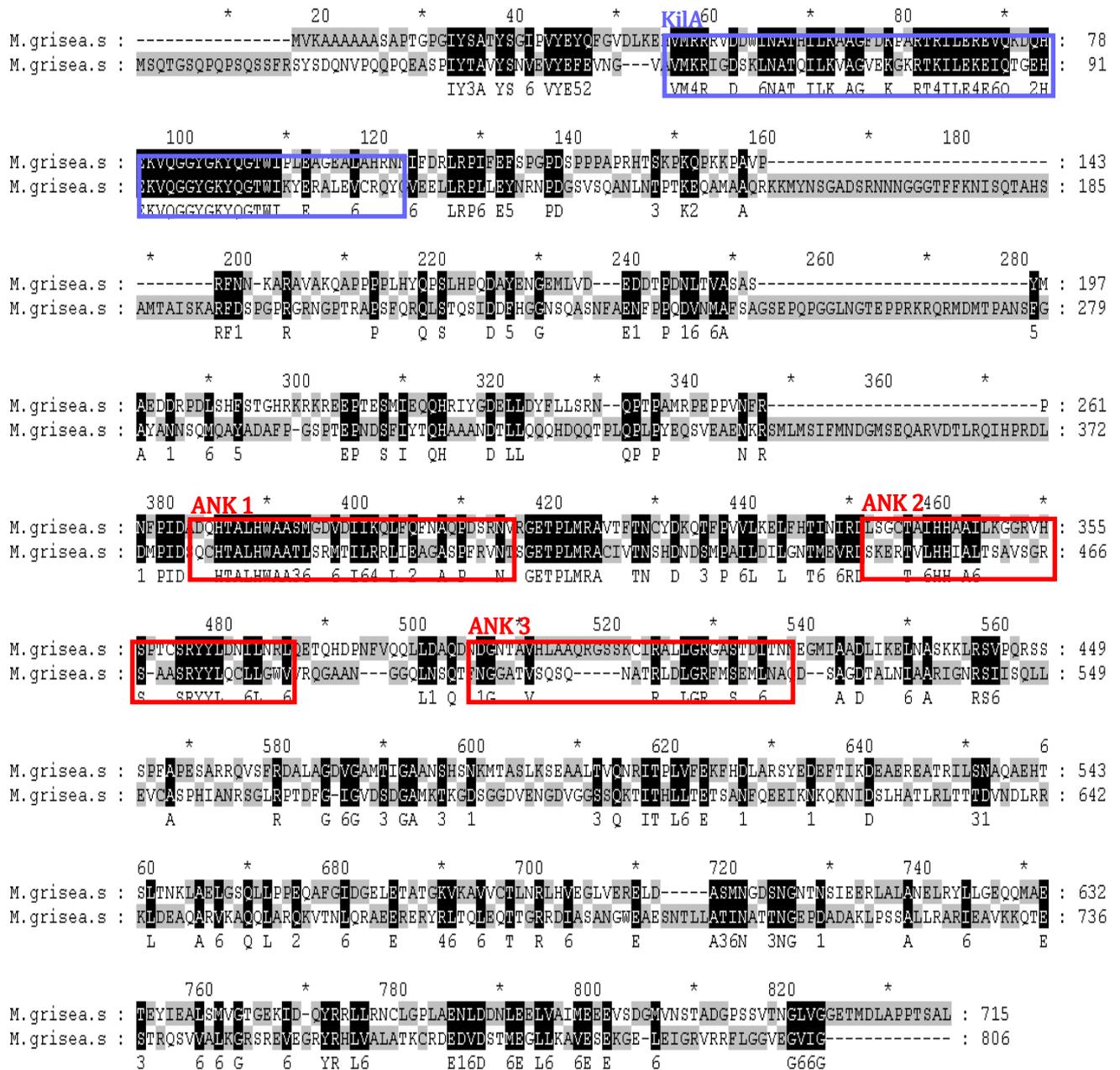


Figure 12 : Alignement des protéines MgSwi4 et MgSwi6



## 4. Facteur de transcription Rlm1

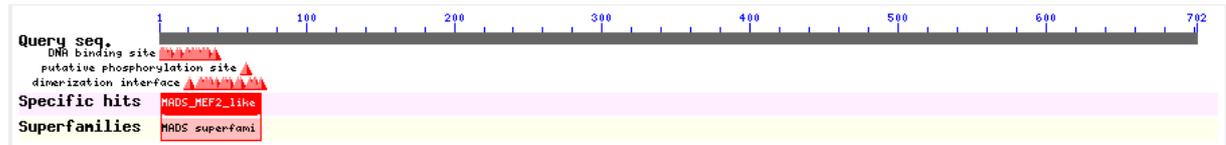


Figure 13 : Schéma des domaines et acides aminés fonctionnels de Rlm1

### 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)

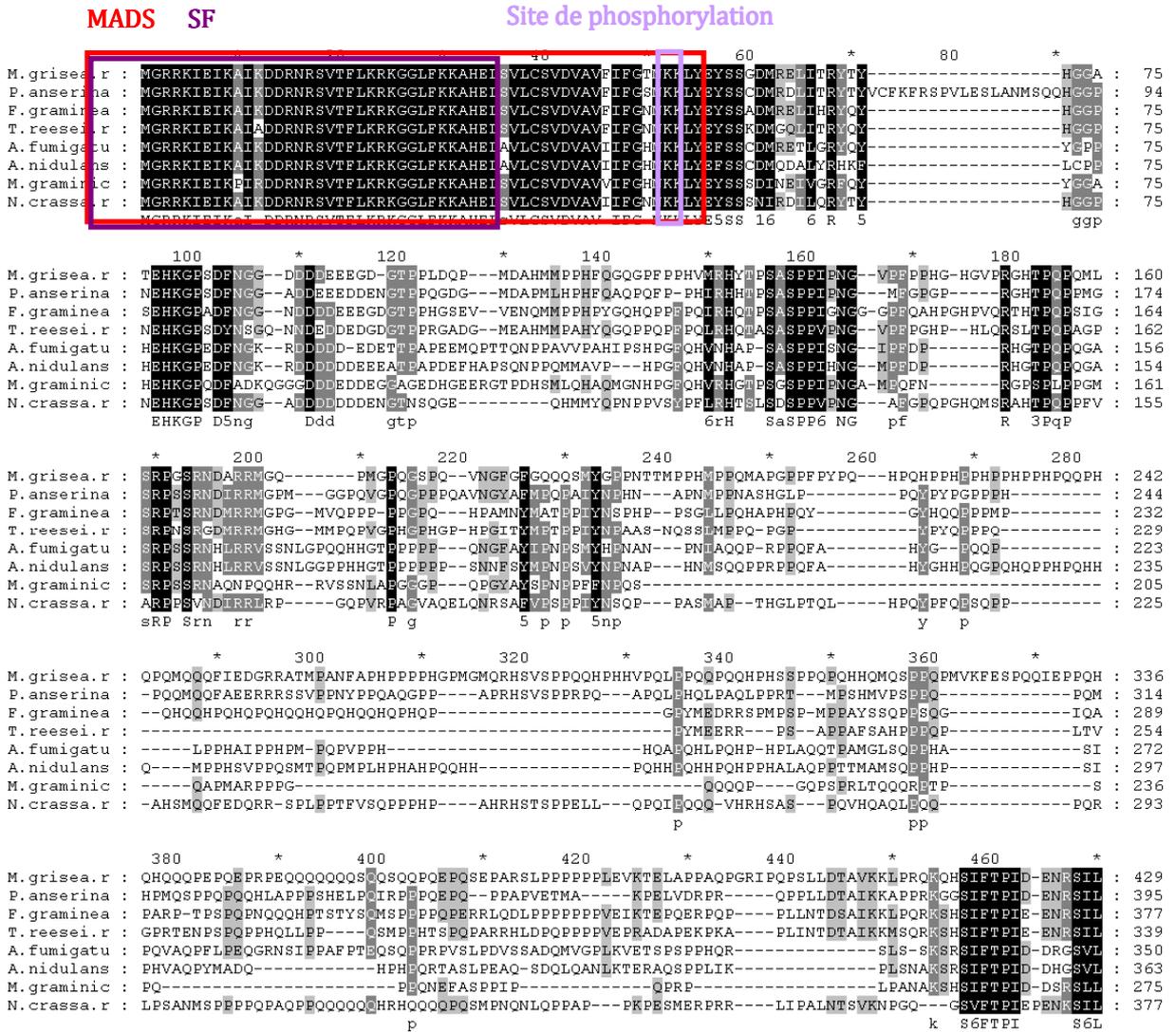
**PHO** : Le site de phosphorylation de Rlm1 se trouve au niveau des résidus Y 55 et Y 57 (motif YEY), chez *M.grisea*. Cette phosphorylation conduit à l'activation de Rlm1.

**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 transcriptionnelle. Au milieu de ce domaine, il y a la région de fixation à l'ADN, appelé « MADS box ».



## 4.2. Alignements avec les séquences des orthologues de MgRlm1





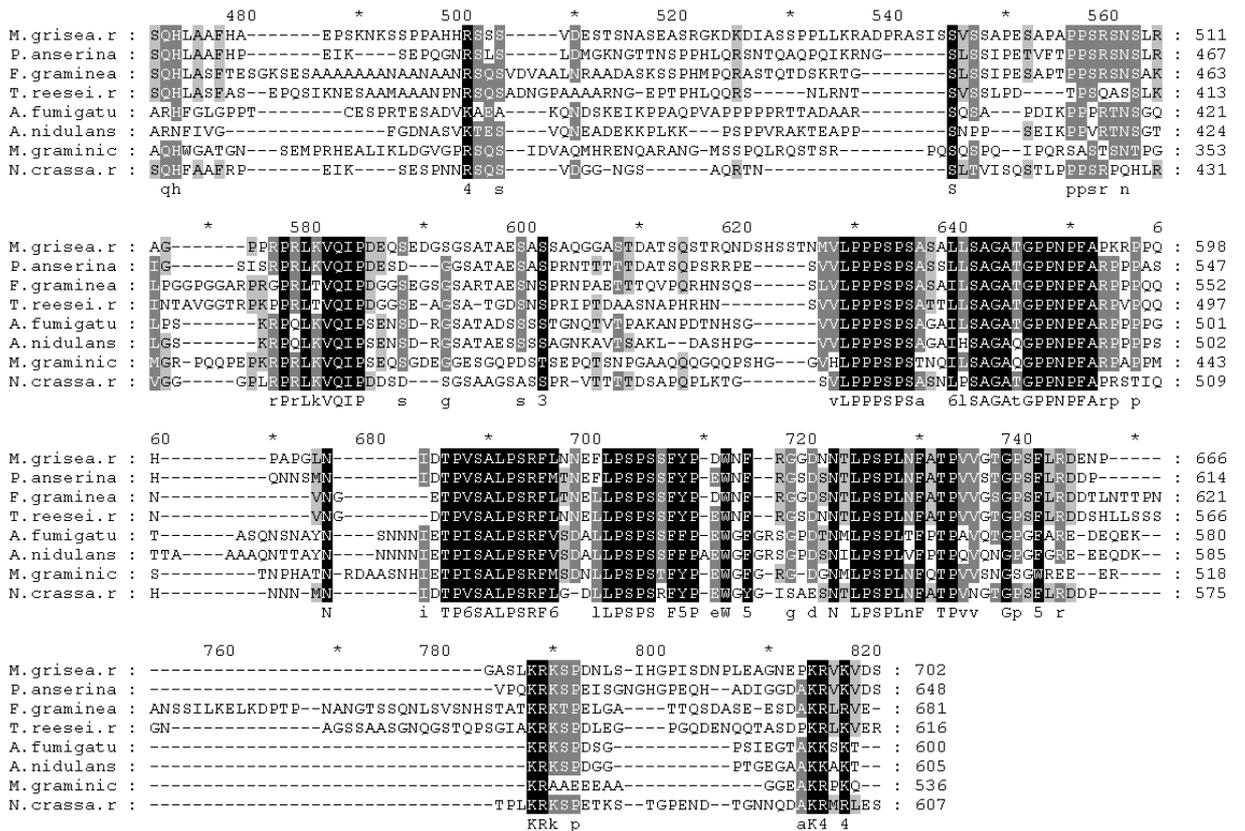


Figure 14: Alignement des séquences des homologues de MgRlm1, chez les espèces fongiques étudiés. Les domaines fonctionnels importants sont entourés.

### ➤ 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 présentent 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 entre 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

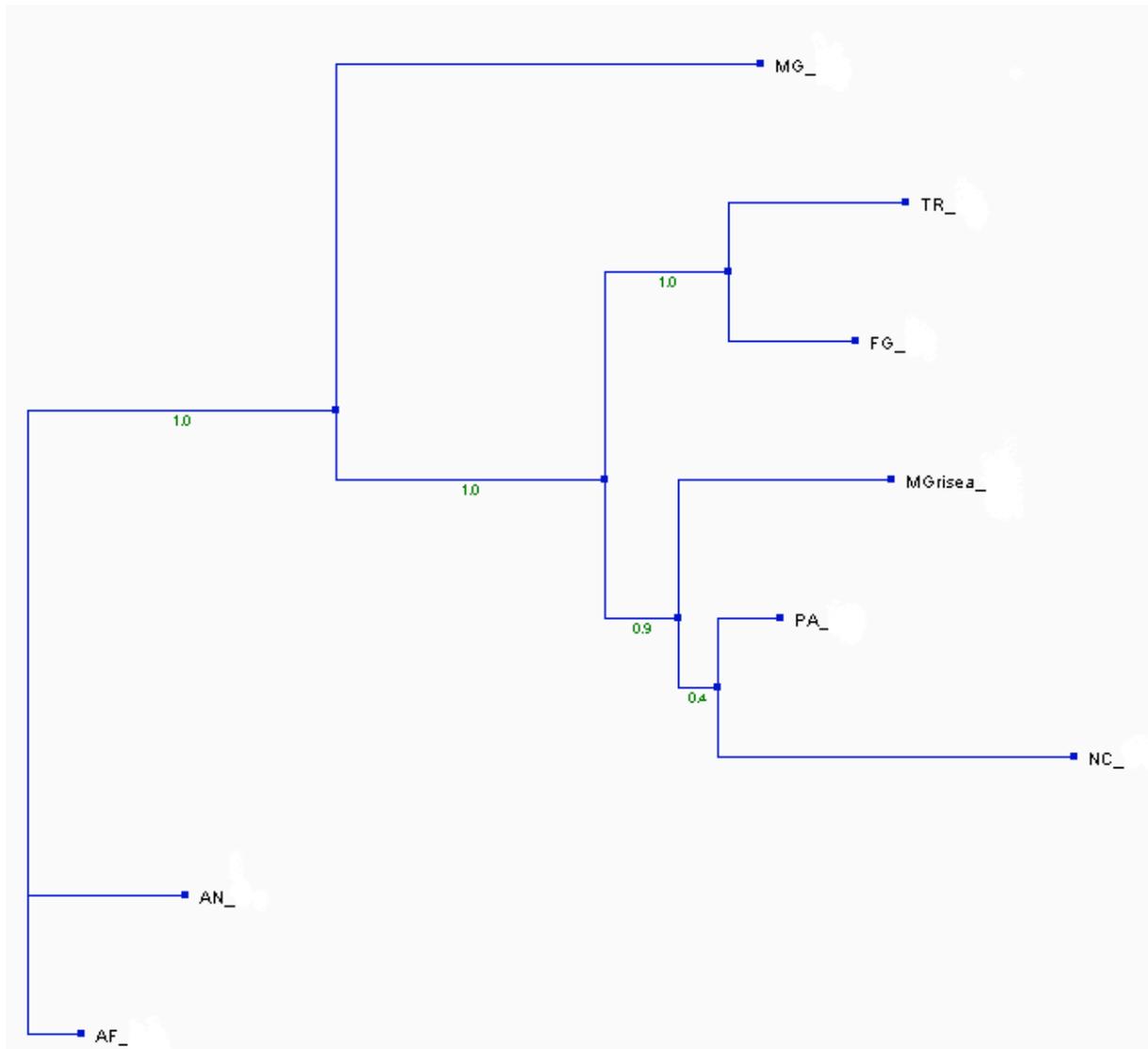


Figure 15 : Arbre phylogénique des orthologues de MgRlm1 réalisé par PhyML.

AF : *Aspergillus fumigatus*, AN : *Aspergillus nidulans*, MG : *Mycosphaerella graminicola*, MGrisea : *Magnaporthe grisea*, TR : *Trichoderma reesei*, FG : *Fusarium graminearum*, PA : *Podospora anserin*, et NC : *Neurospora crassa*

L'arbre est réalisé par la méthode de bootstrap, ainsi, plus la valeur est élevée plus la fiabilité de la branche est importante.



## 5. Facteur de transcription Crz1



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

M. grisea.c :	---MDQLQHHQGPGRARSPSAASTGAAPQQHQEHPPQHIRSHSPAPAPQSFSSPQHNG---LGLGIEHSQS-----ESGFNPNPSPDFLNPQ :	81
P. anserina :	---MDQQLPQ---ARGRSLSAASTGGG---HHHQPPNIIIRDHSPSPARFPNPNDAVVSIGLGLGLVDQQFP---TAQPDYSAYNANSNSFLNNH :	84
F. graminea :	---MDQQAQA---HRGRSLSTG-----HQQPHINHSHPSPSPYQHND---PSVGLGLTLDQSAQSS-----YESFNNSG--FLSPQ :	66
T. reesei.c :	-----MRGRSPSAG-----GFQSDINQSHSPARSPLAPTNEQPSAGLVGLGQQQORAFAPLHPNYDSFGANG---FLGAQ :	69
B. cinerea :	---MDS-----QRGRSPSGS-----HQHIRNHSPPSHAFQDGMNGLGIALDPSISINNHQQFQN---NNAQNTTLPAYVDNN :	66
A. fumigatu :	---MASQEMFP---ELGQSP-APGVKSRGVSRSPHPHQQQQQHQHTGLDLDSSITASSFANSFPDPSNNVSPSAESYGYTAAGYLSGT PASQT :	89
A. nidulans :	---MDPQDTLQ---DLGQAP-AAHIN-RSASPSAAHAHQYNNHN---DLTIDPSTSNSSYPSSFANNS---APGSEAFAYSSS-YLT--PATAT :	80
C. immitis :	---MDVP---HQ---GRGRSPSVAGDENQHINPSDPMNPAQTYQDRATLALDPAISNVSPSP-SGFPGSNPTTSGAADAYAINNSFIHN---STTL :	84
S. nodorum :	---MDIQ-----RGRSP-SAGSHANNIRSSPSPHAFPNLSP-----YDPSIHPTSSFPAATSSGFDSNQFLASTQPQQAQO-----GL :	70
N. crassa.c :	---MDQQYTD---ARGRSLSAASTGGGQ---VHDQQQSHIRNHSPPSTPFPNNDGVNN---GLGLGLIDPSASQ-HFQPEESYGGENP---FQQH :	81
C. albicans :	-----MLSTMSNLPVAVIGITATTGTTSTTTASTSTSGSVNTTATNNNNNTSAS :	50
S. cerevisi :	MSFSNGNMA SYMTSSNGEEQSINNKNDDNSAYRRNFRNSNGSHSTPQLSDDLDDVDMRMSANSSEKISKNLSSGIPDPSFSDNVNSLSPS :	94
A. gossypii :	-----MCFEDYLNQTV---SDVSPDKARMNSNKNANGMRMKEKESPAYDMESEMTADGVSFLNSF :	60
M. grisea.c :	PS---QTFPSQGG-----LDPSSFDATQPFDS---NQAQPGYSQEFLLNNNNFSGSDFSLFPAT---TEQLSTPLFVTGDNQQPPQLS :	157
P. anserina :	QPSF---QPFQPGSLDPSNVPTFDLNSFTDPLKPESSFTSAPSTYPQQTLLAPSGDAFTTFPTPG-EQYDAPLAVFG-DSQQO---LN :	171
F. graminea :	QSP---SFLPPAH-----QQNNSFGQANLSDPATSLFFNNQSAAYLSPNLNDNDFSLFPNTSQGGQDFNAPLEFN---STLN :	139
T. reesei.c :	AN-----AVDPTNG-----FDPSASFQQPATGP-STLSLNAQAQHNLYSPLNLDHDFSLFPSAABOGDQYNAPEFEQ-----PPLG :	140
B. cinerea :	EFLNPTQQFTQSGLG-----DANFAPSQTQDYTYKQEDSFAPPQRSTDFEQLLSANFDG-DFSLYPNSSGQ-NEQFDQSYFMN-ELPQSGNPS :	151
A. fumigatu :	DQN-----YAN-----SLQTPQSYGTGLVQPNESHQQLSDDNFSDLLNSNATEYDENTVYQTHSPSNTAPEYDSLSDLDPO----- :	163
A. nidulans :	DHN-----EAPR-----SLQTPQSFQDGLS-----HQ-ABEENSLLNNTGDFPS-LYQGSFEN-NTGSDYPSGLLDPQOSGMQ :	150
C. immitis :	DDN-----LLRANIPSD---PLFNQPSYSQSFEAS-----LKAHSGMNNVTNLLPSDQLGFEDFGMYSN---NNQASEFGSLLDLPQVVSQS :	162
S. nodorum :	DQS-----FLQAN-----PSLSQHTPQFRP-----QGNLDQPDHLNLANTSSTPDSFFPAGSDLNQNALNPTYLGS-TLDPQLLESQ :	143
N. crassa.c :	SP-----ESQPLG-----DFNCGYTNLENQDNSFGLSQPAYSP-NLMASTPQDAFYGIFPTTTA-AGQFNGLSFT-DNQS-----IN :	152
C. albicans :	N-----STASSTTANGGTSTNSGNSLOYYTGNNTSNVSDGNKYSLPSIYPTPQ----- :	100
S. cerevisi :	SGSYSADLNYQSILYKP-----DLFQQQLQQQLQQQQQQQQQQQQKQPTLKVYQSSTPQWDLLPADNQHRPSLTNQFLSPRNYDG :	181
A. gossypii :	HTN-----PTTTLTVPQVILSPYDQDESFGTPTQHLGQFPQAPTINIQTPLEGAVGSHALDMSPMNLPOYAEGLD :	131
M. grisea.c :	TPDLNMSHHSPTPPHHLKPEPHQPG---SAHQSEFENQHQSESPPARHSRHASTGEEAALLPGQV---DWSGT-----QFQCHRRTPSEYSDVSS :	241
P. anserina :	SANANM-NHNQTPPHLLNDDPQPG---SAHQSEFENQHQSEPP-GRHSRNVSTGEEAALLPGQV---DWTRA-----QFQCHRRSPSEFSDVSS :	253
F. graminea :	PNDMNTMHSPTPPHFLQHDGQQPS---SAHQSEFENQHQSESP-PSHSRHASTGEEADALLPQIA---DWNRP-----QFQCHRRTPSEYSDVSS :	223
T. reesei.c :	---DLNAMHQSPTPPQLFQPD-----SLOSPFENRHQSESP-PTHSRNASIGEEAALLPSQIG---DWTQP-----QFQCHRRTPSEYSDVSS :	216
B. cinerea :	INPAELNAHTPTPPSLLQEDNRPPA---SAHQSEFENQHPQPS-PGHSRHASTGEEAALPLVHNPGDMSHMP---PQFTCHRRTPSEYSDISS :	239
A. fumigatu :	---VHQQSHHSSTSPQISPLEQQQHSSPGPMSTQGGTVAIYTP---QHSRHASTDEATAFALTNTHPDQAVMGNSAAFQCHRRAPSEVSEISS :	254
A. nidulans :	AVNPVDLPHPSNSQTSPLDQPPSS---AMSEFASSTGTYTP---QHSRHASTDEASAAAYMNVSHPEWQAVMNN-SAAFCHRRAPSEVSEISS :	238
C. immitis :	PHLNQSI PHNETPPHLLAPEESHPS---RPTSEFVSTPGTYTP---QHSRHASTDESSAAYITGHGSHDQGMGLGN-PSEQCHRRAPSEHSDVSS :	250
S. nodorum :	QQNQSI SHSTPTPPHLLPTMNNHQN-PSPHASENMQGAPSP---GHSRHASTDE-SAAYGPAS-----CQAPSETYSVSDVSS :	217
N. crassa.c :	NPDNPM-SHSPPEPHLLSPEIN-----SFAFAQGRFPMATGRHSRHASTGEEAALLPGQV---WSHMP---QFQCHRRSAEELSDVSS :	228
C. albicans :	-----DSINNTSHTYNYPTTVSG---AVTQPMQLDQSSTVNNNQFTLENNQQLSSPQQ-----QQYNSNSNLSM :	165
S. cerevisi :	TTRSSGINYSDETSNYHTPYLYPQD---LVSEFAMSHLTANNDDELLSVAEMSNYLLPVSNSHG-----YKHSNLDLDELDDLSTYS :	263
A. gossypii :	VDQLRLP-NTPNRDSYLSASMSDQS-----VSAYNAHSPETAHFLRHQNVAVSEQVSYLRTGND-----DFDELLHLHSGTPE :	203
	p hsr s p a g r s s s	
M. grisea.c :	VAPSPNVSHSDSDHIEH---SEMQREVTAGLYQ-ELHGTGNFSLADPPPPHAHSPDLRGRSPSHSPA-ISPRTPQGLE---DMNQ---NS :	324
P. anserina :	AAPSFLVSSDSEEQHGD-HSEMYRQD-AGLYQ-ELHGTGSEFISDHGAHSPNHPGA---RSPSHSPA-ISPRTPQGLE---DVNQ---NN :	333
F. graminea :	VAPSPNVSAESDSDTIGGHS-BAHRPSD-GGLYQ-EMVSTGNFSLADPQI---GGSPGHQGRSPSHSPA-ISPRTPQGLE---DLNQLN---NS :	307
T. reesei.c :	VAPSPNVSDTDADQSGHSPQRPAD-VSYQ-EMVSTGSESLADH---GSPYHGRSPSHSPA-ISPRTPQGLE---DTMQP---S :	294
B. cinerea :	AAHSFNVGHSDSEEGDQHSPEMQHPD---STYQ-DVLAETGSESLADPS---HAG---ISPAHSPA-ISPRTPQGLE---MMDQ---Y :	314
A. fumigatu :	AAPSFVPSQHESDGVDDNPSPLLAQNDPSLYD-SALCENFTLSEHQH---QHOGSPAHSPY-ISPRTPQGLE---GQEMMNPV---Y :	334
A. nidulans :	AAHSFVTPQHSDSDVADNPSPLLAQNDPSLYD-SALCENFTLSEHQH---QTOGSPAHSPY-ISPRTPQGLE---PTDILPGGF---F :	320
C. immitis :	VAHSFVTPQENADISENNHSPLLMAQDPDAIYE-NAUGTGSFTISDQDQ-----AFSPAHSPYNSPRTPQGLEGGDLGPDPT---F :	329
S. nodorum :	AHASFVTPQDSE---ENQPSPLHAQNDPQLFQDPVMQFQFTLNDGTS-----HSPGHSPH-LSPRTPQGLEQQALPQPG---SF :	296
N. crassa.c :	VAHSFNVGGLSDSDPIENHSPPLQGPQA-DALYS-QLNGTGNFSLSD---HIG---RSPSHSPA-VSPRTPQGLEDEIDPNQP---NH :	306
C. albicans :	ENYHNNNTTINANVGSNTSBOLESNTTPNPISEVLPDKDNVYNNNTN-----VLVSSYESTMNNQOQQOQQO-----YL :	237
S. cerevisi :	DNLLLSASNNSDNNSNNGIINTADTQSTAIANKSKVCTNQKMLTIPTS-----STPSESTHAAPVTITISIQFENEGHFVKNEDDGTL :	350
A. gossypii :	NSEYFQHDVDDLNAILLDDNVHDFYSPHTGDS-DAHQVPMNDIASPATT-----QYALINVHSDGLTLPSESSIVTPE----- :	279
	sp f sp sp hsp pr6 pq	
M. grisea.c :	SFMLQQGQGTCTQIA-LQSS-EAFEPQLPQ-----HGLAQMAA-TNNDYAFNTLNRN---FGRPM-MDSALTPPDCRVRNPPRAVTDPE :	404
P. anserina :	FMLQSQGN-VGHPSPY-LQSSQEAFFSLPQETEN---ITENQMAPPSNIDFAETAVRNG-FDQPS-LDVSLSLTPPDCRRLAPRAVTDPE :	419
F. graminea :	FGLATPHNPGI PSTYPDVNAVFAEFTLQP-----SGADLSMAPPAINTDEAETNSKQGAFTPKSRMDQDLSLTPPDCRPRSPRAVTDPE :	395
T. reesei.c :	ENLIPNNGGDGVSQYDLPQPSHSEFSLSGG---MGDMHQMAPPAINIDEAETNSRQGSFEPKPSQMDQDLSLTPPDCRPKSPRAVTDPE :	383
B. cinerea :	EAMLNANNGSPSONIY---NQGESEFQMQHSN-SL-DMGQAQMVPEPENVSEFASRQNS-FDPEPSALDQALTPPDCR---RRAVSDPE :	399
A. fumigatu :	LSGPAENTQPTPPNDMYGNGAEGMMNMQGTHPSV-DIGQASQMAPPSNVEFAEPSPRIPSEFGPS-PSANLDSLSPPSST-RSRRGSKSDPE :	425
A. nidulans :	ISAPATNSAFTPTTEGYPNGD-----IGQASQMAPPSNVEFAEPAKAQVFPEE-RTADMDLSLPPPSLR-TSRMRGSKSDPE :	397
C. immitis :	LTTQTLTSSSGPSEAYAMKTEISGEPFQSONSPGEMGQAQMTPEVMSVSEAEPSRTSTFETSTGEGGKDTLSPPIS---RGRGSKSDPE :	419
S. nodorum :	GLDNNMNNQGGQGMVYVNSGAEFFSLNNGIPI---EFGQADAMSPEPNTDEAEPSPRQASFEPP-PEHQAALSPDPSRNRIRAKSDPE :	386
N. crassa.c :	EMLHTPANSRGPATY-MQPOQEAFFQLSLLDPSG-MQAQNMAPPAINIDEAEPAPAKSG-LDQPTN-LDNNSLALNARGMRPPRAVTDPE :	395
C. albicans :	QPSQYQYSNQYMQPYXNQQAPE-----QQVQKAEKELPHLSVTNIDYSSLSVYTVSPSILKKRRRTAKKSLSPSSSS :	316
S. cerevisi :	QLKVRDNESATNNNNLLRPDDNDYNEALSIDDR-SFEDIINGRKLK-KKSRRRSSQTSNNSPFSRSSRSRISDEBAKISANREKLE :	443
A. gossypii :	-PRTSEFENRPNLDFLKVKNEEFALTD-----DELEDAHEQVQGRYKRRSSTKSLRSQSIANTPQCEHAHTLNREKLE :	361
	pp ap pp r dp	



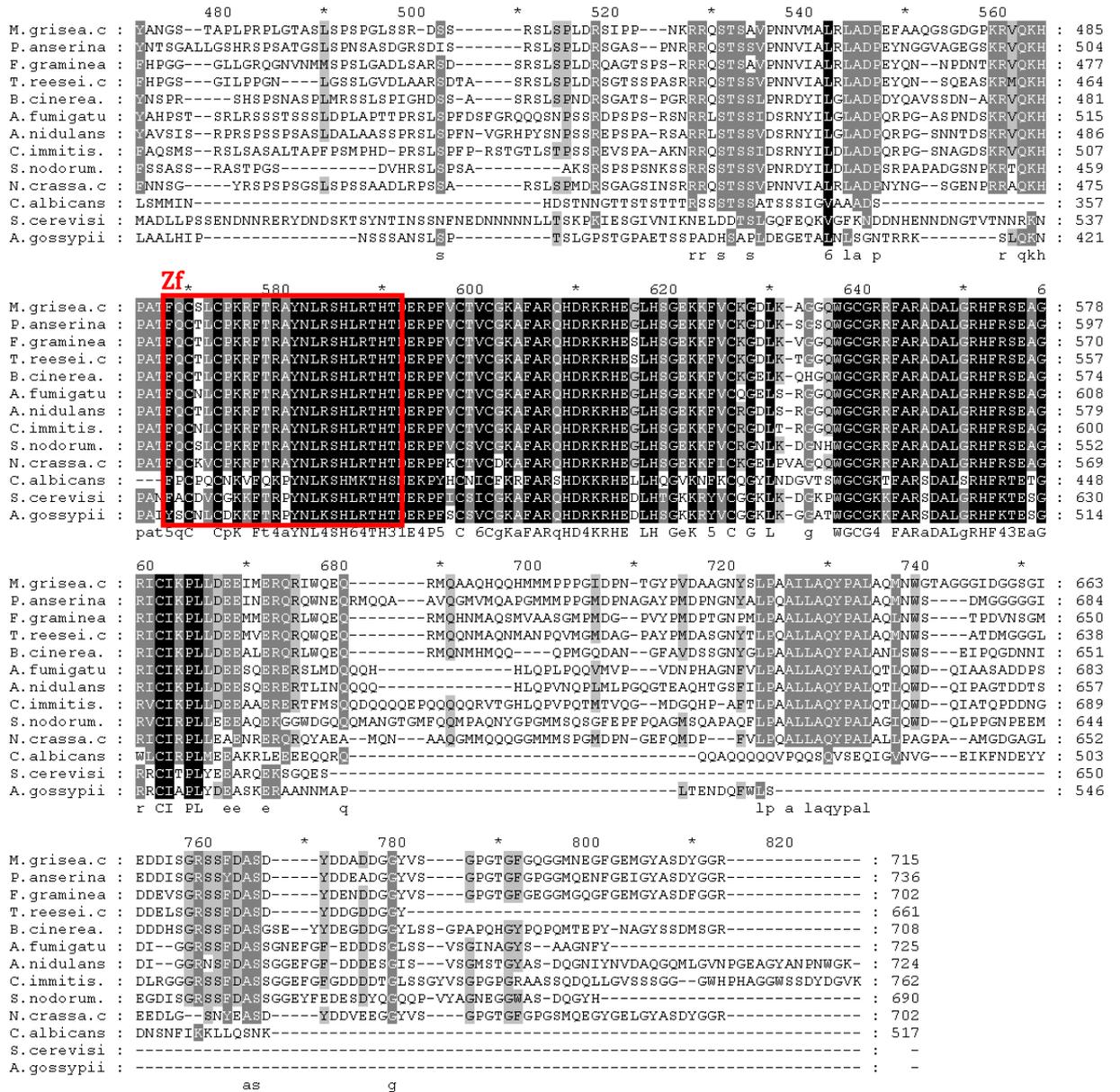


Figure 17 : Alignement des séquences des homologues de MgCrz1, chez les espèces fongiques étudiés. Les domaines fonctionnels importants sont entourés

### ➤ 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

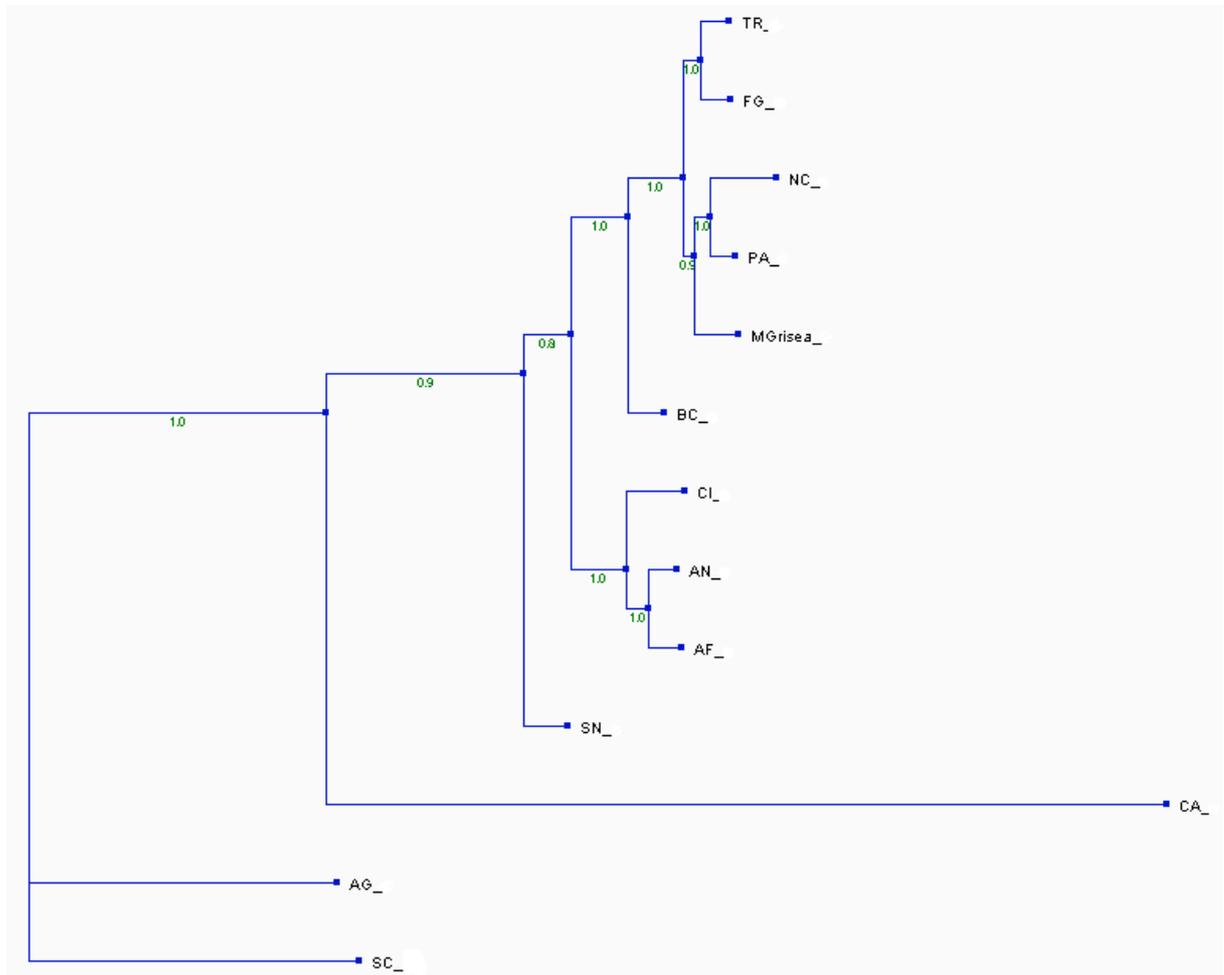


Figure 18 : Arbre phylogénique des orthologues de MgCrz1 réalisé par PhyML.

AF : *Aspergillus fumigatus*, AG : *Ashbya gossypii*, AN : *Aspergillus nidulans*, BC : *Botrytis cinerea*, CA : *Candida albicans*, MGrisea : *Magnaporthe grisea*, TR : *Trichoderma reesei*, SN : *Stagonospora nodorum*, AG : *Ashbya gossypii*, CI : *Coccidioides immitis*, FG : *Fusarium graminearum*, PA : *Podospora anserin*, SC : *Saccharomyces cerevisiae* et NC : *Neurospora crassa*

L'arbre est réalisé par la méthode de bootstrap, ainsi, plus la valeur est élevée plus la fiabilité de la branche est importante.



## 6. Protéine Ags1 ( $\alpha$ -1,3-glucan synthase)

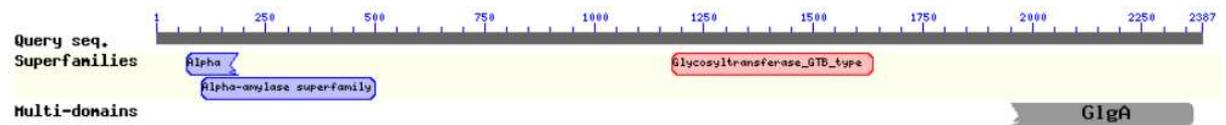


Figure 19 : Schéma des domaines et acides aminés fonctionnels de Ags1

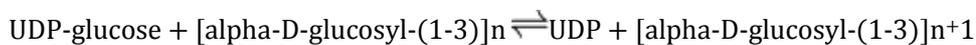
### 6.1. Identification des domaines fonctionnels d'Ags1

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 :



**GT1** : Le domaine « Glycosyltransferase », IPR013534, est un domaine catalytique caractéristique des glycosyl synthases qui utilise ADP glucose comme substrat. Ce domaine est caractéristique de l'activité enzymatique par des liaisons 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. Aligement des séquences des orthologues de MgAg1

```

*          20          *          40          *          60          *          80          *
M.grisea.a : -----MAPTHNVFLAVTLFTTSLVPLKFDVDF-VDDNLTNRLATNPLETIGNR--DKTNHT--KSPNWRPBYTFLDRFVNGDF : 80
P.anserina : -----MIRPPFFSNALLVTLTATLLVQGLRDKDEE--MNNLNTKKSATPLEDYDVLVSRPENITYMBSPTNWRPBYTFLDRFVNGDF : 85
N.crassa.a : -----MFMSSWGCQPPETARSEIYNLNRNKTATSEDDYWGDRTEDDPNEYTFYFSPKNWRPBYTFLDRFVNGDF : 68
B.cinerea : -----MLARTFVALCSVLLSTQVDALRVEEVEF-VGYNLNTNQTATSEDFDYGKWEDH--EPE--QSPNWRPBYTFLDRFVNGDF : 77
A.fumigatu : -----MGWRLVGSLLAFFAATSEI--AWPYDEAL--VDYLNLTNKOASNPABEYSTDGPGH--KAT--PSPNWRPBYTFLDRFVNGDF : 76
A.nidulans : -----MGRLQLSSGLKAI--ALLTF--AATAT--CWPYDESL--VDYVNTNKSATNPADYVGEWSDH--KPH--PSPNWRPBYTFLDRFVNGDF : 81
M.graminic : -----MAYRMDPEY--TEYLNQDQFTENPLEYMGYWHEDAADYT--PSPNWRPBYTFLDRFVNGDF : 61
                    5N6N n a P Y                    8P NWR P Y3 F6D45VNGDF

*          100          *          120          *          140          *          160          *          180          *
M.grisea.a : TNDNDINGTYEODNTFNQLRHGGDLGCVLDSLDYTCGCGVKGITYAGSEFINAEPWCADAYS LDTLLKHFGRKMKQKTHQAIHDRGMVVI : 173
P.anserina : NNDNDINGTYEODMMSQQLRFGGDLGGLRDSLDYTAGCARAIYIAGSEFINAEPWCADAYS LDTLLKHFGRKMKQKTHQAIHDRGMVVI : 178
N.crassa.a : MDNVTMTGDLIFEGYLNSTPFLVEEHKVMKSD--RYYLDFDIGNTYNKTCDYEPFVYDGG--KRIKP--DGLKGCYDSDFDQYGDTEAFG : 161
B.cinerea : TNDNDINGTRFETDEMOTQLRHGGDLGGLLDSLDYTCGCGVKGITYAGSEFINAEPWCADAYS LDPSSLLOHFGITDMMRKTATAIHDRGMVVI : 170
A.fumigatu : TNDNDINGTDFEHDNINQMRHGGDYVGLDITLDYDQCGVKGITYAGSEFINAEPWCADAYS LDTLLDHHFGITDMMRKTATAIHDRGMVVI : 169
A.nidulans : TNDNDINGTDFEHDNINQMRHGGDYVGLDITLDYDQCGVKGITYAGSEFINAEPWCADAYS LDTLLDHHFGITDMMRKTATAIHDRGMVVI : 174
M.graminic : YNDNDINGTAFERPNPNQMRHGGDLGGLDITLDYDQCGVKGITYAGSEFINAEPWCADAYS LDTLLDHHFGITDMMRKTATAIHDRGMVVI : 154
                    ND INGT 5E D s Q6R GGD6 G6 D3LDY6 GmG K 6Y6AG3p 6N PwG D YS 6D 36d hfg 6 w 1h fga v0

*          200          *          220          *          240          *          260          *          280          *
M.grisea.a : IDQMTATMGDLIFEGYLNSTPFLVEEHKVMKSD--RYYLDFDIGNTYNKTCDYEPFVYDGG--KRIKP--DGLKGCYDSDFDQYGDTEAFG : 265
P.anserina : IDNVTMTGDLIFEGYLNSTPFLVEEHKVMKSD--RYYLDFDIGNTYNKTCDYEPFVYDGG--KRIKP--DGLKGCYDSDFDQYGDTEAFG : 267
N.crassa.a : MDNVTMTGDLIFEGYLNSTPFLVEEHKVMKSD--RYYLDFDIGNTYNKTCDYEPFVYDGG--KRIKP--DGLKGCYDSDFDQYGDTEAFG : 250
B.cinerea : LDNVTMTGDLIFEGYLNSTPFLVEEHKVMKSD--RYYLDFDIGNTYNKTCDYEPFVYDGG--KRIKP--DGLKGCYDSDFDQYGDTEAFG : 263
A.fumigatu : PDNVTMTGDLIFEGYLNSTPFLVEEHKVMKSD--RYYLDFDIGNTYNKTCDYEPFVYDGG--KRIKP--DGLKGCYDSDFDQYGDTEAFG : 261
A.nidulans : PDNVTMTGDLIFEGYLNSTPFLVEEHKVMKSD--RYYLDFDIGNTYNKTCDYEPFVYDGG--KRIKP--DGLKGCYDSDFDQYGDTEAFG : 266
M.graminic : LDNVTMTGDLIFEGYLNSTPFLVEEHKVMKSD--RYYLDFDIGNTYNKTCDYEPFVYDGG--KRIKP--DGLKGCYDSDFDQYGDTEAFG : 246
                    DmDdRgDdDgGfG IN 31FF 6h w4 K 1 DF GH IN IC 1F 23 6 6 G 11S6DFDQGD 8AFG

*          300          *          320          *          340          *          360          *          380          *
M.grisea.a : FPDWQRQLAKFASVQDRLRDREHPSVMAKIKVPSCLATQMLDDEYFRIDKAKQVTVLBAQAEPSSAMRACAKE--VGRDNEMVYGEITSGNVLSV : 357
P.anserina : FPDWQRQLAKFASVQDRLRDREHPSVMAKIKVPSCLATQMLDDEYFRIDKAKQVTVLBAQAEPSSAMRACAKE--VGRDNEMVYGEITSGNVLSV : 359
N.crassa.a : FPDWQRQLAKFASVQDRLRDREHPSVMAKIKVPSCLATQMLDDEYFRIDKAKQVTVLBAQAEPSSAMRACAKE--VGRDNEMVYGEITSGNVLSV : 343
B.cinerea : FPDWQRQLAKFASVQDRLRDREHPSVMAKIKVPSCLATQMLDDEYFRIDKAKQVTVLBAQAEPSSAMRACAKE--VGRDNEMVYGEITSGNVLSV : 355
A.fumigatu : YPDWQRQLAKFASVQDRLRDREHPSVMAKIKVPSCLATQMLDDEYFRIDKAKQVTVLBAQAEPSSAMRACAKE--VGRDNEMVYGEITSGNVLSV : 353
A.nidulans : WPDWQRQLAKFASVQDRLRDREHPSVMAKIKVPSCLATQMLDDEYFRIDKAKQVTVLBAQAEPSSAMRACAKE--VGRDNEMVYGEITSGNVLSV : 358
M.graminic : YPDWQRQLAKFASVQDRLRDREHPSVMAKIKVPSCLATQMLDDEYFRIDKAKQVTVLBAQAEPSSAMRACAKE--VGRDNEMVYGEITSGNVLSV : 338
                    GEDW RQD REASVQDRREW F V 40 CO 0 LD Dg K DRA Q 1 GA 8 a K CA K M 0 G 611 GNC Y86

*          380          *          400          *          420          *          440          *          460          *
M.grisea.a : YLGRGRQSDMKNPDLT---TALSLSGS---DKKYLFRPFGNSALDGGAFHYSYRRLTKFLGLOENLQAGFDLTDQMATFMDMTQSNDFVY : 444
P.anserina : YLGRGRQEPGAENLH--PEKAMNMDSDKNNQDLFVREPGNSALDGGAFHYSYRSMTRFLGLSCHLQAGFDLTDQMATFMDMTQSNDFVY : 449
N.crassa.a : YLGRGRQEPGAENLH--PEKAMNMDSDKNNQDLFVREPGNSALDGGAFHYSYRSMTRFLGLSCHLQAGFDLTDQMATFMDMTQSNDFVY : 435
B.cinerea : YLGRGRQSDMKNPDLT---TALSLSGS---DKKYLFRPFGNSALDGGAFHYSYRRLTKFLGLOENLQAGFDLTDQMATFMDMTQSNDFVY : 442
A.fumigatu : YLGRGRQSDMKNPDLT---TALSLSGS---DKKYLFRPFGNSALDGGAFHYSYRRLTKFLGLOENLQAGFDLTDQMATFMDMTQSNDFVY : 440
A.nidulans : YLGRGRQSDMKNPDLT---TALSLSGS---DKKYLFRPFGNSALDGGAFHYSYRRLTKFLGLOENLQAGFDLTDQMATFMDMTQSNDFVY : 447
M.graminic : YVGRGRQSDMKNPDLT---TALSLSGS---DKKYLFRPFGNSALDGGAFHYSYRRLTKFLGLOENLQAGFDLTDQMATFMDMTQSNDFVY : 425
                    Y6GRGR2p A6 6 F6R A6D AFHY3 YR 6T4FLG6 G L ag5D p 1 W W 6 3ND N

*          480          *          500          *          520          *          540          *          560          *
M.grisea.a : ANTGFDPDRHLYGVTNODVFRWPAIEKCTERMLLAFETITLFLPGAPLIIYGBEQEYVLDNSBNYVFGROAPSPPTAMQAHACYKQDNEVY : 537
P.anserina : ANTGFDPDRHLYGVTNODVFRWPAIEKCTERMLLAFETITLFLPGAPLIIYGBEQEYVLDNSBNYVFGROAPSPPTAMQAHACYKQDNEVY : 542
N.crassa.a : ANTGFDPDRHLYGVTNODVFRWPAIEKCTERMLLAFETITLFLPGAPLIIYGBEQEYVLDNSBNYVFGROAPSPPTAMQAHACYKQDNEVY : 528
B.cinerea : ANTGFDPDRHLYGVTNODVFRWPAIEKCTERMLLAFETITLFLPGAPLIIYGBEQEYVLDNSBNYVFGROAPSPPTAMQAHACYKQDNEVY : 535
A.fumigatu : ANTGFDPDRHLYGVTNODVFRWPAIEKCTERMLLAFETITLFLPGAPLIIYGBEQEYVLDNSBNYVFGROAPSPPTAMQAHACYKQDNEVY : 533
A.nidulans : ANTGFDPDRHLYGVTNODVFRWPAIEKCTERMLLAFETITLFLPGAPLIIYGBEQEYVLDNSBNYVFGROAPSPPTAMQAHACYKQDNEVY : 540
M.graminic : ANTGFDPDRHLYGVTNODVFRWPAIEKCTERMLLAFETITLFLPGAPLIIYGBEQEYVLDNSBNYVFGROAPSPPTAMQAHACYKQDNEVY : 518
                    aNTG FDPDRH6Y 3NQDVFRRP 6 G 4 6 FI T 6PG P 6 5GEEQ Y LD 3a NY65GRQa AW HgC5 1 Y

*          60          *          580          *          600          *          620          *          640          *
M.grisea.a : VDMVMEKSRGCDITFVSYDHRDPSAFLRNMMKMFQMR--QIPSEHCGVLYQKLANOTRPELLRGS--SSPSEFGIWRARGLMIPAKANE : 627
P.anserina : IGMVMEKSRGCDITFVSYDHRDPSAFLRNMMKMFQMR--QIPSEHCGVLYQKLANOTRPELLRGS--SSPSEFGIWRARGLMIPAKANE : 629
N.crassa.a : VDMVPTKAKDCCDKSVGDHRNPAAFVNRNLIKMMFAMRNSQLGVEHCGVLYQKLANOTRPELLRGS--SSPSEFGIWRARGLMIPAKANE : 620
B.cinerea : YQEPNDSCTRGCDITFVSYDHRDPSAFLRNMMKMFQMR--QIPSEHCGVLYQKLANOTRPELLRGS--SSPSEFGIWRARGLMIPAKANE : 626
A.fumigatu : YQEPNDSCTRGCDITFVSYDHRDPSAFLRNMMKMFQMR--QIPSEHCGVLYQKLANOTRPELLRGS--SSPSEFGIWRARGLMIPAKANE : 624
A.nidulans : YQEPNDSCTRGCDITFVSYDHRDPSAFLRNMMKMFQMR--QIPSEHCGVLYQKLANOTRPELLRGS--SSPSEFGIWRARGLMIPAKANE : 631
M.graminic : YQEPNDSCTRGCDITFVSYDHRDPSAFLRNMMKMFQMR--QIPSEHCGVLYQKLANOTRPELLRGS--SSPSEFGIWRARGLMIPAKANE : 606
                    P GC D DHR1P p6RN 4 M5 6R 6 G 6 L qT GS 3e G6wS R q

```



M. grisea.a : S----E P Y V M L V Y H N E A V E K T T F D C N S -- Q A - E H V E V A F P D S G D R K V V N L F D K S D V L L G S S A V K N G E T G S A - S A G C T S S T D M K F Y E F R A Y V : 712  
 P. anserina.a : D----E P V M L L Y S N R N K H T Y E F D C S N P D T F - N K G A P I A F D A C T K I R D V E D G S P E I L E A S P V K N E F D N S T K N A G C L S K I V M P P Y C P R A Y V : 717  
 N. crassa.a : D----K - P V M E V Y H N R E N T T T K F N C D Q ---- R E G A F L S F D A C A K V R N L M D D G D V I L S S S N V K N N Y N T S G K N M G C L S E V T L N P E F R A Y V : 703  
 B. cinerea.a : A G G A N Q S V M V Y H N N Y D V T Y S F D C S S N E T ---- S I V A F L D G V T V R N L Y P Y E E V L K A G P Q L G I A N Q T G F N G C L D S L D I V P Y E Y R A Y V : 714  
 A. fumigatu.a : D--K D D Q P V M L V Y Q N E N H Q V D K F D C G S N D S ---- A I V A F A S C T K V R N L Y P H D E H V L K D G P K L G L N G S S D T N G C L D S L D K E E F R A Y V : 710  
 A. nidulans.a : S--D D N E P I W L V Y S N M N R H D Y T F D C S D N E T ---- A I T A A F P S C T K V R N L H P Y D T L L G D G P E M V Y G N S T E L V G C L N P L M T S R Y E F R A Y V : 717  
 M. graminic : A N R N A N L P I W L L P F N L N E K R E F E N C S D N A D L N T T A L S Y P A C T K I V R L H P Y D E H I L I N S T Q T L Y I S N S T E P N G C L R E L E M P P E G F A Y V : 699  
 6W 65 N t 5 F1C a 6 p5 G 6 16f tL s GC6 6 6 p5 5 YV

M. grisea.a : --E D G K F V E I T P M I T C E I P G P S D N P G K H D S S F D S ---- F A D G R I D L R L E S V R M A D C D S I T K A I L L T T K D G B C T G S S A R T ---- T Q V T C G L : 796  
 P. anserina.a : --L K D S W L E A P M I T R E P G ---- H D M S T D S T ---- G K G G V F L R L B N N H E M - D C D S V K K S T A - V L T V D H S C I A N P K K L D I T W D N N A C G T : 796  
 N. crassa.a : D D P E D A D M Q E A P M I T R E P G ---- H D V P H D S ---- K A N G R H D I S F E N T E M - D C D S V T K A L V - N L T Q D -- G V N D P T Q L -- S W T K P N C E L : 780  
 B. cinerea.a : --P K S V V G S P M I T S S P G ---- H D A R I V S T V A P G Q E T E T E F G S A B M - K C S D L I S K M V I T S A T E D -- G V - A T - L A N A T G E Y S C T L : 793  
 A. fumigatu.a : --P K N R I A D R E M I T Q I T P G ---- H D T P L S K V A P D Q A E E I D V S I Y S A B M - D C D S V T K S I T L N S T E S -- G K T - P S - V D S K S A -- S C R G : 787  
 A. nidulans.a : --K N E L P K K R E M I T R P Q P G D D E A N G - H D S P H R S V A P D A S E T V R L L Q P S E A M - C C D S V T D S I F N S S T E T -- G K I - P S - I D A S T I -- C C G A : 800  
 M. graminic : --P A S D W L E E P V I T R S P G ---- H D A S L S T ---- R D K R E V O L B S Q S M - D C N N V T R S I T F E S S T D N -- G D I R P T - V D R D T I -- R C G A : 773  
 S p P6IT f PG HD St 6 6 F M C 6 T G 6

M. grisea.a : L--Q N P T K R D L V E F V P S L F E S A K L T S L A D G I H K V Y V E N A P A K T G S - T A A R D V F L E R E G K L N N P V M P Q V A N Y S T T L V S G T K - D A M S T H S : 885  
 P. anserina.a : F T P --S E K S E Y I C S L E S T K I E G K L N V Q D G I I K L S V R - N A T R E D G S A S N A N D H F L I R E G A P N P V P P S S A N Y S R T L L E - F D G N R M A N H S : 885  
 N. crassa.a : F T P Q D A D K I K Y T C A I N S A R R N A T L N V A D G I I L L D P T A A A K G G V T K G T R D H F L L R D G K P S N P V V M G M D A Y N W D L Q S V S N N I Y R K H N : 873  
 B. cinerea.a : L P S A - V N V T E F V G S I P T M T T E K G N L N V S N G V H S I T L A - N I T S N S G S S G A G A D T F L E R V G Q V D N P I A F P G S A N F T R E L L K Y D N G T L Y S H K : 884  
 A. fumigatu.a : L P - A - T D - T Q M T Q L P N V V T E G K L G Y N G I H R L V T P - N A S D S A C S A N A I D H F L E R V G Q S D N P M V E T - S A N Y S S L L H E H E N G T L F H Q H H : 875  
 A. nidulans.a : I T E V - A N - S N A T C H I P G K N Q T A A D L R G Y Y N G I H R V Y V M - N A S N A D C D S S H A V D H F L E R G Q I D N P M V E T - S A N Y S S L L H E K E D G T F Y H Q H H : 889  
 M. graminic : L A N P - E M S T L V A G - L P S A F P S A K L R N V E D G V H R L L V P - V V K T L S G Q L K S R D H F L I R V G Q P N P I V E T R A N Y S S T L V Q A S D D K L M L N S : 863  
 G 6 S L 6 1G6 6 6 G t D F L R G N P6V5 AnS L6 6 H

M. grisea.a : A P G A T R Y R Y T N N G T M S W Q P Y T E Q T V - S I S E M ---- W S C T A K Q Q E G C H V V O V H S A P L E S S S I K H G L N - W G T E R L R L D H V E I H G P : 970  
 P. anserina.a : A A G A T H R F R S T D F G S L W S W P F Y D A E K T Y Q E V D A M Y R D N T L M G T E L Q R W E G R H L O V O Y F S P L G S S G F I Q A D S N - D I T F E R H V P H I R I H G P : 977  
 N. crassa.a : A P G A T R Y R Y S T N F G S W S R W V D N D E K E T -- S V T G Q Q ---- W S T A L Q A E G R H I Q V O Y F S R P L G S S A F I Q H S D K G -- I D Y Q R V F P H I K L H G P : 957  
 B. cinerea.a : A A G A D R F Y S L N W G S S W S W L E Y V G N T I E L P Q A ---- W I G T S K Q K D G D H V M Q V Y S R L T G S S D V V Q A D L E - T N K W S R R L P H L E A N G P : 969  
 A. fumigatu.a : A A G A D R Y R Y S T N W G S S F S D M D Y K G N E T I E L P ---- W S T E R K Q K D C H H V R V E Y S R L T G S S D Y V Q G D S G W D S N R P R F P H L E F N G P : 961  
 A. nidulans.a : A A G A D R Y R Y S T N G T F S D M K T Y K G N T I T M L P ---- W N C T K A Q E G C H H I R V E Y S R M T G S S S H V Q G D S G W K Y T E R F R P H L E A N G P : 975  
 M. graminic : A A G A D L F R Y S T N F G T F S D W T E T E G M T E V E K Q E ---- W S T E K K Q A W K S H R V E Y S F R G S S D H V Q A D L --- S K E R R L E D L E L N G P : 946  
 A GA 5453t15G3 5S W Y g W GT Q W G H6 62Y S GSS Q D R Ph GP

M. grisea.a : F N K Y G Y D A G L N T M A L A --- C A G L M E K H F F Y E W E A N --- F O L N I W G I N P D Q P D A F I Y G D V D N D G V A D R L P P S S L A N N V Y N T S G P E M P Y W : 1056  
 P. anserina.a : Y N K Y G Y D A G L P G S M D L V --- H H H T M E L H Y M Y E W E A E --- F O L N V V G I N P D N Q P D V G E I Y G D I D D G I V D R L P P S S L A R N W I N I T E A P L P Q L : 1063  
 N. crassa.a : F N K Y G Y D T G L P G S M D L V --- G H N T M S L H Y M Y E W E A N --- F O L N I W G I N P D N Q P D S E I F G D I D G D H V V D R L P P S S L A N N V I N I T E P P T P A L : 1043  
 B. cinerea.a : Y N O Y G Y D T G I D N G F T L N K --- K D S L M E Y K F M T E W E A N --- V M O V N V G M N P D G Q P D E T I V I G I D I D N D I L D R M P P S S L T A L I N I T R V P S E P Y L : 1056  
 A. fumigatu.a : Y N O Y G Y D A G L D N A V O L --- G D D G L M R F R E V A E W E A N --- Q Q O F N V G I N P D G Q P D S E V E G D A D M D G V I D R M P P S S L T L I N I T D H P E A P H L : 1047  
 A. nidulans.a : Y N O Y G Y D G L D N Q I K L D A G A G D G Y M K Y F T S E W E A N --- V G O V N V G I N P D E P D O S W Y M G D V D K V I D R M P P S S L A T L I N I T D H P E P H Y I : 1065  
 M. graminic : Y N S Y G Y D A G L D N T F K L S --- N D G E M S I P M T E T S A S G S V A Q I N V V G M N P D G Q P D O I I V L G D I D G S V D R L P P S S L A K I L N I T M P E R H E L : 1035  
 5N 5GYD G6 L W 5 EwPA Q N6W6GNPD 2P 6 GD D D 6 DR6PPSsL 66NIT Pp P

M. grisea.a : S W K I Q F P D D N L T I K K V P Q C H I A V O V I L M F L A T G S V I L A A V S C N T Y A G F Y R V K V N K S E F S ---- K R K G P L K H - N L S S V N L M S R E K E K G M G : 1143  
 P. anserina.a : A Y R I V Y N D A T W R E Y I T E T C H I G I Q V L F I L L A I I F V L L A V L A G A G I Y T S F Y O V K V N K S E F S ---- S R G W P L R H C N L S L D F -- R N L K G K - G : 1148  
 N. crassa.a : A W K V E Y N D A T W T H L E P A G N N V O I A E M L F A I L E V A L A C L A G A G I Y T S F Y O V K V N K S E F A ---- T R G W P L R H C N L S L N I -- A N V G R G -- : 1127  
 B. cinerea.a : C Y K I A D D G N Y R Y Q I P Y G N R S Y Q M L V V L E W I E V L S G G L S I D L F K S F Y A V K N S V G V K ---- E A R N Y I P L A D R R K L R - R E K K D P S P E K E : 1143  
 A. fumigatu.a : A W V H L D D S T L Q Q L B E T C S R A A Q M A F E L W L T E V L T A A A C V Y E K K S F Y O V K F N O V G V S ---- E K R K L I P L A R R R K I R - R -- A D L E D G E P : 1132  
 A. nidulans.a : S W K I Y I N D A T M R Y L I P A C H Q S G O I A M P L E W I I P L S G S A C V Y E K S F Y K V K F N E I C A A G A S T E M R S L N P L A R R R M - Q L A S G N G K N G P S : 1157  
 M. graminic : A W K I A V N D G N M R A L I T E T E N W H O L T L Y V L L W T V L T A A L S A W V P L G F Y R K N R I K A T E -- K I R S V L E V A R R K P L R - K L F H R R T P S S E R : 1124  
 5k6 1D P G Q6 L p6 5 5 F Y V K N G 4 P6 6

**GT1**

M. grisea.a : M E M A T V T P S E M V S I T P A P G G A A A A A G K D G K R F K V L I A T M E Y N I D D M R I S I K I G G L G V M K L M S T A L P P C D I I W V V P V G D V E Y E V T -- P A E S : 1234  
 P. anserina.a : V E M S P M P P P E ---- P S A A L V P F G S G G G O F V L I A T M E Y N I D D F R I K I K I G G L G V M A Q L M G S A L K H M N L W V I P V V G D V T Y E F S M Q A A E : 1234  
 N. crassa.a : V E M N A I T P P P E ---- P S S A L S P L G A A G G R F V L I A T M E Y N I D D F R I K I K I G G L G V M A Q L M A N A D H M D I V V V I P V V G D V T Y E F E K M Q R A E : 1213  
 B. cinerea.a : M T V M G G L -- H S M F H E N A T Q L G L Q A D V A A T G R F V L I A T M E Y D I D D W A I K I K I G G L G V M A Q L M G K N L G Q D L I W V V P V G G E D Y D I D -- H O A E : 1232  
 A. fumigatu.a : M N P L V R F A N R S S F V Q S R S A F ---- N E G T L K R F V L I A T M E Y D I D D W A I K I K I G G L G V M A Q L M G K N G C H O N L I W V V P V G G E V D Y D E D -- Q R A D : 1219  
 A. nidulans.a : F N P L M R I A E K S G F M Q S T T A L -- A G A A S K R F M V L I A T M E Y D I D D W A I K I K I G G L G V M A Q L M G K T P G Q D L I W V V P V G G E V D Y D E D -- T B A E : 1245  
 M. graminic : F -- L Q E V A K P S -- L E N S L E ---- N O F V L I A T M E Y N I D D M R I K I K I G G L G V M S Q L M G N N V -- F N L I W V V P V G G E D Y D I D -- E B A P : 1199  
 R V L I A T M E I T D S I K R S G S G V M a q m G N 100W6F VS 6 TE d A p



```

*          1320          *          1340          *          1360          *          1380          *
M. grisea.a : MEVNLGSSYEVKVOYHYHENITYVLLDAPVFRQTKADPYIARMDDISALTYAAMNSCIAATRRPS-VDIYHINDYHCAAPLLELLPOTI : 1326
P. anserina : MEVVMGQPELEIYVYVKNITYVLLDAPVFRQTKANFYIARMDDISALTYAAMNSCIAATRRPE-VDIYHINDYHCAAPLLELLPOTI : 1326
N. crassa.a : MEVVMGQPELEIYVYVKNITYVLLDAPVFRQTKADPYIARMDDISALTYAAMNSCIAATRRPE-VDIYHINDYHCAAPLLELLPOTI : 1305
B. cinerea. : MDVAILGNSYVVOVQYHTLRNITYVLLDAPVFRQTKSEPYIARMDDLDLAVYSAWNSCIAATRRPE-VDIYHINDYHCAAPVAPVLELLPOTI : 1324
A. fumigatu : MEVVLGNSYEVVVOYHYVKNITYVLLDAPVFRQTKSEPYIARMDDLDLAVYSAWNSCIAATRRPS-VDIYHINDYHCAAPLLELLPOTI : 1311
A. nidulans : MEVVLGQAYQVVOYHYVKNITYVLLDAPVFRQTKSEPYIARMDDLDLAVYSAWNSCIAATRRPE-VDIYHINDYHCAAPLLELLPOTI : 1337
M. graminic : MEVVLGSSYEVVVOYHYVKNITYVLLDAPVFRQTKADPYIARMDDISALTYAAMNSCIAATRRPE-VDIYHINDYHCAAPLLELLPOTI : 1292
M V 66G Y 6 V Y NITYV6LDAP6FR Q3K PY ARMDD6 Sa6 Y AWW CIA I RF vd6YH6NDYHG AP6YLLP TI

*          1400          *          1420          *          1440          *          1460          *          1480
M. grisea.a : ECCLSLHNAEFQGMWPMRPEBQKEVCSVFNLDPEVVRDYVOYGSVFNLLHAGASLRLHQRCFGAVGVSRKYGDRSDARYPIEFWGLSKNIQGL : 1419
P. anserina : ECCLSLHNAEFQGMWPMRPEBQKEVCSVFNLDPEVVRDYVOYGSVFNLLHAGASLRLHQRCFGAVGVSRKYGDRSDARYPIEFWGLSKNIQGL : 1419
N. crassa.a : ECCLSLHNAEFQGMWPMRPEBQKEVCSVFNLDPEVVRDYVOYGSVFNLLHAGASLRLHQRCFGAVGVSRKYGDRSDARYPIEFWGLSKNIQGL : 1398
B. cinerea. : ECCLSLHNAEFQGLWPMRQKBEVCSVFNLDPEVVRDYVOYGSVFNLLHAGASLRLHQRCFGAVGVSRKYGDRSDARYPIEFWGLSKNIQGL : 1417
A. fumigatu : ECCLSLHNAEFQGLWPMRQKBEVCSVFNLDPEVVRDYVOYGSVFNLLHAGASLRLHQRCFGAVGVSRKYGDRSDARYPIEFWGLSKNIQGL : 1404
A. nidulans : ECCLSLHNAEFQGLWPMRQKBEVCSVFNLDPEVVRDYVOYGSVFNLLHAGASLRLHQRCFGAVGVSRKYGDRSDARYPIEFWGLSKNIQGL : 1430
M. graminic : ECCLSLHNAEFQGMWPMR E E6C V5n6 YVQ5G VFN6LHAGAsyLR6HQ GFGAVGVs KYG RS ARYpIFW L 6g L
P CLSLHNAEFQ6GWPMR E E6C V5n6 YVQ5G VFN6LHAGAsyLR6HQ GFGAVGVs KYG RS ARYpIFW L 6g L

*          1500          *          1520          *          1540          *          1560          *          1580
M. grisea.a : ENPDPSPDADNDPNDISNQS-KEEIDQSEBEKRGDLRRAQAEWAGLEVDFEAVLVEFVGRWSLQKGVLDLIADLPEPSLLEKYEKTQLIIVGVE : 1512
P. anserina : ENPDPSPDADNDPNDISNQS-KEEIDQSEBEKRGDLRRAQAEWAGLEVDFEAVLVEFVGRWSLQKGVLDLIADLPEPSLLEKYEKTQLIIVGVE : 1511
N. crassa.a : ENPDPSPDADNDPNDISNQS-KEEIDQSEBEKRGDLRRAQAEWAGLEVDFEAVLVEFVGRWSLQKGVLDLIADLPEPSLLEKYEKTQLIIVGVE : 1490
B. cinerea. : ENPDPSPDADNDPNDISNQS-KEEIDQSEBEKRGDLRRAQAEWAGLEVDFEAVLVEFVGRWSLQKGVLDLIADLPEPSLLEKYEKTQLIIVGVE : 1506
A. fumigatu : ENPDPSPDADNDPNDISNQS-KEEIDQSEBEKRGDLRRAQAEWAGLEVDFEAVLVEFVGRWSLQKGVLDLIADLPEPSLLEKYEKTQLIIVGVE : 1493
A. nidulans : ENPDPSPDADNDPNDISNQS-KEEIDQSEBEKRGDLRRAQAEWAGLEVDFEAVLVEFVGRWSLQKGVLDLIADLPEPSLLEKYEKTQLIIVGVE : 1521
M. graminic : ENPDPSPDADNDPNDISNQS-KEEIDQSEBEKRGDLRRAQAEWAGLEVDFEAVLVEFVGRWSLQKGVLDLIADLPEPSLLEKYEKTQLIIVGVE : 1474
pNPDp3D w 61 E R 4r2AQEWAGL 1P A L VEVGRWS6QK6DLDIAD P 6LE p QLI 6GP

*          1600          *          1620          *          1640          *          1660          *
M. grisea.a : VIDLYGFAALKLEKRLMKRYEGRVFSKPEFTSLPPYIPSGAEFALI PSRDEPFGGLVAEFGGRKALGVGARVGLGQMPGFYVVEVSTPSQHL : 1605
P. anserina : VIDLYGFAALKLEKRLMKRYEGRVFSKPEFTSLPPYIPSGAEFALI PSRDEPFGGLVAEFGGRKALGVGARVGLGQMPGFYVVEVSTPSHL : 1604
N. crassa.a : VIDLYGFAALKLEKRLMKRYEGRVFSKPEFTSLPPYIPSGAEFALI PSRDEPFGGLVAEFGGRKALGVGARVGLGQMPGFYVVEVSTPSHL : 1583
B. cinerea. : VIDLYGFAALKLEKRLMKRYEGRVFSKPEFTSLPPYIPSGAEFALI PSRDEPFGGLVAEFGGRKALGVGARVGLGQMPGFYVVEVSTPSHL : 1599
A. fumigatu : VIDLYGFAALKLEKRLMKRYEGRVFSKPEFTSLPPYIPSGAEFALI PSRDEPFGGLVAEFGGRKALGVGARVGLGQMPGFYVVEVSTPSHL : 1586
A. nidulans : VIDLYGFAALKLEKRLMKRYEGRVFSKPEFTSLPPYIPSGAEFALI PSRDEPFGGLVAEFGGRKALGVGARVGLGQMPGFYVVEVSTPSHL : 1614
M. graminic : VIDLYGFAALKLEKRLMKRYEGRVFSKPEFTSLPPYIPSGAEFALI PSRDEPFGGLVAEFGGRKALGVGARVGLGQMPGFYVVEVSTPSHL : 1567
VIDLYG4FAALKL 6M Yp RV S4PeFT LPP 6F3GAeFALI PSRDEPFGGLVAEFGGRKALGVGARVGLGQMPGFYVVEVSTPSHL 3 H6

*          1680          *          1700          *          1720          *          1740          *          1760
M. grisea.a : LQQRFOAIEBALACRHNKRAVMRAASAKORF PVAQWVKQLDDELYSESRIRIHREAKKKKFDALSPMGTRPSSRASNISNTYVDPGGAGHTP : 1697
P. anserina : LQQRFOAIEBALACRHNKRAVMRAASAKORF PVAQWVKQLDDELYSESRIRIHREAKKKKFDALSPMGTRPSSRASNISNTYVDPGGAGHTP : 1697
N. crassa.a : LQQRFOAIEBALACRHNKRAVMRAASAKORF PVAQWVKQLDDELYSESRIRIHREAKKKKFDALSPMGTRPSSRASNISNTYVDPGGAGHTP : 1671
B. cinerea. : LQQRFOAIEBALACRHNKRAVMRAASAKORF PVAQWVKQLDDELYSESRIRIHREAKKKKFDALSPMGTRPSSRASNISNTYVDPGGAGHTP : 1671
A. fumigatu : LQQRFOAIEBALACRHNKRAVMRAASAKORF PVAQWVKQLDDELYSESRIRIHREAKKKKFDALSPMGTRPSSRASNISNTYVDPGGAGHTP : 1671
A. nidulans : LQQRFOAIEBALACRHNKRAVMRAASAKORF PVAQWVKQLDDELYSESRIRIHREAKKKKFDALSPMGTRPSSRASNISNTYVDPGGAGHTP : 1705
M. graminic : LQQRFOAIEBALACRHNKRAVMRAASAKORF PVAQWVKQLDDELYSESRIRIHREAKKKKFDALSPMGTRPSSRASNISNTYVDPGGAGHTP : 1657
6 QF AI A6 k R MRA SAKORFPVAQW 6 L s I 6H K 4 ps ps

*          1780          *          1800          *          1820          *          1840          *          1860
M. grisea.a : LSPFPGSSAGPSPGADASRTSLIGFTPTS PGLMS PYGADDDCERLSAPRF PWTDLPSNNRDSTI SVMTTDFTGFRAGSEGAEGDML---- : 1783
P. anserina : LSPFPGSSAGPSPGADASRTSLIGFTPTS PGLMS PYGADDDCERLSAPRF PWTDLPSNNRDSTI SVMTTDFTGFRAGSEGAEGDML---- : 1785
N. crassa.a : LSPFPGSSAGPSPGADASRTSLIGFTPTS PGLMS PYGADDDCERLSAPRF PWTDLPSNNRDSTI SVMTTDFTGFRAGSEGAEGDML---- : 1756
B. cinerea. : LSPFPGSSAGPSPGADASRTSLIGFTPTS PGLMS PYGADDDCERLSAPRF PWTDLPSNNRDSTI SVMTTDFTGFRAGSEGAEGDML---- : 1753
A. fumigatu : LSPFPGSSAGPSPGADASRTSLIGFTPTS PGLMS PYGADDDCERLSAPRF PWTDLPSNNRDSTI SVMTTDFTGFRAGSEGAEGDML---- : 1754
A. nidulans : LSPFPGSSAGPSPGADASRTSLIGFTPTS PGLMS PYGADDDCERLSAPRF PWTDLPSNNRDSTI SVMTTDFTGFRAGSEGAEGDML---- : 1777
M. graminic : LSPFPGSSAGPSPGADASRTSLIGFTPTS PGLMS PYGADDDCERLSAPRF PWTDLPSNNRDSTI SVMTTDFTGFRAGSEGAEGDML---- : 1739
S

*          1880          *          1900          *          1920          *          1940          *
M. grisea.a : -GMPTPPPESFYQSRNSLMLSLKDVVGRHDFKLRVQVDFDPSNBEFFYFESAMLDNLTAKNSTEMCTESFLKSEKSEWBARVRNAKLG : 1875
P. anserina : -GMPTPPPESFYQSRNSLMLSLKDVVGRHDFKLRVQVDFDPSNBEFFYFESAMLDNLTAKNSTEMCTESFLKSEKSEWBARVRNAKLG : 1876
N. crassa.a : -GMPTPPPESFYQSRNSLMLSLKDVVGRHDFKLRVQVDFDPSNBEFFYFESAMLDNLTAKNSTEMCTESFLKSEKSEWBARVRNAKLG : 1847
B. cinerea. : -GMPTPPPESFYQSRNSLMLSLKDVVGRHDFKLRVQVDFDPSNBEFFYFESAMLDNLTAKNSTEMCTESFLKSEKSEWBARVRNAKLG : 1842
A. fumigatu : -GMPTPPPESFYQSRNSLMLSLKDVVGRHDFKLRVQVDFDPSNBEFFYFESAMLDNLTAKNSTEMCTESFLKSEKSEWBARVRNAKLG : 1846
A. nidulans : -GMPTPPPESFYQSRNSLMLSLKDVVGRHDFKLRVQVDFDPSNBEFFYFESAMLDNLTAKNSTEMCTESFLKSEKSEWBARVRNAKLG : 1868
M. graminic : -GMPTPPPESFYQSRNSLMLSLKDVVGRHDFKLRVQVDFDPSNBEFFYFESAMLDNLTAKNSTEMCTESFLKSEKSEWBARVRNAKLG : 1827
3 L86 66G 4 D LQ VD ff D3 ge5 F L L NS CIE 5L 48E4 Wf R1A4LG

```



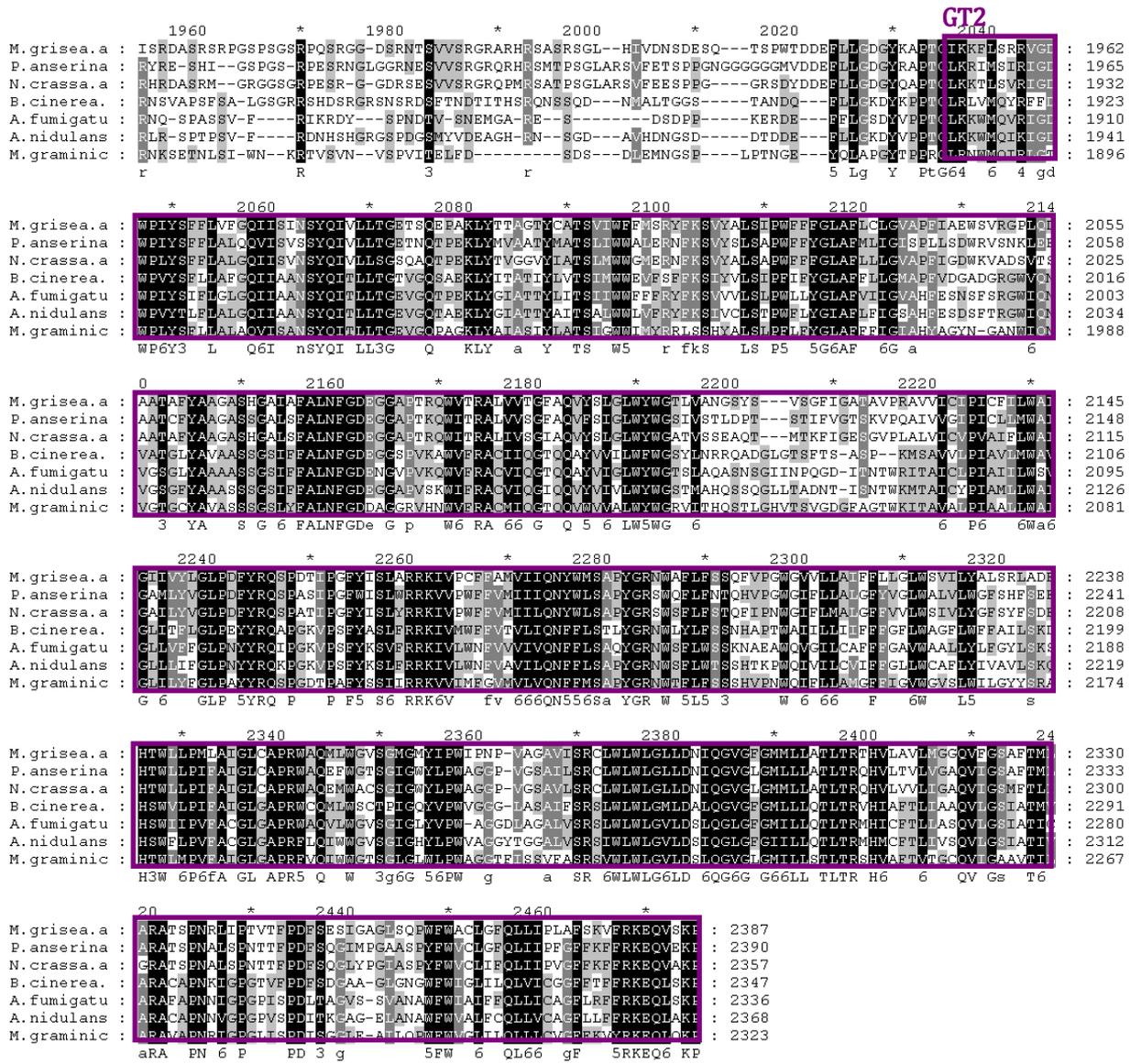


Figure 20: Alignement des séquences des homologues de MgAgs1, chez les espèces fongiques étudiés. Les domaines fonctionnels importants sont entourés

### ➤ 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. cerevisiae*, *C. albicans* et *A. gossypii* cette protéine est inexistante puisque celle-là a un rôle dans la synthèse de  $\gamma(1-3)$  glucane, un composant qu'on ne trouve pas chez la levure.



### 6.3. Arbre phylogénique

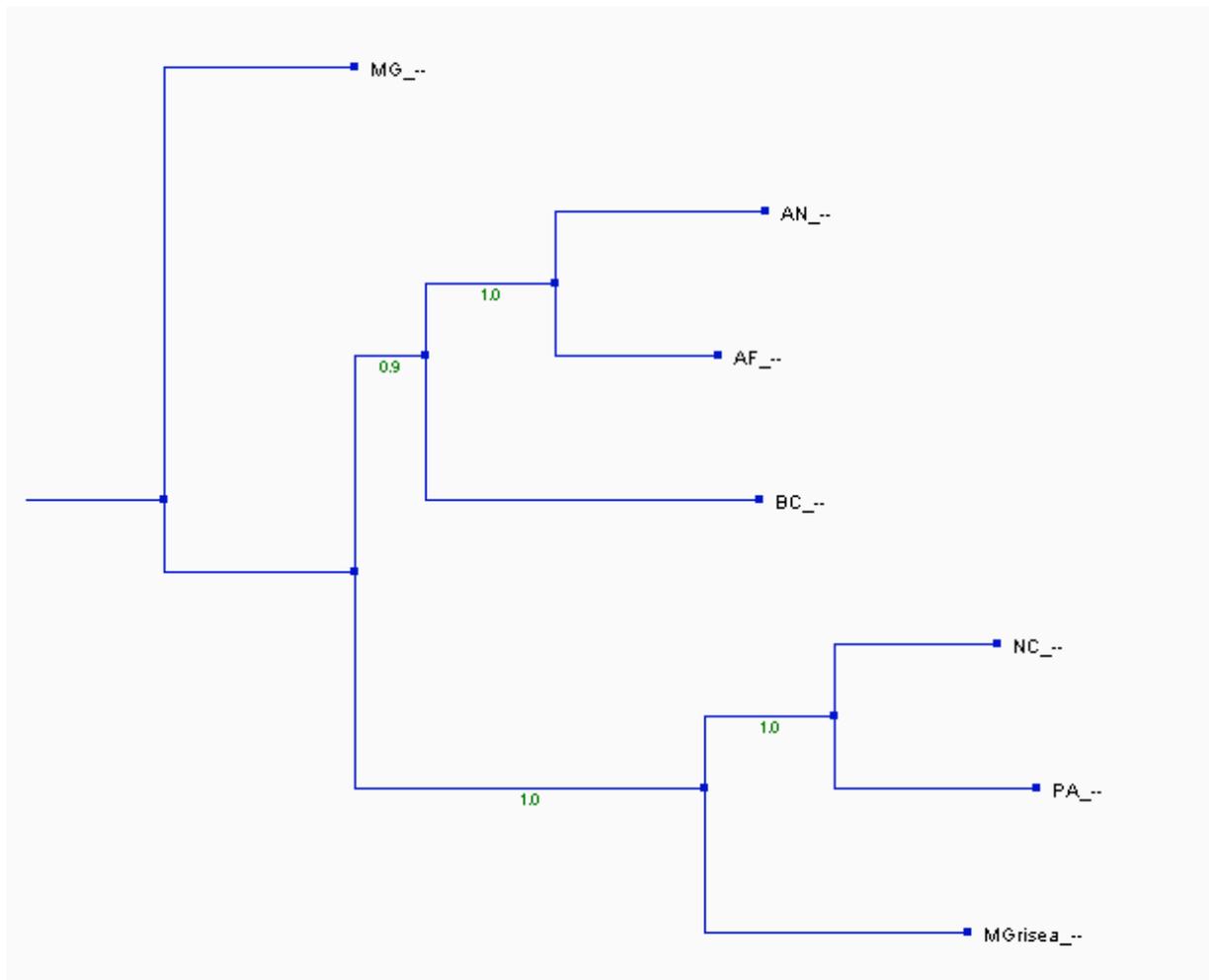


Figure 21 : Arbre phylogénique des orthologues de MgAgs1 réalisé par PhyML.

AF : *Aspergillus fumigatus*, AN : *Aspergillus nidulans*, BC : *Botrytis cinerea*, MG : *Mycosphaerella graminicola*, MGrisea : *Magnaporthe grisea*, PA : *Podospora anserin*, et NC : *Neurospora crassa*

L'arbre est réalisé par la méthode de bootstrap, ainsi, plus la valeur est élevée plus la fiabilité de la branche est importante.



## 7. Adaptateur Ada2

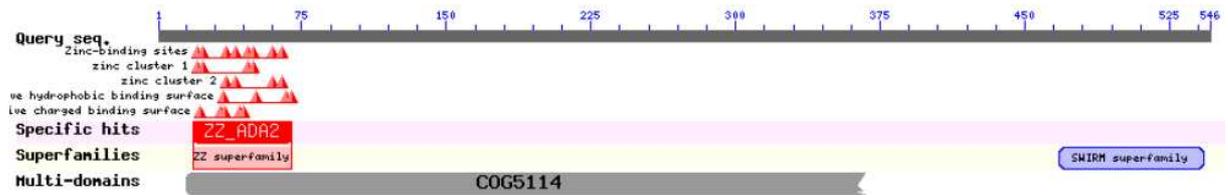


Figure 22 : Schéma des domaines et acides aminés fonctionnels d'Ada2

### 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 transcriptionnelle comme la protéine Ada2 chez *S. cerevisiae*. En effet, la protéine Cas5, chez *C. albicans*, joue le même rôle que la protéine Ada2 chez *S. cerevisiae*.

**COG** : « COG5114 », encode pour un complexe d'histone acétyltransférase, SAGA/ADA ; une sous-unité 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.



## 7.2. Alignement avec mes séquences des orthologues de MgAda2

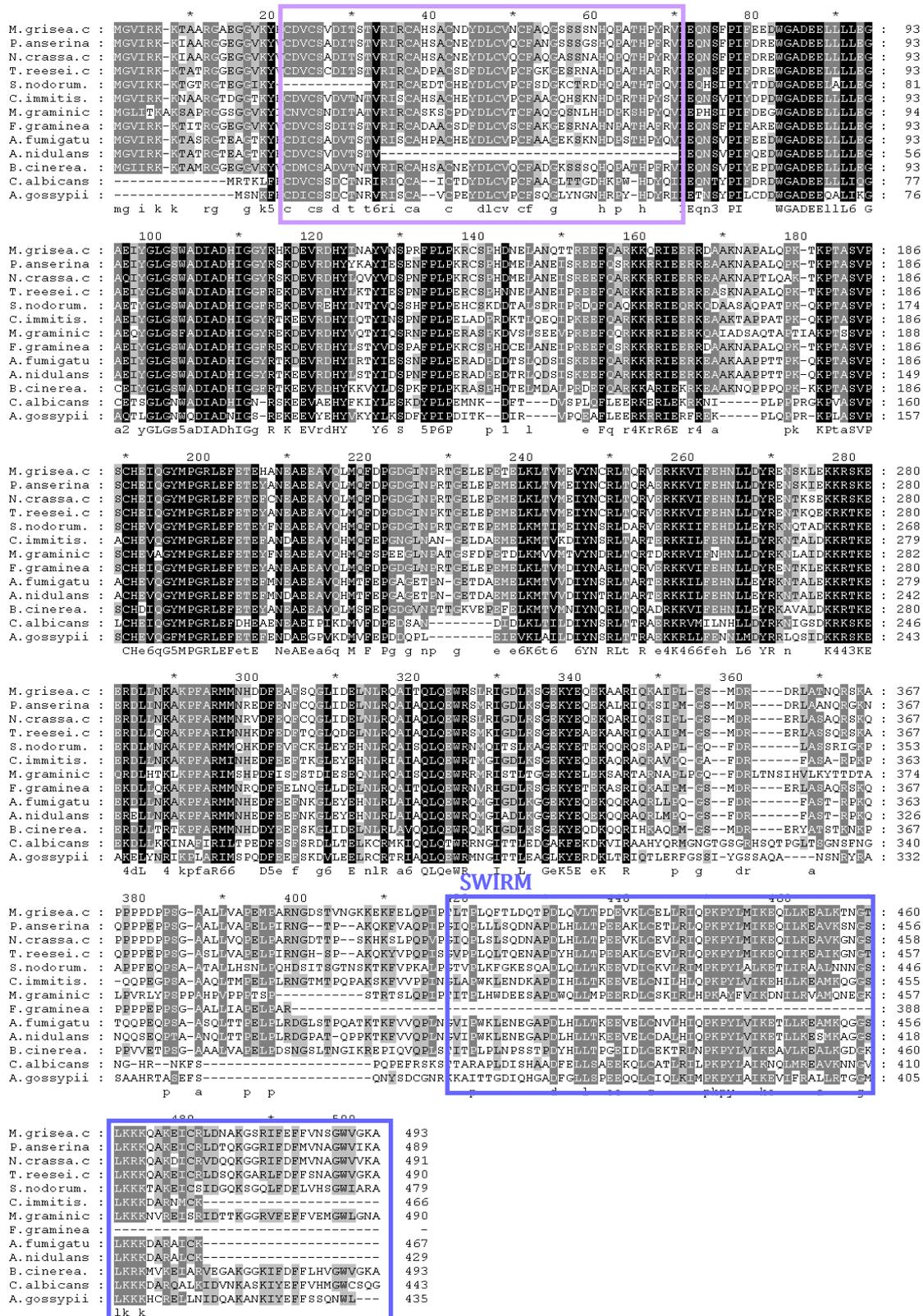


Figure 23: Alignement des séquences des homologues de MgAda2, chez les espèces fongiques étudiés. Les domaines fonctionnels importants sont entourés



### ➤ Conservation des domaines chez les différents champignons

L'adaptateur Ada2 de *M. grisea* possède deux domaines « ZZ », IPR000433 (18 à 64 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. cerevisiae* 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

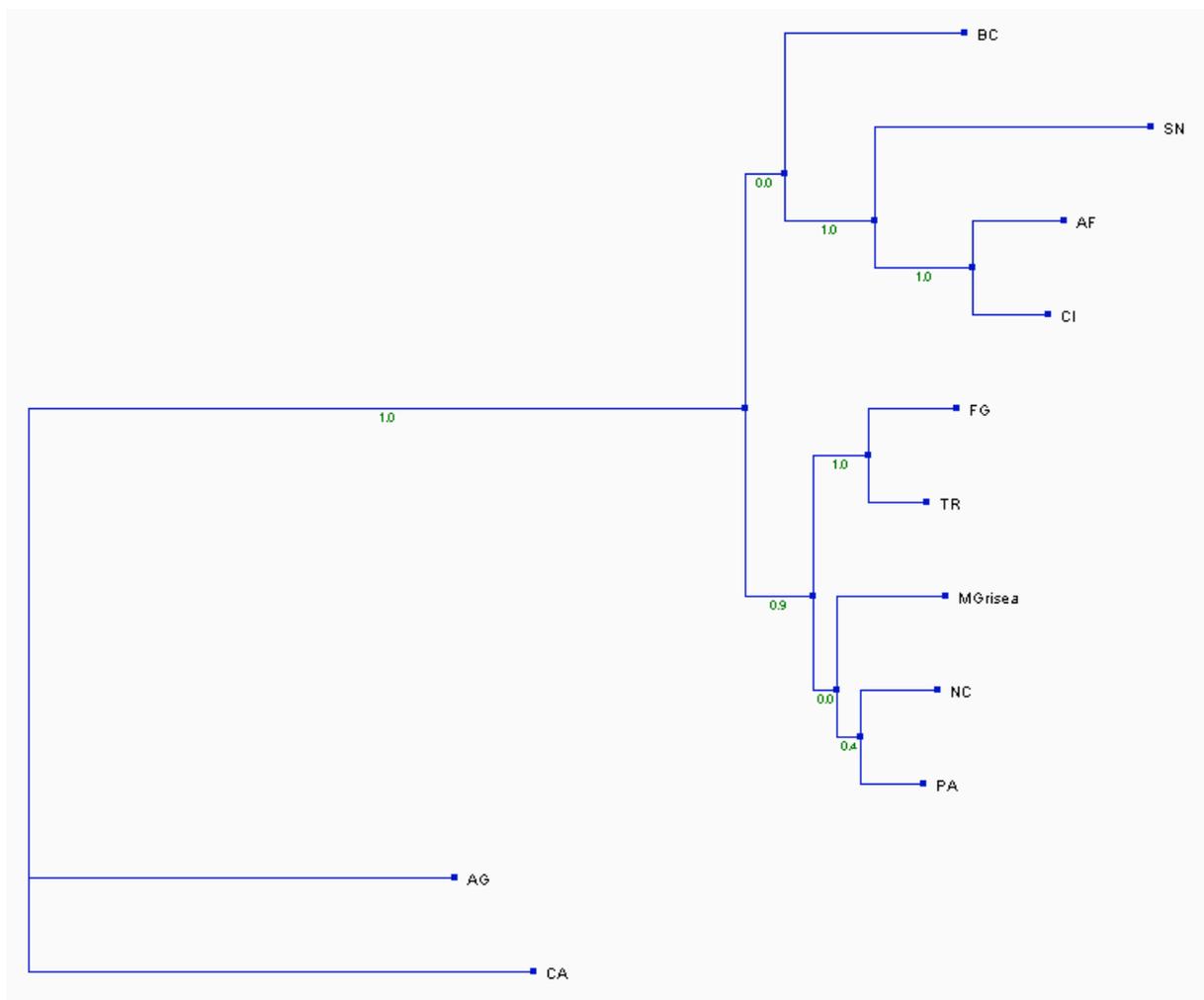


Figure 24: Arbre phylogénique des orthologues de MgAda2 réalisé par PhyML.

AF : *Aspergillus fumigatus*, AN : *Aspergillus nidulans*, BC : *Botrytis cinerea*, MG : *Mycosphaerella graminicola*, MGrisea : *Magnaporthe grisea*, PA : *Podospora anserin*, et NC : *Neurospora crassa*

L'arbre est réalisé par la méthode de bootstrap, ainsi, plus la valeur est élevée plus la fiabilité de la branche est importante.



## 8. Régulateur Knr4

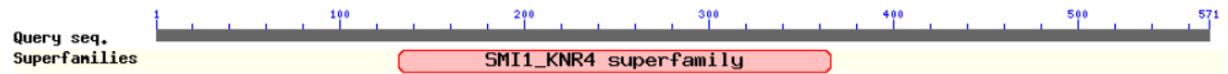


Figure 25 : Schéma des domaines et acides aminés fonctionnels de Knr4

### 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

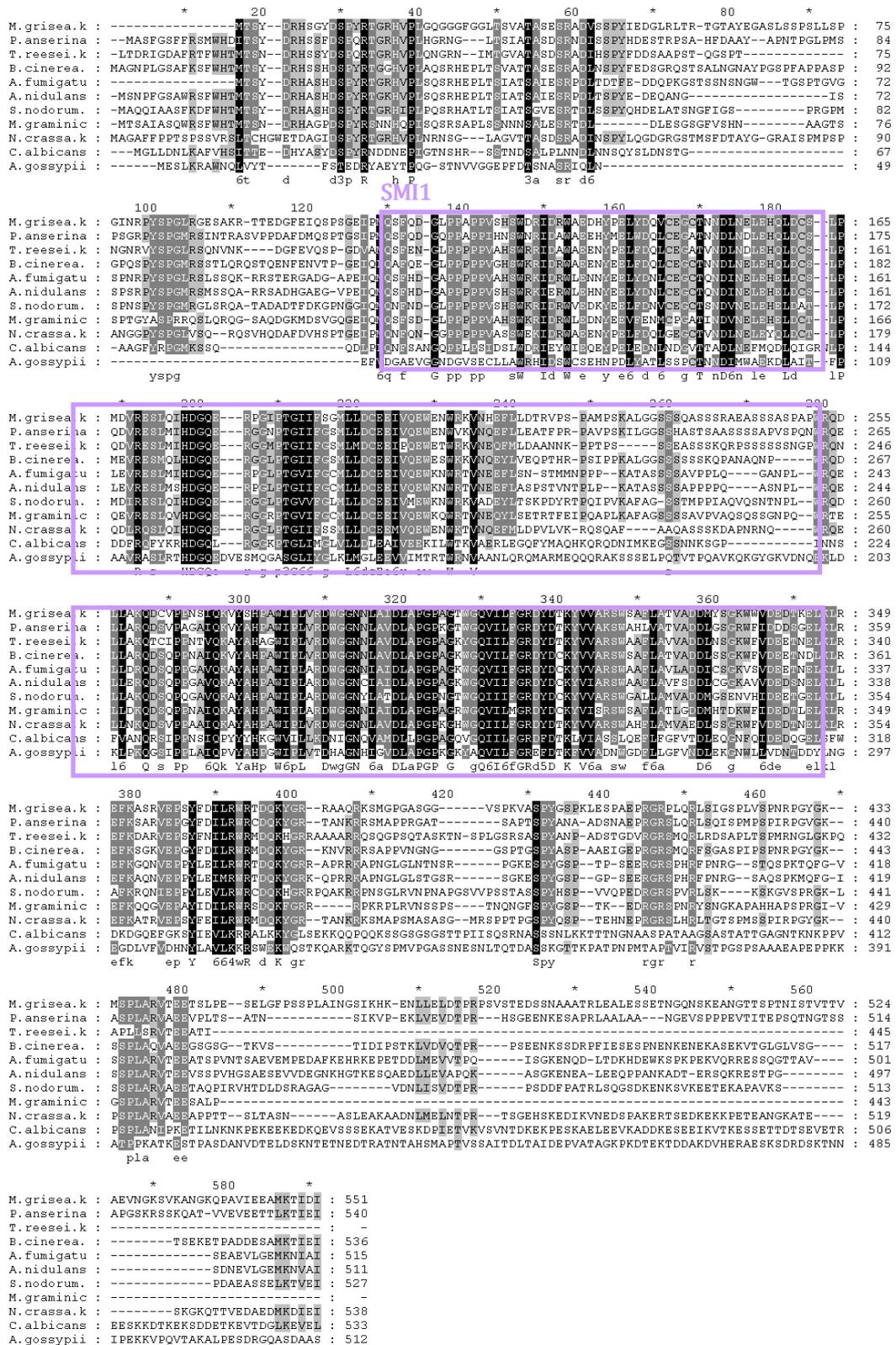


Figure 26: Alignement des séquences des homologues de MgKnr4, chez les espèces fongiques étudiés. Les domaines fonctionnels importants sont entourés



### ➤ 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. cerevisiae* 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

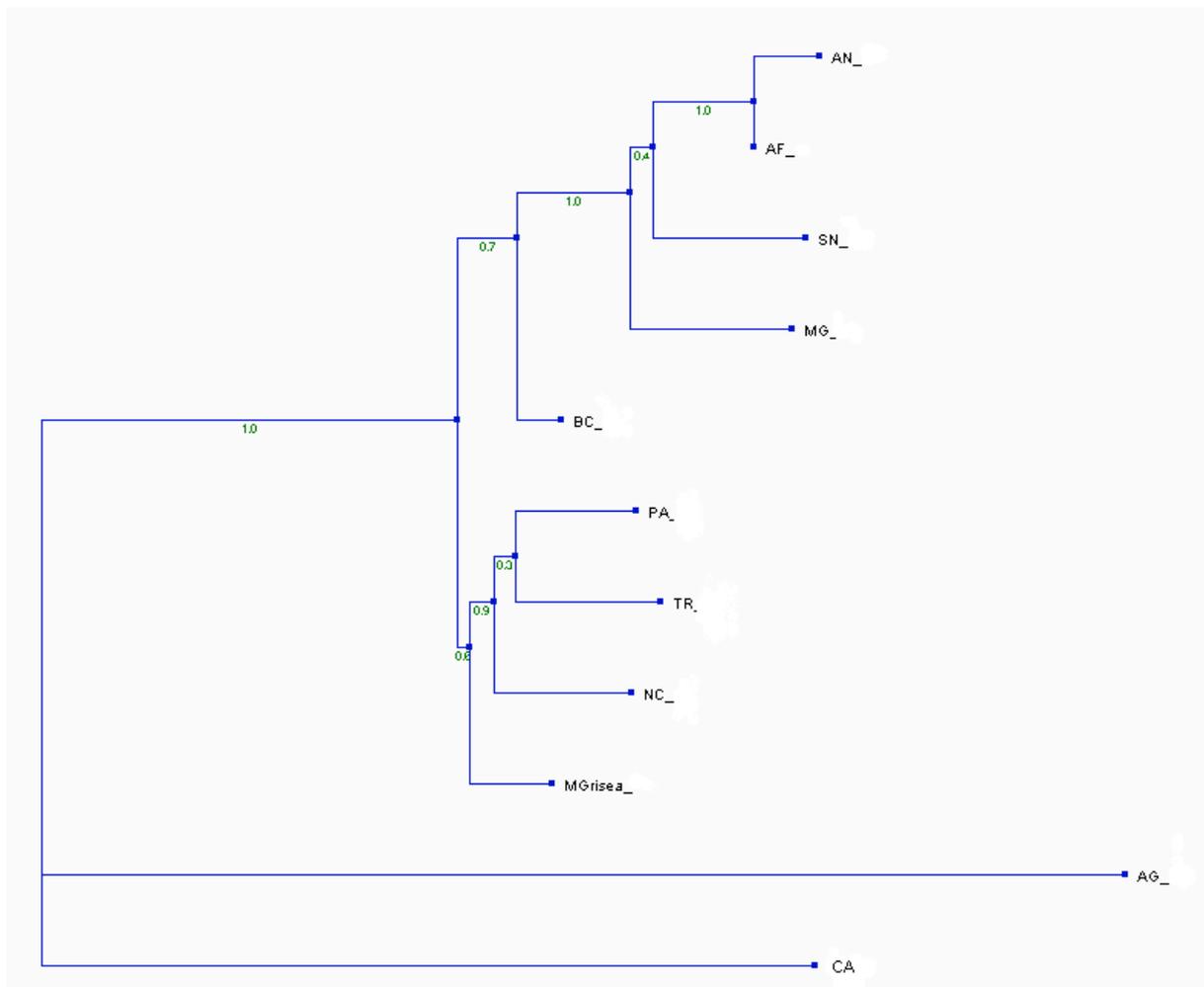


Figure 27 : Arbre phylogénique des orthologues de MgKnr4 réalisé par PhyML.

AF : *Aspergillus fumigatus*, AN : *Aspergillus nidulans*, BC : *Botrytis cinerea*, CA : *Candida albicans*, MG : *Mycosphaerella graminicola*, MGrisea : *Magnaporthe grisea*, TR : *Trichoderma reesei*, SN : *Stagonospora nodorum*, AG : *Ashbya gossypii*, PA : *Podospora anserin*, et NC : *Neurospora crassa*

L'arbre est réalisé par la méthode de bootstrap, ainsi, plus la valeur est élevée plus la fiabilité de la branche est importante.



## 9. IDC1

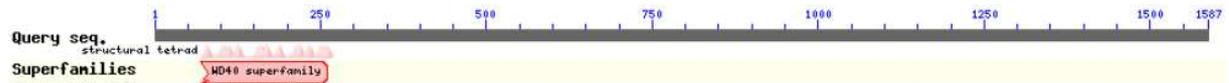


Figure 28 : Schéma des domaines et acides aminés fonctionnels d'Idc1

### 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.











### ➤ 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 mauvaise 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

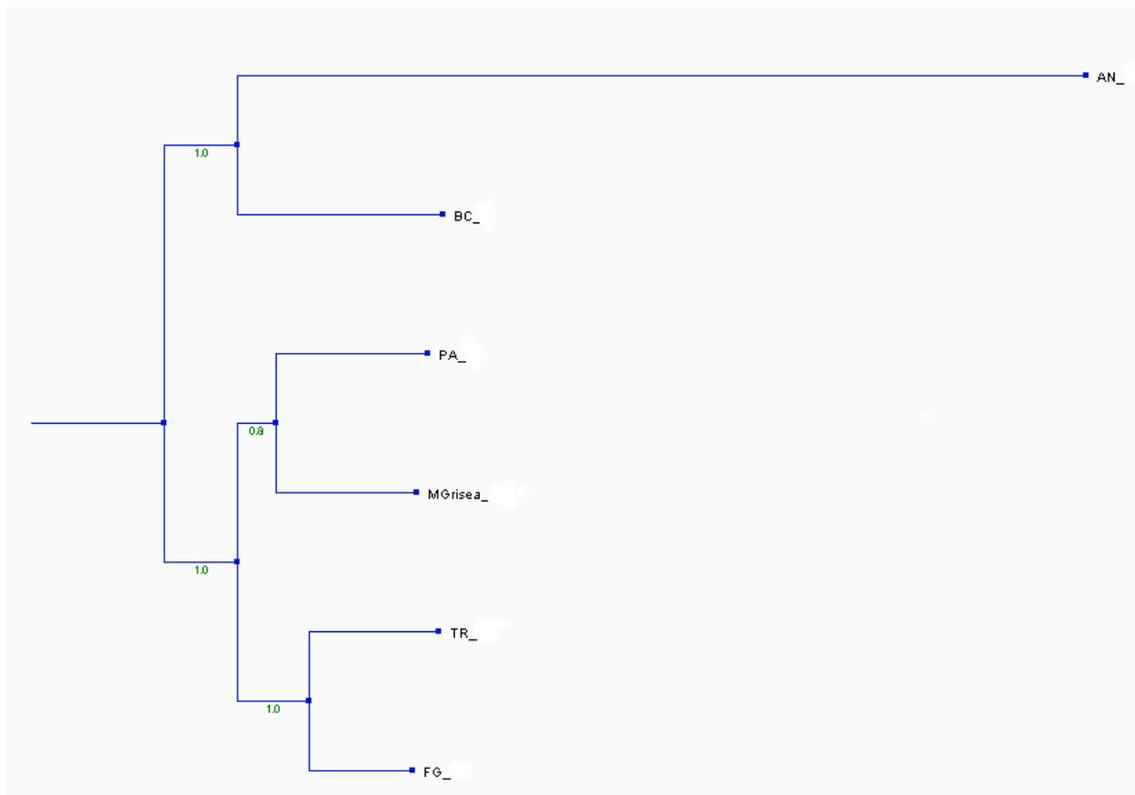


Figure 30 : Arbre phylogénique des orthologues de MgIdc1 réalisé par PhyML.

AN : *Aspergillus nidulans*, BC : *Botrytis cinerea*, MgGrisea : *Magnaporthe grisea*, TR : *Trichoderma reesei*, FG : *Fusarium graminearum* et PA : *Podospira anserin*

L'arbre est réalisé par la méthode de bootstrap, 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*.

<i>M. grisea</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. gossypii</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. immitis</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>M. graminicola</i>	<i>N. crassa</i>	<i>P. anserina</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. nodorum</i>	<i>T. reesei</i>
<b>MPS1</b>	MPKA	AAS52913	EMENI_AN5666	BC1G_07144	CA5865	CIMG_01981	FGSG_10313	ESEXTE_GWP_GW1_C_13063	NCU11376	XP_001912152	SLT2	SNU05764.1	C_360018
<b>SW14</b>	AFU3G13920	AFR600C	EMENI_AN3154	BC1G_13808	CA2853	CIMG_00076	FGSG_10384	GW.1.278.1	NCU07246	PA_2_14120	YDL056W	SNU10392.1	5664
<b>SW16</b>	AFU7G05620	AFR690C	EMENI_AN6715	BOFUT4_P132610.1	CA1605	CIMG_05472	FGSG_04220	ESEXTE_FGENESH2_PG_C_120224	NCU07587	PA_3_250	YLR182W	SNU05807.1	53484
<b>RLM1</b>	Af293		EMENI_AN2984	BOFUT4_P040740.1		CIMG_07638	FGSG_09339	ESEXTE_FGENESH2_PM_C_50239	NCU02558	PA_1_6600	YPL089C		68097
<b>CRZ1</b>	AFU1G06900	ADL198W	EMENI_AN5726	BOFUT4_P049220.1	CA5657	CIMG_04025	FGSG_01341		NCU07952	PA_3_1720	YNL027W	SNU05002.1	36391
<b>AGS1</b>	AFU2G11270		EMENI_AN3307	BOFUT4_P114550.1		CIMG_08204		E_GW.1.1945.1	NCU08132	PA_5_2730			
<b>CAS5</b>	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
<b>IDC1</b>			EMENI_AN2701	BOFUT4_P062870.1		CIMG_09777	FGSG_10835		NCU11226	PA_3_8520		SNU06709.1	67350
<b>KNR4</b>	AFU5G05770	ADL139W	EMENI_AN8946	BOFUT4_P033920.1	CA1740	CIMG_06246	FGSG_06998	ESEXTE_GENEWISE_C_61150	NCU04189	PA_2_10930	YGR229C	SNU09238.1	27719

Figure 31 : Tableau récapitulatif des gènes identifiés chez différents champignons étudiés

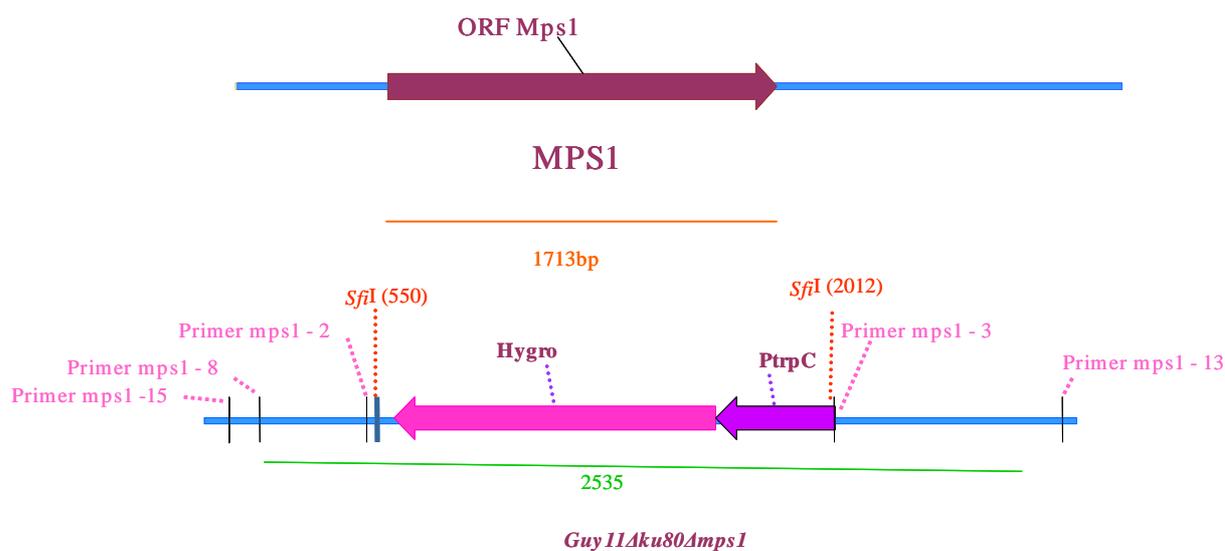


### ANNEXE 3

#### Schéma des constructions des mutants

#### 1. Schéma des constructions du mutant de délétion *Guy11Δku80Δmps1* et *P1.2Δku80Δmps1*

##### 1.1. Schéma de la construction du mutant de délétion *Guy11Δku80Δmps1* et *P1.2Δku80Δmps1*

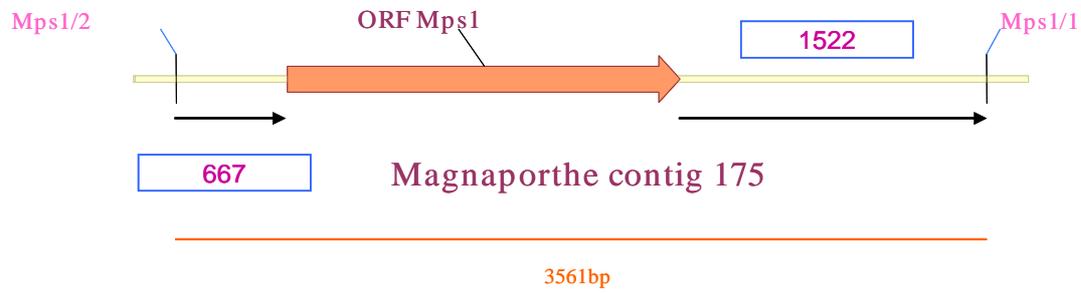


Primer mps1 - 2	CACGGCCTGAGTGGCCGATTGCTGTGGTTGCCTCGTTTATT
Primer mps1 - 3	GTGGGCCATCTAGGCCTTTGGAGAGGGCATGAGATACTGCT
Primer mps1 - 8	ACCTATCCAGGTCCATTTCTATCCC
Primer mps1 - 13	TCGTTTCTGTTTGCGGAGTCC
Primer mps1 - 15	AGTTAGTGCTAGTTCTCTCTTATGGTGTGG



## 1.2. Schéma de la construction des mutants de complémentation

*Guy11Δku80Δmps1* et *P1.2Δku80Δmps1*

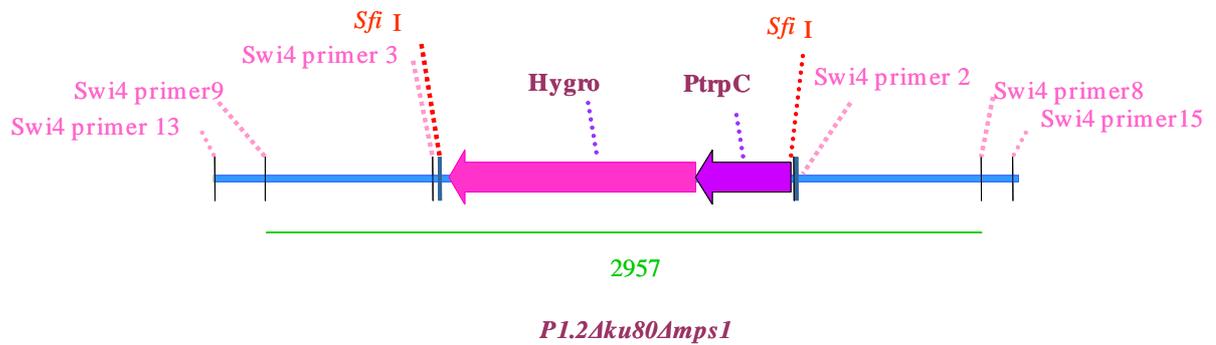


Mps1/1	TCACCAAGGAACTCGGTCAGGG
Mps1/2	ACCAGCGTTCTCCTCAGGGTCC



## 2. Schéma des constructions du mutant *P1.2Δku80Δswi4*

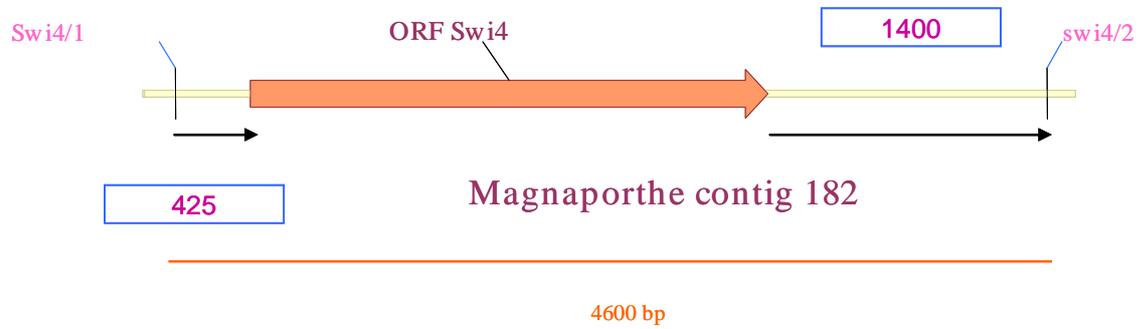
### 2.1. Schéma de la construction du mutant de délétion *P1.2Δku80Δswi4*



<b>Swi4 primer 2</b>	GTGGGCCATCTAGGCCCCGCACGCCTCCGCTACA
<b>Swi4 primer 3</b>	CACGGCCTGAGTGGCCCGATGATGTCTGGTTTCGCACG
<b>Swi4 primer 8</b>	GCCCTCCTGACTGACTTGCGA
<b>Swi4 primer 9</b>	GGTTGGCGTTTGGGATGCG
<b>Swi4 primer 13</b>	CGACTTAGGCTCGTGTTCGTAGACG
<b>Swi4 primer 15</b>	GATGAGGATGGCTGAAACGAGGA



2.2. Schéma de la construction du mutant de complémentation du *P1.2Δku80Δswi4*

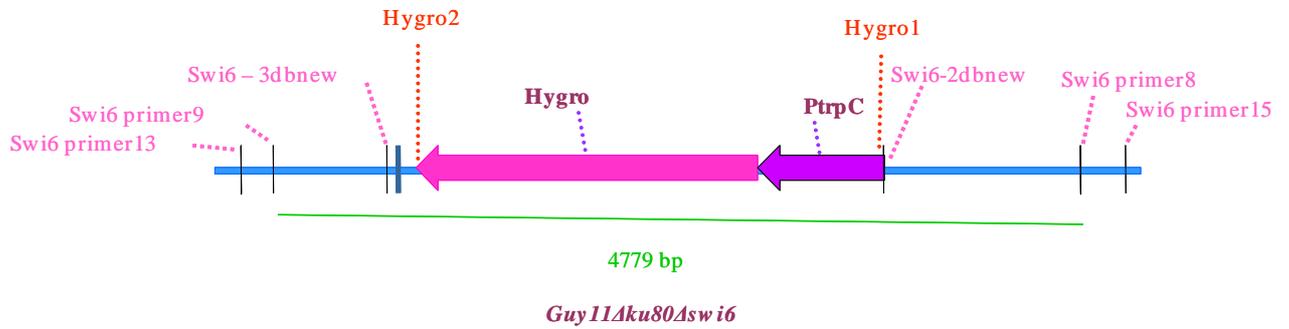


<b>Swi4/1</b>	ATCGTATTAAGTAGCAGGAAAGGGAGAAA
<b>swi4/2</b>	CGGGCAGTGTCCACCTCGTT



### 3. Schéma de construction du mutant *Guy11Δku80Δswi6*

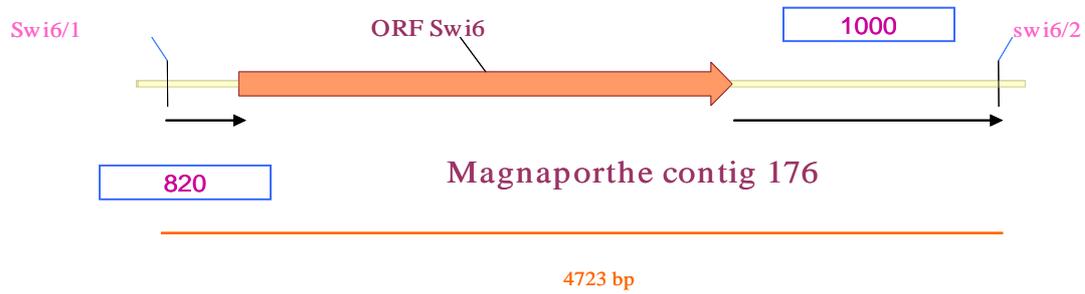
#### 3.1. Schéma de la construction du mutant de délétion *Guy11Δku80Δswi6*



<b>Swi 6 - 8</b>	TCCGAACAGCAACCAAGAGGTCA
<b>Swi 6 - 9</b>	AGGTTCTCCTTCCCACGGTTACAAA
<b>Swi 6 - 13</b>	CGATAAAGGGCAAGCTGGTCCA
<b>Swi 6 - 15</b>	CGAAGCAGCGTACCACACCAGTC
<b>Swi6-2dbNEW</b>	ATTCGAGGGCCTGAGTGGCCCCTGAGTGGCCCGATGGGTT
<b>Swi6-3dbNEW</b>	TAGAGTAGATGCCGACCGGAACCCATCTAGGCCACACCACATTGAC



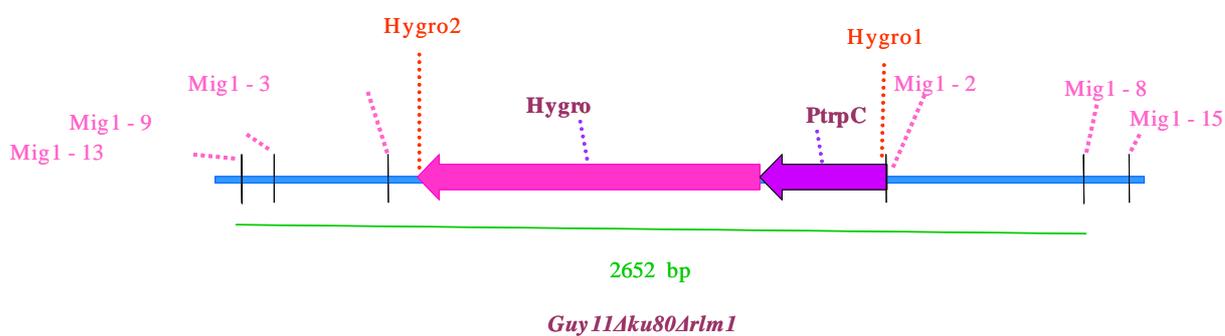
3.2. Schéma de la construction du mutant de complémentation du  
*Guy11Δku80Δswi6*



SWI6/1	AGGTTCTCCTTCCCACGGTTACAAA
SWI6/2	CGAAGCAGCGTACCACACCAGTC



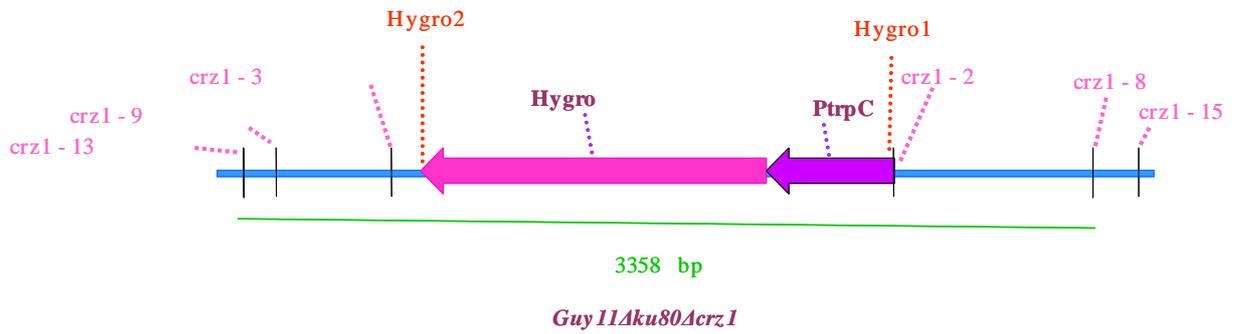
#### 4. Schéma de construction du mutant de délétion *Guy11Δku80Δrlm1*



<b>Mig1-2</b>	TAGAGTAGATGCCGACCGGAACTGCCTGTCTAGGCTGGTGAGCTG
<b>Mig1-3</b>	ATTCGAGGGCCTGAGTGGCCACCGTCTTTCCTCCGTCTTGTCTTT
<b>Mig1-8</b>	CTCCTGCATGCTACTGGTCA
<b>Mig1-9</b>	ATGCAGGGCATGGAGAAAGA
<b>Mig1-13</b>	GTGGCGAGGGTGAATTAGTGTCG
<b>Mig1-15</b>	CCCACTCGTATGCTCCCACGTC



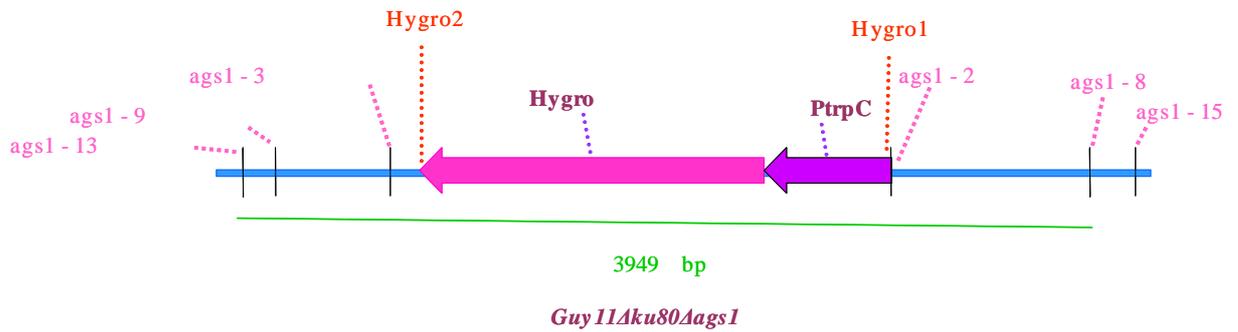
## 5. Schéma de construction du mutant de délétion *Guy11Δku80Δcrz1*



Crz1 primer 2	GTGGGCATCTAGGCCCGAGATGCCTGAGTTGCCAG
Crz1 primer 3	CACGGCCTGAGTGGCCGCGAAAGCTATGCGGTGGCA
Crz1 primer 8	TTGACCACCAACCAGCTCCAGAC
Crz1 primer 9	GTATCCAAGCAAATCACTGGCAACTG
Crz1 primer13	CGCCGCCGTTGTGAATTACCTA
Crz1 primer15	TCAACCAATACCCAAATCTTCCACTTC



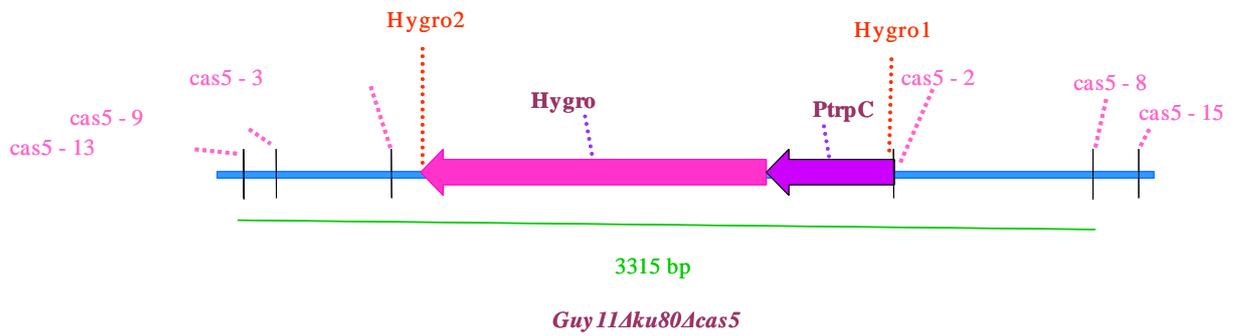
## 6. Schéma de construction du mutant de délétion *Guy11Δku80Δags1*



<b>Ags1 - 2</b>	TCTTTACCACATTATCACTCGTTC
<b>Ags1 - 3</b>	GTGAAGGCGGAACCAAAGACCT
<b>Ags1 - 8</b>	CGTTATCCCACACCCCGTTACTC
<b>Ags1 - 9</b>	CCGAGATATTCGACTTCAACTACAGGAA
<b>Ags1 - 13</b>	AGAAAATAGCAACGCCAACGTC
<b>Ags1 - 15</b>	TGCCCGTCTTGCCACGTCTC



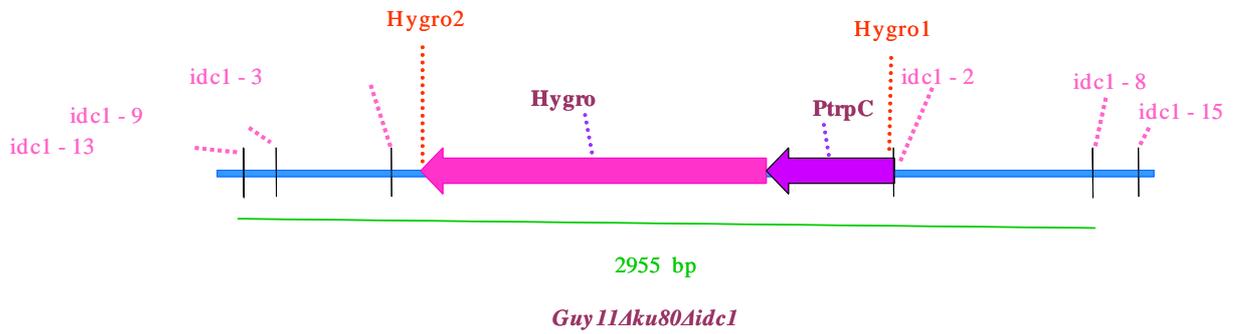
7. Schéma de construction du mutant de délétion *Guy11Δku80Δada2*



<b>Cas-2</b>	ATTTCGAGGGCCTGAGTGGCCCGGTCTGTCGCGGTACGA
<b>Cas5-3</b>	TAGAGTAGATGCCGACCGGAACAAGGCACCGCCTTCCATCG
<b>cas-8</b>	CACGGCCTGAGTGGCCGCGAGCCACCCAGTCAAG
<b>Cas-9</b>	AGGGCGAGAACCTGTACTACACGAG
<b>Cas-13</b>	CGGACCTCAAGACGCCCTTTC
<b>Cas-15</b>	TGTCTTCTCGTATTTTCGGGTTGCTG



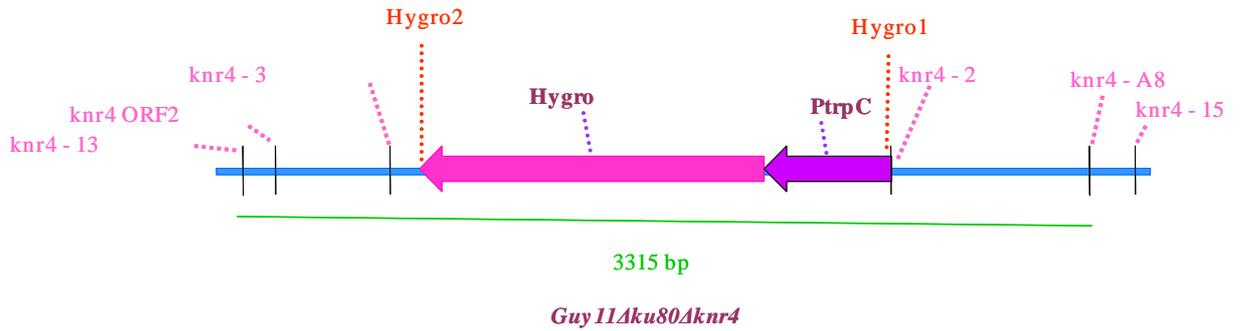
## 8. Schéma de construction du mutant de délétion *Guy11Δku80Δidc1*



<b>IDC12</b>	ATTTCGAGGGCCTGAGTGGCCGTACTACCACATCTAATTCTGTGCGAGGGCAGCATCATAT
<b>IDC13</b>	TAGAGTAGATGCCGACCGGGAACAGGCTTCCGTGCTTGCCGT
<b>IDC1 primer 8</b>	ACTGTCAAATGTCGCAGAACTGGG
<b>IDC1 primer 9</b>	ACCTGTATGTGCTGTGTGCCGC
<b>IDC1 primer 13</b>	CCCGCATGACTAGCCTTGTTCAG
<b>IDC1 primer 15</b>	GCCCAACCCGACAGCATAGGA



9. Schéma de construction du mutant de délétion *Guy11Δku80Δknr4*



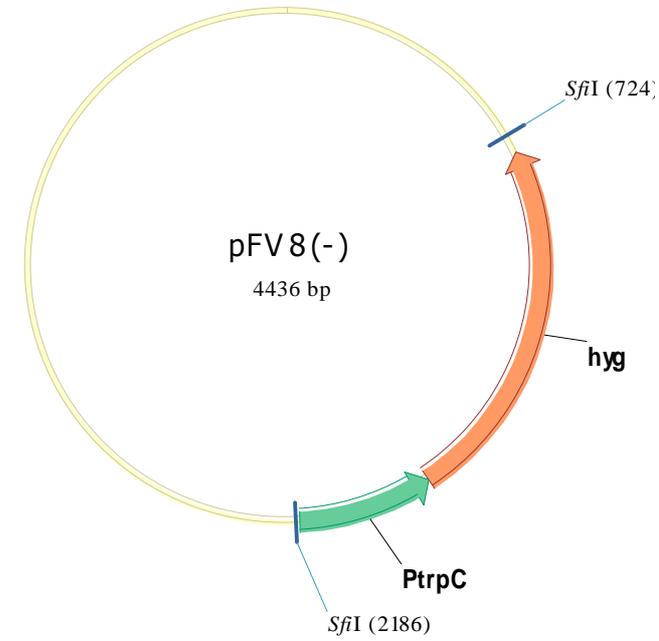
<b>Knr4 - 2</b>	CAATTAACCACCAACTTGTACTGTCTGGGTTCCCGGTCGGCATCTACTCTA
<b>Knr4 - 3</b>	GCTCTAGATATCGATCGTCTTCGGCCACTCAGGCCCTCGAAT
<b><i>knr4-A8</i></b>	GCAGGCTGTGTTTTAGCACTGCT
<b><i>knr4-ORF2</i></b>	GTCAATTAACTGGCACACCTACCCAAG
<b>Knr4 - 13</b>	GACGGCACTCATCCCAAACG
<b>Knr4 - 15</b>	GCTTGTGGAGGTGACCTTATTGGTGT



## ANNEXE 4

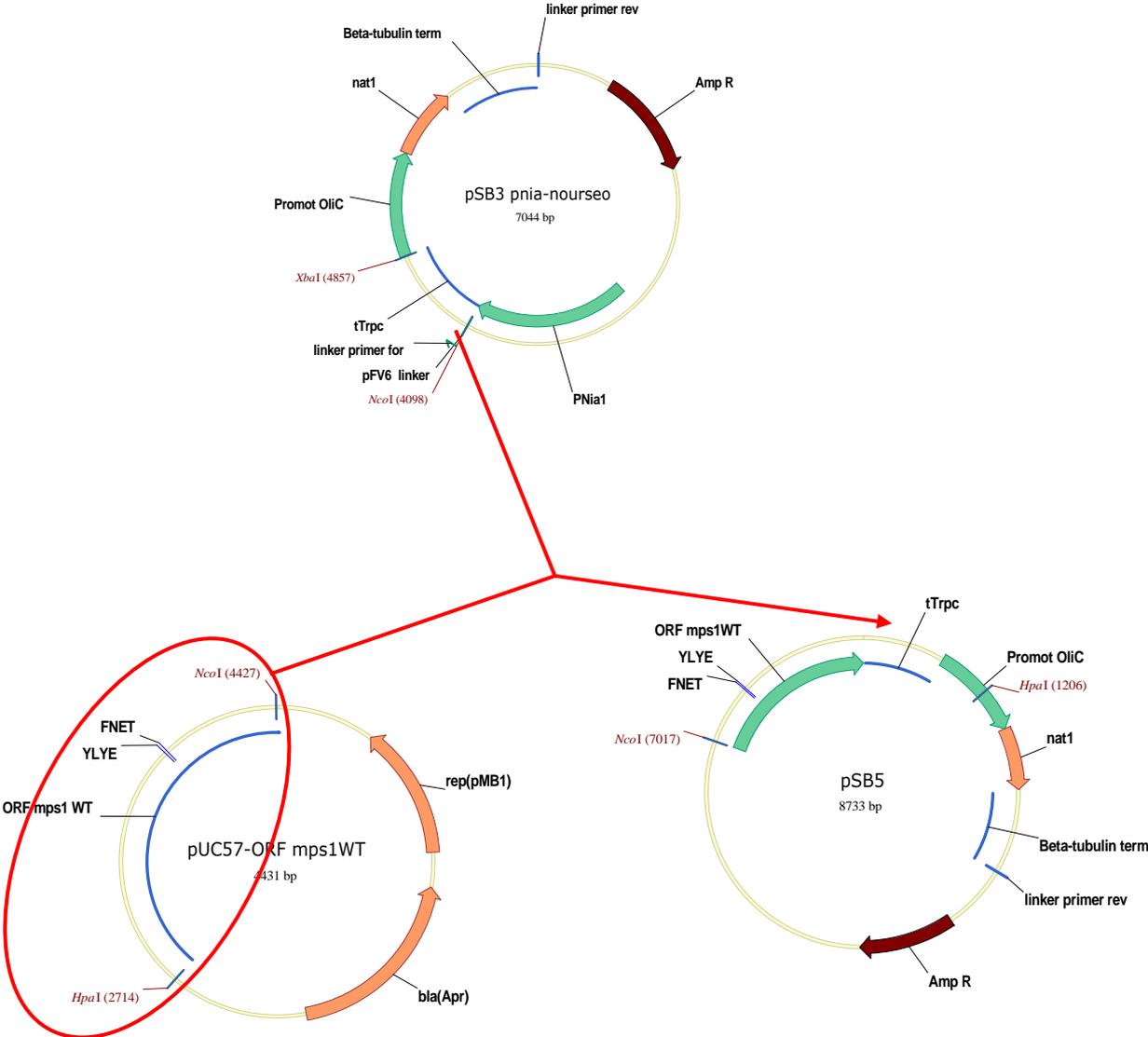
### Schéma des vecteurs utilisés

#### 1. Schéma du plasmide pFV8 (-)



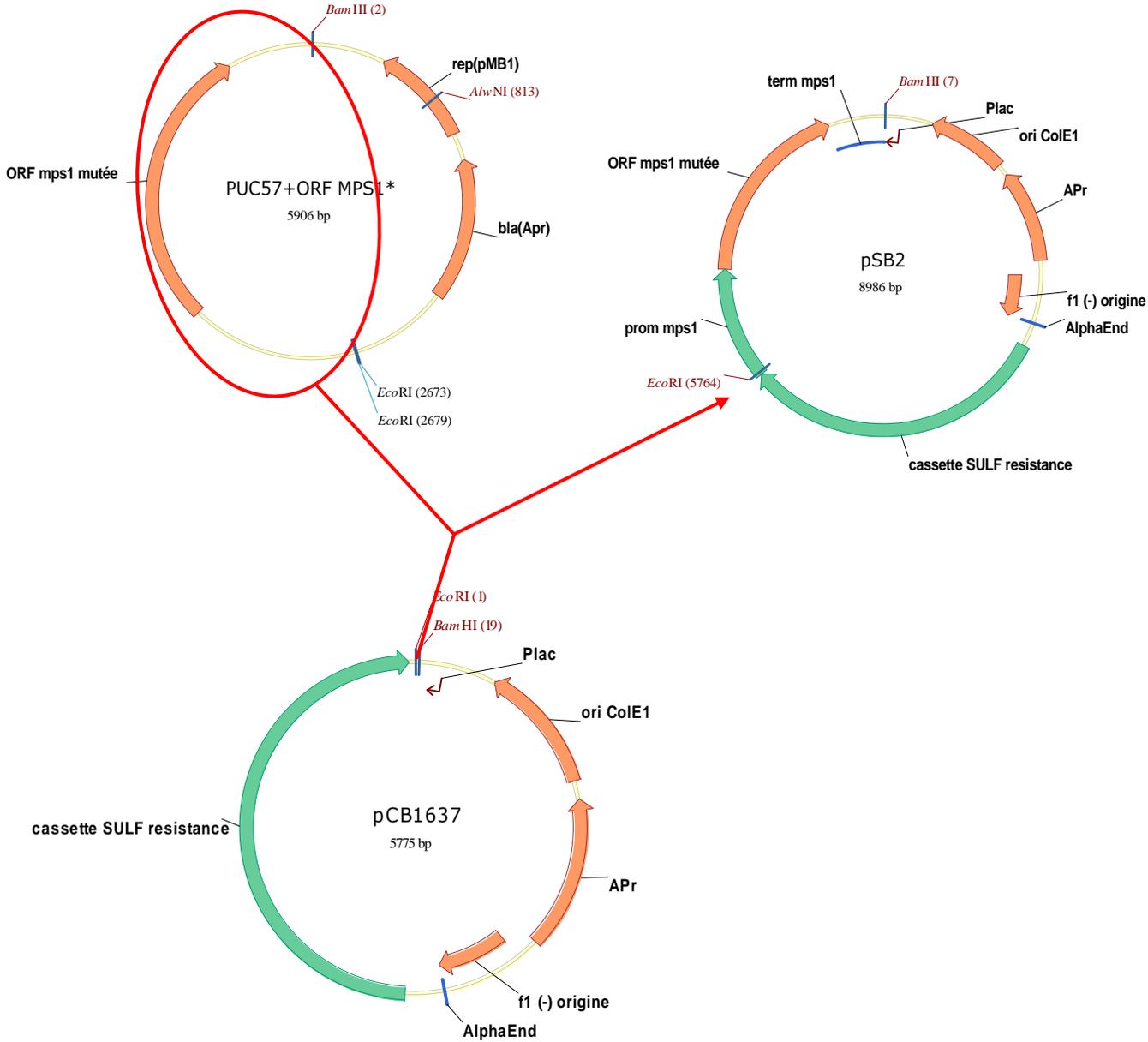


2. Construction du mutant conditionnel de *Guy11ΔKU80ΔpNiaMps1*





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, Saezler 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. *Yeast Special Issue: Special Issue of Yeast on Fungal Cell Walls* Volume 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, 2433-2444.
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  $\beta$ -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 substrate-specificity determination for MAP kinases *Trends in Biochemical Sciences* Volume 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 membrane-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 *Aspergillus niger*, is induced in response to cell wall stress. Fungal Genetic of Biology 42, 165 – 177.
15. **Ashton Breitskreutz and Mike Tyers** (2002) MAPK signaling specificity: it takes two to tango. Trends in Cell Biology Volume 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 Slr2 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 environmental 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, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev*; 62: 130-180.
32. **Chamilo 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. **Carlwrith** (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 Garrett – 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 Interact*3: 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., Houle, 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 gene cluster involved in secondary metabolism. *New Phytologist*Volume 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, Maribu 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 cerevisiae* *FKS1 (ETG1)* gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of  $\beta$ -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, indispensable 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 plant pathogenic 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 and 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) Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalinization, changes in protein phosphorylation, and establishment of 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., McClelland 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. Natl. Acad. 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 Development*, 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 Biol.* Apr;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 Vedyappan, 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. *Science*15: 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 of salt tolerance by *Torulopsis 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 Ca<sup>2+</sup> but not Cl<sup>-</sup> 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. *MolCell 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 Microbiol*50: 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, Melillo RM, Carlomagno SM, Santoro M, Chiariello 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<sup>4</sup> 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 encoding calcineurin-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. Stagner et John E. Hamer** (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* 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 Lett* 154: 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 et Kazuo 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 H<sub>p</sub>/Ca<sub>2</sub>p exchange and induces Ca<sub>2</sub>p ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell Biol.* 16 2226–2237.

**129. K., M. Saitoh** (2002) Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by the stress-induced 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 Smirnov, 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 Gene36: 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., Noguch, E., Hayashi,N., and Nishimoto,T.** (1998) Nuclear protein import, but not mRNA export, is defective in all *S.cerevisiae* 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, Yekutieli 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, Yekutieli 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, François 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* YCRO17c/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 chitinase and b-1,3-glucanase in bean leaves. *Plant Cell* 1:447–457.
- 175. Mauch, F., Mauch-Mani, B., and Boller, T.** (1988) Antifungal hydrolases in pea tissue. *Plant Physiol* 88: 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  $\beta$ 1,3-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 oryzae*. *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 Genet Biol* 20: 217-227.
- 182. Muhammad Badaruddin, Lucy J. Holcombe, 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 Ca<sup>2+</sup> 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 calcium-calcineurin 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. Pollock, 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* required for normal saprotrophic growth, conidiation, plant surface sensing and host tissue colonization. Molecular plant pathology (2), 173–184.

**192. Osumi M.** (1998) The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. Micron 29: 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 Ca<sup>2+</sup>/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/mitogen-activated 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)- $\beta$ -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. Popolo, 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  $\beta$ 1,3-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  $\alpha$ -(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the  $\beta$ -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 signals in plants: a current assessment. *Annu Rev Plant Physiol Plant 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)*, vol.10, 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 homeostasis 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-dependant 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 Microbiology Volume 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 Microbiol 3: 9-16.
- 248. Talbot NJ** (2003) On the trail of a cereal killer: exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. Annu Rev Microbiol 3: 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 Sciences Volume 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. Genetics 127: 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 the ability of partially *N*-acetylated chitosans and chitoooligosaccharides to 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 nidulans* *In Silico Biology* 4, 0050 (2004); *Bioinformatics 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 factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slk2) 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 Plant 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 Chem 280: 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 Physiol 125: 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.Biol.Chem. 271, 29876-29881.
- 280. Zarzov, P, Mazzoni, C., and Mann, C.** (1996) The SLT2 (MPK1) MAP kinase is activated during periods of polarized cell growth in yeast. EMBO J. 15 :83-91.
- 281. Zeigler RS** (1998) Recombination in *Magnaporthe grisea*. Annu Rev Phytopathol 36: 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 Number 11.
- 284. Zlotnik H, Fernandez MP, Bowers B, Cabib E.** (1984) *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. J Bacteriol 159: 1018-1026.