



**HAL**  
open science

# Décryptage des cascades de signalisation liées au stress par phosphoprotéomique et génétique fonctionnelle chez *Botrytis cinerea*

Jaafar Kilani

► **To cite this version:**

Jaafar Kilani. Décryptage des cascades de signalisation liées au stress par phosphoprotéomique et génétique fonctionnelle chez *Botrytis cinerea*. Biologie moléculaire. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS050 . tel-01865827

**HAL Id: tel-01865827**

**<https://theses.hal.science/tel-01865827v1>**

Submitted on 2 Sep 2018

**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.

NNT : 2018SACLS050

THESE DE DOCTORAT  
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY,  
préparée à l'Université Paris-Sud

ÉCOLE DOCTORALE N° 567  
Sciences du Végétal : du Gène à l'Ecosystème

Spécialité de doctorat : Biologie

Par

**M. Jaafar KILANI**

Décryptage des cascades de signalisation liées au stress par phosphoprotéomique et  
génétique fonctionnelle chez *Botrytis cinerea*

Thèse présentée et soutenue à Thiverval-Grignon, le 12 mars 2018

**Composition du Jury :**

M. Di Pietro Antonio  
Mme Poussereau Nathalie  
M. Bonhomme Ludovic  
Mme Malagnac Fabienne  
Mme Fillinger Sabine

Pr. Université de Cordoue  
MCF Université Lyon 1  
MCF Université Blaise Pascal  
Pr. Université Paris-Sud  
DR INRA (Versailles-Grignon)

Rapporteur  
Rapporteuse  
Examineur  
Présidente  
Directrice de thèse





## Remerciements

« La thèse ce n'est pas une sinécure ! ». A cela je répondrais : c'est pas faux !

Au cours de ces trois ans de thèses (mais quatre ans à BIOGER), il y a eu des hauts et des bas, mais surtout des hauts, qui sont passés à une vitesse folle. Et oui ces années à BIOGER avec les gens rencontrés au fil du temps ont été riche en émotions.

Un Grand merci à Frau Sabine Fillinger, qui m'a fait suffisamment confiance pour me confier son projet de cœur. Sabine, ce projet m'a réellement passionné, comme tu as dû le constater à de nombreuses reprises, où tu devais calmer mon enthousiasme face à mon envie de tester de nouvelles choses malgré le manque de temps. Certes, j'ai des regrets de ne pas avoir pu pousser jusqu'au bout le sujet, mais j'ai pu apprendre de nombreuse chose : qu'un projet pouvait être récalcitrant, qu'il ne faut jamais crier victoire trop vite mais surtout j'ai pu apprendre que rien n'est jamais perdu et qu'il y a toujours moyen de retomber sur ses jambes. Je te remercie également pour ton encadrement et ta présence malgré ta casquette de co-directrice d'unité. Bien que parfois un peu rude à entendre ta franchise a tout de même du bon (promis je ferai tout pour « improve my english »). En gros voilà !

Je remercie également le reste de mon équipe, en particulier mon ancienne voisine de bureau, Jocelyne Bach, et le ptit nouveau (vieux) qui a pris sa place, Guillaume Fouchet, avec qui j'ai pu rire et parler de tout et n'importe quoi et qui parfois ont dû jouer le rôle de bureau des lamentations.

Guillaume et Agathe je vous souhaite du courage pour vos thèses respectives. Et j'espère que vous allez apprécier, comme j'ai apprécié, ce p'tit séjour à BIOGER.

Merci Danièle pour ta bonne humeur, qui fut une source de motivation en arrivant le matin.

Je remercie Thierry Rouxel de m'avoir accueilli au sein de l'unité BIOGER. Grâce à toi je pensais à Star Wars au moins une fois par jour (chercher la référence dans l'épisode IV)..

Je tiens également à remercier les membres de mon jury de thèse. Merci à Fabienne Malagnac et Ludovic Bonhomme d'avoir accepté d'être examinateurs et à Nathalie Poussereau et Antonio Di Pietro d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

J'en profite pour remercier à nouveau Fabienne, ainsi Sylvain Brun, Hervé Lalucque et bien entendu le grand manitou Philippe Silar, qui m'ont fait découvrir et apprécier le monde mystérieux des champignons et sans qui...bah je ne serais tout simplement pas là. On se sent tout de suite grandi lorsque nos enseignants deviennent nos confrères. Fabienne, Sylvain, Hervé, merci pour les bons

moments passé avec vous en Californie. Au plaisir de repartir avec vous à Asilomar. Et bien entendu ce qui se passe à Asilomar reste à Asilomar.

Je remercie la plateforme de protéomique du Moulon (PAPPSO) et tout spécialement Michel Zivy et Marlène Davanture qui m'ont permis de me former à l'analyse protéomique et phosphoprotéomique. Malgré la demi-réussite (je préfère voir le verre à moitié plein) du phosphoprotéome, la gentillesse et la bienveillance de Michel et Marlène m'ont permis de relativiser. Bon par contre je suis désormais connu au Moulon comme le doctorant le plus malchanceux ayant passé leur porte. Ce n'est pas donné à tout le monde d'avoir des expériences de phosphoprotéomique qui ratent à cause d'un campement de gitans. Au moins ça fait des anecdotes à raconter.

En parlant d'anecdotes, un grand merci à Oriane (Brigitte Bardot pour les intimes) pour la vitalité que tu as apporté au labo, les Kouign-amanns, les pauses café, etc et bien entendu aux petites histoires toujours très distrayante. Au final tu seras resté presque autant que moi à BIOGER.

Merci à Claire-Line, Camille (Camille qui ?) et Jeremy pour avoir été de parfaits compagnons de road-trip (n'oublions pas notre superbe diner au Pacos Tacos !!!). Qui sait, on s'en referra peut-être un autre un de ces quatre. Promis vous aurez le droit à mes magnifiques photos de canyons une fois que je les aurais traitées.

Merci également à Julie pour les bons p'tits moments passés ensemble.

Je tiens également à remercier mes amis de la nuit. GwiGwi, c'était un plaisir de papoter de tout avec toi à des heures non réglementaire. Ah Anne-Lise si gentillesse était un nom propre ta photo l'illustrerait ! Bon, maintenant que tu as ton CDI (avant même d'avoir fini ta thèse soulignons-le) tu pourrais au moins faire l'effort de glander un petit peu, non mais oh !

Je remercie aussi les anciens doctorants Antoine et Jean-Felix. Jean-Felix qui a notamment permis au labo de passer au Southern Blot en sonde froide et qui m'a encadré lors de la réalisation du miens.

Un très grand merci à l'équipe MSN-Bot vers qui je pouvais me tourner lorsque j'avais des petits soucis ou des interrogations concernant Botrytis. Merci à toi Muriel pour ta gentillesse et ta bonne humeur, ainsi que de m'avoir fait découvrir les croisements chez *Botrytis cinerea*. Si si j'y crois encore pour mes croisements ! Mais en tout cas grâce à toi j'ai des photos de magnifiques apothécies. Un énorme merci à Adeline qui m'a aidé dans l'analyse de mes résultats de protéomique. Ton aide m'a été très utile, notamment grâce au génialissime Botportal qui m'a permis d'avoir accès à l'annotation fonctionnelle de ce cher *Botrytis* de façon simple et rapide.

Merci aux différentes activités de groupe organisées au sein de l'unité. Un grand merci au meeting G.R.O.S, à son fondateur et aux participants où nous avons pu analyser plus en détail les propriétés organoleptiques de nombreux fromages (il y a toujours une histoire de champignons). Merci

également à l'atelier fimo pour le développement de mes qualités de sculpteurs. J'y repense à chaque fois que je contemple ma magnifique licorne.

Je remercie l'ensemble des jeunes, ceux qui veulent se faire passer pour des jeunes et les moins jeunes, de l'unité. Les Guillaume (le nombre est variable en fonction des années mais ils ont tous été au top !), Alex, les JYohann, Lydie, Delphine, Baptiste, Christophe, Clémentine, Anaïs, Marie-Pierre, ... la liste est trop longue.

Je remercie également toutes les aides techniques de l'unité, Christian, Bruno, Martin, Isabelle qui m'ont parfois sauvé la vie. Je remercie également le service administratif de l'unité.

Merci BIOGER !

En dehors du labo, je remercie bien évidemment mes amis de toujours. Une pensée à Alexandre, Camille, Sandy et Flo que j'ai un peu délaissé, surtout lors de la troisième année, mais qui ne m'en tiendront pas rigueur j'en suis sûr. Promis, « I'll be back ! ».

Un ENORME merci à toi ma Julia qui sait ce qu'est une thèse et qui j'en suis sûr aura moins de mal que moi lors de l'étape du manuscrit (oui oui ce n'est pas compliqué je sais). Merci d'avoir toujours été présente et de m'avoir si souvent proposé ton aide et boosté. J'espère pouvoir être là à mon tour quand tu auras besoin d'aides. Merci aussi de m'avoir fait découvrir les champignons, comestible cette fois ci (autres que les champignons de Paris).

Je tiens enfin à remercier ma famille pour son soutien. Mon père et ma mère qui m'ont toujours poussé à aller aussi loin que je pouvais. Je les remercie d'avoir fait semblant de comprendre mon sujet de thèse quand je leur ai raconté que j'allais travailler trois ans sur ce sujet très fondamental. Je tiens également à remercier ma sœur et mon frère pour le sas de décompressions qu'ils m'ont offert. Merci Sabine pour les week-ends shopping et merci à toi Naïm pour les moments où tu me demandais des conseils artistiques pour tes œuvres.



# Table des matières

<b>Chapitre I : Introduction Générale.....</b>	<b>13</b>
<b>1. <i>Botrytis cinerea</i> .....</b>	<b>15</b>
1.1. Cycle de vie.....	15
1.2. Impact agronomique .....	16
<b>2. Les différentes stratégies de lutttes contre <i>B. cinerea</i>.....</b>	<b>16</b>
2.1. Lutte « biologique ».....	17
2.1.1. Contrôle de <i>B. cinerea</i> à partir de microorganismes .....	17
2.1.2. Contrôle de <i>B. cinerea</i> à partir de substances organiques et minérales.....	18
2.1.3. Contrôle de <i>B. cinerea</i> à partir d'extraits de plantes .....	18
2.2. Mesures prophylactiques .....	18
2.3. Lutte chimique .....	18
2.3.1. Synthèse des acides aminés.....	20
2.3.2. Respiration.....	20
2.3.3. Biosynthèse des stérols .....	21
2.3.4. Cytosquelette .....	22
2.3.5. Action multi site.....	23
2.3.6. Osmo-régulation.....	23
Phenylpyrroles : 30 years, two molecules and (nearly) no resistance .....	25
2.3.7. Résistance.....	37
<b>3. Perception et adaptation à l'environnement : les voies de signalisation .....</b>	<b>38</b>
3.1. Modifications post-traductionnelles.....	38
3.1.1. Glycosylation.....	38
3.1.2. Méthylation.....	38
3.1.3. Acétylation.....	39
3.1.4. Ubiquitination.....	39
3.1.5. Phosphorylation .....	39
3.2. Messenger secondaire .....	39
3.3. Les voies « Mitogen-Activated Protein Kinase » (MAPK).....	40
3.3.1. Voie BMP1 .....	41
3.3.2. Voie BMP3.....	41
3.3.3. Voie Sak1 .....	42
3.3.4. Contrôle de la voie osmorégulatrice par un système à deux composants .....	44

3.4.	Voie de signalisation <i>via</i> protéines G.....	45
3.4.1.	Protéines G monomériques .....	45
3.4.2.	Complexe G hétérotrimérique et régulation par l'AMPc.....	46
3.5.	Voie Calcique .....	48
<b>4.</b>	<b>Analyse de génomique fonctionnelle par protéomique.....</b>	<b>49</b>
4.1.	L'analyse protéomique : Du 2D au shotgun.....	50
4.2.	Analyse des modifications post traductionnelles.....	53
4.2.1.	Analyse de la phosphorylation par enrichissement IMAC/TiO <sub>2</sub> .....	53
4.3.	Analyse quantitative.....	54
<b>5.</b>	<b>Objectif de thèse .....</b>	<b>56</b>

**Chapitre II : Décryptage de la voie osmorégulatrice chez *B. cinerea* par protéomique comparative .....**

**Introduction..... 59**

**Matériel et Méthodes..... 61**

**Résultats..... 65**

1.	Identification des protéines .....	65
2.	Absence d'effet du fludioxonil sur l'abondance des protéines .....	65
3.	Identification des protéines montrant une différence d'abondance entre mutants et sauvage.....	66
4.	Enrichissement fonctionnel des groupes de protéines sous contrôle de Bos1 et/ou Sak1.....	68
5.	Régulation de clusters du métabolisme secondaire par Bos1 et/ou Sak1.....	70
6.	Contrôle de protéines sécrétées par Bos1 et Sak1 .....	72
7.	Réponses aux stress.....	74
8.	Fonctions diverses régulées par la voie osmorégulatrice .....	78
9.	Interconnexion entre Bos1/Sak1 et les autres voies de signalisation.....	79

**Discussion..... 81**

1.	Contrôle des protéines de résistance aux stress par la voie osmorégulatrice .....	82
2.	Décryptage du pouvoir pathogène par protéomique chez les mutants de la voie osmorégulatrice.....	83
3.	Interconnexion directe/indirecte entre la voie osmorégulatrice et d'autres voies de signalisation .....	85

<b>Chapitre III : Analyse de la réponse au fludioxonil chez <i>B. cinerea</i> par phosphoprotéomique</b> .....	<b>89</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>91</b>
Projet pilote de phosphoprotéomique comparative en réponse au fludioxonil .....	91
<b>Matériel et Méthodes</b> .....	<b>94</b>
<b>Résultats</b> .....	<b>98</b>
1. Mise au point des conditions de culture .....	98
1.1. Courbe de croissance.....	98
1.2. Contrôle de l'induction de la phosphorylation de la MAPK Sak1.....	99
2. Principales étapes expérimentales.....	99
2.1. Digestion trypsique.....	100
2.2. Décomplexification des échantillons .....	100
2.3. Marquage isotopique et enrichissement en phosphopeptides .....	101
3. Impact du fludioxonil sur l'état de phosphorylation de nombreuses protéines.....	102
4. Comparaison des résultats obtenus entre la 1 <sup>ère</sup> et la 2 <sup>ème</sup> analyse phosphoprotéomique	104
<b>Discussion</b> .....	<b>108</b>
1. Le phosphoprotéome, un outil puissant mais une mise au point indispensable dépendante de l'organisme analysé.....	108
2. Actions putatives du fludioxonil.....	109
<b>Chapitre IV : Analyse fonctionnelle de la phosducin-like PhnA chez <i>B. cinerea</i> et identification d'une connexion entre la voie osmorégulatrice et la voie AMPc</b> .....	<b>111</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>113</b>
<b>Matériel et Méthodes</b> .....	<b>117</b>
<b>Résultats</b> .....	<b>123</b>
1. Analyse <i>in silico</i> de la séquence de PhnA.....	123
2. Etude fonctionnelle de <i>phnA</i> .....	123
3. <i>phnA</i> n'est pas impliqué dans l'adaptation au fludioxonil .....	125
4. Effet du fludioxonil sur la concentration intracellulaire d'AMPc .....	126
5. Rôle de <i>phnA</i> sur la croissance mycélienne et le développement de <i>B. cinerea</i> .....	127
6. Agressivité des mutants <i>phnA</i> .....	129
7. Capacité d'acidification du milieu chez les mutants <i>phnA</i> .....	130
8. Analyse de la formation de structures infectieuse sur lame de verre chez les mutants $\Delta$ <i>phnA</i> .....	131
9. Lien entre PhnA et la voie osmorégulatrice .....	132

9.1. Rôle de PhnA dans l'adaptation à différents stress.....	132
9.2. Morphologie des filaments sous stress pariétal.....	134
9.3. Analyse de la phosphorylation de la MAPK Sak1 chez les mutants <i>phnA</i> .....	135
<b>Discussion.....</b>	<b>137</b>
1. Contrôle du messager secondaire AMPc par le fludioxonil et la voie osmorégulatrice ...	137
2. PhnA intervient dans le pouvoir pathogène chez <i>B. cinerea</i> .....	138
3. Interconnexion avec d'autres MAPKs .....	139
4. L'état de phosphorylation de la sérine 66 n'est pas impliqué dans l'activité de PhnA.....	139
<b>Chapitre IV - Annexes .....</b>	<b>141</b>
<b>Réponse à la lumière : analyse du rôle de LTF1 dans la voie osmorégulatrice .....</b>	<b>141</b>
<b>Chapitre V : Discussion Générale.....</b>	<b>145</b>
<b>Références .....</b>	<b>153</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>167</b>

## **Liste des abréviations**

ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ATP	Adénosine triphosphate
CND	CalciNeurin Dependant
DAG	Diacylglycérol
GAP	GTPase-activating protein
GTP	Guanosine triphosphate
HK	Histidine Kinase
HOG	High osmolarity glycerol
HPLC	High performance liquid chromatographie
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphate
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
PAK	p21-activated kinase
PC	Peak counting
PCR	Polymerase chain reaction
PhLP	Phosducin-Like protein
PKA	Protein kinase A
PKAR	cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit
PKC	Protein kinase C
PLC	Phospholipase C
PTM	Post translational modification
Sak1	Stress-activated kinase 1
SC	Spectral counting
SCX	Strong Cation eXchange chromatography
XIC	eXtracted Ion Chromatogram



# Chapitre I : Introduction Générale

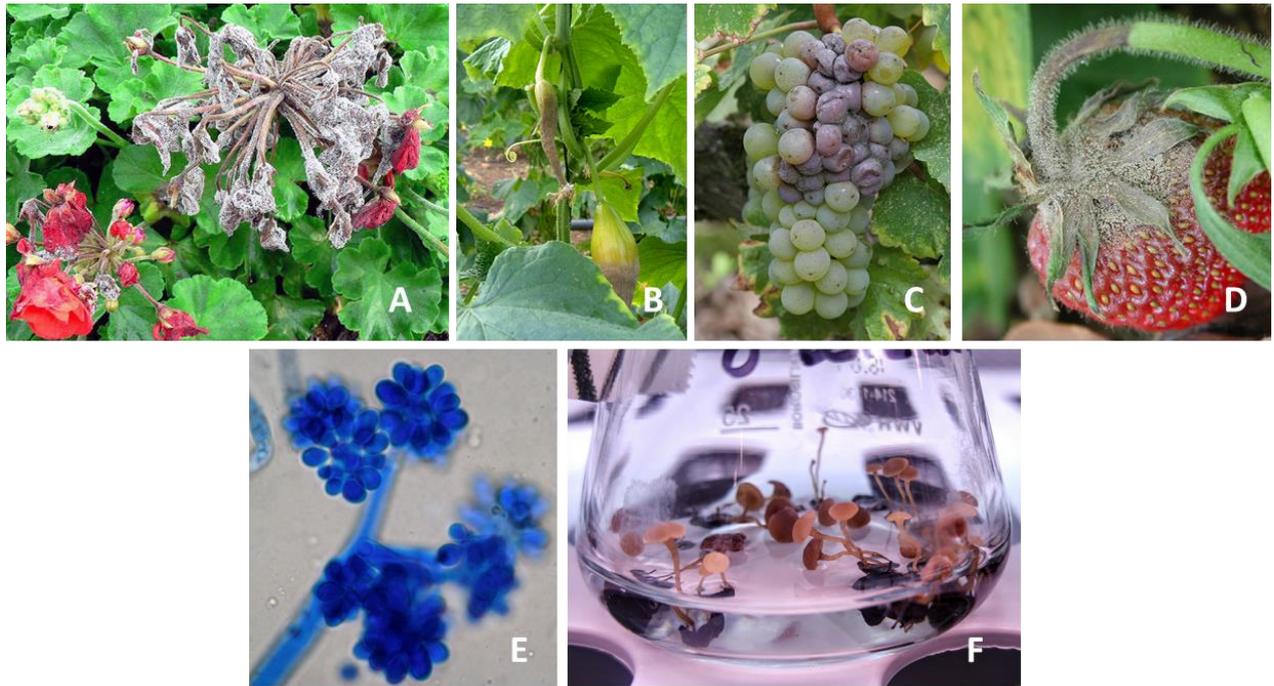


Figure I - 1 : Symptômes d'infection par *B. cinerea* et structure asexuée et sexuée du champignon. **A**/Infection sur geranium (<https://atrium.lib.uoguelph.ca/xmlui/handle/10214/6025>); **B**/Infection sur Concombre (<https://www.apsnet.org/publications/imageresources/Pages/IW000077.aspx>); **C**/Infection sur Raisin (<http://ephytia.inra.fr/fr/C/6979/Vigne-Principaux-symptomes#>); **D**/Infection sur Fraise ([http://www.omafra.gov.on.ca/IPM/images/strawberries/diseases/botrytis/strawberry\\_botrytis7\\_01\\_zoom.jpg](http://www.omafra.gov.on.ca/IPM/images/strawberries/diseases/botrytis/strawberry_botrytis7_01_zoom.jpg)); **E**/ Macroconidiophore (<http://ephytia.inra.fr/fr/C/6988/Vigne-Description-du-champignon#>); **F**/ Apothécies obtenues en laboratoire (MSN-Bot ; Bioger).

## 1. *Botrytis cinerea*

*Botrytis cinerea* (téléomorphe *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel) est un champignon ascomycète filamenteux. Il fait partie de la classe des Leotiomycètes, de l'ordre des Héliotales et de la famille des Sclerotiniaceae. Responsable de la pourriture grise, ce champignon pathogène, nécrotrophe des plantes, infecte ses hôtes en provoquant la mort des cellules.

### 1.1. Cycle de vie

*Botrytis cinerea* possède un cycle de vie durant lequel des macroconidies (spores asexuées) germent à la surface d'une plante hôte, pénètrent dans les tissus et forment des hyphes. Le mycélium se développe et forme à son tour des macroconidiophores portant des macroconidies (**Figure I - 1**). Ces macroconidies peuvent ensuite être dispersées par le vent ou la pluie et ainsi infecter de nouveaux organes de l'hôte ou de nouvelles plantes. Sous certaines conditions climatiques (froid et obscurité), le mycélium forme des structures de résistance, compactes et mélanisées, appelées sclérotés qui vont permettre au champignon d'hiberner. Lors de conditions climatiques plus favorables, les sclérotés vont pouvoir former à nouveau du mycélium. Les sclérotés, également impliqués dans la reproduction sexuée, produisent des gamètes femelles appelés ascogones. Les gamètes mâles ou microconidies sont, quant à eux, produits par le mycélium. Il peut y avoir fécondation lorsqu'une microconidie d'un type sexuel (MAT1-1 ou MAT1-2) s'associe à un ascogone du type sexuel opposé (réciproquement MAT1-2 ou MAT1-1) (Faretra et al., 1988). Après caryogamie suivie d'une méiose et d'une mitose, un asque avec quatre paires d'ascospores est produit. Ces asques sont rassemblés dans des structures de fructification appelée apothécies. Après dispersion, ces ascospores vont pouvoir germer et former du mycélium susceptible d'infecter un nouvel hôte (**Figure I - 2**). Dans la nature le cycle sexué est rarement observé. Cependant, les études de génétique des populations ont révélées une telle variété de génotypes au sein d'une population que seule la recombinaison sexuelle peut expliquer (Walker et al., 2015). De plus, en laboratoire le cycle sexué de *B. cinerea* est maîtrisé (Faretra and Antonacci, 1987).

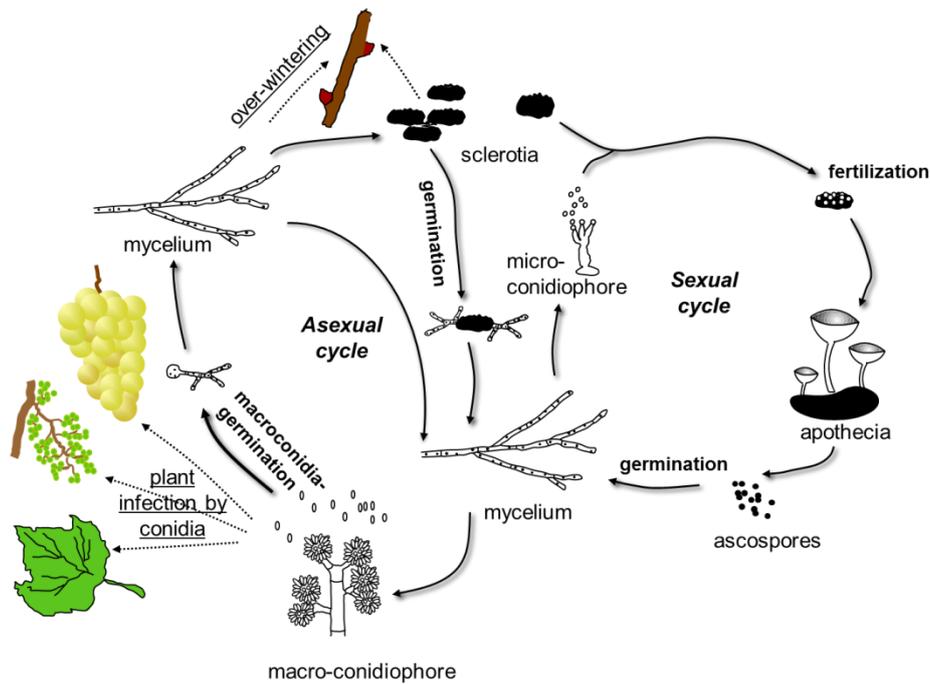


Figure I - 2 : Cycle de vie de *B. cinerea* (Fillinger et al., 2007).

## 1.2. Impact agronomique

Contrairement aux autres espèces du genre *Botrytis*, le spectre d'hôte de *B. cinerea* est très large. Il a été recensé que *B. cinerea* a la capacité d'infecter 586 genres de plantes (Elad et al., 2016). Certains de ses hôtes ont un fort intérêt agricole et/ou économique (e.g. vigne, raisin de table, fraises, tomates, kiwi, choux laitues, haricots, roses, orchidées...). *B. cinerea* est capable d'infecter différents organes de plantes tels les feuilles, les fleurs et les fruits et peut provoquer d'importants dégâts pré- et post-récolte. Dans un contexte de commerce international, l'infection par *B. cinerea* pose un réel problème après récolte, de l'acheminement à la vente (suite aux longues périodes de transport et stockage). Les pertes dues à l'infection post-récolte représentent un coût économique considérable qui s'ajoutent aux pertes de rendement (Droby and Lichter, 2004; Romanazzi et al., 2016). En fonction des conditions climatiques, la filière viticole peut être durement touchée. *B. cinerea* a un impact quantitatif sur les cultures, par une baisse de rendement, mais aussi un impact qualitatif par une altération du goût du vin (goût « terreux ») (Ky et al., 2012). Notons tout de même qu'à contrario *B. cinerea* peut être bénéfique à certains types de vinification. En effet, ce champignon est également responsable de la pourriture noble, à l'origine de l'augmentation du taux de sucre dans les baies et qui donne naissance à des vins liquoreux tels le Sauternes ou le Coteaux-du-Layon.

## 2. Les différentes stratégies de luttres contre *B. cinerea*

Certaines cultures (e.g. pois chiche, haricot) peuvent être entièrement décimées par *B. cinerea* (Williamson et al., 2007). Afin de contrôler l'infection par ce champignon, de nombreux moyens de lutte, plus ou moins efficaces, sont disponibles. Parmi eux, la lutte biologique, les mesures

prophylactiques et la lutte chimique. L'utilisation de l'ensemble de ces stratégies de lutte représente un coût pouvant dépasser un milliard d'euros par an (Dean et al., 2012). Etant donné l'importance de ce coût, nous pouvons aisément imaginer que les pertes économiques liées à *B. cinerea* sont bien supérieures.

## **2.1. Lutte « biologique »**

Des politiques agricoles (e.g. plan Ecophyto : <http://agriculture.gouv.fr/le-plan-ecophyto-pour-reduire-lutilisation-des-produits-phytosanitaires-en-france>), poussent au développement de culture raisonnées et à diminuer le recours aux pesticides de synthèse. En parallèle à cela, une pression sociétale rejette de plus en plus l'utilisation de produits chimiques sur les cultures. La lutte contre *B. cinerea* fait appel à l'utilisation de biopesticides et au développement de l'agriculture intégrée. Le terme « biopesticide » a été défini comme des préparations à base de microorganismes vivants ou de substances d'origines naturelles (extrait de plantes, de microorganismes et des composés organiques et minéraux) permettant le contrôle de pathogènes (Nicot et al., 2016) (définition de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail : <https://www.anses.fr/fr/content/les-produits-biocides>).

### **2.1.1. Contrôle de *B. cinerea* à partir de microorganismes**

Dans le cadre de l'agriculture biologique, certains microorganismes, bactéries ou champignons, sont autorisés afin de limiter le développement de *B. cinerea*, pendant la culture ou après récolte. Les bactéries principalement utilisées sont *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas syringae*. L'actinomycète *Streptomyces griseoviridis* est également utilisé dans la lutte anti-botrytis. Quant aux champignons, les plus employés sont la levure *Aureobasidium pullulans* et des champignons filamenteux tels que *Clonostachys rosea* ou des membres du genre *Trichoderma spp.*. Comme décrit par Nicot et al. (2016), trois modes d'action entrent en jeu dans le contrôle de la pourriture grise par les microorganismes :

- Compétition spatiale et nutritionnelle.
- Hyperparasitisme par la sécrétion de molécules antifongiques, d'enzymes et de lipopeptides. Ces molécules ciblent en particulier la paroi et la membrane cellulaire entraînant leur lyse et la mort du champignon.
- Stimulation des défenses de la plante.

L'efficacité des agents de biocontrôle est néanmoins variable et dépend notamment de leur stabilité dans le temps. Cette stabilité peut être influencée par le microclimat, ainsi certains agents de biocontrôle ne se maintiennent pas lors de fluctuations de température ou d'humidité, tandis qu'au contraire, d'autres microorganismes tel que *Rhodotorula glutinis*, restent efficaces contre *B. cinerea* après d'importantes variations de température (Zhang et al., 2007). L'efficacité des agents de biocontrôle dépend également du stade d'infection au moment de l'application de ces derniers ainsi que des plantes infectées (Nicot et al., 2016).

### **2.1.2. Contrôle de *B. cinerea* à partir de substances organiques et minérales**

Des huiles peuvent également être utilisées pour limiter l'attaque de champignons. Dans la lutte anti-botrytis les huiles couramment utilisées sont les huiles minérales (huile de paraffine) mais aussi l'huile de margousier. Ces huiles ont principalement un rôle prophylactique et agissent sur la croissance mycélienne et la germination des macroconidies.

### **2.1.3. Contrôle de *B. cinerea* à partir d'extraits de plantes**

Des extraits de plantes permettent également de lutter contre des champignons pathogènes. Ces extraits peuvent avoir des fonctions antifongiques (extrait de l'arbre à thé, de thym) et des fonctions de stimulation de défense de la plante hôte (extrait de *Reynoutria sachalinensis*).

## **2.2. Mesures prophylactiques**

Dans le cas des vignes, des mesures prophylactiques ont pour objectifs de limiter le développement du champignon et, par conséquent, l'application de fongicides. En ce qui concerne la pourriture grise, cela passe par l'aération des grappes afin de réduire la présence d'humidité favorisant le développement de la pourriture grise. D'autre part, des précautions sont prises afin de limiter des points d'entrées à la suite de blessures sur les feuilles et les grappes (note technique commune gestion de la résistance 2017 : <http://viticulture.ecophytopic.fr/vt/surveillance/evaluation-des-risques/note-technique-commune-gestion-de-la-resistance-2017>). La sensibilité des plantes à *B. cinerea* dépend également de la vigueur et, par conséquent, de l'apport en azote. Un taux élevé d'azote augmente la croissance et la densité du feuillage de la plante mais augmenterait également la sensibilité au champignon (Elad, 2016). Ainsi la limitation de l'apport en nutriment azoté réduit l'incidence de la pourriture grise (Fagard et al., 2014). De façon opposée, un meilleur apport en potassium semble réduire l'intensité de l'infection par *B. cinerea* chez certaines plantes (*e.g.* basilic, vigne, citrouille). L'ion calcium peut également être un facteur important de la résistance à *B. cinerea*. Ainsi l'augmentation du contenu en Ca<sup>2+</sup> réduit l'incidence de la maladie en complément des traitements fongicides (revue par Elad, 2016).

En ce qui concerne les étapes post-récoltes, les fruits mûrs étant plus sensibles à l'infection par *B. cinerea*, de nombreuses mesures sont mises en place pour contrôler leur maturité. Pour cela, durant le transport et le stockage, les fruits peuvent être placés au froid, mais aussi en condition d'atmosphère contrôlée ou modifiée (Sommer, 1985). Des inhibiteurs d'éthylène peuvent également être utilisés afin de ralentir le mûrissement des fruits (Romanazzi et al., 2016).

## **2.3. Lutte chimique**

La lutte chimique est définie par l'utilisation de fongicides de synthèse. Il s'agit à ce jour de la stratégie la plus efficace contre *B. cinerea*. En 2001, les traitements employés pour lutter contre *B. cinerea* représentaient 10% du marché des fongicides, soit 540 millions d'euros (Dean et al., 2012).

Les fongicides présents sur le marché possèdent divers modes d’actions en fonction de leurs familles chimiques (**Tableau I - 1**).

Tableau I - 1 : Principaux fongicides utilisés contre *Botrytis cinerea*. Adapté de Fillinger and Walker, (2016).

Mode d'action	Substances actives	Groupes chimiques
<b>Multi-site</b>	Dichlofluanide	Sulfamides
	Folpet	Phthalimides
	Thirame	Dithiocarbamates
	Chlorothalonil	Chloronitriles
<b>Respiration</b>	Fluazinam	Pyridinamine
	Boscalid	Pyridine-carboxamides
	Fluopyram	Pyridinyles-éthyl-benzamides
<b>Cytosquelette</b>	Carbendazime	Thiophanates -
	Thiophanate-méthyl	Benzimidazoles
	Diéthofencarbe	N-phényl-carbamates
<b>Osmo-régulation</b>	Iprodione	Dicarboximides
	Procymidone	
	Fludioxonil	Phénylpyrroles
<b>Synthèse des acides aminés</b>	Cyprodinil	Anilinopyrimidines
	Mépanipyrim	
	Pyriméthanol	
<b>Biosynthèse des stérols</b>	Prochloraz	Imidazoles
	Tebuconazole	Triazoles
	Fenhexamid	Hydroxyanilides
	Fenpyrazamine	Aminopyrazolinones

### 2.3.1. Synthèse des acides aminés

Cyprodinil, mépanipyrim et pyriméthanol (Figure I - 3) appartiennent tous les trois à la famille des anilinoypyrimidines, considérés longtemps en tant que possibles inhibiteurs de la biosynthèse d'acides aminés. En effet, il a été montré que le traitement par le pyriméthanol inhibait la biosynthèse de la méthionine (Fritz et al., 1997). Des résistances de *B. cinerea* spécifiques aux anilinoypyrimidines ont été mises en évidence après quelques années d'utilisation (Chapeland et al., 1999), suggérant ainsi une résistance par mutations de cible. Seulement très récemment ces mutations ont été caractérisées (Mosbach et al., 2017). Elles affectent plusieurs gènes dont la fonction est liée à la mitochondrie suggérant que les anilinoypyrimidines ciblent une protéine mitochondriale, éventuellement la NADH kinase BcPos5.

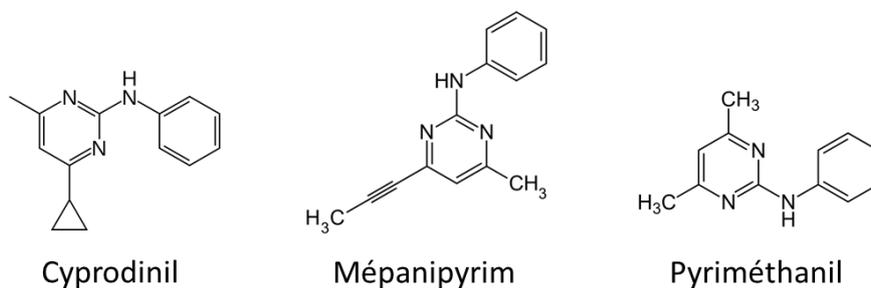


Figure I - 3 : Structure chimique de la cyprodinil, mépanipyrim et pyriméthanol.

### 2.3.2. Respiration

Les inhibiteurs de la respiration chez *B. cinerea* sont regroupés en deux catégories suivant leur cible. Certains fongicides ciblent le complexe II, alors que d'autres inhibent la phosphorylation oxydative de la chaîne respiratoire (Figure I - 4).

Le complexe II de la chaîne respiratoire correspond à la succinate déshydrogénase qui oxyde le succinate en fumarate et réduit l'ubiquinone libérant ainsi un électron transmis au complexe III. La succinate déshydrogénase est composée de quatre protéines : SdhA, SdhB, SdhC, SdhD (Hägerhäll, 1997). Pour la lutte contre *B. cinerea*, les inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHI) homologués en France, sont principalement le Boscalid et le Fluopyram qui appartiennent respectivement aux groupes des pyridine-carboxamides et des pyridinyles-éthyl-benzamides. Ils agissent au niveau des sous-unités SdhB, SdhC, SdhD, qui composent le site de fixation de l'ubiquinone appelé « site-Q ». Des souches résistantes à ces fongicides ont été isolées depuis 2007 (Leroux et al., 2010; Stammler et al., 2007). Ces résistances sont principalement dues à des mutations au niveau de la sous-unité B en position P225 et H272 revue par (Fillinger and Walker, (2016). Elles ne confèrent pas systématiquement une résistance croisée aux différents SDHI, suggérant des interactions moléculaires différentes selon les familles chimiques (Lalève et al., 2014a).

Appelés découplants, les inhibiteurs de phosphorylation oxydative conduisent à une diminution du gradient de protons (complexe V) ce qui entraîne inexorablement une baisse de la synthèse d'ATP. A l'heure actuelle, seul un découplant destiné à la lutte anti-botrytis est autorisé en Europe : le fluazinam, appartenant à la famille chimique des pyridinamines est peu concerné par des phénomènes de résistance (Fillinger and Walker, 2016).

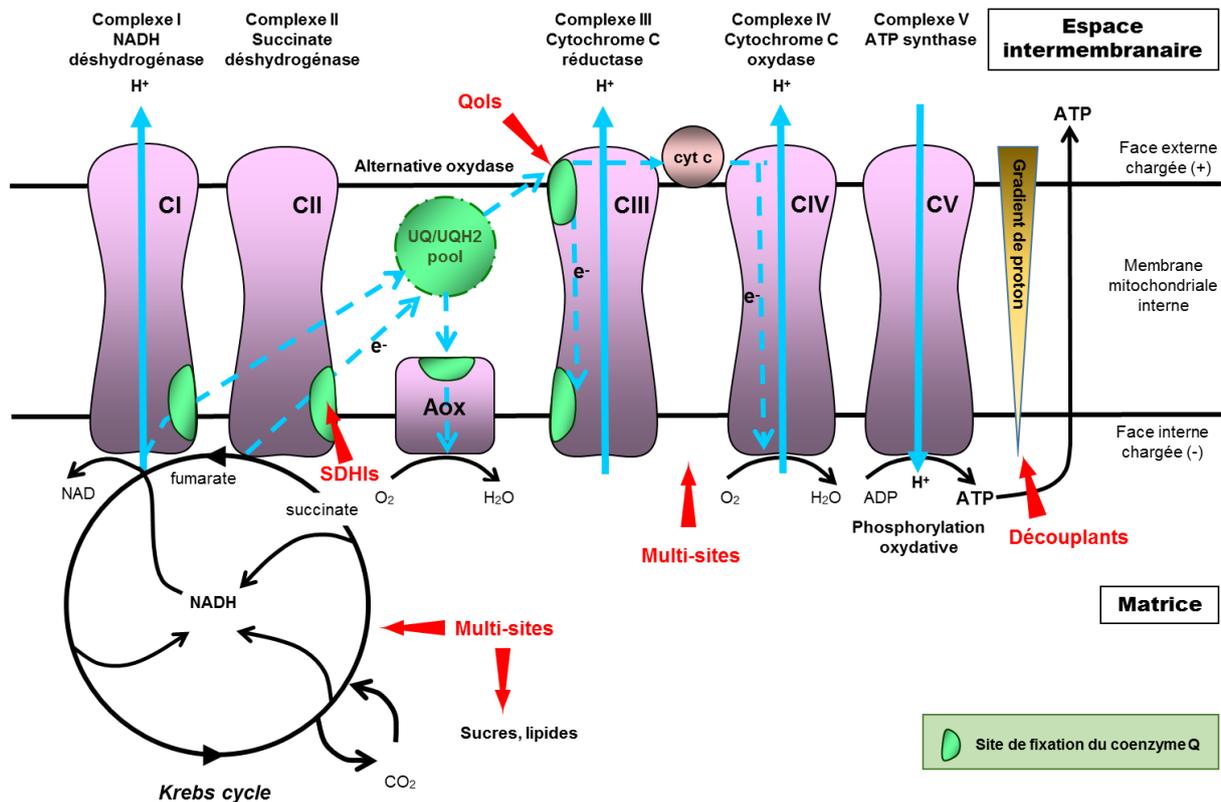


Figure I - 4 : Cibles des inhibiteurs respiratoires dans la chaîne mitochondriale chez *B. cinerea* (d'après Fillinger and Walker, 2016)

### 2.3.3. Biosynthèse des stérols

L'ergostérol est un stérol spécifique des champignons, ce qui fait de lui une excellente cible pour les traitements fongicides. Il existe deux catégories d'inhibiteurs utilisés contre la pourriture grise : d'une part les inhibiteurs de la C4-déméthylation tels que le fenhexamid et la fenpyrazamine et d'autre part, les inhibiteurs de la 14 $\alpha$ -déméthylase (DMI) tels que les azoles, tebuconazole et prochloraz (**Figure I - 5**). Le fenhexamid a la particularité de posséder un spectre étroit, n'étant efficace que sur *B. cinerea* et sur les espèces du genre *Botrytis*, proches de *B. cinerea*, à l'exception de *B. pseudocinerea* qui est naturellement résistant à ce fongicide (Leroux et al., 2002; Walker et al., 2011). L'inhibition par le fenhexamid et la fenpyrazamine de la 3-ketoreductase impliquée dans la C4-déméthylation, a pour conséquence d'inhiber la biosynthèse d'ergostérol et d'entraîner l'accumulation d'un intermédiaire toxique (Debieu et al., 2001; 2013). Des cas de résistance sont apparus après

quelques années d'utilisation (Leroux et al., 2002). Cette résistance est due à des modifications de la protéine cible Erg27 (Fillinger et al., 2008). L'utilisation raisonnée du fenhexamid a probablement permis de contrôler la dispersion de la mutation dans les populations, expliquant que ce fongicide soit encore efficace en champ à l'heure actuelle (Walker et al., 2013).

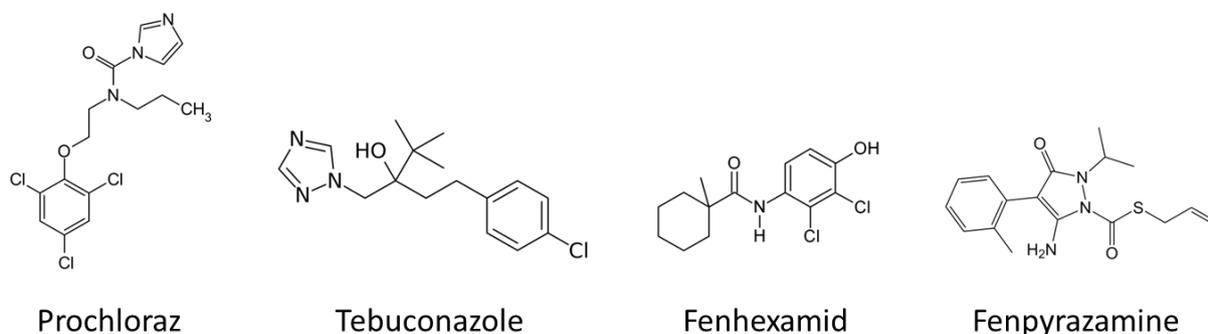


Figure I - 5 : Structure chimique du prochloraz, tebuconazole, fenhexamid, fenpyrazamine

### 2.3.4. Cytosquelette

Les benzimidazoles et thiophanates ont été les premiers fongicides à cibler le cytosquelette et plus précisément la  $\beta$ -tubuline (**Figure I - 6**). Ils agissent de façon curative grâce à leur action systémique. Malheureusement, suite à leur utilisation intensive, de nombreux cas de résistances sont apparus, en particulier chez *B. cinerea*. Cette résistance aux benzimidazoles est due à une mutation ponctuelle au niveau du gène *benA* codant pour la  $\beta$ -tubuline. Néanmoins, les souches résistantes aux benzimidazoles (BenR1), ayant la mutation E198A/V, sont sensibles aux N-phényl-carbamates dont le mode d'action est identique (résistance croisée négative). L'application du mélange benzimidazoles/N-phényl-carbamates a entraîné l'apparition de la mutation F200Y qui provoque une résistance croisée positive aux benzimidazoles et aux N-phényl-carbamates (souches BenR2). La mutation F200Y n'est maintenue que sous pression de sélection indiquant un coût de fitness lié à cette mutation. A l'opposé, la mutation E198A s'est rapidement répandue dans les populations de *B. cinerea* et ce même en absence de pression de sélection (Walker et al., 2013).

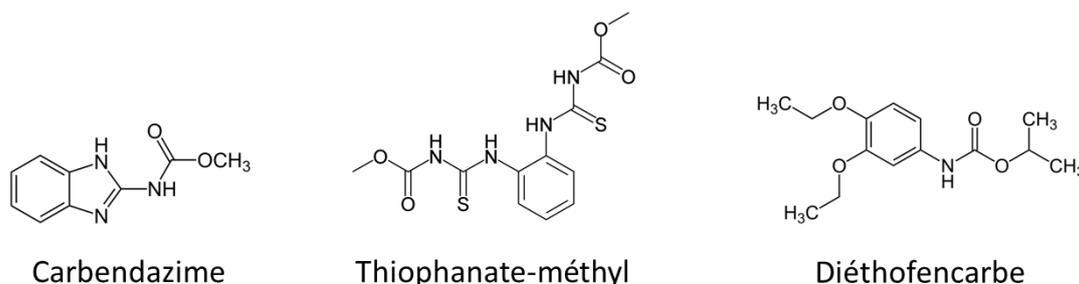


Figure I - 6 : Structure chimique du carbendazime, thiophanate-méthyl et diéthofencarbe

### 2.3.5. Action multi site

Appartenant aux familles chimiques des sulfamides, des phthalimides, dithiocarbamates et chloronitriles (**Figure I - 7**), les fongicides multi site agissent fortement sur les groupes thiol de nombreuses enzymes fongiques (Fillinger and Walker, 2016). Bien que peu de résistances ne soient détectées vis-à-vis des fongicides multi site, nombre d'entre eux ont été retirés du marché à cause de l'impact toxicologique.

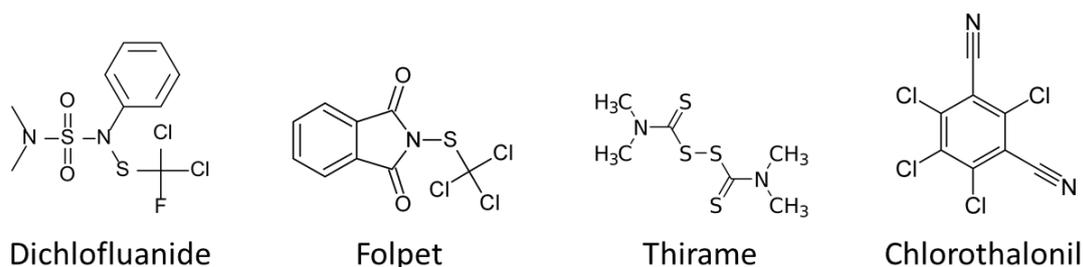


Figure I - 7 : Structure chimique du dichlofluanide, folpet, thirame, chlorothalonil

### 2.3.6. Osmo-régulation

Les phénylpyrroles et les dicarboximides (**Figure I - 8**) ciblent la voie osmorégulatrice par l'intermédiaire de l'histidine kinase Bos1. De nombreux cas de résistance aux dicarboximides ont pu être identifiés en champ (Faretra and Pollastro, 1991; Oshima et al., 2002). Ces résistances sont causées par des mutations au sein du gène *bos1*.

Le fludioxonil, qui appartient à la famille chimique des phénylpyrrole, est à ce jour le seul fongicide dont pratiquement aucune résistance spécifique n'a été détectée en champ. En effet, seul des résistances de type « Multi-Drug Resistance » entraînent une résistance moyenne à ce fongicide. Cette classe de fongicides ciblant la voie de signalisation osmorégulatrice fait l'objet d'une revue bibliographique que nous avons réalisé (Kilani and Fillinger, 2016).

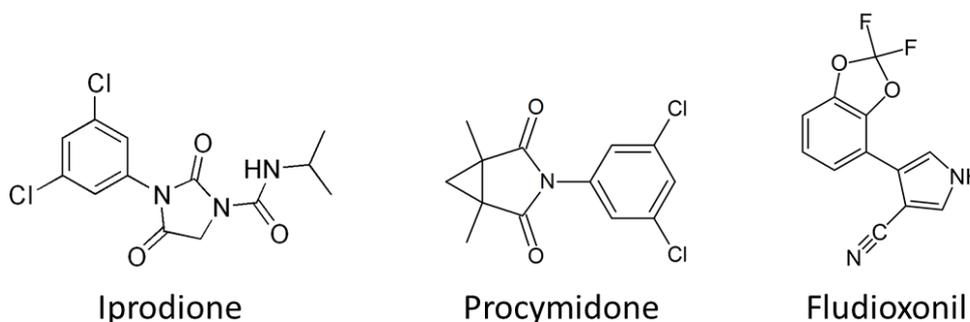


Figure I - 8 : Structure chimique de l'iprodione, procymidone et fludioxonil



Phenylpyrroles : 30 years, two  
molecules and (nearly) no resistance





# Phenylpyrroles: 30 Years, Two Molecules and (Nearly) No Resistance

Jaafar Kilani<sup>1,2\*</sup> and Sabine Fillinger<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UMR BIOGER, Institut National de la Recherche Agronomique, AgroParisTech, Université Paris Saclay, Thiverval-Grignon, France, <sup>2</sup> Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Orsay, France

Phenylpyrroles are chemical analogs of the natural antifungal compound pyrrolnitrin. Fenpiclonil, but mainly fludioxonil are registered against multiple fungal crop diseases since over 25 years for seed or foliar treatment. They have severe physiological impacts on the pathogen, including membrane hyperpolarization, changes in carbon metabolism and the accumulation of metabolites leading to hyphal swelling and burst. The selection and characterization of mutants resistant to phenylpyrroles have revealed that these fungicides activate the fungal osmotic signal transduction pathway through their perception by a typical fungal hybrid histidine kinase (HHK). The HHK is prone to point mutations that confer fungicide resistance and affect its sensor domain, composed of tandem repeats of HAMP motifs. Fludioxonil resistant mutants have been selected in many fungal species under laboratory conditions. Generally they present severe impacts on fitness parameters. Since only few cases of field resistance specific to phenylpyrroles have been reported one may suspect that the fitness penalty of phenylpyrrole resistance is the reason for the lack of field resistance.

**Keywords:** fungicide, signal transduction, histidine kinase, resistance, fitness

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Miguel Cache Teixeira,  
University of Lisbon, Portugal

### Reviewed by:

Yong-Sun Bahn,  
Yonsei University, South Korea  
Nicolas Papon,  
University of Angers, France

### \*Correspondence:

Jaafar Kilani  
jaafar.kilani@inra.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Antimicrobials, Resistance  
and Chemotherapy,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

**Received:** 29 September 2016

**Accepted:** 01 December 2016

**Published:** 16 December 2016

### Citation:

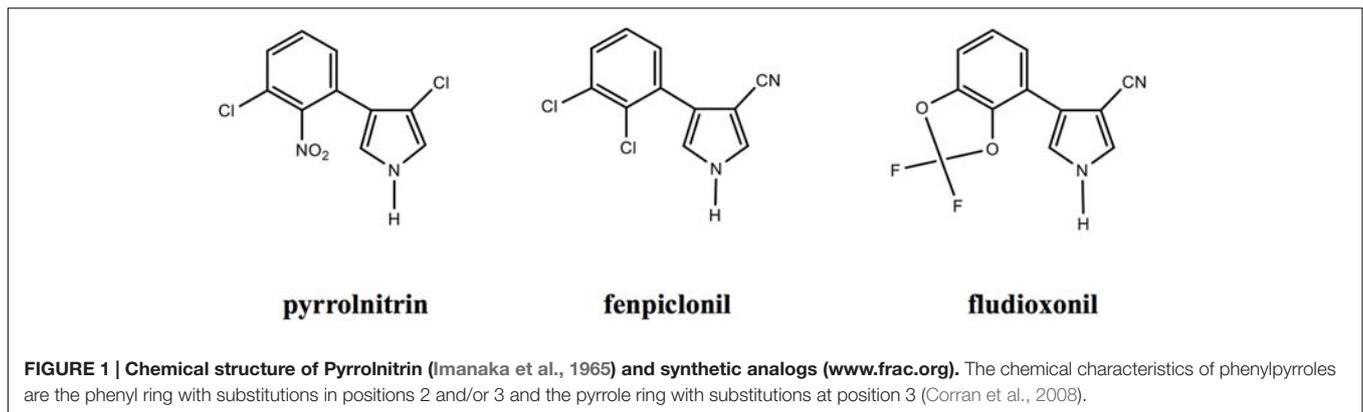
Kilani J and Fillinger S (2016)  
Phenylpyrroles: 30 Years, Two  
Molecules and (Nearly) No  
Resistance. *Front. Microbiol.* 7:2014.  
doi: 10.3389/fmicb.2016.02014

## THE ORIGIN OF PHENYLPYRROLES

Phenylpyrroles are chemical derivatives of pyrrolnitrin, a secondary metabolite produced by some bacteria from tryptophan (Floss et al., 1971). It was isolated for the first time from *Pseudomonas pyrrocinia* in the 1960s (Arima et al., 1965) and showed strong antifungal activity against various animal and plant pathogenic fungi even under greenhouse conditions. Pyrrolnitrin or pyrrolnitrin producing *Pseudomonas* (e.g., *P. fluorescens*) proved phytoprotecting efficiency against *Rhizoctonia solani*, *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Verticillium dahliae*, and *Thielaviopsis basicola*. Its activity was found stable for 30 days in the soil (Howell and Stipanovic, 1979) but sensitive to light decomposition. Consequently, two synthetic analogs have been successfully developed by Ciba-Geigy AG (now Syngenta AG) in the 1980s and introduced in the market for seed treatment and foliar use (reviewed in Leadbitter et al., 1994).

Fenpiclonil and fludioxonil are 3-cyano-4-phenylpyrrol analogs of pyrrolnitrin with largely increased photo-stability and similar antifungal activity (reviewed in Corran et al., 2008). These compounds differ by the substitutions at positions 2 and 3 of the phenyl ring (**Figure 1**). Fenpiclonil

**Abbreviations:** HAMP domain: domains conserved among histidine kinase, adenylate cyclase, methyl accepting proteins, phosphatases; HHK: hybrid histidine kinase; HK: histidine kinase; MAPK: mitogen activated kinase; PK-III: protein kinase III; ST: signal transduction.



(synthesized in 1984) was introduced in the market as seed-treatment in 1988 but rapidly superseded (1990) by the more stable and more active fludioxonil as foliar and seed-treatment (Leadbitter et al., 1994; Corran et al., 2008). To date, fludioxonil can be considered as major representative of the phenylpyrrole family of fungicides.

As non-systemic, surface fungicide, fludioxonil is registered for treatments at pre- and post-harvest stages on leaves, fruits and seeds. It has a principally prophylactic action against multiple fungal diseases provoked by ascomycetes or basidiomycetes. The list of crops registered for the use of fludioxonil and the associated pathogens (if known) is indicated in **Table 1**. Fludioxonil has no detectable activity on non-target organisms, such as baker's yeast, men, plants, or animals (Gehmann et al., 1990).

Phenylpyrroles inhibit all stages of fungal development, spore germination, germ-tube elongation, and mycelial growth (Leroux et al., 1992). The observed consequences are swollen hyphae with increased ramifications and apical lysis (Leroux, 1996) indicating that phenylpyrroles might act on the intra-hyphal turgor and cell wall biosynthesis (Lew, 2010).

## EFFECT OF PHENYLPYRROLES ON TARGET FUNGI – MODE OF ACTION

Jespers et al. (1994) observed extremely rapid intracellular accumulation of fenpiclonil in *Fusarium sulphureum* reaching its maximum in less than 1 min. Interestingly, the majority of the accumulated fenpiclonil can be washed off by water, suggesting that the phenylpyrrole penetrates the fungus through passive diffusion. The same study also showed that during the exposure to fenpiclonil the fungus accumulates the lipophilic tetraphenylphosphonium bromide (TPP<sup>+</sup>), independent of extracellular pH, indicating hyperpolarization of the plasma membrane and modification of the mitochondrial membrane potential (Jespers et al., 1994). Similar results have been observed with fludioxonil in *Neurospora crassa*, i.e., the induction of hyperpolarization of the plasma membrane through efflux of H<sup>+</sup> and influx of K<sup>+</sup> leading to increased membrane potential (Lew, 2010).

Various authors have observed modifications in the intracellular accumulation of different metabolites (e.g., *F.*

*sulphureum*, *N. crassa*). Exposure to high doses of fenpiclonil (over 10-fold EC<sub>50</sub> concentrations) induces the accumulation of amino acids and monosaccharides (Jespers et al., 1993). Conversely the exposure to sub-lethal doses of phenylpyrroles seems to inhibit the incorporation of mono-saccharides into macromolecules (Jespers and De Waard, 1994) but also to stimulate biosynthesis and intracellular accumulation of glycerol and mannitol (Jespers and De Waard, 1995; Pillonel and Meyer, 1997). In order to precise the enzymatic step inhibited by phenylpyrroles, Jespers and De Waard (1995), studied the fate of radioactively labeled 2-deoxyglucose. 2-deoxyglucose can be phosphorylated as is glucose, but cannot be further metabolized. In the presence of fenpiclonil, [<sup>14</sup>C]-2-deoxyglucose accumulated intracellularly, while the intracellular concentration of [<sup>14</sup>C]-2-deoxyglucose-phosphate diminished indicating the inhibition of hexokinase activity during exposure of the mycelium to the phenylpyrrole. When the authors performed the same assay on crude mycelial extracts, they only observed a minor reduction of [<sup>14</sup>C]-2-deoxyglucose phosphorylation under high concentrations of fenpiclonil, withdrawing the cytoplasmic hexokinase as sole or direct target of fenpiclonil (Jespers and De Waard, 1995).

Pillonel and Meyer tested the inhibition of protein kinase activities in *N. crassa* by phenylpyrroles. They found that purified PK-III was inhibited by fenpiclonil and fludioxonil (Pillonel and Meyer, 1997). Although the concentration of phenylpyrroles required for PK-III inhibition was found similar to that of rat PKC-inhibition, *N. crassa* PK-III does not seem to be neither a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin nor a cAMP regulated protein kinase (Judewicz et al., 1981; Ulloa et al., 1987). To some extent the inhibition of PK-III correlated with growth inhibition by fenpiclonil, but less by fludioxonil, raising the question if phenylpyrroles, especially fenpiclonil, directly inhibit PK-III activity. Given the data of Pillonel and Meyer, this hypothesis has never been retained nor validated, since the concentrations required to inhibit the purified enzyme (I<sub>50</sub>) were much higher (up to 100 times in the case of fludioxonil) than those needed to inhibit fungal growth (EC<sub>50</sub>). Either phenylpyrroles do not inhibit PK-III by itself, acting rather indirectly, or they may affect different cellular targets.

**TABLE 1 | Crops and diseases registered for pre- or post-harvest treatment with phenylpyrroles.**

Crop	Pathogens controlled	Reference
<b>Seed treatments and post-harvest uses</b>		
Almonds	<i>Coryneum beijerinckii</i> , <i>Monilinia</i> spp.	Gehmann et al., 1990
Avocado	<i>Dothiorella iberica</i> <i>Neofusicoccum australe</i> <i>Neofusicoccum luteum</i> <i>Neofusicoccum parvum</i> <i>Phomopsis</i> spp.	Twizeyimana et al., 2013
Barley	<i>Microdochium nivale</i> <i>Fusarium</i> spp. <i>Ustilago hordei</i> <i>Pyrenophora graminea</i> <i>Cochliobolus sativus</i>	Gehmann et al., 1990
Beans	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Botrytis</i> spp.	Olaya et al., 1994 Gehmann et al., 1990
Carrot	<i>n.i.*</i>	
Citrus fruit	<i>Penicillium digitatum</i>	Kanetis et al., 2007
Cotton	<i>Fusarium</i> spp. <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Thielaviopsis basicola</i>	Leroux et al., 1992; Corran et al., 2008
Cucurbit vegetables	<i>n.i.</i>	
Eggplant	<i>Botrytis</i> spp.	Corran et al., 2008
Flax seed	<i>n.i.*</i>	
Foliage of legume vegetables	<i>n.i.*</i>	
Ginseng	<i>n.i.*</i>	
Grapes	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Glomerella cingulata</i>	Gehmann et al., 1990
Grass (forage, fodder, hay)	<i>n.i.*</i>	
Jojoba	<i>n.i.*</i>	
Kiwifruit	<i>Botrytis cinerea</i>	Brigati et al., 2009
Lettuce	<i>Sclerotinia minor</i>	Gehmann et al., 1990
Maize	<i>Fusarium graminearum</i>	Gehmann et al., 1990
Tropical fruits	<i>n.i.*</i>	
Peanut	<i>Sclerotinia minor</i> <i>Rhizoctonia solani</i>	Gehmann et al., 1990; Corran et al., 2008
Peas	<i>Ascochyta</i> spp. <i>Fusarium</i> spp. <i>Peyronellaea pinodes</i>	Gehmann et al., 1990; Corran et al., 2008
Pineapple	<i>n.i.*</i>	
Pistachio	<i>Alternaria</i> spp.	Ma et al., 2004
Pome fruit	<i>Penicillium</i> spp., <i>Botrytis cinerea</i>	Errampalli, 2004; Zhao et al., 2010
Pomegranate	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Alternaria</i> spp. <i>Penicillium</i> spp.	Palou et al., 2007; D'Aquino et al., 2010
Potato	<i>Fusarium</i> spp. <i>Helminthosporium solani</i> <i>Boeremia exigua</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Alternaria solani</i>	Gehmann et al., 1990; Gachango et al., 2012
Rapeseed	<i>Leptosphaeria maculans</i>	Gehmann et al., 1990;

(Continued)

**TABLE 1 | Continued**

Crop	Pathogens controlled	Reference
	<i>Alternaria brassicae</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Duan et al., 2013
Rice	<i>Gibberella fujikuroi</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Gaeumannomyces oryzae</i> <i>Cochliobolus miyabeanus</i>	Gehmann et al., 1990
Rye	<i>Microdochium nivale</i> <i>Urocystis occulta</i> <i>Monographella nivalis</i>	Gehmann et al., 1990; Corran et al., 2008
Safflower	<i>n.i.*</i>	
Soybean	<i>Fusarium</i> spp. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Rhizoctonia solani</i>	Mueller et al., 1999; Corran et al., 2008
Stone fruits (apricots, peaches, nectarines, cherries, plums)	<i>Monilinia</i> spp., <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Rhizopus</i> spp.	Gehmann et al., 1990; Förster et al., 2007
Strawberry	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Glomerella cingulata</i>	Gehmann et al., 1990; Taguchi et al., 2012
Sunflower	<i>n.i.*</i>	
Sweet potato	<i>Rhizopus stolonifer</i>	Edmunds and Holmes, 2009
Tomato	<i>Botrytis</i> spp., <i>Alternaria solani</i>	Gehmann et al., 1990
Tropical fruits	<i>n.i.*</i>	
Watercress	<i>n.i.*</i>	
Wheat	<i>Tilletia laevis</i> <i>Microdochium nivale</i> <i>Fusarium</i> spp. <i>Bipolaris sorokiniana</i> <i>Phaeosphaeria nodorum</i> <i>Monographella nivalis</i>	Gehmann et al., 1990; Corran et al., 2008
<b>Terrestrial non-food uses</b>		
Turf	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Sclerotinia homeocarpa</i> <i>Drechslera poae</i> <i>Microdochium nivale</i>	Gehmann et al., 1990
Ornamentals	<i>Rhizoctonia solani</i>	Gehmann et al., 1990

\**n.i.*: not indicated (crops without associated pathogens were extracted from the registration review of fludioxonil).

## FROM PHENYLPYRROLES TO OSMOTIC SIGNAL TRANSDUCTION

Glycerol accumulation is a consequence specific to the exposure to phenylpyrrole, dicarboximide and aromatic hydrocarbon fungicides. The selection of laboratory generated mutants resistant to the three categories of fungicides in *B. cinerea* correlated with osmosensitivity (Leroux et al., 1992; Faretra and Pollastro, 1993). Also *N. crassa* osmosensitive mutants *os-1*, *os-2*, *os-4*, and *os-5* (Perkins et al., 1982) are resistant to dicarboximides, aromatic hydrocarbons, and phenylpyrroles (Fujimura et al., 2000; Zhang et al., 2002).

The corresponding genes and mutations have been cloned and identified in *N. crassa* and later in other fungi. The *os-1* gene encodes a class III HHK (Schumacher et al., 1997) whose mutations lead to fungicide resistance and osmosensitivity (Ochiai et al., 2001). The *os-2* gene on its turn encodes the osmosensing MAPK (Zhang et al., 2002), homologous to the MAPK of *Saccharomyces cerevisiae* involved in adaptation to high osmolarity named, high osmolarity glycerol, Hog1 (Hohmann, 2002). The fungicide resistant/osmosensitive phenotype of *os-2* mutants is due to non-sense mutations. Finally, *os-5* and *os-4* are the MAPKK and MAPKKK encoding genes, respectively (Fujimura et al., 2003). The *Os-5*, *Os-4*, and *Os-2* elements are equivalent to the yeast osmotic ST cascade. Altogether these items suggest that the phenylpyrroles (and dicarboximides) target the osmotic ST cascade, in particular the class III HHK *Os-1*.

An additional argument for this hypothesis is the fact that the yeast *S. cerevisiae*, devoid of this class of HHK, is insensitive to phenylpyrroles and dicarboximides. The introduction of a class III HHK, orthologous to *Os-1*, leads to sensitivity to phenylpyrroles, dicarboximides and aromatic hydrocarbons in *S. cerevisiae* (Motoyama et al., 2005). These results are in favor of the class III HHK as direct target of phenylpyrroles (and dicarboximides).

The possible mode of action is that fludioxonil, by binding to the class III HHK, mimics an osmotic stress through the activation of the *Os-2/Hog1* MAPK (**Figure 2A**). This activation probably leads to multiple downstream reactions, such as activation of H<sup>+</sup>-ATPase, K<sup>+</sup>-influx and glycerol biosynthesis leading to increased intracellular turgor and membrane potential (Lew, 2010). Additional enzyme activities may be affected, e.g., hexokinase or sugar transporters (Jespers et al., 1994; Jespers and De Waard, 1995) that ultimately explain the phenotypes outlined above.

## RESISTANCE TO PHENYLPYRROLES

Until now only few cases of field resistance specific to fludioxonil have been reported; this despite the fact that for many fungal species (*N. crassa*, *B. cinerea*, *S. sclerotiorum*, *U. maydis*, *A. nidulans*,...) resistant strains could easily be obtained after mutagenesis and successive replication on fludioxonil supplemented medium (e.g., Avenot et al., 2005). These laboratory mutants display high resistance levels to phenylpyrroles, which is often associated with sensitivity to hyper-osmolarity and cross-resistance to dicarboximides and aromatic hydrocarbons (Ochiai et al., 2001; Leroux et al., 2002). In addition, most laboratory mutants, e.g., in *B. cinerea* and *A. brassicicola*, display developmental defects and reduced pathogenicity (Avenot et al., 2005; Ajouz et al., 2010; Ren et al., 2016). Adversely, no fitness penalty was found associated with dicarboximide resistance (and phenylpyrrole sensitivity) in field strains (Oshima et al., 2002, 2006). Notably, in some fungal species, no developmental defect besides osmosensitivity was found associated with phenylpyrrole resistance (Motoyama et al., 2005; Luo et al., 2012).

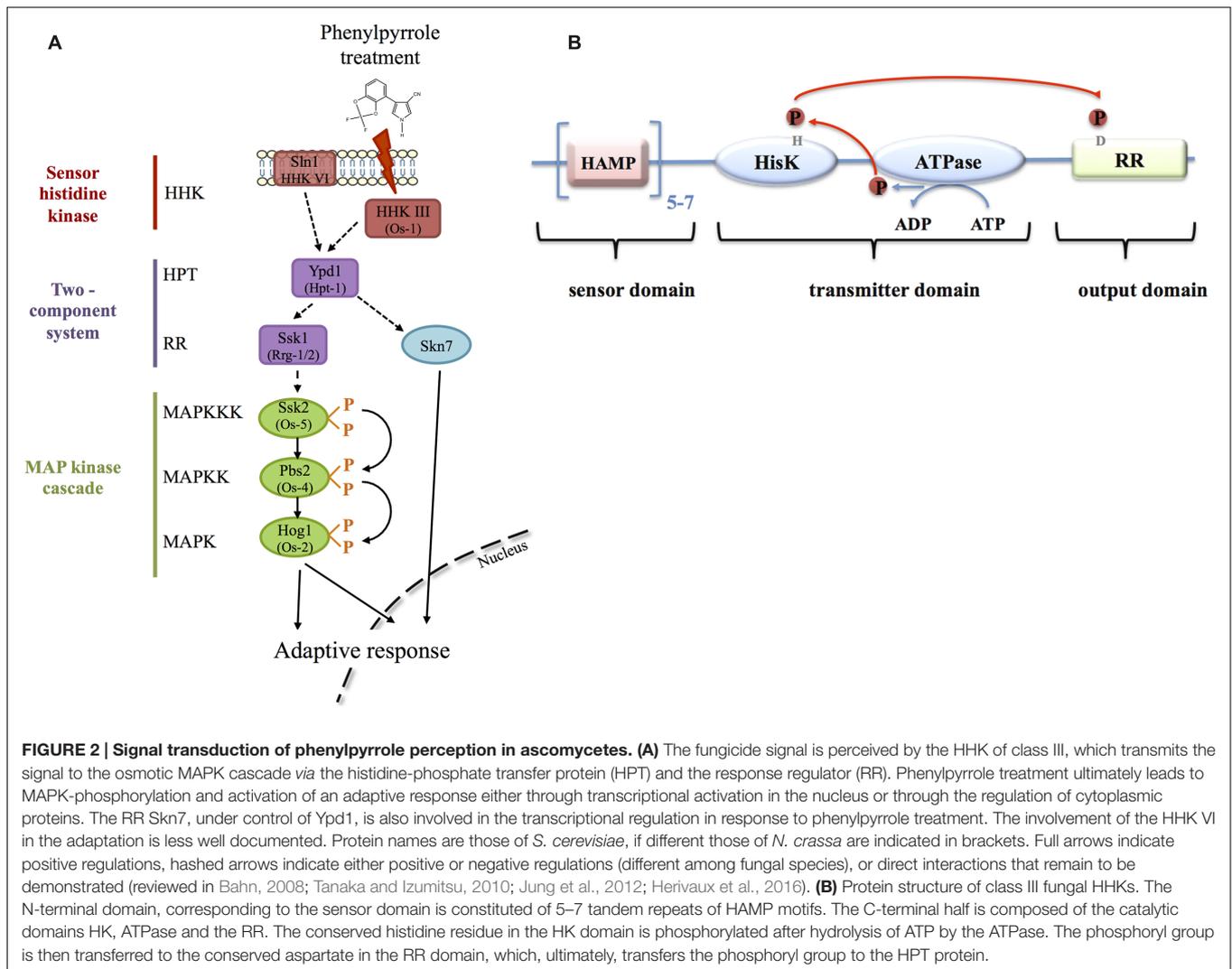
Field strains cross-resistant to phenylpyrroles and dicarboximides have been isolated from *A. brassicicola*, *A. longipes*, and *A. alternata* populations (Dry et al., 2004; Iacomi-Vasilescu et al., 2004; Avenot et al., 2005; Luo et al., 2012; Avenot and Michailides, 2015; Malandrakis et al., 2015). No significant developmental defects could be detected in the *A. brassicicola* resistant mutants and only moderate osmosensitivity (Avenot et al., 2005; Iacomi-Vasilescu et al., 2008). However, phenylpyrrole resistance seems limited in *Alternaria* field populations (Avenot and Michailides, 2015; Malandrakis et al., 2015) indicating a potential fitness penalty not detected under controlled laboratory conditions.

Recently, fludioxonil resistant strains have been isolated from *B. cinerea* field populations in China, at low levels (<3%). They present the typical osmosensitivity and developmental defects of fludioxonil resistant laboratory mutants (Ren et al., 2016) raising the question of their capacity to compete with sensitive and fitter strains and the selective pressure of fungicide treatments on these particular populations. Globally, specific resistance to fludioxonil does not exist among gray mold populations maintaining the high efficiency of this fungicide (Walker et al., 2013; Fillingner and Walker, 2016). However, multi-drug resistant (MDR) phenotypes due to increased fungicide efflux affect sensitivity to fludioxonil (Kretschmer et al., 2009). Although MDR does not reach resistance levels sufficient to alter field efficacy of fungicides at their registered field rates, the MDR1h phenotype of *B. cinerea* group S strains leads to the highest resistance levels to fludioxonil reported for field isolates (Leroch et al., 2013) – besides the specific resistance reported from China (Ren et al., 2016) – and impacts fludioxonil efficacy at least in *in vitro* assays (Rupp et al., 2016).

## FUNGAL HISTIDINE KINASES LINKED TO PHENYLPYRROLE RESISTANCE

As mentioned above, mutations conferring resistance to phenylpyrroles and dicarboximides map to class III HHKs, although one cannot exclude the presence of mutations in other components of the osmotic ST cascades that have not been specifically searched for. HKs are ubiquitous, but typical fungal HHKs are absent from mammals and therefore constitute interesting targets for fungicide treatments. They are involved in cellular ST systems referred to as His-to-Asp phosphorelays. HHKs act as primary sensors for various environmental signals and initiate the adaptive response after autophosphorylation and subsequent phosphotransfer (reviewed by Bahn, 2008). Interestingly, the class III HHKs were shown to be cytoplasmic (Meena et al., 2010; Foureau et al., 2014), meaning that they sense fludioxonil intracellularly after its transmembrane diffusion.

Fungal HHKs are composed of the variable N-terminal sensor domain and the C-terminal domain, including the catalytic HK and ATPase domains that autophosphorylate the conserved



histidine residue, in addition to the receiver domain with the cognate aspartate residue (reviewed in Jung et al., 2012; Herivaux et al., 2016) (Figure 2). A classification according to the structural components of the N-terminal domain and the peptide sequence around the conserved histidine residue attributed 16 classes of HHKs to fungi (Defosse et al., 2015). The number of HHK genes varies among species of the fungal kingdom from 1 to 21 HHKs (Catlett et al., 2003; Lavin et al., 2010; Defosse et al., 2015).

The HHKs involved in fludioxonil sensing are principally those belonging to class III (Ochiai et al., 2001; Avenot et al., 2005; Motoyama et al., 2005; Viaud et al., 2006; Dongo et al., 2009; Alberoni et al., 2010; Furukawa et al., 2012), but some data indicate a possible role in phenylpyrrole sensing of other HHKs. In *Candida lusitanae* Chk1, the HHK of class VI, homologous to the osmosensing HHK Sln1 of *S. cerevisiae*, interferes with phenylpyrrole sensitivity (Chapeland-Leclerc et al., 2007). In the *Cryptococcus neoformans*, Tco2, a basidiomycete specific dual HK is also involved in fludioxonil sensitivity (Bahn et al., 2006). If the action of these

HHKs is direct or indirect through the HOG pathway remains to be established.

The N-terminal domain of class III HHKs is characterized by 5–7 tandem repeats of an approximately 50-amino acid alpha-helical region, conserved among several signaling proteins and named HAMP domain (IPR003660). HAMPs have been extensively studied in bacterial sensor proteins where they play an active role in the intramolecular ST from the transmembrane sensor domain to the cytoplasmic kinase domain. It has been suggested that the HAMP domain regulates the phosphorylation of homodimeric sensor proteins by transmitting the conformational changes in the ligand-binding domains to the C-terminal signaling kinase domains (Aravind and Ponting, 1999; Klose et al., 2014; Schultz et al., 2015). This model is supported by genetic and biochemical studies (Zhou et al., 2009; Matamouros et al., 2015).

Histidine kinase, adenylate cyclase, methyl accepting proteins, phosphatases modules do not have strict sequence conservation, but a canonical coiled coil structure. HAMP subunits have

two 16-residue amphiphilic helices (AS1, AS2) joined by a 14- to 15-residue connector segment. AS1 and AS2 have a seven-residue repeat pattern with hydrophobic residues at the first and fourth position, respectively (Parkinson, 2010). Rotation after signal perception is proposed to constitute the basic mechanism of HAMP mediated transmembrane signaling in bacteria (Airoola et al., 2010, 2013; Klose et al., 2014).

The 5–7 repeats of HAMP modules and the cytoplasmic localization do not allow a simple transposition of the bacterial structure-function model to explain the mechanism of ST in fungal HKs. The number of repeat units varies across fungal species. Using *S. cerevisiae* as heterologous host the role of HAMP domains in ST has been investigated. In the case of *Debaryomyces hansenii* class III HHK, HAMP deletion and yeast two hybrid studies led to the proposal of a functional model to explain the transduction of the hyperosmolarity or fludioxonil signal involving the five HAMP domains of the DhNik1 protein (Meena et al., 2010; Furukawa et al., 2012): The correct order of the HAMP domains is essential; HAMP1-3, 5 are essential for kinase activity, but HAMP4 is essential for the regulation of the HHK in response to a signal through its interaction with HAMP5. Using this approach, the authors showed that DhNik1 in the heterologous host *S. cerevisiae* has a functional kinase activity under standard conditions inhibiting the phosphorylation of the MAPK Hog1. Hyperosmolarity or fludioxonil inhibit DhNik1 activity leading to Hog1 activation. The interaction between two HAMP domains (HAMP4 and HAMP5) is essential for HHK inhibition. The authors also showed in the yeast model, that a constitutive active form of DhNIK1 confers resistance to fludioxonil. Among point mutations of *N. crassa* mutants displaying low resistance to fludioxonil (Ochiai et al., 2001), at least one of these mutations leads to a constitutive active form of the class III HK, conferring fludioxonil resistance to *S. cerevisiae* (Furukawa et al., 2012).

Mutations in fungal class III HHKs conferring resistance to phenylpyrroles and cross-resistance to dicarboximides generally induce phenotypes similar to deletion mutants (Viaud et al., 2006; Fillinger et al., 2012). They localize within or between the HAMP domains of the HHKs (Oshima et al., 2002; Alberoni et al., 2010; Fillinger et al., 2012; Firoz et al., 2015), while others are frameshift or non-sense mutations (Ochiai et al., 2001; Iacomini-Vasilescu et al., 2004; Duan et al., 2014; Ren et al., 2016). Altogether these results are in agreement with the hypothesis that in most cases loss-of-function mutations are responsible for fludioxonil resistance in plant pathogenic fungi (mainly laboratory mutants; reviewed in Defosse et al., 2015), but mutations leading to modified function or even constitutively active HHK may exist as well, probably at very low frequencies. Due to its essential role in many biological processes including pathogenicity (Viaud et al., 2006; Herivaux et al., 2016), losing a class III HHK might explain the absence of fludioxonil field resistance in most plant pathogenic fungi.

## CONCLUSION

Thirty years after their introduction in the fungicide market, the large spectrum phenylpyrroles still hide some mysteries. Although all characterized resistance mutations have been mapped to class III HHK genes, the corresponding protein has never been demonstrated as phenylpyrrole target. It has been shown that fludioxonil, the nearly unique representative of this class of fungicides, activates the osmosensing MAPK in diverse fungi (Kojima et al., 2004; Yoshimi et al., 2005; Bahn et al., 2006; Hagiwara et al., 2007; Segmuller et al., 2007) which may be its real mode of action. One may hypothesize that this permanent stimulation of the hyper-osmolarity response *via* MAPK activation induces the observed pleiotropic phenotypes and, consequently, fungal death.

Another mystery is the absence (or low abundance) of fludioxonil field resistance. To our knowledge field isolates displaying specific resistant to fludioxonil have been detected only in *Alternaria* sp. (Iacomini-Vasilescu et al., 2004) and, very recently in *B. cinerea* (Ren et al., 2016). In most cases fludioxonil resistance due to mutations in the HHK gene seems to induce a strong fitness penalty; *e.g.*, extremely reduced sporulation, osmosensitivity, loss of pathogenicity, etc. (Ziogas et al., 2005; Viaud et al., 2006; Ajouz et al., 2011; Malandrakis et al., 2015), definitely counter-selecting fludioxonil resistance. In the case of *A. brassicicola*, the absence of evident developmental defects in some fludioxonil resistant field isolates (Iacomini-Vasilescu et al., 2004), might be due to compensatory mutations in a given genetic background. Nevertheless spreading of these strains might be limited under field conditions due to some yet undetected defect. Therefore it might be suspected that evolution of fludioxonil resistance in fungal populations is strongly limited, unless additional mutations compensating the fitness penalty may arise and be selected. After 30 years of phenylpyrroles the chances to select such multiple mutations seem limited; otherwise they would have already appeared.

Another question raised while writing this review is the absence of alternative structural analogs of pyrrolnitrin that could have been produced by the chemical companies; an astonishing fact since fenpiclonil and fludioxonil have a large spectrum of activity, high efficiency and are not really facing resistance problems. Were similar components synthesized, but did not show comparable efficiency or stability? Are there problems with other phenylpyrroles that fenpiclonil or fludioxonil do not face? Is synthesis too complicated or expensive? At Ciba Geigy, among the multiple analogs tested, fenpiclonil and fludioxonil were the only molecules with the required properties for efficient fungicides (Leadbitter et al., 1994; Pillonel and Meyer, 1997) and their registration, suggesting potential problems in synthesis, activity, stability, and/or toxicity issues of other analogs.

With increasing resistance problems against medical antifungal compounds, class III HHKs have been considered as potential drug targets also against human fungal pathogens (Bahn et al., 2005; Nemecek et al., 2006; Chapeland-Leclerc et al., 2007; Randhawa et al., 2016), especially since the target is specific of the pathogen. Phenylpyrroles could constitute the next generation of clinical antifungals, but for this sector, we are not

aware of any compound in clinical testing, although pyrrolnitrin served as lead structure for pharmaceutical research (e.g., Umio et al., 1969). The absence of clearly characterized molecular interaction between phenylpyrroles and class III HHKs may explain the absence of clinical analogs of phenylpyrroles or other inhibitors of these proteins. Inhibition studies of known protein kinases may help the identification of new antifungal molecules [e.g., in the model fungus *N. crassa* (Pillonel, 2005), the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis* (Tueckmantel et al., 2011; Grutter et al., 2012), the human pathogenic fungi *C. neoformans* and *C. albicans* (Tsuda et al., 2011; Lee et al., 2015)], but phenylpyrrole-analogs do not figure among the tested molecules.

From a fundamental point of view, the activation of the osmotic ST pathway by phenylpyrroles also raises questions. Do

phenylpyrroles share the same ST elements as an hyperosmolarity treatment? If they bind to the class III HHK, what are the interacting domains? Do they differ from those recognizing hyperosmolarity (or dicarboximides)? Is resistance to fludioxonil conferred to by HHK loss-of-function mutations only, or are some of the mutations dominant active forms? These last questions require a thorough analysis of the ST processes after perception of phenylpyrroles, which may ultimately help understanding their mode of action.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

JK and SF designed the plan of the manuscript. JK wrote sections 1–4, SF wrote sections 5 and 6 and completed the review.

## REFERENCES

- Airola, M. V., Sukomon, N., Samanta, D., Borbat, P. P., Freed, J. H., Watts, K. J., et al. (2013). HAMP domain conformers that propagate opposite signals in bacterial chemoreceptors. *PLoS Biol.* 11:e1001479. doi: 10.1371/journal.pbio.1001479
- Airola, M. V., Watts, K. J., Bilwes, A. M., and Crane, B. R. (2010). Structure of concatenated HAMP domains provides a mechanism for signal transduction. *Structure* 18, 436–448. doi: 10.1016/j.str.2010.01.013
- Ajouz, S., Bardin, M., Nicot, P. C., and El Maataoui, M. (2011). Comparison of the development in planta of a pyrrolnitrin-resistant mutant of *Botrytis cinerea* and its sensitive wild-type parent isolate. *Eur. J. Plant Pathol.* 129, 31–42. doi: 10.1007/s10658-010-9638-5
- Ajouz, S., Nicot, P. C., and Bardin, M. (2010). Adaptation to pyrrolnitrin in *Botrytis cinerea* and cost of resistance. *Plant Pathol.* 59, 556–566. doi: 10.1111/j.1365-3059.2009.02230.x
- Alberoni, G., Collina, M., Lanen, C., Leroux, P., and Brunelli, A. (2010). Field strains of *Stemphylium vesicarium* with a resistance to dicarboximide fungicides correlated with changes in a two-component histidine kinase. *Eur. J. Plant Pathol.* 128, 171–184. doi: 10.1007/s10658-010-9642-9
- Aravind, L., and Ponting, C. P. (1999). The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 176, 111–116. doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13650.x
- Arima, K., Imanaka, H., Kousaka, M., Fukuda, A., and Tamura, G. (1965). Studies on pyrrolnitrin, a new antibiotic. I. Isolation and properties of pyrrolnitrin. *J. Antibiot. (Tokyo)* 18, 201–204.
- Avenot, H., Simoneau, P., Iacomi-Vasilescu, B., and Bataille-Simoneau, N. (2005). Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene AbNIK1 from *Alternaria brassicicola* that confer high dicarboximide and phenylpyrrole resistance. *Curr. Genet.* 47, 234–243. doi: 10.1007/s00294-005-0568-2
- Avenot, H. F., and Michailides, T. J. (2015). Detection of isolates of *Alternaria alternata* with multiple-resistance to fludioxonil, cyprodinil, boscalid and pyraclostrobin in California pistachio orchards. *Crop Prot.* 78, 214–221. doi: 10.1016/j.cropro.2015.09.012
- Bahn, Y.-S. (2008). Master and commander in fungal pathogens: the two-component system and the HOG signaling pathway. *Eukaryot. Cell* 7, 2017–2036. doi: 10.1128/ec.00323-08
- Bahn, Y. S., Kojima, K., Cox, G. M., and Heitman, J. (2005). Specialization of the HOG pathway and its impact on differentiation and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Biol. Cell* 16, 2285–2300. doi: 10.1091/mbc.E04-11-0987
- Bahn, Y. S., Kojima, K., Cox, G. M., and Heitman, J. (2006). A unique fungal two-component system regulates stress responses, drug sensitivity, sexual development, and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Biol. Cell* 17, 3122–3135. doi: 10.1091/mbc.E06-02-0113
- Brigati, S., Gregori, R., Bianchi, P., and Serrati, L. (2009). “Fludioxonil: a new active substance for kiwifruit protection against post-harvest rots,” in *Proceedings of the IX Convegno Nazionale dell’Actinidia, Viterbo-Latina, Italia, 6–8 Ottobre* (Firenze: Società di Ortoflorofruitticoltura Italiana), 285–289.
- Catlett, N. L., Yoder, O. C., and Turgeon, B. G. (2003). Whole-genome analysis of two-component signal transduction genes in fungal pathogens. *Eukaryot. Cell* 2, 1151–1161. doi: 10.1128/EC.2.6.1151-1161.2003
- Chapeland-Leclerc, F., Paccalot, P., Ruprich-Robert, G., Rebutout, D., Chastin, C., and Papon, N. (2007). Differential involvement of histidine kinase receptors in pseudohyphal development, stress adaptation, and drug sensitivity of the opportunistic yeast *Candida lusitanae*. *Eukaryot. Cell* 6, 1782–1794. doi: 10.1128/EC.00155-07
- Corran, A., Knauf-Beiter, G., and Zeun, R. (2008). “Fungicides acting on signal transduction,” in *Modern Crop Protection Compounds*, eds W. Krämer and U. Schirmer (Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH), 561–580.
- D’Aquino, S., Palma, A., Schirra, M., Continella, A., Tribulato, E., and La Malfa, S. (2010). Influence of film wrapping and fludioxonil application on quality of pomegranate fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 55, 121–128. doi: 10.1016/j.postharvbio.2009.08.006
- Defosse, T. A., Sharma, A., Mondal, A. K., Dugé de Bernonville, T., Latgé, J.-P., Calderone, R., et al. (2015). Hybrid histidine kinases in pathogenic fungi. *Mol. Microbiol.* 95, 914–924. doi: 10.1111/mmi.12911
- Dongo, A., Bataille-Simoneau, N., Campion, C., Guillemette, T., Hamon, B., Iacomi-Vasilescu, B., et al. (2009). The group III two-component histidine kinase of filamentous fungi is involved in the fungicidal activity of the bacterial polyketide ambruticin. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 127–134. doi: 10.1128/AEM.00993-08
- Dry, I. B., Yuan, K. H., and Hutton, D. G. (2004). Dicarboximide resistance in field isolates of *Alternaria alternata* is mediated by a mutation in a two-component histidine kinase gene. *Fungal Genet. Biol.* 41, 102–108. doi: 10.1016/j.fgb.2003.09.002
- Duan, Y., Ge, C., Liu, S., Chen, C., and Zhou, M. (2013). Effect of phenylpyrrole fungicide fludioxonil on morphological and physiological characteristics of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 106, 61–67. doi: 10.1016/j.pestbp.2013.04.004
- Duan, Y.-B., Ge, C.-Y., and Zhou, M.-G. (2014). Molecular and biochemical characterization of *Sclerotinia sclerotiorum* laboratory mutants resistant to dicarboximide and phenylpyrrole fungicides. *J. Pest Sci.* 87, 221–230. doi: 10.1007/s10340-013-0526-6
- Edmunds, B. A., and Holmes, G. J. (2009). Evaluation of alternative decay control products for control of postharvest Rhizopus soft rot of sweetpotatoes. *Plant Health Prog.* (in press). doi: 10.1094/PHP-2009-0206-01-RS
- Errampalli, D. (2004). Effect of fludioxonil on germination and growth of *Penicillium expansum* and decay in apple cvs. Empire and Gala. *Crop Prot.* 23, 811–817. doi: 10.1016/j.cropro.2003.12.010
- Faretra, F., and Pollastro, S. (1993). Isolation, characterization and genetic analysis of laboratory mutants of *Botryotinia fuckeliana* resistant to the phenylpyrrole fungicide CGA 173506. *Mycol. Res.* 97, 620–624. doi: 10.1016/s0953-7562(09)81187-8

- Fillinger, S., Ajouz, S., Nicot, P. C., Leroux, P., and Bardin, M. (2012). Functional and structural comparison of pyrrolnitrin- and iprodione-induced modifications in the class III histidine-kinase Bos1 of *Botrytis cinerea*. *PLoS ONE* 7:e42520. doi: 10.1371/journal.pone.0042520
- Fillinger, S., and Walker, A.-S. (2016). "Chemical control and resistance management of *Botrytis* diseases," in *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*, eds S. Fillinger and Y. Elad (Cham: Springer International Publishing), 189–216.
- Firoz, M. J., Xiao, X., Zhu, F. X., Fu, Y. P., Jiang, D. H., Schnabel, G., et al. (2015). Exploring mechanisms of resistance to dimethachlone in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pest Manag. Sci.* 72, 770–779. doi: 10.1002/ps.4051
- Floss, H. G., Manni, P. E., Hamill, R. L., and Mabe, J. A. (1971). Further studies on the biosynthesis of pyrrolnitrin from tryptophan by *Pseudomonas*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45, 781–787. doi: 10.1016/0006-291x(71)90485-2
- Förster, H., Driever, G. F., Thompson, D. C., and Adaskaveg, J. E. (2007). Postharvest decay management for stone fruit crops in California using the "reduced-risk" fungicides fludioxonil and fenhexamid. *Plant Dis.* 91, 209–215. doi: 10.1094/pdis-91-2-0209
- Foureau, E., Clastre, M., Montoya, E. J. O., Besseau, S., Oudin, A., Glevarec, G., et al. (2014). Subcellular localization of the histidine kinase receptors Sln1p, Nik1p and Chk1p in the yeast CTG clade species *Candida guilliermondii*. *Fungal Genet. Biol.* 65, 25–36. doi: 10.1016/j.fgb.2014.01.007
- Fujimura, M., Ochiai, N., Ichiichi, A., Usami, R., Horikoshi, K., and Yamaguchi, I. (2000). Sensitivity to phenylpyrrole fungicides and abnormal glycerol accumulation in os and cut mutant strains of *Neurospora crassa*. *J. Pestic. Sci.* 25, 31–36. doi: 10.1584/jpestics.25.31
- Fujimura, M., Ochiai, N., Oshima, M., Motoyama, T., Ichiishi, A., Usami, R., et al. (2003). Putative homologs of SSK22 MAPK kinase and PBS2 MAPK kinase of *Saccharomyces cerevisiae* encoded by os-4 and os-5 genes for osmotic sensitivity and fungicide resistance in *Neurospora crassa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 186–191. doi: 10.1271/bbb.67.186
- Furukawa, K., Randhawa, A., Kaur, H., Mondal, A. K., and Hohmann, S. (2012). Fungal fludioxonil sensitivity is diminished by a constitutively active form of the group III histidine kinase. *FEBS Lett.* 586, 2417–2422. doi: 10.1016/j.febslet.2012.05.057
- Gachango, E., Hanson, L. E., Rojas, A., Hao, J. J., and Kirk, W. W. (2012). *Fusarium* spp. causing dry rot of seed potato tubers in Michigan and their sensitivity to fungicides. *Plant Dis.* 96, 1767–1774. doi: 10.1094/pdis-11-11-0932-re
- Gehmann, K., Nyfeler, R., Leadbeater, A. J., Nevill, D. J., and Sozzi, D. (1990). "CGA 173506: a new phenylpyrrole fungicide for broad-spectrum disease control," in *Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases – 1990*, Vol. 2, (Alton: British Crop Protection Council), 399–406.
- Grutter, C., Simard, J. R., Mayer-Wrangowski, S. C., Schreier, P. H., Perez-Martin, J., Richters, A., et al. (2012). Targeting GSK3 from *Ustilago maydis*: type-II kinase inhibitors as potential antifungals. *ACS Chem. Biol.* 7, 1257–1267. doi: 10.1021/cb300128b
- Hagiwara, D., Matsubayashi, Y., Marui, J., Furukawa, K., Yamashino, T., Kanamaru, K., et al. (2007). Characterization of the NikA histidine kinase implicated in the phosphorelay signal transduction of *Aspergillus nidulans*, with special reference to fungicide responses. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 844–847. doi: 10.1271/bbb.70051
- Herivaux, A., So, Y. S., Gastebois, A., Latge, J. P., Bouchara, J. P., Bahn, Y. S., et al. (2016). Major sensing proteins in pathogenic fungi: the hybrid histidine kinase family. *PLoS Pathog.* 12:e1005683. doi: 10.1371/journal.ppat.1005683
- Hohmann, S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 300–372. doi: 10.1128/MMBR.66.2.300-372.2002
- Howell, C. R., and Stipanovic, R. D. (1979). Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology* 69, 480–482. doi: 10.1094/Phyto-69-480
- Iacomini-Vasilescu, B., Avenot, H., Bataillé-Simoneau, N., Laurent, E., Guénard, M., and Simoneau, P. (2004). In vitro fungicide sensitivity of *Alternaria* species pathogenic to crucifers and identification of *Alternaria brassicicola* field isolates highly resistant to both dicarboximides and phenylpyrroles. *Crop Prot.* 23, 481–488. doi: 10.1016/j.cropro.2003.10.003
- Iacomini-Vasilescu, B., Bataillé-Simoneau, N., Campion, C., Dongo, A., Laurent, E., Serandat, I., et al. (2008). Effect of null mutations in the AbNIK1 gene on saprophytic and parasitic fitness of *Alternaria brassicicola* isolates highly resistant to dicarboximide fungicides. *Plant Pathol.* 57, 937–947. doi: 10.1111/j.1365-3059.2008.01864.x
- Imanaka, H., Kousaka, M., Tamura, G., and Arima, K. (1965). Studies on pyrrolnitrin, a new antibiotic. 3. Structure of pyrrolnitrin. *J. Antibiot. (Tokyo)* 18, 207–210.
- Jespers, A. B. K., Davidse, L. C., and De Waard, M. A. (1994). Interference of the phenylpyrrole fungicide fenpiclonil with membranes and membrane function. *Pestic. Sci.* 40, 133–140. doi: 10.1002/ps.2780400208
- Jespers, A. B. K., Davidse, L. C., and Dewaard, M. A. (1993). Biochemical effects of the phenylpyrrole fungicide fenpiclonil in *Fusarium sulphureum* (Schlecht). *Pestic. Biochem. Physiol.* 45, 116–129. doi: 10.1006/pest.1993.1014
- Jespers, A. B. K., and De Waard, M. A. (1995). Effect of fenpiclonil on phosphorylation of glucose in *Fusarium sulphureum*. *Pestic. Sci.* 44, 167–175. doi: 10.1002/ps.2780440210
- Jespers, B. K., and De Waard, M. A. (1994). Effect of fenpiclonil on macromolecule biosynthesis in *Fusarium sulphureum*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 49, 53–62. doi: 10.1006/pest.1994.1033
- Judewicz, N. D., Glikin, G. C., and Torres, H. N. (1981). Protein kinase activities in *Neurospora crassa*. *Arch. Biochem. Biophys.* 206, 87–92. doi: 10.1016/0003-9861(81)90069-2
- Jung, K., Fried, L., Behr, S., and Heermann, R. (2012). Histidine kinases and response regulators in networks. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 118–124. doi: 10.1016/j.mib.2011.11.009
- Kanetis, L., Förster, H., and Adaskaveg, J. E. (2007). Comparative efficacy of the new postharvest fungicides azoxystrobin, fludioxonil, and pyrimethanil for managing citrus green mold. *Plant Dis.* 91, 1502–1511. doi: 10.1094/pdis-91-11-1502
- Klose, D., Voskoboinikova, N., Orban-Glass, I., Rickert, C., Engelhard, M., Klare, J. P., et al. (2014). Light-induced switching of HAMP domain conformation and dynamics revealed by time-resolved EPR spectroscopy. *FEBS Lett.* 588, 3970–3976. doi: 10.1016/j.febslet.2014.09.012
- Kojima, K., Takano, Y., Yoshimi, A., Tanaka, C., Kikuchi, T., and Okuno, T. (2004). Fungicide activity through activation of a fungal signalling pathway. *Mol. Microbiol.* 53, 1785–1796. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04244.x
- Kretschmer, M., Leroch, M., Mosbach, A., Walker, A. S., Fillinger, S., Mernke, D., et al. (2009). Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *PLoS Pathog.* 5:e1000696. doi: 10.1371/journal.ppat.1000696
- Lavin, J. L., Ramirez, L., Ussery, D. W., Pisabarro, A. G., and Oguiza, J. A. (2010). Genomic analysis of two-component signal transduction proteins in basidiomycetes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 18, 63–73. doi: 10.1159/000277654
- Leadbitter, N. J., Nyfeler, R., and Elmsheuser, H. (1994). "The phenylpyrroles: the history of their development at Ciba," in *Proceedings of a Symposium held at the University of Kent, Canterbury*, 129–134.
- Lee, W. J., Moon, J. S., Kim, S. I., Bahn, Y. S., Lee, H., Kang, T. H., et al. (2015). A phenylpropanoid glycoside as a calcineurin inhibitor isolated from *Magnolia obovata* Thunb. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 1429–1432. doi: 10.4014/jmb.1506.06031
- Leroch, M., Plesken, C., Weber, R. W., Kauff, F., Scalliet, G., and Hahn, M. (2013). Gray mold populations in german strawberry fields are resistant to multiple fungicides and dominated by a novel clade closely related to *Botrytis cinerea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 159–167. doi: 10.1128/AEM.02655-12
- Leroux, P. (1996). Recent developments in the mode of action of fungicides. *Pestic. Sci.* 47, 191–197. doi: 10.1002/(SICI)1096-9063(199606)47:2\$<191::AID-PS415\$>\$3.3.CO;2-9
- Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., et al. (2002). Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Manag. Sci.* 58, 876–888. doi: 10.1002/ps.566
- Leroux, P., Lanen, C., and Fritz, R. (1992). Similarities in the antifungal activities of fenpiclonil, iprodione and tolclofos-methyl against *Botrytis cinerea* and *Fusarium nivale*. *Pestic. Sci.* 36, 255–261. doi: 10.1002/ps.2780360312
- Lew, R. R. (2010). Turgor and net ion flux responses to activation of the osmotic MAP kinase cascade by fludioxonil in the filamentous fungus

- Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* 47, 721–726. doi: 10.1016/j.fgb.2010.05.007
- Luo, Y. Y., Yang, J. K., Zhu, M. L., Liu, C. J., Li, H. Y., Lu, Z. B., et al. (2012). The group III two-component histidine kinase ALHK1 is involved in fungicides resistance, osmosensitivity, spore production and impacts negatively pathogenicity in *Alternaria longipes*. *Curr. Microbiol.* 64, 449–456. doi: 10.1007/s00284-012-0093-8
- Ma, Q., Roy, F., Herrmann, S., Taylor, B. L., and Johnson, M. S. (2004). The Aer protein of *Escherichia coli* forms a homodimer independent of the signaling domain and flavin adenine dinucleotide binding. *J. Bacteriol.* 186, 7456–7459. doi: 10.1128/JB.186.21.7456-7459.2004
- Malandrakis, A. A., Apostolidou, Z. A., Markoglou, A., and Flouri, F. (2015). Fitness and cross-resistance of *Alternaria alternata* field isolates with specific or multiple resistance to single site inhibitors and mancozeb. *Eur. J. Plant Pathol.* 142, 489–499. doi: 10.1007/s10658-015-0628-5
- Matamouros, S., Hager, K. R., and Miller, S. I. (2015). HAMP domain rotation and tilting movements associated with signal transduction in the PhoQ sensor kinase. *MBio* 6:e00616-15. doi: 10.1128/mBio.00616-15
- Meena, N., Kaur, H., and Mondal, A. K. (2010). Interactions among HAMP domain repeats act as an osmosensing molecular switch in group III hybrid histidine kinases from fungi. *J. Biol. Chem.* 285, 12121–12132. doi: 10.1074/jbc.M109.075721
- Motoyama, T., Kadokura, K., Ohira, T., Ichiishi, A., Fujimura, M., Yamaguchi, I., et al. (2005). A two-component histidine kinase of the rice blast fungus is involved in osmotic stress response and fungicide action. *Fungal Genet. Biol.* 42, 200–212. doi: 10.1016/j.fgb.2004.11.002
- Mueller, D. S., Hartman, G. L., and Pedersen, W. L. (1999). Development of sclerotia and apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* from infected soybean seed and its control by fungicide seed treatment. *Plant Dis.* 83, 1113–1115. doi: 10.1094/pdis.1999.83.12.1113
- Nemecek, J. C., Wuthrich, M., and Klein, B. S. (2006). Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science* 312, 583–588. doi: 10.1126/science.1124105
- Ochiai, N., Fujimura, M., Motoyama, T., Ichiishi, A., Usami, R., Horikoshi, K., et al. (2001). Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene that confer fludioxonil resistance and osmotic sensitivity in the os-1 mutants of *Neurospora crassa*. *Pest. Manag. Sci.* 57, 437–442. doi: 10.1002/ps.302
- Olaya, G., Abawi, G. S., and Barnard, J. (1994). Response of *Rhizoctonia solani* and Binucleate rhizoctonia to five fungicides and control of pocket rot of table beets with foliar sprays. *Plant Dis.* 78, 1033–1037. doi: 10.1094/PD-78-1033
- Oshima, M., Banno, S., Okada, K., Takeuchi, T., Kimura, M., Ichiishi, A., et al. (2006). Survey of mutations of a histidine kinase gene BcOS1 in dicarboximide-resistant field isolates of *Botrytis cinerea*. *J. Gen. Plant Pathol.* 72, 65–73. doi: 10.1094/PHYTO-98-4-0397
- Oshima, M., Fujimura, F., Banno, S., Hashimoto, C., Motoyama, T., Ichiishi, A., et al. (2002). A point mutation in the two-component histidine kinase BcOS-1 gene confers dicarboximide resistance in field isolates of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 92, 75–80. doi: 10.1094/PHYTO.2002.92.1.75
- Palou, L., Crisosto, C. H., and Garner, D. (2007). Combination of postharvest antifungal chemical treatments and controlled atmosphere storage to control gray mold and improve storability of “Wonderful” pomegranates. *Postharvest Biol. Technol.* 43, 133–142. doi: 10.1016/j.postharvbio.2006.08.013
- Parkinson, J. S. (2010). Signaling mechanisms of HAMP domains in chemoreceptors and sensor kinases. *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 101–122. doi: 10.1146/annurev.micro.112408.134215
- Perkins, D. D., Radford, A., Newmeyer, D., and Björkman, M. (1982). Chromosomal loci of *Neurospora crassa*. *Microbiol. Rev.* 46, 426–570.
- Pillonel, C. (2005). Evaluation of phenylaminopyrimidines as antifungal protein kinase inhibitors. *Pest. Manag. Sci.* 61, 1069–1076. doi: 10.1002/ps.1080
- Pillonel, C., and Meyer, T. (1997). Effect of phenylpyrroles on glycerol accumulation and protein kinase activity of *Neurospora crassa*. *Pestic. Sci.* 49, 229–236. doi: 10.1002/(SICI)1096-9063(199703)49:3<229::AID-PS525>>3.0.CO;2-T
- Randhawa, A., Chawla, S., and Mondal, A. K. (2016). Functional dissection of HAMP domains in NIK1 ortholog from pathogenic yeast *Candida lusitanae*. *Gene* 577, 251–257. doi: 10.1016/j.gene.2015.12.002
- Ren, W., Shao, W., Han, X., Zhou, M., and Chen, C. (2016). Molecular and biochemical characterization of laboratory and field mutants of *Botrytis cinerea* resistant to fludioxonil. *Plant Dis.* 100, 1414–1423. doi: 10.1094/pdis-11-15-1290-re
- Rupp, S., Weber, R. W., Detzel, P., Rieger, D., and Hahn, M. (2016). Spread of *Botrytis cinerea* strains with multiple fungicide resistance in German horticulture. *Front. Microbiol.* 7:2075. doi: 10.3389/fmicb.2016.02075
- Schultz, J. E., Kanchan, K., and Ziegler, M. (2015). Intraprotein signal transduction by HAMP domains: a balancing act. *Int. J. Med. Microbiol.* 305, 243–251. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.12.007
- Schumacher, M. M., Enderlin, C. S., and Selitrennikoff, C. P. (1997). The osmotic-1 locus of *Neurospora crassa* encodes a putative histidine kinase similar to osmosensors of bacteria and yeast. *Curr. Microbiol.* 34, 340–347. doi: 10.1007/s002849900193
- Segmuller, N., Ellendorf, U., Tudzynski, B., and Tudzynski, P. (2007). BcSAK1, a stress-activated mitogen-activated protein kinase, is involved in vegetative differentiation and pathogenicity in *Botrytis cinerea*. *Eukaryot. Cell* 6, 211–221. doi: 10.1128/ec.00153-06
- Taguchi, H., Suzuki, H., and Kuroda, K. (2012). A system to control *Glomerella cingulata* on strawberry by using fungicides on the basis of their residual activity. *Annu. Rep. Kansai Plant Prot. Soc.* 54, 53–59. doi: 10.4165/kapps.54.53
- Tanaka, C., and Izumitsu, K. (2010). “Two-component signaling system in filamentous fungi and the mode of action of dicarboximide and phenylpyrrol fungicides,” in *Fungicides*, ed. O. Carisse (Rijeka: InTech), 523–538.
- Tsuda, K., Nishiya, N., Umeyama, T., and Uehara, Y. (2011). Identification of LY83583 as a specific inhibitor of *Candida albicans* MPS1 protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409, 418–423. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.05.010
- Tueckmantel, S., Greul, J. N., Janning, P., Brockmeyer, A., Gruetter, C., Simard, J. R., et al. (2011). Identification of *Ustilago maydis* aurora kinase as a novel antifungal target. *ACS Chem. Biol.* 6, 926–933. doi: 10.1021/cb200112y
- Twizeyimana, M., McDonald, V., Mayorquin, J. S., Wang, D. H., Na, F., Akgül, D. S., et al. (2013). Effect of fungicide application on the management of avocado branch canker (Formerly *Dothiorella* Canker) in California. *Plant Dis.* 97, 897–902. doi: 10.1094/pdis-06-12-0518-re
- Ulloa, R. M., Glikin, G. C., Tellez-Inon, M. T., Torres, H. N., and Judewicz, N. D. (1987). A novel stimulator of protein phosphorylation in *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biochem.* 77, 11–17. doi: 10.1007/BF00230146
- Umio, S., Kariyone, K., Tanaka, K., and Nakamura, H. (1969). Total synthesis of pyrrolnitrin. I. synthesis of 3-arylpyrrole derivatives by knorr's condensation. *Chem. Pharm. Bull.* 17, 559–566. doi: 10.1248/cpb.17.559
- Viaud, M., Fillingner, S., Liu, W., Polepalli, J. S., Le Pecheur, P., Kunduru, A. R., et al. (2006). A class III histidine kinase acts as a novel virulence factor in *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19, 1042–1050. doi: 10.1094/mpmi-19-1042
- Walker, A.-S., Micoud, A., Rémuson, F., Grosman, J., Gredt, M., and Leroux, P. (2013). French vineyards provide information that opens ways for effective resistance management of *Botrytis cinerea* (grey mould). *Pest. Manag. Sci.* 69, 667–678. doi: 10.1002/ps.3506
- Yoshimi, A., Kojima, K., Takano, Y., and Tanaka, C. (2005). Group III histidine kinase is a positive regulator of Hog1-type mitogen-activated protein kinase in filamentous fungi. *Eukaryot. Cell* 4, 1820–1828. doi: 10.1128/EC.4.11.1820-1828.2005
- Zhang, Y., Lamm, R., Pillonel, C., Lam, S., and Xu, J. R. (2002). Osmoregulation and fungicide resistance: the *Neurospora crassa* os-2 gene encodes a HOG1 mitogen-activated protein kinase homologue. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 532–538. doi: 10.1128/AEM.68.2.532-538.2002
- Zhao, H., Kim, Y. K., Huang, L., and Xiao, C. L. (2010). Resistance to thiabendazole and baseline sensitivity to fludioxonil and pyrimethanil in *Botrytis cinerea*

- populations from apple and pear in Washington state. *Postharvest Biol. Technol.* 56, 12–18. doi: 10.1016/j.postharvbio.2009.11.013
- Zhou, Q., Ames, P., and Parkinson, J. S. (2009). Mutational analyses of HAMP helices suggest a dynamic bundle model of input-output signalling in chemoreceptors. *Mol. Microbiol.* 73, 801–814. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06819.x
- Ziogas, B. N., Markoglou, A. N., and Spyropoulou, V. (2005). Effect of phenylpyrrole-resistance mutations on ecological fitness of *Botrytis cinerea* and their genetical basis in *Ustilago maydis*. *Eur. J. Plant Pathol.* 113, 83–100. doi: 10.1007/s10658-005-1227-7

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Kilani and Fillinger. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

### 2.3.7. Résistance

L'utilisation de fongicides entraîne inévitablement l'apparition de résistances contre ces derniers (revue par Lucas et al., 2015). La plupart des résistances sont spécifiques d'une famille ou d'un fongicide (voir paragraphes précédents). Ces résistances spécifiques passent par des modifications de cibles, de compensation ou de surexpression de cible.

Des résistances non spécifiques appelées MDR pour « Multi-Drug Resistance » peuvent apparaître suite à une augmentation des mécanismes d'efflux au sein des cellules fongiques. Cette augmentation de l'efflux est principalement causée par des mutations entraînant une élévation du niveau d'expression de transporteurs de type ABC (ATP-Binding Cassette) ou MFS (Major-Facilitator Superfamily) (revue par Morschhäuser, 2010). Chez *B. cinerea*, le développement des MDR a entraîné l'apparition de résistances faibles à élevées en fonction du fongicide employé. Trois types de MDR ont été identifiées. MDR1 présente une surexpression de transporteurs ABC codés par le gène *atrB*. Cette modification d'expression est causée par une mutation ponctuelle du facteur de transcription Mrr1 qui régule *atrB*. Dans le cas de souches MDR2, la surexpression de *mfsM2*, codant pour un transporteur de type MFS, est causé par l'insertion d'un rétrotransposon au niveau du promoteur. Les souches MDR3 sont issues de la recombinaison des deux précédentes mutations (Kretschmer et al., 2009). Cette dernière MDR cumule la résistance aux fongicides couverte par les MDR1 et MDR2 (Fillinger and Walker, 2016).

Le maintien d'une résistance au champ dépend principalement du coût de fitness lié à cette résistance. La fitness a été définie comme étant la capacité d'un individu à survivre et se reproduire dans son environnement (Orr, 2009). La fitness de *B. cinerea* est généralement évaluée par la capacité à former des conidies, leur germination, la croissance mycélienne et la capacité à infecter son hôte. Ainsi, des impacts sur la fitness ont été reportés pour différents types de résistances ; *e.g.* SDHI (Lalève et al., 2014b; Veloukas et al., 2013) ; fenhexamid (Billard et al., 2012). Alors que la résistance aux benzimidazoles ne semble pas affecter la fitness des souches, puisqu'elle est généralisée au champ (Walker et al., 2013). En ce qui concerne les phénylpyrroles, très peu de résistances spécifiques ont été identifiées en champ (Ren et al., 2016). Les souches résistantes obtenues en laboratoire présentent un coût de fitness très important (osmosensibilité) expliquant l'incapacité de celles-ci à perdurer dans l'environnement. Au vue de la durabilité de cette famille de fongicides, l'analyse et la compréhension de son mode d'action est indispensable.

### **3. Perception et adaptation à l'environnement : les voies de signalisation**

L'ensemble des organismes vivants perçoivent leur environnement *via* un système plus ou moins complexe de senseurs et de messagers, leur permettant ainsi de s'adapter en activant les réponses adéquates. Dans le cas des organismes plus complexes, les systèmes de transduction de signaux permettent également aux cellules de communiquer entre elles. Cette communication est essentielle pour la différenciation des tissus et dans le développement de ces organismes. La transmission des signaux au sein d'un même organisme peut être réalisée suivant deux types de mécanismes. L'un fait appel à des interactions protéine-protéine et des modifications post-traductionnelles. L'autre fait intervenir des molécules, appelées messagers secondaires », produites après perception du signal et ayant une fonction effectrice en régulant l'activité de protéines en aval (Krauss, 2014a).

#### **3.1. Modifications post-traductionnelles**

Pendant ou après l'étape de traduction, de nombreuses protéines peuvent subir des modifications par ajout de groupements chimiques sur des acides aminés. Ces modifications post-traductionnelles (PTM), qui peuvent être réversibles, permettent de moduler l'activité de nombreuses protéines, mais aussi de modifier leur conformation et leur localisation. Cela fait de ce processus un élément crucial de la signalisation cellulaire. Plus de 200 PTM ont été recensées (Swaney and Villén, 2016) mais les modifications les plus communes sont la phosphorylation, la glycosylation, l'acétylation, l'ubiquitination et l'oxydation d'acides aminés.

##### **3.1.1. Glycosylation**

La glycosylation est l'une des PTM les plus répandue se produisant dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Les N-glycosylations et les O-glycosylations représentent respectivement l'ajout de glycanes sur un groupement amine et un groupement hydroxyle. Ces modifications sont fortement impliquées dans le repliement des protéines mais aussi dans leur turnover (Zhang et al., 2013). Chez les champignons et notamment chez *B. cinerea*, la glycosylation est impliquée dans la sporulation, la stabilisation de la paroi et dans la pathogénicité (González et al., 2013, 2014).

##### **3.1.2. Méthylation**

La méthylation des protéines est catalysée par des méthyltransférases qui ajoutent un groupement méthyl sur des lysines ou des arginines. La méthylation des histones est impliquée dans la structure de la chromatine et ainsi dans l'expression de gènes. Moins connue, la méthylation peut également être impliquée dans la signalisation cellulaire notamment par des interconnexions avec d'autres PTM telle la phosphorylation (Biggar and Li, 2015; Paik et al., 2007).

### **3.1.3. Acétylation**

L'acétylation est une modification qui se caractérise par l'ajout d'un groupement acétyl en N-terminal (modification co-traductionnelle) ou sur les résidus lysine (modification post-traductionnelle). La modification en N-terminal est présente chez un grand nombre de protéines. L'acétylation des lysines se caractérise quant à elle, par un processus réversible impliquant une acétylation et une déacétylation respectivement catalysées par une acétyl-transférase et une déacétylase. L'acétylation a été identifiée comme impliquée dans la stabilisation de protéines, dans le métabolisme cellulaire et l'apoptose. Comme la méthylation, cette modification est également impliquée dans le remodelage de la chromatine par l'intermédiaire des histones (Spange et al., 2009; Zhang et al., 2013).

### **3.1.4. Ubiquitination**

L'ubiquitine est une petite protéine de 76 acides aminés, très conservée. La poly-ubiquitination de protéines ciblées au niveau des lysines, est un marquage entraînant leur protéolyse. Cependant l'ubiquitination est également une modification post-traductionnelle ayant une fonction non protéolytique. L'ubiquitination peut ainsi participer à la signalisation cellulaire par l'activation de protéines kinases, la régulation du trafic membranaire, la réparation de l'ADN et le remodelage de la chromatine (Chen and Sun, 2009).

### **3.1.5. Phosphorylation**

La phosphorylation est la modification post-traductionnelle la plus répandue. Comme son nom l'indique, ce mécanisme permet l'addition d'un groupement phosphate sur différentes protéines. Les résidus les plus phosphorylés sont la sérine/thréonine et la tyrosine. L'aspartate, le glutamate et l'histidine sont également des acides aminés pouvant être phosphorylés. L'ensemble des processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, l'apoptose et la communication, nécessitent un contrôle de l'état de phosphorylation. L'état de phosphorylation peut moduler le repliement, l'activité, la localisation ou la dégradation de nombreuses protéines. La régulation de cette PTM est catalysée d'une part par des protéine-kinases et d'autre part par des phosphatases (Humphrey et al., 2015; Zhang et al., 2013).

## **3.2. Messenger secondaire**

Un messenger secondaire est une molécule ou un ion de signalisation intracellulaire dont la concentration peut augmenter ou baisser suite à la reconnaissance d'un élément extracellulaire au niveau membranaire. Les principaux messagers secondaires identifiés sont : l'AMPc, l'ion  $Ca^{2+}$ , le diacylglycérol (DAG) et l'inositol-1,4,5-trisphosphate ( $IP_3$ ) (**Figure I - 9**). La régulation de ces messagers secondaires sera décrite dans les paragraphes suivants.

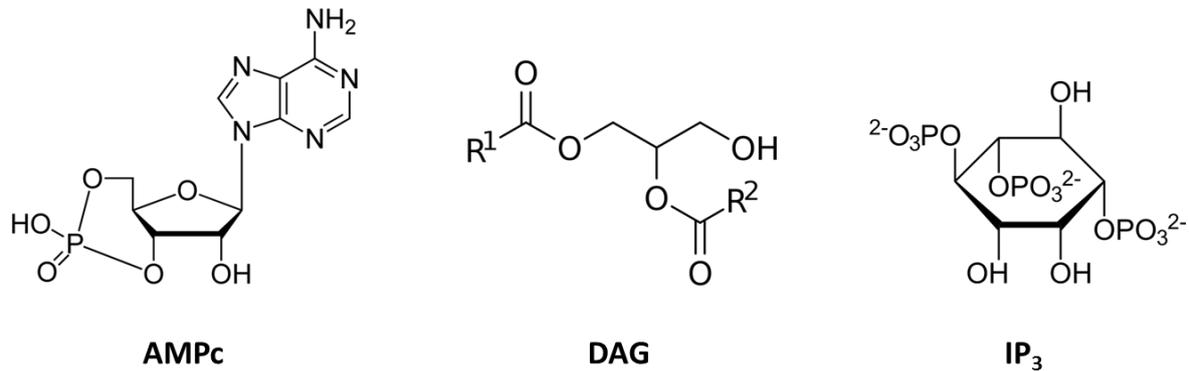


Figure I - 9 : Structures chimiques de l'AMPc, du DAG et de l'IP<sub>3</sub>. Dans le cas du DAG, R1 et R2 représentent des chaînes d'acides gras.

### 3.3. Les voies « Mitogen-Activated Protein Kinase » (MAPK)

Les MAPKs sont des protéine-kinases conservées chez les eucaryotes et impliquées dans la transduction de signaux. Ces voies MAPKs sont composées de trois protéine-kinases connectées qui transmettent un signal par des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation. Ces cascades de kinases sont composées d'une MAPK kinase kinase (MAPKKK) qui, une fois activée, va phosphoryler la MAPK kinase (MAPKK) sur deux résidus serine et/ou thréonine entraînant ainsi son activation. La MAPKK ainsi activée va alors phosphoryler les résidus thréonine et tyrosine de la MAPK au sein d'un motif -TXY- conservé. Cette MAPK activée va ainsi agir comme une protéine effectrice en régulant de nombreux processus cellulaires, notamment par l'activation de facteurs de transcription. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, cinq voies MAPKs ont été décrites : Fus3, Kss1, Slt2, Hog1, Smk1. Les MAPK Fus3 et Kss1, fonctionnellement redondantes, sont impliquées dans la reproduction sexuée et asexuée. Slt2 régule le cycle cellulaire et l'intégrité pariétale, tandis que Hog1 régule la réponse au stress osmotique et oxydatif. La MAPK Smk1, moins étudiée, est impliquée dans l'assemblage de la paroi des ascospores (Chen and Thorner, 2007). A l'exception de Smk1, des homologues de ces MAPK sont retrouvés chez les champignons filamenteux (Hamel et al., 2012). Ainsi, chez *B. cinerea* les MAPK Bmp1, Bmp3 et Sak1 sont respectivement les homologues de Fus3/Kss1, Slt2 et Hog1 (**Figure I - 10**).

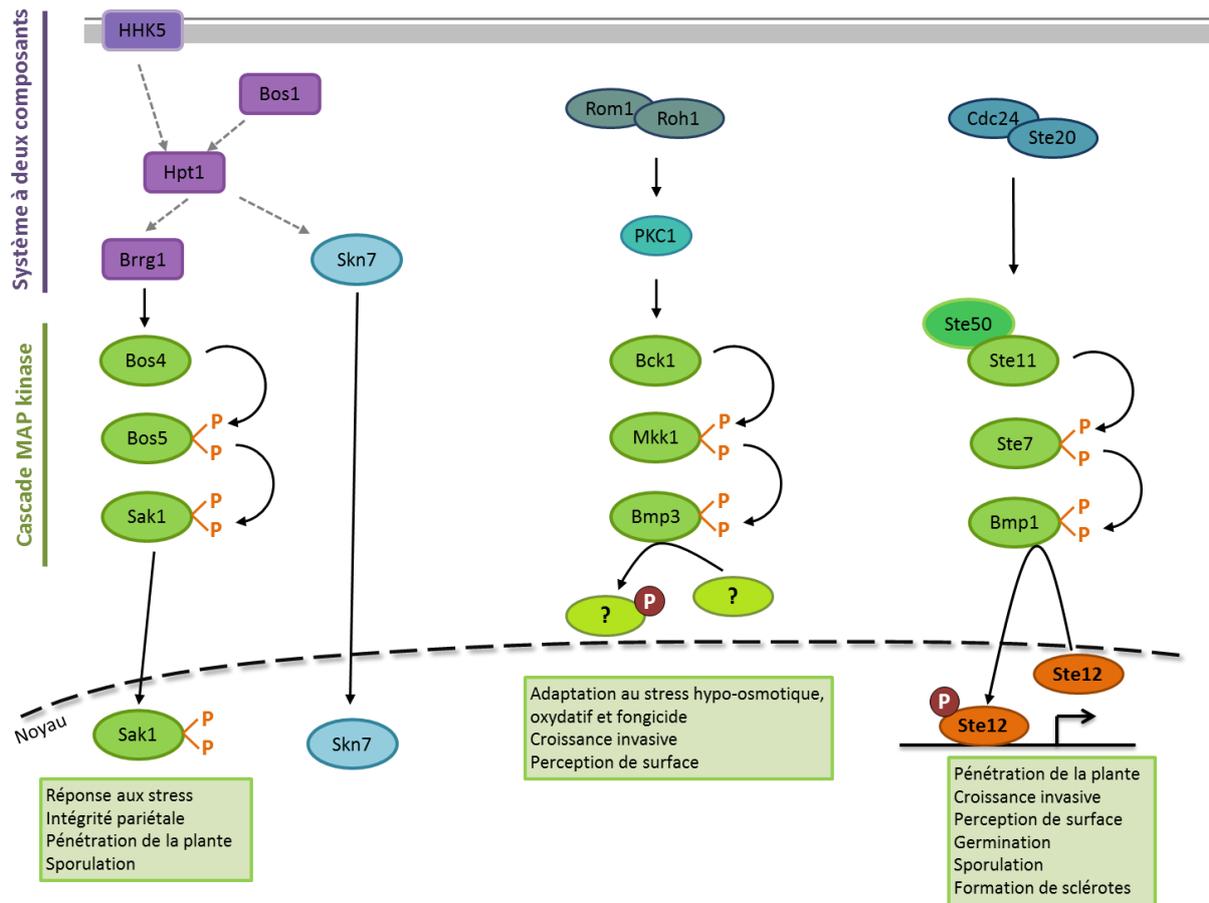


Figure I - 10 : Voies de signalisations MAP kinases chez *B. cinerea*.

### 3.3.1. Voie BMP1

Chez *B. cinerea*, la MAPK BMP1 intervient dans la croissance végétative, la perception de surface hydrophobe, le pouvoir pathogène et la formation de spores et de sclérotés (Schamber et al., 2010; Zheng et al., 2000). BMP1 est régulée en amont par la MAPKKK Ste11 associée à l'adaptateur Ste50 puis par la MAPKK Ste7. Cette cascade de signalisation régule l'activation du facteur de transcription Ste12 (**Figure I - 10**). Ce dernier régule l'expression du gène *bcgas2* qui est impliqué dans la formation d'appressorium. Toutefois, l'ensemble des gènes régulés par ce dernier n'ont pas encore été totalement identifiés.

### 3.3.2. Voie BMP3

Le gène codant pour la MAPK Bmp3 est impliquée dans l'adaptation au stress hypoosmotique, au fludioxonil, ainsi que dans l'adaptation au stress oxydatif. A l'instar de la voie BMP1, la MAPK BMP3 est également impliquée dans perception de surfaces. L'activation de cette voie de signalisation pourrait être contrôlée par la protéine kinase PKC, toutefois les récepteurs en

amont de cette cascade restent inconnus (Rui and Hahn, 2007) (**Figure I - 10**). De plus, les protéines cibles activées par la MAPK Bmp3 sont également inconnues.

### 3.3.3. Voie Sak1

Cette cascade de signalisation est composée de la MAPKKK Bos4, de la MAPKK Bos5 et de la MAPK Sak1 (**Figure I - 10**). Elle régule le développement du champignon tel la croissance et la formation de macroconidies. Chez le mutant  $\Delta sak1$ , la formation de macroconidiophore et, par conséquent de macroconidies, est abolie. Toutefois le mutant n'est pas impacté dans la formation de sclérotites, indiquant que leur formation n'est pas contrôlée par Sak1. Bien que souvent nommée « voie osmorégulatrice », cette voie permet également l'adaptation à différents stress comme les stress osmotiques (ionique), les stress oxydatifs et les stress pariétaux. Sak1 est également impliqué dans le pouvoir pathogène. En effet, le mutant  $\Delta sak1$  présente une incapacité à former des structures infectieuses le rendant ainsi incapable de pénétrer son hôte sauf si ce dernier est blessé (Segmüller et al., 2007). En fonction du signal, la localisation cellulaire de Sak1 varie et sa fonction probablement aussi. Ainsi, en présence d'un stress osmotique Sak1 est transloqué dans le noyau tandis que, lorsque *B. cinerea* subi un stress oxydatif, la MAPK reste cytosolique (Heller et al., 2012). Toutefois les mécanismes sous-jacents qui permettent de distinguer les différents signaux sont encore inconnus à ce jour. Par la suite, Sak1 cible des facteurs de transcription tels que BcReg1 et BcAtf1. BcReg1 est impliqué dans la production de métabolites secondaires, la sporulation et la colonisation. BcAtf1 est également impliqué dans la sporulation mais ce facteur de transcription régule également les gènes impliqués dans la réponse aux stress. Notons qu'il existe également des interconnexions entre des voies de signalisation. Ainsi chez *B. cinerea*, une communication entre les voie Sak1 et BMP3 a été décrite (Liu et al., 2011). Chez le mutant  $\Delta sak1$  en présence d'un stress oxydatif, il y a une augmentation du niveau de phosphorylation de BMP3. Cela indique un contrôle de l'état de phosphorylation de BMP3 par Sak1 lors d'un stress oxydatif ou alors une redondance fonctionnelle (augmentation de la phosphorylation de BMP3 afin de compenser l'absence de Sak1).



### 3.3.4. Contrôle de la voie osmoréglatrice par un système à deux composants

En amont de la voie osmoréglatrice, la perception et la transmission des signaux passent par un réseau de protéines de signalisation appelé système à deux composants. Ce dernier est composé d'un senseur (histidine kinase), d'un phosphotransfert et d'un régulateur réponse. Chez les champignons, l'histidine kinase senseur est une protéine hybride (HHK) qui possède à la fois un domaine senseur et un domaine régulateur réponse (RR) (Hérivaux et al., 2016). Ainsi, suite à la perception d'un signal, l'histidine kinase catalyse son autophosphorylation sur le résidu histidine conservé transférant ensuite le phosphate à un résidu aspartate du domaine régulateur réponse. Le signal est par la suite transmis *via* une protéine phosphotransfert (HPT) à une protéine RR (Hérivaux et al., 2016; Kilani and Fillinger, 2016). Chez *B. cinerea*, il existe 20 histidines kinases (Catlett et al., 2003; Defosse et al., 2015) dont deux en amont de la voie Sak1 : Bos1 et HHK5. L'histidine kinase de classe VI, HHK5, est l'homologue de Sln1 chez *S. cerevisiae*. Indispensable chez la levure en raison de son rôle dans la régulation de la réponse aux stress, cette histidine kinase n'est pas nécessaire chez *B. cinerea* (Li et al., 2002; Schumacher, 2016). Chez les ascomycètes les histidines kinases de classe VI sont les seuls à posséder un domaine transmembranaire. Chez *B. cinerea*, l'HHK de classe III Bos1 joue un rôle essentiel dans l'adaptation au stress osmotique neutre et ionique, pariétal et au peroxyde d'hydrogène (Liu et al., 2008; Viaud et al., 2006). Bien qu'il n'ait pas été prouvé que Bos1 soit la cible du fludioxonil, cette histidine kinase est essentielle à sensibilité au fludioxonil. De façon générale la délétion des histidines kinases de classe III entraîne une résistance aux phénylpyrroles et aux dicarboximides (Avenot et al., 2005; Liu et al., 2008; Motoyama et al., 2005; Ochiai et al., 2001; Viaud et al., 2006). Chez le mutant  $\Delta bos1$  la phosphorylation de la MAPK Sak1 est constitutive indiquant que le système à deux composants contrôle négativement l'activation de la voie osmoréglatrice (Liu et al., 2008). Les systèmes à deux composants ont également la capacité de réguler plusieurs voies de signalisation. Ainsi, les protéines de phosphotransfert, comparables à des nœuds de communication, peuvent transmettre le signal issu de l'HHK à plusieurs régulateurs réponses. Chez *B. cinerea*, il y a deux RRs en aval du phosphotransfert Hpt1 : Brrg1 et Skn7 (**Figure I - 10**). Brrg1 module l'activation de la MAPKKK Bos4 et par conséquent le reste de la cascade. Skn7 est impliquée dans l'adaptation au stress oxydatif et osmotique en agissant en tant que facteur de transcription (Viefhues et al., 2015).

### 3.4. Voie de signalisation *via* protéines G

Les protéines G correspondent à une famille de GTPases qui ont la capacité de fixer et d'hydrolyser le GTP en GDP. Ces protéines ont des propriétés effectrices et sont impliquées dans la signalisation cellulaire à la suite d'un *stimulus*. Il existe deux catégories de protéines G, les protéines G monomériques et les protéines hétérotrimériques (Ross and Wilkie, 2000).

#### 3.4.1. Protéines G monomériques

Les « small GTPases » sont des protéines G monomériques qui ont une affinité pour le GDP et le GTP. Selon la fixation du GDP ou du GTP, la conformation de la GTPase est modifiée. La GTPase-GDP est inactive tandis que la GTPase-GTP présente une activité effectrice. Ces small GTPases vont pouvoir interagir avec d'autres protéines de signalisation, soit en étant activée par des voies de signalisation, soit en activant d'autres voies de signalisation (Krauss, 2014b). La régulation des « small GTPases » se fait d'une part par les protéines GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors) qui permettent l'échange du GDP par le GTP. A l'inverse, les « small GTPases » ont la capacité d'hydrolyser le GTP en GDP, toutefois cette activité intrinsèque est lente. Les GAPs (GTPase-Activating Proteins) permettent d'accélérer l'hydrolyse du GTP en GDP (**Figure I - 12**). Les small GTPases appartiennent à la superfamille des protéines Ras, qui se divise en 5 catégories : les Ras-GTPases, les Rho-GTPases, les Rab-GTPases, les Ran-GTPases et les Arf-GTPases. Chacune de ces catégories possède des fonctions conservées. Les Ras sont impliquées dans la prolifération cellulaire, les Rho dans l'organisation du cytosquelette, les Rab dans le trafic membranaire, les Ran dans le transport nucléaire et les Arf dans le transport vésiculaire (Wennerberg et al., 2005). Chez *B. cinerea*, les Ras-GTPases BcRas1 et BcRas2 ont été caractérisées. BcRas1 est impliqué dans le développement des hyphes, des sclérotes et dans le pouvoir pathogène (Dub et al., 2013), tandis que BcRas2 est impliqué dans la germination, la croissance et intervient dans la production d'AMPc (Schumacher et al., 2008a). Dans la catégorie des Rho-GTPases, BcCDC42 est impliquée dans la production de sclérotes, la formation des macroconidies et la croissance (Kokkelink et al., 2011). Le mutant  $\Delta bcrac$  présente des phénotypes semblables au mutant  $\Delta ras1$ , indiquant des fonctions communes entre les deux GTPases.

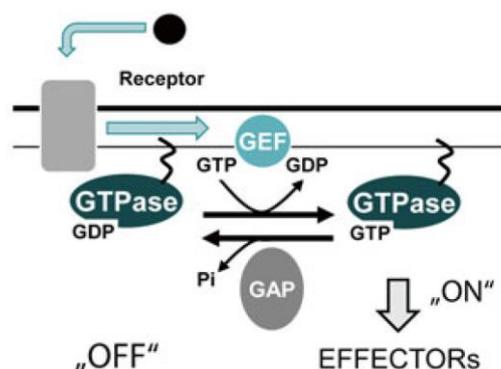


Figure I - 12 : Régulation des protéines G monomérique (Schumacher, 2016).

### 3.4.2. Complexe G hétérotrimérique et régulation par l'AMPC

Chez les organismes eucaryotes, la transmission de signaux externes de type nutritionnel, hormonal, lumineux, etc., passe par une autre voie de signalisation dépendante de l'échange GDP/GTP. Celle-ci implique un complexe hétérotrimérique inactif composé des sous-unités  $G\alpha$ -GDP,  $G\beta$  et  $G\gamma$ . En présence d'un signal perçu par un récepteur à 7 domaines transmembranaire (GPCR), le GDP associé à la sous unité  $G\alpha$  est remplacé par un GTP. Il y a alors dissociation de l'hétérotrimère, libérant ainsi la sous unité  $G\alpha$ -GTP et le dimère  $G\beta\gamma$ . Une fois libéré les sous unités  $G\alpha$ -GTP et  $G\beta\gamma$  ont des activités effectrices. La sous unité  $G\alpha$ -GTP va activer l'adénylate cyclase qui catalyse la formation d'AMPC (**Figure I - 13**). Chez *S. cerevisiae*, la sous unité  $G\beta\gamma$  interagit avec la composante Ste20, impliquées dans l'activation de la MAPK Fus3/Kss1 (Chen and Thorner, 2007). *B. cinerea* possède trois sous-unités  $G\alpha$  : BCG1, BCG2 et BCG3. BCG1 et BCG3 ont des fonctions redondantes impliquant la production d'AMPC (Doehlemann et al., 2006; Schumacher et al., 2008b). Le mutant  $\Delta bcg2$  ne présente au contraire aucun défaut flagrant de développement et de virulence indiquant une fonction différente des deux autres sous-unités  $G\alpha$  (Gronover et al., 2001).

Chez *B. cinerea*, les différents niveaux d'AMPC permettent la régulation de divers processus biologiques. Le contrôle de ces niveaux est réalisé d'une part positivement par l'adénylate cyclase BAC et d'autre part négativement par les phosphodiésterases PDE1 et PDE2. L'une des principales protéines régulée par l'AMPC est la Protéine Kinase A (PKA). La PKA inactive fait partie d'un hétérotétramère composée de deux sous-unités catalytiques, les PKAs et de deux sous-unités régulatrice, les PKARs. L'interaction entre l'AMPC et les PKARs permet la dissociation des sous-unités PKAs et ainsi leur activation (**Figure I - 13**). Chez *B. cinerea*, la PKA est impliquée dans la régulation du pouvoir pathogène (croissance invasive) ainsi que dans le développement sur milieu solide. Indépendamment de la PKA, l'AMPC régule entre autres la germination, la croissance mycélienne, la sporulation et la production de sclérotés (Schumacher et al., 2008a).

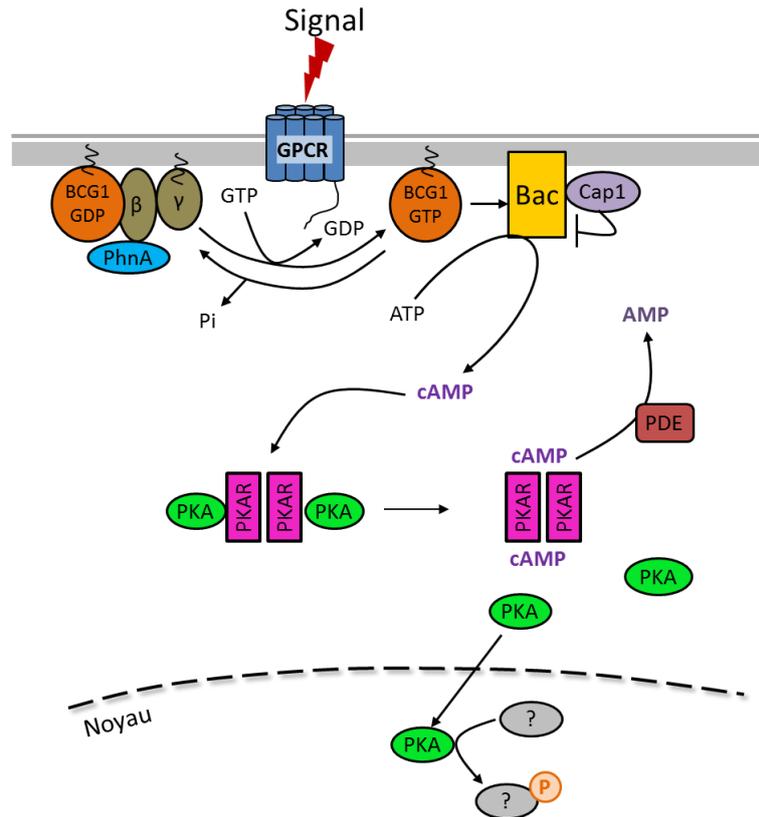


Figure I - 13 : Voie de signalisation régulée par le complexe G hétérotrimérique chez *B. cinerea*.

### 3.4.2.1. Régulation du complexe hétérotrimérique

L'activité des protéines G et notamment celle de la sous-unité  $G\alpha$ , est régulée d'une part par le GPCR (G protein coupled receptor) qui possède une activité GEF et, d'autre part, par une famille de GAP appelée « Regulators of G protein Signaling » (RGSs). Comme les GAPs décrites précédemment, les RGSs vont améliorer l'activité hydrolytique intrinsèque de la sous-unité  $G\alpha$ . Sept RGSs putatives ont été identifiées chez *B. cinerea* (Amselem et al., 2011). À l'instar des GAPs qui agissent spécifiquement sur différentes protéines Ras, les différentes RGS produites s'associent spécifiquement à une sous-unité  $G\alpha$  (Yu, 2006).

La formation de l'hétérotrimère  $G\alpha\beta\gamma$  dépend de la disponibilité des sous-unités  $G\alpha$ -GDP mais aussi du dimère  $G\beta\gamma$ . Cependant, la sous-unité  $G\beta$  nouvellement synthétisée est instable (Li et al., 2007). L'action de protéines chaperonnes est indispensable pour sa stabilisation et son repliement. Ainsi, chez l'homme, la protéine CCT (cytosolic chaperonin containing TCP-1) va se fixer au niveau de la région N-terminal de  $G\beta$ . Cette interaction se fait au niveau d'une région proche du site de fixation de la sous-unité  $G\gamma$  empêchant cette dernière de s'associer à  $G\beta$ -CCT. Intervient alors une autre co-chaperone, la phosducine, qui en s'associant à la sous-unité  $G\beta$  permet la dissociation de la protéine CCT laissant de nouveau accessible le site de fixation de la sous-unité  $G\gamma$  (Plimpton et al., 2015) (**Figure I - 14**). Chez de nombreux microorganismes eucaryotes il n'existe pas de phosducines,

toutefois des phospho-ducin-like proteins (PhLPs) ont pu être identifiées. Les différentes PhLPs sont regroupées dans trois groupes distincts : les PhLP1, 2 et 3 (Blaauw et al., 2003). Néanmoins la stabilisation de la sous-unité G $\beta$  n'est assurée que par la PhLP1.

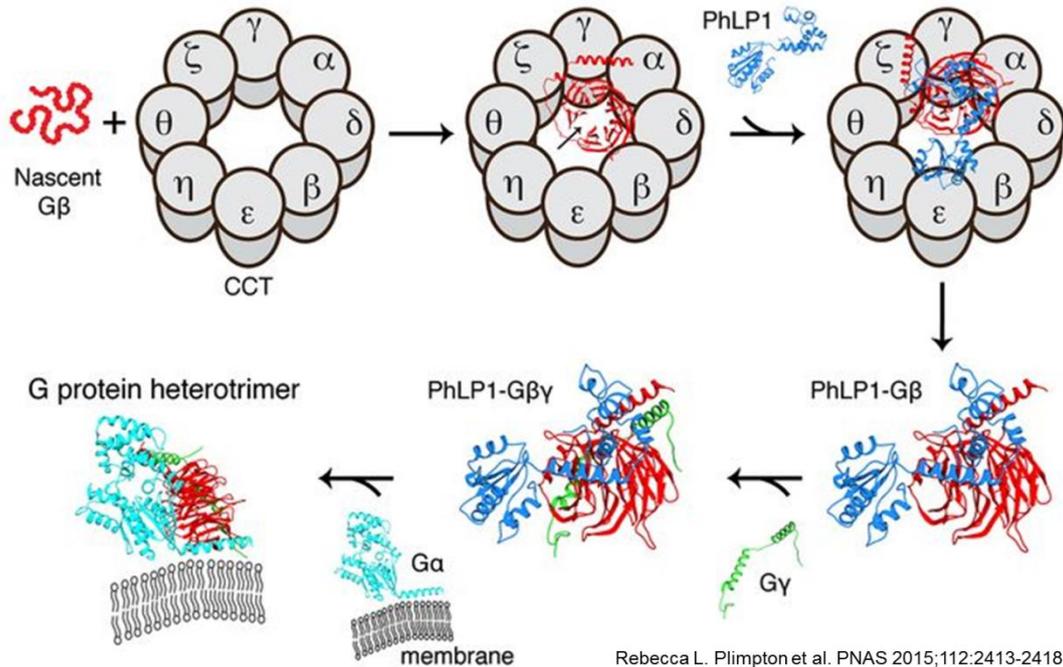


Figure I - 14 : Mécanisme d'assemblage du complexe hétérotrimérique G $\alpha\beta\gamma$  (d'après Plimpton et al., 2015).

### 3.5. Voie Calcique

La voie calcique est activée suite à une augmentation de la concentration cytosolique d'ions Ca<sup>2+</sup>, issus du milieu extracellulaire ou de compartiments intracellulaires (vacuole, golgi, réticulum endoplasmique). L'ion Ca<sup>2+</sup> agit à la fois comme un cofacteur et comme un messager secondaire. Ainsi de nombreuses enzymes telles que les protéines kinase C (PKCs) sont activées en réponse aux ions Ca<sup>2+</sup> et au diacylglycérol (DAGs), un autre messager secondaire (Huang, 1989). Le Ca<sup>2+</sup> permet également l'activation de la calmoduline (CaM). Le complexe Ca<sup>2+</sup>/CaM interagit par la suite avec de nombreuses kinases (CMKs) et avec une phosphatase, la calcineurine (**Figure I - 15**).

L'influx de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire se fait par des transporteurs de haute et faible affinité (respectivement HACS et LACS). En plus du Golgi et du réticulum endoplasmique, le Ca<sup>2+</sup> est également stocké dans les vésicules, le rendant ainsi disponible rapidement. Cette augmentation peut être provoquée par l'intermédiaire de la sous-unité G $\alpha$  active. En effet chez les mammifères, après fixation de G $\alpha$  à une phospholipase C (PLC) il y a hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP<sub>2</sub>) en inositol-1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) et DAG. L'IP<sub>3</sub> est impliqué dans l'activation de transporteur calcique permettant ainsi la libération cytosolique du Ca<sup>2+</sup>. Un mécanisme similaire a

également été démontré chez *N. crassa* (Silverman-Gavrila and Lew, 2002, 2003). Chez *B. cinerea* de nombreux gènes dépendants de  $G\alpha$  et de la voie calcique sont dérégulés chez le mutant  $\Delta plc1$  laissant à penser que ce même mécanisme s'applique également chez *B. cinerea* (Schumacher et al., 2008b). La calcineurine est un hétérodimère composé d'une sous-unité catalytique CNA et d'une sous-unité régulatrice CNB. Cet hétérodimère initialement inactif va interagir avec  $Ca^{2+}/CaM$ . Ce nouveau complexe actif va déphosphoryler les protéines cibles. La calcineurine active ainsi le facteur de transcription CRZ1 par déphosphorylation. CRZ1 régule l'expression de gènes cibles après fixation sur un élément du promoteur appelé CDRE (Calcineurin-dependent response element). Chez *B. cinerea*, le facteur de transcription BcCRZ1 est impliqué dans le développement, l'intégrité pariétale, la réponse aux stress et le pouvoir pathogène (Schumacher et al., 2008c; Thewes, 2014).

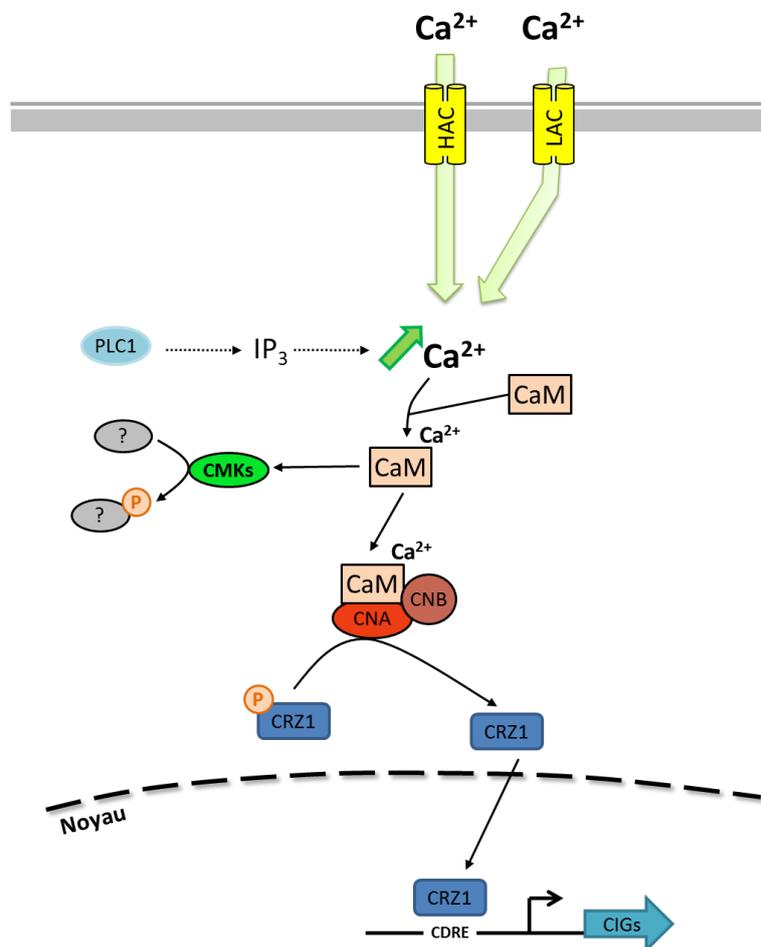


Figure I - 15 : Voie de signalisation calcique chez *B. cinerea*.

#### 4. Analyse de génomique fonctionnelle par protéomique

Afin de d'étudier la réponse de la cellule à un changement d'environnement, des techniques d'analyses comparatives globales sont employées (anciennement nommée analyses post-génomiques). Nous utilisons ici le terme de génomique fonctionnelle dont le but est d'identifier la fonction des gènes dans un processus biologique en se basant sur l'ensemble des modifications de transcrits ou de

production de protéines (James, 1997). La génomique fonctionnelle est largement dominée par les analyses transcriptomiques notamment grâce au RNA-seq apparu il y a moins de dix ans (Lowe et al., 2017). La protéomique est l'étude de l'ensemble des protéines présentes chez un organisme à un moment et une condition donnée. Comme les protéines reflètent les processus biologiques de la cellule, l'étude du protéome permet d'avoir une image « instantanée » de l'état de celle-ci. Le protéome permet d'obtenir une plus grande diversité d'information par rapport à la transcriptomique puisqu'il reflète d'une part les informations d'abondance, de turnover, de localisation, d'interaction et d'autre part les modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles. Il s'agit là d'un réel avantage par rapport à l'analyse du transcriptome. Ainsi, l'expression des gènes ne peut être corrélée à l'abondance de nombreuses protéines associées (Gygi et al., 1999). Kim et al. (2007) évoque un développement « exponentiel » des analyses protéomiques chez les champignons lesquelles sont principalement dû à l'émergence du protéome dit « shotgun ». Celui-ci a permis de s'affranchir de l'électrophorèse bidimensionnelle utilisée précédemment pour les analyses protéomiques.

#### **4.1. L'analyse protéomique : Du 2D au shotgun**

L'ensemble des techniques de protéomique nécessite l'utilisation de la spectrométrie de masse afin d'identifier les protéines. L'analyse par spectrométrie de masse nécessite tout d'abord que les molécules injectées (*e.g.* peptides) soient ionisées. Pour cela une source d'ionisation, telle l'électronébulisation (ESI : ElectroSpray Ionization), est utilisée. Les peptides ionisés sont ensuite transportés jusqu'à un analyseur qui va différencier les peptides en fonction du ratio de leur masse sur leur charge ( $m/z$ ) et va ainsi permettre l'obtention d'un spectre (nommé spectre MS) caractéristique des peptides présents (**Figure I - 16**). Différents types d'analyseurs existent. Ceux de type ToF (Time of Flight) analysent le temps de parcours d'une distance donnée par un ion accéléré préalablement par une tension. Ce ToF est directement relié au  $m/z$ . Les analyseurs de masse de type Orbitrap, mesurent la fréquence de rotation des ions autour d'une électrode. Une transformation de Fourier est utilisée afin de convertir cette fréquence en  $m/z$ . Deux autres analyseurs de masse peuvent être utilisés : les pièges à ions et les analyseurs quadripolaires. Ce deuxième est principalement utilisé dans le cadre d'une analyse en tandem (MS/MS). Dans le cas de cette analyse en tandem, deux analyseurs sont utilisés. Par exemple, dans le cas d'une analyse par un spectromètre de masse de type « Q Exactive », un analyseur quadripolaire est utilisé afin de filtrer les ions en fonction du  $m/z$  permettant ainsi de sélectionner un ion parent. Cet ion parent est ensuite envoyé dans une chambre de collision (*e.g.* cellule HCD : Higher-energy Collisional Dissociation) où il est fragmenté puis les ions fils sont transférés dans l'analyseur Orbitrap permettant ainsi d'obtenir un spectre MS/MS (Michalski et al., 2011). Selon la nature de la cellule de collision, les ions peptidiques sont fragmentés au niveau de liaisons bien précises ce qui permet d'informer sur la structure de la molécule (**Figure I - 17**). La cellule HCD forme principalement des ions b et y (Shao et al., 2014).

L'identification des protéines peut se faire par deux méthodes : celle nommée « *de novo* » est basée sur l'interprétation des spectres MS/MS et leur traduction en séquences d'acides aminés. Cette technique d'identification ne permet malheureusement pas d'obtenir des séquences complètes. L'autre méthode, appelé « mass matching », est basée sur la comparaison des profils spectraux obtenus pour chaque peptide avec le profil théorique généré à partir d'une base de données protéiques. Cette deuxième méthode a l'avantage d'identifier des mélanges protéiques complexes. Elle nécessite toutefois une base de données complète où le peptide recherché est présent. La disponibilité de génomes complet et bien annoté est donc un facteur important pour l'identification par « mass matching ».

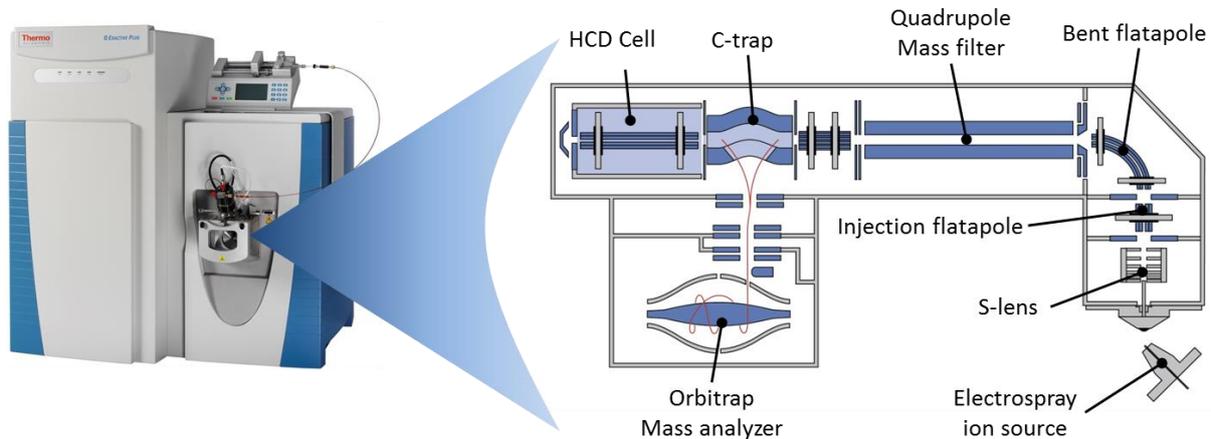


Figure I - 16 : Schéma du spectromètre de masse utilisé dans les analyses protéomique et phosphoprotéomique de cette thèse.

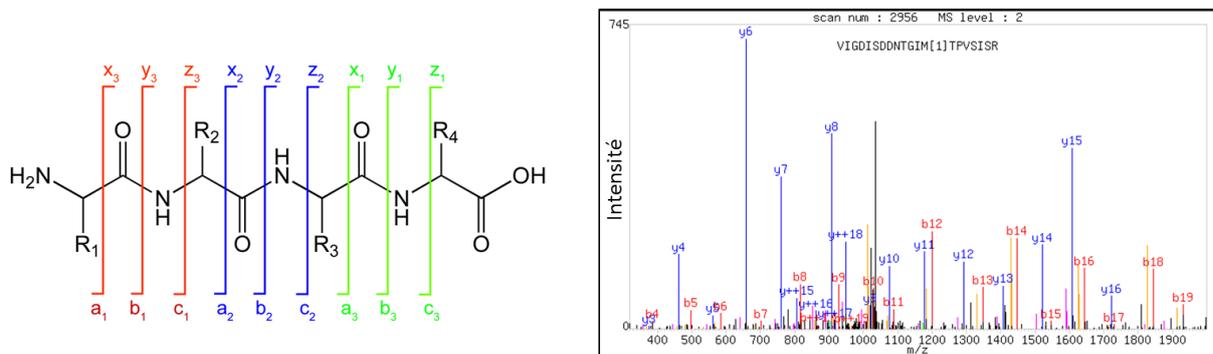


Figure I - 17 : A gauche : différents types de fragmentations des peptides après transfert de l'ion parent en cellule de collision. A droite : exemple de spectre MS/MS.

Initialement les analyses protéomiques consistaient à séparer sur gel de polyacrylamide un mélange protéique selon deux dimension (2-DE) afin de le « décomplexifier ». Le premier axe consiste en une séparation en fonction du point isoélectrique tandis qu'une séparation en fonction du poids moléculaire est réalisée sur le deuxième axe. La comparaison des profils « 2D » entre les mutants et/ou conditions de croissance révèle des protéines différemment produites. Les spots

d'intérêt sont prélevés, digérés et analysés par spectrométrie de masse. Très utilisée pendant un temps, cette technique présente un certain nombre d'inconvénients, notamment le faible niveau de sensibilité (protéines peu abondantes), les problèmes de reproductibilité (Liñeiro et al., 2016a), la difficulté d'analyse des protéines membranaires, mais surtout le temps d'analyse. En effet, chaque spot doit être analysé un par un (Zhang et al., 2013). Cependant l'analyse protéomique par 2-DE permet de mettre en évidence facilement des modifications post-traductionnelle grâce à leur disposition très distinctive (**Figure I - 18**).

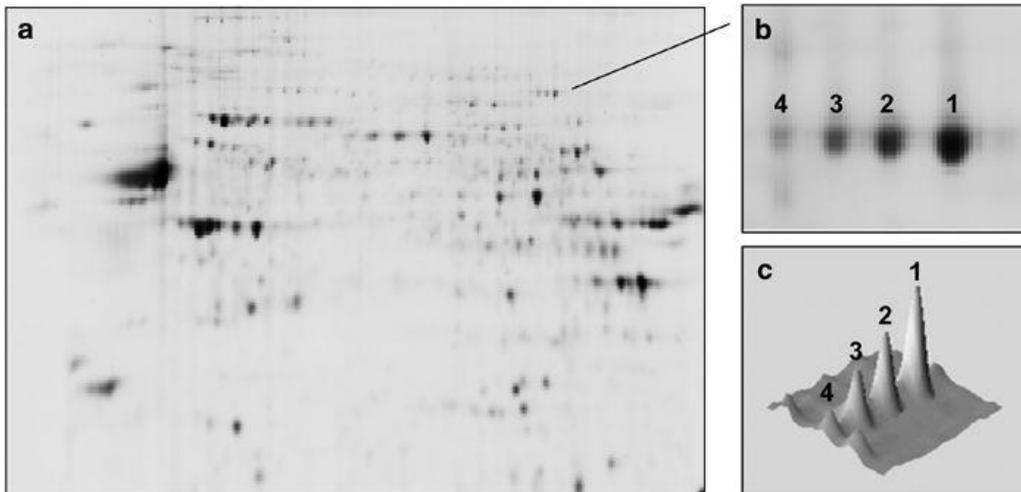


Figure I - 18 : Modification post-traductionnelle isolée à partir d'un gel d'électrophorèse à deux dimensions (Swatton et al., 2004). a/Image du gel 2D réalisé à partir de protéines du cortex préfrontal humain. b/Agrandissement du gel au niveau de quatre spots caractéristiques de PTM (phosphorylation) ou d'isoformes. c/Représentation 3D des spots correspondant à leur abondance.

L'augmentation des analyses protéomiques ces dernières années s'explique de deux façons. D'une part, comme cela a été expliqué précédemment, la disponibilité de génomes annotés pour un organisme donné est un facteur majeur pour l'identification de protéines chez ce même organisme. Ainsi, l'augmentation des analyses protéomiques, notamment chez les champignons, est concomitante au séquençage haut débit et à l'annotation des génomes. L'autre explication de cette augmentation est l'évolution des techniques permettant de se passer du gel bidimensionnel pour décomplexifier les extraits protéiques. Cette nouvelle technique de protéomique est basée sur de la spectrométrie de masse couplée à une chromatographie en phase liquide (LC-MS/MS). Appelé protéome « shotgun bottom-up », cette technique permet une meilleure profondeur d'analyse que la protéomique 2-DE (Zhang et al., 2013). Elle implique tout d'abord une étape de digestion protéolytique. Puis, ces peptides sont injectés en LC-MS/MS. La chaîne HPLC (high pressure liquid chromatography) permet de séparer les peptides en fonction de leur hydrophobicité (Fournier et al., 2007). L'identification des protéines passe par la comparaison entre les peptides identifiés et les peptides théoriques obtenus après digestion *in silico* à partir de la base de données disponible (**Figure I - 19**). Dans le cas de mélanges

peptidiques plus complexes, ce mélange peut préalablement être fractionné par chromatographie telle la chromatographie échangeuse de cation (SCX). Au cours des années, les techniques de protéomique shotgun ont évolué afin de pouvoir offrir une meilleure efficacité ainsi qu'une meilleure répétabilité par rapport à la protéomique 2-DE. De plus, l'analyse shotgun est également utilisée dans le cadre d'analyses de modifications post-traductionnelles ainsi que d'analyses quantitatives.

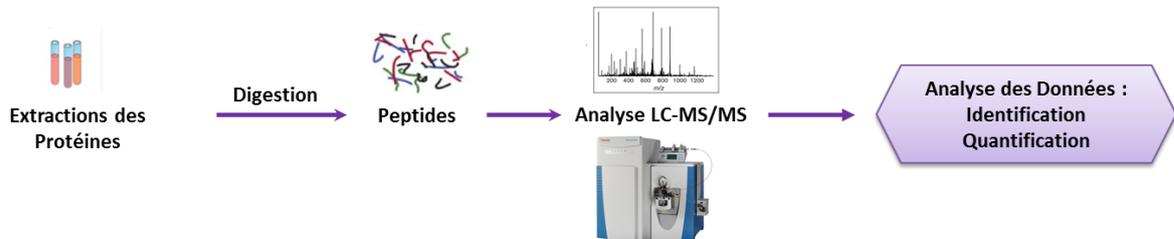


Figure I - 19 : Principales étapes de l'analyse protéomique de type shotgun.

## 4.2. Analyse des modifications post traductionnelles

Les voies de signalisation impliquent de nombreux phénomènes de modifications post-traductionnelles. L'analyse par protéomique permet d'identifier des protéines ayant subies des modifications post-traductionnelles. Cependant, les peptides ayant subis un type de modification post-traductionnelle sont sous-représentés dans un mélange peptidique complexe, les rendant ainsi difficilement détectables lors d'une analyse par shotgun. Afin de les détecter, un enrichissement est réalisé dans le but d'augmenter la proportion de peptides avec une modification précise.

### 4.2.1. Analyse de la phosphorylation par enrichissement IMAC/TiO<sub>2</sub>

Dans le cas d'une analyse phosphoprotéomique, un enrichissement en phosphopeptides est réalisé par chromatographie d'affinité. Celle-ci fait principalement appel à deux technologies différentes : l'IMAC (Immobilized metal ion affinity chromatography) ou la TiO<sub>2</sub> (**Figure I - 20**). Largement utilisée pour l'enrichissement en phosphopeptides, l'IMAC possède un ion chélateur qui peut être : Fe<sup>3+</sup>, Ga<sup>3+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Zr<sup>3+</sup>. Cet ion interagit avec les phosphopeptides, mais interagit également avec les peptides acides. Comme alternative à l'IMAC, une autre chromatographie utilisant le dioxyde de titane (ou le zirconium) a été développée. Celle-ci est décrite comme présentant une meilleure sélectivité pour les phosphopeptides (Zhang et al., 2013).

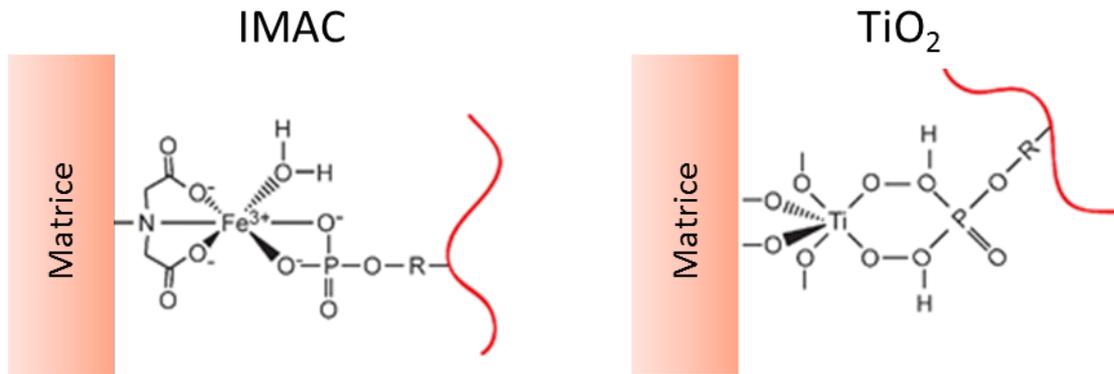


Figure I - 20 : Enrichissement en phosphopeptides par IMAC et  $\text{TiO}_2$ . Représentation schématique de l'interaction entre l'IMAC/ $\text{TiO}_2$  et le peptide phosphorylé (d'après Rogers and Foster, (2009)).

### 4.3. Analyse quantitative

L'analyse protéomique révèle d'une part des données qualitatives relatives à la présence ou absence de protéines. Toutefois cette liste de protéines identifiées est peu informative lorsque l'on souhaite comparer des mutants ou différentes conditions de culture. Pour cela une analyse quantitative est nécessaire. Cette analyse quantitative a pour vocation de répondre à de nombreuses questions biologiques. Dans le domaine de la pathologie médicale, la quantification peut être utilisée afin de réaliser le diagnostic de certaines maladies (Cifani and Kentsis, 2017).

Des analyses quantitatives ont tout d'abord été réalisées sur gel 2-DE. Toutefois, les défauts de cette technique ne permettaient pas d'obtenir des résultats de qualité. Très rapidement le protéome dit « shotgun » s'est présenté comme la technique adaptée à la quantification.

La quantification des peptides (et donc des protéines) par spectrométrie de masse peut se faire selon trois méthodes différentes : le « spectral counting », le « peak counting » et le XIC. Le « spectral counting » se base sur le nombre de spectres MS/MS par peptide et sur le nombre de peptides par protéine. Ainsi plus l'ion précurseur d'un peptide est isolé et fragmenté, plus ce peptide est considéré comme abondant. Par contre cette méthode semi-quantitative ne prend pas en compte les peptides partagés. De plus elle est faiblement résolutive (Mueller et al., 2008; Zhang et al., 2013). Le « peak counting » repose sur le nombre de fois où un pic MS a été détecté à un temps de rétention donné. Cette méthode est toutefois moins dynamique que le « spectral counting ». Le XIC (eXtracted Ion Chromatograms) est une méthode quantitative qui repose sur le calcul de l'aire sous la courbe des pics MS afin de mesurer l'abondance d'ions à un temps de rétention donné. Cette technique permet notamment une mesure précise de l'intensité et donc de l'abondance. Toutefois dans le cadre d'une analyse comparative, cette technique ne permet pas de détecter les variations de protéines de type présence/absence.

En fonction des analyses réalisées, la quantification par spectrométrie de masse peut être réalisée soit en « label free », soit en marquage isotopique. L'analyse quantitative « label free » est

utilisée pour la quantification d'échantillons de façon individuelle. Il est toutefois nécessaire d'aligner les temps de rétention (temps que met un composé pour traverser la colonne après injection) entre chaque injection dans le cas de quantification par XIC. Le marquage isotopique est quant à lui utilisé pour la quantification de plusieurs échantillons par multiplexage (*e.g.* échantillon non traité/échantillon traité). Cela permet, en effet, de faire passer plusieurs échantillons dans un même « run » de LC-MS. Ainsi en MS, les mêmes peptides, l'un marqué et l'autre non, sont détectés avec un décalage de masse sur charge bien défini (**Figure I - 21**).

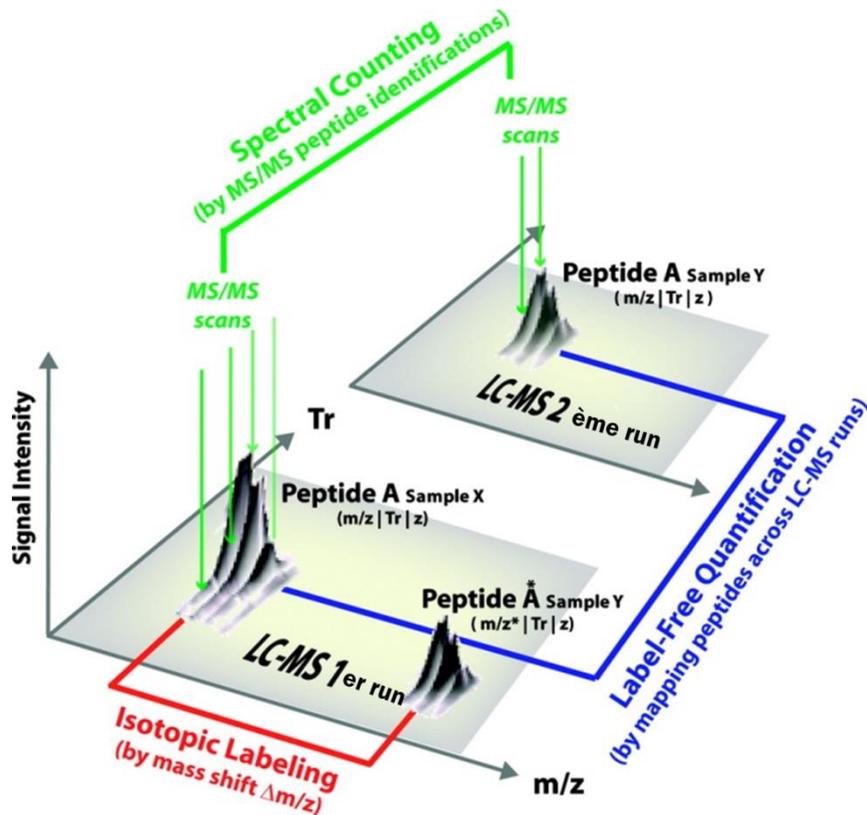


Figure I - 21 : Schéma de synthèse de l'approche quantitative (Mueller et al., 2008).

## 5. Objectif de thèse

Comme l'ensemble des êtres vivants, *B. cinerea* perçoit son environnement et s'y adapte. Les mécanismes sous-jacents à cette adaptation peuvent être très complexes. Ainsi, de nombreuses inconnues persistent dans la réponse au stress chez *B. cinerea*. Notamment l'existence d'interconnexion entre plusieurs voies de signalisation et les processus biologiques régulés par ces dernières.

L'objectif de ma thèse est de décrypter les voies de signalisation en réponse au stress et plus particulièrement au fludioxonil. Pour cela une approche globale de protéomique et phosphoprotéomique comparative a été utilisée.

La voie osmorégulatrice possède un rôle majeur dans l'adaptation au stress et dans le pouvoir pathogène de *B. cinerea*, ce qui peut être expliqué par la régulation d'un grand nombre de processus biologiques. Afin d'étudier l'ensemble des processus régulés par cette voie, nous avons réalisé une analyse protéomique comparative intégrant les mutants de signalisation  $\Delta bos1$  et  $\Delta sak1$ . Cette analyse est décrite dans le **chapitre II**.

Comme le fludioxonil agit sur la voie osmorégulatrice, nous avons entrepris une analyse de phosphoprotéomique comparative afin d'étudier la transmission du signal lié à ce stress fongicide et les processus cellulaires susceptibles d'être modulés par ce dernier (**chapitre III**).

Lors des analyses phosphoprotéomiques, une protéine de type phosphoducine a été identifiée différemment phosphorylée. Le **chapitre IV** décrit l'analyse fonctionnelle du gène *phnA* codant cette phosphoducine-like afin d'identifier le rôle de cette protéine dans la réponse au stress, ainsi que le rôle du site de phosphorylation dans la fonction de la protéine.

En collaboration avec deux chercheurs de l'université de Münster, qui étudient la perception de la lumière chez *B. cinerea*, nous avons également étudié l'activation de la voie osmorégulatrice en réponse au signal lumineux (**annexe chapitre IV**).

Chapitre II: Décryptage de la voie osmorégulatrice chez *B. cinerea* par protéomique comparative



## Introduction

La perception des signaux environnementaux et leur transmission au noyau passent par de nombreuses voies de signalisation très conservées chez les champignons. Comme décrit de façon plus détaillée dans le chapitre introductif, la perception de différents stress ainsi que du fludioxonil passe par la voie osmorégulatrice contrôlée en amont par l'histidine kinase Bos1 et par l'élément final, la MAPK Sak1. L'analyse fonctionnelle des deux gènes, chez *B. cinerea*, a révélé l'implication des deux protéines dans des régulations communes telles la sporulation, la pathogénicité, la sensibilité au stress oxydatif par le peroxyde d'hydrogène, la sensibilité au stress osmotique ionique. Toutefois ils sont également impliqués dans des régulations distinctes. Bos1 est impliqué dans la sensibilité aux fongicides de type phénylpyrroles, dicarboximides et hydrocarbures aromatiques, mais aussi dans la réponse au stress oxydatif par des ions superoxyde et au stress osmotique neutre. A l'opposé, Sak1 régule la formation de structures infectieuses (Liu et al., 2008, 2011; Segmüller et al., 2007; Viaud et al., 2006). Sak1 est essentielle à la synthèse de glycérol alors que Bos1 régule cette voie métabolique en réponse au stress. Il est évident que la voie osmorégulatrice dont font partie Bos1 et Sak1 n'est pas seulement linéaire, mais qu'il existe d'autres protéines impliquées, notamment le régulateur réponse Skn7, pour expliquer le phénotype de résistance au fludioxonil de Bos1 indépendamment de Sak1 ou alors les différences de sensibilité au stress oxydatif (Viefhues et al., 2015; Yang et al., 2015).

Heller et al. (2012) ont réalisé une analyse transcriptomique par macroarray du mutant  $\Delta sak1$  comparé au sauvage, soumis à un stress oxydatif et en conditions d'infection. Cette analyse a montré que Sak1 est un élément central dans la réponse globale aux stress et dans le processus infectieux. La comparaison des profils transcriptomiques de la souche  $\Delta sak1$  à la souche sauvage a mis en évidence 75 gènes régulés négativement par Sak1 et 50 régulés positivement. La majorité des gènes différentiellement régulés sont impliqués dans la régulation et la différenciation, ainsi que dans le métabolisme. 20% des gènes régulés négativement sont impliqués dans la réponse aux stress. Ce résultat montre l'intérêt des approches systématiques dans la compréhension des processus biologiques contrôlés par des voies de signalisation. Leur décryptage est essentiel afin de comprendre les mécanismes de réponse aux stress, dans notre cas au fludioxonil.

Un autre niveau dans l'analyse systématique est le niveau protéique. L'analyse de l'accumulation des protéines intra-cellulaire tient compte de l'ensemble des régulations lors de la synthèse et la dégradation (turn-over) ainsi que de la sécrétion des protéines. Afin de répondre à cette problématique, nous avons réalisé une analyse protéomique comparative des mutants  $\Delta sak1$ ,  $\Delta bos1$  par rapport à la souche sauvage. Les analyses protéomiques chez les champignons, bien qu'encore minoritaires, sont en progression, lié notamment à l'amélioration des techniques d'analyse par des approches à haut débit dites « shotgun » (voir introduction générale) et de l'explosion des données génomiques fongiques (Sharma, 2016).

L'étude comparative du protéome nous permettra, i/ de vérifier si les variations d'expression observées chez  $\Delta sak1$  modifient le contenu en protéines ; ii/ de relier les régulations de Bos1 à celles de Sak1 ; iii/ d'étudier la réponse au fludioxonil au niveau de l'abondance des protéines en amont d'une analyse phosphoprotéomique.

i/ L'analyse transcriptomique réalisée par macroarray entre la souche sauvage et le mutant  $\Delta sak1$  a été réalisé sur un total de 4948 gènes (dont certains appartenant à des plantes). L'étude du protéome permet de comparer la régulation qu'exerce Sak1 sur les gènes avec l'abondance des protéines d'intérêt identifiés.

ii/ Dans le cadre de cette thèse, nous avons cherché à identifier les différentes composantes de signalisation liées à la perception du stress fludioxonil et à décrypter les interconnexions entre la voie osmorégulatrice avec les autres voies de signalisation. Le but de l'analyse protéomique est également d'identifier des fonctions biologiques qui ne sont pas co-régulées par Bos1 et Sak1 mais par chaque partenaire indépendamment.

iii/ L'analyse protéomique a été réalisée en complément d'une analyse phosphoprotéomique. Cette dernière a été réalisée afin de tracer la transmission du signal fludioxonil par (dé)phosphorylation des protéines et d'identifier les composants de réponse à ce fongicide. Pour évaluer le niveau de phosphorylation, il est nécessaire de normaliser les données du phosphoprotéome par l'abondance des protéines (voir chapitre suivant).

## Matériel et Méthodes

### Souches, milieu et conditions de culture

Dans cette étude, nous avons utilisé la souche modèle de *B. cinerea*, B05.10 (Büttner et al., 1994), ainsi que les mutants  $\Delta bos1$  et  $\Delta sak1$ , obtenus à partir de cette même souche (Liu et al., 2008; Segmüller et al., 2007). Le milieu de culture utilisé est le milieu SISLER :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,5 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g/L, glucose 10 g/L, extrait de levure 2 g/L, agar 15 g/L. Des précultures ont été réalisées à partir d'explants calibrés (5 mm) déposés sur milieu SISLER solide préalablement recouvert d'une membrane de cellophane stérile (Bio-Rad, Etats-Unis). Les cultures ont été maintenues 4 jours en chambre climatique à 20°C, à l'obscurité et à une hygrométrie de 70%. Le mycélium a été récupéré puis broyé pendant 1 minute, dans 100 mL de milieu SISLER liquide, à l'aide d'un Ultra Turax. 500  $\mu\text{L}$  de ce broyat ont été étalés sur milieu SISLER solide recouvert de cellophane. Les cultures ont été incubées à l'obscurité à 20°C pendant 2 jours. Après ces 2 jours, la membrane de cellophane a été prélevée et déposée délicatement sur une boîte de milieu SISLER solide, supplémenté ou non de fludioxonil à 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Après 15 min d'incubation, les échantillons ont été prélevés et congelés dans l'azote liquide puis lyophilisés. Quatre réplicats ont été réalisés pour chaque souche et chaque traitement.

### Extraction des protéines totales

Les protéines totales ont été obtenues par extraction dite au TCA (Trichloroacetic acid). Pour cela, le mycélium lyophilisé a été broyé dans l'azote liquide. Les protéines ont ensuite été précipitées à l'aide d'une solution de précipitation (10% de TCA et 0,07% de  $\beta$ -mercaptoéthanol, dans l'acétone). Après agitation au vortex et centrifugation à 9838 g à 4°C, le culot a été rincé à trois reprises dans l'acétone additionnée de 0,07% de  $\beta$ -mercaptoéthanol afin d'éliminer le TCA. Après séchage, le culot a été pesé, puis les protéines ont été re-solubilisées à raison de 50  $\mu\text{L}$  par mg d'extrait dans du tampon ZUT (Urée 6 M, Thiourée 2 M, DTT 10 mM, Tris-HCl 30 mM pH 8,8, 0.1% de ZALS (Progenta<sup>TM</sup> Zwitterionic Acid Labile Surfactants – Protea Bioscience, États-Unis)). Après 5 min de centrifugation à 14000 g et 25°C, le surnageant a été prélevé. Le tampon ZUT est composé de ZALS qui, comme le CHAPS, est un détergeant zwitterionique. Toutefois, contrairement au CHAPS, le ZALS n'interfère pas avec l'analyse par spectrométrie de masse car il est clivé à pH acide.

### Dosage protéique :

Le dosage protéique a été réalisé avec le kit « 2D Quant kit » (GE Healthcare Life Sciences), à partir de 3  $\mu\text{L}$  d'extrait protéique re-solubilisé, selon les instructions du fournisseur.

## Digestion des protéines

40 µg de protéines extraites ont été prélevés et le volume ajusté avec du tampon ZUT afin d'ajuster la concentration à 4 µg/µL. Les échantillons ont été alkylés avec de l'iodoacétamide (concentration finale de 50 mM) pendant 45 min à température ambiante et à l'obscurité. Les échantillons ont ensuite été dilués avec une solution de bicarbonate d'ammonium 50 mM, de façon à réduire la concentration en urée à 1 M. Les échantillons ont alors été digérés pendant la nuit à 37°C avec 800 ng de trypsine (Promega, États-Unis). La digestion a été stoppée en ajoutant 6 µL de TFA (Trifluoroacetic acid) à 18,6%, puis incubés 30 min à température ambiante afin de cliver le ZALS. Les extraits peptidiques ont été dessalés sur colonne C18 (Strata<sup>TM</sup>XL 100µm Polymeric Reversed Phase – Phenomenex, États-Unis).

## Analyse LC-MS/MS

Pour chaque échantillon 4 µL du mélange de peptides obtenu par digestion trypsique ont été injectés et séparés par HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) Nano LC-Ultra system (Eksigent, Royaume-Unis). La chromatographie utilise une colonne C18 de 30 cm (Nanoseparations, Pays-Bas) et un gradient d'un tampon 99,9% CH<sub>3</sub>CN + 0,1% acide formique, suivant les étapes suivantes : 5% à 35% de tampon pendant 110 min ; 35% à 95% de tampon pendant 3 min ; 95% de tampon pendant 10 min. L'injection dans le spectromètre de masse QexactivePLUS (Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis) a été réalisée à partir d'une source nano-electrospray (New Objective, Etats-Unis).

L'ensemble du couplage a été piloté par Xcalibur 4.0 avec la méthode d'acquisition suivante : l'acquisition des spectres MS a été réalisée sur une gamme m/z = 400 – 1400 avec une résolution de 70000. Les huit ions les plus intenses (Top 8) ont subi une fragmentation HCD (Higher energy Collisional Dissociation) avec une énergie de collision de 27%, obtenant ainsi un spectre MS/MS acquis à une résolution de 15000. Une exclusion dynamique fixée à 40 sec a été utilisée.

L'identification des peptides a été réalisée à l'aide du logiciel X!Tandem (Craig and Beavis, 2004) (version PILEDRIVER 01/04/2015) où des modifications de masse ont été indiquées. La modification de masse correspondant à la carbamidométhylation des cysteines (57,02146 Da) a été déclarée comme modification systématique. Des modifications potentielles ont été ajoutées telles que l'oxydation des méthionines (15,99491 Da) et l'acétylation en N-terminal (+42,01056 Da). La tolérance de la masse du précurseur était de 10 ppm tandis que celle du fragment était de 0,02 Da. Un seul « missed cleavage » a été autorisé.

La base de données de *B. cinerea* fournie au logiciel a été récupérée à partir du site Ensembl ([http://fungi.ensembl.org/Botrytis\\_cinerea/](http://fungi.ensembl.org/Botrytis_cinerea/)) et préalablement ré-annotée fonctionnellement sur UseGalaxy à partir des données publiées (Amselem et al., 2011) et des annotations automatiques obtenues avec Pfam (Finn et al., 2016). Une base de données comprenant des contaminants standards a également été ajoutée. Les protéines identifiées ont été filtrées et groupées avec X!Tandem Pipeline

3.4.0 Elastine durcie (Langella et al., 2017). Les données présentant une E-value peptide  $< 0,04$ , au minimum deux peptides par protéines et une E-value pour les protéines de  $10^{-4}$  ont été retenues. La FDR (false discovery rate) a été estimée à 0,02% pour les peptides et 0% pour les protéines.

### **Quantification, analyse statistique et annotation**

L'analyse quantitative du protéome s'appuie sur l'analyse de données complémentaires qui sont respectivement les XIC (extracted ion chromatogram) extraits des spectres MS1, les « peak counting » et les « spectral counting ».

La quantification des peptides se fait à partir des données XIC grâce au logiciel libre MassChroQ (v2.2) (Valot et al., 2011). Le « peak counting » (PC) est quant à lui, le comptage du nombre de pics MS1 utilisé en XIC. Le « spectral counting » (SC) est le comptage du nombre de spectres MS2 ayant permis l'identification d'une protéine dans un échantillon donné.

L'ensemble des analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R en utilisant le package MassChroQR (<http://pappso.inra.fr/bioinfo/masschroqr/>). Les données de XIC ont été normalisées. Pour cela un échantillon WT non traité a été choisi comme référence. Pour chaque peptide, un rapport échantillon/référence a été calculé. Le facteur de normalisation a été désigné comme étant la médiane des rapports. Les peptides communs à plusieurs protéines posent un problème quant à la quantification des protéines, il a donc été nécessaire de les supprimer du jeu de données. Pour des raisons de fiabilité de la quantification par les XIC, il est nécessaire d'utiliser des peptides répétables. Pour cela les peptides, absents à un seuil de 5%, sont éliminés. Les données manquantes ont pu être compensées par imputation des peptides à partir d'une régression linéaire se basant sur l'intensité d'autres peptides de la même protéine. Dans le cas où aucun peptide d'une protéine n'est présent dans un échantillon, aucune imputation sur les peptides n'est réalisée. L'abondance des protéines a été estimée comme la somme des intensités des peptides. Les analyses globales (tel l'Analyse en Composantes Principales) nécessitent des données complètes, ainsi lorsque l'abondance d'une protéine est manquante dans un échantillon, une imputation est faite à partir de la plus faible valeur d'abondance mesurée sur la protéine dans l'expérience. L'analyse de variance sur l'abondance des protéines a été faite par une analyse de variance de type ANOVA. Les protéines présentant une variation significative ( $p$ -value  $< 0,01$ ) de l'abondance entre les différentes souches ont été sélectionnées.

Les données de peak et de spectral counting ont été utilisées là où les informations de XIC n'étaient pas disponibles. Les données de XIC étant exprimées en  $\log_{10}$ , il a été nécessaire d'annuler la transformation logarithmique. Afin de calculer le « fold change » pour les trois types de données, la moyenne des valeurs des quatre réplicats de chaque protéine a été réalisée. A partir de ce résultat, un ratio mutant/sauvage a été réalisé afin de calculer le « fold change ». Les protéines dont le ratio est inférieur à 0,66 ou supérieur à 1,5 ont été conservées. Après regroupement des protéines en groupes de régulation, l'enrichissement fonctionnel selon le processus biologiques a été analysé avec Blast2GO

(Götz et al., 2008) pour chaque groupe. Cet enrichissement fait appel à un test de Fisher exact avec une p-value  $< 0,05$ . Ce même type de test a également été utilisé afin de réaliser un enrichissement manuel à partir d'une liste de fonctions biologiques étudiées chez *B. cinerea*.

## Résultats

### 1. Identification des protéines

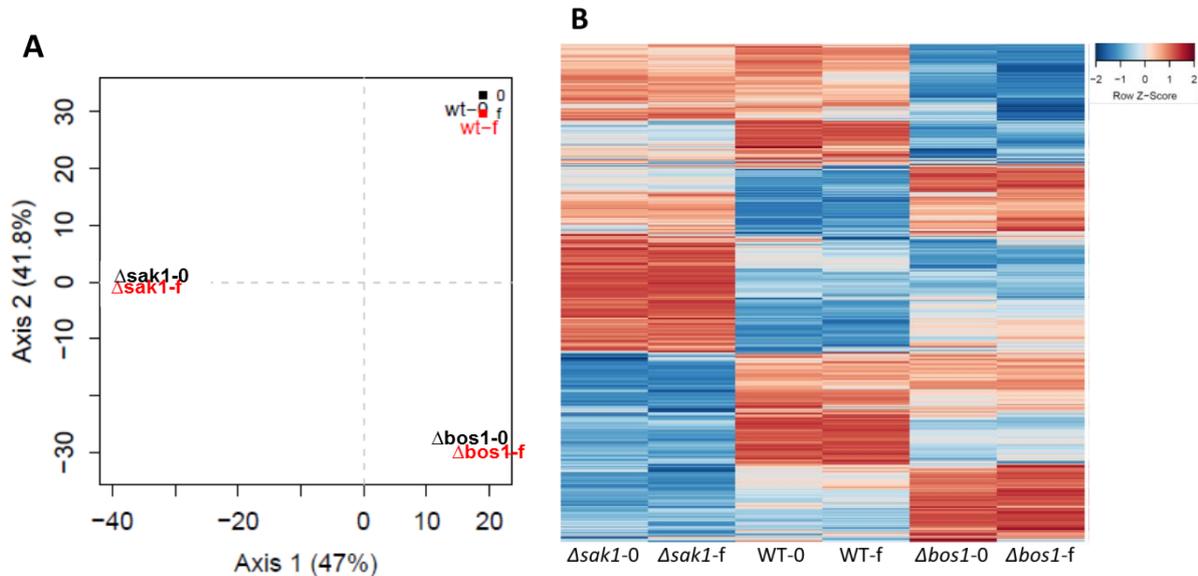
Nous avons entrepris l'analyse du protéome des mutants de la voie osmorégulatrice  $\Delta bos1$  et  $\Delta sak1$ , comparé à celui de la souche sauvage. Pour cela nous avons extrait les protéines des différentes souches ayant subies ou non un traitement au fludioxonil de 15 min. Après digestion tryptique et analyse des peptides par LC-MS/MS, l'identification et la quantification des protéines ont été réalisées.

A partir des spectres générés en LC-MS/MS et leur analyse par X!Tandem (Langella et al., 2017), 99% d'entre eux ont été utilisés pour chaque échantillon. En utilisant la nouvelle annotation du génome de *B. cinerea* (Van Kan et al., 2017) comme base de données, ainsi qu'une base de données « contaminants », en moyenne 67% des spectres ont pu être assignés. La non-assignation des spectres peut-être due à des modifications post-traductionnelles, des mutations non présentes dans la base de données, ou à des modifications chimiques non indiquées dans X!Tandem.

L'analyse du protéome par cette approche dite « shotgun » a permis l'identification en « peak » et « spectral counting » de 2425 protéines sur les 11701 protéines prédites de *B. cinerea* (soit 20,7% du protéome théorique). L'analyse des XIC (extracted ion chromatogram) a de son côté permis d'obtenir le profil quantitatif de 1263 protéines sur les 2425 (soit 10,8% du protéome théorique).

### 2. Absence d'effet du fludioxonil sur l'abondance des protéines

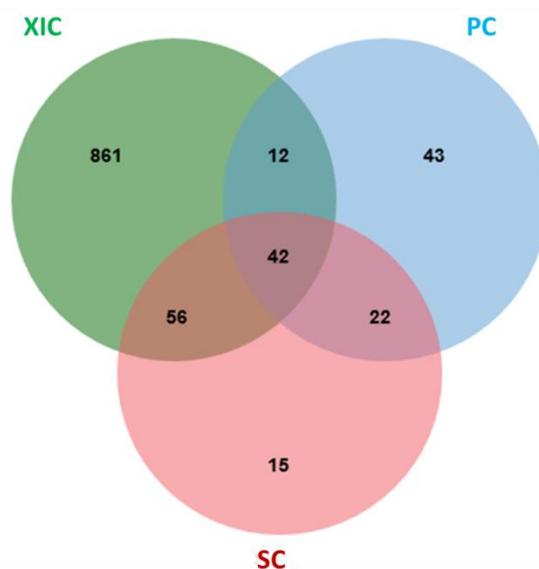
Une première analyse de la variation entre les échantillons traités et non traités de chaque génotype a été réalisée, afin d'étudier l'effet du fludioxonil à 10  $\mu\text{g/mL}$  sur l'abondance des protéines après 15 min d'exposition. Une ANOVA a mis en évidence l'absence d'effet significatif ( $p < 0,01$ ) lié au traitement. De plus, sur une représentation de l'analyse en composantes principales (ACP) (**Figure II - 1**), nous constatons le regroupement des données par génotype, que les souches soient traitées ou non. En conclusion, le fludioxonil n'a pas d'effet sur l'abondance des protéines après 15 minutes de traitement. Par contre nous constatons que les mutations étudiées ont un impact prononcé sur l'accumulation des protéines.



**Figure II - 1 :** Effet du traitement au fludioxonil et du génotype sur l'abondance des protéines. A/ Analyse en composante principale. En noir sont représentées les souches n'ayant pas subies de traitement au fludioxonil, tandis qu'en rouge sont représentées les souches ayant subies une exposition de 15 min au fludioxonil. B/ Heatmap représentant l'abondance des protéines pour chaque souche sans et avec traitement au fludioxonil. Chaque ligne représente une protéine. Les protéines ont été regroupées selon leur profil de régulation.

### 3. Identification des protéines montrant une différence d'abondance entre mutants et sauvage

A partir des 1263 protéines identifiées en XIC, celles présentant une variation d'abondance non significative ou en dessous des seuils définis ont été supprimées. A partir des 2425 protéines identifiées en « peak counting » et en « spectral counting », les données ont été filtrées de façon à supprimer les protéines présentant respectivement une faible variation d'abondance et une faible variation du nombre de spectres. Une analyse de variance par ANOVA a ensuite été réalisée pour les trois types de données. 971 protéines identifiées en XIC, 119 protéines en « peak counting » et 135 en « spectral counting » ont présenté une variation significative entre les souches ( $p < 0,01$ ) (**Figure II - 2**).



**Figure II - 2 :** Répartition des protéines différentielles selon la méthode de détection (XIC, peak counting (PC) et spectral counting (SC)). Le diagramme de Venn a été réalisé avec l’outil en ligne « jvenn » (Bardou et al., 2014).

Afin d’identifier les protéines dont l’abondance est significativement différente du sauvage, nous avons calculé un ratio (fold-change) entre les mutants  $\Delta bos1$ ,  $\Delta sak1$  et la souche sauvage en fixant un seuil arbitraire de 1,5. Les protéines ayant un ratio inférieur à 0,66 ou supérieure à 1,5 ont donc été sélectionnées comme présentant une abondance significativement différente par rapport au sauvage. A partir des données filtrées de spectral et de peak counting, seul les protéines n’étant pas détectées en XIC ont été retenues. Chez le mutant  $\Delta bos1$ , 425 protéines ont été identifiées (380 en XIC et 45 en spectral ou peak counting) dont l’abondance diffère du sauvage, contre 487 protéines chez le mutant  $\Delta sak1$  (425 protéines identifiées en XIC et 62 en spectral ou peak counting).

L’ensemble des protéines différentiellement régulées ont été regroupées en fonction de la régulation exercée par chaque mutant sur l’abondance de ces protéines (**Tableau II - 1 ; Tableau II - S1**). Ainsi, nous observons que 38,7% des protéines sont régulées positivement (carré vert) ou négativement (carré rouge) à la fois par Bos1 et Sak1. En ce qui concerne la proportion des protéines inversement régulées par Bos1 et Sak1, elles représentent 4,4% des protéines seulement (carrés jaunes). En analysant les protéines indépendamment régulées par Bos1 et Sak1, nous constatons qu’elles représentent 56,9% des protéines différentiellement régulées par rapport au sauvage. 59% des protéines de cette catégorie sont régulées par Sak1 contre 41% par Bos1.

C’est derniers résultats suggèrent que Sak1 soit contrôlé par au moins une autre protéine senseur ayant un rôle majeur. Dans le cas de l’histidine kinase Bos1, les résultats indiquent une autre sortie que Sak1.

**Tableau II - 1 :** Nombre de protéines identifiées en fonction de la régulation exercée par chaque protéine-kinase. Les cases en vert et rouge foncé représentent, respectivement, les protéines co-régulées positivement et négativement par Bos1 et Sak1. Les cases en vert pâle et rouge pâle représentent, respectivement, les protéines régulées de façon spécifique par Bos1 ou Sak1. En jaune sont représentées les protéines inversement régulées par Bos et Sak1.

		Bos1		
		+	-	∅
Sak1	+	XIC: 123 PC: 24 23,04%	XIC: 12 PC: 3 2,35%	XIC: 72 PC+SC: 18 14,11%
	-	XIC: 12 PC: 1 2,04%	XIC: 88 PC: 12 15,67%	XIC: 118 PC: 5 19,28%
	∅	XIC: 89 13,95%	XIC: 56 PC+SC: 5 9,56%	

#### 4. Enrichissement fonctionnel des groupes de protéines sous contrôle de Bos1 et/ou Sak1

Une analyse par enrichissement fonctionnel a été réalisée afin d'identifier des processus biologiques enrichis pour chaque groupe (**Tableau II - 2**) par l'outil Blast2GO et par enrichissement manuel à partir de différentes catégories fonctionnelles.

Ainsi Bos1 et Sak1 ont un rôle positif (groupe A) dans le métabolisme des acides nucléiques, le métabolisme énergétique, les CAZYmes (Carbohydrate-Active enZYmes), les protéines sécrétées, le métabolisme secondaire. A l'opposé, ils régulent majoritairement de façon négative (groupe B) la biosynthèse des acides alpha-aminés, la réponse au stress oxydatif, la respiration alternative et d'autres voies du métabolisme secondaire.

Dans les groupes régulés inversement par Bos1 et Sak1, l'enrichissement manuel a permis de mettre en évidence des protéines impliquées dans le métabolisme secondaire (groupe C), ainsi que des protéines sécrétées et des CAZYmes (groupe D).

Bos1 seul régule de façon positive (groupe E) majoritairement la glycosylation des macromolécules, des protéines impliquées dans le métabolisme primaire ainsi que certains CAZYmes. De façon négative, Bos1 seul régule majoritairement (groupe F) le métabolisme des nucléotides et celui des acides aminés.

Le groupe G, regroupant des protéines régulées positivement par Sak1 seul, est enrichi en protéines sécrétées, ainsi qu'en protéines impliquées dans la réponse au stress oxydatif mais aussi dans la production de ROS. L'enrichissement manuel des protéines régulées négativement par Sak1 seul (groupe H) a permis de mettre en évidence un regroupement de protéases, ainsi que des protéines impliquées dans le métabolisme secondaire et dans les voies de signalisation.

Ainsi l'analyse de l'enrichissement fonctionnel, a mis en évidence que la majorité des groupes de régulation sont enrichis en protéines intervenant dans le processus infectieux chez *B. cinerea* (CAZYmes, protéines sécrétées, équilibre redox, métabolisme secondaire). Des protéines du métabolisme secondaire ont été identifiées dans quatre groupes sur neuf et sont toujours régulées par au moins Sak1. La présence de protéines d'un même processus dans différents groupes révèle donc une régulation complexe.

Tableau II - 2 : Enrichissement fonctionnel réalisé sur les différents groupes de régulation. Les signes + et - représentent respectivement la régulation positive et négative exercée par Bos1 ou Sak1 sur l'ensemble des protéines de chaque groupe. L'enrichissement manuel a été réalisé en utilisant un test de Fisher exact ( $p < 0,05$ ) sur les catégories fonctionnelles annotées manuellement (Amselem et al., 2011).

Groupes	Enrichissement par « Blast2GO »	Enrichissement manuel
Bos1(+)/Sak1(+) <b>A</b>	Métabolisme des acides nucléiques Métabolisme carboné Métabolisme du Pyruvate Métabolisme du Lactate Gluconéogenèses	Carbohydrate-Active enZYmes (CAZYmes) Protéines Sécrétées Métabolisme secondaire
Bos1(-)/Sak1(-) <b>B</b>	Biosynthèse d'acides alpha-amines	Métabolisme secondaire Réponse au stress oxydatif Respiration alternative
Bos1(+)/Sak1(-) <b>C</b>	<i>nd</i>	Métabolisme secondaire
Bos1(-)/Sak1(+) <b>D</b>	<i>nd</i>	Protéines Sécrétées Carbohydrate-Active enZYmes
Bos1(+) <b>E</b>	Métabolisme des Glycoprotéines Glycosylation de macromolécules	Carbohydrate-Active enZYmes Métabolisme primaire
Bos1(-) <b>F</b>	Métabolisme nucléotidique Métabolisme des bases puriques Métabolisme des acides aminés	Protéases
Sak1(+) <b>G</b>	Métabolisme des monosaccharides Métabolisme des oxoacides Equilibre rédox	Protéines sécrétées Equilibre rédox
Sak1(-) <b>H</b>	Métabolisme des acides carboxyliques Biosynthèse de coenzymes	Métabolisme secondaire Protéases Composants de voies de signalisation

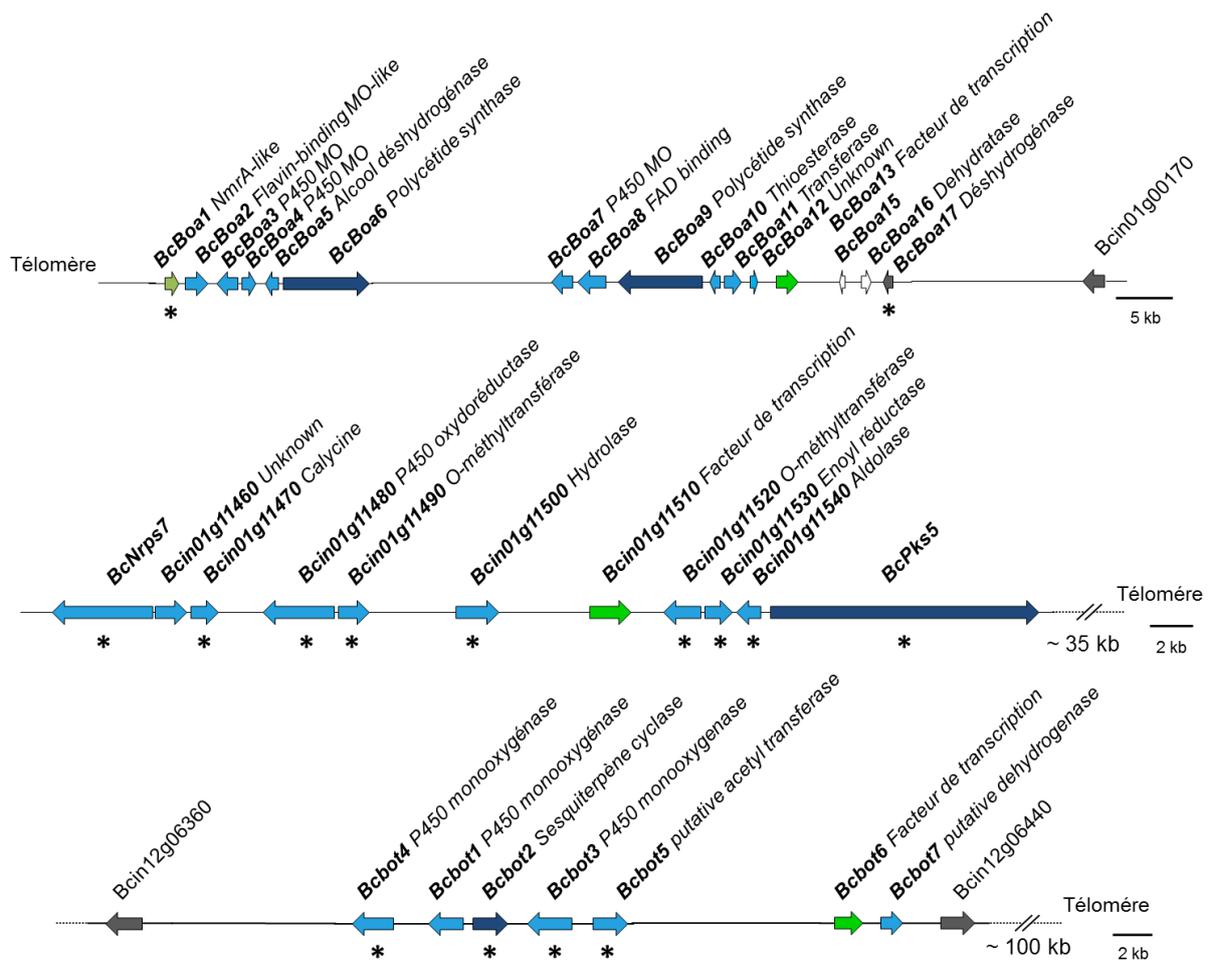


Figure II - 3 : Représentation des clusters de gènes de l'acide botcinique (Boa), NRPS7/PKS5 et du botrydial (Bot) chez *B. cinerea*. Les flèches vertes, bleues foncées et bleues claires représentent respectivement les gènes codants pour des facteurs de transcriptions, des polycétides synthases et des gènes accessoires. Les gènes codant pour les protéines identifiées dans le protéome différentiel sont marqués par un astérisque.

## 5. Régulation de clusters du métabolisme secondaire par Bos1 et/ou Sak1

Le rôle de Sak1 dans l'expression de gènes du métabolisme secondaire a précédemment été décrit (Heller et al., 2012), notamment ceux du cluster BOA, impliqué dans la synthèse d'acide botcinic (Dalmais et al., 2011) et ceux du cluster BOT impliqué dans la synthèse de botrydial (Rossi et al., 2011). J'ai ainsi analysé la présence et l'abondance des protéines appartenant aux clusters du métabolisme secondaire, ainsi que des protéines connues pour intervenir dans le métabolisme secondaire chez *B. cinerea* (Tableau II - 3).

En analysant l'accumulation des protéines du cluster BOT, nous pouvons constater que BcBot4 (monooxygénase à cytochrome P450), BcBot2 (sesquiterpène cyclase), BcBot3 (monooxygénase à cytochrome P450) sont régulées négativement par Sak1 et positivement par Bos1. L'abondance de BcBot1 correspondant à une monooxygénase à cytochrome P450 n'est pas régulée par

Sak1 mais seulement par Bos1. En conclusion l'abondance des protéines du cluster BOT est régulée positivement par Bos1 tandis que Sak1 régule négativement plusieurs d'entre elles.

En nous intéressant au cluster BOA, nous constatons que seul BcBoA1 (putative NmrA-like regulator) et BcBoA17 (déshydrogénase putative) ont été détectées dans nos données en XIC. Bos1 exerce une régulation négative sur l'accumulation de BcBoA1 tandis que Sak1 régule positivement l'accumulation de cette protéine. Dans le cas de BcBoA17 la régulation est inversée. L'identification en PC et SC a mis en évidence BcBoA6, BcBoA9 et BcBoA11, toutefois ces dernières ne sont pas sorties de l'analyse comme significativement différentes.

J'ai pu identifier des protéines plus abondantes chez le mutant  $\Delta sak1$ , situées au sein du cluster BcNRPS7-BcPKS5 (Amselem et al., 2011). Cinq d'entre elles sont régulées uniquement et positivement par Sak1 : Une calycine, une  $\alpha$ - $\beta$ -hydrolase, une « non ribosomal peptide synthase » (NRPS), une O-méthyltransférase et une polycétide synthase (PKS5). L'abondance de la protéine BcNRPS7 est en plus régulée négativement par Bos1 tandis que celle d'une protéine appartenant à la famille des « zinc-binding dehydrogenase » est régulée positivement par Bos1. Ces résultats mettent en avant une régulation complexe du cluster BcNRPS7-BcPKS5 par la voie osmorégulatrice.

En dehors de ces clusters, nous constatons que d'autres protéines du métabolisme secondaire sont régulées par Bos1 et Sak1. Les deux tétrahydroxynaphthalène réductases, BcBRN1 et BcBRN2, ainsi que la scytalone déshydratase BcSCD1, impliquées dans la biosynthèse de la mélanine, ont leur abondance fortement réduite chez le mutant  $\Delta sak1$ . BcBRN2 est également impacté, mais dans une moindre mesure chez  $\Delta bos1$ . Ces résultats sont en accord avec l'expression des gènes *brn1*, *brn2* et *scd1* réduite chez le mutant  $\Delta sak1$  (Liu et al., 2011). La protéine BcPKS13, également impliquée dans la biosynthèse de la mélanine, n'a pas été détectée en LC-MS/MS. La protéine BcOah, une oxaloacétate hydrolase, catalyse l'hydrolyse de l'oxaloacétate en oxalate et acétate (Han et al., 2007) En étudiant son abondance chez les mutants de la voie osmorégulatrice, nous constatons qu'elle est également fortement impactée chez  $\Delta sak1$  et dans une moindre mesure chez  $\Delta bos1$ .

Tableau II - 3 : Protéines du métabolisme secondaire différenciellement produites chez  $\Delta bos1$  et/ou  $\Delta sak1$ . Les numéros d'accèsion suivis d'un astérisque correspondent aux protéines identifiées en peak counting.

	N° Accession	Nom	Description	Abondance relative $\Delta bos1/WT$	Abondance relative $\Delta sak1/WT$
<b>Mélanine</b>	Bcin04g04800	BcBRN1	Tétrahydroxynaphthalène réductase	1,434	<b>0,088</b>
	Bcin03g08100	BcBRN2	Tétrahydroxynaphthalène réductase	<b>0,622</b>	<b>0,007</b>
	Bcin03g08110*	BcSCD1	Scytalone déshydratase Arp1 (pigmentation des macroconidies)	0,826	<b>0,043</b>
<b>Oxalate</b>	Bcin12g01020	Bcoah	Oxaloacétate hydrolase	<b>0,263</b>	<b>0,010</b>

	N° Accession	Nom	Description	Abondance relative $\Delta bos1$ /WT	Abondance relative $\Delta sak1$ /WT
<b>Cluster BoA</b>	Bcin01g00010	BcBoA1	Régulateur transcriptionnel de type NmrA putative	<b>3,381</b>	<b>0,525</b>
	Bcin01g00160	BcBoA17	Déshydrogénase putative	0,965	<b>3,202</b>
<b>Cluster BcNRPS7 - BcPKS5</b>	Bcin01g11450	BcNRPS7	Non-ribosomal peptide synthetase	<b>0,535</b>	<b>10,278</b>
	Bcin01g11470	nd	Calycin	1,130	<b>12,699</b>
	Bcin01g11480*	nd	Bifunctional p450:nadph-p450 reductase	1,306	<b>4,000</b>
	Bcin01g11490	nd	O-methyltransferase	1,286	<b>15,438</b>
	Bcin01g11500	nd	Alpha/beta hydrolase	1,229	<b>1,885</b>
	Bcin01g11520	nd	Méthyltransferase	1,401	<b>9,058</b>
	Bcin01g11530	nd	Enoyl-réductase	<b>1,929</b>	<b>19,547</b>
	Bcin01g11540*	nd	Aldolase	<b>4,500</b>	<b>14,500</b>
	Bcin01g11550	BcPKS5	Polycétide synthase	0,843	<b>4,753</b>
<b>Cluster BOT</b>	Bcin12g06370	BcBot4	Cytochrome P450	<b>0,055</b>	<b>1,536</b>
	Bcin12g06380	BcBot1,CND5	Cytochrome P450	<b>0,152</b>	0,918
	Bcin12g06390	BcBot2,CND15	Sesquiterpen cyclase	<b>0,514</b>	<b>1,895</b>
	Bcin12g06400	BcBot3,CND11	Cytochrome P450	<b>0,134</b>	<b>1,829</b>

## 6. Contrôle de protéines sécrétées par Bos1 et Sak1

L'analyse de l'enrichissement fonctionnel a permis de mettre en évidence, dans le groupe de protéines dont l'abondance est positivement régulée par Bos1 et Sak1 (groupe A), des protéines potentiellement sécrétées et modifiant la paroi de la plante : l'alpha-beta hydrolase, des glycosides hydrolases (familles 10, 15, 31, 35), le précurseur de la tripeptidyle-peptidase I, les peptidases (familles S28, S41), ainsi que la carboxypeptidase S1.

J'ai également mis en évidence des protéines sécrétées, régulées négativement par Bos1 et positivement par Sak1 : une glycoside hydrolase de famille 17, la laccase 2, le précurseur de la pectine lyase A.

D'autres protéines sont exclusivement régulées par Bos1 : une glycoside hydrolase (familles 72 et 17), l'endo-bêta-1,4-glucanase Cel5A, la pectate lyase A et une protéase décrite comme une  $\alpha/\beta$ -hydrolase.

L'ensemble des protéines sécrétées, régulées par Bos1 et Sak1 (**Tableau II - 4**) sont impliquées dans la modification et la dégradation de la paroi de la plante. L'accumulation intracellulaire d'enzyme de dégradation de la paroi pourrait expliquer le défaut de pathogénicité observé chez les mutants.

Tableau II - 4 : Enzymes lytiques sécrétées différentiellement produites chez les mutants  $\Delta bos1$  et  $\Delta sak1$ . Les numéros d'accèsion suivis d'un astérisque correspondent aux protéines identifiées en peak counting.

	N° Accession	Nom	Description	Abondance relative $\Delta bos1/WT$	Abondance relative $\Delta sak1/WT$
<b>Enzymes sécrétées</b>	Bcin02g06940	nd	Glycoside hydrolase family 72	<b>1,632</b>	0,935
	Bcin10g05710	nd	Glycoside hydrolase family 32	0,954	<b>0,454</b>
	Bcin02g01420*	nd	Glycoside hydrolase family 13	0,686	<b>0,171</b>
	Bcin01g06010	nd	Glycoside hydrolase family 16	<b>3,803</b>	<b>3,635</b>
	Bcin05g01520	nd	Glycoside hydrolase family 16	<b>0,159</b>	<b>0,105</b>
	Bcin04g04190	nd	Glycoside hydrolase family 15	<b>0,169</b>	<b>0,126</b>
	Bcin12g03390	nd	Glycoside hydrolase family 15	<b>0,204</b>	<b>0,053</b>
	Bcin02g03090	nd	Glycoside hydrolase family 1	<b>0,222</b>	<b>0,084</b>
	Bcin11g06440	nd	Glycoside hydrolase family 31	<b>0,285</b>	<b>0,201</b>
	Bcin14g00480	nd	Glycoside hydrolase family 3	<b>0,383</b>	<b>0,225</b>
	Bcin09g02680	nd	Glycoside hydrolase family 63	<b>0,387</b>	<b>0,254</b>
	Bcin16g01950	nd	Glycoside hydrolase family 63	<b>0,655</b>	<b>0,601</b>
	Bcin03g03480*	nd	Glycoside hydrolase family 10	<b>0,400</b>	<b>0,200</b>
	Bcin14g00650*	nd	Glycoside hydrolase family 31	<b>0,404</b>	<b>0,213</b>
	Bcin01g11220	nd	Glycoside hydrolase family 17	<b>2,191</b>	<b>0,519</b>
	Bcin08g02390	nd	Peptidase S28	<b>0,401</b>	<b>0,151</b>
	Bcin07g04370	nd	Peptidase S41	<b>0,406</b>	<b>0,099</b>
	Bcin10g04320	Bccp4	Carboxypeptidase Y	1,346	<b>2,518</b>
	Bcin08g00280*	nd	Carboxypeptidase S1	<b>0,281</b>	<b>0,125</b>
	Bcin14g02510	BcLCC2	Laccase 2	<b>3,867</b>	<b>0,294</b>
Bcin14g03430*	nd	Pectine lyase A	<b>1,600</b>	<b>0,200</b>	
Bcin03g04010	cel5A	Endo-beta-1,4-glucanase	<b>2,659</b>	1,484	
Bcin03g05820	nd	Pectate lyase A	<b>7,408</b>	0,773	
Bcin13g03090	nd	Alpha beta hydrolase	<b>11,676</b>	1,366	

	N° Accession	Nom	Description	Abondance relative $\Delta bos1/WT$	Abondance relative $\Delta sak1/WT$
<b>Enzymes sécrétées</b>	Bcin01g11500	nd	Alpha beta hydrolase	1,229	<b>1,885</b>
	Bcin06g02510	nd	Alpha beta hydrolase	<b>0,117</b>	<b>0,108</b>
	Bcin02g05500*	nd	Alpha beta hydrolase	<b>0,154</b>	<b>0,115</b>

## 7. Réponses aux stress

Comme mentionné précédemment, les mutants de signalisation sont plus sensibles aux stress osmotique, oxydatif et pariétal. Nous avons donc étudié les données protéomiques par rapport aux protéines impliquées dans ces fonctions (**Tableau II - 5**).

L'analyse fonctionnelle de *sak1* a mis en évidence que ce gène régule en partie le mécanisme de détoxification des ROS (Segmüller et al., 2007). A partir du protéome comparatif, des protéines différenciellement produites ont été identifiées comme intervenant dans la réponse au stress oxydatif (**Figure II - 4**) (Siegmund and Viefhues, 2016).

La superoxyde dismutase intervient dans le processus de détoxifications des ions superoxydes. Chez le mutant  $\Delta sak1$  nous constatons une baisse de l'abondance de la protéine BcSod1 par rapport au sauvage.

Le peroxyde d'hydrogène (issus ou non de la dismutation de l'ion superoxyde), est détoxifié par l'action des catalases. Dans le génome de *B. cinerea*, 8 catalases ont été annotées, parmi lesquelles 3 ont été retrouvées différenciellement produites chez  $\Delta sak1$  et/ou  $\Delta bos1$ . La protéine Cat7 présente une abondance réduite chez le mutant  $\Delta sak1$ , tandis que CatA est surabondante chez le mutant  $\Delta bos1$  comparé au sauvage. La catalase Cat5 est, quant à elle, moins présente à la fois chez  $\Delta sak1$  et  $\Delta bos1$ .

La détoxification des ROS passe également par l'intermédiaire de thioredoxines, de disulfure-isomérasés, ainsi que par le couplage au glutathion. Nous constatons chez le mutant  $\Delta sak1$  une diminution de la biosynthèse de la thioredoxine BcTRX1 ainsi que de trois disulfure isomérasés. Une seule disulfure isomérase a été identifiée dont l'abondance est impactée à la fois chez le mutant  $\Delta sak1$  et  $\Delta bos1$ . En s'intéressant au couplage au glutathion, nous constatons que chez le mutant  $\Delta sak1$ , quatre glutathion-S-transférases (GST) ont une abondance qui varie significativement par rapport au sauvage. Ainsi les GST 2 et 9 sont moins abondantes tandis que les GST 5 et 14 sont plus abondantes. La glutathion réductase (Glr) BcGlr1 est importante pour la réduction du disulfure de glutathion (GSSG) et la régénération du glutathion (GSH). L'abondance de cette protéine est réduite chez le mutant  $\Delta bos1$  ainsi que chez  $\Delta sak1$ . La glutarédoxine (Grx) est une oxydoréductase qui est réduite par l'intermédiaire du glutathion. Le GSH est par la suite oxydé en GSSG. Chez le mutant  $\Delta sak1$ , la quantité de glutarédoxine est réduite par rapport au sauvage.

D'autres enzymes sont impliquées dans la détoxification des ROS comprenant les peroxirédoxines (PRX). Sur neuf PRX annoté chez *B. cinerea*, cinq ont été détectées en LC-MS/MS

parmi lesquelles trois ont été identifiées comme différentiellement abondantes chez  $\Delta bos1$  et  $\Delta sak1$  par rapport à la souche sauvage. PRX1 et PRX9 sont moins abondantes à la fois chez  $\Delta sak1$  mais aussi chez  $\Delta bos1$ . De façon contraire, PRX8 est plus abondante chez les deux mutants. En conclusion, l'analyse par protéomique consolide les résultats obtenus par analyse transcriptionnelle. La sensibilité des deux mutants et en particulier du mutant  $\Delta sak1$ , aux stress oxydatif semble être la conséquence d'une baisse de l'abondance d'un grand nombre de protéines impliquées dans la détoxification des ROS. L'abondance de ces protéines est moins impactée chez le mutant  $\Delta bos1$  pouvant ainsi expliquer la tolérance aux ions superoxyde, notamment par l'absence d'impact sur l'abondance de BcSod1.

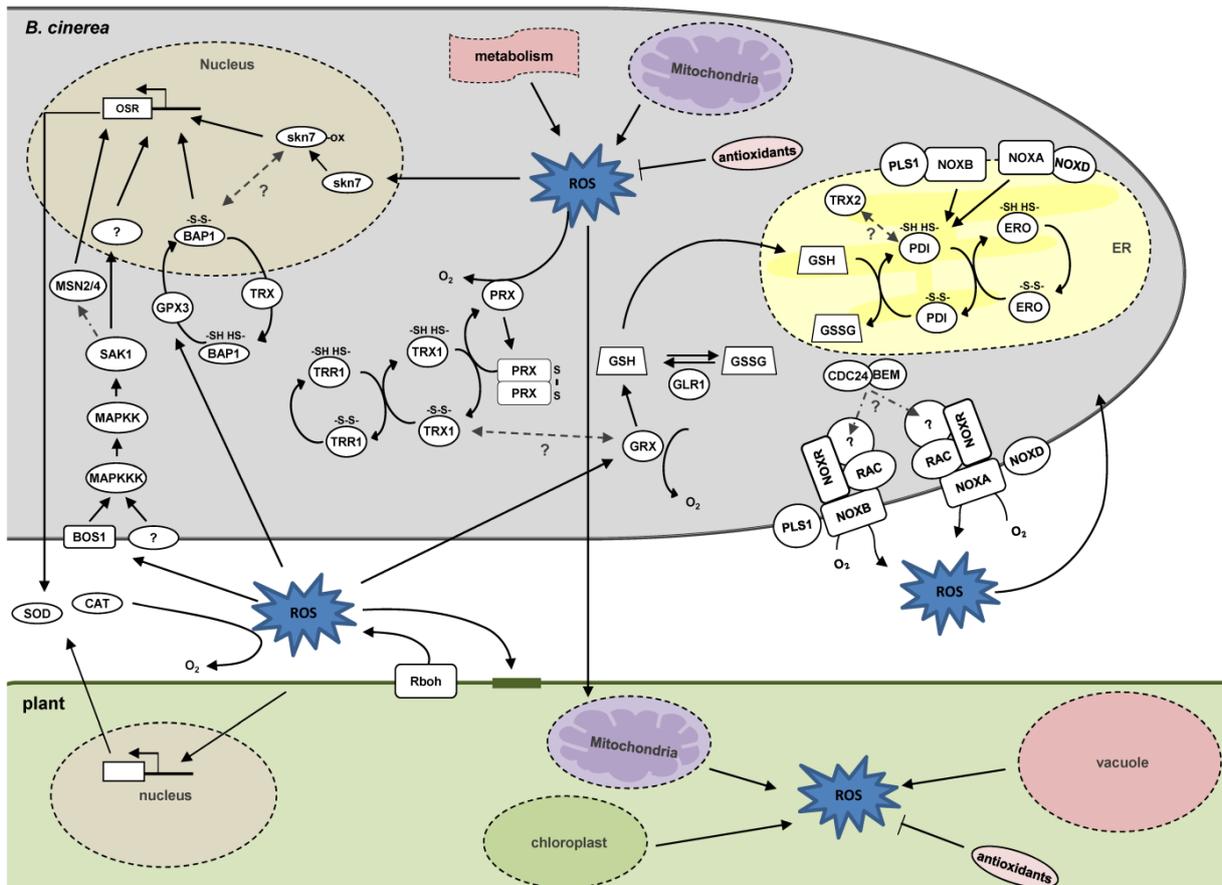


Figure II - 4 : Composants impliqués dans la production et la détoxification des ROS chez *B. cinerea* (Siegmund and Viehues, 2016).

Il a été montré que le glycérol intervient dans la réponse au stress osmotique (Blomberg and Adler, 1989) tandis que le mannitol intervient à la fois dans la réponse au stress osmotique et oxydatif (Dulermo et al., 2010; Upadhyay et al., 2015). Nous nous sommes ainsi intéressés à la régulation du métabolisme des polyols (**Figure II - 5**) chez les mutants  $\Delta bos1$  et  $\Delta sak1$ . Chez ces deux mutants nous constatons une réduction dans le contenu en glycérol déshydrogénase et en glycérol-3-phosphate déshydrogénase. En ce qui concerne le métabolisme du mannitol, chez le mutant  $\Delta sak1$  il y a une baisse significative en mannitol déshydrogénase et en mannitol-1-phosphate 5-déshydrogénase par

rapport au sauvage. Ces données confirment bien le rôle de Sak1 et de Bos1 dans l'adaptation au stress osmotique par l'intermédiaire du métabolisme des polyols.

L'adaptation au stress pariétal nous a amenée à analyser l'abondance des chitine-synthases chez les mutants  $\Delta sak1$  et  $\Delta bos1$ . Ainsi chez le mutant  $\Delta sak1$  nous constatons une augmentation de la quantité des deux chitines synthases BcCHSIIIa et BcCHSV. Chez le mutant  $\Delta bos1$  l'abondance de ces chitines synthases est légèrement inférieure au sauvage. La paroi fongique est également composée de  $\beta$ -1,3-glucane. En analysant l'abondance de  $\beta$ -1,3-glucane synthase, nous constatons que cette enzyme est moins présente chez le mutant  $\Delta bos1$  par rapport au sauvage, tandis que chez le mutant  $\Delta sak1$  l'abondance de cette protéine est comparable à la souche sauvage. L'accumulation différentielle de ces protéines peut expliquer en partie les défauts pariétaux des mutants, notamment de  $\Delta sak1$ .

Tableau II - 5 : Protéines impliquées dans la réponse à différents stress. Les numéros d'accèsion suivis d'un astérisque correspondent aux protéines identifiées en peak counting. Les numéros associés aux descriptions correspondent aux réactions enzymatiques représentés dans la Figure II - 5.

	N° Accession	Nom	Description	Abondance relative $\Delta bos1/WT$	Abondance relative $\Delta sak1/WT$
<b>Adaptation au stress oxydatif</b>	Bcin06g01180*	BcCATA	Catalase	<b>3,750</b>	1,125
	Bcin03g01920	BcCAT5	Catalase	<b>0,120</b>	<b>0,039</b>
	Bcin09g04400*	BcCAT7	Catalase	1,040	<b>0,040</b>
	Bcin03g03390	BcSod1	Superoxyde dismutase	0,727	<b>0,283</b>
	Bcin12g04280	BcTRX1	Thiorédoxine	0,814	<b>0,496</b>
	Bcin06g05730	BcPDI1	Disulfure isomérase	0,753	<b>0,573</b>
	Bcin01g08850	nd	Disulfure isomérase	1,021	<b>0,636</b>
	Bcin05g08370	nd	Disulfure isomérase	0,827	<b>0,653</b>
	Bcin08g02380	nd	Disulfure isomérase erp38	<b>0,580</b>	<b>0,640</b>
	Bcin01g04900*	gstII	Glutathion s-transférase	1,125	<b>0,156</b>
	Bcin14g03160*	BcGST5	Glutathion s-transférase	<b>3,000</b>	<b>15,000</b>
	Bcin06g03060	BcGST9	Glutathion s-transférase	<b>0,520</b>	<b>0,232</b>
	Bcin07g03430	BcGST14	Glutathion s-transférase	0,762	<b>3,980</b>

	N° Accession	Nom	Description	Abondance relative $\Delta bos1/WT$	Abondance relative $\Delta sak1/WT$
<b>Adaptation au stress oxydatif</b>	Bcin04g05300	BcGLR1	Glutathion-disulfure réductase	<b>0,473</b>	<b>0,360</b>
	Bcin10g01240	BcGRX1	Glutarédoxine	0,750	<b>0,635</b>
	Bcin04g00570	BcPRX1	Peroxyrédoxine	<b>0,647</b>	<b>0,617</b>
	Bcin09g03930	BcPRX8	Peroxyrédoxine	<b>2,011</b>	<b>7,046</b>
	Bcin10g01030	BcPRX9	Peroxyrédoxine	<b>0,265</b>	<b>0,055</b>
<b>Stress osmotique et Métabolisme carboné</b>	Bcin08g06300	nd	6-phosphofructokinase ( <b>10</b> )	<b>0,635</b>	<b>0,591</b>
	Bcin08g04730	nd	Fructose-1,6-bisphosphatase ( <b>11</b> )	<b>0,590</b>	0,815
	Bcin02g08340	TPS1	Trehalose-6-phosphatesynthase ( <b>5</b> )	<b>0,657</b>	0,722
	Bcin11g05700	BcHxk1	Hexokinase ( <b>8</b> )	<b>0,581</b>	<b>0,484</b>
	Bcin15g04970	nd	Glucose-6-phosphate isomerase ( <b>9</b> )	<b>0,629</b>	<b>0,588</b>
	Bcin11g04710	nd	Glycerol déhydrogénase ( <b>18</b> )	<b>0,440</b>	<b>0,562</b>
	Bcin08g03150	nd	Dihydroxyacétone kinase ( <b>15</b> )	<b>0,324</b>	<b>0,239</b>
	Bcin04g06400	nd	Glycerol-3-phosphate déhydrogénase ( <b>19</b> )	<b>0,589</b>	<b>0,557</b>
	Bcin16g03380	nd	Mannitol déshydrogénase ( <b>1</b> )	0,837	<b>0,501</b>
Bcin15g05600*	BcCND9	Mannitol-1-phosphate 5-déshydrogénase ( <b>3</b> )	0,767	<b>0,333</b>	
<b>Stress pariétal</b>	Bcin04g03120	BcCHSIIIa	Chitine synthase	0,697	<b>1,591</b>
	Bcin12g05370	BcCHSV	Chitine synthase	0,736	<b>1,638</b>
	Bcin02g06930	nd	1,3-bêta-glucane synthase	<b>0,491</b>	1,309



MS/MS souligne le rôle majeur de la voie osmorégulatrice sur la régulation de ces protéines, mais suggère également un lien avec la voie calcique.

L'analyse du protéome a permis d'identifier deux protéines annotées comme des oxygénases d'acides gras : PpoA80 et PpoA90. Ces deux oxygénases sont des homologues de cyclo-oxygénases présentes chez *A. nidulans*. Une analyse par BLAST, à partir de ces oxygénases de *B. cinerea*, a permis de mettre en évidence un domaine « linoleate diol synthase » dans les deux protéines. Il est donc fort probable que ces deux oxygénases soient des cyclo-oxygénases qui oxydent l'acide linoléique en oxylipine. L'analyse du contenu en PpoA80 et PpoA90 chez  $\Delta sak1$  révèle une baisse de ces deux protéines tandis que chez le mutant  $\Delta bos1$  seule PpoA90 est réduite (données non montrées).

La méthode d'extraction des protéines utilisée pour la réalisation de ce protéome nous a permis d'obtenir également des protéines membranaires. L'analyse du groupe co-régulé négativement par Sak1 et Bos1 (groupe B) révèle plusieurs transporteurs de type ABC dont l'abondance est accrue chez  $\Delta bos1$  et  $\Delta sak1$ , parmi lesquels le transporteur BcatrB, impliqué dans la sensibilité au phénylpyrroles (Schoonbeek et al., 2001; Vermeulen et al., 2001). Dans ce groupe nous constatons également la surabondance d'une protéine identifiée comme un MFS (Major facilitator superfamily) (données non montrées).

Nous nous sommes intéressés à la protéine ayant le ratio différentiel le plus important. La protéine Bcin01g10380, très abondante chez le mutant sak1 (avec un ratio de 32) a été annotée comme une NADPH-cytochrome P450 réductase. L'analyse *in-silico* (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=protcompan&group=help&subgroup=proloc>) de la localisation sub-cellulaire de la protéine a mis en avant la localisation probable au niveau de la membrane plasmique. En effet, un signal d'adressage, ainsi que des domaines transmembranaire et une ancre GPI ont été identifiées (non montrées). Toutefois, la fonction biologique précise de la protéine Bcin01g10380 est inconnue.

## 9. Interconnexion entre Bos1/Sak1 et les autres voies de signalisation

Comme mentionné dans l'introduction, nous cherchions également des connexions avec d'autres cascades de signalisation, non seulement par la recherche de modification de l'état de phosphorylation mais aussi par la modification de l'abondance de certains éléments. Chez le mutant  $\Delta sak1$  nous observons un enrichissement en protéines de signalisation. En particulier, il y a une accumulation de protéines impliquées dans la voie *via* protéine G et régulant la concentration du messenger secondaire AMPc. Ainsi nous constatons une surproduction de la protéine **BCG1**, l'une des trois sous-unités  $\alpha$  du complexe hétérotrimérique  $G\alpha\beta\gamma$  chez *B. cinerea*. Dans une moindre mesure, **CAP1**, protéine associée à l'adénylate cyclase et **PKAR**, la sous-unité régulatrice de la protéine kinase A (dépendante de l'AMPc), sont également surabondantes. Sak1 régule ainsi négativement l'abondance de ces protéines. Chez le mutant  $\Delta bos1$  il n'y a pas de différence d'abondance par rapport

au sauvage. Il semble donc exister une interconnexion entre la MAPK Sak1 de la voie osmorégulatrice et la voie *via* protéine G et AMPc.

Chez *Δsak1*, plusieurs protéines impliquées dans la voie calcique telles que deux « calcium calmodulin-dependent kinases », une « calcineurin-like phosphoesterase » ressortent également de l'analyse. Les deux « Ca<sup>2+</sup> calmodulin-dependent kinase » sont régulés de façon opposée chez *Δsak1* : BcCMK1, est plus abondante chez *Δsak1* tandis que l'abondance de la deuxième est diminuée. De façon moins importante, l'abondance d'une « calcineurin-like phosphoesterase » est légèrement augmentée. Uniquement chez le mutant *Δbos1*, un transporteur de calcium de type SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> APTase) est moins abondante que chez le sauvage (**Tableau II - 6**).

Nous constatons que la protéine kinase Cla4 est moins abondante chez les deux mutants que chez le sauvage. Chez *S. cerevisiae*, les « p21-activated kinase » (PAK) Cla4 et Ste20 ont été décrites dans une voies annexe activée par la « small GTPase » Cdc42 et activant la MAPK Hog1 (Saito and Posas, 2012). Minz-Dub and Sharon (2017) ont récemment montré chez *B. cinerea*, que la protéine Cla4 est impliquée dans le développement et dans la signalisation contrôlant l'entrée en mitose.

En conclusion, nos données révèlent clairement une interconnexion entre la voie osmorégulatrice et d'autres voies de signalisation. Notamment Sak1 joue un rôle majeur sur l'accumulation de protéines des voies dépendantes des protéines G, de l'AMPc et du calcium.

Tableau II - 6 : Protéines de signalisation des voies de signalisation AMPc, calcique et du cycle cellulaire dont l'abondance chez les mutants *Δbos1* et/ou *Δsak1* est significativement différente par rapport à la souche sauvage.

	N° Accession	Nom	Description	Abondance relative <i>Δbos1</i> /WT	Abondance relative <i>Δsak1</i> /WT
<b>Signalisation via AMPc</b>	Bcin05g06770	BCG1	Sous-unité Gα1	1,391	<b>2,429</b>
	Bcin03g07980	BcCAP1	Protéine associée à l'adenylate cyclase	1,484	<b>1,538</b>
	Bcin04g01630	BcPKAR	Sous-unité régulatrice d'une kinase AMPc dépendante	1,024	<b>1,708</b>
<b>Signalisation calcique</b>	Bcin01g09320	nd	Transporteur de calcium ATP dépendant	<b>0,574</b>	1,279
	Bcin07g04730	BcCMK1	Protéine kinase calcium calmodulin-dépendante	0,994	<b>1,742</b>
	Bcin05g04730	nd	Protéine kinase calcium calmodulin-dépendante	0,964	<b>0,422</b>
	Bcin13g05090	nd	Phosphoesterase de type calcineurin-like	1,099	<b>1,536</b>
<b>Signalisation cycle cellulaire</b>	Bcin03g02930	Cla4	Protéine kinase p21	<b>0,495</b>	<b>0,640</b>

## Discussion

Notre analyse protéomique comparative a permis d'obtenir un regard global de la régulation qu'exercent les deux composants de la voie osmorégulatrice Bos1 et Sak1.

L'analyse du protéome et du transcriptome ont tous les deux mis en évidence une action de Sak1 sur les processus de réponse aux stress et le métabolisme secondaire. Néanmoins, la comparaison des données transcriptomiques à celles obtenues en protéomique montre que seulement une fraction des données est retrouvée entre les deux études. Les données communes représentent 6,9% du protéome et 18,7% du transcriptome. La sensibilité des techniques, leurs couvertures et les seuils apportés peuvent expliquer (en partie) ce manque de recouvrement, comme par exemple, un gène identifié comme étant régulé différemment, ne conduit pas nécessairement à une protéine différemment régulée dans nos conditions. Dans un cas plus extrême, nous avons pu constater que certains gènes et protéines se retrouvent régulés de façon opposée. Ces différences d'expression et d'abondance peuvent être liées à des conditions de culture différentes et notamment à la composition du milieu de culture et à la différence entre cultures submergées et exposées à l'air. Nos cultures ayant eu lieu sur cellophane, nous devons nous interroger également sur la capacité de cette membrane à induire une réponse chez le champignon de par la nature de la surface ainsi que par le type de carbone qu'il fournit. Enfin, il se peut également que certains candidats subissent une régulation post-transcriptionnelle, voire post-translationnelle. La variation du contenu en protéine peut-être la conséquence d'une modification de l'expression des gènes dont ils découlent, mais aussi à une régulation de la traduction ou alors de la dégradation de ces protéines.

Les protéines régulées de façon inverse par Bos1 et Sak1 ne sont que très minoritaires dans le protéome total. Ce résultat est très intéressant sachant que chez *B. cinerea*, Bos1 régule négativement l'activation de la MAPK Sak1 (Liu et al., 2008). On aurait ainsi pu s'attendre à une majorité de protéines dont l'abondance est régulée négativement par Bos1 et positivement par Sak1 et inversement. Cela confirme bien que la voie n'est pas soumise à un simple mécanisme « on/off » mais à une régulation fine mettant en jeu différents états de phosphorylation. Ainsi chez  $\Delta bos1$  il a été montré que Sak1 est constitutivement phosphorylé (Liu et al., 2008). Néanmoins l'état de phosphorylation est inférieur à celle provoquée à la suite de certains stress (Liu et al., 2011; Kilani et al., non publié). Nous pouvons donc supposer que la phosphorylation de Sak1 provoquée par le mutant  $\Delta bos1$  ne corresponde pas à l'état actif de Sak1, ce qui peut expliquer pourquoi la majorité des protéines sont co-régulées dans le même sens par Bos1 et Sak1 et non inversement. L'analyse du protéome du double mutant  $\Delta\Delta bos1-sak1$  ainsi que du mutant Sak1 muté pour les résidus thréonine 171 et tyrosine 173 (phosphorylation mimée et/ou inhibée), seraient de bons moyens de répondre à cette interrogation.

L'analyse de nos données révèle que Bos1 et Sak1 régulent principalement trois processus généraux qui correspondent à l'interconnexion avec d'autres voies de signalisation, la pathogénicité et l'adaptation à certains stress.

### **1. Contrôle des protéines de résistance aux stress par la voie osmorégulatrice**

Sak1 exerce un rôle central dans l'adaptation au stress oxydatif et pariétal. Le protéome a permis de montrer le lien direct ou indirect que Sak1 exerce sur les mécanismes de détoxification des ROS. Ainsi Sak1 régule positivement la réponse au stress oxydatif et fait ainsi intervenir différentes classes d'enzymes, telles des catalases, la superoxyde dismutase, une thioredoxine, des disulfure isomérases, des glutathion-S-transférases, une glutathion réductase, une glutarédoxine et une peroxyrédoxines. La diminution du contenu de ces différentes protéines, impliquées dans la détoxification des ROS, chez le mutant  $\Delta sak1$  concorde avec son rôle dans l'adaptation au stress oxydatif et dans le pouvoir pathogène de *B. cinerea*. Néanmoins chez le mutant  $\Delta bos1$ , l'abondance des protéines impliquées dans la résistance au stress oxydatif, est moins impactée que chez  $\Delta sak1$  et notamment celle de la protéine BcSod1. Cela pourrait ainsi expliquer la tolérance de  $\Delta bos1$  aux ions superoxydes, provoqués, par exemple, par l'exposition à la ménadione. Le rôle de BcSod1 dans la génération de  $H_2O_2$  fait de cette enzyme un facteur de virulence important de *B. cinerea* (Rolke et al., 2004). Chez  $\Delta sak1$  et  $\Delta bos1$ , parmi toutes les protéines impliquées dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, la protéine Cat5 est celle dont l'abondance est la plus diminuée par rapport au sauvage. Il se pourrait alors que cette catalase joue un rôle majeur dans la résistance au stress oxydatif et serait régulée par la voie Bos1/Sak1.

On notera que l'analyse du protéome s'est faite en absence de stress oxydatif, où les mutants  $\Delta bos1$  et  $\Delta sak1$  présentent un défaut de production de protéines de détoxification. Il est fort probable que cette abondance constitutive soit indispensable en réponse à un stress oxydatif, sans toutefois nécessiter une induction. Mais il se peut également que leur présence soit également nécessaire au développement de la souche sauvage.

Ce protéome est également l'une des premières analyses en omique comparative réalisée chez un mutant de l'histidine-kinase de classe III, ce qui a permis d'avoir une vision global de la biologie du mutant et qui permettra d'avancer dans la caractérisation de cette histidine kinase et de son rôle chez *B. cinerea*. Bien que la majorité des fonctions biologiques identifiées soient co-réglées par Bos1 et Sak1, des protéines ayant une même fonction biologique peuvent être régulées indépendamment par Bos1 ou Sak1. Il est notamment fort probable que l'abondance de protéines régulées par Bos1 indépendamment de Sak1 soit régulée par Skn7, régulateur réponse et facteur de transcription en aval de Bos1 et de la protéine de phosphotransfert Hpt1 (Viefhues et al., 2015). En effet, il a été montré que Skn7 est également impliqué dans le développement et la réponse à de nombreux stress. Ainsi le

mutant  $\Delta skn7$  de *B. cinerea* est sensible au stress osmotique ionique et aux stress oxydatif. Viefhues et al. (2015) ont montré que Skn7 pouvait se fixer au promoteur du gène *glr1* (glutathion réductase) régulant ainsi son expression. Néanmoins comme il a été montré précédemment, Sak1 régule également de façon positive *Glr1*. Il est donc possible que la glutathion réductase soit régulé d'une part par Skn7 de façon directe et d'autre part par Sak1. Contrairement au mutant  $\Delta sak1$ , le mutant  $\Delta skn7$  est plus tolérant au fludioxonil, mais l'est moins que le mutant  $\Delta bos1$ . L'hypothèse émise par Izumitsu et al., (2007) est que les protéines Bos1 et Skn7 ont des rôles redondants. En effet, chez *Cochliobolus heterostrophus*, les régulateurs réponse Skn7 et Ssk1 agissent de façon additive sur l'adaptation au stress hyperosmotique et sur l'action des dicarboximides, qui ont un mode d'action très proche de celui des phénylpyrroles. Ce type de double régulation pourrait notamment s'appliquer à *glr1* chez *B. cinerea*.

La régulation de l'abondance des enzymes impliquées dans la biosynthèse du glycérol est similaire entre le mutant  $\Delta bos1$  et  $\Delta sak1$ . Selon les travaux de Liu et al. (2008), la biosynthèse de glycérol est impactée chez le mutant  $\Delta sak1$  ce qui explique sa sensibilité au stress osmotique. La même étude a montré que chez le mutant  $\Delta bos1$  il y a une production constitutive de glycérol, ce qui ne va pas dans le même sens des résultats de protéomique obtenus. Nous pouvons supposer que cela peut être dû à une régulation post-traductionnelle des enzymes.

Concernant la synthèse de chitine, les données de protéomique concordent avec l'analyse phénotypique du mutant  $\Delta sak1$  réalisée par Liu et al. (2011) où une surabondance de chitine a été observée chez ce mutant. Cette surproduction de chitine est sans doute due à une augmentation de la production en chitine synthases, entraînant ainsi une déstabilisation de la paroi et une sensibilité aux inhibiteurs pariétaux. J'ai pu montrer que Sak1 régule l'abondance de la chitine synthase BcCHSIIIa, essentielle à l'intégrité pariétale et à la virulence (Soulié et al., 2006). En ce qui concerne  $\Delta bos1$ , les résultats obtenus en protéomique ne concordent pas avec les données des travaux cités précédemment. De plus, la sous-abondance de  $\beta$ -1,3-glucan synthase chez  $\Delta bos1$  ne concorde pas avec la surproduction de  $\beta$ -1,3-glucan décrite par Liu et al. (2011). Nous devons donc envisager l'intervention d'autres enzymes et d'autres mécanismes de régulations.

## **2. Décryptage du pouvoir pathogène par protéomique chez les mutants de la voie osmorégulatrice**

Chez les mutant  $\Delta bos1$  et  $\Delta sak1$ , le défaut de pathogénicité est l'un des phénotypes les plus marqués. Connus pour participer au pouvoir pathogène chez *B. cinerea*, de nombreuses protéines du métabolisme secondaire ont été identifiées comme étant régulées par Bos1 et/ou Sak1. Ainsi la voie osmorégulatrice contrôle l'abondance de protéines impliquée dans la biosynthèse d'acide botcinic et du botrydial. Bien que la plupart des protéines du cluster Bot identifiées dans le protéome soient plus

abondantes chez *Δsak1*, la production de botrydial est très impactée selon l'étude de Heller et al., (2012). Ce résultat contradictoire peut s'expliquer par la différence des conditions de culture utilisées ou, de façon plus probable, par une ou des protéines du cluster Bot non identifiées dans le protéome et dont l'abondance serait régulée positivement par Sak1. Au vu des données protéomiques, en particulier celles concernant les clusters du métabolisme secondaire, il peut exister une forte disparité entre la régulation transcriptionnelle et l'abondance des protéines, probablement expliquée par des régulations post-transcriptionnelles et post-traductionnelles.

En plus des métabolites secondaires, la voie osmorégulatrice régule le pouvoir pathogène de *B. cinerea* notamment par la production et la sécrétion d'enzymes modifiant la paroi de la plante. L'accumulation intracellulaire d'enzymes sécrétées suggère que la voie osmorégulatrice et plus précisément Bos1, régule les mécanismes de sécrétion. En effet, nous constatons une accumulation de ces protéines principalement chez ce dernier. Parmi les protéines dont l'abondance est régulée positivement et seulement par Bos1, j'ai identifié la protéine Sas1 décrite comme Rab GTPase, nécessaire à la fixation des vésicules et à la sécrétion de protéines (Zhang et al., 2014). Bos1 semble également impliquée dans la régulation du trafic vésiculaire. En effet, l'histidine kinase régule positivement l'abondance de la protéine Bcin05g05700, homologue de la protéine Sec18 de *Saccharomyces cerevisiae* impliquée dans la fusion vésiculaire (Steel et al., 1999). Elle régule également la protéine Sey1 (Bcin15g01350), orthologue d'une « root hair defective 3 GTP-binding », décrite comme étant impliquée dans le transport des vésicules (Wang et al., 1997) (**Tableau II – S1**). Ainsi l'accumulation intracellulaire d'enzymes de dégradation pourrait être due à un défaut d'export dans le mutant *Δbos1*. Il serait alors intéressant de réaliser des observations microscopiques afin de vérifier si les mutants *Δbos1* et *Δsak1* présentent un défaut de formation et de fixation de vésicules de sécrétion ou bien de tester la sécrétion de protéines étiquetées.

Nous avons également constaté que l'accumulation de l'oxaloacétate hydrolase est régulée par la voie osmorégulatrice. L'enzyme catalyse l'hydrolyse de l'oxaloacétate en oxalate. L'acide oxalique est indispensable au pouvoir pathogène chez *S. sclerotiorum* pour le développement des nécroses (Godoy et al., 1990) et joue également un rôle important dans le pouvoir pathogène de *B. cinerea* (Nakajima and Akutsu, 2014). L'acide oxalique intervient également dans ce processus en induisant l'apoptose chez la plante (Kim et al., 2008). L'acidification du milieu par le champignon favorise la croissance de ce dernier mais aussi participe à son pouvoir pathogène. En effet, la production de plusieurs enzymes lytiques est dépendante du pH environnant. De plus l'activité de ces enzymes lytiques, sécrétées lors du processus infectieux, nécessitent un pH acide (Manteau et al., 2003).

Chez le mutant *Δsak1*, la quasi-totalité des protéines du cluster NRPS7/PKS5 sont plus abondantes. Selon R. Marschall, I. Finkemeier et P. Tudzynski (données non publiées), deux protéines du cluster (une calycine et une P450 oxydoréductase) interagissent avec la protéine NoxB. NoxB est l'une des deux sous-unités catalytiques de NADPH oxydase chez *B. cinerea*. Les NADPH oxydases sont des générateurs de ROS. NoxB joue également un rôle crucial dans la biologie du champignon,

dans la sensibilité aux stress ainsi que dans la formation de macroconidies, la pénétration de la plante, la production de ROS et la formation de structures infectieuses (Marschall et al., 2016). A partir de ces phénotypes, proches de ceux constatés lors de l'analyse fonctionnelle de Sak1, nous pouvons envisager que la surabondance des protéines du cluster NRPS7/PKS5 puisse perturber le complexe contrôlé par NoxB et ainsi participer en partie aux phénotypes observés chez *Δsak1*.

### **3. Interconnexion directe/indirecte entre la voie osmorégulatrice et d'autres voies de signalisation**

La protéine Cla4, identifiée comme sous-abondante chez les mutants *Δbos1* et *Δsak1* joue un rôle majeur dans le développement de *B. cinerea*. En effet, le mutant *Δcla4* présente de forts défauts au niveau de la pathogénicité mais aussi au niveau de la morphologie (croissance très réduite, absence de macroconidies). L'analyse fonctionnelle de Cla4 a permis de mettre en évidence son implication dans la signalisation de l'entrée en mitose. Cette signalisation fait intervenir une Rho-GTPase, BcRac, qui une fois activée et en association avec Cla4, module le passage de la phase S à la phase M. Bien qu'encore présente chez les deux mutants de la voie osmorégulatrice, l'abondance de la protéine Cla4 est (fortement) impactée. Etant donné le rôle majeur de cette protéine dans le développement et la pathogénicité il est fort probable que cette réduction d'abondance entraîne des défauts qui peuvent expliquer au moins en partie les phénotypes de *Δbos1* et *Δsak1*. Chez *Claviceps purpurea*, le rôle crucial de la protéine Rac et Cla4 dans le développement et la pathogénicité a également été montré, mais aussi dans l'équilibre des ROS (Rolke and Tudzynski, 2008). L'analyse du protéome de *B. cinerea* a permis d'établir que la voie osmorégulatrice régule, en partie, positivement l'abondance de Cla4. Néanmoins il nous est impossible d'affirmer si la régulation exercée est directe ou indirecte.

Notre étude a permis de mettre en évidence de multiples liens entre la voie osmorégulatrice et d'autres voies de signalisation. Le contrôle de l'abondance des protéines Ga1, CAP1 et PKAR semble indiquer que la voie AMPc serait directement ou indirectement contrôlée par Sak1. Toutefois les autres sous-unités de l'hétérotrimère  $G\alpha\beta\gamma$ , n'ont pas été détectées en LC-MS/MS. La sous-unité  $G\alpha$  codée par le gène *Bcbcg1* régule la concentration intracellulaire en AMPc par l'intermédiaire de l'adénylate cyclase Bac. Il serait alors intéressant de doser la concentration de ce messager secondaire chez le mutant *Δsak1*. Il a été montré que BCG1 intervient également dans la signalisation calcique indépendamment de l'AMPc par l'intermédiaire de la phospholipase C PLC1 (Schumacher et al., 2008b). Ainsi certains gènes différentiellement exprimés chez *Δbcg1* par rapport au sauvage, sont également dépendant de la voie calcique et AMPc indépendant, tels que des gènes impliqués dans la biosynthèse de botrydial (Schumacher et al., 2008a). De façon similaire, la production d'acide oxalique, régulée positivement par Sak1 et BCG1, est AMPc indépendante. De façon intéressante, des phénotypes communs ont pu être observés chez les mutants *Δsak1* et ceux de la voie calcique, notamment concernant la virulence (croissance invasive, de sécrétion de protéases, de production de métabolites secondaire et d'acide oxalique). De plus, l'abondance de la protéine kinase dépendante de

la calmodulin (BcCMK1) et d'une protéine du type calcineurine est régulée par Sak1. Chez *Δbos1* la diminution d'un transporteur de calcium pourrait entraîner une modification de la concentration cytoplasmique en ion  $Ca^{2+}$ , perturbant ainsi la réponse de la voie calcique. A cela vient s'ajouter une régulation de plusieurs protéines dépendantes de la calcineurine (CND). L'ensemble des résultats obtenus confirme bien l'interconnexion de la voie osmorégulatrice avec la voie calcique.

Bien que l'interconnexion entre la voie osmorégulatrice et protéine G soit très probable, nous ne pouvons pas conclure pour l'instant si cette connexion est directe ou indirecte. En effet, comme cela a été évoqué par Heller et al. (2012), la modification de l'abondance en protéines chez les différents mutants peut être la conséquence d'un rôle direct de ces derniers sur l'expression de gènes, mais il peut également s'agir d'effet indirect compensatoire. Toutefois la surabondance de BCG1 chez le mutant *Δsak1* nous pousse plutôt à penser que Sak1 régulerait la production de la sous-unité  $G\alpha 1$  ce qui augmenterait la production d'AMPC et activerait des protéines AMPC dépendantes. Le lien, déjà démontré, entre BCG1 et la voie calcique (Schumacher et al., 2008b) pourrait expliquer l'interconnexion identifiée en protéomique entre Sak1 et cette voie calcique. La connexion entre ces dernières se ferait donc par l'intermédiaire de BCG1. Néanmoins nous ne pouvons pas laisser de côté l'hypothèse selon laquelle Sak1 régulerait de façon distincte l'abondance de BCG1 et des protéines de la voie calcique (**Figure II - 6**).

Les données de protéomique ont permis de montrer que la pathogénicité contrôlée par la voie osmorégulatrice n'est pas seulement liée à une régulation directe de cette voie sur des processus infectieux, mais aussi à de nombreux processus, parfois régulés indirectement et favorisant la résistance du champignon lors de l'infection et le développement des nécroses.

Nous pouvons supposer que l'interconnexion entre les voies de signalisation explique en partie l'influence globale qu'exerce la voie osmorégulatrice sur le développement et la pathogénicité, par modulation d'autres voies de signalisation.

L'un des premier protéomes « shotgun » réalisé chez la souche B05.10 chez *B. cinerea* n'a permis de d'identifier que 225 protéines (Gonzalez-Fernandez et al., 2013). L'évolution des technologies et l'amélioration des techniques de spectrométrie a permis d'obtenir un protéome dix fois plus important et, par conséquent, bien plus représentatif de l'état de la cellule. Les résultats du protéome comparatif vont dans le même sens que l'analyse fonctionnelle et transcriptomique de Sak1, ainsi que l'analyse fonctionnelle de Bos1. Le protéome comparatif est donc une méthode intéressante pour l'analyse de mutants, l'évaluation du pouvoir pathogène et l'analyse du rôle d'une protéine sur la biologie d'un organisme. De plus, ce type d'analyse permet d'approfondir l'étude de la régulation de l'expression des gènes jusqu'à la production et le « turnover » des protéines *via* des régulations post-transcriptionnelles et post-traductionnelles.

Le protéome a permis d'identifier des interconnexions entre voies de signalisation, mais aussi d'identifier le rôle global de Bos1 et Sak1 sur la biologie de *B. cinerea*. Il n'est cependant pas possible

d'élucider la transmission des signaux à partir de cette technique. De plus, le protéome ne permet d'identifier que des connexions indirectes. La signalisation par modification post-traductionnelle, telle la phosphorylation, peut être analysée par phosphoprotéomique. Cette technique pourra de façon complémentaire mettre en avant une connexion directe entre les voies de signalisation. L'étude de phosphoprotéomique comparative est décrite dans le chapitre suivant.

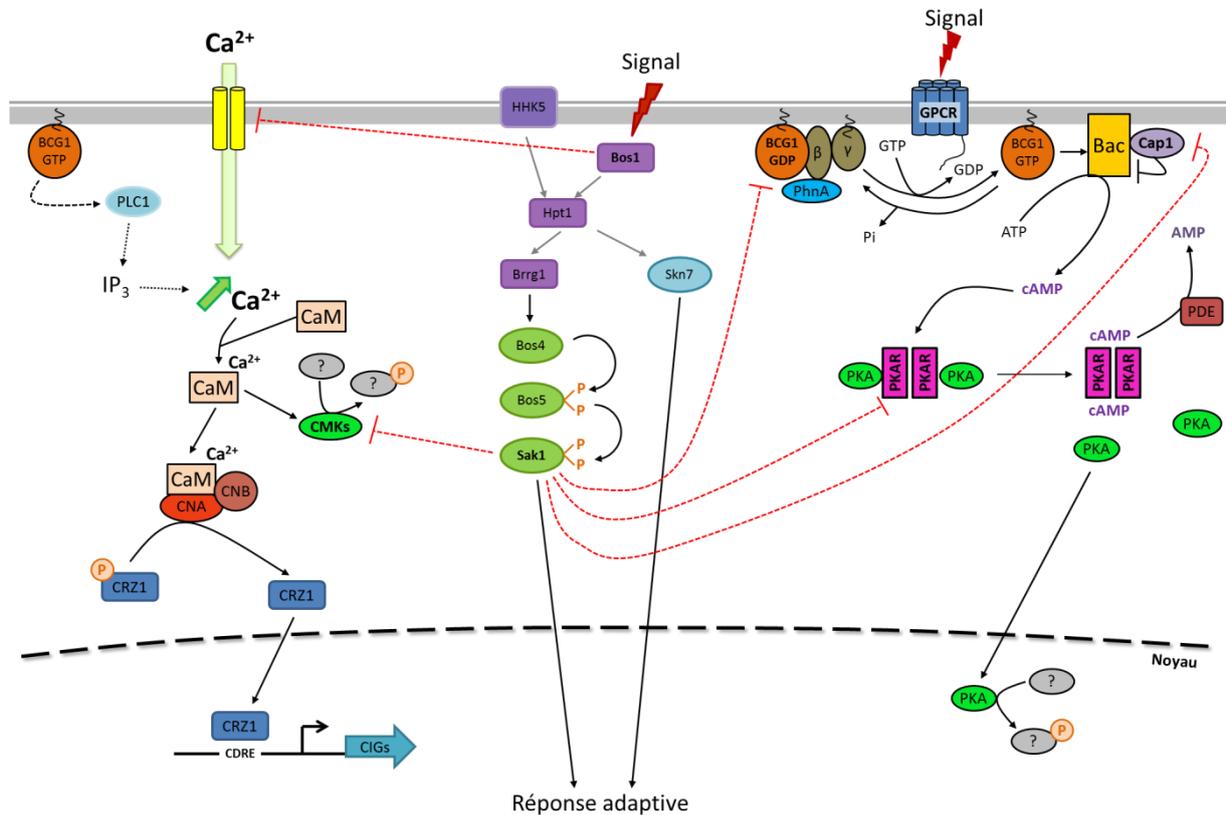


Figure II - 6 : Représentation des voies de signalisation osmorégulatrice, calcique et AMPc. Les flèches pleines noires représentent des régulations directes tandis que les flèches pointillées noires représentent des connexions nécessitant plusieurs réactions intermédiaires. L'ensemble des interconnexions suggérées par les données de protéomique sont représentées par des liens en pointillés rouges. Les barres à l'extrémité des liens représentent des régulations négatives.



Chapitre III : Analyse de la réponse au  
fludioxonil chez *B. cinerea* par  
phosphoprotéomique



## Introduction

Dans le chapitre précédent nous avons montré qu'il existe une interconnexion chez *B. cinerea* entre la voie osmorégulatrice et les voies de l'AMPC et calcique. Néanmoins l'analyse protéomique permet seulement d'identifier les effets sur l'abondance des protéines. Or, la transmission de signaux environnementaux se fait majoritairement par des modifications post-traductionnelles dont la (dé)phosphorylation.

L'analyse par phosphoprotéomique permet ainsi d'identifier l'ensemble des protéines phosphorylées dans une condition donnée. De plus en plus d'analyses phosphoprotéomiques sont réalisées chez de nombreux organismes dont les champignons (Ribeiro et al., 2017). Toutefois les analyses comparatives et quantitatives restent encore très peu répandues (voir introduction générale).

Afin d'identifier comment se fait la transmission du signal exercé par le stress fludioxonil, nous avons entrepris d'étudier les mécanismes de (dé)phosphorylation, en réponse à ce fongicide.

### **Projet pilote de phosphoprotéomique comparative en réponse au fludioxonil**

Une première analyse de phosphoprotéomique comparative a été réalisée chez *B. cinerea* avant mon arrivée au laboratoire (Davature et al., 2014 & non publié). Cette étude a consisté à analyser la réponse au fludioxonil en comparant le phosphoprotéome d'une souche sauvage traitée par le fongicide avec celui de la même souche sans traitement. Un certain nombre de phosphopeptides ont pu être identifiés comme étant différentiellement phosphorylés de façon significative, en fonction du traitement par le fludioxonil.

L'analyse par Student a mis en évidence 94 peptides différentiellement phosphorylés en présence de fludioxonil, à un seuil de 5%. Ces 94 phosphopeptides représentent au total 84 protéines. Sur l'ensemble des phosphopeptides significatifs, 50 sont phosphorylés en présence de fludioxonil tandis que 44 sont déphosphorylés en présence du fongicide. Parmi les protéines différentiellement phosphorylées en présence de fludioxonil, 14 ont été identifiées comme étant impliquées, ou pouvant être impliquées, dans des voies de signalisation (Tableau III - 1).

De façon intéressante, en présence de fludioxonil l'histidine kinase Bos1 est phosphorylée de façon significative sur la sérine 1293. Cela valide bien l'action du fongicide sur la voie osmorégulatrice même si cette sérine ne correspond à aucun site de phosphorylation connu. En ce qui concerne la MAPK Sak1 le peptide « IQDPQMTGYVSTR » a été détecté phosphorylé sur la thréonine en position 7 et/ou sur la tyrosine en position 9. Toutefois ce peptide n'a pas été détecté différentiellement phosphorylé par le traitement fludioxonil.

L'analyse phosphoprotéomique a permis de mettre en évidence une augmentation de l'état de phosphorylation d'une protéine Sch9-like, d'une protéine kinase C (PKC), d'une phosphatase-like, d'une pyruvate déshydrogénase kinase, d'une protéine associée à l'adénylate cyclase et de l'histidine kinase Bos1, suite au traitement par le fludioxonil. A l'inverse, le traitement au fludioxonil a entraîné

une déphosphorylation de trois protéines kinases, du facteur de transcription CRZ1, ainsi que de deux protéines activatrices de RhoGTPase et d'une activatrice de GTPase appartenant à une autre famille. La PKC, PhnA, Cap1, CRZ1 ainsi que les activatrices de GTPases sont impliquées dans la voie *via* protéine G et la voie calcique (Bahn and Sundstrom, 2001a; Blaauw et al., 2003; Huang, 1989; Ross and Wilkie, 2000; Schumacher et al., 2008c). Il semble donc que le fludioxonil module l'activation de ces cascades de signalisation par phosphorylation.

Tableau III - 1 : Protéines impliquées ou potentiellement impliquées dans la transduction de signaux, différemment phosphorylées en présence de fludioxonil. En jaune sont représentées les protéines phosphorylées en présence de fludioxonil, tandis que les protéines déphosphorylées sont indiquées en vert.

ID	Nom	Description	Pfam	p-value	Abondance relative phosphopeptide traité/non traité
Bcin11g06110	BPK2	Sch9-like (protéine dépendante de l'AMPc)	PF00069.20(Pkinase) + PF00433.19(Pkinase_C)	0,030	3,033
Bcin12g04680	BcPKC1	Protéine kinase C	PF02185.11(HR1) + PF02185.11(HR1) + PF00130.17(C1_1) + PF00130.17(C1_1) + PF00069.20(Pkinase) + PF00433.19(Pkinase_C)	0,014	2,042
Bcin08g01410	BcPhnA	Phosducin-like	PF02114.11(Phosducin)	0,005	2,031
Bcin13g04630	nd	AGC PDK1 kinase	PF00069.20(Pkinase)	0,045	1,682
Bcin03g07980	BcCap1	Protéine associée à l'adénylate cyclase	PF01213.14(CAP_N) + PF08603.6(CAP_C)	0,019	1,519
Bcin01g06260	Bos1	Histidine-kinase (Système à 2 composants)	PF00672.20(HAMP) + PF00672.20(HAMP) + PF00672.20(HAMP) + PF00512.20(HisKA) + PF02518.21(HATPase_c) + PF00072.19(Response_reg)	0,014	1,360
Bcin03g06910	YAK1	DYRK YAK1 kinase	PF00069.20(Pkinase)	0,032	0,900
Bcin06g06640	nd	Protéine activatrice de Rho GTPase (GAP)	PF00611.18(FCH) + PF00610.16(DEP) + PF00620.22(RhoGAP)	0,029	0,846
Bcin01g06420	nd	« ADP-ribosylation factor (ARF) » activant la GTPase (Csx2)	PF00169.24(PH) + PF01412.13(ArfGap)	0,044	0,680
Bcin11g05130	nd	Serine threonine kinase Cot-1	PF00069.20(Pkinase)	0,012	0,626
Bcin01g08230	BcCRZ1	Facteur de transcription « C2H2 »	PF13465.1(zf-H2C2_2)	0,034	0,581
Bcin04g03430	nd	Serine/threonine protéine kinase ; Caseine kinase	PF00069.20(Pkinase)	0,011	0,580
Bcin15g05240	nd	« ADP-ribosylation factor (ARF) » activant la GTPase	PF01412.13(ArfGap)	0,047	0,444

Toutefois lors de cette étude, la culture liquide et la récupération du mycélium ont souvent entraîné une activation de la protéine Sak1. En prenant en compte et en s'adaptant à cette difficulté, nous avons procédé à une nouvelle analyse de phosphoprotéomique comparative quantitative en présence ou en absence de fludioxonil chez la souche sauvage de *B. cinerea*. De plus, afin de décrypter les voies de signalisation nous avons entrepris d'analyser dans les mêmes conditions le phosphoprotéome de deux mutants de la voie osmorégulatrice,  $\Delta bos1$  et  $\Delta sak1$ . Ce chapitre va, dans un premier temps exposer l'ensemble des données obtenues à l'issue de cette analyse et les mettre en relation avec celles obtenues lors de l'analyse préliminaire. Dans un deuxième temps nous allons mettre en avant les nombreux freins à l'analyse phosphoprotéomique quantitative chez les champignons filamenteux et dans ce cas-ci, chez *B. cinerea*.

## Matériel et Méthodes

Les paragraphes « Souches, milieu et conditions de culture », « Extraction de protéines totales » et « Dosage protéique » sont identiques à celles présentées dans la partie matériel et méthodes du chapitre II.

### Contrôle de l'état de phosphorylation de Sak1 par Western Blot :

Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide 10% en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Le gel a ensuite été transféré sur membrane PVDF (Bio-Rad) par transfert semi-sec à 15 V pendant 20 min. Après blocage pendant 1 h à température ambiante dans une solution de TBS-T (Tris-Buffered Saline 1x (Tris-HCl 50 mM pH 7,6, NaCl 150 mM), 0,5% Tween 20) avec du lait écrémé en poudre à 5%, la membrane a été hybridée pendant la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire anti-phospho p38 (Cell Signaling, Etats-Unis), dilué au 1:1000 dans du TBS-T. Après 3 rinçages avec du TBS-T, la membrane a été hybridée avec l'anticorps secondaire couplé à la Horseradish Peroxydase (HRP) (Cell Signaling, Etats-Unis), dilué au 1:2000 dans du TBS-T, pendant 1 h à température ambiante et sous agitation. Après rinçage de la membrane au TBS-T, l'Immobilon Western HRP kit (Merck Millipore, Allemagne) a été utilisé, selon les consignes du fournisseur, comme réactif pour la réaction de chemiluminescence, révélée sur film autoradiographique « UltraCruz » (Santa Cruz Biotechnology, Etat-Unis).

### Digestion des protéines

750 µg de protéines extraites ont été prélevés et le volume ajusté avec du tampon ZUT afin d'ajuster la concentration à 8 µg/µL. Les échantillons ont été alkylés avec de l'iodoacétamide (concentration finale de 50 mM) pendant 1 h à température ambiante et à l'obscurité. Les échantillons ont ensuite été dilués avec une solution de bicarbonate d'ammonium 50 mM, de façon à réduire la concentration en urée à 1 M. Les échantillons ont alors été digérés pendant la nuit à 37°C avec 20 µg de trypsine (Promega, États-Unis). La digestion a été stoppée en ajoutant 5 µL de TFA (Trifluoroacetic acid) à 100%, puis incubés 30 min à température ambiante afin de cliver le ZALS. Les extraits peptidiques ont été dessalés sur colonne C18 (Strata™XL 100µm Polymeric Reversed Phase – Phenomenex, États-Unis).

### Dessalage et marquage isotopique

Les peptides ont été marqués à partir d'isotope stable (Boersema et al., 2009) tout en étant dessalés sur colonne C18 (Sep-Pak 3cc Vac Cartridge 55-105µm – Waters Corporation, États-Unis).

Marquage Léger : Formaldehyde CH<sub>2</sub>O + Cyanoborohydride NaBH<sub>3</sub>CN (+28 Da)

Marquage Intermédiaire : Formaldehyde Deutééré CD<sub>2</sub>O + Cyanoborohydride NaBH<sub>3</sub>CN (+32 Da)

Marquage Lourd : Formaldehyde Deutééré <sup>13</sup>CD<sub>2</sub>O + Cyanoborodeuteride NaBD<sub>3</sub>CN (+36 Da)

Les échantillons marqués ont ensuite été mélangés, afin de former des triplex selon l'association représentés ci-contre (**Tableau III - 2**), puis séchés.

Tableau III - 2 : Répartition des extraits protéique dans chaque triplex. « Ø » correspond aux échantillons non traités tandis que « F » correspond aux échantillons traités par le fludioxonil.

<b>Triplex</b>	<b>Léger 28:</b>	<b>Intermédiaire 32:</b>	<b>Lourd 36:</b>
Tx1	Témoin tech 1	WT Ø R1	WT F R1
Tx2	Témoin tech 2	WT Ø R2	WT F R2
Tx3	Témoin tech 3	WTF R3	WT Ø R3
Tx4	Témoin tech 4	Δsak1 Ø R1	Δsak1 F R1
Tx5	Témoin tech 5	Δsak1 F R2	Δsak1 Ø R2
Tx6	Témoin tech 6	Δsak1 F R3	Δsak1 Ø R3
Tx7	Témoin tech 7	Δbos1 F R1	Δbos1 Ø R1
Tx8	Témoin tech 8	Δbos1 Ø R2	Δbos1 F R2
Tx9	Témoin tech 9	Δbos1 Ø R3	Δbos1 F R3

## **Enrichissement en phosphopeptides**

### **Fractionnement SCX**

L'ensemble des triplex ont été repris dans 500 µL de tampon de reprise (30% CH<sub>3</sub>CN, 0,5% acide formique). Pour chaque triplex, les 500 µL ont été injectés en chromatographie SCX (Strong Cation Exchange chromatography) utilisant une colonne ProPac Sax-10 (Thermo Scientific, Etats-Unis). La colonne a été éluée avec un tampon d'éluion (30% CH<sub>3</sub>CN, 0,5% acide formique, formiate d'ammonium 540 mM) à un débit de 200µL/min. Dix fraction de 300 µL ont été récupérées puis séchées.

### **Enrichissement IMAC**

Chaque échantillon a été resuspendu dans du solvant A (acide acétique 250 mM, 30% CH<sub>3</sub>CN). 60 µL de billes IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) ont été ajoutées dans chaque échantillon lesquels ont été incubées à température ambiante sous agitation pendant 60 min. Après une courte centrifugation le surnageant a été transféré dans un tube avec de nouvelles billes. Trois passages sur matrice IMAC ont ainsi été réalisés. Chaque fraction ont été rincées deux fois avec 300 µL de solvant A puis une fois avec 300 µL d'eau ultra pure. L'éluion a été réalisée à trois reprises avec 40 µL de solvant B (NH<sub>4</sub>OH, 30% CH<sub>3</sub>CN). Après une courte centrifugation, les éluats sont récupérés et 40 µL d'une solution de 10% d'acide formique ont été ajoutés afin de neutraliser le pH.

### **Analyse LC-MS/MS**

Tous les triplex ont été repris dans un tampon composé de 2% CH<sub>3</sub>CN et 0,05% d'acide formique. Pour chaque triplex 4 µL du mélange enrichi en phosphopeptide ont été injectés et séparés par HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) NanoLC 400 (Eksigent, Royaume-Unis). La

chromatographie utilise une colonne C18 de 30 cm (Nanoseparations, Pays-Bas) et un gradient d'un tampon 99,9% CH<sub>3</sub>CN + 0,1% acide formique, suivant les étapes suivantes : 5% à 35% de tampon pendant 110 min ; 35% à 95% de tampon pendant 3 min ; 95% de tampon pendant 10 min. L'injection dans le spectromètre de masse QexactivePLUS (Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis) a été réalisée à partir d'une source nano-electrospray (New Objective, Etats-Unis).

L'ensemble du couplage a été piloté par Xcalibur 2.3 avec la méthode d'acquisition suivante : l'acquisition des spectres MS a été réalisée sur une gamme m/z = 350 – 1400 avec une résolution de 70000. Les douze ions les plus intenses (Top 12) ont subi une fragmentation HCD (Higher energy Collisional Dissociation) avec une énergie de collision de 27%, obtenant ainsi un spectre MS/MS acquis à une résolution de 17500. Une exclusion dynamique fixée à 30 sec a été utilisée.

L'identification des peptides a été réalisée à l'aide du logiciel X!Tandem (Craig and Beavis, 2004) (version PILEDRIIVER 01/04/2015) où des modifications de masse ont été indiquées. Les modifications de masse correspondant à la carbamidométhylation des cysteines (57,02146 Da), au marquage léger (28,0313 Da), au marquage intermédiaire (32,0564 Da) et au marquage lourd (36,0756 Da) ont été déclarées comme modifications systématiques. Des modifications potentielles ont été ajoutées telles que l'oxydation des méthionines (15,99491 Da), la phosphorylation de la sérine, thréonine et tyrosine (79,96633 Da). La tolérance de la masse du précurseur était de 10 ppm tandis que celle du fragment était de 0,02 Da. Un seul « missed cleavage » a été autorisé.

La base de données de *B. cinerea* fournie au logiciel a été récupérée à partir du site Ensembl ([http://fungi.ensembl.org/Botrytis\\_cinerea/](http://fungi.ensembl.org/Botrytis_cinerea/)) et préalablement ré-annotée fonctionnellement sur UseGalaxy à partir des données publiées (Amselem et al., 2011) et des annotations automatiques obtenues avec Pfam (Finn et al., 2016). Une base de données comprenant des contaminants standards a également été ajoutée. Les protéines identifiées ont été filtrées et groupées avec X!Tandem Pipeline 3.4.1 Elastine durcie (Langella et al., 2017).

Deux traitements ont été réalisés : le mode « combine » et le mode « phosphopeptides ». Le mode « combine » prend en compte l'ensemble des échantillons pour l'étape d'identification des protéines. Les données présentant une E-value peptide < 0,01, au minimum deux peptides par protéines et une E-value pour les protéines de 10<sup>-4</sup> ont été retenues. La FDR (false discovery rate) a été estimée à 0,15% pour les peptides et 0,13% pour les protéines. Le mode « phosphopeptides » ne prend en compte que les phosphopeptides. Les données présentant une E-value peptide < 0,001, au minimum un peptide par protéine et une E-value pour les protéines de 10<sup>-3</sup> ont été retenues. La FDR (false discovery rate) a été estimée à 0,06% pour les peptides et 1,07% pour les protéines.

## Quantifications, analyses statistiques et annotations

La quantification des peptides se fait à partir des données XIC grâce au logiciel libre MassChroQ (v2.2) (Valot et al., 2011). Le « peak counting » (PC) est quant à lui, le comptage du nombre de pics MS1 utilisé en XIC. Le « spectral counting » (SC) est le comptage du nombre de spectres MS2 ayant permis l'identification d'une protéine dans un échantillon donné.

L'ensemble des analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R. Les données de XIC ont été normalisées de la façon suivante : après transformation  $\log_{10}$  des intensités, pour chaque phosphopeptiz, la différence entre l'échantillon (marqué intermédiaire ou lourd) d'un triplex et la référence (témoin technique marqué léger) du même triplex a été calculée. La médiane de cette différence a été calculée pour chaque échantillon et cette valeur a été soustraite à chaque phosphopeptiz de cet échantillon. La comparaison entre une souche traitée et non traitée a été réalisée par un test de Student pairé, de façon à ne prendre en compte que les différences intra-triplex. Les phosphopeptides présentant une variation significative ( $p$ -value < 0,05) entre les différents traitements ont été sélectionnés. La normalisation se présente sous la formule suivante :

$\text{fact.normal}(\text{échantillon}) = \text{mediane}(\log_{10}(\text{intensité.peptiz}(\text{échantillon})/\text{intensité.peptiz}(\text{référence})))$

$\text{intensité.normalisée.peptiz}(\text{échantillon}) = \log_{10}(\text{intensité.peptiz}(\text{échantillon})) - \text{fact.normal}(\text{échantillon})$

## Résultats

### 1. Mise au point des conditions de culture

#### 1.1. Courbe de croissance

Lors de la première étude phosphoprotéomique, les cultures de *B. cinerea* ont été réalisées en milieu liquide. Cependant la récupération du mycélium entraîne souvent la phosphorylation de Sak1, probablement liée à un stress mécanique. Pour éviter cela, nous avons choisi de réaliser des cultures sur milieu solide. La courbe de croissance pour chacune des souches a été établie afin de traiter au fludioxonil chacune des souches au même état physiologique. Pour cela, les pré-cultures des mutants  $\Delta bos1$  et  $\Delta sak1$  ont été réalisées à partir de quatre explants contre un seul pour la souche sauvage. Après broyage et culture, le poids sec a été mesuré pour chaque souche au cours d'une semaine (Figure III - 1). Pour l'ensemble des souches nous constatons que la phase exponentielle de croissance s'étend du jour 0 au jour 3. Nous avons donc décidé d'appliquer le traitement fludioxonil après deux jours de croissance.

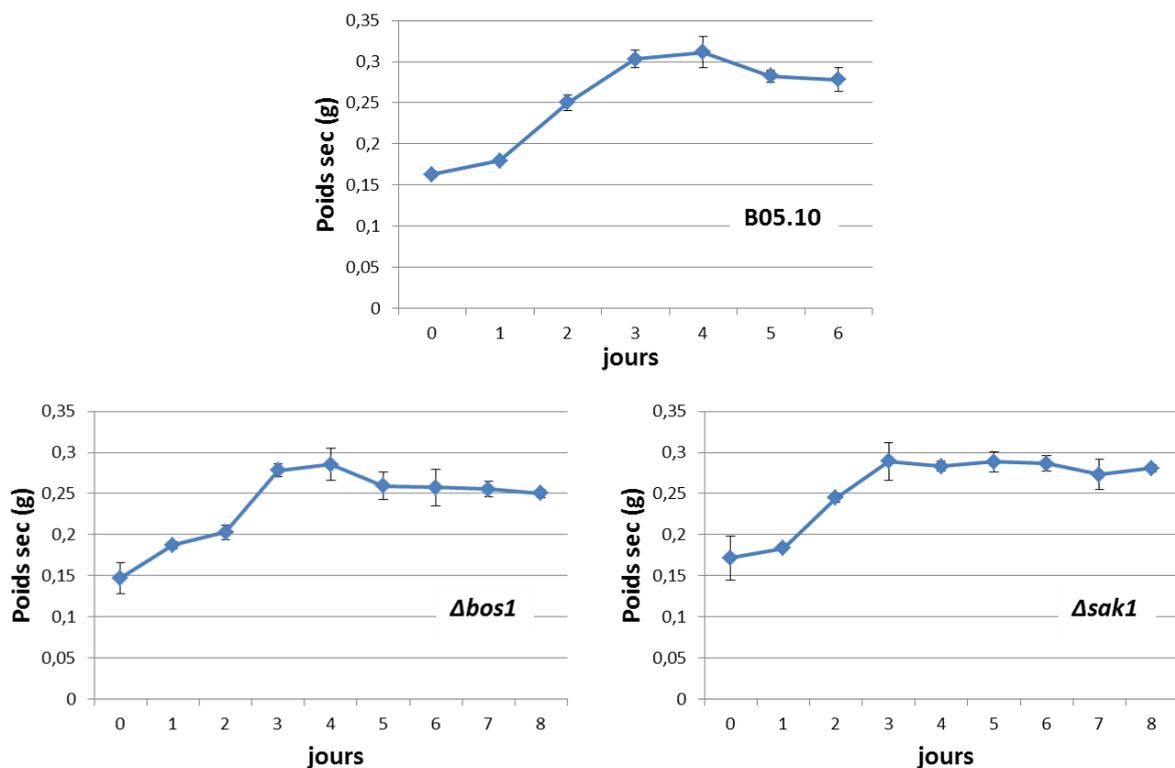


Figure III - 1 : Courbes de croissances des mutants  $\Delta bos1$ ,  $\Delta sak1$  et de la souche sauvage. Les cultures ont été réalisées sur milieu SISLER et cellophane. Les souches ont été inoculées du jour 0 au jour 7, puis séchées 24h à 60°C. Trois réplicats ont été réalisés pour chaque souche.

## 1.2. Contrôle de l'induction de la phosphorylation de la MAPK Sak1

Comme mentionné précédemment, l'état de phosphorylation de Sak1 est dépendant de nombreux stress. L'application d'un stress mécanique pouvant moduler l'état de phosphorylation de la protéine, nous avons alors contrôlé l'état de phosphorylation de Sak1 pour les conditions traitées et non traitées avec le fludioxonil. Ainsi chez les différents réplicats de la souche sauvage, nous constatons une absence de phosphorylation de Sak1 en conditions non traitées, tandis qu'en présence de 10 µg/mL de fludioxonil pendant 15 min, la protéine est détectée comme phosphorylée dans les quatre réplicats. Une phosphorylation constitutive de Sak1 chez le mutant  $\Delta bos1$  a précédemment été démontrée (Liu et al., 2008). Nous constatons également, de notre part, une phosphorylation constitutive de Sak1. Toutefois le niveau de phosphorylation de la protéine est inférieur à celui détecté chez la souche sauvage après le traitement au fludioxonil.

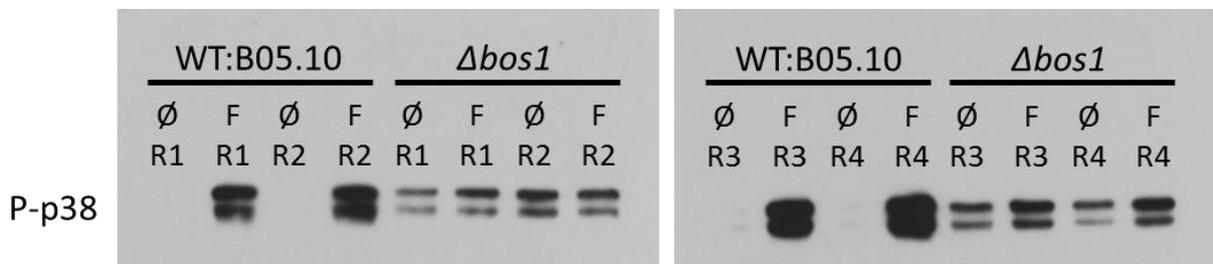


Figure III - 2 : Niveau de phosphorylation de la MAPK Sak1 chez la souche sauvage et le mutant  $\Delta bos1$  en présence et en absence de fludioxonil. Les protéines ont été extraites de cultures soumises à 10 µg/mL de fludioxonil pendant 15 min. La phosphorylation de Sak1 a été révélée par l'hybridation avec l'anticorps anti-phospho p38. La même quantité totale de protéines (5 µg) a été déposée dans chaque puits.

## 2. Principales étapes expérimentales

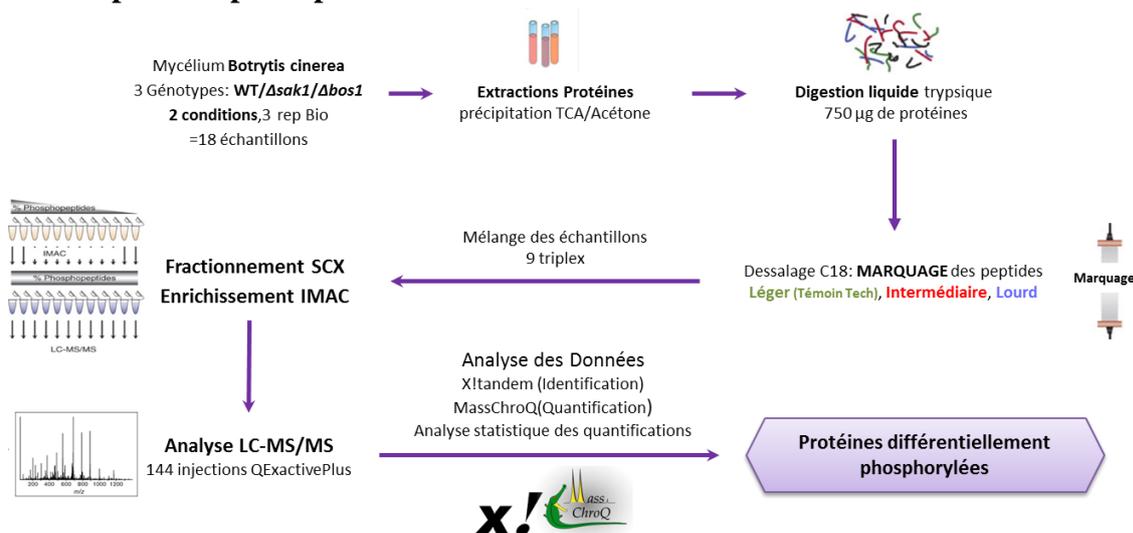


Figure III - 3 : Déroulement des étapes de l'analyse phosphoprotéomique.

## 2.1. Digestion trypsique

L'analyse phosphoprotéomique est basée sur l'identification des phosphopeptides. La digestion enzymatique de l'ensemble des protéines pour chaque échantillon a été réalisée avec la trypsine. L'arrêt de la digestion a été faite par ajout d'acide trifluoroacétique. Pour un même peptide il peut exister plusieurs états de charge, que l'on nomme peptiz.

Après l'arrêt de la digestion nous avons constaté qu'un précipité était apparu dans chaque échantillon. Les peptides ne précipitant pas dans ces conditions, les précipités formés correspondent probablement à des protéines. La présence de protéines non digérées révèle ainsi une digestion partielle par la trypsine. Il se peut alors que la quantité de peptides disponibles soit réduite.

## 2.2. Décomplexification des échantillons

Les échantillons ont été décomplexifier par chromatographie SCX (échangeuse de cation) afin d'obtenir une meilleure profondeur d'analyse (Figure III - 4). Chaque triplex a ainsi été fractionné en fonction de l'état de charge des peptides.

Lors du passage des triplex 1 et 2, 10 fractions par triplex ont été récupérées. Après passage du troisième triplex, l'appareil à chromatographie a subi une panne majeure empêchant de poursuivre cette étape pour les autres triplex. Chacun des trois premiers triplex, correspondant à la souche sauvage, ont donc été à nouveau réassemblés afin d'être traité de façon identique aux mutants  $\Delta bos1$  et  $\Delta sak1$ , qui ne sont pas passé sur colonne SCX.

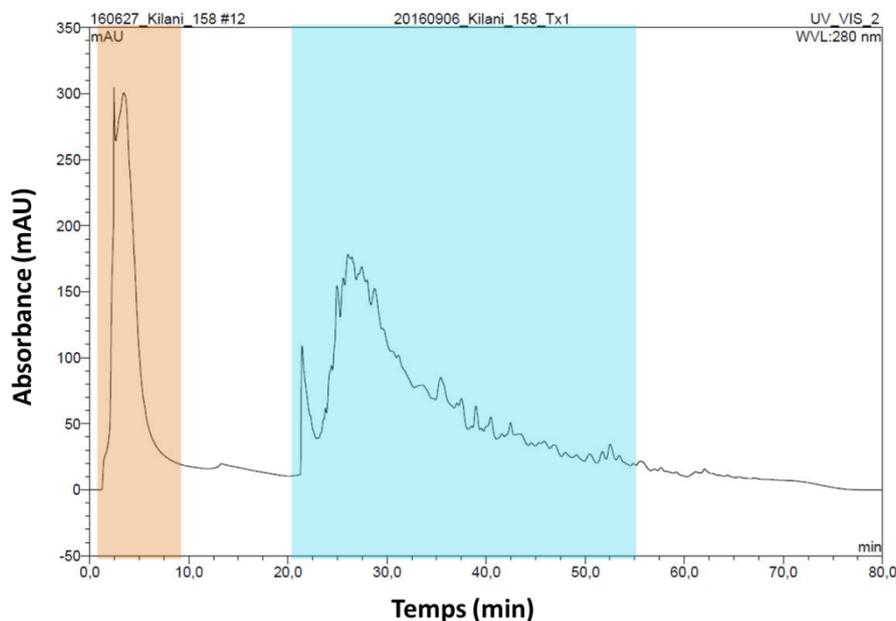


Figure III - 4 : Chromatogramme du triplex 1 lors du passage sur chromatographie échangeuse de cation (SCX). La figure représente l'absorbance à 280 nm des différents composés présents dans le triplex 1 en fonction du temps d'éluion. Le rectangle orange représente des composés non retenus par la colonne et non récupérés. Le rectangle bleu représente l'ensemble des fractions récupérées au cours de l'éluion.

### 2.3. Marquage isotopique et enrichissement en phosphopeptides

Le marquage isotopique permet le multiplexage des échantillons issus des souches traitées, non traitées et du témoin technique formant ainsi un triplex. Pour être analysé, un phosphopeptide doit se retrouver marqué de trois façons différentes : Léger pour le témoin technique, intermédiaire ou lourd pour le phosphopeptide issus de la souche non traitée et inversement pour la souche traitée.

En analysant la proportion de phosphopeptides pour chaque isotope et dans chaque triplex, nous constatons une quantité équivalente de phosphopeptides entre les marquages légers et intermédiaires tandis que la quantité de phosphopeptides avec le marquage lourd est deux fois moins importante que les deux autres marquages (**Figure III - 5A**).

Sur l'ensemble des échantillons il y a eu un défaut de marquage lourd. Ce défaut est susceptible d'entraîner une diminution de l'identification des protéines différenciellement phosphorylées.

De plus, dans les triplex 4 à 9, nous constatons quatre fois moins de phosphopeptides que dans les triplex 1, 2 et 3. Il semble donc qu'il y ait eu un problème lors de l'enrichissement. En effet, lorsque l'on étudie l'enrichissement en phosphopeptides, réalisé par chromatographie d'affinité sur matrice IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography), nous constatons un pourcentage d'enrichissement de 90-100% pour les triplex 1, 2 et 3, tandis que dans le cas des triplex 4 à 9 le pourcentage d'enrichissement est inférieure à 20% (**Figure III - 5B**).

En conclusion, un défaut d'enrichissement des phosphopeptides est retrouvé dans les triplex correspondant aux mutants  $\Delta sak1$  et  $\Delta bos1$ , tandis que chez les triplex correspondant à la souche sauvage l'enrichissement a fonctionné.

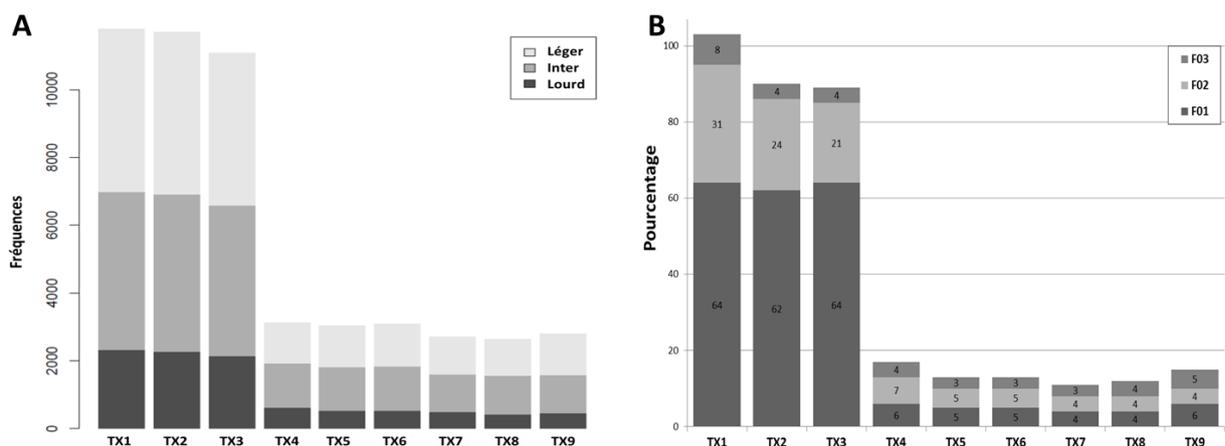


Figure III - 5 : **A**/Fréquence des phosphopeptides marqués pour chaque triplex. Pour chaque histogramme les sections gris clair, gris et gris foncé représentent respectivement les fréquences des marquages légers, intermédiaires et lourds. **B**/Pourcentage d'enrichissement en phosphopeptides pour chaque triplex. Pour chaque triplex, le pourcentage des trois fractions récupérées en IMAC est représenté sur l'historgramme.

### 3. Impact du fludioxonil sur l'état de phosphorylation de nombreuses protéines

En raison du faible nombre de phosphopeptides obtenus pour les triplex 4 à 9, associé au défaut de marquage par l'isotope lourd, aucun phosphopeptide n'est sorti de l'analyse comme étant différentiellement phosphorylé entre les conditions traitées et non traitées par le fludioxonil. Il n'y a donc pas de données phosphoprotéomiques disponibles pour les mutants  $\Delta bos1$  et  $\Delta sak1$ . Par conséquent, seuls les triplex 1 à 3, en condition traitée et non traitée, ont été analysés. Étant donné que les peptides marqués avec l'isotope lourd sont sous-représentés en comparaison au marquage léger et intermédiaire, entraîne un biais faisant passer la FDR à plus de 5%. Les résultats qui suivent, bien que significatifs, doivent donc être considérés avec précautions.

Pour chacun des trois triplex correspondant à la souche sauvage, les données XIC des phosphopeptides ont été analysées. Afin d'identifier les protéines différentiellement phosphorylées en fonction du traitement, une analyse par Student pairée a été réalisée pour chacun des trois triplex entre marquage intermédiaire et lourd. 31 phosphopeptides issus de 31 protéines ont ainsi été identifiés comme différentiellement phosphorylés à un seuil de 5%. Parmi elles, 20 protéines sont phosphorylées en présence de fludioxonil tandis que 11 sont déphosphorylées (Tableau III - 3). L'analyse qualitative par peak counting (PC) a également permis d'identifier des protéines différentiellement phosphorylées en fonction du traitement. Ainsi, la recherche de peptides apparaissant comme différentiellement phosphorylés a mis en évidence 10 protéines où un même résidu (dé)phosphorylé a été retrouvé dans les trois réplicats (Tableau III - 4).

Parmi les protéines différentiellement phosphorylées en présence de fongicide, nous pouvons trouver des protéines impliquées dans des **voies de signalisation**. Nous constatons également que la glucokinase Glk est retrouvée phosphorylée en présence de fludioxonil, reflétant l'action de ce dernier sur la voie de **réponse au stress osmotique**.

En étudiant les protéines impliquées dans des voies de signalisation autres que la voie osmorégulatrice, deux protéines activatrices de GTPases pouvant être liées à la voie via protéine G sont phosphorylées pour l'une et déphosphorylées pour l'autre, après traitement au fludioxonil. La sous-unité régulatrice de la protéine kinase AMPc-dépendante, PKAR, a été identifiée déphosphorylée sur la sérine 55 en présence de fludioxonil. L'analyse par peak counting a permis de mettre en évidence une protéine de type « arrestin » déphosphorylée en présence de fludioxonil.

Parmi les protéines phosphorylées en présence de fludioxonil, la protéine kinase Wee1, impliquée dans la signalisation du cycle cellulaire, a été identifiée phosphorylée sur la sérine 602 en présence du fongicide. D'autres protéines kinases sont différentiellement phosphorylées tels que la protéine Bcin04g05320 et la protéine Cot-1, toutes les deux déphosphorylées après traitement.

Concernant les protéines effectrices des signaux, l'analyse phosphoprotéomique a également permis d'identifier différents facteurs de transcription. Ainsi, le facteur de transcription XlnR est

phosphorylé sur la sérine 227 en présence de fludioxonil. Les facteurs de transcription Cys6 et un autre, identifié comme se fixant au motif CCAAT, sont quant à eux déphosphorylés en présence de fludioxonil. Ces derniers n'ont pas encore été caractérisés chez *B. cinerea*. De façon intéressante, les données de peak counting ont permis de mettre en évidence le facteur de transcription de réponse à la lumière LTF1 (Schumacher et al., 2014) comme étant phosphorylé sur la sérine 185 en présence de fludioxonil. Ce fongicide pourrait donc agir sur la voie de signalisation de réponse à la lumière.

La recherche d'autres protéines impliquées dans la régulation de l'expression de gènes a permis de mettre en évidence une protéine possédant un domaine dpy-30, déphosphorylée sur la thréonine 138 en présence du fongicide. Ce domaine est décrit comme étant impliqué dans la régulation de la structure chromatinienne de l'ADN (Nagy et al., 2002). A partir des données de peak counting, nous identifions une protéine déphosphorylée sur la sérine 667 après traitement. Cette protéine est annotée comme étant une « Myb-like », également impliquée dans le remodelage de la chromatine (Boyer et al., 2004).

En plus de l'effet putatif du fludioxonil sur l'expression des gènes, nous avons également étudié l'effet du fongicide sur la modification de l'état de phosphorylation de protéines impliquées dans la traduction. Nous constatons ainsi qu'au sein des facteurs d'initiation de la traduction, la sous-unité eIF-4G du complexe eIF-4F est phosphorylée sur la sérine 927 en présence de fludioxonil. L'analyse par peak counting a permis de mettre en évidence un autre phosphopeptide de la protéine identifié comme étant déphosphorylé sur la sérine 108.

En conclusion, l'ajout de fludioxonil serait susceptible de moduler l'activation de voies de signalisation autres que la voie osmorégulatrice. Le traitement au fludioxonil modifierait également la régulation de l'expression de différents gènes ainsi que le processus traductionnel de la cellule.

A partir des 10 protéines identifiées en peak counting, nous notons trois protéines impliquées dans le transport vésiculaire (Tableau III - 4). La protéine BcSey1, orthologue d'une « Root hair defective 3 GTP-binding protein » (RHD3) est phosphorylée en présence de fludioxonil. La protéine Bcin03g04970 possède un domaine ENTH, présent chez les adaptateurs de clathrine (Ford et al., 2002) tandis que la protéine Bcin13g05460 possède un domaine VHS important pour le transport vésiculaire (Lohi et al., 2002).

Le fludioxonil modifierait donc l'état de phosphorylation de protéines impliquées dans le transport et l'encrage des vésicules.

#### 4. Comparaison des résultats obtenus entre la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> analyse phosphoprotéomique

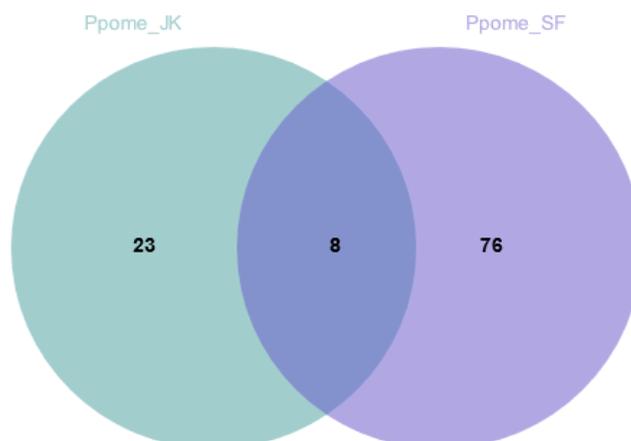


Figure III - 6 : Comparaison des protéines identifiées en XIC dans les deux études de phosphoprotéomique. Le diagramme de Venn a été réalisé avec l'outil en ligne « jvenn » (Bardou et al., 2014).

Le nombre de protéines candidates obtenues lors de cette étude est trois fois inférieur au nombre obtenu dans le premier projet de phosphoprotéomique comparative. Huit protéines différemment phosphorylées sont communes entre ces deux études. En nous y intéressant, nous constatons que l'état de phosphorylation de six protéines sur huit est modulé de la même manière entre les deux études. Ainsi les protéines Bcin03g06810, Bcin12g02060, Bcin13g00620, Bcin14g02590 sont identifiées comme phosphorylées en présence de fludioxonil, tandis que les protéines Bcin02g03320, Bcin11g05130 sont identifiées comme déphosphorylées. Toutefois lorsque l'on analyse l'ensemble des phosphosites identifiés, nous constatons qu'ils sont différents d'un phosphoprotéome à l'autre pour une même protéine.

En conclusion, il existe une forte disparité des résultats obtenus entre les deux analyses par phosphoprotéomique.

Tableau III - 3 : Protéines différentiellement phosphorylée en présence de fludioxonil, extraites de l'analyse quantitative par les XIC

ID	Nom	Description	Séquence	Modifications	Positions	Ratio traité/non traité	p-value
Bcin09g04100	nd	Pal1 (morphologie cellulaire)	RVTSDSIGESSR	S6:+79.96633 T3:+79.96633	476 ; 479	6,555	0,0452
Bcin14g01970	nd	nd	RIELQGEGDDGLTSPGAR	S14:+79.96633	497	6,489	0,0189
Bcin12g04990	nd	Division mitochondriale	SMPILHEHFEPGSSIR	S1:+79.96633	302	5,238	0,0452
Bcin07g01380	nd	Activatrice de GTPase	DTSSTSTPHIAFQDK	S3:+79.96633	328	4,191	0,0233
Bcin07g06650	nd	Phosphatase regulator	SPATSTTHSPAUSR	S1:+79.96633 S9:+79.96633	10 ; 18	3,766	0,0065
Bcin13g00620	nd	Jsn1 (fixation à l'ARN)	ARTAGVLDSPNTR	T3:+79.96633	382	3,511	0,0009
Bcin09g04550	BcWee1	WEE kinase	QASSFSHFQNGSPTSHR	S12:+79.96633	602	3,006	0,0272
Bcin14g02590	nd	Som1 (maturation de protéines mitochondriale)	RGTPHMNNPGIPSPLPEGQNR	T3:+79.96633	435	2,877	0,0059
Bcin07g01450	nd	Protéine à domaine de reconnaissance de l'ARN	RNSQQFAPPTGPSAPAFNNPNMGP SMGHQNGSR	N18:+0.98402 S3:+79.96633	89	2,826	0,0375
Bcin06g00790	nd	Ribose-phosphate diphosphokinase	SGHRNSVGASSPLIR	S6:+79.96633	291	2,615	0,0241
Bcin03g04940	nd	nd	AGSNDRPHGIFGFSR	S3:+79.96633	156	2,446	0,0470
Bcin03g06810	nd	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma (eIF-4G)	TNSTNSMPHSPR	S3:+79.96633	927	2,240	0,0037
Bcin08g01730	nd	nd	RDSMPMVGPSR	S3:+79.96633	71	2,103	0,0111
Bcin09g02650	nd	Rgp1	RQSIIEPATAK	S3:+79.96633	614	1,977	0,0405
Bcin01g09080	nd	Duf221 domain	RSDPGINIAGENIGINRPPGNIR	S3:+79.96633	758	1,870	0,0482
Bcin15g00990	nd	Spindle poison sensitivity Scp3	NSLLHEGASPGSR	S9:+79.96633	453	1,407	0,0363
Bcin05g07170	nd	PPP4R2	ESSLSHTGSNGTNSGGGSPR	N10:+0.98402 S18:+79.96633	228	1,466	0,0040
Bcin09g04170	BcGlk	Glucokinase	NTVSTPEGFRDEHIFR	T2:+79.96633	136	1,263	0,0282
Bcin15g01270	nd	RNA recognition motif containing	QDAPQSPSGEER	S6:+79.96633	15	1,208	0,0256

ID	Nom	Description	Séquence	Modifications	Positions	Ratio traité/non traité	p-value
Bcin12g02060	BcXlnR	Facteur de transcription de type "zinc-finger"	AGSLESLTEVPSQGHPPHVS	Q13:+0.98402 S3:+79.96633	227	1,141	0,0288
Bcin06g05870	nd	Protéine à domaine dpy-30	ATSQHPDTGPSVPTEASVHGAPAR	Q4:+0.98402 T2:+79.96633	138	0,854	0,0090
Bcin04g05320	nd	Tyrosine kinase	VAAATGEIQSSGAVTPDARPTSAR	Q9:+0.98402 T22:+79.96633	612	0,739	0,0343
Bcin04g01630	BcPKAR	Sous unité régulatrice d'une kinase cAMP-dependent kinase regulatory subunit	SVSPGTANRPR	S1:+79.96633	55	0,645	0,0084
Bcin05g02930	nd	Phosphoglycérate mutase	IRSPNDLLGIR	S3:+79.96633	386	0,346	0,0166
Bcin11g05130	nd	Serine threonine kinase Cot-1	NNRQSVNLDEINLTVSNR	S5:+79.96633	454	0,310	0,0443
Bcin04g05610	nd	"Oxysterol-binding"	NDSEGGFSSYHVGVLQK	S3:+79.96633	217	0,329	0,0397
Bcin02g03320	nd	Facteur de transcription se fixant au motif CCAAT	MSVQHVGSPAVPNAQPLMNHR	M18:+15.99491 Q4:+0.98402 S2:+79.96633	163	0,265	0,0020
Bcin11g01040	nd	nd	RTSSAPGVWNINDLEK	T2:+79.96633	50	0,196	0,0164
Bcin02g02360	nd	Protéine à domaine SH3	MRSAPFSQFPHVSR	S3:+79.96633	172	0,159	0,0417
Bcin09g07020	nd	Facteurs de transcription factor Cys6	SRSPAPLNGETAK	N8:+0.98402 S3:+79.96633	261	0,100	0,0365
Bcin15g01500	nd	Protéine activatrice de Rho GTPase (GAP)	SKSFGGPVDENPR	S3:+79.96633	599	0,079	0,0292

Tableau III - 4 : Protéines différentiellement phosphorylé après traitement au fludioxonil identifiées à partir des données de peak counting

ID	Nom	Description	Pfam	F	O	Séquence	Modifications	Position
<b>Bcin12g00660</b>	nd	Protéine à domaine GYF	PF02213.11(GYF)	3	0	RETSDAVPFAAGLGSPAGTGR	T3:+79.96633	247
<b>Bcin15g01350</b>	BcSey1	Protéine RHD3 (dynamin-like GTPase)	PF05879.7(RHD3)	3	0	FPTAPSVMTMNGNFASVGDAPTK	T3:+79.96633	21
<b>Bcin04g03840</b>	nd	Transporteur mitochondrial	nd	3	0	RRYSSEGSWEDK	Y3:+79.96633	162
<b>Bcin14g03930</b>	BcLTF1	Facteur de transcription de type GATA	PF00320.22(GATA)	3	0	RPSLLHPSIPQSLPANSYAAPR	S4:+79.96633	185
<b>Bcin03g06810</b>	nd	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma (eIF-4G)	PF12152.3(eIF_4G1) PF02854.14(MIF4G)	+	0 3	KSSVTISANGPAGYVPNGGPVGGSR	N9:+0.98402 N17:+0.98402 S3:+79.96633	108
<b>Bcin13g02620</b>	nd	Arrestin	PF00339.24(Arrestin_N) PF02752.17(Arrestin_C)	+	0 3	CHLIEVQEFVLPGTSTTSR	C1:+57.02146 Q7:+0.98402 T14:+79.96633	242
<b>Bcin07g02070</b>	nd	myb-like (Domaine de fixation à l'ADN)	nd	0	3	AGVSEEASPKDDASK	S8:+79.96633	667
<b>Bcin03g04970</b>	nd	Protéine à domaine ENTH	PF01417.15(ENTH)	0	3	IPAQHTAPGTFVNSAGAGLGR	T6:+79.96633	479
<b>Bcin13g05460</b>	nd	Protéine à domaine VHS	PF00790.14(VHS) PF03127.9(GAT)	+	0 3	QSSLTASASTR	S3:+79.96633	193 (256)
<b>Bcin02g07980</b>	nd	nd	nd	0	3	AISDFSTNHSR	S3:+79.96633	364

## Discussion

Cette étude a eu pour but de décrire la transmission du signal fludioxonil chez *B. cinerea* par phosphorylation. Lors de cette deuxième analyse phosphoprotéomique, nous avons mis en évidence chez la souche sauvage, plusieurs protéines dont l'état de phosphorylation varie en présence de fludioxonil. Cependant nous avons été soumis à de nombreux obstacles techniques qui, d'une part, n'a pas permis d'obtenir assez de données pour les mutants de signalisation et, d'autre part, n'a fournis que des données partielles quant à l'effet du fludioxonil chez la souche sauvage.

L'effet du fludioxonil, identifié dans cette étude, peut néanmoins être associé aux données significatives issues du projet phosphoprotéomique préliminaire.

### **1. Le phosphoprotéome, un outil puissant mais une mise au point indispensable dépendante de l'organisme analysé**

A partir des données phosphoprotéomiques, nous avons obtenu un répertoire de phosphopeptides. Ces données permettent d'identifier de nombreux sites de phosphorylation. Il est donc d'un grand intérêt de répertorier l'ensemble de ces sites dans des bases de données publiques telles que : PROTiCdb (Ferry-Dumazet et al., 2005), ProteomeXchange (Vizcaíno et al., 2014).

La force de cette étude portait sur la réalisation d'un phosphoprotéome comparatif et quantitatif. Pour cela, le marquage et le multiplexage des échantillons traités et non traités était indispensable. L'une des causes responsable du faible nombre de peptides différenciellement phosphorylés identifiés est le défaut de marquage lourd. Sur l'ensemble des triplex la proportion de marquage lourd étant plus de deux fois inférieure à celui du marquage intermédiaire. De nombreux peptides n'ont pas pu être analysés de par l'absence de données. L'isotope lourd étant de même nature chimique que le marqueur intermédiaire, la raison du défaut de marquage à cette étape ne peut donc être imputée à une éventuelle inhibition du marquage par un composé. Cependant, nous ne pouvons pas exclure une erreur technique ou humaine lors de cette étape.

A la différence d'une analyse protéomique, l'analyse du phosphoprotéome nécessite un enrichissement en phosphopeptides. Or nous avons constaté que seul les triplex ayant subi un passage sur colonne SCX ont pu être enrichis en phosphopeptides. On peut donc supposer qu'un composé présent dans les échantillons a pu empêcher l'enrichissement en phosphopeptides et que ce même composé a été éliminé en SCX. Il est donc fortement probable que ce composé perturbateur se situe dans le premier pic élué au début de la chromatographie (Figure III - 4). La recherche de composés fongiques capables d'interagir avec la colonne IMAC nous a mené à soupçonner l'action de

sidérophores, connu pour leur affinité aux ions métalliques (S. Mann, MNHN, communication personnelle).

En raison de la digestion partielle des protéines ainsi que du problème d'enrichissement en phosphopeptides, il serait nécessaire de repenser le protocole de phosphoprotéomique. Afin d'éviter le problème de digestion partielle, nous pouvons modifier le protocole d'extraction. En ce qui concerne l'inhibition de l'enrichissement en phosphopeptides, nous notons l'importance de la chromatographie SCX afin d'éliminer les composés perturbateurs. Au cours de l'analyse nous avons également constaté une forte disparité des résultats avec ceux obtenus lors de la première analyse. Cette différence peut s'appuyer sur trois points qui sont : les conditions de cultures, la variation issue de la digestion partielle et l'analyse des triplex non fractionnés en SCX

## **2. Actions putatives du fludioxonil**

L'analyse des données issues du projet préliminaire et de cette étude a permis de mettre en évidence un effet probable du fludioxonil sur des voies de signalisation autres que la voie osmorégulatrice. L'identification d'une protéine de type phosphatase et de GTPases, différenciellement phosphorylés en présence de fludioxonil, pourrait indiquer que ce fongicide modulerait la voie *via* protéines G directement ou par l'intermédiaire de la voie osmorégulatrice. En effet, comme il a été montré dans le chapitre précédent, il existe une interconnexion entre la voie osmorégulatrice et les voies AMPc et calcique. Dans le chapitre suivant, nous nous intéressons à la fonction de la protéine PhnA chez *B. cinerea* ainsi son rôle dans la réponse au fludioxonil.

En aval de la voie *via* protéine G, la modification de l'état de phosphorylation des protéines Cap1 et PKAR pourrait induire une modification de la production d'AMPc. De plus, j'ai pu constater qu'une arrestine est déphosphorylée en présence de fludioxonil. Cette protéine a été décrite comme régulant la transmission des signaux à la voie *via* protéines G (Gurevich and Gurevich, 2006). Pour cela l'arrestine favorise, le découplage entre le récepteur GPCR et trimère  $G\alpha\beta\gamma$  et participe également à l'internalisation par endocytose du récepteur (Shenoy and Lefkowitz, 2011). D'autre part, nous avons pu constater, que le traitement par le fludioxonil entrainerait une déphosphorylation du facteur de transcription CRZ1. Or l'analyse du rôle de CRZ1 a mis en évidence que sa localisation subcellulaire dépend de son état de phosphorylation (Schumacher et al., 2008c). Ainsi lorsque la protéine est déphosphorylée elle est transloquée dans le noyau. Par conséquent le fludioxonil activerait CRZ1 et l'expression des gènes régulés par ce dernier.

Chez *N. crassa* il a été montré que la protéine kinase Cot-1 est importante pour l'élongation des hyphes (Gorovits et al., 2000). La protéine sortant déphosphorylée dans les deux analyses phosphoprotéomiques, cela ajoute du poids quant à l'action du fludioxonil sur son état de

phosphorylation. Chez *N. crassa*, l'activité de la protéine est dépendante de son état de phosphorylation (Ziv et al., 2009). De façon intéressante, il existe une connexion entre Cot-1 et la voie régulée par l'AMPc. En effet, l'inhibition de l'activité de la PKA chez le mutant *cot-1* restaure le phénotype sauvage (Gorovits and Yarden, 2003).

Les données de peak counting ont mis en évidence une phosphorylation de la sérine 185 du facteur de transcription LTF1 en réponse au fludioxonil. Ce facteur de transcription est impliqué dans les mécanismes de réponse à la lumière (Schumacher et al., 2014). De façon intéressante le mutant  $\Delta ltf1$  présente une sensibilité aux stress osmotique et oxydatif, rappelant les phénotypes observés chez le mutant  $\Delta sak1$ . Dans le chapitre suivant nous avons étudié le rôle de Sak1 dans la réponse à la lumière et sa connexion avec le facteur de transcription LTF1.

Par ailleurs, il semble également que le fludioxonil modifierait la régulation épigénétique du champignon. En effet, chez la levure l'homologue de la protéine Dpy-30, Saf19p, fait partie du complexe Set1 nécessaire pour la méthylation de l'histone H3 (Nagy et al., 2002). De plus une protéine de type Myb a été identifiée en peak counting. Une analyse des domaines conservés a permis de mettre en évidence des domaines SANT impliqués dans la fixation à l'ADN et participant au remodelage de la chromatine (Boyer et al., 2004). La modification de l'expression de gènes après traitement par le fludioxonil pourrait également être la conséquence d'un changement de l'état de compaction de la chromatine.

Le transport vésiculaire semble également être perturbé par le traitement au fludioxonil. Dans le chapitre précédent j'ai pu montrer que le transport et la fusion vésiculaire sont régulés par l'histidine kinase Bos1 par l'intermédiaire des protéines Sas1, Sec18 et Sey1. De façon intéressante, la protéine Sey1 est phosphorylée en présence de fludioxonil. Cela tend à valider le contrôle du trafic vésiculaire par Bos1.

Les deux analyses phosphoprotéomiques étant réalisés en réponse à un traitement fludioxonil, nous ne pouvons pas savoir si les modifications de l'état de phosphorylation identifiées sont spécifiques de la réponse au fludioxonil ou si ces mêmes modifications peuvent être provoquées par des stress osmotiques, oxydatifs et pariétaux. Dans la perspective d'une autre analyse phosphoprotéomique il serait intéressant d'ajouter des échantillons soumis à ces différents stress afin d'identifier, comment et à quel niveau, se fait la différenciation des signaux perçus par la voie osmorégulatrice. Avant de réaliser ce type d'étude il conviendra de s'affranchir des problèmes techniques.

Chapitre IV : Analyse fonctionnelle de la phosducin-like PhnA chez *B. cinerea* et identification d'une connexion entre la voie osmorégulatrice et la voie AMPc



## Introduction

A la suite du premier projet d'analyse phosphoprotéomique, 46 protéines différenciellement phosphorylées en présence de fludioxonil ont été mises en évidence. L'une d'entre elles a été spécifiquement phosphorylée sur la sérine 66 en présence de ce fongicide. Cette protéine, appelée PhnA appartient à la famille des « phosducin-like protein » (PhLP) chez *B. cinerea* (Amselem et al., 2011).

Une analyse phylogénétique de 33 phosducines et « phosducin-like proteins » putatives a montré qu'il existe trois groupes de phosducines ou PhLP : I, II et III (Blaauw et al., 2003). Les PhLP1 (voir aussi chapitre introductif) sont impliquées dans la voie de signalisation *via* protéine G. Il s'agit de protéines chaperonnes qui ont pour fonction de stabiliser la sous-unité G $\beta$  jusqu'à ce qu'elle s'associe avec la sous-unité G $\gamma$ . La région N-terminal et notamment la présence de la séquence « TG(V/P)KGVIXD » chez PhLP1 joue un rôle essentiel dans l'interaction avec G $\beta$ . Des homologues de PhLP1 ont été identifiés et caractérisés chez certains champignons filamenteux. Chez les espèces phytopathogènes *Cryphonectria parasitica* (Salamon et al., 2010) et *Fusarium graminearum* (Horevaj and Bluhm, 2012) la PhLP1 (appelé BDM1 chez *C. parasitica*) est impliquée dans la sporulation, la pigmentation et le pouvoir pathogène. Chez l'ascomycète modèle *Aspergillus nidulans*, l'orthologue est impliquée dans la croissance végétative, le développement sexué et la production du métabolite secondaire stérigmatocystine. Malgré la présence de résidus interagissant potentiellement avec la sous-unité G $\beta$ , le contrôle de la voie de signalisation par protéines G ne semble pas être la fonction principale des PhLP2-3. Toutefois, il semble qu'elles jouent le rôle de co-chaperonne en association avec le complexe CCT. Le rôle crucial de la PhLP2 a été montré chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et l'amibe *Dictyostelium discoideum*. En effet, elle intervient dans le contrôle du cycle cellulaire et sa délétion est létale. Chez ces deux mêmes organismes, la délétion de la PhLP3 a montré qu'elle n'est pas indispensable au développement. Chez *S. cerevisiae* la PhLP3 est impliquée dans le repliement de la  $\beta$ -tubuline (Blaauw et al., 2003; Flanary et al., 2000).

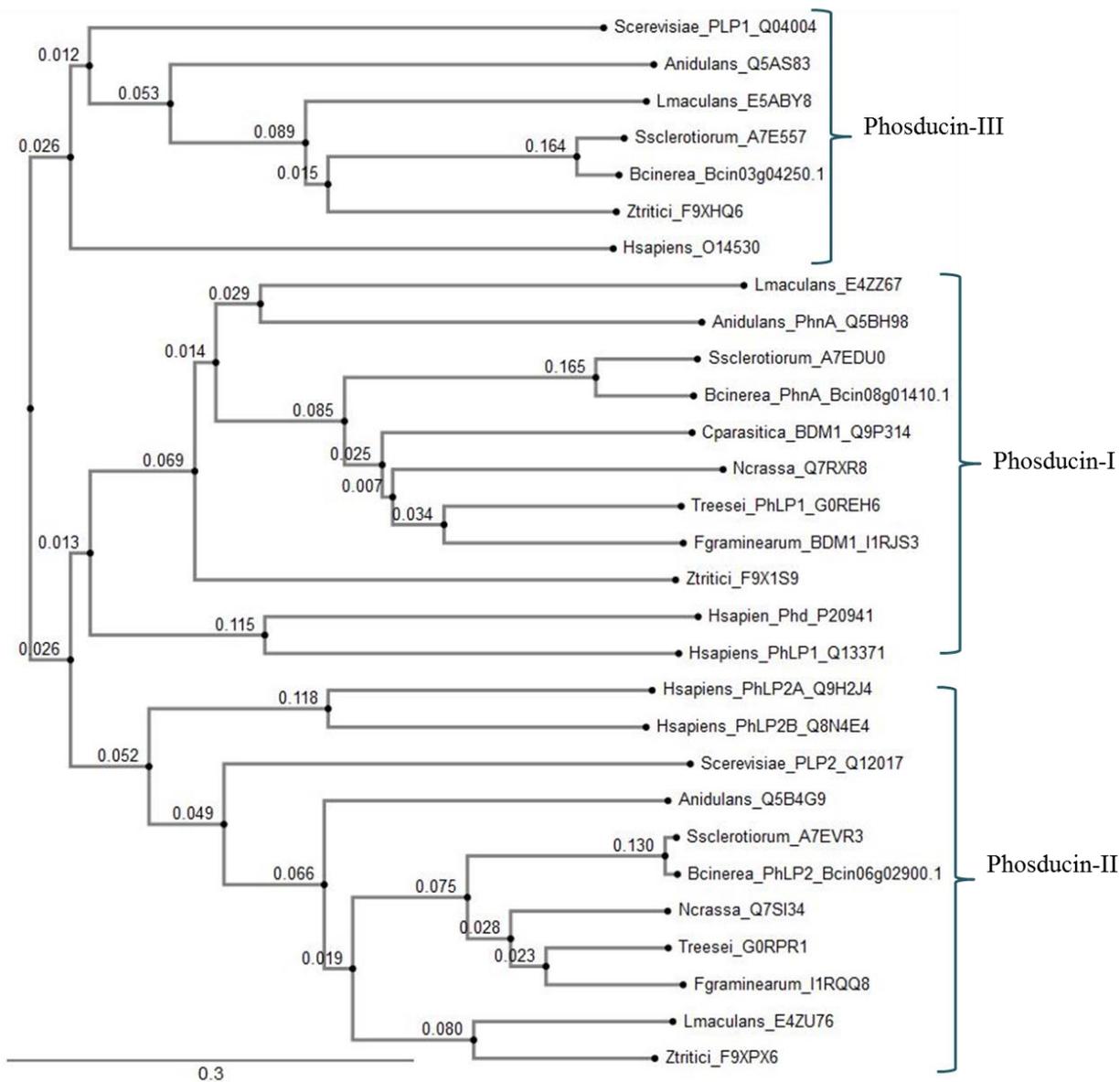
Chez *B. cinerea*, trois PhLP ont été identifiées (Amselem et al., 2011; Van Kan et al., 2017). PhnA est un homologue des PhLP1 décrites précédemment. Les deux autres phosducines de *B. cinerea* n'ont à l'heure actuelle pas été étudiées.

Jusqu'à présent le fludioxonil a été décrit comme ciblant uniquement la voie osmorégulatrice à travers l'histidine kinase Bos1. La phosphorylation de PhnA pourrait mettre en évidence une connexion entre la voie osmorégulatrice et la voie *via* protéines G.

Dans le cadre de ma thèse, nous avons entrepris l'étude fonctionnelle de PhnA chez *B. cinerea* ainsi que lien avec la voie osmorégulatrice. Dans un premier temps, afin d'étudier le rôle de PhnA chez *B. cinerea*, nous avons délété le gène *phnA*. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés au rôle que pouvait jouer le site de phosphorylation au niveau de la réponse au fludioxonil mais aussi

au niveau de la biologie du champignon. Pour cela nous avons muté le site de phosphorylation, la sérine 66, en alanine ou en aspartate, permettant respectivement, d'inhiber ou de mimer l'état de phosphorylation.

**A/**



## B/

PhnA-A_nidulans	1	---MSTAQEEFNQIFSNRE---KNLSPEDRNNLSDNDP-----SPDPHQHFEHS
PhnA-B_cinerea	1	MAGKTAAQEEFDNLTAKASAN-ENHHPDDEKDYSDR-----NSDVEEHEHNR
BDM1-C_parasiti	1	-MSKTAAQEEFDDFTAKNSADPDNHPEDREDAAYEELHARD----NSDDEEQYRAS
PhLP1-N_crassa	1	MSDQTPAQEEFASFTAKNSST-KY-SHPEDRDDYHDSAFHSDGQADSEDEEDRFRNA
PhLP1-F_gramine	1	--MSTAQEEFDNLTAKNTH--RETHPEDRDDPDE-----KDIQDISEEDLFRNA
PhLP1-T_reesei	1	--MPTAAQEEFNALVANNTIP--RETHPEDRDDADS-----QHGSDISEEQYRNQ
PhnA-A_nidulans	47	DSEI MAAMTSR-----TTSYTVENTRFE--ANTGFKGVIADAQAERARRINFR
PhnA-B_cinerea	51	NIEITMKMPLFDKSNSSGGLGGLSEPLLEHRDFDSGRITGVKGVADARSEEFARKTGGW
BDM1-C_parasiti	56	KITAAAMRMFGNDR-----PVQLPPASFDAGRATGVKGVADARSEKAKKSSKW
PhLP1-N_crassa	60	QIEAAMRMPTMDS-----RTEIHLPPAGFDAGAAATGVKGVADARAVENAKRSKW
PhLP1-F_gramine	48	QITNAMRMPTVDRLTGAG---ASEIHLPPVSDNGRATGVKGVADARNEYAARKNKW
PhLP1-T_reesei	48	RIEEAMRMPTA-----ATEIHLPPASFDSGRSTGVKGVADARSEYSAARKTKW
PhnA-A_nidulans	94	KSFVSGNSAA-----QRSHHSSSK----SSGDARLLHNSPPADGGSGSDIDEDDTEF
PhnA-B_cinerea	111	RNKIRGNTITKE-----DKRA-TFIKD-----GSGSEGLSDIEEF
BDM1-C_parasiti	105	GKMRNARRSVI GLTSMKMTSDSKSS-----DSEEHSGDEDEEQF
PhLP1-N_crassa	111	RNRVRSARRSVFEGGGDASPEQQKSGSRKYSDGAGSSGL-DSDFGSDAGLDSMDEDEKEF
PhLP1-F_gramine	103	RHRVRTARNSIFGIESAPPAKSTESSE-----D--DAKSDADEEAF
PhLP1-T_reesei	96	RSRAMSVRKSVFGAPRSHADKSESESE-----AIFSGGDDEEEEF
PhnA-A_nidulans	142	LRWRRESRMQELQSMK-----AKRFSARRRYGSLFTVDAAGYLDAIEKVPALQVVVVC
PhnA-B_cinerea	146	LRWRQQRVEMQSEKQD--IRNRRRTSPSVRRYGRFDEVDAAGYLDAIEKVGRETTVVVVF
BDM1-C_parasiti	145	LRQWRESRRRELEDAEDRSRVR--NRRTSPSSRNYGRFQKVDAMGYLDAIEKVSRTTTVVVVF
PhLP1-N_crassa	170	LRWRRESRRRELEKSSMNPASRQRRRTSPSSRQFGRLDNVDATGYLDAIEKVGPEITAVVVF
PhLP1-F_gramine	143	LAWRRESRRRELESEASRSVRNRRRTSPSVRIYGRLEVDALGYLDAIEKVSRETTVVVVF
PhLP1-T_reesei	138	LSQWREARRQELKFAQGSIRN--RRTSPSTRITYGRLEVDALGYLDAIEKVNRTTTVAVF
PhnA-A_nidulans	196	IYDFESNTSALVEDCLHTIASRQQLVHFVKLHYEIAEMDNIEAPALLAYRG-GDVFATIV
PhnA-B_cinerea	204	YDFECPVSVQVINSALNPIVAANETVHFVRYHYEIEFDNAGVPAILAYNQGDLFANLTI
BDM1-C_parasiti	204	YDFESEVCSITIESALGPIVSONPNTFVKVHYEIEIEFDNAGVPAILAYRNQGDLFANLTI
PhLP1-N_crassa	230	YDFECPVSAATEIATRETVHSHPAIHFVKVHYAEMFDNAAVPSITLAYRNQGDLFANLTI
PhLP1-F_gramine	203	YDFECPVSAATEIQAALMPTVKANPEVHFVKVHYEIEIEFDNAAVPAILEYRNQGDLFANLTI
PhLP1-T_reesei	197	YDFESEVSSAIESVLLPLVKTNPVHFVKVHYEIEIEFDNAAVPAILEYRNQGDLFANLTI
PhnA-A_nidulans	255	QIPQQIPKGRSCSAISIEDLLKSHRVI-----
PhnA-B_cinerea	264	YIITQIPDDTIFDTKALKDVLVRHQVI-----
BDM1-C_parasiti	264	AIITMIPEDDFTDSSLKFLFRHGII-----
PhLP1-N_crassa	290	GIEMIPDDEDFDTDLKRLFERHGIIERSQGEPAW
PhLP1-F_gramine	263	GIEMIPDDETEGTSSIRELFQKHITII-----
PhLP1-T_reesei	257	GIEMMPDDEHFGAISEKVLKKGVI-----

**Figure IV - 1 :** Phylogénie des phosducines fongique (A) et comparaison des séquences protéique des PhLP1 (B). **A/**Analyse phylogénétique de phosducines fongiques. Les phosducines humaines ont également été intégré à l'analyse. L'alignement des différentes séquences a été réalisé avec l'outil Clustal Ω. Les séquences de phosducines chez *B. cinerea* sont issues du site [http://fungi.ensembl.org/Botrytis\\_cinerea/](http://fungi.ensembl.org/Botrytis_cinerea/), tandis que les séquences des phosducin-like des autres espèces ont été récupérées sur le site d'UniProt (le numéro d'accension de chaque protéine est indiqué sur la figure après le nom de l'espèce). L'arbre a été réalisé avec la méthode de Neighbour-joining et tracé à partir de l'outil Phylo.io. La distance est indiquée au niveau de chaque nœud. **B/**Alignement des séquences protéique des homologues de PhnA de *B. cinerea*, *C. parasitica*, *A. nidulans*, *F. graminearum*, *T. reesei*, *N. crassa*. L'alignement a été réalisé en utilisant Clustal Ω

(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) avec les paramètres par défaut. Les sérines en rouge ont été décrites comme étant phosphorylé chez *B. cinerea*. La barre orange représente la région interagissant avec la sous-unité G $\beta$ .

## Matériel et Méthodes

### Souches, milieux, conditions de culture :

Pour l'ensemble des expériences, la souche B05.10 (Büttner et al., 1994) a été utilisée comme souche sauvage de référence. Elle a également été utilisée pour les mutagenèses. Les différentes souches ont été entretenues sur le milieu riche ML (extrait de malt 20 g/L, extrait de levure 5 g/L, agar 15 g/L).

Utilisé couramment dans l'équipe, le milieu de culture pour l'ensemble des tests est le milieu SISLER (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g/L, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0,5 g/L, glucose 10 g/L, extrait de levure 2 g/L, agar 15 g/L).

Ces cultures ont été incubées en chambre climatique à 20°C sous lumière continue et à une hygrométrie de 70%.

**Tableau IV - 1** : Liste des souches utilisées dans cette étude

Souches	Génotypes	Références
<b>WT: B05.10</b>	Souche sauvage européenne	(Büttner et al., 1994)
<b><i>ΔphnA-4.2</i></b>	B05.10- <i>ΔphnA::hph</i>	Cette étude
<b><i>ΔphnA-4.8</i></b>	B05.10- <i>ΔphnA::hph</i>	Cette étude
<b><i>ΔphnA-4.9</i></b>	B05.10- <i>ΔphnA::hph</i>	Cette étude
<b><i>ΔphnA-4.11</i></b>	B05.10- <i>ΔphnA::hph</i>	Cette étude
<b><i>phnA-nat</i></b>	B05.10: <i>phnA-nat1</i>	Cette étude
<b><i>phnA-4.8C1.1</i></b>	<i>ΔphnA-4.8:phnA-nat1</i>	Cette étude
<b><i>phnA-4.11C2.1</i></b>	<i>ΔphnA-4.11:phnA-nat1</i>	Cette étude
<b><i>phnA</i><sup>S66A</sup></b>	B05.10: <i>phnA</i> <sup>S66A</sup> - <i>nat1</i>	Cette étude
<b><i>phnA</i><sup>S66D</sup></b>	B05.10: <i>phnA</i> <sup>S66D</sup> - <i>nat1</i>	Cette étude
<b><i>Δbos1</i></b>	B05.10- <i>Δbos1::bar</i>	(Liu et al., 2008)
<b><i>Δsak1</i></b>	B05.10- <i>Δsak1::nat1</i>	(Segmüller et al., 2007)

### Extraction d'ADN plasmidique :

Les extractions des différents plasmides ont été réalisées avec le kit « NucleoSpin Plasmid QuickPure » (Macherey-Nagel, Allemagne) selon le protocole du fabricant à partir de 3 mL de cultures bactériennes cultivées pendant 16 h à 37°C sous agitation dans du LB supplémenté d'ampicilline 100 µg/mL.

### Extraction d'ADN génomique fongique :

Du mycélium frais, récolté à partir de cultures de *B. cinerea* âgées de 7 à 14 jours, a été placé dans des tubes « Fast-prep » avec des billes de verre et 600 µL de tampon Sarcosyl (50 mM Tris HCl pH 8, 50 mM EDTA pH 8, Sarcosyl 2%, 150mM NaCl). Après broyage au « Fast-prep » (MP Biomedicals, Etats-Unis) à vitesse 5,5 pendant 55 sec et une centrifugation pendant 1 min à 14000 g, des étapes successives d'extraction au phénol, phénol-chloroforme, chloroforme ont été réalisées, chacune suivie d'une centrifugation de 5 min à 14000 g. Afin de précipiter l'ADN, 1:10 volume d'acétate de sodium 3 M et 2 volumes d'éthanol absolu sont ajoutés. Après centrifugation pendant 15 min à 14000 g, rinçage à l'éthanol 70%, le culot a été resuspendu dans 100 µL d'H<sub>2</sub>O.

### Conditions de PCR :

Les conditions de PCR ont été de façon générale les suivantes : dans un volume final de 25 µL 1-100 ng d'ADN génomique ou 1 pg-10 ng d'ADN plasmidique, 200 µM de chaque dNTP, 500 nM de chaque primer et 0,5 U de Taq polymérase ont été incubés selon les paramètres suivants : une étape initiale de 30 secondes à 98°C; 35 cycles de 10 secondes à 98°C (dénaturation), 15 secondes d'hybridation au T<sub>m</sub> des amorces, une élongation à 72°C à raison de 30 s/kb, et une élongation finale de 2 minutes à 72°C. Pour les PCR analytiques, nous avons utilisé la Titanium Taq (Clontech, Etats-Unis), une Taq sans activité exonucléase 3'→5'. Pour les clonages et la mutagenèse nous avons utilisé la Taq Q5 (New England Biolabs, Etats-Unis), une Taq haute-fidélité avec une activité exonucléase 3'→5'.

Tableau IV - 2 : Liste des amorces PCR utilisées dans cette étude

Nom	Séquence	Utilisation
pUC18/phnA Fwd	TAAAACGACGGCCAGTGCCAGCCTGTCTTC TTTCCCCTCT	Clonage cassette de complémentation
phnA/nat1 Rev	CGGGAATGCGGCTCTAACCATCGAACAGA GACAGACA	Clonage cassette de complémentation
phnA/nat1 Fwd	GTCTCTGTTTCGATGGTTAGAGCCGCATTCC CGATTCCG	Clonage cassette de complémentation
nat1/3'fl phnA Rev	ACAAAGAGTGGGAGTCTGCAGGCCGCTCA GGGGCAG	Clonage cassette de complémentation
nat1/3'fl phnA Fwd	CCTGAGCGGCCTGCAGACTCCCACTCTTTG TCATGC	Clonage cassette de complémentation
3'fl phnA/pUC18 Rev	CAGCTATGACCATGATTACGGCATCATAGT CCCTCCCACA	Clonage cassette de complémentation
sonde5UTR Rev	CCACGAGGTCTTGTAGCAAT	Amplification de la sonde
phnA Fwd	GCCTGTCTTCTTTCCCCTCT	Amplification sonde/cassette de délétion et complémentation
3'fl phnA Rev	GCATCATAGTCCCTCCCACA	Amplification cassette de complémentation

Nom	Séquence	Utilisation
phnA55-56	TCAGTACCAAACCCCTGACC	Vérification pureté des transformants <i>phnA</i> <sup>S66A</sup> et <i>phnA</i> <sup>S66D</sup>
phnA35-36	CCCATCCTGTTACGACACCT	Vérification pureté des transformants <i>phnA</i> <sup>S66A</sup> et <i>phnA</i> <sup>S66D</sup>
phnA56	CTACAACATCAGCGCCAAAA	Vérification pureté des transformants $\Delta$ <i>phnA</i>
phnA36	CCATCCGATTCCCTAACC	Vérification pureté des transformants $\Delta$ <i>phnA</i>
phnA51	CCAGTCAAAGCTCGAACT	Vérification jonction 5' cassette <i>hph</i>
hph57	TTGACCTCCACTAGCTCCAG	Vérification jonction 5' cassette <i>hph</i>
hph37	GTCCGAGGGCAAAGGAATAG	Vérification jonction 3' cassette <i>hph</i>
phnA31	CTCCACACACCGTCTTA	Vérification jonction 3' cassette <i>hph</i>

### Constructions des mutants :

Le clonage du gène *phnA* pour complémentation a été réalisé dans le plasmide pUC18 digéré par les enzymes de restriction EcoRI et HindIII. La séquence contenant le gène *phnA* a été amplifiée en partant de 1099 pb en amont du gène et jusqu'à 634 pb en aval du gène, avec le couple d'amorces pUC18/*phnA* Fwd et *phnA*/*nat1* Rev sur l'ADN génomique de la souche B05.10. Les amplicons possèdent en 5' et 3', de courtes séquences identiques aux extrémités des fragments voisins. La cassette de résistance a été amplifiée à partir des amorces *phnA*/*nat1* Fwd et *nat1*/3'fl *phnA* Rev à partir du plasmide pNR1 (Malonek et al., 2004). 976 pb de la région 3'UTR du gène *phnA* ont été amplifiées à l'aide des amorces *nat1*/3'fl *phnA* Fwd et 3'fl *phnA*/pUC18 Rev sur l'ADN génomique de la souche B05.10. L'assemblage des fragments et du vecteur a été réalisé à l'aide du kit « Gibson assembly cloning kit » (New England Biolab) selon les indications du fournisseur, formant ainsi le plasmide pUC18-*phnA*. L'insert de complémentation (5063 pb), utilisé pour la transformation du champignon, a été amplifié à partir du plasmide pUC18-*phnA* et du couple d'amorces *phnA* Fwd et 3'fl *phnA* Rev.

La mutagenèse du site de phosphorylation a été réalisée par synthèse d'un fragment de 650 pb (Eurofins), où le codon codant pour la sérine a été remplacé par le codon codant pour l'alanine et l'aspartate. Le fragment a ensuite été cloné dans le plasmide pUC18-*phnA* après digestion par les enzymes de restriction BmgBI et Bsu36I.

### Préparation et transformation de protoplastes de *B. cinerea* :

Une culture sur la nuit à 23°C a été réalisée à partir d'une suspension de spores de *B. cinerea* (10<sup>5</sup> spores/mL) dans 100 mL de milieu SISLER. Une centrifugation pendant 10 minutes à 2680g à 4°C a été réalisée afin de récupérer le mycélium qui a été rincé par la suite avec 40 mL de 0,6 M KCl, 0,1 M Na-Phosphate pH 5,8 avant une nouvelle centrifugation. Le culot a été resuspendu dans 20 mL

de 0,6 M KCl, 0,1 M Na-Phosphate pH 5,8 et 160 mg d'enzymes lytiques (de *Trichoderma harzianum*, Sigma-Aldrich) puis incubé à 25°C sous légère agitation pendant 2 à 3h. Les protoplastes ont été filtrés successivement sur membrane de 25 µm puis sur membrane de 10 µm. Après deux étapes de lavage et de centrifugation (5 minutes à 1315g à 4°C) avec une solution isotonique (1 M sorbitol, 10 mM MOPS, pH 6,3), les protoplastes ont été resuspendus dans du TMSC (1 M sorbitol, 10 mM MOPS, 40 mM CaCl<sub>2</sub>) à raison de 4,5.10<sup>8</sup> protoplastes/mL. 1 à 2 µg de produit de PCR ont été ajoutés à 100 µL de protoplastes puis incubés pendant 20 minutes dans la glace. 200 µL de polyéthylène glycol (PEG) 60% ont été ajoutés et incubés pendant 15 minutes à température ambiante. Après élimination du PEG par l'ajout de 1 mL de TMSC et centrifugation, les protoplastes ont été resuspendus dans 200 µL de TMSC. 70 µL de protoplastes ont été ajoutés à 4 mL de milieu MMSV sélectif en surfusion puis étalés sur des boîtes de MMSV ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g/L, glucose 20 g/L, saccharose 200 g/L, sels minéraux à 1X, agar oxoïde 15 g/L), supplémenté avec de la nouséothricine (70 µg/mL) puis incubés à 23°C à l'obscurité pendant 5 à 7 jours. Les transformants ont été repiqués et isolés sur milieu sélectif (avec hygromycine ou nouséothricine) jusqu'à l'obtention d'homocaryon.

#### **Southern Blot :**

10µg d'ADN génomique des transformants et de la souche réceptrice ont été digérés par 50U d'enzyme de restriction NdeI dans un volume final de 75 µL à 37°C sur la nuit. L'ADN a été précipité puis resuspendu dans 15 µL d'H<sub>2</sub>O. L'ADN digéré a été déposé et séparé sur un gel d'agarose 0,7% puis transféré (Southern, 1975) sur une membrane de nylon chargé positivement (N+, Amersham GE Healthcare). La membrane a été préhybridée avec une solution d'hybridation (SSC 5X, acide maleique 20 mM, N-lauroylsarcosine 0,1%, SDS 0,02%, « blockingreagent » 2% (Roche), urée 3 M) pendant 30 min à 50°C. Le tampon d'hybridation a été préparé selon les instructions du fabricant avec le kit « PCR DIG Probe Kit » (Roche) à partir de 720 ng de sonde d'ADN, amplifiée avec le couple d'amorces « phnA Fwd/sonde5UTR Rev » (1069 pb). La membrane a été hybridée avec la sonde à 50°C pendant la nuit puis rincée deux fois avec du SSC 2X/SDS 0,1% à température ambiante, suivi de deux rinçages avec du SSC 0,5X/SDS 0,1% à 65°C. La détection a été réalisée à l'aide du kit « DIG Luminescent Detection kit » selon les instructions du fabricant (Roche).

#### **Test de phosphorylation par Western-blot :**

Les différentes souches ont été cultivées dans les mêmes conditions que celles décrites dans le chapitre II. Pour l'extraction des protéines, le mycélium lyophilisé a été broyé au FastPrep (MP Biomedicals, Etats-Unis) avec 200 µL de Cell Lysis Buffer (Cell Signaling) et 1mM de PMSF (Phenylmethylsulfonylfluoride). Après centrifugation à 14000 g pendant 10 minutes, 40 µL du surnageant a été récupéré. 10 µL de tampon de charge (Tris HCl 0,4 M pH 6,8, β-mercaptoethanol 1%,

SDS 1%, glycérol 30%, bleu de bromophénol 0,05%) ont été ajoutés puis les échantillons ont été bouillis pendant 2 minutes.

Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide 10% en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Le gel a ensuite été transféré sur membrane PVDF « Trans-Blot® Turbo™ Mini PVDF Transfer Packs » (Bio-Rad, Etats-Unis) par transfert semi-sec à l'aide du « Trans-Blot® Turbo™ Transfer System » (Bio-Rad, Etats-Unis). Après blocage pendant 1 h à température ambiante dans une solution de TBS-T (Tris-Buffered Saline 1x (Tris-HCl 50 mM pH 7,6, NaCl 150 mM), Tween 20 0,5%) avec du lait écrémé en poudre à 5%, la membrane a été hybridée pendant la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire anti-phospho p38 (Cell Signaling, Etats-Unis), dilué au 1:1000. Après 3 rinçages avec du TBS-T, la membrane a été hybridée avec l'anticorps secondaire couplé à une Horseradish Peroxydase (HRP) (Cell Signaling, Etats-Unis) dilué au 1:2000 pendant 1 h à température ambiante et sous agitation. Après rinçage de la membrane, l'Immobilon Western HRP kit (Merck Millipore, Allemagne) a été utilisé, selon les consignes du fabricant, comme réactif pour la réaction de chemiluminescence, observée à l'aide du « ChemiDoc » (Bio-Rad, Etats-Unis).

#### **Dosage AMPc :**

Les différentes souches ont été cultivées dans les mêmes conditions que celles décrites dans le chapitre II. La concentration intracellulaire d'AMPc a été mesurée en utilisant le kit « Amersham cAMP Biotrak Enzyme-immunoassay System » (GE Healthcare, Etats-Unis). Pour cela, 4 mg de mycélium lyophilisés ont été broyé au Fast-Prep à l'aide de grenat « Garnet Matrix A Bulk » (MP Biomedicals) et du tampon de lyse 1B (fourni dans le kit de dosage). Après centrifugation le surnageant a été utilisé pour le test enzymatique. Le calcul de la concentration d'AMPc a été réalisé par rapport à une courbe étalon tracée selon une méthode de régression logistique à quatre paramètres. Les concentrations ont ensuite été normalisées par rapport à la concentration d'acides nucléiques dans l'extrait, dosés à  $\lambda=260\text{nm}$ . La concentration en AMPc est exprimée en fmoles/ng d'ADN.

#### **Tests phénotypiques :**

##### **Evaluation du pouvoir pathogène**

Des implants calibrés de mycélium, prélevés sur des cultures non sporulantes (ML, 3 jours) ont été déposés sur feuilles de haricot blessées ou non blessées. Un minimum de trois réplicats biologiques ont été réalisés. Les feuilles inoculées ont été placées en chambre climatique dans les conditions expérimentales suivantes : 22°C en période jour et 18°C en période nuit avec une photopériode de 16 h et une hygrométrie de 75%. Une notation des symptômes a été réalisée à partir de trois jours et jusqu'à sept jours.

##### **Détermination de la CI50**

A partir d'une préculture sur milieu SISLER, des implants de mycélium de 3 mm de diamètre, prélevés au niveau du front de croissance ont été utilisés pour ensemercer des boîtes de milieu SISLER supplémentées avec une gamme de fludioxonil : 0; 0,0003; 0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Les mesures du diamètre de croissance ont été faites à J+3, à raison de deux mesures de diamètre par boîte. Trois réplicats ont été réalisés pour chaque souche testée. La détermination de la CI50 a été faite à l'aide du logiciel « GraphPad Prism 6» (GraphPad Software).

### **Morphologie des hyphes et spores**

Des spores ou des fragments mycéliens ont été resuspendu dans 15  $\mu\text{L}$  de milieu SISLER et déposés sur lame de verre et placé sous atmosphère humide. Après 24 h, une goutte de Calcofluor White a été ajoutée puis les lames ont été observées au microscope à fluorescence DM5500B (Leica).

### **Tests de sensibilité aux stress**

Des implants de mycélium de 3 mm de diamètre, issues de précultures, ont été utilisés pour ensemercer des boîtes de milieu SISLER supplémentées avec : 0,6 M Sorbitol, 0,6 M NaCl, 50 mg/L Calcofluor white, 500 mg/L Rouge Congo respectivement. Le sorbitol est utilisé pour induire un stress osmotique neutre, le NaCl pour induire un stress osmotique ionique, le CFW et le rouge Congo pour induire un stress pariétal.

Un milieu sans stress a été utilisé comme témoin. Des mesures à J+1 et J+3 ont été réalisées. Les valeurs de vitesses de croissances ont été rapportées à la vitesse de croissance sur milieu témoin. Trois réplicats ont été réalisés pour chaque souche et chaque condition.

## Résultats

### 1. Analyse *in silico* de la séquence de PhnA

L'alignement de la séquence de PhnA de *B. cinerea* avec celles des protéines homologues déjà étudiés de *C. parasitica*, *F. graminearum*, *A. nidulans* et *T. reesei* révèle de nombreuses régions conservées (**Figure IV - 1B**). Dans la région N-terminale, en position 89 à 97 nous notons la présence de la séquence « TGVKGVIADA » impliquée dans l'interaction avec la sous-unité G $\beta$  (Xu et al., 1995). Cette séquence est très conservée chez les champignons filamenteux. Au niveau N-terminal, le site de phosphorylation sérine 66 n'est pas conservé hormis chez *Sclerotinia sclerotiorum* (donnée non montrée). Des études ont montrées qu'au niveau C-terminal, plusieurs régions conservées, de type thioredoxine, sont présentes. De plus, ces domaines ont été décrits comme se fixant à la région du dimère G $\beta\gamma$  interagissant avec la membrane (Blaauw et al., 2003; Gaudet et al., 1996).

A partir des séquences de phosducines de différentes espèces fongiques et de l'Homme, un arbre phylogénétique a été réalisé (**Figure IV - 1A**). Cet arbre a permis de valider la présence de trois groupes de phosducines. Chacune des PhLP identifiées chez *B. cinerea* est répartie dans un groupe différent. PhnA est donc une phosducine appartenant au groupe I tandis que les deux autres PhLP, Bcin06g02900 et Bcin03g04250 appartiennent respectivement au groupe II et III.

### 2. Etude fonctionnelle de *phnA*

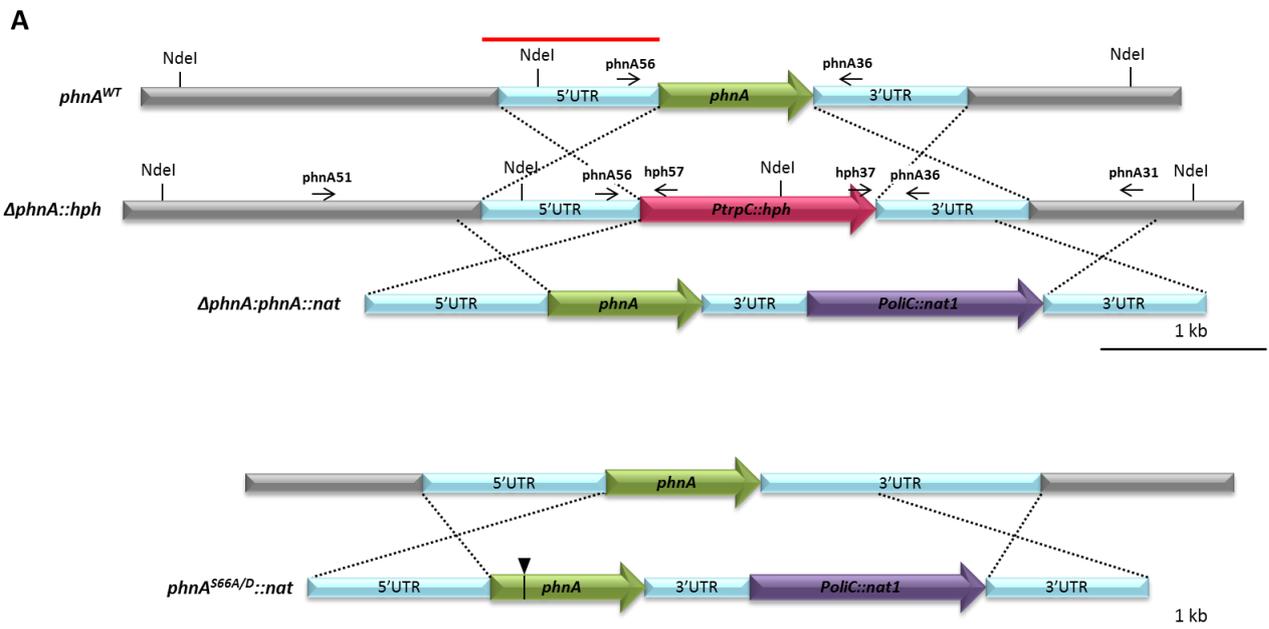
Afin d'étudier le rôle de la phosducin PhnA chez *Botrytis cinerea*, nous avons réalisé l'inactivation du gène en le remplaçant par le gène de résistance à l'hygromycine (*hph*). Avant mon arrivée sur ce projet, une première transformation a permis d'obtenir six transformants. Après purification j'ai pu obtenir 3 homocaryons :  $\Delta$ phnA-1.1 ;  $\Delta$ phnA-1.11 ;  $\Delta$ phnA-2.11. Toutefois chaque transformant présentait des différences au niveau de sa morphologie sur milieu solide (couleur et sporulation) ainsi qu'au niveau de sa sensibilité à différents stress (osmotique et pariétal) à l'exception de l'absence de pathogénie (données non montrées). Une nouvelle transformation a par conséquent été réalisée. Après purification, quatre transformants indépendants et homocaryotiques ont pu être obtenus :  $\Delta$ phnA-4.2 ;  $\Delta$ phnA-4.8 ;  $\Delta$ phnA-4.9 ;  $\Delta$ phnA-4.11. L'ensemble des transformants ont été analysés par PCR au niveau des régions flanquante 5' et 3' de la cassette de remplacement. Pour chacun des transformants, un fragment de 2061 pb a été amplifié au niveau de la région flanquante en 5' tandis qu'un fragment de 1696 pb a été amplifié au niveau de la région flanquante en 3' (**Figure IV - 2A et 2C**). Sur la **Figure IV - 2C**, la vérification de la jonction 5' et 3' nous indique la présence d'une bande chez les transformant  $\Delta$ phnA, à la taille attendu. Pour la jonction 5' nous constatons néanmoins la présence d'une bande non spécifique, d'environ 500 pb pour les transformants. Que ce soit pour la jonction 5' ou 3', aucune bande n'est observée chez le sauvage.

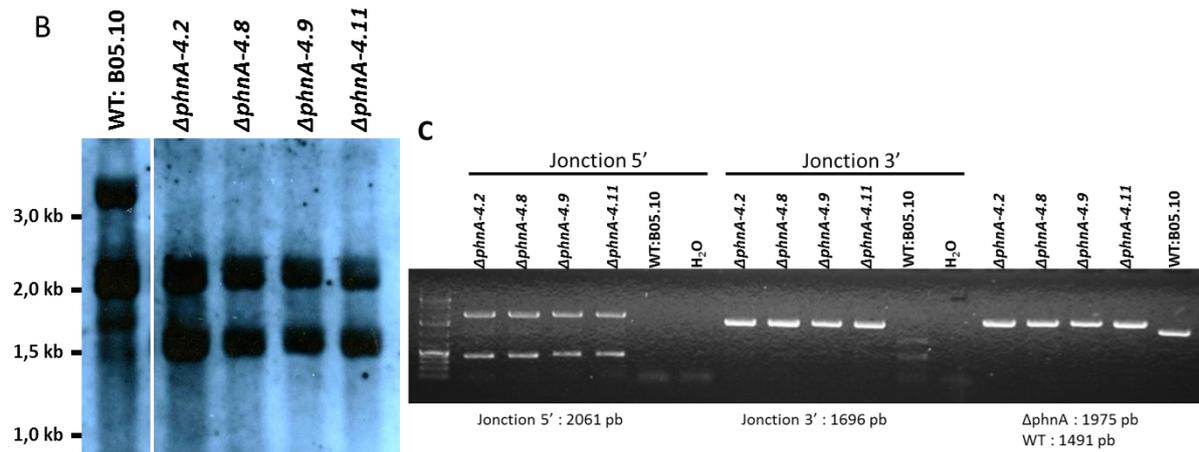
Une analyse par Southern blot a mis en évidence, une bande à 2160 pb présente chez le sauvage et les mutants, une bande à 3572 pb uniquement présente chez le sauvage et une bande à 1572 pb uniquement présente chez les mutants  $\Delta phnA$  (**Figure IV - 2B**) confirmant le remplacement du gène *phnA* par le marqueur hygromycine.

Ces analyses ont permis de montrer que la cassette de délétion s'est bien intégrée au locus d'intérêt et sans intégration ectopique dans le génome. Dans les parties qui suivent, j'ai choisi de focaliser l'analyse sur les mutants  $\Delta phnA-4.8$  et  $\Delta phnA-4.11$ .

Pour confirmer les phénotypes observés chez les mutants  $\Delta phnA$ , j'ai cherché à compléter les mutants  $\Delta phnA-4.8$  et  $\Delta phnA-4.11$  en réintégrant au locus initial le gène *phnA*, associé au gène de résistance à la nouséothricine (*nat*). Une souche B05.10 transformé par la cassette de complémentation (*B05.10:phnA-nat*) a permis de vérifier que l'intégration de la cassette ne modifie pas le phénotype de la souche réceptrice.

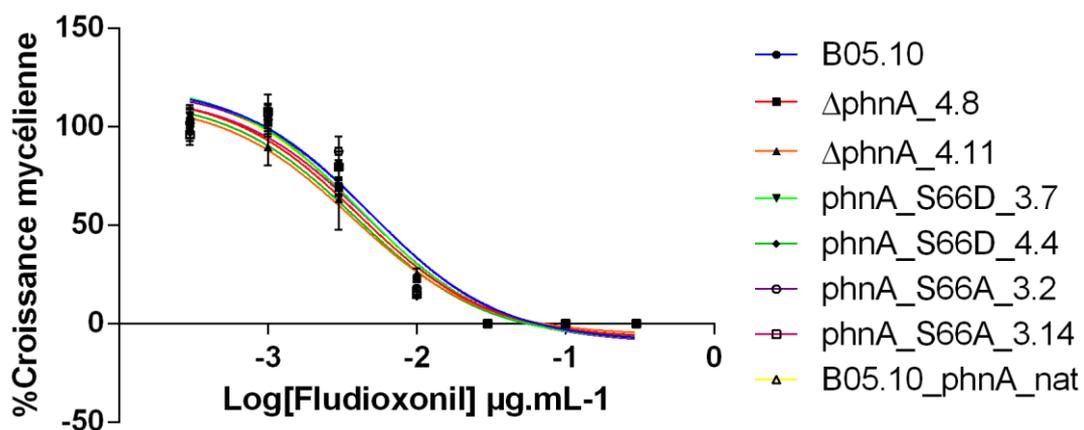
Nous avons également décidé d'étudier le rôle du site de phosphorylation serine 66 en le mutant, soit en alanine afin d'inhiber la phosphorylation, soit en aspartate pour mimer l'état de phosphorylation. La mutagenèse a été réalisée à partir de la souche sauvage en la transformant avec un produit de PCR composé du gène muté couplé au gène de résistances à la nouséothricine (**Figure IV - 2A**). Une fois purifié, j'ai ainsi pu obtenir cinq transformants *phnA*<sup>S66A</sup> et deux transformants *phnA*<sup>S66D</sup>.





**Figure IV - 2 :** Construction des mutants  $\Delta phnA$ , des souches complémentées ainsi que des mutants  $phnA^{S66A}$  et  $phnA^{S66D}$ . **A/**L'inactivation du gène  $phnA$  a été réalisée en remplaçant ce dernier par le gène  $hph$  sous contrôle du promoteur fort  $P_{trpC}$ . La complémentation a été réalisée en remplaçant la cassette hygromycine par le gène  $phnA$  couplé au gène  $nat$  sous contrôle du promoteur  $P_{oliC}$ . La mutation du site de phosphorylation a été réalisée à partir de la souche sauvage transformée avec le gène  $phnA$  muté couplé au gène  $nat$  sous contrôle du promoteur  $P_{oliC}$ . **B/**Analyse par Southern blot de quatre transformants indépendants  $\Delta phnA$  dont l'ADN a été digéré par l'enzyme de restriction  $NdeI$ . La sonde de 1069 pb est représentée en rouge en A/. **C/**PCR de vérification de l'intégration au locus de la cassette de délétion et de la pureté des transformants. La vérification des jonctions 5' et 3' a respectivement été réalisée avec les couples d'amorces  $phnA51/hph57$  et  $hph37/phnA31$ . La vérification de la pureté des transformants a été réalisée avec le couple d'amorce  $phnA56/phnA36$ . Les amorces utilisées sont représentées par des flèches la figure A/.

### 3. $phnA$ n'est pas impliqué dans l'adaptation au fludioxonil



**Figure IV - 3 :** Estimation de la  $CI_{50}$  du fludioxonil chez différentes souches. Représentation graphique de la croissance mycélienne en fonction de différentes concentrations de fludioxonil. Le calcul de la  $CI_{50}$  a été réalisé avec le logiciel GraphPad Prism.

Afin de déterminer si  $phnA$  est impliqué dans l'adaptation au fludioxonil, j'ai mesuré la sensibilité au fludioxonil des mutants  $phnA$  par rapport à la souche sauvage par test de croissance mycélienne. Après analyse des courbes dose-réponse nous observons que les  $CI_{50}$  de toutes les

souches se situent autour de 4,5 ng/ $\mu$ L (+/- 2,5 ng/ $\mu$ L) indiquant qu'il n'y a pas de différence de sensibilité au fludioxonil entre la souche sauvage et les différents mutants  $\Delta phnA$  et  $phnA^{S66A}$  et  $phnA^{S66D}$  (**Figure IV - 3**).

Ni la protéine PhnA, ni sa phosphorylation sur la sérine 66 ne semblent donc jouer de rôle dans la sensibilité au fludioxonil chez *B. cinerea*.

#### **4. Effet du fludioxonil sur la concentration intracellulaire d'AMPC**

Le rôle de la phosphoducine dans la voie de signalisation *via* protéine G nous a amené à étudier l'impact du fludioxonil sur la production d'AMPC contrôlée par la voie des protéines G. Pour cela j'ai dosé l'AMPC intracellulaire au cours de l'exposition au fludioxonil, chez la souche sauvage B05.10, les mutants  $\Delta phnA$  et les mutants de la voie osmorégulatrice  $\Delta bos1$  et  $\Delta sak1$ .

La concentration intracellulaire en AMPC chez le mutant  $\Delta phnA-4.8$  est supérieure à la souche sauvage, tandis que chez le mutant  $\Delta phnA-4.11$  la concentration est inférieure à cette dernière (**Figure IV - 4A**). Nous ne pouvons donc pas tirer de conclusion sur le rôle de *phnA* dans l'accumulation d'AMPC.

Par la suite, nous avons étudié le rôle du fludioxonil et de la voie osmorégulatrice sur le contenu en AMPC (**Figure IV - 4B**). Le dosage d'AMPC a été réalisé après 5, 15, 30 et 60 minutes de traitement par le fludioxonil. Le temps 0 min représentant le témoin non traité. Chez la souche sauvage, nous pouvons constater une augmentation de 26% de la concentration en AMPC après 60 minutes d'exposition au fludioxonil. Chez le mutant  $\Delta bos1$ , sans traitement fludioxonil, la concentration d'AMPC est comparable au sauvage. Toutefois, nous constatons une augmentation transitoire de la concentration en AMPC après 5 à 30 minutes de traitement par le fludioxonil. Une concentration comparable au sauvage est retrouvée après 60 minutes de traitement. L'augmentation d'AMPC intracellulaire en réponse au fludioxonil est ainsi plus rapide chez le mutant  $\Delta bos1$  que chez le sauvage. L'analyse du mutant  $\Delta sak1$  nous indique que sans traitement fludioxonil, le niveau d'AMPC est 2,5 fois plus élevé que chez le sauvage. En présence de fludioxonil, la concentration en AMPC diminue progressivement en fonction du temps de traitement, jusqu'à atteindre un niveau similaire au sauvage après 60 minutes d'induction.

En conclusion, bien qu'un effet sur la concentration en AMPC soit présent chez les mutants  $\Delta phnA$ , il est impossible de déterminer si *phnA* régule positivement ou négativement le contenu intracellulaire en AMPC. Par contre, les résultats obtenus avec les mutants  $\Delta bos1$  et  $\Delta sak1$  indiquent l'existence d'une connexion entre la voie osmorégulatrice et la voie AMPC.

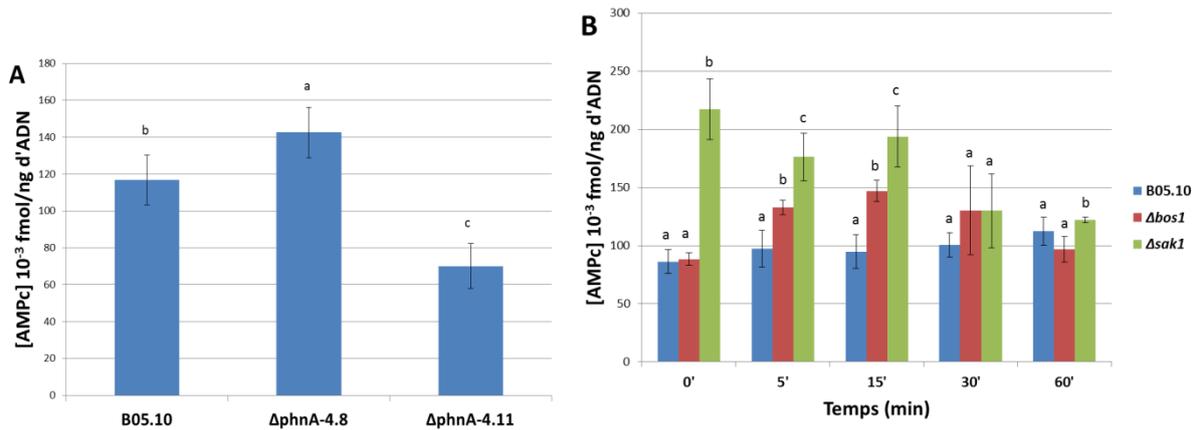


Figure IV - 4 : **A**/Comparaison des concentrations intracellulaires d'AMPc entre deux mutants  $\Delta phnA$  et la souche sauvage. **B**/Effet du traitement fluorexonil sur les concentrations intracellulaires d'AMPc chez la souche B05.10,  $\Delta bos1$  et  $\Delta sak1$  (10 mg/L). Chaque valeur correspond à la moyenne de 11 mesures issues de 3 réplicats biologiques. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type standard. Pour la figure A, une ANOVA a été réalisée suivi d'un test de Tukey ( $p < 0,01$ ). Pour la figure B, une ANOVA suivie d'un test de Tukey ( $p < 0,05$ ) ont été réalisés pour les temps 5 et 15 min. Un test de Kruskal Wallis a été réalisé ( $p < 0,05$ ) pour les temps 0, 30 et 60 min. Les lettres différentes représentent des valeurs significativement différentes.

## 5. Rôle de *phnA* sur la croissance mycélienne et le développement de *B. cinerea*

J'ai tout d'abord étudié l'effet de la délétion de *phnA* sur le développement du champignon. Nous constatons que la croissance radiale chez les mutants  $\Delta phnA$  est significativement réduite d'environ 20% par rapport au sauvage. Le gène *phnA* a bien un impact sur la croissance de *B. cinerea*, bien qu'il ne soit pas essentiel à cette dernière. L'analyse de la croissance mycélienne chez les mutants  $phnA^{S66A}$  et  $phnA^{S66D}$  a mis en évidence une croissance similaire au sauvage (**Figure IV - 5**).

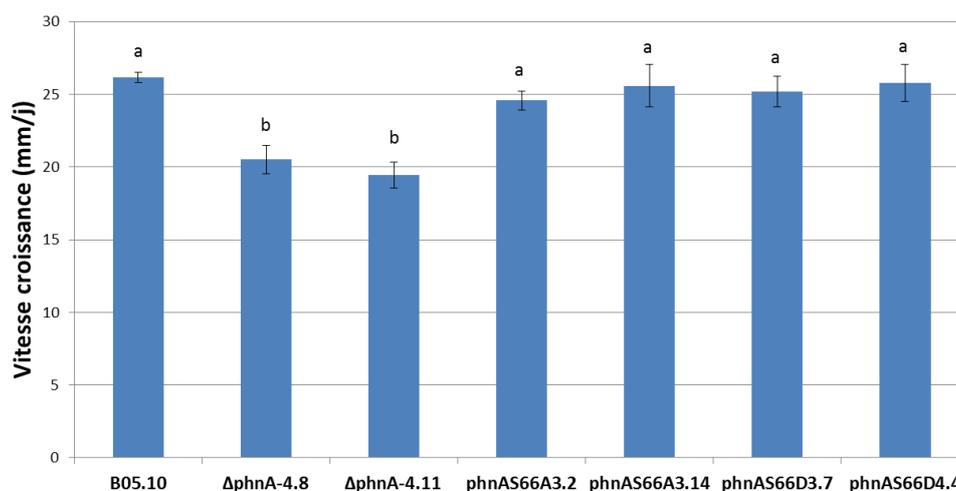


Figure IV - 5 : Vitesse de croissance mycélienne des mutants *phnA* et de la souche sauvage. Les vitesses de croissance ont été calculées après les mesures des diamètres de croissances sur milieu SISLER à 20°C à J1 et J3. Six réplicats ont été réalisés. Le graphique représente la moyenne des données et les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type standard. Une ANOVA a été réalisée suivi

d'un test de Tuckey ( $p < 0,01$ ). Les lettres différentes représentent des valeurs significativement différentes.

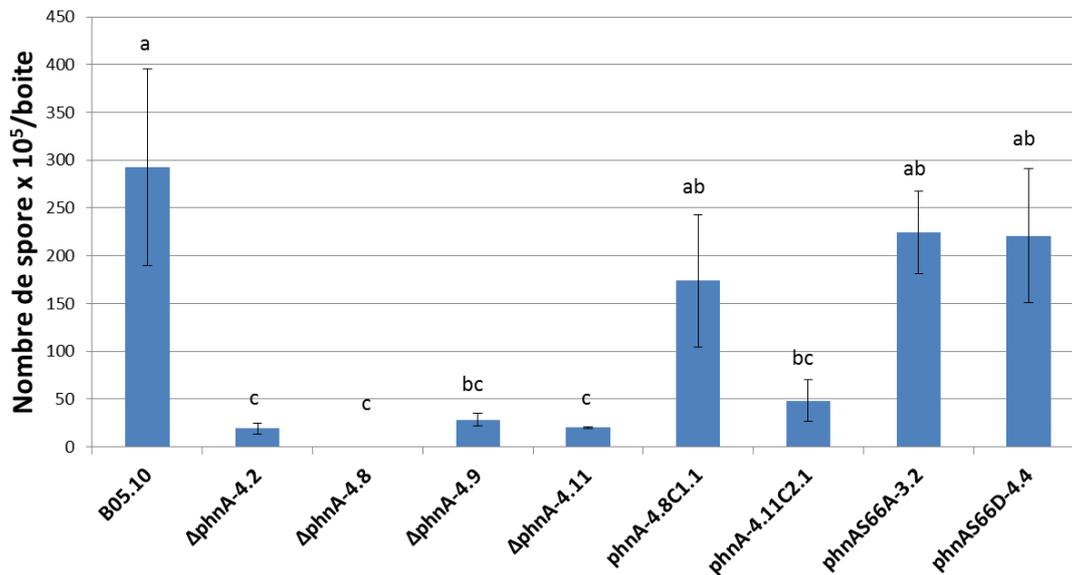


Figure IV - 6 : Production de macroconidies chez les mutants *phnA* et la souche sauvage. Les macroconidies ont été récoltées après 15 jours de culture à la lumière sur milieu ML. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque souche. L'analyse de variance a été réalisée par le test non paramétrique Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ). Les lettres différentes représentent des valeurs significativement différentes.

La délétion du gène *phnA* affecte le cycle asexué de *B. cinerea*. En effet, les mutants  $\Delta phnA$  présentent une forte réduction de la sporulation ( $\Delta phnA-4.2$ ,  $\Delta phnA-4.9$ ,  $\Delta phnA-4.11$ ) ou une absence totale de sporulation ( $\Delta phnA-4.8$ ) par rapport au sauvage (**Figure IV - 6**). La capacité des mutants *phnA*<sup>S66A</sup> et *phnA*<sup>S66D</sup> à sporuler n'est que partiellement affectée. La formation de sclérotés a également été analysée. Nous constatons que les mutants  $\Delta phnA$  semblent avoir perdu leur capacité à produire des sclérotés alors que les mutants de phosphorylation ne présentent pas ce défaut (**Figure IV - 7**). Cependant le défaut de formation de sclérotés n'a pas pu être complété (données non montrées).

En conclusion, PhnA est impliquée dans la croissance mycélienne et est nécessaire au développement des macroconidies alors que la phosphorylation de la serine 66 n'intervient ni dans la croissance, ni dans la production de macroconidies ou de sclérotés. En absence de complémentation pour le défaut de formation de sclérotés, il nous est impossible de conclure sur le rôle de PhnA dans ce phénotype. Une mutation additionnelle présente chez les souches  $\Delta phnA-4.8$  et  $\Delta phnA-4.11$  pourrait en être responsable.

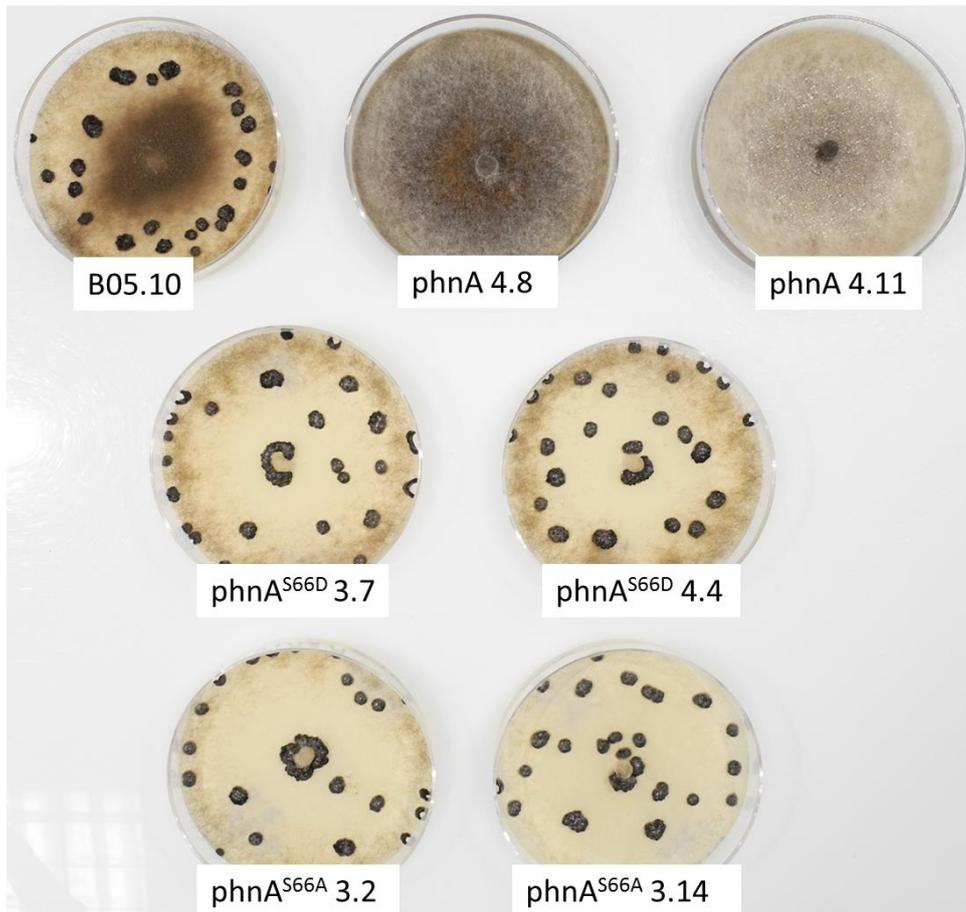


Figure IV - 7 : Formation de sclérotes chez les mutants *phnA* et la souche sauvage. Les sclérotes ont été obtenus après 1 mois de culture à 20°C à l'obscurité sur milieu ML. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque souche.

## 6. Agressivité des mutants *phnA*

Afin d'étudier le pouvoir pathogène des mutants *phnA*, nous avons examiné leur capacité à infecter des feuilles de haricots détachées, qu'elles soient blessées ou non (**Figure IV - 8**). Ainsi, nous observons l'absence totale de nécrose avec les différents transformants  $\Delta phnA$ , y compris sur feuilles blessées. Les mutants du site de phosphorylation provoquent des nécroses identiques à celles formées par le sauvage.

Avec les mutants  $\Delta phnA$  complémentés nous constatons la formation de lésions nécrotiques beaucoup plus réduites qu'avec le sauvage.

Le pouvoir pathogène n'étant pas totalement restauré après l'introduction de l'allèle sauvage dans les mutants  $\Delta phnA-4.8$  et  $\Delta phnA-4.11$ , nous ne pouvons confirmer l'implication de *phnA* dans le processus infectieux. Il faut cependant noter que l'ensemble des transformants  $\Delta phnA$  obtenus présentent ce même phénotype non pathogène. Nous pouvons tout de même conclure que le site de phosphorylation n'intervient pas dans l'agressivité chez *B. cinerea*.

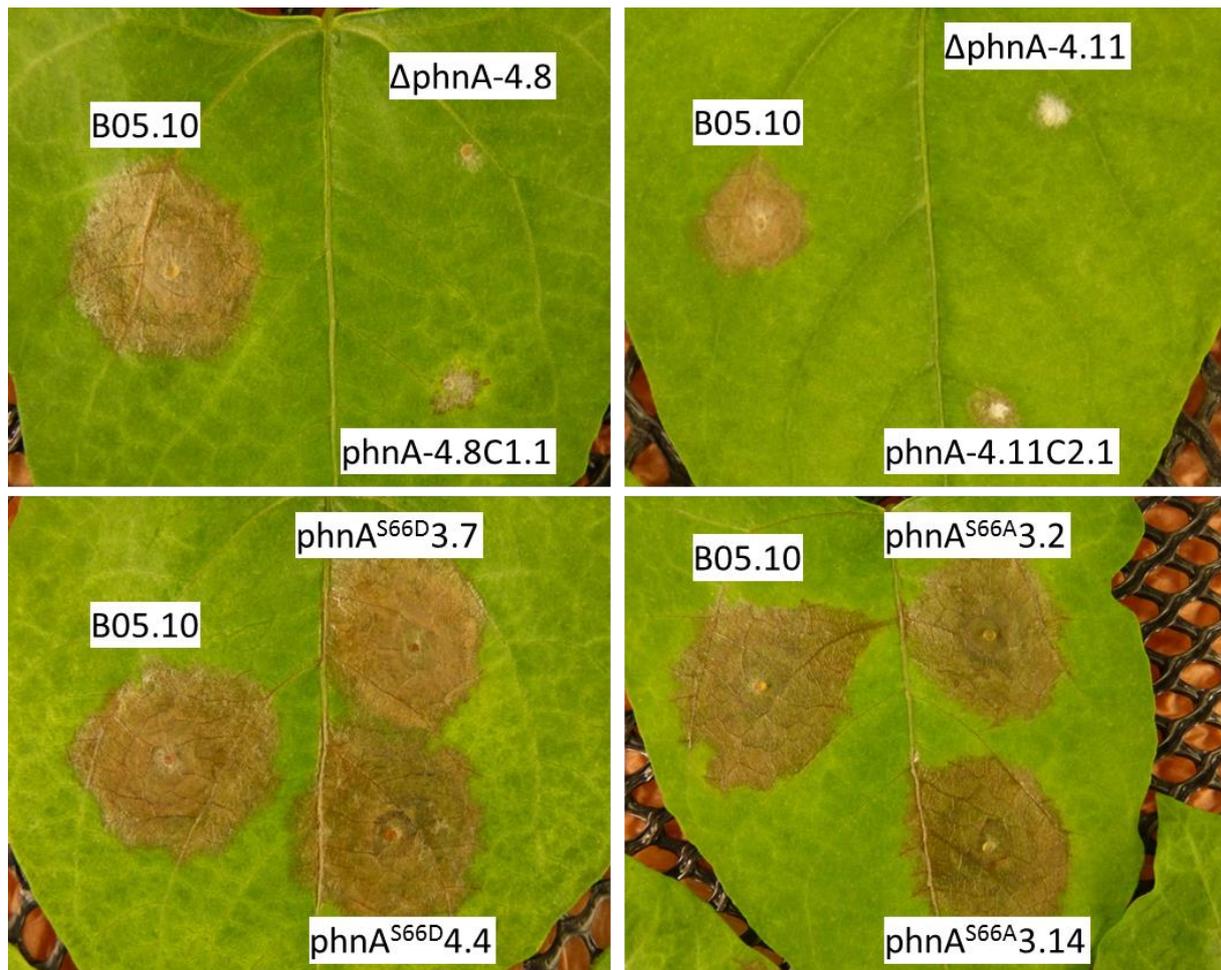


Figure IV - 8 : Analyse du pouvoir pathogène des mutants *phnA*. Formation de nécroses provoquées par les mutants *phnA* et la souche sauvage sur feuille de haricot. Les feuilles détachées ont été inoculées par des implants calibrés de mycélium des différentes souches indiquées. Les images sont représentatives de 9 réplicats pour les mutants *phnA*. Les clichés ont été réalisés après 3 jours d'incubation à 22°C.

## 7. Capacité d'acidification du milieu chez les mutants *phnA*

Il a été montré chez *B. cinerea* et *S. sclerotiorum* que la production de composés acides tels que l'acide oxalique participait au pouvoir pathogène de ces champignons (Williamson et al., 2007). J'ai réalisé un test afin d'évaluer chez les mutants si cette capacité à sécréter des composés acides était affectée. Des boîtes de milieu ML supplémenté avec du bleu de bromothymol ont étéensemencées avec des explants de souche sauvage et de mutants *phnA*. Le bleu de bromothymol est un indicateur de pH où la transition de bleu à jaune se fait à un pH inférieur à 6 (**Figure IV - 9**).

Chez la souche sauvage et les mutants du site de phosphorylation nous observons la présence d'un halo jaune vif autour du front de croissance, représentatif de l'acidification du milieu. Chez les mutants  $\Delta phnA$  nous constatons l'absence de ce halo jaune autour du front de croissance, indiquant une absence d'acidification du milieu. Nous observons également chez les mutants  $\Delta phnA$  un retard de croissance sur ce milieu contenant du bleu de bromothymol, supérieure au retard de croissance observé

dans la (**Figure IV - 5**). La complémentation de  $\Delta phnA$  ne restaure pas la capacité d'acidification. Toutefois le défaut de croissance sur milieu bleu de bromothymol a été compensé.

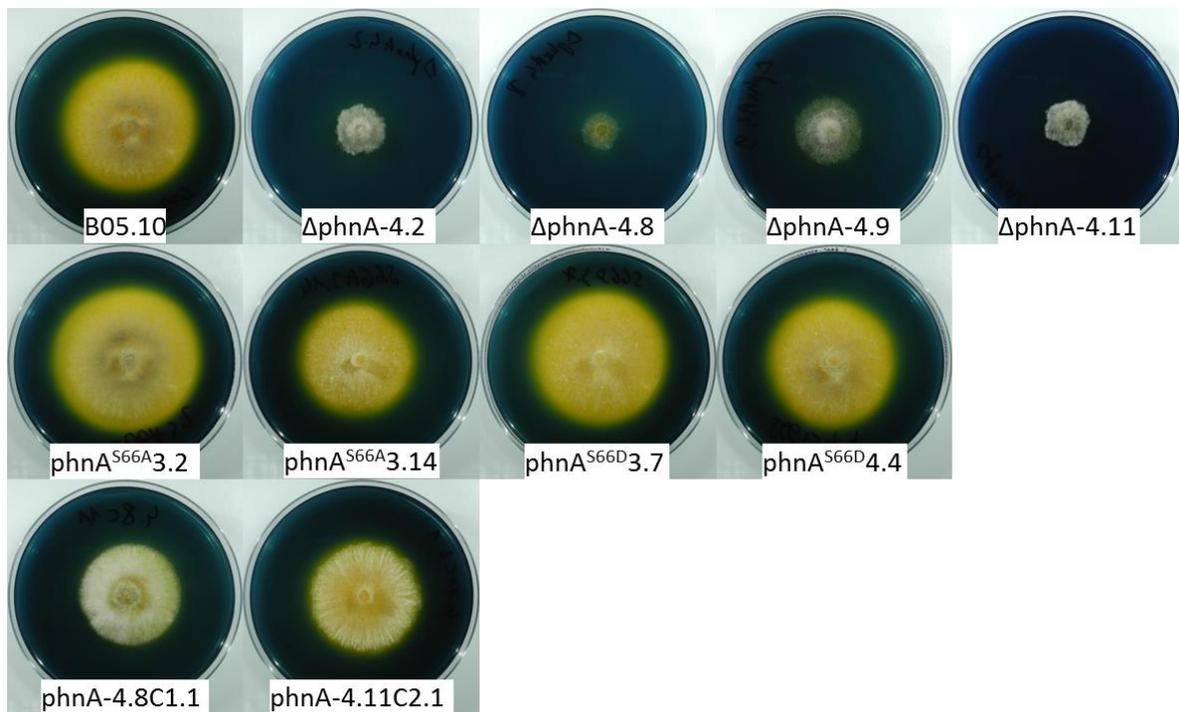


Figure IV - 9 : Acidification du milieu par les différents mutants *phnA* en comparaison à la souche sauvage. Suivi de l'acidification sur milieu ML à pH8, contenant 0,01% de bleu de bromothymol. On suit l'apparition d'un halo jaune autour du front de croissance après 3 jours représentatif de l'acidification. Pour chaque souche trois réplicats ont été réalisés.

## 8. Analyse de la formation de structures infectieuses sur lame de verre chez les mutants $\Delta phnA$

La germination est une étape importante lors du processus infectieux via la formation de structures de type appressorium-like. L'analyse microscopique a montré une différence de la structure des hyphes des mutants  $\Delta phnA$  sur lame de verre (**Figure IV - 10**). Chez la souche sauvage, plusieurs tubes germinatifs peuvent partir d'une spore. Ces tubes germinatifs sont à la fois courts et ont des structures coudées et plongeantes, caractéristique des structures appressorium-like indiquées par des flèches dans la **Figure IV - 10**. Contrairement à cela, chez les mutants  $\Delta phnA-4.2$ ,  $\Delta phnA-4.9$ ,  $\Delta phnA-4.11$ , un seul tube germinatif part de chaque spore. Ces derniers sont très allongé, unidirectionnels et ne présentent pas de structures différenciées. Chez la souche  $phnA-4.11C2.1$ , la structure des tubes germinatifs est identique au sauvage.

PhnA est impliqué dans le développement et la morphologie des hyphes germants, ainsi que dans la formation de structures infectieuses.

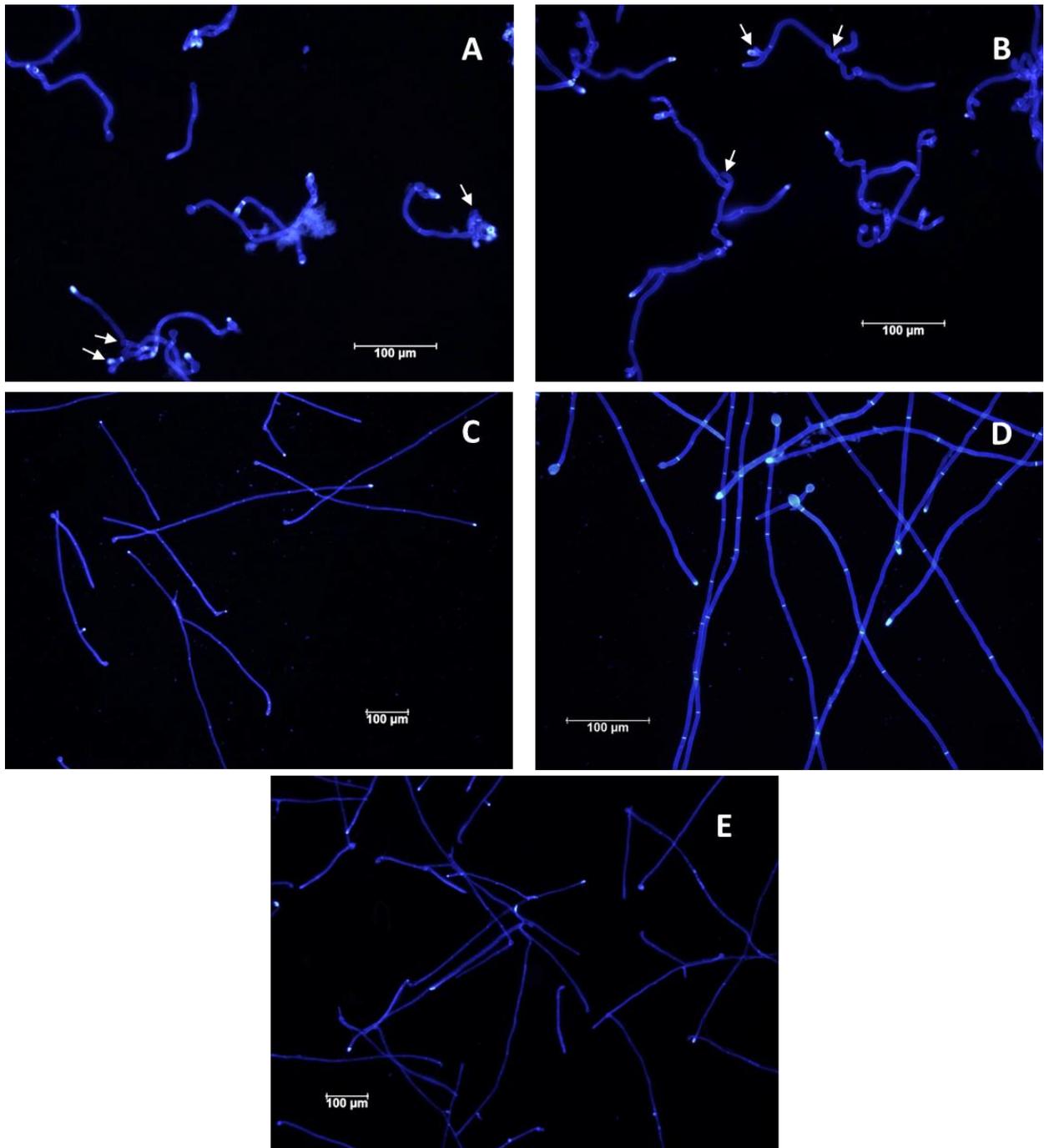


Figure IV - 10 : Germination des macroconidies sur lame de verre après coloration au CFW (1 g/L). A/B05.10, B/*phnA-4.11C2.1*, C/ $\Delta$ *phnA-4.2*, D/ $\Delta$ *phnA-4.9*, E/ $\Delta$ *phnA-4.11*. L'observation a été réalisée après 24h d'incubation. Les flèches blanches indiquent des structures infectieuses de type appressorium.

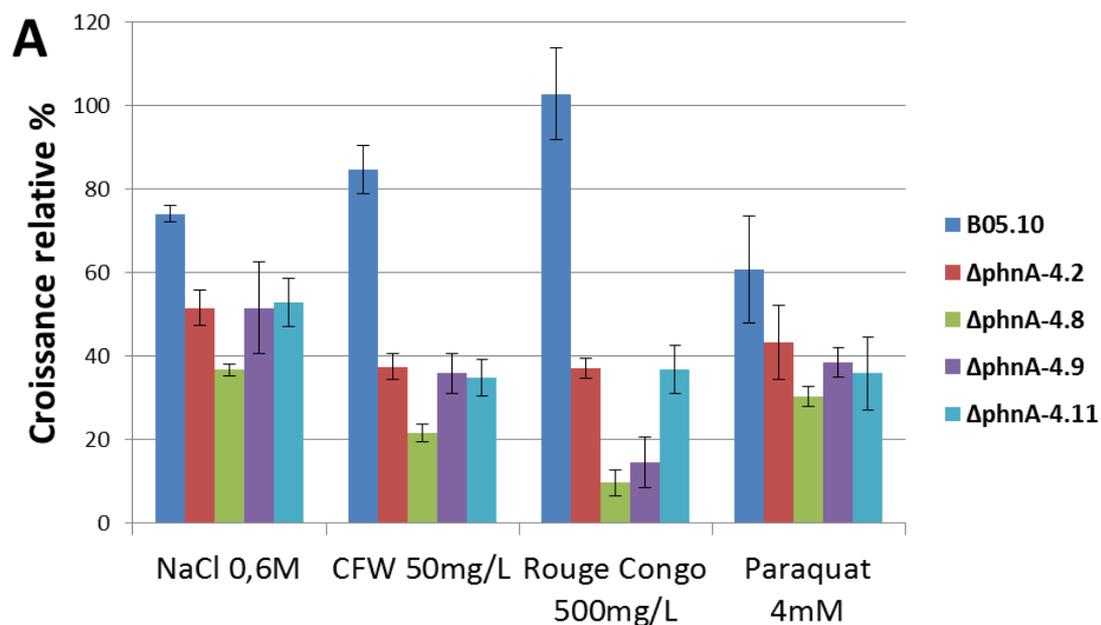
## 9. Lien entre PhnA et la voie osmoréglatrice

### 9.1. Rôle de PhnA dans l'adaptation à différents stress

Afin d'établir un lien entre la voie osmoréglatrice et la protéine PhnA, j'ai analysé la sensibilité des souches  $\Delta$ *phnA* aux différents stress régulés par Bos1 et Sak1 tel que le stress

osmotique, oxydatif (Liu et al., 2008) et le stress pariétal (Liu et al., 2011). Le NaCl a été utilisé afin d'induire un stress osmotique ionique. Le stress oxydatif a été provoqué par l'ajout de paraquat qui entraîne l'accumulation d'ions superoxyde. Le Calcofluor White (CFW) et le rouge Congo quant à eux, perturbent la paroi cellulaire (Roncero and Durán, 1985). Le CFW interagit avec la chitine tandis que le rouge Congo interagit avec les  $\beta$ -1,3 glucanes. La mesure de la croissance relative à celle sur milieu contrôle a montré une plus grande sensibilité, au stress osmotique ionique des mutants  $\Delta phnA$ . La sensibilité sur stress osmotique neutre, induit par du sorbitol 0,6 M (donnée non montrée), n'a montré aucune différence entre les mutants  $\Delta phnA$  et la souche sauvage. Par contre les mutants  $\Delta phnA$  sont plus sensible au stress pariétal que ce soit sur CFW ou rouge Congo (**Figure IV - 11A**). Dans le cas des mutants du site de phosphorylation, nous ne constatons aucune différence de sensibilité par rapport au sauvage sur les différents stress (**Figure IV - 11B**). Dans le cas de la souche complétée *phnA-4.11C2.1*, il y a une restauration de la croissance sur les différents stress, à l'exception du stress osmotique par NaCl (données non montrée).

En conclusion, PhnA est impliqué dans l'adaptation aux stress ioniques et pariétaux mais pas la phosphorylation de la serine 66.



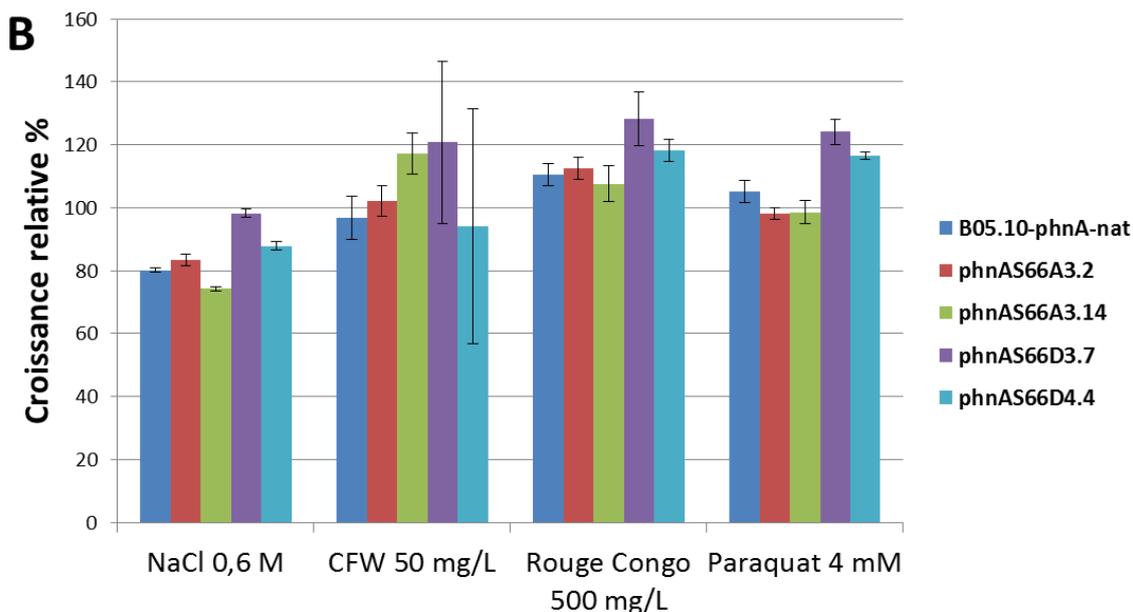


Figure IV - 11 : Sensibilité des mutants *phnA* à différents stress. Les valeurs de vitesses de croissances (J3-J1) ont été rapportées à la croissance sur milieu témoin. Trois réplicats ont été réalisés pour chaque souche. A/Croissance relative des différents transformants  $\Delta phnA$ . B/ Croissance relative des mutants du site de phosphorylation sérine 66. Dans cette analyse, la souche B05.10-*phnA*-nat est utilisée comme souche de référence à la place de la souche B05.10.

## 9.2. Morphologie des filaments sous stress pariétal

Afin d'étudier l'effet du stress pariétal sur la morphologie des hyphes, j'ai analysé le mycélium cultivé en présence de CFW (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). L'observation au microscope à fluorescence du mutant  $\Delta phnA-4.11$  a permis de mettre en évidence une déformation des hyphes semblable à des gonflements, caractéristique des défauts de parois (Sabine Fillingner, communication personnelle) (**Figure IV - 12C**). Chez la souche sauvage ou la souche complétementé, ce phénomène est moins présent (**Figure IV - 12A et B**).

Pour résumer, ces résultats confirment que *phnA* est impliqué dans l'adaptation au stress pariétal chez *B.cinerea*.

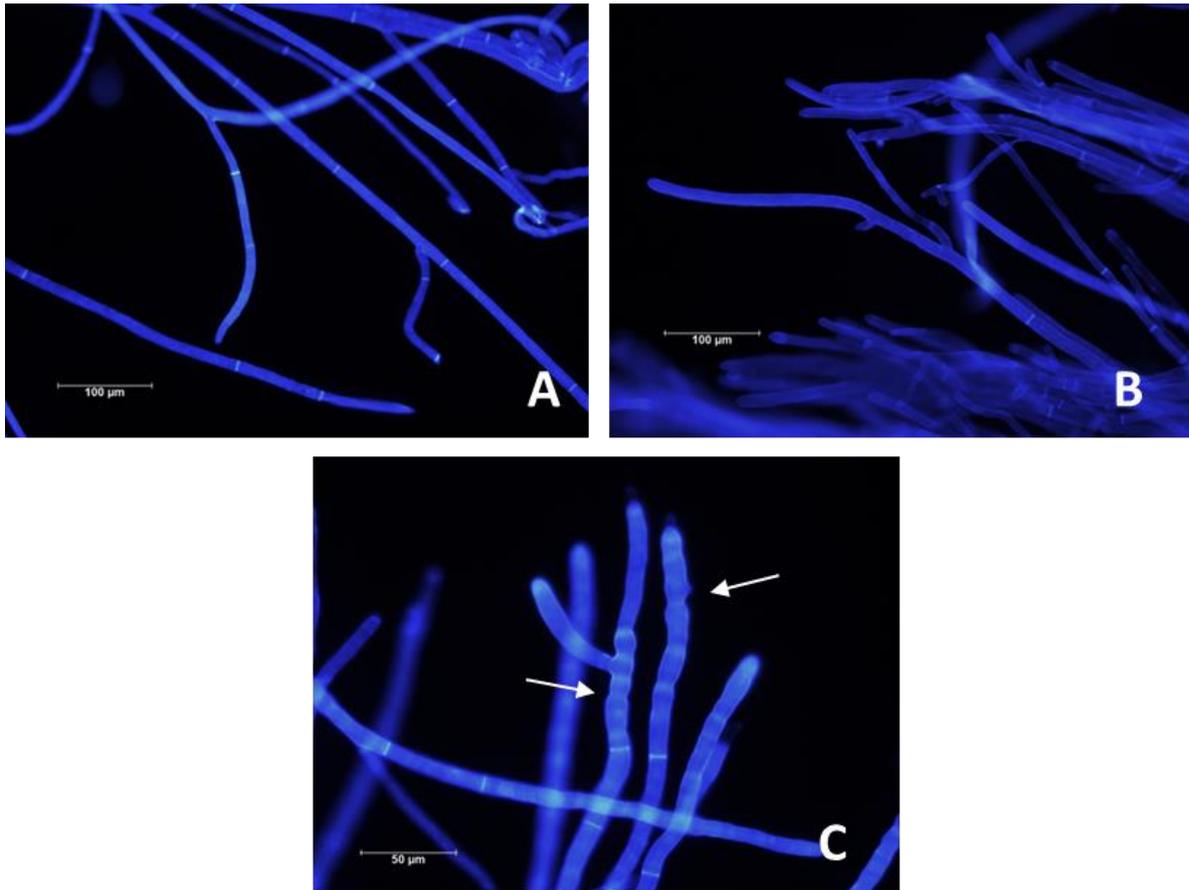


Figure IV - 12 : Morphologie des hyphes subissant un stress pariétal causé par le Calcofluor. L'observation a été réalisée sur mycélium cultivé sur milieu solide SISLER supplémenté avec CFW 50 µg/mL pendant trois jours. A/ B05.10 ; B/ *phnA*-4.11C2.1 ; C/  $\Delta$ *phnA*-4.11.

### 9.3. Analyse de la phosphorylation de la MAPK Sak1 chez les mutants *phnA*

Afin de déterminer si la protéine PhnA régule l'activité de la MAPK Sak1 *via* sa phosphorylation, nous avons étudié la phosphorylation de Sak1 par Western Blot chez la souche sauvage et les mutants  $\Delta$ *phnA*-4.8 et  $\Delta$ *phnA*-4.11, soumis à différents temps d'induction par le fludioxonil (**Figure IV - 13**). Chez la souche sauvage nous constatons bien une phosphorylation de la MAPK Sak1 en présence de fludioxonil, bien que cette induction ne soit pas très marquée dans le deuxième réplicat. Chez les mutants  $\Delta$ *phnA* il y a également induction de la phosphorylation de Sak1 en présence de fludioxonil. Les différents niveaux de phosphorylation observés entre les souches correspondent à des concentrations de protéines totales différentes. En conclusion, l'activation de la MAPK Sak1 par le fludioxonil n'est donc pas affectée par PhnA.

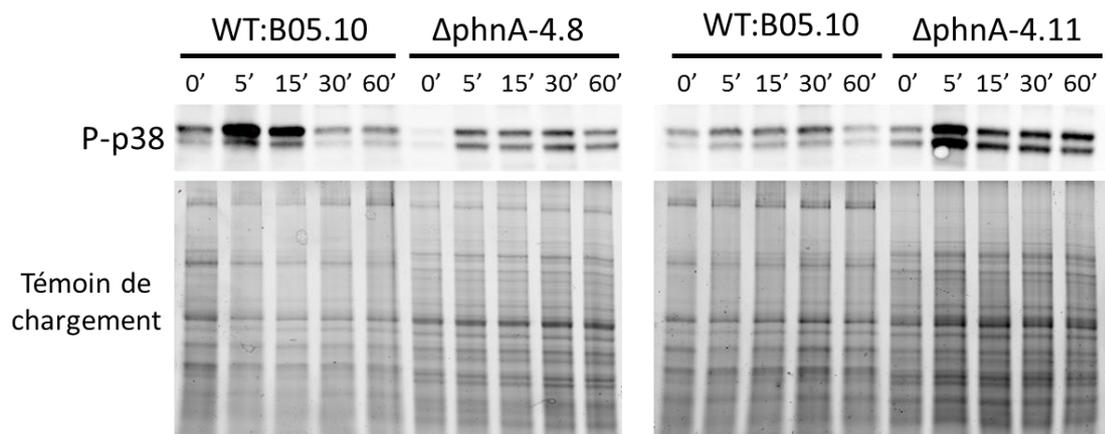


Figure IV - 13 : Phosphorylation de la MAPK Sak1 sous traitement fludioxonil chez les mutants  $\Delta phnA$  et le sauvage. Les protéines ont été extraites à partir de cultures soumises à 10  $\mu\text{g/mL}$  de fludioxonil pendant différentes durées d'induction (0'; 5'; 15'; 30'; 60'). La phosphorylation de Sak1 a été révélée par l'hybridation avec l'anticorps anti-phospho p38. Les gels de protéines totales ont été utilisés comme contrôle de chargement.

## Discussion

### 1. Contrôle du messager secondaire AMPc par le fludioxonil et la voie osmoréglatrice

La délétion de l'histidine kinase *bos1* entraînant une résistance au fludioxonil, il a été admis que Bos1 était l'unique senseur du fludioxonil. Dans cette étude, j'ai pu montrer que chez la souche sauvage, le fludioxonil accroît la concentration intracellulaire en AMPc suite à une induction longue de 60 min. De façon intéressante, chez le mutant  $\Delta$ *bos1* une réponse plus rapide au fludioxonil est présente, caractérisée par une augmentation d'AMPc après 5 min d'induction. Cela indique bien que la cellule est capable de percevoir le fludioxonil, même en absence de l'HK Bos1. La délétion de *bos1* entraînant une augmentation rapide de l'AMPc intracellulaire, il se peut alors de Bos1 régule négativement l'action du fludioxonil sur la voie AMPc. Malgré une augmentation de l'AMPc intracellulaire après induction par le fludioxonil, les phénotypes causés par le fongicide sont principalement liés à la voie osmoréglatrice. Il semblerait donc que l'effet du fludioxonil sur la voie AMPc soit « masqué » par l'effet sur l'histidine kinase. La variation de la concentration en AMPc chez le mutant  $\Delta$ *bos1* en présence de fludioxonil indique une perception du fongicide indépendante de l'histidine kinase.

La souche  $\Delta$ *sak1* présente une augmentation de la concentration en AMPc. Après traitement par le fludioxonil, l'AMPc intracellulaire diminue au cours du temps de traitement, indiquant ainsi que le stress fludioxonil module négativement la concentration en AMPc chez le mutant  $\Delta$ *sak1*. L'augmentation du contenu en AMPc chez le mutant  $\Delta$ *sak1* indique avant tout l'existence d'une connexion entre la voie osmoréglatrice et la voie AMPc. Ce résultat est donc en adéquation avec ceux obtenus dans le protéome total (voir chapitre II) où nous avons pu montrer une augmentation de l'abondance de la protéine BCG1 chez le mutant  $\Delta$ *sak1*. L'ensemble de ces résultats confirme ainsi l'interconnexion entre Sak1 et la voie AMPc par l'intermédiaire de BCG1 chez *B. cinerea*. La diminution, jusqu'à un certain seuil, de la concentration en AMPc après traitement par le fludioxonil chez le mutant  $\Delta$ *sak1* semble indiquer la présence d'un niveau basal d'AMPc, sans doute dû à une autre sous-unité  $G\alpha$ , la protéine BCG3, qui régule également la production d'AMPc (Doehlemann et al., 2006) mais qui ne serait donc pas régulée par Sak1.

La connexion entre ces voies de signalisation sera discutée en détail dans le chapitre V « Discussion Générale ».

Une action de *phnA* sur la concentration en AMPc a pu être démontrée, toutefois les résultats opposés chez les deux transformants étudiés ne nous permettent pas de conclure sur le mode de régulation exercé par *phnA*. Toutefois il s'avère que la délétion des gènes codant pour la sous-unité  $G\beta$  et  $G\gamma$  entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc (Julia Schumacher, communication personnelle). Sachant que PhnA est impliqué dans l'activité du dimère  $G\beta\gamma$ , il est alors envisageable qu'elle agisse de la même façon sur la concentration en AMPc.

## 2. PhnA intervient dans le pouvoir pathogène chez *B. cinerea*

La délétion du gène *phnA* augmente la sensibilité de la souche B05.10 au stress pariétal provoqué par le CFW et le rouge Congo. L'observation microscopique corrobore cet effet et suggère que les mutants  $\Delta phnA$  ont un défaut de la paroi. Afin de le confirmer, il serait intéressant de réaliser la même expérience en ajoutant du sorbitol afin de stabiliser osmotiquement le milieu. L'absence de déformation des hyphes validerait alors le défaut de paroi. Il conviendrait également d'analyser la composition de la paroi, notamment en quantifiant la chitine et les  $\beta$ 1,3-glucane comme cela a été réalisé par Liu et al. (2008).

Certains phénotypes n'ont pas pu être restaurés par la complémentation des mutants  $\Delta phnA$ . Toutefois on peut difficilement écarter certains d'entre eux, tel que le défaut de pathogénie, qui se retrouve dans chaque transformant indépendant. Chez les quatre transformants  $\Delta phnA$  obtenus dans cette étude, mais aussi chez les trois transformants obtenus auparavant, nous constatons une incapacité à former des nécroses. Au vue des nombreux transformants indépendants ayant ce même phénotype, il est peu probable que ce dernier ne soit pas lié à la mutation.

Dans le cas de la formation de nécroses, le phénotype  $\Delta phnA$  est partiellement complétement. En effet, sur les feuilles infectées par les souches complétementées j'ai observé l'apparition de faibles lésions nécrotiques autour de l'implant. La germination sur lame de verre des mutants  $\Delta phnA$  a montré un défaut de formation de structures infectieuses chez le mutant  $\Delta phnA$  complétementé par l'allèle sauvage. La formation d'hyphes allongés des mutants  $\Delta phnA$  reflète un défaut de perception de la surface. En testant la production d'acide par les mutants  $\Delta phnA$ , leur croissance est très affectée sur milieu supplémenté en bleu de bromothymol. En effet, la réduction de croissance est supérieure à ce qui a été observée sur milieu ML. Pour les souches complétementées *phnA-4.8C1.1* et *phnA-4.11C2.1* la croissance était comparable au sauvage, indiquant bien que la croissance et la production d'acide sont indépendantes l'une de l'autre. Il se pourrait donc que cette réduction de croissance chez les mutants  $\Delta phnA$ , soit causée par un stress induit par le bleu de bromothymol. Il est intéressant de noter, que pour les besoins de l'expérimentation le milieu de test doit être basique afin de bien visualiser l'effet de l'acidification. Il se peut que la délétion de *phnA* ait pu entraîner une sensibilité au pH basique. Afin de compléter l'étude il serait pertinent d'analyser la croissance des mutants  $\Delta phnA$  sur milieu dont le pH est contrôlé. Tous ces indices nous confortent dans l'hypothèse que *phnA* jouerait un rôle dans le pouvoir pathogène du champignon. Mais il nous est pour l'instant impossible d'évaluer l'impact de *phnA* dans le pouvoir pathogène de *B. cinerea*.

Afin de valider les phénotypes observés, nous avons alors entrepris des croisements entre les mutants  $\Delta phnA$  (MAT1-1) et la souche SAS405 (MAT1-2) afin d'analyser la ségrégation des phénotypes dans la descendance.

### 3. Interconnexion avec d'autres MAPKs

Dans cette étude nous avons montré que *phnA* est impliqué dans la formation du tube germinatif et des structures infectieuses. Ces phénotypes ont également été observés chez d'autres mutants de signalisation telle que ceux de la voie MAPK BMP1 et BMP3 (Doehlemann et al., 2006; Rui and Hahn, 2007; Schamber et al., 2010; Zheng et al., 2000) et ont été mis en relation avec un défaut de perception de surface. Le mutant  $\Delta bmp1$ , présente également un défaut de germination induit par la source carbone, mais qui est restauré par l'ajout d'AMPc. Il se peut alors qu'il existe une interconnexion entre PhnA et les MAPK BMP1 et BMP3. Afin de tester cette hypothèse, nous pouvons analyser par microscopie le développement du mutants  $\Delta phnA$  sur des surfaces de différentes natures et sur différentes sources de carbones. Chez  $\Delta phnA$ , nous pouvons également analyser la restauration de certains phénotypes par ajout d'AMPc exogène afin de déterminer si les processus régulés par PhnA se font de manière AMPc dépendante.

Chez *S. cerevisiae*, il existe une connexion entre la voie *via* protéine G et la cascade MAPK Fus3/Kss1 (orthologue de BMP1). Cette connexion se fait par l'intermédiaire des sous-unités G $\beta$  (Ste4), G $\gamma$  (Ste18) lors de la perception et la transmission de signaux de phéromones. Le dimère G $\beta\gamma$  participe ainsi à l'activation de la MAPK Fus3 (Rispaïl et al., 2009). Il serait alors intéressant d'étudier si un mécanisme semblable est présent chez *B. cinerea*.

### 4. L'état de phosphorylation de la sérine 66 n'est pas impliqué dans l'activité de PhnA

Liñeiro et collègues (2016) ont publié le phosphoprotéome de *B. cinerea* sur différents milieux de culture. De façon intéressante, la protéine PhnA a été retrouvée dans cette analyse, phosphorylée sur la sérine 66 mais aussi sur sérine 170. La sérine 66 n'est donc pas phosphorylée spécifiquement en présence de fludioxonil, mais aussi lors de la croissance végétative en milieu minimum. Lors de cette étude j'ai pu montrer que le site de phosphorylation sérine 66 n'est conservé que chez *S. sclerotiorum* (donnée non montrée) et n'intervient pas dans l'activité de la protéine. Sa fonction reste donc encore inconnue. Néanmoins il serait intéressant d'analyser la séquence du gène *phnA* chez d'autres souches de *B. cinerea* afin de d'établir si cette sérine 66 est conservée au sein de cette espèce.

Il est fort probable que la régulation l'activité de PhnA passe principalement par la phosphorylation de la sérine 170. En effet, contrairement à la sérine 66, la sérine 170 est très conservée chez de nombreuses espèces. Le fait qu'elle n'ait pas été détectée dans nos études du phosphoprotéome pourrait signifier que son état de phosphorylation n'est pas modulé par le fludioxonil.

Lors de cette analyse nous avons pu voir l'importance que joue *phnA* dans le développement chez *B. cinerea* mais aussi dans l'adaptation au stress. Ainsi, j'ai montré que *phnA* intervient dans la croissance mycélienne, l'adaptation au stress osmotique ionique, joue un rôle important dans la

sporulation et dans la réponse au stress pariétal. J'ai également pu montrer que *phnA* intervient dans la morphologie des hyphes germants et la formation de structures infectieuses sur lame de verre. La délétion de *phnA* impacte la concentration en AMPc. Toutefois les résultats obtenus ne nous permettent pas de conclure si *phnA* régule positivement ou négativement le contenu en AMPc. La transformation des mutants au locus par l'allèle sauvage n'a pas permis de rétablir certains phénotypes tels que la formation de sclérotas, la pathogénicité et la production d'acide. Nous pouvons alors difficilement relier ces phénotypes au gène *phnA*.

J'ai également cherché à identifier le rôle de la phosphorylation de la sérine 66. Que ce soit en inhibant l'état de phosphorylation ou en le mimant, j'ai constaté que ce site n'était pas impliqué dans le développement, ni l'adaptation au stress, ni dans le pouvoir pathogène chez *B. cinerea*. Le site de phosphorylation contrôlant l'activité de la protéine n'est donc pas cette sérine 66.

Dans le cadre du décryptage des voies de signalisation liées au stress fludioxonil, j'ai pu montrer que ce fongicide agit sur la concentration intracellulaire en AMPc indépendamment de l'HK Bos1, mais également qu'il existe une interconnexion entre la voie osmorégulatrice et la voie via protéine G.

## Chapitre IV - Annexes

### Réponse à la lumière : analyse du rôle de LTF1 dans la voie osmorégulatrice

La perception de la lumière est un élément crucial au développement chez *B. cinerea*. L'exposition du champignon à de la lumière blanche entraîne la production de macroconidies, tandis que l'obscurité conduit à la formation de sclérotes. La perception et la transmission des différents signaux lumineux regroupent de nombreux complexes protéiques (**Figure IV - S1**) (Schumacher, 2017). Parmi ces protéines, le facteur de transcription LTF1 (Light Transcription Factor 1) a été identifié comme étant impliqué dans la reproduction sexuée, la résistance aux stress et la virulence (Schumacher et al., 2014). En effet, la délétion du gène *ltf1* altère la perception du signal lumineux entraînant une production constitutive de macroconidie sans aucun sclérote, que ce soit en présence ou en absence de lumière. Le facteur de transcription LTF1 est également impliqué dans la croissance de façon lumière-dépendante. De façon intéressante la souche  $\Delta ltf1$  présente une sensibilité aux stress osmotiques et oxydatifs quelle que soit l'exposition lumineuse. Ces phénotypes suggèrent ainsi une connexion avec la voie osmorégulatrice contrôlée par la MAPK Sak1. Comme cela a été montré dans le chapitre précédent, la protéine LTF1 serait phosphorylée en présence de fludioxonil. Cela tend bien à renforcer l'hypothèse d'une connexion entre le facteur de transcription LTF1 et la voie osmorégulatrice.

Le but de cette analyse complémentaire a été d'identifier l'existence d'un lien entre la réponse à la lumière, contrôlée par LTF1 et la voie de réponse au stress osmotique sous contrôle de Sak1.

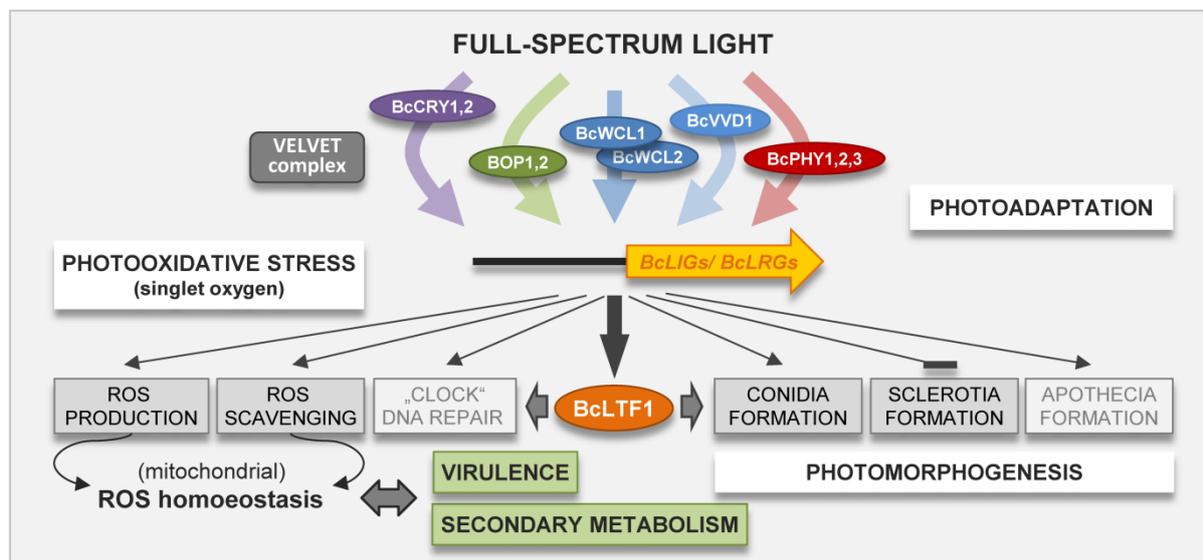


Figure IV - S1 : Réponse à la lumière sous contrôle du facteur de transcription LTF1 chez *B. cinerea* (Schumacher et al., 2014).

En collaboration avec Julia Schumacher et Kim Cohrs de l'université de Münster, nous avons étudié le rôle de la MAPK Sak1 dans la perception de la lumière. Pour cela, nous avons analysé l'effet de Sak1 sur l'expression du facteur de transcription LTF1 mais aussi l'effet de ce dernier sur l'activation de Sak1.

Il a précédemment été montré chez d'autres champignons, que la voie osmotique sous contrôle de Hog1, intervient également dans la réponse à la lumière (Esquivel-Naranjo et al., 2016; Yu et al., 2016). De plus, chez *B. cinerea*, l'homologue de de Hog1, Sak1, intervient dans la réponse à divers stress (osmotique, oxydatif, pariétale) mais aussi dans la conidiation, cette dernière étant également dépendante de la lumière. Chez le mutant  $\Delta sak1$ , quelle que soit les conditions, il y a une abolition de l'expression des gènes *bcccg1*, *bcbop1*, *bcddr48*, *bc12228* impliqués dans la réponse aux stress osmotique et oxydatif (Heller et al., 2012). Chez la souche sauvage, l'analyse de l'expression de ces gènes impliqués dans la réponse à différents stress, met en évidence une induction lumière dépendante, révélant ainsi un lien entre la régulation par Sak1 et la lumière (**Figure IV - S2**). En ce qui concerne les facteurs de transcription LTF1 et LTF2, leur expression est induite chez la souche sauvage en présence d'une source de lumière continue ou transitoire. Chez le mutant  $\Delta sak1$ , l'expression de LTF1 en condition lumineuse est conservée contrairement au facteur de transcription LTF2. Sak1 est donc nécessaire à la régulation transcriptionnelle de gènes de façon lumière dépendante. Néanmoins le gène *ltf1* n'est pas soumis à cette régulation.

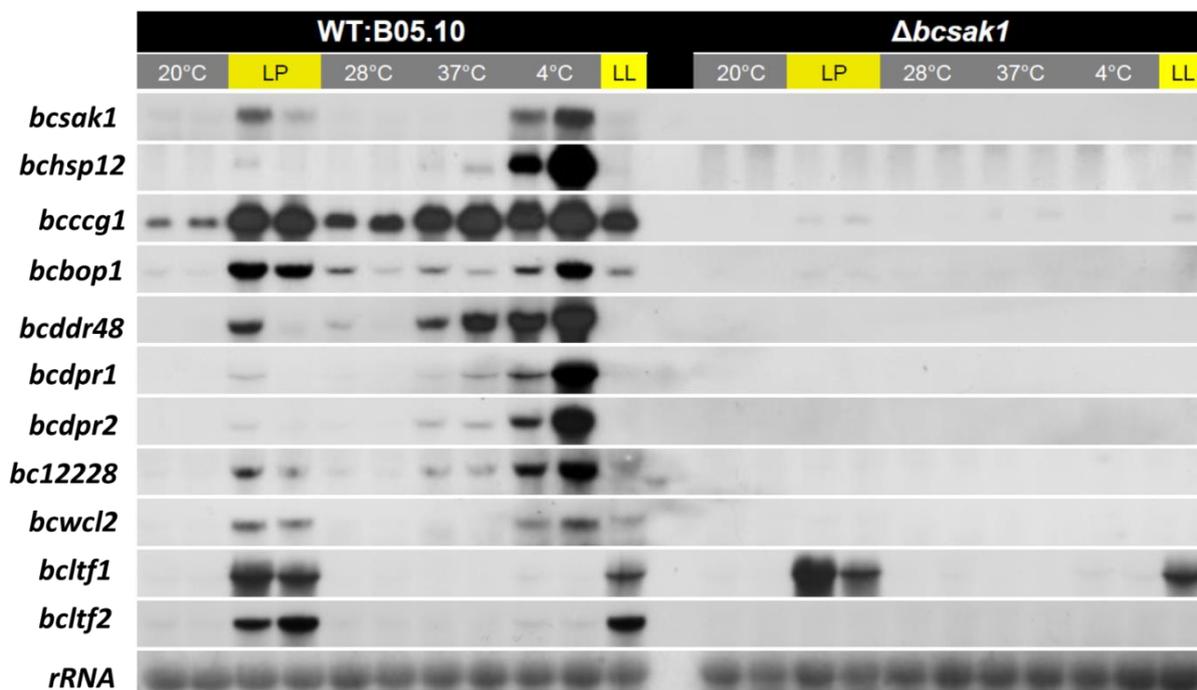


Figure IV - S2 : Implication de la MAPK Sak1 dans les mécanismes de réponse à la lumière (Schumacher et al., 2017, non publié). Analyse de l'expression des gènes candidats par Northern blot chez la souche sauvage et le mutant  $\Delta sak1$  dans différentes conditions de culture (lumière et température). Les gènes testés sont connus pour être impliqués dans la réponse à différents stress

(osmotique, oxydatif) et à la lumière. L'exposition aux différentes températures et conditions lumineuses a été réalisée pendant 30 et 90 min (bande gauche et droite respectivement).

Comme Julia Schumacher et Kim Cohrs l'ont montré précédemment, de nombreux gènes sous contrôle de Sak1 sont également dépendants de l'état lumineux. Nous avons donc étudié l'activation de la MAPK Sak1 en fonction de différents temps d'induction par la lumière (**Figure IV - S3A**). Nous constatons qu'en absence de lumière il n'y a pas ou peu d'activation de Sak1 tandis qu'en présence de lumière la MAPK est rapidement phosphorylée. En effet, il y a une augmentation de l'état de phosphorylation dès 5 minutes d'exposition, suivi d'une baisse après 30-60 minutes. Lors d'une induction plus longue, une nouvelle augmentation de l'état de phosphorylation se produit. Nous constatons donc une activation transitoire de de la MAPK en fonction du temps d'induction par la lumière.

Le rôle de LTF1 dans la régulation du stress osmotique et pariétal suggère une action de ce facteur de transcription sur la voie osmorégulatrice. Pour cela nous avons analysé l'état de phosphorylation de Sak1 chez le sauvage et le mutant  $\Delta ltf1$  soumis à différents traitements lumineux (**Figure IV - S3B**). Nous constatons une augmentation de l'état de phosphorylation de Sak1 que ce soit en lumière continue ou après induction par un signal lumineux de 30 min. D'une manière ou d'une autre le facteur de transcription LTF1 régule la phosphorylation de Sak1 en réponse à la lumière. A l'opposé, la protéine WCL1 du complexe WCC (White Collar Complex) impliqué dans la perception de la lumière bleue (**Figure IV - S1**) n'est pas nécessaire à l'activation de Sak1.

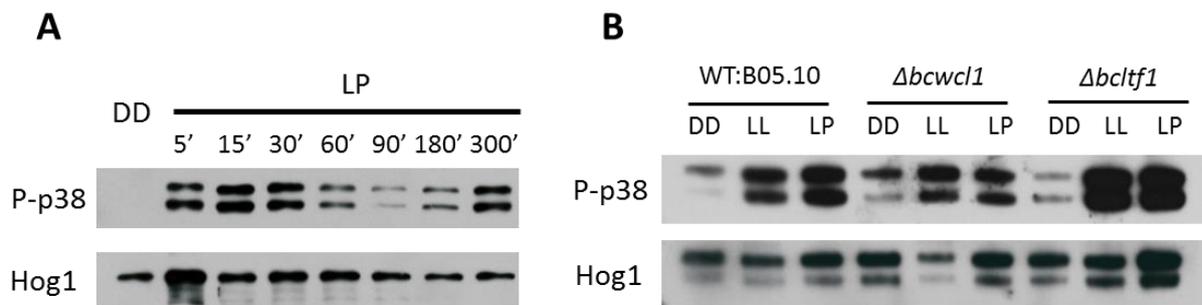


Figure IV - S3 : **A**/Phosphorylation de la MAPK Sak1 chez la souche sauvage après différents temps d'éclairage (LP) et à l'obscurité (DD). **B**/ Phosphorylation de la MAPK Sak1 chez les mutants  $\Delta bcwcl1$ ,  $\Delta ltf1$  et la souche sauvage. La phosphorylation de Sak1 a été révélée par l'hybridation avec l'anticorps anti-phospho p38. Un contrôle de chargement a été fait par détections des protéines Sak1 totales dans chaque échantillon. Les cultures ont été réalisées sur cellophane. Trois réplicats ont été réalisés, présentant chacun des résultats identiques.

Nous avons montré que l'expression de nombreux gènes contrôlés par la MAPK Sak1 peut être différentiellement induite en fonction de la lumière. Cette régulation lumière-dépendante est sûrement due à l'activation de Sak1 par phosphorylation suite à une exposition à la lumière.

Chez le mutant  $\Delta ltf1$  l'hyperactivation de Sak1 pourrait en partie expliquer sa sensibilité aux stress osmotique et pariétal. Il nous reste désormais à identifier, si LTF1 régule directement l'activation de Sak1 sachant qu'il s'agit d'un facteur de transcription. L'hypothèse la plus probable serait que LTF1 régule négativement l'expression d'une protéine activatrice de la MAPK ou au contraire positivement l'expression d'une protéine répresseur de son activation.

## Chapitre V : Discussion Générale

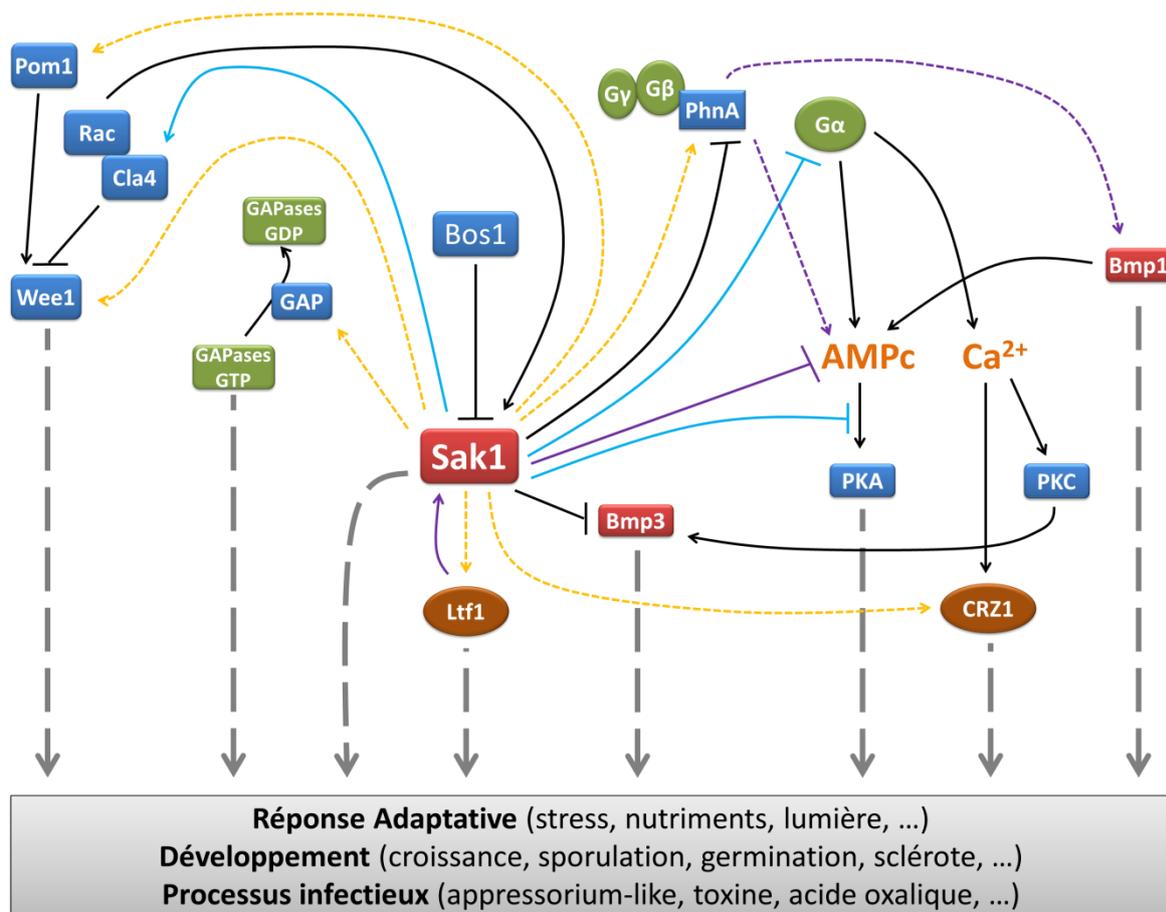


Figure V - 1 : Interconnexions suggérées entre la MAPK Sak1 et différentes voies de signalisation. Les flèches pleines noires symbolisent les connexions décrites dans la littérature. Les flèches bleues représentent les connexions identifiées à partir du protéome. Les flèches jaunes pointillées représentent les (dé)phosphorylations après traitement au fludioxonil, représentatives d’une éventuelle régulation par Sak1. Les flèches pleines violettes représentent les connexions identifiées à partir des résultats de Western Blot ou de dosage d’AMPC. Les protéines rouges, vertes et oranges représentent respectivement les MAPKs, des protéines G et des facteurs de transcription.

La perception et l'adaptation à l'environnement sont des processus indispensables pour la survie des champignons tels *B. cinerea*. Ils peuvent ainsi percevoir différents types de signaux qu'ils soient chimiques (ions, composés chimique) ou physiques (lumière, température, topographie) et engager des mécanismes cellulaires et moléculaires adéquates. Bien qu'impliquées dans des fonctions précises, les voies de signalisation sont loin d'être linéaires et peuvent s'interconnecter entre elles et avec d'autres voies n'ayant pas les mêmes fonctions, ajoutant ainsi une complexité supplémentaire dans l'étude de la réponse à un *stimulus*. L'ambition de cette thèse n'était pas, bien entendu, de résoudre l'ensemble des mécanismes de signalisations mais d'approfondir les connaissances existantes sur la voie de signalisation de réponse au stress. L'étude menée par des techniques globales, nous a ainsi permis d'apporter de nouvelles informations sur la signalisation impliquant la MAPK Sak1 (**Figure V - 1**), permettant de mieux comprendre les mécanismes de signalisation impliqués dans la perception des stress et les processus cellulaires engagés. Cette étude a également permis d'identifier des fonctions biologiques dont l'activité est susceptible d'être modulée par le fludioxonil, nous permettant ainsi d'avoir des informations complémentaires sur le mode d'action de ce fongicide.

## **Ce que nous savons désormais sur la régulation par Sak1**

### **Interconnexion entre MAPKs et protéines G**

Nous avons démontré qu'il existe plusieurs interconnexions entre la voie de signalisation impliquant Sak1 et la voie signalisation impliquant les protéines G. Grâce à l'étude du protéome nous avons pu mettre en évidence l'implication de la protéine BCG1 dans l'interconnexion avec Sak1. BCG1 joue un rôle clef dans l'activation de voies de signalisations telles que celle dépendante du messager secondaire AMPc ou la voie calcique. Comme présenté dans le chapitre introductif, la sous-unité *Gα1* est impliquée dans la production d'AMPc par l'intermédiaire de l'adénylate cyclase (Klimpel et al., 2002), tandis que la phosphodiesterase PDE2 est impliquée dans la dégradation de l'AMPc. Nous avons montré une augmentation de la concentration en AMPc chez le mutant  $\Delta sak1$  indiquant que la MAPK Sak1 régule négativement la production d'AMPc. Cette régulation ne semble pourtant pas dépendre de l'état d'activation de Sak1. En effet lors de l'étude du mutant  $\Delta bos1$ , dans lequel Sak1 est constitutivement phosphorylé (Liu et al., 2008), la concentration en AMPc n'est pas modifiée. En accord avec cela, le mutant  $\Delta sak1$  présente une augmentation de l'abondance de la protéine BCG1, ce qui pourrait entraîner une hyper-activation de l'adénylate cyclase Bac et ainsi expliquer l'augmentation de la concentration en AMPc (alors que la concentration en AMPc reste inchangée chez  $\Delta bos1$ ). L'analyse du protéome a également mis en évidence chez le mutant  $\Delta sak1$  une augmentation de la quantité de la protéine Cap1. Chez *Candida albicans* et *M. oryzae*, les mutants  $\Delta cap1$  présentent un défaut de production d'AMPc (Bahn and Sundstrom, 2001b; Zhou et al., 2012). L'accumulation de Cap1 pourrait ainsi également expliquer l'accumulation d'AMPc chez *B. cinerea*. La régulation de la concentration en AMPc peut se faire par dégradation de celle-ci en AMP par une phosphodiesterase. Toutefois, l'absence d'identification de phosphodiesterase lors de l'analyse

protéomique ne nous permet pas de conclure sur cette régulation. La modification du contenu en AMPc a probablement de fortes conséquences sur divers processus biologiques, notamment ceux sous contrôle de la PKA. Par ailleurs, Sak1 contrôle également l'activité de la PKA en régulant l'abondance de la sous-unité régulatrice PKAR.

Dans le but d'apporter des précisions sur la connexion entre Sak1 et la production d'AMPc, il serait intéressant de réaliser un dosage de l'AMPc en fonction des différents stress activant la MAPK Sak1 (stress osmotique, oxydatif, pariétal et fludioxonil) et des différents mutants de la voie osmorégulatrice. Afin d'étudier l'impact de la métabolisation de l'AMPc dans ce phénomène, il faudrait comparer l'expression du gène *pde2* entre le sauvage et le mutant  $\Delta sak1$ .

L'étude préliminaire du phosphoprotéome en réponse au fludioxonil a mis en évidence un lien entre Sak1 et la co-chaperonne PhnA impliqué dans la régulation des protéines G $\beta$  et G $\gamma$ . Une analyse transcriptomique des gènes régulés par le facteur de transcription Atf1, contrôlé par la MAPK Sak1, corrobore ce lien. En effet, Temme et al. (2012) ont montré que Atf1 régule négativement le gène *phnA*. Il est donc probable que Sak1 régule l'expression de *phnA*. La régulation de *phnA* peut donc se faire à deux niveaux : transcriptionnelle et post-traductionnelle. Sak1 agirait ainsi non seulement sur BCG1 mais également sur d'autres composantes de la voie contrôlée par les protéines G.

Chez *B. cinerea*, il semble également exister une connexion entre les protéines G, par l'intermédiaire de l'AMPc et une autre MAPK, BMP1. En effet l'allongement du tube germinatif du mutant  $\Delta phnA$  (chapitre IV) est également observé chez le mutant  $\Delta bmp1$  (Doehle et al., 2006). Chez le mutant  $\Delta bmp1$ , la diminution du pourcentage de germination induite par une source unique de carbone est compensée par l'ajout d'AMPc, indiquant un lien entre cette MAPK et la voie AMPc. La connexion entre PhnA et la MAPK BMP1 étant inconnue, il serait intéressant de vérifier si PhnA agit directement sur la voie MAPK impliquant BMP1 ou à travers l'AMPc. Pour cela nous pouvons réaliser un Western blot afin d'analyser l'état de phosphorylation de la BMP1 entre la souche sauvage et le mutant  $\Delta phnA$ .

Chez *S. cerevisiae*, il existe également une connexion entre la voie *via* protéine G et la cascade MAPK Fus3/Kss1 (orthologues de BMP1). En effet, en présence de phéromones, les sous-unités G $\beta$  (Ste4), G $\gamma$  (Ste18) sont impliquées dans l'activation de la MAPK Fus3 (Rispaïl et al., 2009). Le dimère G $\beta\gamma$  va activer la protéine GEF Cdc24 qui active à son tour la GTPase Cdc42, puis la protéine kinase Ste20. Cette dernière active la MAPKKK Ste11 et déclenche la cascade de phosphorylation jusqu'à Fus3. Lors d'une carence nutritive, la même cascade est déclenchée *via* la GTPase Ras2 et vers la MAPK Kss1 (Rispaïl et al., 2009).

Chez *B. cinerea*, Ras2 est impliquée dans la production d'AMPc (Schumacher et al., 2008a) soulignant encore une fois le lien entre protéines G, AMPc et potentiellement BMP1. En ce qui concerne les sous-unités G $\beta$  et G $\gamma$ , nous ne disposons que de peu d'information sur leur rôle d'effecteurs et sur les mécanismes de régulation qu'elles sont susceptibles d'activer. Il est peut-être envisageable chez *B. cinerea* que ces protéines G $\beta$  et G $\gamma$  exercent une fonction similaire à celles chez *S. cerevisiae* et participeraient à l'activation de la MAPK BMP1.

### **Interconnexion entre Sak1 et la voie calcique**

Comme présenté dans le chapitre introductif, une connexion entre la voie impliquant les protéines G et la voie calcique faisant intervenir la sous-unité  $G\alpha 1$  existe (Schumacher et al., 2008b). Ainsi avec le contrôle de l'abondance de  $G\alpha 1$  par Sak1, il est envisageable que cette MAPK influence également les processus cellulaires sous contrôle de la voie calcique. Cette hypothèse est corroborée d'une part par le contrôle de l'abondance de deux kinases dépendante de  $Ca^{2+}$ /calmoduline par Sak1 (chapitre II). D'autre part, l'analyse de la réponse au fludioxonil a permis de mettre en évidence une activation du facteur de transcription CRZ1 (chapitre III) dont l'activation dépend de la phosphatase calcineurine A (CNA). L'interconnexion entre les deux voies de signalisation pourrait également s'expliquer par la co-régulation de certaines voies métaboliques. Ainsi la production de métabolites secondaire et d'acide oxalique sont régulés à la fois par Sak1 et CRZ1 (cette étude; Heller et al., 2012; Schumacher et al., 2008). Le défaut de production de ces composés chez le mutant  $\Delta bcg1$  (Schumacher et al., 2008b) semble indiquer que cette interconnexion implique la protéine  $G\alpha$ . Le messenger secondaire  $Ca^{2+}$  intervient dans l'activation d'enzymes tels que la PKC1 (Huang, 1989). Celle-ci est à son tour une composante essentielle de l'activation d'une autre voie MAPK, celle de BMP3 (Hamel et al., 2012).

Afin de mieux comprendre le contrôle de Sak1 sur la voie calcique, des mesures de concentration en  $Ca^{2+}$  devraient être réalisées chez différents mutants en réponse à différents stress. Ainsi il serait intéressant de quantifier la concentration en  $Ca^{2+}$  chez les mutants  $\Delta bcg1$  et  $\Delta sak1$  en présence d'un stress activateur de la MAPK Sak1. Ces résultats nous permettraient de déterminer s'il existe un lien direct entre Sak1 et les composantes de la voie calcique.

### **Contrôle de Ltf1 par Sak1 et vice-versa**

Chez *B. cinerea*, bien que Sak1 soit impliquée dans la signalisation du stress, cette MAPK est également impliquée dans la réponse à la lumière. Sak1 régule ainsi l'expression du gène *bcwcl2* codant une protéine du complexe de réponse à la lumière « White Collar » ainsi que le gène *ltf2* codant pour un facteur de transcription de réponse à la lumière (J. Schumacher, comm. pers.). Par contre, Sak1 ne régule pas l'expression du facteur de transcription LTF1 qui intervient pourtant dans la réponse au stress oxydatif (Schumacher et al., 2014). A contrario, nos résultats de phosphoprotéomique indiquent que le fludioxonil module la phosphorylation de LTF1, probablement par l'intermédiaire de Sak1. Or de façon intéressante, LTF1 régule la phosphorylation de Sak1 (chapitre IV). Dans ce dernier cas, nous pouvons imaginer par exemple que le facteur de transcription LTF1 régule positivement l'expression d'une phosphatase. Il serait donc intéressant d'analyser l'expression de phosphatases chez le mutant  $\Delta ltf1$  par rapport à la souche sauvage afin d'identifier l'enzyme potentiellement impliquée.

## **Phosphoprotéome : vers une meilleure compréhension du mécanisme d'action du fludioxonil ?**

L'étude des mécanismes de signalisation liés au stress a été réalisée en utilisant le phénylpyrrole fludioxonil comme *stimulus*. Grâce au phosphoprotéome, nous avons notamment mis en évidence des processus biologiques sous influence du fongicide. Le premier phosphoprotéome a majoritairement mis en évidence des mécanismes de signalisation dévoilant d'éventuelles interconnexions de Sak1 avec, par exemple, la PKC, Cap1, CRZ1, des GAP (GTPase Activating Protein), tandis que la deuxième étude a permis de mettre en évidence des processus cellulaires divers impliqués, entre autre, dans le développement et le pouvoir pathogène du champignon.

Chez *Cochliobolus heterostrophus*, une tolérance au fludioxonil est observée chez les mutants  $\Delta skk1$  et  $\Delta skn7$ , les deux régulateurs réponse en aval de l'histidine kinase orthologue de Bos1. De façon intéressante le double mutant  $\Delta skk1\Delta skn7$  montre le même niveau de résistance que le mutant délété pour l'histidine kinase, indiquant que les deux voies régulent de façon additive la réponse au fludioxonil (Izumitsu et al., 2007). Chez *Alternaria alternata* l'étude du régulateur réponse Skn7 et de la MAPK Hog1 a révélé que la simple délétion de chacun des gènes correspondants entraîne une résistance partielle au fludioxonil, tandis que la double délétion du gène *skn7* et *hog1* entraîne une résistance totale (Chen et al., 2012) suggérant que Skn7 et Hog1 régule de façon complémentaire la résistance au fludioxonil. En ce qui concerne *B. cinerea* la situation est différente. En effet, ni la délétion du gène *sak1*, ni celle du gène *skn7* ne confère de résistance au fludioxonil (Liu et al., 2008; Segmüller et al., 2007; Yang et al., 2015). De plus, l'analyse protéomique a mis en évidence des protéines dont l'abondance était exclusivement régulée par Bos1 et indépendamment de Sak1. L'analyse de l'expression des gènes correspondants à ces protéines, chez les mutants  $\Delta bos1$  et  $\Delta skn7$ , permettra de vérifier si ces protéines sont régulées par la voie liant Bos1 et Skn7. Dans l'hypothèse d'une régulation indépendante de Skn7, cela indiquerait la présence d'une troisième voie de signalisation ayant Bos1 comme senseur. Il se pourrait ainsi que la régulation par le fludioxonil se fasse également par d'autres voies de signalisation en dehors de la cascade Bos1/Sak1.

### **Le cycle cellulaire, une cible potentielle du fludioxonil**

Le traitement fludioxonil provoque notamment la phosphorylation de la phosphatase Wee1 impliquée dans le cycle cellulaire chez *B. cinerea* (Minz-Dub and Sharon, 2017). De plus, cette protéine est régulée négativement par la PAK kinase Cla4 associée à la GTPase Rac. De façon intéressante, la GTPase Rac intervient dans l'activation de la MAPK Sak1 en présence de stress oxydatif (Dub et al., 2013). Chez *S. pombe*, Rac intervient également dans le cycle cellulaire et l'activation de cette protéine dépend notamment du gradient de la protéine kinase Pom1. De façon intéressante, l'orthologue de Pom1 a pu être identifiée lors du premier phosphoprotéome mais légèrement au-dessus du seuil de 5%. L'analyse fonctionnelle de *pom1* chez *B. cinerea* a mis en

évidence un rôle dans le pouvoir pathogène et dans la croissance du mycélium. Par contre, son implication dans le cycle cellulaire ne semble que très limitée (Kilani et al., données non publiées).

### **Le fludioxonil interviendrait-il dans la signalisation du pH ?**

Parmi les mécanismes modulés en présence de fludioxonil, certains impliquent le pouvoir pathogène, telles les protéines de réponse au pH incluant l'arrestine. Chez *A. nidulans*, la perception et la régulation du pH passe par l'activation de la voie Pal et du facteur de transcription associé PacC (Herranz et al., 2005). Le récepteur de cette voie est une protéine à sept domaines transmembranaires de la famille de GPCR. Chez les mammifères les  $\beta$ -arrestines sont impliquées l'endocytose du récepteur GPCR, son recyclage, mais aussi dans la transduction du signal (Shenoy and Lefkowitz, 2011). De façon intéressante, un mécanisme similaire d'endocytose du récepteur a été décrit chez *A. nidulans* impliquant l'arrestine PalF. Contrairement aux mammifères ce système ne semble pas entraîner un recyclage du récepteur mais serait cependant impliqué dans la transmission du signal vers la protéine PacC (Herranz et al., 2005). Cette transmission du signal nécessite la phosphorylation et l'ubiquitination de l'arrestine. Chez *B. cinerea*, des protéines de type arrestine ont également été annotées (Amselem et al., 2011) et l'une d'entre elles a été détectée déphosphorylée en présence de fludioxonil. Si ce résultat se confirme, cela signifierait que le fongicide interviendrait la perception du pH.

### **Perspectives globales**

L'analyse par protéomique et phosphoprotéomique sont des moyens puissants pour le décryptage des voies de signalisation. Néanmoins la présence d'obstacles techniques et le coût élevé en phosphoprotéomique, empêche l'utilisation de cette technique en routine. Dans l'hypothèse d'une étude phosphoprotéomique chez *B. cinerea* où les problèmes techniques seraient résolus, nous pourrions envisager de suivre la transmission de différents signaux en cinétique. Cette technique dynamique nous permettra ainsi de suivre le cheminement du signal à travers les étapes de phosphorylation et déphosphorylation, mais aussi d'identifier comment la voie osmorégulatrice régule la réponse à des signaux de différentes natures. Cette technique pourrait être couplée à une étude transcriptomique afin d'identifier les gènes régulés au cours du temps et en fonction de la nature du stress. L'analyse du phosphoprotéome peut également s'avérer très utiles dans l'identification *in silico* de sites de phosphorylation. En effet, l'identification systématique des sites de phosphorylation est très utile pour la mise en évidence des motifs conservés qui pourront ensuite être identifiés à partir d'outils informatiques (Ribeiro et al., 2017). Ainsi, il serait possible d'identifier des sites de phosphorylation putatifs de protéines fongiques. Une identification systématique des sites de phosphorylation permettrait également d'étudier l'évolution des sites de phosphorylation. En effet, l'identification de sites de phosphorylation conservés parmi plusieurs espèces est représentatif de sites très anciens

(Boekhorst et al., 2008; Studer et al., 2016). De plus, l'évolution des sites de phosphorylation modifie les interactions kinase-substrat et est une grande source de diversité phénotypique (Beltrao et al., 2009).

Comme expliqué dans le chapitre introductif, différentes modifications post-traductionnelles sont impliquées dans les mécanismes de régulation. Ainsi la voie Pal, implique une arrestine qui subit à la fois une phosphorylation et une ubiquitination. Par ailleurs, une récente étude a identifié l'ensemble des modifications par acétylation chez *B. cinerea* (Lv et al., 2016). Celle-ci a mis en évidence une acétylation de plusieurs composants de la voie osmorégulatrice dont la MAPK Sak1. Chez des cellules cardiaques, l'acétylation de la MAPK p38 participe à l'activité de la kinase (Pillai et al., 2011). Il est particulièrement intéressant de savoir que l'état de phosphorylation d'une protéine peut également dépendre d'autres modifications post-traductionnelles. Ainsi l'étude des autres PTM est essentielle pour la compréhension holistique des mécanismes régulant la transmission des signaux.

### **La phosphorylation, cible des futurs fongicides ?**

Malgré de nombreux points communs et une forte conservation des protéines de signalisation chez les eucaryotes, l'analyse fonctionnelles des différentes voies de signalisation chez les champignons a montré qu'il existe de nombreuses spécificités liées à certains genres ou espèces fongiques (e.g. Hamel et al., 2012). Il est alors nécessaire pour le décryptage des voies de signalisation de ne pas se limiter aux organismes dits « modèles ». En ce qui concerne les champignons pathogènes et notamment les phytopathogènes, il est très probable que leurs mécanismes de signalisation soient spécifiques des processus infectieux employés et diffèrent ainsi selon l'espèce considérée. Comme nous avons pu le constater lors de cette étude, l'analyse du protéome et du phosphoprotéome semble des techniques très intéressantes afin d'identifier des mécanismes de signalisation associés à la pathogénicité et ainsi identifier de futures cibles pour une lutte antifongique.

L'importance de l'analyse phosphoprotéomique a déjà été mise en avant dans domaine médicale. En effet, de nombreuses pathologies, dont de nombreux cancers sont causés par une dérégulation des phénomènes de phosphorylation, liées à des mutations qui modifient l'activité de certaines protéine kinases (Blume-Jensen and Hunter, 2001). Ces protéine kinases sont à l'heure actuelle des cibles potentielles pour de futur protocoles thérapeutiques (Marmioli et al., 2015).

En se basant sur l'étude de l'évolution des sites de phosphorylation il est également envisageable d'identifier des sites de phosphorylations spécifiques à un genre ou une espèce de champignon phytopathogène (e.g. *Botrytis*) et qui soit nécessaire à son développement ou au pouvoir pathogène. Ces sites de phosphorylation et les kinases associées seraient, à l'instar du domaine médical, d'excellentes cibles de lutte. Cette lutte spécifique d'une espèce pourrait également permettre de limiter l'impact du traitement sur les organismes non cibles et microbiotes.

## Références



- Amselem, J., Cuomo, C.A., Kan, J.A.L. van, Viaud, M., Benito, E.P., Couloux, A., Coutinho, P.M., Vries, R.P. de, Dyer, P.S., Fillinger, S., et al. (2011). Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLOS Genet.* 7, e1002230.
- Avenot, H., Simoneau, P., Iacomi-Vasilescu, B., and Bataillé-Simoneau, N. (2005). Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene *AbNIK1* from *Alternaria brassicicola* that confer high dicarboximide and phenylpyrrole resistance. *Curr. Genet.* 47, 234–243.
- Bahn, Y.S., and Sundstrom, P. (2001a). *CAP1*, an adenylate cyclase-associated protein gene, regulates bud-hypha transitions, filamentous growth, and cyclic AMP levels and is required for virulence of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 183, 3211–3223.
- Bahn, Y.-S., and Sundstrom, P. (2001b). *CAP1*, an Adenylate Cyclase-Associated Protein Gene, Regulates Bud-Hypha Transitions, Filamentous Growth, and Cyclic AMP Levels and Is Required for Virulence of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 183, 3211–3223.
- Bardou, P., Mariette, J., Escudié, F., Djemiel, C., and Klopp, C. (2014). jvenn: an interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics* 15.
- Beltrao, P., Trinidad, J.C., Fiedler, D., Roguev, A., Lim, W.A., Shokat, K.M., Burlingame, A.L., and Krogan, N.J. (2009). Evolution of Phosphoregulation: Comparison of Phosphorylation Patterns across Yeast Species. *PLOS Biol.* 7, e1000134.
- Biggar, K.K., and Li, S.S.-C. (2015). Non-histone protein methylation as a regulator of cellular signalling and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 5.
- Billard, A., Fillinger, S., Leroux, P., Lachaise, H., Beffa, R., and Debieu, D. (2012). Strong resistance to the fungicide fenhexamid entails a fitness cost in *Botrytis cinerea*, as shown by comparisons of isogenic strains. *Pest Manag. Sci.* 68, 684–691.
- Blaauw, M., Knol, J.C., Kortholt, A., Roelofs, J., Ruchira, Postma, M., Visser, A.J.W.G., and Haastert, P.J.M.V. (2003). Phosducin-like proteins in *Dictyostelium discoideum*: implications for the phosducin family of proteins. *EMBO J.* 22, 5047–5057.
- Blomberg, A., and Adler, L. (1989). Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 171, 1087–1092.
- Blume-Jensen, P., and Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411, 355–365.
- Boekhorst, J., van Breukelen, B., Heck, A.J., and Snel, B. (2008). Comparative phosphoproteomics reveals evolutionary and functional conservation of phosphorylation across eukaryotes. *Genome Biol.* 9, R144.
- Boersema, P.J., Raijmakers, R., Lemeer, S., Mohammed, S., and Heck, A.J.R. (2009). Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Nat. Protoc.* 4, 484–494.
- Boyer, L.A., Latek, R.R., and Peterson, C.L. (2004). The SANT domain: a unique histone-tail-binding module? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 158.
- Büttner, P., Koch, F., Voigt, K., Quidde, T., Risch, S., Blaich, R., Brückner, B., and Tudzynski, P. (1994). Variations in ploidy among isolates of *Botrytis cinerea*: implications for genetic and molecular analyses. *Curr. Genet.* 25, 445–450.
- Catlett, N.L., Yoder, O.C., and Turgeon, B.G. (2003). Whole-genome analysis of two-component signal transduction genes in fungal pathogens. *Eukaryot. Cell* 2, 1151–1161.

- Chapeland, F., Fritz, R., Lanen, C., Gredt, M., and Leroux, P. (1999). Inheritance and Mechanisms of Resistance to Anilinopyrimidine Fungicides in *Botrytis Cinerea* (*Botryotinia Fuckeliana*). *Pestic. Biochem. Physiol.* *64*, 85–100.
- Chen, R.E., and Thorner, J. (2007). Function and Regulation in MAPK Signaling Pathways. *Biochim. Biophys. Acta* *1773*, 1311–1340.
- Chen, Z.J., and Sun, L.J. (2009). Nonproteolytic Functions of Ubiquitin in Cell Signaling. *Mol. Cell* *33*, 275–286.
- Chen, L.-H., Lin, C.-H., and Chung, K.-R. (2012). Roles for SKN7 response regulator in stress resistance, conidiation and virulence in the citrus pathogen *Alternaria alternata*. *Fungal Genet. Biol.* *49*, 802–813.
- Cifani, P., and Kentsis, A. (2017). Towards comprehensive and quantitative proteomics for diagnosis and therapy of human disease. *PROTEOMICS* *17*, n/a-n/a.
- Craig, R., and Beavis, R.C. (2004). TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra. *Bioinformatics* *20*, 1466–1467.
- Dalmis, B., Schumacher, J., Moraga, J., Le Pêcheur, P., Tudzynski, B., Collado, I.G., and Viaud, M. (2011). The *Botrytis cinerea* phytotoxin botcinic acid requires two polyketide synthases for production and has a redundant role in virulence with botrydial. *Mol. Plant Pathol.* *12*, 564–579.
- Davature, M., Dumur, J., Bataillé-Simoneau, N., Campion, C., Valot, B., Zivy, M., Simoneau, P., and Fillinger, S. (2014). Phosphoproteome profiles of the phytopathogenic fungi *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea* during exponential growth in axenic cultures. *PROTEOMICS* *14*, 1639–1645.
- Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., et al. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* *13*, 414–430.
- Debieu, D., Bach, J., Hugon, M., Malosse, C., and Leroux, P. (2001). The hydroxyanilide fenhexamid, a new sterol biosynthesis inhibitor fungicide efficient against the plant pathogenic fungus *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Pest Manag. Sci.* *57*, 1060–1067.
- Debieu, D., Bach, J., Montesinos, E., Fillinger, S., and Leroux, P. (2013). Role of sterol 3-ketoreductase sensitivity in susceptibility to the fungicide fenhexamid in *Botrytis cinerea* and other phytopathogenic fungi. *Pest Manag. Sci.* *69*, 642–651.
- Defosse, T.A., Sharma, A., Mondal, A.K., Dugé de Bernonville, T., Latgé, J.-P., Calderone, R., Giglioli-Guivarc'h, N., Courdavault, V., Clastre, M., and Papon, N. (2015). Hybrid histidine kinases in pathogenic fungi. *Mol. Microbiol.* *95*, 914–924.
- Doehlemann, G., Berndt, P., and Hahn, M. (2006). Different signalling pathways involving a G $\alpha$  protein, cAMP and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia. *Mol. Microbiol.* *59*, 821–835.
- Droby, S., and Lichter, A. (2004). Post-Harvest *Botrytis* Infection: Etiology, Development and Management. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, (Springer, Dordrecht), pp. 349–367.
- Dub, A.M., Kokkelink, L., Tudzynski, B., Tudzynski, P., and Sharon, A. (2013). Involvement of *Botrytis cinerea* Small GTPases BcRAS1 and BcRAC in Differentiation, Virulence, and the Cell Cycle. *Eukaryot. Cell* *12*, 1609–1618.

- Dulermo, T., Rasclé, C., Billon-Grand, G., Gout, E., Bligny, R., and Cotton, P. (2010). Novel insights into mannitol metabolism in the fungal plant pathogen *Botrytis cinerea*. *Biochem. J.* *427*, 323–332.
- Elad, Y. (2016). Cultural and Integrated Control of *Botrytis* spp. In *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and Its Management in Agricultural Systems*, (Springer, Cham), pp. 149–164.
- Elad, Y., Pertot, I., Prado, A.M.C., and Stewart, A. (2016). Plant Hosts of *Botrytis* spp. In *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and Its Management in Agricultural Systems*, (Springer, Cham), pp. 413–486.
- Esquivel-Naranjo, E.U., García-Esquivel, M., Medina-Castellanos, E., Correa-Pérez, V.A., Parra-Arriaga, J.L., Landeros-Jaime, F., Cervantes-Chávez, J.A., and Herrera-Estrella, A. (2016). A *Trichoderma atroviride* stress-activated MAPK pathway integrates stress and light signals. *Mol. Microbiol.* *100*, 860–876.
- Fagard, M., Launay, A., Clément, G., Courtial, J., Dellagi, A., Farjad, M., Krapp, A., Soulié, M.-C., and Masclaux-Daubresse, C. (2014). Nitrogen metabolism meets phytopathology. *J. Exp. Bot.* *65*, 5643–5656.
- Faretra, F., and Antonacci, E. (1987). Production of apothecia of *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz. under controlled environmental conditions. *Phytopathol. Mediterr.* *26*, 29–35.
- Faretra, F., and Pollastro, S. (1991). Genetic basis of resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Mycol. Res.* *95*, 943–951.
- Faretra, F., Antonacci, E., and Pollastro, S. (1988). Sexual Behaviour and Mating System of *Botryotinia fuckeliana*, Teleomorph of *Botrytis cinerea*. *Microbiology* *134*, 2543–2550.
- Ferry-Dumazet, H., Houel, G., Montalent, P., Moreau, L., Langella, O., Negroni, L., Vincent, D., Lalanne, C., de Daruvar, A., Plomion, C., et al. (2005). PROTICdb: A web-based application to store, track, query, and compare plant proteome data. *PROTEOMICS* *5*, 2069–2081.
- Fillinger, S., and Walker, A.-S. (2016). Chemical Control and Resistance Management of *Botrytis* Diseases. SpringerLink 189–216.
- Fillinger, S., Ruijter, G., Tamás, M.J., Visser, J., Thevelein, J.M., and D'enfert, C. (2001). Molecular and physiological characterization of the NAD-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* *39*, 145–157.
- Fillinger, S., Leroux, P., Auclair, C., Barreau, C., Hajj, C.A., and Debieu, D. (2008). Genetic Analysis of Fenhexamid-Resistant Field Isolates of the Phytopathogenic Fungus *Botrytis cinerea*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *52*, 3933–3940.
- Finn, R.D., Coghill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Mistry, J., Mitchell, A.L., Potter, S.C., Punta, M., Qureshi, M., Sangrador-Vegas, A., et al. (2016). The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res.* *44*, D279–D285.
- Flanary, P.L., DiBello, P.R., Estrada, P., and Dohlman, H.G. (2000). Functional Analysis of Plp1 and Plp2, Two Homologues of Phosducin in Yeast. *J. Biol. Chem.* *275*, 18462–18469.
- Ford, M.G.J., Mills, I.G., Peter, B.J., Vallis, Y., Praefcke, G.J.K., Evans, P.R., and McMahon, H.T. (2002). Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* *419*, 361.
- Fournier, M.L., Gilmore, J.M., Martin-Brown, S.A., and Washburn, M.P. (2007). Multidimensional Separations-Based Shotgun Proteomics. *Chem. Rev.* *107*, 3654–3686.

- Fritz, R., Lanen, C., Colas, V., and Leroux, P. (1997). Inhibition of Methionine Biosynthesis in *Botrytis cinerea* by the Anilinopyrimidine Fungicide Pyrimethanil. *Pestic. Sci.* *49*, 40–46.
- Gaudet, R., Bohm, A., and Sigler, P.B. (1996). Crystal Structure at 2.4 Å Resolution of the Complex of Transducin  $\beta\gamma$  and Its Regulator, Phosducin. *Cell* *87*, 577–588.
- Godoy, G., Steadman, J.R., Dickman, M.B., and Dam, R. (1990). Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* *37*, 179–191.
- González, M., Brito, N., Frías, M., and González, C. (2013). *Botrytis cinerea* Protein O-Mannosyltransferases Play Critical Roles in Morphogenesis, Growth, and Virulence. *PLOS ONE* *8*, e65924.
- González, M., Brito, N., and González, C. (2014). Identification of glycoproteins secreted by wild-type *Botrytis cinerea* and by protein O-mannosyltransferase mutants. *BMC Microbiol.* *14*.
- Gonzalez-Fernandez, R., Aloria, K., Arizmendi, J.M., and Jorrin-Novo, J.V. (2013). Application of Label-Free Shotgun nUPLC–MSE and 2-DE Approaches in the Study of *Botrytis cinerea* Mycelium. *J. Proteome Res.* *12*, 3042–3056.
- Gorovits, R., and Yarden, O. (2003). Environmental Suppression of *Neurospora crassa* cot-1 Hyperbranching: a Link between COT1 Kinase and Stress Sensing. *Eukaryot. Cell* *2*, 699–707.
- Gorovits, R., Sjollesma, K.A., Sietsma, J.H., and Yarden, O. (2000). Cellular distribution of COT1 kinase in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* *30*, 63–70.
- Götz, S., García-Gómez, J.M., Terol, J., Williams, T.D., Nagaraj, S.H., Nueda, M.J., Robles, M., Talón, M., Dopazo, J., and Conesa, A. (2008). High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res.* *36*, 3420–3435.
- Gronover, C.S., Kasulke, D., Tudzynski, P., and Tudzynski, B. (2001). The Role of G Protein Alpha Subunits in the Infection Process of the Gray Mold Fungus *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *14*, 1293–1302.
- Gurevich, E.V., and Gurevich, V.V. (2006). Arrestins: ubiquitous regulators of cellular signaling pathways. *Genome Biol.* *7*, 236.
- Gygi, S.P., Rochon, Y., Franza, B.R., and Aebersold, R. (1999). Correlation between Protein and mRNA Abundance in Yeast. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 1720–1730.
- Hägerhäll, C. (1997). Succinate: quinone oxidoreductases: Variations on a conserved theme. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* *1320*, 107–141.
- Hamel, L.-P., Nicole, M.-C., Duplessis, S., and Ellis, B.E. (2012). Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Plant-Interacting Fungi: Distinct Messages from Conserved Messengers. *Plant Cell Online* *24*, 1327–1351.
- Han, Y., Joosten, H.-J., Niu, W., Zhao, Z., Mariano, P.S., McCalman, M., Kan, J. van, Schaap, P.J., and Dunaway-Mariano, D. (2007). Oxaloacetate Hydrolase, the C–C Bond Lyase of Oxalate Secreting Fungi. *J. Biol. Chem.* *282*, 9581–9590.
- Have, A. ten, Mulder, W., Visser, J., and van Kan, J.A.L. (1998). The Endopolygalacturonase Gene *Bcpg1* Is Required for Full Virulence of *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *11*, 1009–1016.

- Heller, J., Ruhnke, N., Espino, J.J., Massaroli, M., Collado, I.G., and Tudzynski, P. (2012). The Mitogen-Activated Protein Kinase BcSak1 of *Botrytis cinerea* Is Required for Pathogenic Development and Has Broad Regulatory Functions Beyond Stress Response. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 25, 802–816.
- Hérivaux, A., So, Y.-S., Gastebois, A., Latgé, J.-P., Bouchara, J.-P., Bahn, Y.-S., and Papon, N. (2016). Major Sensing Proteins in Pathogenic Fungi: The Hybrid Histidine Kinase Family. *PLOS Pathog* 12, e1005683.
- Herranz, S., Rodríguez, J.M., Bussink, H.-J., Sánchez-Ferrero, J.C., Arst, H.N., Peñalva, M.A., and Vincent, O. (2005). Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 12141–12146.
- Horevaj, P., and Bluhm, B.H. (2012). BDM1, a phosphatase-like gene of *Fusarium graminearum*, is involved in virulence during infection of wheat and maize. *Mol. Plant Pathol.* 13, 431–444.
- Huang, K.P. (1989). The mechanism of protein kinase C activation. *Trends Neurosci.* 12, 425–432.
- Humphrey, S.J., James, D.E., and Mann, M. (2015). Protein Phosphorylation: A Major Switch Mechanism for Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol. Metab.* 26, 676–687.
- Izumitsu, K., Yoshimi, A., and Tanaka, C. (2007). Two-Component Response Regulators Ssk1p and Skn7p Additively Regulate High-Osmolarity Adaptation and Fungicide Sensitivity in *Cochliobolus heterostrophus*. *Eukaryot. Cell* 6, 171–181.
- James, P. (1997). Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Q. Rev. Biophys.* 30, 279–331.
- Kilani, J., and Fillinger, S. (2016). Phenylpyrroles: 30 Years, Two Molecules and (Nearly) No Resistance. *Front. Microbiol.* 7.
- Kim, K.S., Min, J.-Y., and Dickman, M.B. (2008). Oxalic Acid Is an Elicitor of Plant Programmed Cell Death during *Sclerotinia sclerotiorum* Disease Development. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 21, 605–612.
- Kim, Y., Nandakumar, M.P., and Marten, M.R. (2007). Proteomics of filamentous fungi. *Trends Biotechnol.* 25, 395–400.
- Klimpel, A., Gronover, C.S., Williamson, B., Stewart, J.A., and Tudzynski, B. (2002). The adenylate cyclase (BAC) in *Botrytis cinerea* is required for full pathogenicity. *Mol. Plant Pathol.* 3, 439–450.
- Kokkelink, L., Minz, A., Al-Masri, M., Giesbert, S., Barakat, R., Sharon, A., and Tudzynski, P. (2011). The small GTPase BcCdc42 affects nuclear division, germination and virulence of the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Fungal Genet. Biol.* 48, 1012–1019.
- Krauss, G. (2014a). Intracellular Messenger Substances: “Second Messengers.” In *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, G. Krauss, ed. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA), pp. 369–416.
- Krauss, G. (2014b). G Protein-Coupled Signal Transmission Pathways. In *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, G. Krauss, ed. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA), pp. 291–368.
- Kretschmer, M., Leroux, M., Mosbach, A., Walker, A.-S., Fillinger, S., Mernke, D., Schoonbeek, H.-J., Pradier, J.-M., Leroux, P., Waard, M.A.D., et al. (2009). Fungicide-Driven Evolution and Molecular Basis of Multidrug Resistance in Field Populations of the Grey Mould Fungus *Botrytis cinerea*. *PLOS Pathog.* 5, e1000696.

- Ky, I., Lorrain, B., Jourdes, M., Pasquier, G., Fermaud, M., GéNy, L., Rey, P., Doneche, B., and Teissedre, P.-L. (2012). Assessment of grey mould (*Botrytis cinerea*) impact on phenolic and sensory quality of Bordeaux grapes, musts and wines for two consecutive vintages: *Botrytis cinerea* effect on grape and wine quality. *Aust. J. Grape Wine Res.* *18*, 215–226.
- Lalève, A., Gamet, S., Walker, A.-S., Debieu, D., Toquin, V., and Fillinger, S. (2014a). Site-directed mutagenesis of the P225, N230 and H272 residues of succinate dehydrogenase subunit B from *Botrytis cinerea* highlights different roles in enzyme activity and inhibitor binding. *Environ. Microbiol.* *16*, 2253–2266.
- Lalève, A., Fillinger, S., and Walker, A.-S. (2014b). Fitness measurement reveals contrasting costs in homologous recombinant mutants of *Botrytis cinerea* resistant to succinate dehydrogenase inhibitors. *Fungal Genet. Biol.* *67*, 24–36.
- Langella, O., Valot, B., Balliau, T., Blein-Nicolas, M., Bonhomme, L., and Zivy, M. (2017). X!TandemPipeline: A Tool to Manage Sequence Redundancy for Protein Inference and Phosphosite Identification. *J. Proteome Res.* *16*, 494–503.
- Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gredt, M., and Chapeland, F. (2002). Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Manag. Sci.* *58*, 876–888.
- Leroux, P., Gredt, M., Leroch, M., and Walker, A.-S. (2010). Exploring Mechanisms of Resistance to Respiratory Inhibitors in Field Strains of *Botrytis cinerea*, the Causal Agent of Gray Mold. *Appl. Environ. Microbiol.* *76*, 6615–6630.
- Li, L., Wright, S.J., Krystofova, S., Park, G., and Borkovich, K.A. (2007). Heterotrimeric G Protein Signaling in Filamentous Fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* *61*, 423–452.
- Li, S., Dean, S., Li, Z., Horecka, J., Deschenes, R.J., and Fassler, J.S. (2002). The Eukaryotic Two-Component Histidine Kinase Sln1p Regulates OCH1 via the Transcription Factor, Skn7p. *Mol. Biol. Cell* *13*, 412–424.
- Liñeiro, E., Cantoral, J.M., and Fernández-Acero, F.J. (2016a). Contribution of Proteomics Research to Understanding *Botrytis* Biology and Pathogenicity. *SpringerLink* 315–333.
- Liñeiro, E., Chiva, C., Cantoral, J.M., Sabido, E., and Fernández-Acero, F.J. (2016b). Phosphoproteome analysis of *B. cinerea* in response to different plant-based elicitors. *J. Proteomics* *139*, 84–94.
- Liu, W., Leroux, P., and Fillinger, S. (2008). The HOG1-like MAP kinase Sak1 of *Botrytis cinerea* is negatively regulated by the upstream histidine kinase Bos1 and is not involved in dicarboximide- and phenylpyrrole-resistance. *Fungal Genet. Biol.* *45*, 1062–1074.
- Liu, W., Soulié, M.-C., Perrino, C., and Fillinger, S. (2011). The osmosensing signal transduction pathway from *Botrytis cinerea* regulates cell wall integrity and MAP kinase pathways control melanin biosynthesis with influence of light. *Fungal Genet. Biol.* *48*, 377–387.
- Lohi, O., Poussu, A., Mao, Y., Quiocho, F., and Lehto, V.-P. (2002). VHS domain – a longshoreman of vesicle lines. *FEBS Lett.* *513*, 19–23.
- Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S., and Shafee, T. (2017). Transcriptomics technologies. *PLOS Comput. Biol.* *13*, e1005457.

- Lucas, J.A., Hawkins, N.J., and Fraaije, B.A. (2015). Chapter Two - The Evolution of Fungicide Resistance. In *Advances in Applied Microbiology*, S. Sariaslani, and G.M. Gadd, eds. (Academic Press), pp. 29–92.
- Lv, B., Yang, Q., Li, D., Liang, W., and Song, L. (2016). Proteome-wide analysis of lysine acetylation in the plant pathogen *Botrytis cinerea*. *Sci. Rep.* 6, srep29313.
- Malonek, S., Rojas, M.C., Hedden, P., Gaskin, P., Hopkins, P., and Tudzynski, B. (2004). The NADPH-cytochrome P450 Reductase Gene from *Gibberella fujikuroi* Is Essential for Gibberellin Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 279, 25075–25084.
- Manteau, S., Abouna, S., Lambert, B., and Legendre, L. (2003). Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43, 359–366.
- Marmioli, S., Fabbro, D., Miyata, Y., Pierobon, M., and Ruzzene, M. (2015). Phosphorylation, Signaling, and Cancer: Targets and Targeting. *BioMed Res. Int.* 2015.
- Marschall, R., Siegmund, U., Burbank, J., and Tudzynski, P. (2016). Update on Nox function, site of action and regulation in *Botrytis cinerea*. *Fungal Biol. Biotechnol.* 3, 8.
- Michalski, A., Damoc, E., Hauschild, J.-P., Lange, O., Wiegand, A., Makarov, A., Nagaraj, N., Cox, J., Mann, M., and Horning, S. (2011). Mass Spectrometry-based Proteomics Using Q Exactive, a High-performance Benchtop Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometer. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 10.
- Minz-Dub, A., and Sharon, A. (2017). The *Botrytis cinerea* PAK kinase BcCla4 mediates morphogenesis, growth and cell cycle regulating processes downstream of BcRac. *Mol. Microbiol.* 104, 487–498.
- Morschhäuser, J. (2010). Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genet. Biol.* 47, 94–106.
- Mosbach, A., Edel, D., Farmer, A.D., Widdison, S., Barchietto, T., Dietrich, R.A., Corran, A., and Scalliet, G. (2017). Anilinopyrimidine Resistance in *Botrytis cinerea* Is Linked to Mitochondrial Function. *Front. Microbiol.* 8.
- Motoyama, T., Kadokura, K., Ohira, T., Ichiishi, A., Fujimura, M., Yamaguchi, I., and Kudo, T. (2005). A two-component histidine kinase of the rice blast fungus is involved in osmotic stress response and fungicide action. *Fungal Genet. Biol.* 42, 200–212.
- Mueller, L.N., Brusniak, M.-Y., Mani, D.R., and Aebersold, R. (2008). An Assessment of Software Solutions for the Analysis of Mass Spectrometry Based Quantitative Proteomics Data. *J. Proteome Res.* 7, 51–61.
- Nagy, P.L., Griesenbeck, J., Kornberg, R.D., and Cleary, M.L. (2002). A trithorax-group complex purified from *Saccharomyces cerevisiae* is required for methylation of histone H3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 90–94.
- Nakajima, M., and Akutsu, K. (2014). Virulence factors of *Botrytis cinerea*. *J. Gen. Plant Pathol.* 80, 15–23.
- Nicot, P.C., Stewart, A., Bardin, M., and Elad, Y. (2016). Biological Control and Biopesticide Suppression of *Botrytis*-Incited Diseases. In *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and Its Management in Agricultural Systems*, (Springer, Cham), pp. 165–187.

- Ochiai, N., Fujimura, M., Motoyama, T., Ichiishi, A., Usami, R., Horikoshi, K., and Yamaguchi, I. (2001). Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene that confer fludioxonil resistance and osmotic sensitivity in the *os-1* mutants of *Neurospora crassa*. *Pest Manag. Sci.* *57*, 437–442.
- Orr, H.A. (2009). Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nat. Rev. Genet.* *10*, 531–539.
- Oshima, M., Fujimura, M., Banno, S., Hashimoto, C., Motoyama, T., Ichiishi, A., and Yamaguchi, I. (2002). A Point Mutation in the Two-Component Histidine Kinase *BcOS-1* Gene Confers Dicarboximide Resistance in Field Isolates of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* *92*, 75–80.
- Paik, W.K., Paik, D.C., and Kim, S. (2007). Historical review: the field of protein methylation. *Trends Biochem. Sci.* *32*, 146–152.
- Pillai, V.B., Sundaresan, N.R., Samant, S.A., Wolfgeher, D., Trivedi, C.M., and Gupta, M.P. (2011). Acetylation of a Conserved Lysine Residue in the ATP Binding Pocket of p38 Augments Its Kinase Activity during Hypertrophy of Cardiomyocytes. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 2349–2363.
- Plimpton, R.L., Cuéllar, J., Lai, C.W.J., Aoba, T., Makaju, A., Franklin, S., Mathis, A.D., Prince, J.T., Carrascosa, J.L., Valpuesta, J.M., et al. (2015). Structures of the G $\beta$ -CCT and PhLP1-G $\beta$ -CCT complexes reveal a mechanism for G-protein  $\beta$ -subunit folding and G $\beta\gamma$  dimer assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, 2413–2418.
- Ren, W., Shao, W., Han, X., Zhou, M., and Chen, C. (2016). Molecular and Biochemical Characterization of Laboratory and Field Mutants of *Botrytis cinerea* Resistant to Fludioxonil. *Plant Dis.* *100*, 1414–1423.
- Ribeiro, L.F.C., Chelius, C.L., Harris, S.D., and Marten, M.R. (2017). Insights regarding fungal phosphoproteomic analysis. *Fungal Genet. Biol.* *104*, 38–44.
- Rispail, N., Soanes, D.M., Ant, C., Czajkowski, R., Grünler, A., Huguet, R., Perez-Nadales, E., Poli, A., Sartorel, E., Valiante, V., et al. (2009). Comparative genomics of MAP kinase and calcium-calmodulin signalling components in plant and human pathogenic fungi. *Fungal Genet. Biol. FG B* *46*, 287–298.
- Rogers, L.D., and Foster, L.J. (2009). Phosphoproteomics—finally fulfilling the promise? *Mol. Biosyst.* *5*, 1122–1129.
- Rolke, Y., and Tudzynski, P. (2008). The small GTPase Rac and the p21-activated kinase Cla4 in *Claviceps purpurea*: interaction and impact on polarity, development and pathogenicity. *Mol. Microbiol.* *68*, 405–423.
- Rolke, Y., Liu, S., Quidde, T., Williamson, B., Schouten, A., Weltring, K.-M., Siewers, V., Tenberge, K.B., Tudzynski, B., and Tudzynski, P. (2004). Functional analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating systems in *Botrytis cinerea*: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. *Mol. Plant Pathol.* *5*, 17–27.
- Romanazzi, G., Smilanick, J.L., Feliziani, E., and Droby, S. (2016). Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. *Postharvest Biol. Technol.* *113*, 69–76.
- Roncero, C., and Durán, A. (1985). Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. *J. Bacteriol.* *163*, 1180–1185.
- Ross, E.M., and Wilkie, T.M. (2000). GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu. Rev. Biochem.* *69*, 795–827.

- Rossi, F.R., Gárriz, A., Marina, M., Romero, F.M., Gonzalez, M.E., Collado, I.G., and Pieckenstein, F.L. (2011). The Sesquiterpene Botrydial Produced by *Botrytis cinerea* Induces the Hypersensitive Response on Plant Tissues and Its Action Is Modulated by Salicylic Acid and Jasmonic Acid Signaling. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *24*, 888–896.
- Rui, O., and Hahn, M. (2007). The Slr2-type MAP kinase Bmp3 of *Botrytis cinerea* is required for normal saprotrophic growth, conidiation, plant surface sensing and host tissue colonization. *Mol. Plant Pathol.* *8*, 173–184.
- Saito, H., and Posas, F. (2012). Response to Hyperosmotic Stress. *Genetics* *192*, 289–318.
- Salamon, J.A., Acuña, R., and Dawe, A.L. (2010). Phosphorylation of phosphocucin-like protein BDM-1 by protein kinase 2 (CK2) is required for virulence and G $\beta$  subunit stability in the fungal plant pathogen *Cryphonectria parasitica*. *Mol. Microbiol.* *76*, 848–860.
- Schamber, A., Leroch, M., Diwo, J., Mendgen, K., and Hahn, M. (2010). The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase signalling components and the Ste12 transcription factor in germination and pathogenicity of *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* *11*, 105–119.
- Schoonbeek, H., Del Sorbo, G., and De Waard, M.A. (2001). The ABC Transporter BcatrB Affects the Sensitivity of *Botrytis cinerea* to the Phytoalexin Resveratrol and the Fungicide Fenpiclonil. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *14*, 562–571.
- Schumacher, J. (2016). Signal Transduction Cascades Regulating Differentiation and Virulence in *Botrytis cinerea*. *SpringerLink* 247–267.
- Schumacher, J. (2017). How light affects the life of *Botrytis*. *Fungal Genet. Biol.* *106*, 26–41.
- Schumacher, J., Kokkelink, L., Huesmann, C., Jimenez-Teja, D., Collado, I.G., Barakat, R., Tudzynski, P., and Tudzynski, B. (2008a). The cAMP-Dependent Signaling Pathway and Its Role in Conidial Germination, Growth, and Virulence of the Gray Mold *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *21*, 1443–1459.
- Schumacher, J., Viaud, M., Simon, A., and Tudzynski, B. (2008b). The Ga subunit BCG1, the phospholipase C (BcPLC1) and the calcineurin phosphatase co-ordinately regulate gene expression in the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *Mol. Microbiol.* *67*, 1027–1050.
- Schumacher, J., Larrinoa, I.F. de, and Tudzynski, B. (2008c). 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.
- Schumacher, J., Simon, A., Cohrs, K.C., Viaud, M., and Tudzynski, P. (2014). The Transcription Factor BcLTF1 Regulates Virulence and Light Responses in the Necrotrophic Plant Pathogen *Botrytis cinerea*. *PLOS Genet.* *10*, e1004040.
- Segmüller, N., Ellendorf, U., Tudzynski, B., and Tudzynski, P. (2007). BcSAK1, a Stress-Activated Mitogen-Activated Protein Kinase, Is Involved in Vegetative Differentiation and Pathogenicity in *Botrytis cinerea*. *Eukaryot. Cell* *6*, 211–221.
- Shao, C., Zhang, Y., and Sun, W. (2014). Statistical characterization of HCD fragmentation patterns of tryptic peptides on an LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer. *J. Proteomics* *109*, 26–37.
- Sharma, K.K. (2016). Fungal genome sequencing: basic biology to biotechnology. *Crit. Rev. Biotechnol.* *36*, 743–759.

- Shenoy, S.K., and Lefkowitz, R.J. (2011).  $\beta$ -arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends Pharmacol. Sci.* 32, 521–533.
- Siegmund, U., and Viefhues, A. (2016). Reactive Oxygen Species in the Botrytis – Host Interaction. In *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and Its Management in Agricultural Systems*, (Springer, Cham), pp. 269–289.
- Silverman-Gavrila, L.B., and Lew, R.R. (2002). An IP<sub>3</sub>-activated Ca<sup>2+</sup> channel regulates fungal tip growth. *J. Cell Sci.* 115, 5013–5025.
- Silverman-Gavrila, L.B., and Lew, R.R. (2003). Calcium gradient dependence of *Neurospora crassa* hyphal growth. *Microbiol. Read. Engl.* 149, 2475–2485.
- Sommer, N.F. (1985). Role of controlled environments in suppression of postharvest diseases. *Can. J. Plant Pathol.* 7, 331–339.
- Soulié, M.-C., Perino, C., Piffeteau, A., Choquer, M., Malfatti, P., Cimerman, A., Kunz, C., Boccara, M., and Vidal-Cros, A. (2006). Botrytis cinerea virulence is drastically reduced after disruption of chitin synthase class III gene (Bcchs3a). *Cell. Microbiol.* 8, 1310–1321.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503–517.
- Spange, S., Wagner, T., Heinzl, T., and Krämer, O.H. (2009). Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 185–198.
- Stammler, G., Brix, H.D., Nave, B., Gold, R., and Schoefl, U. (2007). Studies on the biological performance of boscalid and its mode of action. *Mod. Fungic. Antifung. Compd. V 15th Int. Reinhardtsbrunn Symp. Friedrichroda Ger. May 6-10 2007* 45–51.
- Steel, G.J., Laude, A.J., Boojawan, A., Harvey, D.J., and Morgan, A. (1999). Biochemical Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* SEC18 Gene Product: Implications for the Molecular Mechanism of Membrane Fusion. *Biochemistry (Mosc.)* 38, 7764–7772.
- Studer, R.A., Rodriguez-Mias, R.A., Haas, K.M., Hsu, J.I., Viéitez, C., Solé, C., Swaney, D.L., Stanford, L.B., Liachko, I., Böttcher, R., et al. (2016). Evolution of protein phosphorylation across 18 fungal species. *Science* 354, 229–232.
- Swaney, D.L., and Villén, J. (2016). Proteomic Analysis of Protein Posttranslational Modifications by Mass Spectrometry. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2016, pdb.top077743.
- Swatton, J.E., Prabakaran, S., Karp, N.A., Lilley, K.S., and Bahn, S. (2004). Protein profiling of human postmortem brain using 2-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2-D DIGE). *Mol. Psychiatry* 9, 128.
- Temme, N., Oeser, B., Massaroli, M., Heller, J., Simon, A., González Collado, I., Viaud, M., and Tudzynski, P. (2012). BcAtf1, a global regulator, controls various differentiation processes and phytoxin production in *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* 13, 704–718.
- Thewes, S. (2014). Calcineurin-Crz1 Signaling in Lower Eukaryotes. *Eukaryot. Cell* 13, 694–705.
- Upadhyay, R.S., Meena, M., Prasad, V., Zehra, A., and Gupta, V.K. (2015). Mannitol metabolism during pathogenic fungal–host interactions under stressed conditions. *Front. Microbiol.* 6.
- Valot, B., Langella, O., Nano, E., and Zivy, M. (2011). MassChroQ: A versatile tool for mass spectrometry quantification. *PROTEOMICS* 11, 3572–3577.

- Van Kan, J.A.L., Stassen, J.H.M., Mosbach, A., Van Der Lee, T.A.J., Faino, L., Farmer, A.D., Papatotiriou, D.G., Zhou, S., Seidl, M.F., Cottam, E., et al. (2017). A gapless genome sequence of the fungus *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* *18*, 75–89.
- Veloukas, T., Kalogeropoulou, P., Markoglou, A.N., and Karaoglanidis, G.S. (2013). Fitness and Competitive Ability of *Botrytis cinerea* Field Isolates with Dual Resistance to SDHI and QoI Fungicides, Associated with Several *sdhB* and the *cytb* G143A Mutations. *Phytopathology* *104*, 347–356.
- Vermeulen, T., Schoonbeek, H., and De Waard, M.A. (2001). The ABC transporter BcatrB from *Botrytis cinerea* is a determinant of the activity of the phenylpyrrole fungicide fludioxonil. *Pest Manag. Sci.* *57*, 393–402.
- Viaud, M., Brunet-Simon, A., Brygoo, Y., Pradier, J.-M., and Levis, C. (2003). Cyclophilin A and calcineurin functions investigated by gene inactivation, cyclosporin A inhibition and cDNA arrays approaches in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Mol. Microbiol.* *50*, 1451–1465.
- Viaud, M., Fillinger, S., Liu, W., Polepalli, J.S., Le Pêcheur, P., Kunduru, A.R., Leroux, P., and Legendre, L. (2006). A Class III Histidine Kinase Acts as a Novel Virulence Factor in *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *19*, 1042–1050.
- Viefhues, A., Schlathoelter, I., Simon, A., Viaud, M., and Tudzynski, P. (2015). Unraveling the Function of the Response Regulator BcSkn7 in the Stress Signaling Network of *Botrytis cinerea*. *Eukaryot. Cell* *14*, 636–651.
- Vizcaíno, J.A., Deutsch, E.W., Wang, R., Csordas, A., Reisinger, F., Ríos, D., Dienes, J.A., Sun, Z., Farrah, T., Bandeira, N., et al. (2014). ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination. *Nat. Biotechnol.* *32*, 223–226.
- Walker, A.-S., Gautier, A., Confais, J., Martinho, D., Viaud, M., Le Pêcheur, P., Dupont, J., and Fournier, E. (2011). *Botrytis pseudocinerea*, a New Cryptic Species Causing Gray Mold in French Vineyards in Sympatry with *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* *101*, 1433–1445.
- Walker, A.-S., Micoud, A., Rémuson, F., Grosman, J., Gredt, M., and Leroux, P. (2013). French vineyards provide information that opens ways for effective resistance management of *Botrytis cinerea* (grey mould). *Pest Manag. Sci.* *69*, 667–678.
- Walker, A.-S., Gladieux, P., Decognet, V., Fermaud, M., Confais, J., Roudet, J., Bardin, M., Bout, A., C. Nicot, P., Poncet, C., et al. (2015). Population structure and temporal maintenance of the multihost fungal pathogen *Botrytis cinerea*: causes and implications for disease management. *Environ. Microbiol.* *17*, 1261–1274.
- Wang, H., Lockwood, S.K., Hoeltzel, M.F., and Schiefelbein, J.W. (1997). The ROOT HAIR DEFECTIVE3 gene encodes an evolutionarily conserved protein with GTP-binding motifs and is required for regulated cell enlargement in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* *11*, 799–811.
- Wennerberg, K., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* *118*, 843–846.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., and Van Kan, J. a. L. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Mol. Plant Pathol.* *8*, 561–580.
- Xu, J., Wu, D., Slepak, V.Z., and Simon, M.I. (1995). The N terminus of phosducin is involved in binding of beta gamma subunits of G protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *92*, 2086–2090.

- Yang, Q., Yin, D., Yin, Y., Cao, Y., and Ma, Z. (2015). The response regulator BcSkn7 is required for vegetative differentiation and adaptation to oxidative and osmotic stresses in *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* *16*, 276–287.
- Yu, J.-H. (2006). Heterotrimeric G protein signaling and RGSs in *Aspergillus nidulans*. *J. Microbiol. Seoul Korea* *44*, 145–154.
- Yu, Z., Armant, O., and Fischer, R. (2016). Fungi use the SakA (HogA) pathway for phytochrome-dependent light signalling. *Nat. Microbiol.* *1*, 16019.
- Zhang, H., Wang, L., Dong, Y., Jiang, S., Cao, J., and Meng, R. (2007). Postharvest biological control of gray mold decay of strawberry with *Rhodotorula glutinis*. *Biol. Control* *40*, 287–292.
- Zhang, Y., Fonslow, B.R., Shan, B., Baek, M.-C., and Yates, J.R. (2013). Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. *Chem. Rev.* *113*, 2343–2394.
- Zhang, Z., Qin, G., Li, B., and Tian, S. (2014). Knocking Out *Bcsas1* in *Botrytis cinerea* Impacts Growth, Development, and Secretion of Extracellular Proteins, Which Decreases Virulence. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *27*, 590–600.
- Zheng, L., Campbell, M., Murphy, J., Lam, S., and Xu, J.-R. (2000). The *BMP1* Gene Is Essential for Pathogenicity in the Gray Mold Fungus *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *13*, 724–732.
- Zhou, X., Zhang, H., Li, G., Shaw, B., and Xu, J.-R. (2012). The Cyclase-Associated Protein *Cap1* Is Important for Proper Regulation of Infection-Related Morphogenesis in *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathog.* *8*.
- Ziv, C., Kra-Oz, G., Gorovits, R., März, S., Seiler, S., and Yarden, O. (2009). Cell elongation and branching are regulated by differential phosphorylation states of the nuclear *Dbf2*-related kinase *COT1* in *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.* *74*, 974–989.

# ANNEXES



Tableau II - S1 : Liste de l'ensemble des protéines identifiées dont l'abondance varie entre la souche sauvage et les mutants de signalisation  $\Delta bos1$  et  $\Delta sak1$ . Les protéines sont regroupées selon leur régulation par Bos1, Sak1 ou les deux. (-) symbolise une régulation négative tandis que (+) symbolise une régulation positive. \*: Résultats obtenus à partir des données de "peak counting" ; \*\*: Résultats obtenus à partir des données de "spectral counting".

Bos1 (-)	N° Accession	Nom	Description	Pfam	$\Delta bos1/$ WT	$\Delta sak1/$ WT
	Bcin11g00330	nd	hydroxymethylglutaryl synthase	PF01154.12(HMG_CoA_synt_N) + PF08540.5(HMG_CoA_synt_C)	1,513	0,697
	Bcin01g06440	nd	translation initiation factor eIF3 subunit	PF08597.5(eIF3_subunit)	1,532	1,119
	Bcin13g02240	nd	importin beta-4 subunit	PF03810.14(IBN_N) + PF13513.1(HEAT_EZ)	1,555	1,166
	Bcin04g05500	nd	dihydroorotase	PF04909.9(Amidohydro_2)	1,558	0,951
	Bcin05g08280	nd	inosine-5 -monophosphate dehydrogenase imd2	PF00478.20(IMPDH) + PF00571.23(CBS) + PF00571.23(CBS)	1,561	1,017
	Bcin07g06150	nd	BRO1-like domain-containing	PF03097.13(BRO1) + PF13949.1(ALIX_LYPXL_bnd)	1,588	1,499
	Bcin12g04560	BcGST2 4	multisynthetase complex auxiliary component p43	PF14497.1(GST_C_3) + PF01588.15(tRNA_bind)	1,593	1,083
	Bcin07g01690	nd	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	PF02222.17(ATP-grasp) + PF00731.15(AIRC)	1,593	0,963
	Bcin07g05890	nd	CTP synthase	PF06418.9(CTP_synt_N) + PF00117.23(GATase)	1,595	1,314
	Bcin01g09170	nd	branched-chain amino acid aminotransferase	PF01063.14(Aminotran_4)	1,611	1,180
	Bcin13g04800	nd	C2H2 and C2HC zinc finger (transcriptional factor)	PF12756.2(zf-C2H2_2) + PF12756.2(zf-C2H2_2)	1,613	1,229
	Bcin13g01760	nd	nd	nd	1,617	1,337
	Bcin03g01700	nd	mitochondrial processing peptidase alpha subunit	PF00675.15(Peptidase_M16) + PF05193.16(Peptidase_M16_C)	1,624	0,762
	Bcin02g02700	nd	hypothetical protein BC1G_02451	nd	1,628	1,490
	Bcin02g06940	nd	glycoside hydrolase family 72	PF03198.9(Glyco_hydro_72) + PF07983.8(X8)	1,632	0,935
	Bcin15g04630	nd	nd	PF00076.17(RRM_1) + PF00076.17(RRM_1)	1,643	1,206
	Bcin10g03950	nd	U3 small nucleolar RNA-associated 10	PF12397.3(U3snoRNP10) + PF08146.7(BP28CT)	1,648	0,874
	Bcin12g03930	nd	10 kDa heat shock mitochondrial	PF00166.16(Cpn10)	1,656	1,300
	Bcin08g05590	nd	WD40 repeat	PF00400.27(WD40) + PF00400.27(WD40) + PF00400.27(WD40)	1,668	0,670
	Bcin16g04340	nd	mitochondrial import receptor subunit TOM40	PF01459.17(Porin_3)	1,670	1,323
	Bcin02g06580	nd	pyruvate decarboxylase	PF02776.13(TPP_enzyme_N) + PF00205.17(TPP_enzyme_M) + PF02775.16(TPP_enzyme_C)	1,672	1,389
	Bcin15g01620	nd	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase	PF00763.18(THF_DHG_CYH) + PF02882.14(THF_DHG_CYH_C)	1,683	1,245
	Bcin02g08410	nd	mitochondrial glyco	PF02330.11(MAM33)	1,691	0,867

Bos1 (-)	N° Accession	Nom	Description	Pfam	$\Delta bos1/$ WT	$\Delta sak1/$ WT
	Bcin01g02090	nd	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase	PF01259.13(SAICAR_synt)	1,706	1,136
	Bcin07g04500	nd	FK506-binding 4	PF00254.23(FKBP_C)	1,715	1,139
	Bcin09g02630	nd	kh domain-containing	PF00013.24(KH_1) + PF00013.24(KH_1) + PF00013.24(KH_1)	1,719	1,361
	Bcin05g02490	nd	peptide methionine sulfoxide reductase	PF01625.16(PMSR)	1,732	1,193
	Bcin07g01580	nd	nucleolar GTP-binding	PF06858.9(NOG1) + PF08155.6(NOGCT)	1,753	0,751
	Bcin02g05590	nd	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase NEP1	PF03587.9(EMG1)	1,756	0,844
	Bcin08g00910	nd	glycosyl hydrolase family 17	PF00332.13(Glyco_hydro_17)	1,774	0,913
	Bcin07g00340	nd	arginase	PF00491.16(Arginase)	1,780	1,371
	Bcin01g01820	nd	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	PF01118.19(Semialdehyde_dh) + PF02774.13(Semialdehyde_dhC)	1,787	1,388
	Bcin05g05580	nd	ribose-phosphate pyrophosphokinase	PF13793.1(Pribosyltran_N) + PF14572.1(Pribosyl_synt)	1,789	0,827
	Bcin06g02560	nd	elongation factor mitochondrial	PF00009.22(GTP_EFTU) + PF03144.20(GTP_EFTU_D2) + PF14492.1(EFG_II) + PF03764.13(EFG_IV) + PF00679.19(EFG_C)	1,801	1,408
	Bcin16g00830	nd	Hsp90 co-chaperone Cdc37	PF03234.9(CDC37_N) + PF08565.6(CDC37_M) + PF08564.5(CDC37_C)	1,823	1,491
	Bcin01g10330	nd	phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	PF00793.15(DAHP_synt_1)	1,825	1,462
	Bcin02g01760	nd	phosphoribosylformylglycinamide synthase	PF00586.19(AIRS) + PF02769.17(AIRS_C) + PF02769.17(AIRS_C) + PF13507.1(GATase_5)	1,842	0,940
	Bcin03g05340	nd	phosphoribosylamine-glycine ligase phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase	PF02844.10(GARS_N) + PF01071.14(GARS_A) + PF02843.11(GARS_C) + PF00586.19(AIRS) + PF02769.17(AIRS_C)	1,859	1,213
	Bcin08g00630	nd	glutamate-rich WD repeat containing 1	PF12265.3(CAF1C_H4-bd) + PF00400.27(WD40) + PF00400.27(WD40) + PF00400.27(WD40) + PF00400.27(WD40)	1,887	0,841
	Bcin06g03290	nd	WD40 repeat	PF00400.27(WD40) + PF00400.27(WD40) + PF00400.27(WD40)	1,897	0,928
	Bcin04g02970	nd	chorismate synthase	PF01264.16(Chorismate_synt)	1,910	1,176
	Bcin15g05360	nd	galactose-1-phosphate uridylyltransferase	PF01087.17(GalP_UDP_transf) + PF02744.12(GalP_UDP_tr_C)	1,934	0,935
	Bcin13g03880	nd	adenylosuccinate lyase	PF00206.15(Lyase_1) + PF10397.4(ADSL_C)	1,969	0,995
	Bcin11g00750	nd	la domain family	PF05383.12(La)	1,991	1,213

Bos1 (-)	N° Accession	Nom	Description	Pfam	$\Delta bos1/$ WT	$\Delta sak1/$ WT
	Bcin09g02000	nd	imidazole glycerol phosphate synthase hisHF	PF00117.23(GATase) + PF00977.16(His_biosynth)	2,053	1,318
	Bcin13g04000	nd	short-chain dehydrogenase	PF00106.20(adh_short)	2,131	0,934
	Bcin10g04050	nd	atp-dependent rna helicase drs1	PF00270.24(DEAD) + PF00271.26(Helicase_C)	2,224	1,074
	Bcin04g01520	nd	Branched-chain-amino-acid aminotransferase	PF01063.14(Aminotran_4)	2,477	1,377
	Bcin02g00280	nd	fad binding domain	PF01565.18(FAD_binding_4) + PF08031.7(BBE)	2,517	1,311
	Bcin03g04010	cel5A	endo-beta-1,4-glucanase precursor	PF00150.13(Cellulase)	2,659	1,484
	Bcin01g07240	nd	DNA-binding HGH1	PF04063.9(DUF383) + PF04064.8(DUF384)	2,712	0,680
	Bcin12g01930	nd	DNA-directed RNA polymerase I subunit	PF02150.11(RNA_POL_M_15KD) + PF01096.13(TFIIS_C)	2,934	1,179
	Bcin07g00400	nd	aldolase citrate lyase family	PF03328.9(HpcH_Hpal)	3,011	0,998
	Bcin03g05820	nd	pectate lyase a	PF00544.14(Pec_lyase_C)	7,408	0,773
	Bcin13g04360	nd	Aldo keto reductase	PF00248.16(Aldo_ket_red)	9,213	0,689
	Bcin13g03090	nd	alpha beta hydrolase fold	PF12697.2(Abhydrolase_6)	11,676	1,366
	Bcin06g01180*	BccatA	catalase	PF00199.14(Catalase) + PF06628.7(Catalase-rel)	3,750	1,125
	Bcin07g05140**	nd	heat shock 60	PF00118.19(Cpn60_TCP1)	1,535	1,374
	Bcin10g03630**	nd	TIF31 like	PF15044.1(CLU_N) + PF13236.1(CLU) + PF12807.2(eIF3_p135) + PF13424.1(TPR_12) + PF13424.1(TPR_12)	1,602	1,460
	Bcin12g04860**	nd	pyrABCN	PF00988.17(CPSase_sm_chain) + PF00117.23(GATase) + PF00289.17(CPSase_L_chain) + PF02786.12(CPSase_L_D2) + PF02787.14(CPSase_L_D3) + PF00289.17(CPSase_L_chain) + PF02786.12(CPSase_L_D2) + PF02142.17(MGS) + PF02729.16(OTCace_N) + PF00185.19(OTCace)	1,763	1,041
	Bcin04g04290**	nd	60s acidic ribosomal p1	PF00428.14(Ribosomal_60s)	2,014	1,333

Bos1 (+)	N° Accession	Nom	Description	Pfam	$\Delta$ bos1/ WT	$\Delta$ sak1/ WT
	Bcin09g05010	nd	fasciclin domain family	PF02469.17(Fasciclin) + PF02469.17(Fasciclin)	0,102	0,957
	Bcin12g06380	BcBot1,CND5	cytochrome P450	PF00067.17(p450)	0,152	0,918
	Bcin08g07040	nd	fatty acid hydroxylase	PF00067.17(p450) + PF00258.20(Flavodoxin_1) + PF00667.15(FAD_binding_1) + PF00175.16(NAD_binding_1)	0,258	0,933
	Bcin04g05010	nd	3-oxo-5-alpha-steroid 4- dehydrogenase	PF02544.11(Steroid_dh)	0,264	0,866
	Bcin09g06110	nd	malate synthase	PF01274.17(Malate_synthase)	0,273	0,678
	Bcin02g04510	nd	nitroreductase	PF00881.19(Nitroreductase)	0,368	1,024
	Bcin02g02320	nd	oxidoreductase	PF01408.17(GFO_IDH_MocA)	0,384	0,926
	Bcin02g02240	nd	dolichyl- diphosphooligosaccharide- glycosyltransferase	PF02516.9(STT3)	0,404	0,780
	Bcin12g00750	nd	cation-transporting atpase 4	PF00122.15(E1-E2_ATPase) + PF00702.21(Hydrolase)	0,404	1,223
	Bcin05g07500	nd	Amidase signature (AS) enzyme	PF01425.16(Amidase)	0,410	0,745
	Bcin05g07200	nd	nd	nd	0,410	0,827
	Bcin09g01320	nd	isocitrate lyase	PF00463.16(ICL)	0,420	1,242
	Bcin16g02170	nd	cleft lip and palate associated transmembrane 1	PF05602.7(CLPTM1)	0,422	0,776
	Bcin08g04420	nd	IMP-specific 5'-nucleotidase 1	PF06437.6(ISN1)	0,426	1,222
	Bcin01g02310	BcPMT1	dolichyl-phosphate- mannose- mannosyltransferase	PF02366.13(PMT) + PF02815.14(MIR)	0,430	1,141
	Bcin04g01430	nd	nd	nd	0,434	0,897
	Bcin12g05330	nd	glycolipid transfer	PF08718.6(GLTP)	0,456	0,783
	Bcin04g05050	nd	e3 ubiquitin- ligase huwe1	PF06012.7(DUF908) + PF06025.7(DUF913) + PF00627.26(UBA) + PF14377.1(DUF4414) + PF00632.20(HECT)	0,462	0,728
	Bcin01g00550	Bcsas1	GTP-binding ypt2	PF00071.17(Ras)	0,466	0,835
	Bcin01g07510	nd	Uncharacterized J domain- containing	PF00226.26(DnaJ)	0,479	1,052
	Bcin05g02240	nd	bap31 domain-containing	PF05529.7(Bap31)	0,481	0,955
	Bcin11g04180	nd	surf4 family	PF02077.10(SURF4)	0,487	0,818
	Bcin01g03500	nd	C2 (Calcium lipid- )	PF00168.25(C2) + PF00168.25(C2) + PF00168.25(C2) + PF00168.25(C2) + PF00168.25(C2)	0,488	1,055
	Bcin02g06930	nd	1,3-beta-glucan synthase	PF14288.1(FKS1_dom1) + PF02364.10(Glucan_synthase)	0,491	1,309
	Bcin15g02970	nd	5'-3' exoribonuclease 1	PF03159.13(XRN_N)	0,495	0,885
	Bcin11g06340	nd	ubiquitin-conjugating enzyme	PF00179.21(UQ_con)	0,495	0,779
	Bcin15g03420	BcPMT2	dolichyl-phosphate- mannose- mannosyltransferase	PF02366.13(PMT) + PF02815.14(MIR)	0,498	1,139

Bos1 (+)	N° Accession	Nom	Description	Pfam	$\Delta bos1/$ WT	$\Delta sak1/$ WT
	Bcin12g05090	nd	vacuolar ATP synthase subunit d	PF01813.12(ATP-synt_D)	0,500	0,979
	Bcin01g08400	nd	oligosaccharyltransferase subunit ribophorin II	PF05817.9(Ribophorin_II)	0,500	0,792
	Bcin08g05920	nd	dynamamin family	PF00350.18(Dynamamin_N) + PF01031.15(Dynamamin_M)	0,501	0,696
	Bcin03g00430	nd	heat shock 70	PF00012.15(HSP70) + PF00012.15(HSP70)	0,502	0,757
	Bcin07g03080	nd	Metalloproteases (zincins) catalytic	PF01433.15(Peptidase_M1) + PF11838.3(ERAP1_C)	0,503	0,996
	Bcin05g00650	nd	allantoicase	PF03561.10(Allantoicase) + PF03561.10(Allantoicase)	0,504	1,245
	Bcin06g06260	nd	20S proteasome subunit beta 2	PF00227.21(Proteasome) + PF12465.3(Pr_beta_C)	0,509	0,932
	Bcin02g06610	nd	Chaperone J-domain-containing	PF13414.1(TPR_11) + PF13371.1(TPR_9) + PF13371.1(TPR_9) + PF00226.26(DnaJ)	0,511	0,784
	Bcin03g02370	nd	yop1	PF03134.14(TB2_DP1_HVA22)	0,520	1,227
	Bcin06g02430	nd	aminotransferase class i and ii	PF00155.16(Aminotran_1_2)	0,523	0,764
	Bcin01g03020	nd	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	PF00171.17(Aldedh)	0,532	0,948
	Bcin16g03180	nd	acyl- dehydrogenase family member 11	PF02771.11(Acyl-CoA_dh_N) + PF02770.14(Acyl-CoA_dh_M) + PF00441.19(Acyl-CoA_dh_1)	0,534	0,692
	Bcin06g04360	nd	cop9 signalosome complex subunit 2	PF01399.22(PCI)	0,538	0,879
	Bcin02g01980	BcPMT4	dolichyl-phosphate-mannose-mannosyltransferase	PF02366.13(PMT) + PF02815.14(MIR)	0,540	0,946
	Bcin14g01750	nd	carbon-nitrogen hydrolase	PF00795.17(CN_hydrolase)	0,541	0,988
	Bcin05g00360	nd	nd	PF00063.16(Myosin_head) + PF06017.8(Myosin_TH1) + PF00018.23(SH3_1)	0,544	1,239
	Bcin02g03080	nd	succinate dehydrogenase subunit C	PF01127.17(Sdh_cyt)	0,546	1,159
	Bcin12g02810	nd	mannan polymerase ii complex anp1 subunit	PF03452.9(Anp1)	0,548	0,988
	Bcin01g03640	nd	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	PF01704.13(UDPGP)	0,549	0,785
	Bcin06g02540	nd	rpel repeat	PF02755.10(RPEL) + PF02755.10(RPEL)	0,562	1,182
	Bcin04g04420	nd	transcription factor C2H2	PF00627.26(UBA)	0,571	0,991
	Bcin01g09320	nd	calcium-translocating P-type SERCA-type	PF00690.21(Cation_ATPase_N) + PF00122.15(E1-E2_ATPase) + PF00702.21(Hydrolase) + PF00689.16(Cation_ATPase_C)	0,574	1,279
	Bcin01g03230	nd	prolyl oligopeptidase	PF00326.16(Peptidase_S9)	0,575	0,768
	Bcin12g00320	nd	glycolipid 2-alpha-mannosyltransferase	PF01793.11(Glyco_transf_15)	0,578	0,669

Bos1 (+)	N° Accession	Nom	Description	Pfam	$\Delta$ bos1/ WT	$\Delta$ sak1/ WT
	Bcin08g02840	nd	dolichyl-diphosphooligosaccharide-glycosyltransferase 48 kDa subunit	PF03345.9(DDOST_48kD)	0,583	0,779
	Bcin11g04630	nd	glyoxylate reductase	PF00389.25(2-Hacid_dh) + PF02826.14(2-Hacid_dh_C)	0,586	1,205
	Bcin03g03150	nd	3-hydroxybutyryl-dehydrogenase	PF02737.13(3HCDH_N) + PF00725.17(3HCDH)	0,589	0,925
	Bcin02g04240	nd	fatty acid elongase 2	PF01151.13(ELO)	0,590	1,480
	Bcin08g04730	nd	fructose-1,6-bisphosphatase	PF00316.15(FBPase)	0,590	0,815
	Bcin04g01150	nd	OST3 OST6 family	PF04756.8(OST3_OST6)	0,590	0,877
	Bcin05g00940	nd	cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	PF02353.15(CMAS)	0,593	1,051
	Bcin03g05840	nd	enoyl- hydratase	PF00378.15(ECH)	0,596	0,718
	Bcin15g00500	nd	nadh-ubiquinone oxidoreductase subunit grim-19	PF06212.7(GRIM-19)	0,597	1,000
	Bcin15g03930	nd	endoplasmic reticulum	PF03661.8(UPF0121)	0,600	1,006
	Bcin01g01700	nd	phosphoinositide phosphatase	PF02383.13(Syja_N)	0,601	1,204
	Bcin15g04980	nd	AGC AKT kinase	PF00069.20(Pkinase) + PF00433.19(Pkinase_C)	0,601	0,775
	Bcin11g06270	nd	delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	PF00171.17(Aldedh)	0,615	0,669
	Bcin07g02610	nd	6-phosphogluconate dehydrogenase	PF03446.10(NAD_binding_2) + PF00393.14(6PGD)	0,618	0,877
	Bcin02g00160	nd	cipC-like antibiotic response	PF12585.3(DUF3759)	0,618	0,916
	Bcin10g05230	nd	4-aminobutyrate aminotransferase	PF00202.16(Aminotran_3)	0,618	1,202
	Bcin02g02740	nd	mitochondrial DNA replication YHM2	PF00153.22(Mito_carr) + PF00153.22(Mito_carr) + PF00153.22(Mito_carr)	0,621	1,151
	Bcin15g02610	nd	cell division control 12	PF00735.13(Septin)	0,621	0,981
	Bcin07g01610	nd	aspartyl protease	PF00240.18(ubiquitin) + PF09668.5(Asp_protease) + PF00627.26(UBA)	0,622	1,160
	Bcin03g07910	nd	carnitine O-acetyltransferase	PF00755.15(Carn_acyltransf)	0,622	1,184
	Bcin14g00830	nd	PLP-dependent transferase	PF00266.14(Aminotran_5)	0,629	1,496
	Bcin11g03990	nd	nd	PF11489.3(DUF3210)	0,632	0,690
	Bcin07g02010	nd	nd	PF12701.2(LSM14) + PF09532.5(FDF)	0,633	0,757
	Bcin16g03680	nd	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase	PF09439.5(SRPRB)	0,635	1,011
	Bcin07g02150	nd	histone h2a	PF00125.19(Histone)	0,636	0,907
	Bcin07g00840	nd	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	PF00160.16(Pro_isomerase)	0,638	0,761
	Bcin12g03270	nd	Zn-dependent exopeptidase	PF04389.12(Peptidase_M28)	0,643	0,696

Bos1 (+)	N° Accession	Nom	Description	Pfam	$\Delta$ bos1/ WT	$\Delta$ sak1/ WT
	Bcin03g06080	nd	class V myosin (Myo4)	PF00063.16(Myosin_head) + PF00612.22(IQ) + PF00612.22(IQ) + PF00612.22(IQ) + PF01843.14(DIL)	0,646	0,965
	Bcin05g05700	nd	vesicular-fusion sec18	PF02359.13(CDC48_N) + PF02933.12(CDC48_2) + PF00004.24(AAA) + PF00004.24(AAA)	0,647	0,706
	Bcin15g01350	nd	root hair defective 3 GTP- binding	PF05879.7(RHD3)	0,647	1,274
	Bcin11g05210	nd	nmda receptor-regulated 1	PF00515.23(TPR_1) + PF12569.3(NARP1)	0,648	0,935
	Bcin11g01880	nd	membrane-associated progesterone receptor component 1	PF00173.23(Cyt-b5)	0,648	1,292
	Bcin01g09510	nd	proteasome component c5	PF00227.21(Proteasome)	0,654	0,931
	Bcin03g02440	nd	nd	PF13233.1(Complex1_LYR_2)	0,654	0,838
	Bcin02g08340	BcTPS1	glycosyltransferase family 20	PF00982.16(Glyco_transf_20)	0,657	0,722
	Bcin11g02490	nd	phosphoglucomutase	PF02878.11(PGM_PMM_I) + PF02879.11(PGM_PMM_II) + PF02880.11(PGM_PMM_III) + PF00408.15(PGM_PMM_IV)	0,657	0,761
	Bcin10g04900	nd	alpha beta	PF12697.2(Abhydrolase_6)	0,662	0,956
	Bcin06g06560	nd	arp2 3 complex 34 kda subunit	PF04045.9(P34-Arc)	0,665	1,053

Sak1 (-)	N° Accession	Nom	Description	Pfam	$\Delta$ bos1/ WT	$\Delta$ sak1/ WT
	Bcin08g03470	nd	DUF1620 domain-containing	PF13360.1(PQQ_2) + PF07774.8(DUF1620)	1,017	1,506
	Bcin09g06820	nd	ubx domain	PF14555.1(UBA_4) + PF00789.15(UBX)	1,146	1,507
	Bcin03g06600	nd	hsp70	PF00012.15(HSP70)	1,324	1,507
	Bcin09g03820	nd	sh3 domain-containing	PF00018.23(SH3_1)	1,397	1,507
	Bcin01g06220	nd	gtp-binding nuclear gsp1 ran	PF00071.17(Ras)	1,455	1,507
	Bcin10g02440	nd	Cytosolic J-domain- containing	PF13414.1(TPR_11) + PF13174.1(TPR_6) + PF07719.12(TPR_2) + PF13414.1(TPR_11) + PF00226.26(DnaJ)	1,252	1,521
	Bcin02g02540	nd	mitochondrial carrier	PF00153.22(Mito_carr) + PF00153.22(Mito_carr)	1,190	1,521
	Bcin13g05020	nd	threonine synthase	PF14821.1(Thr_synth_N) + PF00291.20(PALP)	1,285	1,522
	Bcin08g04540	nd	pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit	PF02779.19(Transket_pyr) + PF02780.15(Transketolase_C)	1,349	1,528
	Bcin09g00600	nd	short-chain dehydrogenase	PF00106.20(adh_short)	1,297	1,528
	Bcin04g02200	nd	acetolactate synthase small subunit	PF01842.20(ACT) + PF10369.4(ALS_ss_C)	1,262	1,536
	Bcin13g05090	nd	calcineurin-like phosphoesterase	PF00149.23(Metallophos)	1,099	1,536
	Bcin03g07980	BcCAP1	adenyl cyclase-associated	PF01213.14(CAP_N) + PF08603.6(CAP_C)	1,484	1,538
	Bcin04g04490	nd	asparagine synthetase	PF13537.1(GATase_7) + PF00733.16(Asn_synthase)	1,421	1,541
	Bcin03g06180	nd	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	PF00389.25(2-Hacid_dh) + PF02826.14(2-Hacid_dh_C)	1,285	1,542
	Bcin05g05970	nd	vacuolar atp synthase 98 kda subunit	PF01496.14(V_ATPase_I)	0,859	1,543
	Bcin09g04160	nd	hsp70	PF00012.15(HSP70)	0,912	1,552
	Bcin04g03430	nd	CK1 CK1 CK1-G kinase	PF00069.20(Pkinase)	0,896	1,554
	Bcin14g04870	nd	phb1 prohibitin 1	PF01145.20(Band_7)	1,245	1,557
	Bcin03g01890	nd	S-phase kinase-associated 1	PF03931.10(Skp1_POZ) + PF01466.14(Skp1)	1,065	1,572
	Bcin02g00470	nd	L-xylulose reductase	PF13561.1(adh_short_C2)	0,742	1,576
	Bcin11g03430	nd	ubiquitin SMT3	PF11976.3(Rad60-SLD)	1,499	1,577
	Bcin08g03520	nd	alkaline phosphatase	PF00245.15(Alk_phosphatase)	1,128	1,585
	Bcin01g00220	nd	Altered inheritance of mitochondria mitochondrial	PF04588.8(HIG_1_N)	1,417	1,586
	Bcin04g03120	BcCHSIIIa	chitin synthase g	PF08407.6(Chitin_synth_1N) + PF01644.12(Chitin_synth_1)	0,697	1,591
	Bcin15g00320	nd	hypothetical protein BC1G_12400	PF11563.3(Protoglobin)	1,283	1,595
	Bcin05g04270	nd	saccharopine dehydrogenase	PF05222.10(AlaDh_PNT_N) + PF01262.16(AlaDh_PNT_C)	1,330	1,615
	Bcin05g00010	nd	Aldo keto reductase	PF00248.16(Aldo_ket_red)	0,927	1,616
	Bcin12g00930	nd	carbohydrate-binding module family 50	PF05433.10(Rick_17kDa_Anti) + PF08881.5(CVNH) + PF01476.15(LysM)	0,924	1,617

Sak1 (-)	N° Accession	Nom	Description	Pfam	$\Delta$ bos1/ WT	$\Delta$ sak1/ WT
	Bcin05g02400	nd	mitochondrial hypoxia responsive domain-containing	PF04588.8(HIG_1_N)	1,439	1,623
	Bcin02g02890	nd	nucleoporin nic96	PF13634.1(Nucleoporin_FG) + PF13634.1(Nucleoporin_FG) + PF13634.1(Nucleoporin_FG) + PF04097.9(Nic96)	0,826	1,627
	Bcin01g06330	nd	pyridoxal kinase	PF08543.7(Phos_pyr_kin)	1,487	1,628
	Bcin12g05370	BcCHSV	chitin synthase	PF00063.16(Myosin_head) + PF00173.23(Cyt-b5) + PF00173.23(Cyt-b5) + PF03142.10(Chitin_synth_2) + PF08766.6(DEK_C)	0,736	1,638
	Bcin13g02990	nd	bsd domain-containing	PF03909.12(BSD)	1,278	1,646
	Bcin09g06240	nd	WH1 domain-containing	PF00568.18(WH1)	1,167	1,650
	Bcin02g01850	nd	PX domain-containing	PF12828.2(PXB) + PF00787.19(PX) + PF12825.2(DUF3818)	0,676	1,658
	Bcin11g04890	nd	glycine cleavage system t	PF01571.16(GCV_T) + PF08669.6(GCV_T_C)	1,055	1,668
	Bcin14g04420	nd	nd	PF14388.1(DUF4419)	0,858	1,673
	Bcin13g04010	nd	sh3 domain-containing	PF04366.7(DUF500) + PF07653.12(SH3_2)	1,139	1,678
	Bcin02g07550	nd	cbs pb1 domain-containing	PF00571.23(CBS) + PF00571.23(CBS) + PF00571.23(CBS) + PF00571.23(CBS) + PF00564.19(PB1)	1,436	1,704
	Bcin14g02370	BcCYC1	cytochrome c	PF00034.16(Cytochrom_C)	1,407	1,707
	Bcin09g00980	nd	isocitrate dehydrogenase	PF00180.15(Iso_dh)	0,910	1,708
	Bcin04g01630	BcPKAR	camp-dependent kinase regulatory subunit	PF02197.12(RIIa) + PF00027.24(cNMP_binding) + PF00027.24(cNMP_binding)	1,024	1,708
	Bcin04g01050	nd	Calponin- CH-domain-containing	PF13499.1(EF-hand_7) + PF00307.26(CH) + PF00307.26(CH) + PF00307.26(CH) + PF00307.26(CH)	1,151	1,720
	Bcin05g03270	nd	mrs7 family	PF07766.8(LETM1)	1,262	1,730
	Bcin06g07240	nd	MC family mitochondrial carrier	PF00153.22(Mito_carr) + PF00153.22(Mito_carr) + PF00153.22(Mito_carr)	0,847	1,732
	Bcin09g07030	nd	glucosamine-phosphate N-acetyltransferase	PF13508.1(Acetyltransf_7)	1,187	1,732
	Bcin15g02860	nd	mitochondrial ribosomal	PF01245.15(Ribosomal_L19)	0,901	1,740
	Bcin07g04730	BcCMK1	calcium calmodulin-dependent kinase	PF00069.20(Pkinase)	0,994	1,742
	Bcin16g02680	nd	peptidase m16 inactive domain-containing	PF00675.15(Peptidase_M16) + PF05193.16(Peptidase_M16_C) + PF05193.16(Peptidase_M16_C)	1,333	1,742
	Bcin02g00910	nd	uba ts-n domain containing	PF12763.2(EF-hand_4) + PF12763.2(EF-hand_4) + PF00627.26(UBA)	1,266	1,745
	Bcin14g04940	nd	aminotransferase class i and ii	PF00155.16(Aminotran_1_2)	1,119	1,747
	Bcin01g06930	BcCarA	carbamoyl-phosphate synthase subunit arginine-specific small	PF08252.6(Leader_CPA1)	1,320	1,750

Sak1 (-)	N° Accession	Nom	Description	Pfam	$\Delta$ bos1/ WT	$\Delta$ sak1/ WT
	Bcin10g03910	nd	hsp98	PF02861.15(Cl <sub>p</sub> _N) + PF02861.15(Cl <sub>p</sub> _N) + PF00004.24(AAA) + PF07724.9(AAA_2) + PF10431.4(Cl <sub>p</sub> B_D2-small)	1,073	1,752
	Bcin02g00170	nd	Vacuolar aminopeptidase 1	PF02127.10(Peptidase_M18)	1,284	1,758
	Bcin11g01920	nd	vacuolar sorting-associated 35	PF03635.12(Vps35)	0,761	1,774
	Bcin16g02820	nd	dihydroxy-acid dehydratase	PF00920.16(ILVD_EDD)	1,211	1,781
	Bcin04g02090	nd	ubiquitin elongating factor core	PF10408.4(Ufd2P_core) + PF04564.10(U-box)	0,972	1,794
	Bcin14g02120	nd	CUE domain-containing	PF02845.11(CUE)	1,113	1,800
	Bcin13g01610	nd	alanine transaminase	PF00155.16(Aminotran_1_2)	1,349	1,826
	Bcin10g02660	nd	hypothetical protein BC1G_04690	PF04828.9(GFA)	1,337	1,837
	Bcin01g03110	nd	pre-mRNA-processing factor 39	nd	0,671	1,841
	Bcin11g00970	nd	branched-chain-amino-acid aminotransferase	PF01063.14(Aminotran_4)	1,246	1,844
	Bcin01g02160	nd	cytoskeleton assembly control Sla2	PF07651.11(ANTH) + PF01608.12(I_LWEQ)	1,265	1,859
	Bcin02g01720	nd	phospholipase D nuclease	PF00614.17(PLDc) + PF00614.17(PLDc)	0,764	1,859
	Bcin04g03100	nd	Keto-acid mitochondrial	PF07991.7(IlvN) + PF01450.14(IlvC)	1,407	1,866
	Bcin14g02720	nd	cysteine desulfurase	PF00266.14(Aminotran_5)	1,108	1,869
	Bcin07g04330	nd	exportin 1	PF03810.14(IBN_N) + PF08389.7(Xpo1)	0,834	1,870
	Bcin15g05110	nd	2-nitropropane dioxygenase	PF03060.10(NMO)	1,373	1,872
	Bcin01g11500	nd	alpha beta hydrolase	PF12697.2(Abhydrolase_6)	1,229	1,885
	Bcin07g06160	nd	atp-dependent protease la	PF02190.11(LON) + PF00004.24(AAA) + PF05362.8(Lon_C)	1,429	1,901
	Bcin04g01680	nd	iron sulfur cluster assembly 1	PF01592.11(NifU_N)	1,296	1,910
	Bcin12g05290	nd	glutaminyl-tRNA synthetase	PF00749.16(tRNA-synt_1c) + PF03950.13(tRNA-synt_1c_C)	0,856	1,956
	Bcin01g07090	nd	ferric-chelate reductase	PF01794.14(Ferric_reduct) + PF08022.7(FAD_binding_8) + PF08030.7(NAD_binding_6)	1,124	1,992
	Bcin09g04730	nd	E1 -activating enzyme G	PF00899.16(ThiF)	1,456	1,995
	Bcin04g06230	BcFHG1	flavo-hemo	PF00042.17(Globin) + PF00970.19(FAD_binding_6) + PF00175.16(NAD_binding_1)	1,441	2,001
	Bcin08g00720	BcAP14	pepsinogen c	PF00026.18(Asp)	1,304	2,010
	Bcin11g04370	nd	ethanolamine kinase	PF01633.15(Choline_kinase)	1,443	2,023
	Bcin11g03040	nd	acetolactate synthase	PF02776.13(TPP_enzyme_N) + PF00205.17(TPP_enzyme_M) + PF02775.16(TPP_enzyme_C)	1,302	2,063
	Bcin08g00090	nd	sulfide quinone reductase	PF07992.9(Pyr_redox_2)	1,437	2,083
	Bcin16g01000	CND8	p-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase	PF00004.24(AAA)	1,166	2,083

Sak1 (-)	N° Accession	Nom	Description	Pfam	$\Delta$ bos1/ WT	$\Delta$ sak1/ WT
	Bcin07g06310	nd	acyl- desaturase	PF00487.19(FA_desaturase) + PF00173.23(Cyt-b5)	1,130	2,090
	Bcin06g00800	nd	inositol monophosphatase	PF00459.20(Inositol_P)	1,484	2,150
	Bcin12g01280	nd	sh3 domain-containing	PF07653.12(SH3_2)	1,049	2,221
	Bcin08g01460	nd	glycine dehydrogenase	PF02347.11(GDC-P) + PF02347.11(GDC-P)	1,186	2,225
	Bcin06g05570	nd	duf1772 domain containing	PF08592.6(DUF1772)	0,781	2,242
	Bcin16g00630	nd	phosphoenolpyruvate carboxykinase	PF01293.15(PEPCK_ATP)	0,896	2,245
	Bcin07g04130	nd	short chain dehydrogenase	PF00106.20(adh_short) + PF00106.20(adh_short) + PF13452.1(MaoC_dehydrat_N) + PF01575.14(MaoC_dehydratas)	0,799	2,307
	Bcin12g03740	nd	sulfite reductase hemo beta- component	PF01855.14(POR_N) + PF00258.20(Flavodoxin_1) + PF03460.12(NIR_SIR_ferr) + PF01077.17(NIR_SIR) + PF03460.12(NIR_SIR_ferr)	1,218	2,350
	Bcin03g05100	nd	glycerol-3-phosphate o- acyltransferase	PF01553.16(Acyltransferase)	0,917	2,392
	Bcin12g04570	nd	phosphomevalonate kinase	PF00288.21(GHMP_kinases_N) + PF08544.8(GHMP_kinases_C)	1,176	2,429
	Bcin05g06770	BCG1	Guanine nucleotide-binding subunit alpha	PF00503.15(G-alpha)	1,391	2,429
	Bcin10g04320	Bccp4	carboxypeptidase y	PF05388.6(Carbpep_Y_N) + PF00450.17(Peptidase_S10)	1,346	2,518
	Bcin14g02730	nd	reduced viability upon starvation	PF03114.13(BAR) + PF00018.23(SH3_1)	1,141	2,524
	Bcin05g06820	nd	3-hydroxyacyl- dehydrogenase	PF00106.20(adh_short)	1,250	2,633
	Bcin06g05690	nd	proline iminopeptidase	PF00561.15(Abhydrolase_1)	0,940	2,728
	Bcin10g02060	nd	Uncharacterized oxidoreductase yvaA	PF01408.17(GFO_IDH_MocA) + PF02894.12(GFO_IDH_MocA_C)	0,777	2,737
	Bcin15g00990	nd	spindle poison sensitivity Scp3	PF00642.19(zf-CCCH)	0,864	2,742
	Bcin08g04440	nd	ser Thr phosphatase family	PF00149.23(Metallophos)	0,888	2,816
	Bcin03g04100	nd	nd	PF07217.6(Het-C)	1,460	2,830
	Bcin08g03270	nd	vacuolar 8	PF00514.18(Arm) + PF00514.18(Arm) + PF00514.18(Arm) + PF00514.18(Arm) + PF00514.18(Arm) + PF00514.18(Arm) + PF00514.18(Arm)	1,471	2,877
	Bcin14g03790	nd	sphingosine-1-phosphate lyase	PF00282.14(Pyridoxal_deC)	0,951	2,919
	Bcin01g05510	nd	CTR2 long splice variant	PF04145.10(Ctr)	1,243	3,042
	Bcin01g00160	BcBoA17	3-oxoacyl-[acyl-carrier- ] reductase	PF00106.20(adh_short)	0,965	3,202
	Bcin13g05210	nd	high affinity copper transporter	PF04145.10(Ctr)	1,110	3,222
	Bcin15g04430	nd	methyltransferase domain- containing	PF08241.7(Methyltransf_11)	1,357	3,327

Sak1 (-)	N° Accession	Nom	Description	Pfam	$\Delta$ bos1/ WT	$\Delta$ sak1/ WT
	Bcin07g06550	nd	3-isopropylmalate dehydratase	PF00330.15(Aconitase) + PF00694.14(Aconitase_C)	1,140	3,447
	Bcin13g01710	nd	FAD-binding monooxygenase	PF01494.14(FAD_binding_3)	0,990	3,514
	Bcin10g05310	nd	3-isopropylmalate dehydrogenase	PF00180.15(Iso_dh)	1,428	3,554
	Bcin01g08020	nd	D-isomer-specific 2-hydroxyacid dehydrogenase	PF02826.14(2-Hacid_dh_C) + PF02826.14(2-Hacid_dh_C)	1,389	3,672
	Bcin03g06830	nd	uricase	PF01014.13(Uricase) + PF01014.13(Uricase)	1,054	3,679
	Bcin10g00060	nd	oxidoreductase NAD-binding domain-containing	PF00970.19(FAD_binding_6) + PF00175.16(NAD_binding_1)	1,162	3,784
	Bcin07g03430	BcGST14	glutathione S-transferase domain-containing	PF13417.1(GST_N_3)	0,762	3,980
	Bcin03g03940	nd	3-ketoacyl-coa thiolase peroxisomal a precursor	PF00108.18(Thiolase_N) + PF02803.13(Thiolase_C)	1,065	4,187
	Bcin01g11550	BcPKS5	polyketide synthase	PF00109.21(ketoacyl-synt) + PF02801.17(Ketoacyl-synt_C) + PF00698.16(Acyl_transf_1) + PF14765.1(PS-DH) + PF08242.7(Methyltransf_12) + PF08659.5(KR) + PF00668.15(Condensation) + PF13745.1(HxxPF_rpt) + PF00501.23(AMP-binding) + PF00550.20(PP-binding) + PF07993.7(NAD_binding_4)	0,843	4,753
	Bcin01g11520	nd	Methyltransferase	nd	1,401	9,058
	Bcin01g11470	nd	nd	nd	1,130	12,699
	Bcin01g11490	nd	O-methyltransferase	PF00891.13(Methyltransf_2)	1,286	15,438
	Bcin01g11480*	nd	bifunctional p-450:nadph-p450 reductase	PF00067.17(p450) + PF00258.20(Flavodoxin_1) + PF00667.15(FAD_binding_1) + PF00175.16(NAD_binding_1)	1,306	4,000
	Bcin02g07090*	nd	NADH:flavin oxidoreductase NADH oxidase	PF00724.15(Oxidored_FMN)	1,143	2,714
	Bcin08g01120*	nd	bleomycin hydrolase	PF03051.10(Peptidase_C1_2)	1,107	1,714
	Bcin16g00570*	nd	DHS-like NAD FAD-binding domain-containing	PF02146.12(SIR2)	1,320	2,320
	Bcin16g03120*	nd	nadp-dependent malic enzyme	PF00390.14(malic) + PF03949.10(Malic_M)	1,375	2,458

Sak1 (+)	N° Accession	Nom	Description	Pfam	$\Delta_{bos1}/$ WT	$\Delta_{sak1}/$ WT
	Bcin01g05720	nd	extracellular serine-rich	nd	1,220	0,055
	Bcin04g04800	BcBRN1	tetrahydroxynaphthalene reductase	PF00106.20(adh_short)	1,434	0,088
	Bcin02g00230	nd	alcohol dehydrogenase	PF00248.16(Aldo_ket_red)	1,099	0,097
	Bcin02g00270	nd	nd	PF07110.6(EthD)	0,921	0,168
	Bcin10g01780	nd	nd	PF14021.1(DUF4237)	0,927	0,195
	Bcin12g02050	nd	alcohol dehydrogenase	PF08240.7(ADH_N) + PF00107.21(ADH_zinc_N)	0,867	0,204
	Bcin07g06060	nd	short-chain dehydrogenase reductase SDR	PF00106.20(adh_short)	1,420	0,255
	Bcin14g03970	nd	1,3-beta-glucanosyltransferase gel1	PF03198.9(Glyco_hydro_72)	1,484	0,266
	Bcin03g03390	BcSod1	superoxide dismutase	PF00080.15(Sod_Cu)	0,727	0,283
	Bcin05g07670	nd	alcohol dehydrogenase	PF08240.7(ADH_N) + PF00107.21(ADH_zinc_N)	0,723	0,303
	Bcin11g04060	nd	nd	nd	0,899	0,327
	Bcin01g06800	nd	phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	PF01474.11(DAHP_synth_2)	1,000	0,330
	Bcin12g01010	nd	nd	nd	0,703	0,342
	Bcin12g02450	nd	biotin synthase	PF04055.16(Radical_SAM) + PF06968.8(BATS)	0,675	0,350
	Bcin05g00670	nd	peptidase family M13	PF05649.8(Peptidase_M13_N) + PF01431.16(Peptidase_M13)	0,735	0,353
	Bcin03g04790	nd	aldo keto reductase	PF00248.16(Aldo_ket_red)	1,119	0,374
	Bcin10g02280	nd	glycosyl transferase family 8	PF01501.15(Glyco_transf_8)	0,829	0,381
	Bcin15g02270	nd	glycogen synthase	PF05693.8(Glycogen_syn)	0,695	0,385
	Bcin08g05050	nd	isovaleryl- dehydrogenase	PF02771.11(Acyl-CoA_dh_N) + PF02770.14(Acyl-CoA_dh_M) + PF00441.19(Acyl-CoA_dh_1)	0,752	0,401
	Bcin05g04730	nd	calcium calmodulin-dependent kinase	PF00069.20(Pkinase)	0,964	0,422
	Bcin16g04350	nd	elongator complex 2	PF01591.13(6PF2K) + PF00300.17(His_Phos_1)	0,697	0,447
	Bcin06g03360	nd	nd	nd	1,122	0,452
	Bcin10g05710	nd	glycoside hydrolase family 32	PF00251.15(Glyco_hydro_32N)	0,954	0,454
	Bcin09g00280	nd	zinc knuckle domain	PF00098.18(zf-CCHC) + PF00098.18(zf-CCHC) + PF00098.18(zf-CCHC) + PF00098.18(zf-CCHC) + PF00098.18(zf-CCHC) + PF00098.18(zf-CCHC) + PF14392.1(zf-CCHC_4)	1,008	0,467
	Bcin02g02110	nd	ribulose-phosphate 3-epimerase	PF00834.14(Ribul_P_3_epim)	0,912	0,478
	Bcin03g09270	nd	phosphatase 5	PF13414.1(TPR_11) + PF00515.23(TPR_1) + PF08321.7(PPP5) + PF00149.23(Metallophos)	0,671	0,480
	Bcin11g04640	nd	anthranilate phosphoribosyltransferase	PF02885.12(Glycos_trans_3N) + PF00591.16(Glycos_transf_3)	0,994	0,495
	Bcin12g04280	BcTRX1	thioredoxin	PF00085.15(Thioredoxin)	0,814	0,496

Sak1 (+)	N° Accession	Nom	Description	Pfam	$\Delta$ bos1/ WT	$\Delta$ sak1/ WT
	Bcin01g10500	nd	nd	PF08881.5(CVNH)	0,761	0,498
	Bcin02g01020	nd	conserved fungal	PF07958.6(DUF1688)	0,828	0,499
	Bcin16g03380	nd	mannitol dehydrogenase	PF00106.20(adh_short)	0,837	0,501
	Bcin03g05330	nd	pyridoxine biosynthesis	PF01680.12(SOR_SNZ)	0,726	0,509
	Bcin03g03060	nd	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	PF01370.16(Epimerase)	1,077	0,509
	Bcin10g03330	nd	mrna processing	PF13824.1(zf-Mss51)	1,106	0,514
	Bcin01g09450	Bclgd1	l-galactonate dehydratase	PF01188.16(MR_MLE) + PF13378.1(MR_MLE_C)	0,993	0,525
	Bcin05g02250	nd	tRNA-dihydrouridine synthase 3	PF01207.12(Dus) + PF01207.12(Dus)	1,056	0,527
	Bcin09g03020	nd	histone h1-binding	PF10516.4(SHNI-TPR)	0,737	0,543
	Bcin04g06240	nd	2-nitropropane dioxygenase	PF03060.10(NMO)	0,719	0,543
	Bcin01g06070	nd	eukaryotic phosphomannomutase	PF03332.8(PMM)	1,028	0,555
	Bcin03g07940	nd	60s ribosomal l3	nd	1,223	0,559
	Bcin06g05730	BcPDI1	disulfide isomerase	PF00085.15(Thioredoxin) + PF13848.1(Thioredoxin_6) + PF00085.15(Thioredoxin)	0,753	0,573
	Bcin07g04070	nd	nd	nd	1,217	0,578
	Bcin03g04170	nd	imidazoleglycerol-phosphate dehydratase	PF00475.13(IGPD)	1,124	0,579
	Bcin12g00280	nd	phosphoserine phosphatase	PF12710.2(HAD)	1,074	0,583
	Bcin02g03060	ppoA80	fatty acid oxygenase	PF03098.10(An_peroxidase) + PF00067.17(p450)	1,066	0,590
	Bcin16g03500	nd	cystathionine beta-synthase	PF00291.20(PALP) + PF00571.23(CBS)	1,242	0,591
	Bcin12g01360	BcPIC5, BcFKB P12	peptidylprolyl isomerase	PF00254.23(FKBP_C)	0,828	0,595
	Bcin06g01640	nd	succinate semialdehyde dehydrogenase	PF00171.17(Aldedh)	0,933	0,599
	Bcin07g04620	nd	f-actin capping beta subunit	PF01115.12(F_actin_cap_B)	0,736	0,602
	Bcin09g02240	nd	oxidoreductase family	PF01408.17(GFO_IDH_MocA)	0,985	0,604
	Bcin05g00380	nd	nd	nd	0,721	0,606
	Bcin02g08570	nd	sec14 cytosolic factor	PF03765.10(CRAL_TRIO_N) + PF00650.15(CRAL_TRIO)	0,897	0,615
	Bcin11g05910	nd	Dipeptidyl-peptidase III	PF03571.10(Peptidase_M49)	0,671	0,627
	Bcin02g06270	nd	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	PF01676.13(Metalloenzyme) + PF06415.8(iPGM_N)	1,073	0,629
	Bcin06g05400	nd	acetyl- acetyltransferase	PF00108.18(Thiolase_N) + PF02803.13(Thiolase_C)	0,755	0,629
	Bcin04g00340	BcPTC3	phosphatase 2C	PF00481.16(PP2C)	0,804	0,632
	Bcin01g08280	nd	phosphoribosylglycinamide formyltransferase	PF00551.14(Formyl_trans_N)	1,294	0,634
	Bcin10g01240	BcGRX1	glutaredoxin	PF00462.19(Glutaredoxin)	0,750	0,635
	Bcin15g02120	nd	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	PF00044.19(Gp_dh_N) + PF02800.15(Gp_dh_C)	0,939	0,635
	Bcin01g08850	nd	S-methyl-5-thioribose-1-phosphate isomerase	PF01008.12(IF-2B)	1,021	0,636

Sak1 (+)	N° Accession	Nom	Description	Pfam	$\Delta$ bos1/ WT	$\Delta$ sak1/ WT
	Bcin06g01850	nd	zinc finger gcs1	PF01412.13(ArfGap)	0,969	0,639
	Bcin05g00580	nd	UDP-galactopyranose mutase	PF13450.1(NAD_binding_8)	0,702	0,640
	Bcin09g05650	nd	nd	nd	0,914	0,644
	Bcin01g08260	nd	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	PF00885.14(DMRL_synthase) + PF00885.14(DMRL_synthase)	0,818	0,651
	Bcin01g10660	nd	transporter sec-13	PF00400.27(WD40) + PF00400.27(WD40) + PF00400.27(WD40) + PF00400.27(WD40) + PF00400.27(WD40)	0,886	0,651
	Bcin03g07930	nd	La domain-containing	PF05383.12(La) + PF14259.1(RRM_6)	1,153	0,652
	Bcin05g08370	nd	disulfide isomerase	PF00085.15(Thioredoxin)	0,827	0,653
	Bcin09g01850	nd	duf1687 domain containing	PF07955.6(DUF1687)	0,768	0,657
	Bcin02g05070	nd	Sec23 Sec24 family	PF04810.10(zf-Sec23_Sec24) + PF04811.10(Sec23_trunk) + PF08033.7(Sec23_BS) + PF04815.10(Sec23_helical) + PF00626.17(Gelsolin)	1,196	0,659
	Bcin06g02380	nd	nd	PF04321.12(RmlD_sub_bind)	1,016	0,662
	Bcin03g07110	nd	40S ribosomal S22	PF00410.14(Ribosomal_S8)	0,820	0,664
	Bcin15g02110	nd	cytochrome c oxidase subunit IV	PF02936.9(COX4)	0,918	0,664
	Bcin09g04400*	BcCAT7	catalase domain containing	PF00199.14(Catalase)	1,040	0,040
	Bcin03g08110*	BcSCD1	conidial pigment biosynthesis scytalone dehydratase Arp1	PF02982.9(Scytalone_dh)	0,826	0,043
	Bcin01g04900*	BcGstII	glutathione s-transferase	PF02798.15(GST_N) + PF00043.20(GST_C)	1,125	0,156
	Bcin05g07190*	nd	Class I glutamine amidotransferase	PF13587.1(DJ-1_Pfpl_N) + PF01965.19(DJ-1_Pfpl)	1,320	0,160
	Bcin02g01420*	nd	glycoside hydrolase family 13	PF00128.19(Alpha-amylase) + PF09260.6(DUF1966)	0,686	0,171
	Bcin03g01570*	nd	NRPS-like enzyme	PF00501.23(AMP-binding) + PF00550.20(PP-binding) + PF07993.7(NAD_binding_4)	1,077	0,192
	Bcin05g02050*	BcALO1	AMID-like mitochondrial oxidoreductase	PF07992.9(Pyr_redox_2) + PF00070.22(Pyr_redox)	1,000	0,205
	Bcin06g01930*	BcGO1	carbohydrate-Binding Module family 18	PF07250.6(Glyoxal_oxid_N) + PF09118.6(DUF1929)	1,067	0,244
	Bcin08g02950*	nd	D-arabinitol dehydrogenase	PF13561.1(adh_short_C2)	0,794	0,265
	Bcin15g05600*	CND9	mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase	PF01232.18(Mannitol_dh) + PF08125.8(Mannitol_dh_C)	0,767	0,333
	Bcin07g02980*	nd	NADH:flavin oxidoreductase NADH oxidase family	PF00724.15(Oxidored_FMN)	1,269	0,346
	Bcin16g04990*	nd	nd	nd	1,174	0,348
	Bcin07g01720*	nd	oligopeptidase family	PF00326.16(Peptidase_S9)	1,146	0,375
	Bcin12g02040*	BcAP8	aspartic protease	PF00026.18(Asp)	0,733	0,378

Sak1 (+)	N° Accession	Nom	Description	Pfam	$\Delta$ bos1/ WT	$\Delta$ sak1/ WT
	Bcin07g06070*	nd	acyl- dehydrogenase domain-containing	PF02771.11(Acyl-CoA_dh_N) + PF02770.14(Acyl-CoA_dh_M) + PF00441.19(Acyl-CoA_dh_1)	1,034	0,414
	Bcin10g00140*	nd	Short-chain dehydrogenase reductase SDR	PF00106.20(adh_short)	1,185	0,444
	Bcin02g03910*	nd	aldehyde dehydrogenase	PF00171.17(Aldedh)	0,853	0,500
	Bcin01g09950**	nd	pyruvate carboxylase	PF00289.17(CPSase_L_chain) + PF02786.12(CPSase_L_D2) + PF02785.14(Biotin_carb_C) + PF00682.14(HMGL-like) + PF02436.13(PYC_OADA) + PF00364.17(Biotin_lipoyl)	0,771	0,580

Bos1 (-) Sak1 (-)	N° Accession	Nom	Description	Pfam	$\Delta$ bos1/ WT	$\Delta$ sak1/ WT
	Bcin16g00820	nd	atp-dependent permease mdl2	PF00664.18(ABC_membrane) + PF00005.22(ABC_tran)	1,527	2,158
	Bcin09g02500	nd	60s ribosomal l44	nd	1,530	1,954
	Bcin15g03910	nd	palmitoyl- thioesterase precursor	PF02089.10(Palm_thioest)	1,533	3,417
	Bcin02g01780	nd	trans-aconitate 2- methyltransferase	PF08241.7(Methyltransf_11)	1,538	2,088
	Bcin08g04430	nd	o-methyltransferase family	PF01596.12(Methyltransf_3)	1,552	2,974
	Bcin01g01990	nd	rna binding	PF00076.17(RRM_1)	1,557	1,757
	Bcin01g08220	nd	zinc-binding oxidoreductase	PF08240.7(ADH_N) + PF00107.21(ADH_zinc_N)	1,561	2,764
	Bcin09g02210	nd	adenylosuccinate synthetase	PF00709.16(Adenylsucc_synt)	1,565	1,563
	Bcin09g05610	nd	nd	nd	1,575	1,938
	Bcin10g00300	nd	heat shock 90	PF13589.1(HATPase_c_3) + PF00183.13(HSP90)	1,592	1,509
	Bcin14g00430	nd	homoaconitase	PF00330.15(Aconitase) + PF00330.15(Aconitase) + PF00694.14(Aconitase_C)	1,599	1,830
	Bcin16g02120	nd	CCR4-Not complex subunit Caf16	PF00005.22(ABC_tran)	1,601	1,641
	Bcin03g02170	nd	mitochondrial inner membrane AAA protease Yta12	PF06480.10(FtsH_ext) + PF00004.24(AAA) + PF01434.13(Peptidase_M41)	1,603	2,066
	Bcin12g00640	nd	nd	nd	1,627	4,022
	Bcin07g04780	nd	PLP-dependent transferase	PF00155.16(Aminotran_1_2)	1,629	3,911
	Bcin07g00730	nd	ornithine aminotransferase	PF00202.16(Aminotran_3)	1,635	1,678
	Bcin06g07090	nd	ATP-dependent RNA helicase	PF00270.24(DEAD) + PF00271.26(Helicase_C)	1,641	1,547
	Bcin01g09530	nd	nd	PF00011.16(HSP20)	1,658	5,466
	Bcin05g00690	nd	nd	nd	1,662	1,853
	Bcin02g00540	nd	prolyl oligopeptidase	PF07859.8(Abhydrolase_3)	1,687	2,129
	Bcin08g03710	BcNDE2	NADH dehydrogenase	PF07992.9(Pyr_redox_2) + PF00070.22(Pyr_redox)	1,688	2,004
	Bcin02g03340	nd	ran gtpase activating 1	PF13516.1(LRR_6)	1,726	1,757
	Bcin07g06220	nd	heat shock 70 kDa	PF00012.15(HSP70)	1,729	1,550
	Bcin03g09280	nd	saccharopine dehydrogenase	PF03435.13(Saccharop_dh)	1,730	2,495
	Bcin08g03960	nd	nd	nd	1,737	2,097
	Bcin06g02300	nd	homoisocitrate dehydrogenase	PF00180.15(Iso_dh)	1,741	2,819
	Bcin11g02580	nd	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit tim44	PF04280.10(Tim44)	1,755	1,596
	Bcin06g06290	nd	cytosine deaminase	PF00383.17(dCMP_cyt_deam_1)	1,789	6,283
	Bcin13g03450	nd	sulfite reductase flavo component	PF01558.13(POR) + PF00667.15(FAD_binding_1) + PF00175.16(NAD_binding_1)	1,806	2,527
	Bcin13g01330	nd	5 -methylthioadenosine phosphorylase	PF01048.15(PNP_UDP_1)	1,809	1,770

Bos1 (-) Sak1 (-)	N° Accession	Nom	Description	Pfam	$\Delta$ bos1/ WT	$\Delta$ sak1/ WT
	Bcin13g04430	nd	pentafunctional arom polypeptide	PF01761.15(DHQ_synthase) + PF00275.15(EPSP_synthase) + PF01202.17(SKI) + PF01487.10(DHquinase_I) + PF08501.6(Shikimate_dh_N) + PF01488.15(Shikimate_DH)	1,854	1,899
	Bcin16g02010	nd	hsp70	PF08609.5(Fes1) + PF13513.1(HEAT_EZ)	1,868	1,774
	Bcin12g05000	nd	chorismate mutase	nd	1,869	2,440
	Bcin04g00140	nd	l-aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase large subunit	PF00501.23(AMP-binding) + PF13193.1(AMP-binding_C) + PF00550.20(PP-binding) + PF07993.7(NAD_binding_4)	1,875	2,602
	Bcin02g06470	nd	cystathionine gamma-synthase	PF01053.15(Cys_Met_Meta_P P)	1,919	1,933
	Bcin01g11530	nd	zinc-binding dehydrogenase family	PF00107.21(ADH_zinc_N)	1,929	19,547
	Bcin09g02600	nd	like mitochondrial	PF01025.14(GrpE)	1,929	1,698
	Bcin09g00730	nd	siderophore iron transporter mirB	PF07690.11(MFS_1)	1,942	3,732
	Bcin14g00540	nd	myo-inositol-1-phosphate synthase	PF07994.7(NAD_binding_5) + PF01658.12(Inos-1-P_synth)	1,961	1,527
	Bcin07g05720	nd	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	PF06337.7(DUSP) + PF00443.24(UCH)	1,978	9,411
	Bcin01g01190	nd	aspartic-type endopeptidase	PF00026.18(Asp)	1,985	2,054
	Bcin01g04340	nd	sulfate adenylyltransferase	PF14306.1(PUA_2) + PF01747.12(ATP-sulfurylase) + PF01583.15(APS_kinase)	1,985	2,390
	Bcin09g03930	nd	peroxisomal matrix	PF08534.5(Redoxin)	2,011	7,046
	Bcin14g04440	nd	nd	nd	2,025	7,328
	Bcin02g08210	nd	ngg1 interacting factor	PF01784.13(NIF3)	2,097	1,666
	Bcin04g06830	nd	nd	nd	2,147	1,519
	Bcin03g04900	nd	hypothetical protein BC1G_00781	PF05022.7(SRP40_C)	2,194	1,734
	Bcin08g05470	nd	choline-sulfatase	PF00884.18(Sulfatase) + PF12411.3(Choline_sulf_C)	2,204	6,363
	Bcin14g01480	nd	dsba oxidoreductase	PF01323.15(DSBA)	2,216	1,935
	Bcin11g05230	nd	mitochondrial import inner membrane translocase subunit tim54	PF11711.3(Tim54)	2,224	1,967
	Bcin02g02580	nd	coproporphyrinogen iii oxidase	PF01218.13(Coprogen_oxidase)	2,231	3,906
	Bcin11g03020	nd	galactokinase	PF10509.4(GalKase_gal_bdg) + PF00288.21(GHMP_kinases_N) + PF08544.8(GHMP_kinases_C)	2,246	1,519
	Bcin04g06310	nd	Metal homeostasis factor atx1	PF00403.21(HMA)	2,303	3,276
	Bcin14g05400	nd	homocitrate synthase	PF00682.14(HMGL-like)	2,325	2,550

Bos1 (-) Sak1 (-)	N° Accession	Nom	Description	Pfam	$\Delta$ bos1/ WT	$\Delta$ sak1/ WT
	Bcin15g01020	nd	chitin synthase activator	PF08238.7(Sel1) + PF08238.7(Sel1) + PF08238.7(Sel1) + PF08238.7(Sel1) + PF08238.7(Sel1)	2,351	1,732
	Bcin09g06840	nd	nd	PF14033.1(DUF4246)	2,387	14,999
	Bcin01g00210	nd	threonine ammonia- biosynthetic	PF00291.20(PALP) + PF00585.13(Thr_dehydrat_C) + PF00585.13(Thr_dehydrat_C)	2,395	2,513
	Bcin09g03710	nd	amidophosphoribosyltransferase	PF00310.16(GATase_2) + PF00156.22(Pribosyltran)	2,415	1,504
	Bcin01g01040	nd	WD40 repeat	PF00400.27(WD40)	2,443	1,891
	Bcin15g02310	nd	nd	PF05368.8(NmrA)	2,493	2,568
	Bcin01g05550	nd	carbamoyl-phosphate large subunit	PF00289.17(CPSase_L_chain) + PF02786.12(CPSase_L_D2) + PF02787.14(CPSase_L_D3) + PF00289.17(CPSase_L_chain) + PF02786.12(CPSase_L_D2)	2,575	2,097
	Bcin03g05720	nd	nd	nd	2,582	7,796
	Bcin14g00860	nd	carbohydrate esterase family 8	PF01095.14(Pectinesterase)	2,618	2,727
	Bcin02g05740	nd	allantoinase	PF01979.15(Amidohydro_1)	2,656	5,639
	Bcin06g02010	nd	Copper-binding of the mitochondrial inner membrane	PF02630.9(SCO1-SenC)	2,725	3,735
	Bcin16g04050	nd	NADP-specific glutamate dehydrogenase	PF02812.13(ELFV_dehydrog_N ) + PF00208.16(ELFV_dehydrog)	2,750	4,263
	Bcin02g01770	nd	NAD NADP octopine nopaline dehydrogenase	PF01210.18(NAD_Gly3P_dh_N) + PF02317.12(Octopine_DH)	2,811	3,029
	Bcin14g00210	nd	nadh oxidase	PF00724.15(Oxidored_FMN)	2,815	15,203
	Bcin14g00100	nd	NADH:ubiquinone B18 subunit	PF05676.8(NDUF_B7)	2,878	1,778
	Bcin05g03840	nd	nd	nd	2,887	1,618
	Bcin01g03710	nd	Acyl- N-acyltransferase	PF13523.1(Acetyltransf_8)	2,895	1,885
	Bcin03g07670	nd	nad-specific glutamate dehydrogenase	PF05088.7(Bac_GDH) + PF00208.16(ELFV_dehydrog)	3,057	1,865
	Bcin05g02460	nd	bax inhibitor family	PF01027.15(Bax1-I)	3,091	4,345
	Bcin03g03910	nd	sucrase ferredoxin domain containing	PF06999.7(Suc_Fer-like)	3,124	9,071
	Bcin11g00160	nd	adenylyl-sulfate kinase	PF01583.15(APS_kinase)	3,154	2,264
	Bcin12g03650	nd	norsolorinic acid reductase	PF00248.16(Aldo_ket_red)	3,685	9,249
	Bcin14g00850	nd	polygalacturonase partial	PF00295.12(Glyco_hydro_28)	3,721	2,534
	Bcin01g06010	nd	glycoside hydrolase family 16	PF00722.16(Glyco_hydro_16)	3,803	3,635
	Bcin06g07480	nd	tam domain methyltransferase	PF13489.1(Methyltransf_23)	3,837	8,662
	Bcin06g06040	nd	nd	PF03856.8(SUN)	3,890	1,990

Bos1 (-) Sak1 (-)	N° Accession	Nom	Description	Pfam	$\Delta$ bos1/ WT	$\Delta$ sak1/ WT
	Bcin12g04980	nd	nonribosomal peptide synthase - like	PF00550.20(PP-binding) + PF00668.15(Condensation) + PF00501.23(AMP-binding) + PF00550.20(PP-binding) + PF00668.15(Condensation)	4,763	17,918
	Bcin01g03270	nd	#N/A	PF05368.8(NmrA)	5,043	5,389
	Bcin05g03230	nd	phosphoketolase	PF09364.5(XFP_N) + PF03894.10(XFP) + PF09363.5(XFP_C)	5,092	4,848
	Bcin07g00300	nd	#N/A	PF01814.18(Hemerythrin)	5,505	9,864
	Bcin05g07140	nd	mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM10	PF02953.10(zf-Tim10_DDP)	5,916	2,184
	Bcin13g03410	nd	paf acetylhydrolase family	PF12695.2(Abhydrolase_5)	6,920	26,291
	Bcin14g02940	nd	#N/A	PF00248.16(Aldo_ket_red)	8,539	21,077
	Bcin12g04900	nd	Salicylate hydroxylase	PF01494.14(FAD_binding_3)	11,896	23,193
	Bcin10g02140*	nd	ABC transporter	PF00664.18(ABC_membrane) + PF00005.22(ABC_tran) + PF00664.18(ABC_membrane) + PF00005.22(ABC_tran)	1,580	2,880
	Bcin16g00002*	nd	FAD-dependent pyridine nucleotide-disulfide partial	PF13738.1(Pyr_redox_3)	1,600	5,800
	Bcin09g05930*	nd	ABC transporter	PF00664.18(ABC_membrane) + PF00005.22(ABC_tran) + PF00664.18(ABC_membrane) + PF00005.22(ABC_tran)	1,900	3,600
	Bcin11g01080*	nd	#N/A	PF00078.22(RVT_1)	2,364	3,091
	Bcin14g03160*	nd	Glutathione S-transferase	PF13417.1(GST_N_3) + PF00043.20(GST_C)	3,000	15,000
	Bcin01g11540*	nd	aldolase	PF03328.9(Hpch_Hpal)	4,500	14,500
	Bcin02g01990*	nd	#N/A	PF13460.1(NAD_binding_10)	6,067	5,600
	Bcin12g04940*	nd	cytochrome P450 monooxygenase	PF00067.17(p450)	6,500	8,667
	Bcin06g03440*	nd	alternative oxidase	PF01786.12(AOX)	6,750	6,750
	Bcin09g06120*	nd	zinc-regulated transporter 1	PF02535.17(Zip)	7,500	14,000
	Bcin13g00710*	nd	abc transporter	PF14510.1(ABC_trans_N) + PF00005.22(ABC_tran) + PF01061.19(ABC2_membrane) + PF06422.7(PDR_CDR) + PF00005.22(ABC_tran) + PF01061.19(ABC2_membrane)	9,000	43,000
	Bcin14g05580*	nd	2-polyprenyl-6-methoxyphenol hydroxylase	PF01494.14(FAD_binding_3)	19,333	17,667

Bos1 (+) Sak1 (+)	N° Accession	Nom	Description	Pfam	$\Delta_{bos1}/$ WT	$\Delta_{sak1}/$ WT
	Bcin07g05550	nd	nf	nd	0,065	0,033
	Bcin14g04090	nd	nd	PF02036.12(SCP2)	0,066	0,058
	Bcin01g08160	nd	Pesticidal crystal cry6Aa	nd	0,085	0,091
	Bcin06g02510	nd	alpha beta-hydrolase	PF00450.17(Peptidase_S10)	0,117	0,108
	Bcin12g06430	nd	retinol dehydrogenase 8	PF00106.20(adh_short)	0,117	0,393
	Bcin03g01920	BcCAT5	Catalase	PF00199.14(Catalase) + PF06628.7(Catalase-rel)	0,120	0,039
	Bcin15g03150	nd	tripeptidyl-peptidase 1 precursor	PF09286.6(Pro-kuma_activ) + PF00082.17(Peptidase_S8)	0,126	0,040
	Bcin16g03540	nd	acetolactate synthase	PF02776.13(TPP_enzyme_N) + PF00205.17(TPP_enzyme_M) + PF02775.16(TPP_enzyme_C)	0,136	0,210
	Bcin07g05560	nd	nd	nd	0,145	0,080
	Bcin01g02910	nd	histidine acid phosphatase	PF00328.17(His_Phos_2)	0,158	0,169
	Bcin05g01520	nd	glycoside hydrolase family 16	PF00722.16(Glyco_hydro_16)	0,159	0,105
	Bcin14g04580	nd	chlorophyll synthesis pathway	PF08240.7(ADH_N) + PF00107.21(ADH_zinc_N)	0,160	0,009
	Bcin02g09370	nd	C2 domain-containing	PF00168.25(C2) + PF00168.25(C2)	0,165	0,130
	Bcin04g04190	nd	glycoside hydrolase family 15	PF00723.16(Glyco_hydro_15) + PF00686.14(CBM_20)	0,169	0,126
	Bcin10g00030	nd	dimeric alpha-beta barrel	PF07110.6(EthD)	0,182	0,012
	Bcin01g08150	nd	nd	nd	0,185	0,169
	Bcin04g06450	nd	aldo-keto reductase (AKR13)	PF00248.16(Aldo_ket_red)	0,188	0,199
	Bcin13g04640	nd	short chain dehydrogenase reductase	PF00106.20(adh_short)	0,202	0,029
	Bcin01g02880	nd	alcohol dehydrogenase ii	PF08240.7(ADH_N) + PF00107.21(ADH_zinc_N)	0,203	0,144
	Bcin12g03390	nd	glycoside hydrolase family 15	PF00723.16(Glyco_hydro_15) + PF00686.14(CBM_20)	0,204	0,053
	Bcin03g01040	nd	glutamate decarboxylase	PF00282.14(Pyridoxal_deC)	0,206	0,331
	Bcin02g03090	nd	glycoside hydrolase family 1	PF00232.13(Glyco_hydro_1)	0,222	0,084
	Bcin16g04640	nd	formate dehydrogenase	PF00389.25(2-Hacid_dh) + PF02826.14(2-Hacid_dh_C)	0,236	0,169
	Bcin11g02720	nd	alcohol dehydrogenase	PF00248.16(Aldo_ket_red)	0,237	0,040
	Bcin16g02700	nd	dihydroxy-acid dehydratase	PF00920.16(ILVD_EDD) + PF00920.16(ILVD_EDD)	0,243	0,599
	Bcin15g03620	nd	glycogen phosphorylase	PF00343.15(Phosphorylase)	0,256	0,257
	Bcin12g01020	BcOah	oxaloacetate partial	PF13714.1(PEP_mutase)	0,263	0,010
	Bcin02g01610	BcNDE3	apoptosis-inducing factor 1	PF07992.9(Pyr_redox_2) + PF00070.22(Pyr_redox)	0,264	0,110
	Bcin10g01030	BcPRX9	TSA family	PF08534.5(Redoxin)	0,265	0,055
	Bcin15g03640	nd	6-hydroxy-d-nicotine oxidase	PF01565.18(FAD_binding_4) + PF08031.7(BBE)	0,274	0,113
	Bcin11g00140	nd	nd	nd	0,276	0,262
	Bcin04g05680	nd	aldehyde dehydrogenase	PF00171.17(Aldedh)	0,282	0,568

Bos1 (+) Sak1 (+)	N° Accession	Nom	Description	Pfam	$\Delta$ bos1/ WT	$\Delta$ sak1/ WT
	Bcin01g10310	nd	glycogen debranching enzyme	PF14699.1(hGDE_N) + PF14701.1(hDGE_amylase) + PF14702.1(hGDE_central) + PF06202.9(GDE_C)	0,283	0,234
	Bcin11g06440	nd	glycoside hydrolase family 31	PF01055.21(Glyco_hydro_31)	0,285	0,201
	Bcin16g02810	nd	nd	nd	0,299	0,510
	Bcin06g04940	nd	short-chain dehydrogenase	PF00106.20(adh_short)	0,307	0,099
	Bcin08g02430	nd	uracil phosphoribosyltransferase	PF14681.1(UPRTase)	0,313	0,227
	Bcin06g00330	nd	tripeptidyl-peptidase 1 precursor	PF09286.6(Pro-kuma_activ) + PF00082.17(Peptidase_S8)	0,313	0,152
	Bcin08g03150	nd	dihydroxyacetone kinase	PF02733.12(Dak1) + PF02734.12(Dak2)	0,324	0,239
	Bcin09g07140	nd	hypothetical protein BcDW1_7862	nd	0,327	0,634
	Bcin02g00013	nd	salicylate 1-monooxygenase	PF01494.14(FAD_binding_3)	0,336	0,158
	Bcin06g02760	nd	nd	PF07978.8(NIPSNAP) + PF07978.8(NIPSNAP)	0,356	0,557
	Bcin06g06350	BcNQO1	minor allergen alt a 7	PF00258.20(Flavodoxin_1)	0,362	0,410
	Bcin04g00600	0	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase	PF00485.13(PRK)	0,362	0,261
	Bcin01g03390	0	glycosyl hydrolase family 38	PF01074.17(Glyco_hydro_38) + PF09261.6(Alpha-mann_mid) + PF07748.8(Glyco_hydro_38C)	0,364	0,180
	Bcin10g02340	0	s-formylglutathione hydrolase	PF00756.15(Esterase)	0,373	0,548
	Bcin11g04130	0	cyanamide hydratase	PF01966.17(HD)	0,374	0,625
	Bcin09g00650	0	2-methylcitrate synthase	PF00285.16(Citrate_synt)	0,380	0,399
	Bcin15g04670	Bcser8	nd	PF09286.6(Pro-kuma_activ) + PF00082.17(Peptidase_S8)	0,381	0,132
	Bcin14g00480	nd	glycoside hydrolase family 3	PF00933.16(Glyco_hydro_3) + PF01915.17(Glyco_hydro_3_C) + PF07691.7(PA14) + PF14310.1(Fn3-like)	0,383	0,225
	Bcin09g02680	nd	glycoside hydrolase family 63	PF03200.11(Glyco_hydro_63)	0,387	0,254
	Bcin15g02090	nd	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	PF02922.13(CBM_48) + PF00128.19(Alpha-amylase) + PF02806.13(Alpha-amylase_C)	0,394	0,239
	Bcin07g03170	nd	cell lysis	PF02453.12(Reticulon)	0,396	0,547
	Bcin03g06200	nd	GTP cyclohydrolase II	PF12471.3(GTP_CH_N) + PF00925.15(GTP_cyclohydro2)	0,398	0,457
	Bcin08g02390	nd	Peptidase S28	PF05577.7(Peptidase_S28)	0,401	0,151
	Bcin07g04370	nd	peptidase s41 family	nd	0,406	0,099
	Bcin02g05580	nd	nd	nd	0,407	0,472
	Bcin01g10150	BcPSD	phosphatidylserine decarboxylase	PF02666.10(PS_Dcarbxylyase)	0,418	0,320
	Bcin09g07130	nd	nd	nd	0,421	0,564

Bos1 (+) Sak1 (+)	N° Accession	Nom	Description	Pfam	$\Delta$ bos1/ WT	$\Delta$ sak1/ WT
	Bcin02g01070	nd	glucosidase ii alpha subunit	PF13802.1(Gal_mutarotas_2) + PF01055.21(Glyco_hydro_31)	0,421	0,502
	Bcin03g03440	nd	haloacid dehalogenase-like hydrolase	PF13419.1(HAD_2)	0,423	0,088
	Bcin08g02080	nd	antibiotic biosynthesis monooxygenase	PF03992.11(ABM)	0,426	0,375
	Bcin07g02370	nd	Class I glutamine amidotransferase	PF13278.1(DUF4066)	0,428	0,528
	Bcin11g03260	BcPIO9	nd	PF11720.3(Inhibitor_I78)	0,429	0,393
	Bcin11g04710	nd	glycerol dehydrogenase	PF00248.16(Aldo_ket_red)	0,440	0,562
	Bcin06g01920	nd	annexin anxc4	PF00191.15(Annexin)	0,442	0,388
	Bcin16g02220	nd	lysine decarboxylase	PF03641.9(Lysine_decarbox)	0,443	0,394
	Bcin02g02910	nd	Pentulose kinase	PF00370.16(FGGY_N) + PF02782.11(FGGY_C)	0,455	0,298
	Bcin02g04670	nd	pyroglutamyl peptidase type	PF01470.12(Peptidase_C15)	0,461	0,511
	Bcin01g10100	BcPIC7	pyruvate kinase	PF00224.16(PK) + PF02887.11(PK_C)	0,465	0,348
	Bcin04g05300	BcGLR1	glutathione-disulfide reductase	PF07992.9(Pyr_redox_2) + PF00070.22(Pyr_redox) + PF02852.17(Pyr_redox_dim)	0,473	0,360
	Bcin01g00750	nd	DUF718 domain-containing	PF05336.8(DUF718)	0,492	0,296
	Bcin12g04970	nd	FAD NAD(P)-binding domain- containing	PF01494.14(FAD_binding_3)	0,494	0,548
	Bcin03g02930	BcCLA4	mitogen-activated kinase : p21- activated kinase (PAK)	PF00786.23(PBD) + PF00069.20(Pkinase)	0,495	0,640
	Bcin11g00830	nd	FAD NAD(P)-binding domain- containing	PF13738.1(Pyr_redox_3)	0,501	0,468
	Bcin02g05270	nd	udp-glucose:glyco glucosyltransferase	PF06427.6(UDP-g_GGTase)	0,503	0,500
	Bcin16g01550	nd	nd	nd	0,506	0,454
	Bcin06g03060	BcGST9	glutathione s-	PF02798.15(GST_N) + PF14497.1(GST_C_3)	0,520	0,232
	Bcin05g01260	nd	nd	nd	0,523	0,462
	Bcin09g02460	nd	cytochrome b5	PF00173.23(Cyt-b5)	0,523	0,449
	Bcin01g11330	nd	glucosidase 2 subunit beta	PF12999.2(PRKCSh-like) + PF12999.2(PRKCSh-like) + PF13015.1(PRKCSh_1)	0,527	0,590
	Bcin15g00860	nd	prenylcysteine oxidase	PF13450.1(NAD_binding_8) + PF07156.9(Prenylcys_lyase)	0,529	0,662
	Bcin03g02420	nd	nd	nd	0,530	0,410
	Bcin11g05710	nd	oligosaccharyltransferase alpha subunit	PF04597.9(Ribophorin_I)	0,532	0,640
	Bcin15g04410	nd	metallopeptidase	PF01432.15(Peptidase_M3)	0,534	0,531
	Bcin04g05230	nd	mitochondrial chaperone Frataxin	PF01491.11(Frataxin_Cyay)	0,534	0,468
	Bcin01g01260	nd	DJ-1 -type	PF13278.1(DUF4066)	0,536	0,399
	Bcin09g02790	nd	acetate-- ligase	PF00501.23(AMP-binding) + PF13193.1(AMP-binding_C)	0,538	0,456
	Bcin04g06850	nd	retinol dehydrogenase	PF00106.20(adh_short)	0,538	0,472

Bos1 (+) Sak1 (+)	N° Accession	Nom	Description	Pfam	$\Delta$ bos1/ WT	$\Delta$ sak1/ WT
	Bcin09g02470	nd	hypothetical protein BC1G_07135	nd	0,543	0,629
	Bcin12g01870	nd	quinone oxidoreductase	PF08240.7(ADH_N) + PF00107.21(ADH_zinc_N)	0,553	0,350
	Bcin03g06220	nd	uracil phosphoribosyltransferase	PF14681.1(UPRTase)	0,558	0,427
	Bcin12g02430	nd	Pyridoxal phosphate- dependent major subdomain 2	PF13500.1(AAA_26) + PF00202.16(Aminotran_3) + PF00202.16(Aminotran_3)	0,562	0,235
	Bcin02g03490	nd	cystathionine gamma-lyase	PF01053.15(Cys_Met_Meta_PP)	0,576	0,316
	Bcin11g01660	nd	inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase	PF01156.14(IU_nuc_hydro)	0,579	0,664
	Bcin06g04660	BcPIO12, Bc gar1	aldo keto reductase	PF00248.16(Aldo_ket_red)	0,579	0,644
	Bcin08g02380	nd	disulfide-isomerase erp38	PF00085.15(Thioredoxin) + PF00085.15(Thioredoxin) + PF07749.7(ERp29)	0,580	0,640
	Bcin11g05700	BcHxk	hexokinase	PF00349.16(Hexokinase_1) + PF03727.11(Hexokinase_2)	0,581	0,484
	Bcin02g06170	nd	nuclear condensin complex subunit smc4	PF02463.14(SMC_N) + PF06470.8(SMC_hinge)	0,583	0,417
	Bcin04g06400	nd	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	PF01266.19(DAO)	0,589	0,557
	Bcin05g05290	nd	nd	PF05368.8(NmrA)	0,592	0,032
	Bcin08g05100	nd	nd	PF00289.17(CPSase_L_chain) + PF02786.12(CPSase_L_D2) + PF02785.14(Biotin_carb_C) + PF00364.17(Biotin_lipoyl)	0,595	0,364
	Bcin08g05630	nd	cyanate hydratase	PF02560.9(Cyanate_lyase)	0,600	0,553
	Bcin13g05580	nd	alcohol dehydrogenase	PF08240.7(ADH_N) + PF00107.21(ADH_zinc_N)	0,608	0,418
	Bcin14g04770	nd	PSP1 domain-containing	PF04468.7(PSP1)	0,609	0,512
	Bcin16g03410	nd	actin depolymerizing	PF00241.15(Cofilin_ADF) + PF00241.15(Cofilin_ADF)	0,609	0,472
	Bcin16g04800	nd	malate dehydrogenase	PF00056.18(Ldh_1_N) + PF02866.13(Ldh_1_C)	0,617	0,601
	Bcin14g01030	nd	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase	PF08240.7(ADH_N) + PF00107.21(ADH_zinc_N)	0,617	0,548
	Bcin09g01930	nd	2-methylcitrate dehydratase	PF03972.9(MmgE_Prpd)	0,620	0,601
	Bcin03g08100	BcBRN2	tetrahydroxynaphthalene reductase	PF00106.20(adh_short)	0,622	0,007
	Bcin15g04970	nd	glucose-6-phosphate isomerase	PF00342.14(PGI)	0,629	0,588
	Bcin02g07690	nd	enoyl- hydratase isomerase	PF00378.15(ECH)	0,631	0,583
	Bcin03g08240	nd	acyl binding	PF00887.14(ACBP)	0,635	0,608
	Bcin08g06300	nd	6-phosphofructokinase	PF00365.15(PFK) + PF00365.15(PFK)	0,635	0,591
	Bcin03g05490	nd	hydroxyacylglutathione hydrolase	PF00753.22(Lactamase_B)	0,637	0,655
	Bcin09g00510	nd	Chaperone J-domain- containing	PF00226.26(DnaJ) + PF00684.14(DnaJ_CXXCXGXG) + PF01556.13(CTDII)	0,638	0,556

Bos1 (+) Sak1 (+)	N° Accession	Nom	Description	Pfam	$\Delta$ bos1/ WT	$\Delta$ sak1/ WT
	Bcin02g06130	nd	nd	PF01237.13(Oxysterol_BP) + PF01237.13(Oxysterol_BP)	0,644	0,489
	Bcin04g00570	BcPRX1	merozoite capping -1	PF00578.16(AhpC-TSA)	0,647	0,617
	Bcin03g01520	nd	NADP-dependent alcohol dehydrogenase	PF08240.7(ADH_N) + PF00107.21(ADH_zinc_N)	0,653	0,017
	Bcin03g01560	nd	aldo keto reductase	PF00248.16(Aldo_ket_red)	0,654	0,288
	Bcin16g01950	nd	glycoside hydrolase family 63	PF03200.11(Glyco_hydro_63)	0,655	0,601
	Bcin02g04770	nd	methionine vitamin-b12	PF01717.13(Meth_synt_2)	0,658	0,179
	Bcin07g03460	nd	survival factor 1	PF08622.5(Svf1)	0,663	0,552
	Bcin03g00010*	nd	nd	nd	0,000	0,000
	Bcin11g02630*	nd	phytanoyl- dioxygenase	PF05721.8(PhyH)	0,050	0,025
	Bcin04g05000*	BcppoB- like,ppoA90	fatty acid oxygenase	PF03098.10(An_peroxidase) + PF00067.17(p450)	0,085	0,122
	Bcin03g00005*	nd	Aegerolysin family	PF06355.8(Aegerolysin)	0,118	0,265
	Bcin02g05500*	nd	alpha beta-hydrolase	PF12697.2(Abhydrolase_6)	0,154	0,115
	Bcin01g10130*	nd	cytosolic nonspecific dipeptidase	PF01546.23(Peptidase_M20) + PF07687.9(M20_dimer)	0,161	0,161
	Bcin07g05540*	nd	nd	nd	0,169	0,152
	Bcin05g07640*	nd	cytochrome P450	PF00067.17(p450)	0,188	0,250
	Bcin15g03060*	nd	nd	PF06101.6(DUF946)	0,215	0,046
	Bcin11g02670*	nd	gluconate 5-dehydrogenase	PF00106.20(adh_short)	0,233	0,100
	Bcin11g02700*	BcPKS4	polyketide synthase	PF00109.21(ketoacyl-synt) + PF02801.17(Ketoacyl-synt_C) + PF00698.16(Acyl_transf_1) + PF14765.1(PS-DH) + PF08242.7(Methyltransf_12) + PF08659.5(KR) + PF00550.20(PP- binding)	0,258	0,169
	Bcin12g06180*	nd	cyanide hydratase	PF00795.17(CN_hydrolase)	0,261	0,435
	Bcin05g01530*	nd	glycosyltransferase family 2	PF13632.1(Glyco_trans_2_3)	0,269	0,654
	Bcin12g00300*	nd	Glycoside family 35	PF01301.14(Glyco_hydro_35) + PF10435.4(BetaGal_dom2) + PF13363.1(BetaGal_dom3) + PF13364.1(BetaGal_dom4_5) + PF13364.1(BetaGal_dom4_5)	0,276	0,276
	Bcin13g01770*	nd	nd	nd	0,276	0,172
	Bcin08g00280*	nd	carboxypeptidase s1	PF00450.17(Peptidase_S10)	0,281	0,125
	Bcin01g08340*	nd	(sam-dependent methyltransferases)	PF08242.7(Methyltransf_12)	0,300	0,150
	Bcin14g00090*	nd	thermophilic desulfurizing enzyme family	PF02771.11(Acyl-CoA_dh_N) + PF08028.6(Acyl-CoA_dh_2)	0,318	0,273

Bos1 (+) Sak1 (+)	N° Accession	Nom	Description	Pfam	$\Delta$ bos1/ WT	$\Delta$ sak1/ WT	
	Bcin10g00040*	BcPKS7	hybrid pks-nrps	PF00109.21(ketoacyl-synt) + PF02801.17(Ketoacyl-synt_C) + PF00698.16(Acyl_transf_1) + PF14765.1(PS-DH) + PF08242.7(Methyltransf_12) + PF08659.5(KR) + PF00550.20(PP- binding) + PF00668.15(Condensation) + PF00501.23(AMP-binding) + PF00550.20(PP-binding) + PF07993.7(NAD_binding_4)		0,321	0,113
	Bcin03g03480*	nd	glycoside hydrolase family 10	PF00734.13(CBM_1) + PF00331.15(Glyco_hydro_10)		0,400	0,200
	Bcin14g00650*	nd	glycoside hydrolase family 31	PF13802.1(Gal_mutarotas_2) + PF01055.21(Glyco_hydro_31)		0,404	0,213
	Bcin03g05040*	nd	rna interference and gene silencing	PF08699.5(DUF1785) + PF02170.17(PAZ) + PF02171.12(Piwi)		0,476	0,622
	Bcin11g02730*	BcPIOS	CDP-alcohol phosphatidyltransferase	PF13344.1(Hydrolase_6) + PF13242.1(Hydrolase_like)		0,619	0,155
	Bcin08g05060*	nd	nad-dependent 15- hydroxyprostaglandin dehydrogenase	nd		0,667	0,212

Bos1 (-) Sak1 (+)	N° Accession	Nom	Description	Pfam	$\Delta$ bos1/ WT	$\Delta$ sak1/ WT
	Bcin06g05640	nd	RNA polymerase Rpb3 insert domain-containing	PF01193.19(RNA_pol_L) + PF01000.21(RNA_pol_A_bac)	1,518	0,560
	Bcin12g00190	nd	GMP synthase	PF00117.23(GATase) + PF02540.12(NAD_synthase) + PF00958.17(GMP_synt_C)	1,546	0,607
	Bcin05g04910	nd	immunogenic	PF15406.1(PH_6)	1,559	0,656
	Bcin14g04340	nd	transcriptional corepressor	PF00515.23(TPR_1) + PF13414.1(TPR_11) + PF00515.23(TPR_1) + PF00515.23(TPR_1) + PF00515.23(TPR_1) + PF13414.1(TPR_11) + PF07719.12(TPR_2)	1,621	0,661
	Bcin01g06060	nd	nd	nd	1,983	0,118
	Bcin03g01540	nd	GMC oxidoreductase	PF00732.14(GMC_oxred_N) + PF05199.8(GMC_oxred_C)	1,996	0,192
	Bcin15g00100	nd	nd	nd	2,040	0,130
	Bcin01g11220	nd	glycoside hydrolase family 17	PF00332.13(Glyco_hydro_17)	2,191	0,519
	Bcin13g01570	nd	zinc finger zpr1	PF03367.8(zf-ZPR1) + PF03367.8(zf-ZPR1)	2,739	0,613
	Bcin04g05700	nd	alcohol dehydrogenase	PF08240.7(ADH_N) + PF00107.21(ADH_zinc_N)	3,067	0,114
	Bcin01g00010	BcBoA1	nd	PF05368.8(NmrA)	3,381	0,525
	Bcin14g02510	BcLCC2	laccase 2	PF07732.10(Cu-oxidase_3) + PF00394.17(Cu-oxidase) + PF07731.9(Cu-oxidase_2)	3,867	0,294
	Bcin14g03430*	nd	pectin lyase a precursor	PF00544.14(Pec_lyase_C)	1,600	0,200
	Bcin16g00930*	CND3	nd	nd	1,900	0,550
	Bcin14g01290*	BcPKS11	polyketide synthase	PF00109.21(ketoacyl-synt) + PF02801.17(Ketoacyl-synt_C) + PF00698.16(Acyl_transf_1) + PF14765.1(PS-DH) + PF08242.7(Methyltransf_12) + PF00107.21(ADH_zinc_N) + PF08659.5(KR) + PF00550.20(PP-binding)	3,417	0,333

Bos1 (+) Sak1 (-)	N° Accession	Nom	Description	Pfam	$\Delta$ bos1/ WT	$\Delta$ sak1/ WT
	Bcin12g06370	BcBot4,BCL4	P450	PF00067.17(p450)	0,055	1,536
	Bcin12g06400	BcBot3,CND11,BcPIO14	P450	PF00067.17(p450)	0,134	1,829
	Bcin01g10380	nd	P450	PF00067.17(p450) + PF00258.20(Flavodoxin_1) + PF00667.15(FAD_binding_1) + PF00175.16(NAD_binding_1)	0,284	32,005
	Bcin06g06240	nd	nd	PF02668.11(TauD)	0,418	3,736
	Bcin12g06390	BcBot2,CND15,BcPIO15,BcSTC 1	nd	PF03936.11(Terpene_synth_C)	0,514	1,895
	Bcin01g11450	BcNRPS7	nd	PF00501.23(AMP-binding) + PF13193.1(AMP-binding_C) + PF00668.15(Condensation)	0,535	10,278
	Bcin05g04870	nd	nd	PF00890.19(FAD_binding_2) + PF00173.23(Cyt-b5)	0,537	1,586
	Bcin02g07220	nd	nd	PF00173.23(Cyt-b5) + PF02771.11(Acyl-CoA_dh_N) + PF02770.14(Acyl-CoA_dh_M) + PF00441.19(Acyl-CoA_dh_1)	0,595	6,826
	Bcin13g00770	nd	nd	PF12697.2(Abhydrolase_6)	0,626	2,354
	Bcin12g03480	nd	nd	PF04191.8(PEMT) + PF04191.8(PEMT)	0,631	2,206
	Bcin09g03440	nd	nd	PF01940.11(DUF92)	0,645	2,719
	Bcin12g06460	nd	nd	PF01738.13(DLH)	0,659	1,886
	Bcin04g03720 *	nd	nd	PF01494.14(FAD_binding_3) + PF01494.14(FAD_binding_3)	0,583	4,167



## **Deciphering stress signal transduction cascades in *Botrytis cinerea* by phosphoproteomics and functional genetics.**

**Keywords :** *Botrytis cinerea*, signalling pathway, phosphorylation, proteomic, fungicide.

**Abstract :** Perception and adaptation to the environment are essential processes for the survival of living organisms. The phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* can thus perceive different types of signals, whether they are chemical or physical. The signalling pathway of the Sak1 MAPK is involved in the adaptation to osmotic, oxidative and cell wall stress, but also in sporulation and pathogenicity by regulating plant penetration and necrosis development. In order to deepen existing knowledge of the Sak1 pathway, we have carried out global studies based on proteomics and phosphoproteomics techniques. A comparative proteomics analysis between the wild type and the signalling mutants  $\Delta bos1$  and  $\Delta sak1$  showed, among others, that Sak1 regulates the abundance of proteins involved in the G-protein pathway and calcium pathway. This connection with G-proteins was confirmed by a decrease in cAMP concentration in the  $\Delta sak1$  mutant. Using fludioxonil as signal for the activation of Sak1 for a phosphoproteomic analysis revealed changes in the state of protein phosphorylation.

Among these differentially phosphorylated proteins, the presence of PKAR (regulatory subunit of protein kinase A) and the transcription factor CRZ1, indicates an action on the G-protein and calcium pathway respectively, validating the results obtained by proteomics. Phosphoproteomics revealed a phosphatase-like protein, PhnA. Its functional characterization reveals its role in stress adaptation, sporulation and germination, as well as in pathogenicity, thus demonstrating a new pathogenicity factor in *B. cinerea*.

Our study revealed interactions between Sak1 and other unsuspected signalling pathways, affecting both the production of certain components (transcriptional and translational regulations) and phosphorylation (post-translational modifications). Our results will create the basis for new research questions to complement our understanding of these interactions involving adaptation to stress and pathogenesis of *B. cinerea*.

**Décryptage des cascades de signalisation liées au stress par phosphoprotéomique et génétique fonctionnelle chez *Botrytis cinerea*.**

**Mots clés :** *Botrytis cinerea*, voies de signalisation, phosphorylation, protéomique, fongicide.

**Résumé :** La perception et l'adaptation à l'environnement sont des processus indispensables pour la survie des organismes vivants. Le champignon phytopathogène *Botrytis cinerea* peut ainsi percevoir différents types de signaux qu'ils soient chimiques ou physiques. La voie de signalisation de la MAPK Sak1 est impliquée dans l'adaptation au stress osmotique, oxydatif et pariétal, mais aussi dans la sporulation et le pouvoir pathogène en régulant la pénétration de la plante et le développement des nécroses. Afin d'approfondir les connaissances existantes sur la voie de Sak1, nous avons réalisé des études globales basées sur des techniques de protéomique et phosphoprotéomique. L'analyse de protéomique comparative entre la souche sauvage et les mutants de signalisation  $\Delta bos1$  et  $\Delta sak1$  a notamment mis en évidence que la MAPK Sak1 régule l'abondance de protéines impliquées dans la voie des protéines G et la voie calcique. Cette connexion avec les protéines G a été confirmée par une baisse de la concentration en AMPc chez le mutant  $\Delta sak1$ . L'utilisation du fludioxonil comme signal de l'activation de la MAPK Sak1 pour l'analyse par phosphoprotéomique a mis en évidence des modifications de l'état de phosphorylation de protéines.

Parmi ces protéines différenciellement phosphorylées, la présence de PKAR (sous-unité régulatrice de la protéine kinase A) et du facteur de transcription CRZ1, indiquent respectivement une action sur la voie *via* protéines G et la voie calcique, validant les résultats obtenus par protéomique. Le phosphoprotéome a révélé une « phosducin-like protein », PhnA. Sa caractérisation fonctionnelle montre son rôle dans l'adaptation aux stress, la sporulation et la germination, ainsi que dans le pouvoir pathogène mettant ainsi en évidence un nouveau facteur de pathogénicité chez *B. cinerea*.

Notre étude a permis de révéler des interactions entre Sak1 et d'autres voies de signalisation non suspectées, agissant aussi bien sur la production de certains composants (régulations transcriptionnelles et traductionnelles) que sur la phosphorylation (modifications post-traductionnelles). Nos résultats constitueront la base de nouvelles recherches pour compléter nos connaissances sur ces interactions impliquant l'adaptation au stress et la pathogénie de *B. cinerea*.