

Amélioration du champignon cellulolytique Trichoderma reesei par reproduction sexuée

Laetitia Chan Ho Tong

▶ **To cite this version:**

Laetitia Chan Ho Tong. Amélioration du champignon cellulolytique Trichoderma reesei par reproduction sexuée. Biotechnologie. Institut agronomique, vétérinaire et forestier de France, 2017. Français. NNT : 2017IAVF0017 . tel-03013494

HAL Id: tel-03013494

https://pastel.hal.science/tel-03013494

Submitted on 19 Nov 2020

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.

agreenium
l'institut agronomique, vétérinaire & forestier de France

AgroParisTech

NNT° : 2017 IAVF 0017

THESE DE DOCTORAT

préparée à l'Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (AgroParisTech)

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Institut agronomique vétérinaire et forestier de France

Spécialité : Biotechnologies

École doctorale n°581
Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)

par

Laetitia CHAN HO TONG

Amélioration du champignon cellulolytique *Trichoderma reesei* par reproduction sexuée

Directeur de thèse : **Antoine MARGEOT**
Co-encadrement de la thèse : **Frédérique BIDARD**

CONFIDENTIEL

Thèse présentée et soutenue à Rueil-Malmaison, le 26 octobre 2017 :

Composition du jury :

Mme Fabienne MALAGNAC, Professeur, Université Paris Saclay	Présidente
Mme Joëlle DUPONT, Professeur, Muséum national d'Histoire naturelle	Rapporteur
M. Marc-Henri LEBRUN, Directeur de recherches, INRA	Rapporteur
M. Robert DEBUCHY, Directeur de recherches, CNRS	Examinateur
Mme Muriel VIAUD, Directeur de recherches, INRA	Examinateur
Mme Frédérique BIDARD, Ingénieur de recherches, IFP Énergies nouvelles	Co-encadrante
M. Antoine MARGEOT, Chef du département Biotechnologie, IFP Énergies nouvelles	Directeur de thèse

IFP Energies nouvelles

IFP Energies nouvelles – Département Biotechnologie
1 et 4 Avenue de Bois Préau
92 500 Rueil-Malmaison

Remerciements

Je remercie chaleureusement mon encadrante, Frédérique Bidard, pour m'avoir accompagné tout au long de ces trois ans avec beaucoup d'enthousiasme et de bienveillance. Je la remercie de m'avoir offert l'opportunité de faire cette thèse, de la confiance qu'elle m'a accordée et de son soutien. Sa disponibilité, ses conseils et nos nombreuses discussions m'ont permis de m'épanouir dans ce projet.

Je remercie Antoine Margeot qui a été pour moi un directeur de thèse impliqué, attentif et disponible malgré la nouveauté de la thématique abordé dans cette thèse et ces nouvelles responsabilités de chef de département. Je le remercie pour ses remarques toujours pertinentes, les discussions constructives et les nombreuses relectures «urgentes».

Je remercie Thiziri Aouam, Céline Cohen, François Wasels, Hugues Mathis et Sabine Prigent pour toutes les manips que vous m'avez aidé à réaliser, pour vos conseils en BM et en fermentation et pour le temps que vous m'avez consacré.

Je remercie Delphine Naquin et Yves D'Aubenton, de la plateforme de séquençage Haut-Débit I2BC, pour leur précieuse aide pour l'assemblage du génome A2 et pour les analyses bio-informatique du BSA-Seq.

Je remercie Frédéric Monot, de m'avoir accueillie au sein du département Biotechnologie, quand il en était le responsable, de m'avoir accompagné pendant presque 3 ans et d'être revenu me supporter lors de la soutenance. Merci à Etienne Jourdier pour son expertise en plans d'expérience et en fermentation. Merci également à Fadhel Ben-Chaabane pour son expertise en fermentation, ces conseils scientifiques et sa capacité à toujours « trouver » le coté brevetable des résultats. Merci à Brigitte pour toutes les corrections de grammaire et d'orthographe et toutes les relectures

Je remercie les stagiaires, Aurélie Brun et Maxime Cailleaux, que j'ai eu le plaisir d'encadrer pendant cette thèse et dont l'aide m'a été précieuse.

Je remercie les membres de mon comité de thèse, Didier Tharreau, Robert Debuchy et Philippe Silar pour leurs regards attentifs, les discussions constructives ainsi que les précieux conseils scientifiques et techniques qu'ils m'ont apportés.

Je remercie les membres de mon jury de thèse, Fabienne Malagnac, Joëlle Dupont, Marc-Henri Lebrun, Muriel Viaud et Robert Debuchy, pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Merci à ma « coloc' de bureau », Marion Drougard, de sa bonne compagnie et de son soutien 2 années durant. Nos discussions quotidiennes, parfois frivoles, mais non moins délectables, ont contribué à mon bien être, à ma bonne humeur et au maintien d'un état d'esprit positif au sein de ce milieu professionnel exigent. Au-delà de la reconnaissance, c'est mon amitié que je t'adresse.

Merci à mes coéquipiers sportifs : pour leur sollicitude qui forçait ma persévérance, grâce à quoi l'effort, physique ou intellectuel, en salle de sport comme au labo, me parut plus surmontable. La joie de souffrir et de transpirer avec vous me manquera beaucoup.

Enfin, je remercie l'ensemble du département Biotechnologie pour l'ambiance de travail agréable et stimulante que je suis peinée de quitter. Merci à tous d'avoir illuminé, chacun à votre façon, mon passage à IFPen.

Je remercie tous les amis d'IFPEN : Marion, Estelle, Julie, Mona, François, Gwladys, Vincent, Benjamin, Rémi, Thiziri, Ludivine et Itzel pour les bons moments partagés sans lesquels mon passage à IFPEN n'aurait pas été si plaisant.

Je remercie Philippe Silar pour m'avoir donné gout au champ disciplinaire dans lequel je persévère aujourd'hui. Notre rencontre fut l'impulsion initiale qui devait finalement aboutir à la réalisation de cette thèse. Mais outre son encadrement bienveillant et ses conseils lumineux, en tant que professeur, chef, et consultant à présent, c'est sa gentillesse, sa disponibilité et son soutien qui m'ont le plus touchée. Je le remercie de m'avoir guidé et encouragé dans la voie que j'ai choisie.

Enfin, j'adresse mon affection à ma famille pour leur soutien, leurs encouragements et leur intérêt vis à vis d'un sujet pour le moins alambiqué pour un auditeur néophyte. Je les remercie d'avoir fait en sorte que cette thèse se déroule dans les meilleures conditions et que je puisse y accorder toute l'attention que ce type de travaux requiert.

Un grand merci à ma maman pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Malgré la distance qui nous sépare, sa confiance, sa tendresse et son amour m'ont toujours portée et guidée. Enfin, je remercie chaleureusement Marc pour sa patience, son soutien indéfectible et pour avoir toujours su trouver les mots pour me réconforter dans les phases de doutes.

Pour terminer ces remerciements, une pensée pour toi qui n'a pas vu l'aboutissement de mon travail mais je sais que tu en aurais été très fier.

Table des matières

Table des matières 1

Liste des figures 7

Liste des tableaux 11

Listes des abréviations 12

Introduction 13

1. Étude bibliographique 16

1.1. Les biocarburants 17

1.1.1. Contexte climatique et énergétique 17

1.1.2. La fabrication des biocarburants : 3 générations 18

1.2. Les champignons dans l'industrie et l'alimentation 22

1.2.1. L'utilisation des champignons dans l'industrie 22

1.2.2. Les méthodes d'amélioration des souches fongiques 24

1.2.3. La reproduction sexuée 30

1.2.4. Le cycle parasexuel et la fusion de protoplastes 36

1.3. Le champignon *Trichoderma reesei* 37

1.3.1. Origines, taxonomie et écologie 37

1.3.2. Le champignon cellulolytique *T. reesei* 39

1.3.3. Les souches hyper-productrices 41

1.4. Reproduction sexuée et cycle de vie chez les souches sauvages de *T. reesei* 44

1.4.1. *T. reesei*, un champignon hétérothallique 44

1.4.2. Les types sexuels 48

1.4.3. Le système phéromone récepteur 52

1.4.4. Développement des périthèces 55

1.4.5. Régulation du développement sexuel par la lumière 58

1.5. Reproduction sexuée et cycle de vie chez la souche industrielle QM6a 59

1.5.1. QM6a est femelle stérile 59

1.5.2. Remédier à la stérilité femelle 62
1.6. Enjeux et objectifs de la thèse 64
2. Matériels et méthodes 66
2.1. Matériel biologique 67
2.2. Milieux et conditions standards de culture 67
2.3. Étude de la reproduction sexuée 68
2.3.1. Reproduction sexuée 68
2.3.2. Observation du cycle de reproduction sexuée 68
2.3.3. Test MAT 69
2.3.4. Obtention de descendants isolés à partir d'ascospores 69
2.3.5. Test de viabilité des ascospores 69
2.3.6. Test d'incompatibilité végétative 70
2.3.7. Observation des anastomoses 70
2.4. Élaboration du plan d'expérience 70
2.5. Transformations 71
2.5.1. Transformation bactérienne 71
2.5.2. Transformation fongique par la méthode des protoplastes 71
2.5.3. Transformation fongique par électroporation des conidies 72
2.6. Construction de souches 73
2.6.1. Invalidation du locus MAT 73
2.6.2. Remplacement du locus MAT 74
2.6.3. Complémentation de l'invalidation du locus *MAT1-2* 75
2.6.4. Construction des souches sauvages marquées 76
2.7. Extraction de l'ADN 76
2.7.1. ADN plasmidique 76
2.7.2. ADN génomique 76
2.8. PCR et amorces 77
2.9. Criblage de souches Ru-A 79
2.9.1. Crible primaire : culture en microplaque 79

2.9.2. Crible secondaire : culture en fioles alimentées 79
2.9.3. Culture en bioréacteurs de laboratoire 79
2.9.4. Mesure d'activité enzymatiques 80
2.9.5. Dosage de l'activité β-glucosidase 81
2.10. BSA-Seq 82
2.10.1. Criblage sur milieu AZCL-He-Cellulose 82
2.10.2. Préparation de librairies, séquençage et assemblage du génome de la souche A2 82
2.10.1. Culture et extraction de l'ADN des groupes de ségrégants 83
2.10.2. Séquençage des groupes de descendants et détection des polymorphismes 83
3. Résultats et discussions 84
3.1. Maîtrise du cycle sexué 85
3.1.1. Isolement de souches sauvages des deux types sexuels 85
3.1.2. Cycle de vie de *T. reesei* 87
3.1.3. Récupération, conservation et germination des ascospores 93
3.1.4. Optimisation de la formation des stromata 94
3.1.5. Effets de différents milieux sur la formation des stromata 99
3.1.6. Comparaison des méthodes de croisement 100
3.1.7. Discussion 101
3.2. Mise au point de la stratégie « souche assistante » 104
3.2.1. Stratégie de la « souche assistante » 104
3.2.2. Prérequis à la stratégie de la souche assistante 106
3.2.3. Construction des souches outils 108
3.2.4. Essais de reproduction sexuée à l'aide de la souche assistante 113
3.2.5. Etude de l'événement de fécondation 120
3.2.6. Discussion 128
3.3. Mise en application de la reproduction sexuée entre souches sauvages et hyper-productrices 132
3.3.1. La reproduction sexuée pour améliorer les performances cellulolytiques de *T. reesei* 132
3.3.2. Identification de mutations d'intérêts par la méthode du BSA-Seq 143
3.3.3. Conclusion et discussion 155

4. Conclusion et perspectives 162
5. Références 167
6. Annexes 186

Liste des figures

Figure 1: Procédé de production d'éthanol de 1ere génération..... 19

Figure 2 : Procédé de production d'éthanol de 2eme génération par la voie biochimique..... 20

Figure 3 : Les champignons dans l'industrie. 22

Figure 4 : Systèmes de recyclage des marqueurs de sélection. 28

Figure 5 : Les différentes stratégies de croisements..... 32

Figure 6 : Exemples d'amélioration génétique par reproduction sexuée. 34

Figure 7 : Représentation schématique d'un cycle parasexuel chez un champignon filamenteux. 37

Figure 8 : *Trichoderma reesei*. 39

Figure 9 : Réassemblage des scaffolds de *T. reesei* en sept chromosomes. 40

Figure 10 : Généalogie simplifiée des souches hyper-productrices dérivant de la QM6a. 42

Figure 11: Réarrangements chromosomiques de la souche RutC30 par rapport à la souche QM6a..... 44

Figure 12 : Reproduction sexuée chez un champignon ascomycète filamenteux hétérothallique et hermaphrodite..... 45

Figure 13 : Morphologie des fructifications et des ascospores de *T. reesei*. 46

Figure 14 : Cycle de vie théorique de *T. reesei* combinant un cycle sexué et un cycle asexuée. 48

Figure 15 : Idiomorphes du locus MAT chez *T. reesei, P. anserina et N. crassa*. 50

Figure 16 : Rôle des gènes des loci MAT dans la reproduction sexuée. 51

Figure 17 : Le système phéromone/récepteur chez les levures. 52

Figure 18 : Le système phéromone/récepteur mating-type dépendant chez *T. reesei*, *P. anserina* et *N. crassa*. 54

Figure 19 : Développement des périthèces chez *H. gelatinosa*. 57

Figure 20 : Développement des périthèces chez *H. schweinitzii*. 57

Figure 21 : Reproduction sexuée de *T. reesei*. 60

Figure 22 : La reproduction sexuée chez *T. reesei*. 61

Figure 23 : Recherche des gènes capables de restaurer la fertilité femelle chez QM6a. 62

Figure 24 : Le gène *idc1* de *T. reesei*. 63

Figure 25 : Etapes de purification des transformants (IFPEN) 72

Figure 26 : Assemblage final de la cassette de délétion dans le plasmide pUC19. 73

Figure 27 : Position des amorces choisies pour l'amplification des différents fragments de la cassette d'invalidation. 74

Figure 28 : Protocole pour le dosage de l'activité FP..... 81

Figure 29 : Protocole pour le dosage de l'activité β-glucosidase 81

Figure 30 : Test Mat ou croisements sexués pour l'identification des types sexuels. 86

Figure 31 : Identification de la souche B31..... 87

Figure 32 : Hyphes ayant différencié des conidiophores 88

Figure 33 : Hyphes entrelacées colorées au Bleu de lactophénol..... 88

Figure 34 : Des boules cotonneuses et un stromata..... 89

Figure 35 : Les stromata à divers stades de développement..... 89

Figure 36 : Libération des ascospores 90

Figure 37 : Le stromata en fin de cycle de reproduction 91

Figure 38 : Cycle de reproduction entre les souches QM6a et A2 92

Figure 39 : Méthode de reproduction sexuée par arrosage. 95

Figure 40 : Récapitulatif des paramètres expérimentés pour optimiser la formation des stromata. 96

Figure 41: Optimisation de la reproduction sexuée par arrosage. 97

Figure 42 : Quantification des stromata obtenus sur différents milieux de culture. 100

Figure 43 : Stratégie d'identification du gène responsable de la stérilité femelle de QM6a. 104

Figure 44 : Stratégie de la souche assistante appliquée à *T. reesei*. 105

Figure 45 : Test de la fertilité femelle des souches A2 et B31. 107

Figure 46 : Validation des prérequis. 108

Figure 47 : Stratégie de construction des souches outils. 108

Figure 48 : Les loci *MAT* de *T. reesei*. 109

Figure 49 : obtention de la cassette d'invalidation du locus *MAT1-1* 110

Figure 50 : Vérification par amplification PCR de l'invalidation du locus *MAT 1-2* 111

Figure 51 : Reproduction sexuée après complémentation de l'invalidation du locus *MAT1-2* 112
Figure 52 : Stratégies alternatives pour l'obtention d'une souche *MAT1-1*. 113
Figure 53 : Stromata obtenu avec la stratégie de la souche assistante 115
Figure 54 : Nombre de stromata obtenus suite à la variation des paramètres de l'arrosage séquentiel 117
Figure 55 : Conditions optimales pour l'obtention de stromata par la stratégie de la souche assistante 118
Figure 56 : Observation d'un stromata issu d'un tricaryon 119
Figure 57 : Principe de l'expérience de fécondation 121
Figure 58 : Mise en œuvre de la reproduction sexuée par arrosage pour l'étude de l'événement de fécondation 124
Figure 59 : Profils de croissance des ascospores issues des croisements A2 (B31) 126
Figure 60 : Profils de croissance des ascospores issues des croisements B31 (A2) 127
Figure 61 : Zone de non recombinaison autour du locus *MAT1-2* chez QM6a. 129
Figure 62 : Profil de sécrétion protéiques des 295 descendants issus du croisement A2 par RutC30. 134
Figure 63 : Répartition des individus par classe en fonction de leur production de protéines. 135
Figure 64 : Crible de la production de protéines en fioles alimentées 136
Figure 65 : Principe du procédé de production de cellulases d'IFP Énergies nouvelles. 137
Figure 66 : Évaluations de la productivité en bioréacteur. 138
Figure 67 : Détection par PCR de la troncation du gène *cre1*. 141
Figure 68 : Principe de la méthode BSA-Seq. 145
Figure 69 : Généalogie de la souche QM9136 146
Figure 70 : Crible AZCL-He-Cellulose pour distinguer les souches productrices ou non de cellulases 147
Figure 71 : Criblage des descendants du croisement A2xQM9136 148
Figure 72 : Différence de caryotype entre les descendants *MAT1-2* et *MAT1-1re* de la souche CBS999.97 150
Figure 73 : Matrice de similarité entre les souches A2 et QM6a 151

Figure 74 : Caryotype de la souche sauvage A2 152

Figure 75 : Cartographie des SNPs sur le génome A2 et représentation de leurs fréquences alléliques 153

Figure 76 : Alignement des gènes *xyr1* des différentes souches parentales et groupe de descendants 155

Liste des tableaux

Tableau 1 : Listes des enzymes fongiques 24

Tableau 2: Récapitulatif des avantages et inconvénients des différentes techniques d'amélioration de souche. 30

Tableau 3 : Comparaison entre la reproduction sexuée et la multiplication clonale 31

Tableau 4 : Classification de *T. reesei* 38

Tableau 5 : Souches utilisées dans ce projet. 67

Tableau 6 : Récapitulatif des amorces utilisées au cours de ce projet de thèse. 78

Tableau 7: Taux de germination des ascospores 94

Tableau 8 : Comparatif des méthodes de reproduction sexuée par arrosage et confrontation 101

Tableau 9: Essais de tricaryon. 114

Tableau 10 : Récapitulatif des paramètres à faire varier pour l'arrosage séquentiel 116

Tableau 11 : Croisements à réaliser pour étudier l'événement de fécondation 122

Tableau 12 : Résultats attendus et interprétations 123

Tableau 13: Récapitulatif des profils de résistance obtenus lors des différents croisements 125

Tableau 14 : Récapitulatif des versions alléliques héritées par les descendants issus du croisement A2 par RutC0. 142

Tableau 15 : Résumé du séquençage des deux groupes de descendants 149

Tableau 16 : Résumé du séquençage de la souche sauvage A2 149

Tableau 17 : Nombre de variants détectés par groupe de descendants 152

Listes des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
CBH	Exonucléase
EG	Endonucléase
g	Accélération centrifuge radiale
GIEC	Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat
HMG	High Mobility Group
InDel	Désigne une insertion ou une délétion dans une séquence d'ADN
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
Kb	Milliers de paires de bases
kV	Kilo Volt
M	Molaire
Mb	Millions de paires de bases
NGS	Next-generation sequencing
OGM	Organisme génétiquement modifié
OPEP	Organisation des pays exportateurs de pétrole
Pb	Paire de bases
rpm	Rotation par minute
SNP / SNV	Single nucleotide polymorphism / Single nucleotide variant
Ω	Ohm
µF	Micro Farad
µL	Micro Litre

Introduction

La demande énergétique mondiale croissante, et les réserves d'hydrocarbures limitées et détenues par un petit nombre de pays soulèvent la question de la sécurité d'approvisionnement des énergies fossiles. Une rupture d'approvisionnement pourrait avoir des conséquences majeures sur l'économie mondiale. Parallèlement, il a été démontré que les changements climatiques en cours sont liés aux émissions de gaz à effet de serre provoquées par les activités humaines. C'est dans ce contexte économique et écologique que les biocarburants, dont le développement a été initié il y a plus d'une trentaine d'années, connaissent un regain d'intérêt.

Le bioéthanol de première génération est le biocarburant le plus utilisé dans le monde. Il est produit à partir de deux grands types de cultures, les plantes sucrières (cannes à sucres, betteraves) et les plantes amylacées (blé, maïs). Cependant il est vivement controversé car il concurrence potentiellement les filières dédiées à l'alimentation humaine et animale et son bilan carbone peut être peu favorable. Ce biocarburant devrait être progressivement complété et remplacé par du bioéthanol de deuxième génération, dérivant des ressources lignocellulosiques (cellulose et hémicellulose issue de résidus forestiers, déchets végétaux et de cultures dédiées). La production de ce type de bioéthanol suit un processus en trois étapes. Lors de la première étape, la biomasse est pré-traitée pour rendre la cellulose, polysaccharide principal des parois végétales, accessible à l'hydrolyse enzymatique. Puis l'action de cocktails d'enzymes cellulolytiques, produit par le champignon filamenteux *Trichoderma reesei,* libère les monosaccharides de glucose. Ces derniers sont ensuite fermentés en éthanol qui est purifié et concentré par distillation (Margeot et al., 2009). L'étape d'hydrolyse peut représenter à elle seule entre 15 et 30 % du coût de production et son amélioration est donc indispensable pour rendre ce procédé viable économiquement.

Dans le but de produire des quantités d'enzymes plus importantes, les acteurs industriels du domaine des biocarburants utilisent des souches du champignon filamenteux *Trichoderma reesei* obtenues par des approches de mutagenèse aléatoire au cours des années 1980. Ces approches « à l'aveugle » ont abouti à des résultats prometteurs (la production des protéines a ainsi été augmentée d'un facteur 10), mais ont atteint leurs limites. Des stratégies de modifications génétiques plus ciblées, dirigées spécifiquement contre les gènes impliqués dans les processus d'induction de la production de cellulases ont été mises en place plus récemment. Des souches améliorées pour leur productivité ou pour la qualité de leur cocktail ont été générées par ces méthodologies. Toutefois, le nombre de gènes qu'il est possible de modifier par ces techniques et la limitation du nombre de marqueurs de sélection et la difficulté de leur recyclage réduisent les modifications possibles.

Comme de nombreux champignons industriels, *T. reesei* a longtemps été considéré comme possédant exclusivement un cycle asexuel. La mise en évidence récente d'un cycle de reproduction sexuée (Seidl et al., 2009) chez ce champignon filamenteux ouvre de nouvelles perspectives

d'amélioration des souches. Cependant, l'isolat sauvage QM6a présente un problème de stérilité femelle (Seidl et al., 2009). Comme toutes les souches industrielles dérivent de la souche QM6a, elles sont toutes stériles en tant que femelles. La reproduction sexuée peut être un outil d'amélioration rapide et efficace, mais si elle ne peut pas avoir lieu entre les souches industrielles, son utilité reste limitée. L'objectif de ce travail de thèse est de mettre en place la reproduction sexuée comme outil génétique et d'amélioration des performances des souches industrielles.

Mon projet de thèse se base sur la mise en place de la reproduction sexuée comme outil d'amélioration de *T. reesei*. Une première partie de mon travail est consacrée à l'optimisation de la reproduction sexuée et à l'étude des étapes et des mécanismes de la reproduction sexuée entre souches sauvages et hyper-productrices. La deuxième partie est dédiée à la mise en place de la reproduction sexuée entre des souches hyper-productrices femelles stériles, à l'aide de la stratégie originale de la « souche assistante » et à la compréhension de l'évènement de fécondation. Enfin, la dernière partie vise à tirer parti de la reproduction sexuée entre souches sauvages et hyperproductrices i) pour générer des souches plus performantes et ii) pour mettre en place la méthode du BSA-Seq, qui combine le Bulk segregant analysis avec du séquençage haut-débit afin d'identifier les mutations impliquées dans un phénotype cellulase-négatif de la souche QM9136.

Ces travaux ont été réalisés au sein du département Biotechnologie d'IFP Energies nouvelles (IFPEN), sous la direction de M. Antoine Margeot, l'encadrement de Mme Frédérique Bidard-Michelot et avec les conseils scientifiques et techniques de M. Philippe Silar.

1. Étude bibliographique

1.1. Les biocarburants

1.1.1. Contexte climatique et énergétique

La demande énergétique mondiale devrait augmenter d'environ 40 % d'ici 2040 du fait de la forte croissance démographique et économique de certains pays émergents (International Energy Agency, 2014). En 2010, la demande énergétique mondiale était satisfaite à plus de 80 % par des énergies fossiles : le pétrole fournit 33 % des besoins mondiaux, suivi par le charbon (27 %) et enfin le gaz (21 %). Ces chiffres illustrent bien la dépendance mondiale aux énergies fossiles. D'après les auteurs de la BP Statistical Review of World Energy (BP, 2015), les réserves d'hydrocarbures sont abondantes, mais concentrées dans un petit nombre de pays, ce qui soulève la question de la sécurité d'approvisionnement. En effet, fin 2014, les pays de l'OPEP (27 pays) possédaient plus de 70 % des réserves mondiales de pétrole et 50 % des réserves de gaz étaient réparties entre la Russie, l'Iran et le Qatar. Du fait de la répartition des ressources, l'approvisionnement peut être rapidement perturbé par des catastrophes naturelles, des incidents techniques (catastrophe industrielle), mais aussi des événements géopolitiques, voire terroristes. Une rupture d'approvisionnement plus ou moins brutale pourrait avoir des conséquences sur l'économie mondiale, c'est pourquoi, plus que la disponibilité des ressources dans le sous-sol, c'est bien l'accès aux ressources et leur valorisation qui préoccupent les dirigeants.

Parallèlement, les conclusions du GIEC (Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat) montrent que les changements climatiques en cours sont liés aux émissions de gaz à effet de serre provoquées par les activités humaines. D'après leurs prévisions, le réchauffement climatique pourrait atteindre 5,5 °C en moyenne à la surface du globe par rapport à la période préindustrielle de 1850, mettant en péril de nombreuses populations et écosystèmes. C'est pourquoi, la communauté internationale a décidé de freiner la hausse des températures à 2 °C d'ici 2100. Cela implique que les émissions de gaz à effet de serre ne dépassent pas 2 900 gigatonnes, or entre 1870 et 2011, les deux tiers de ce total ont déjà été émis (Giec, 2014). Pour respecter cet objectif, il faut réduire d'une façon considérable, les émissions de gaz à effet de serre au cours des prochaines décennies en procédant notamment à des changements dans les modes de productions énergétiques actuels.

Face aux besoins énergétiques croissants, au réchauffement global et à la dépendance énergétique de nombreux pays, les gouvernements ont mis en place des politiques de diversification énergétique qui donnent une part belle aux énergies renouvelables : les biocarburants, les énergies solaires et éoliennes, la géothermie, l'hydraulique. Le présent travail est focalisé plus spécifiquement sur les biocarburants.

1.1.2. La fabrication des biocarburants : 3 générations

Les biocarburants sont issus de la transformation de biomasse ou matière organique d'origine végétale. Ils sont utilisés soit en remplacement, soit en complément des carburants conventionnels dans le secteur des transports. Leur usage présente des intérêts considérables :

- ils sont facilement stockables jusqu'à leur utilisation, car sous forme liquide,
- ils sont simples à utiliser puisqu'ils peuvent être mélangés aux carburants conventionnels et distribués sans avoir à modifier les infrastructures existantes et les véhicules,
- ils sont une source d'énergie constante et contrôlable et les matières premières nécessaires à leur fabrication sont disponibles en Europe.

On distingue 3 générations de biocarburants selon l'origine de la biomasse utilisée et les procédés de transformation associés.

1.1.2.1. La première génération de biocarburants

Les biocarburants de première génération sont fabriqués à partir des organes de réserve des végétaux et sont répartis en deux familles :

- le **biodiesel**, destiné aux moteurs diesel, est fabriqué à partir de plantes à huile (colza, palme, tournesol). Les huiles extraites de ces plantes subissent une transformation chimique (transestérification ou hydrotraitement), qui leur confère des propriétés voisines de celles des gazoles auxquels elles sont mélangées.
- le **bioéthanol** est destiné aux moteurs à essence. Il est obtenu par la fermentation alcoolique du sucre contenu dans la betterave et la canne à sucre ou obtenu après l'hydrolyse de l'amidon extrait du maïs, ou de céréales. L'éthanol obtenu peut être transformé en ETBE (Ethyl Tertio Butyl Ether) par addition avec de l'isobutène (généralement d'origine pétrolière), afin de favoriser le mélange avec l'essence (Figure 1).

Ces biocarburants de première génération sont produits à l'échelle industrielle, majoritairement par les États-Unis, le Brésil et l'Europe. Cependant, ils ne couvrent que 2,5 % de la consommation énergétique mondiale (BP, 2015).

Les biocarburants de 1^{ere} génération présentent un bilan carbone assez variable selon la matière première utilisée (Simbolotti, 2007). Si la production à partir de betteraves permet une réduction des émissions de 50 à 60 % (par rapport à l'essence), celle à partir du maïs permet une réduction de seulement 15 et 25 % (Simbolotti, 2007). Enfin, vivement controversés car produits à partir de matières premières pouvant être utilisées dans une chaîne alimentaire animale ou humaine ou pouvant

entraîner la conversion de zones naturelles en parcelles agricoles, les biocarburants de première génération devraient être progressivement complétés par des biocarburants de deuxième génération.

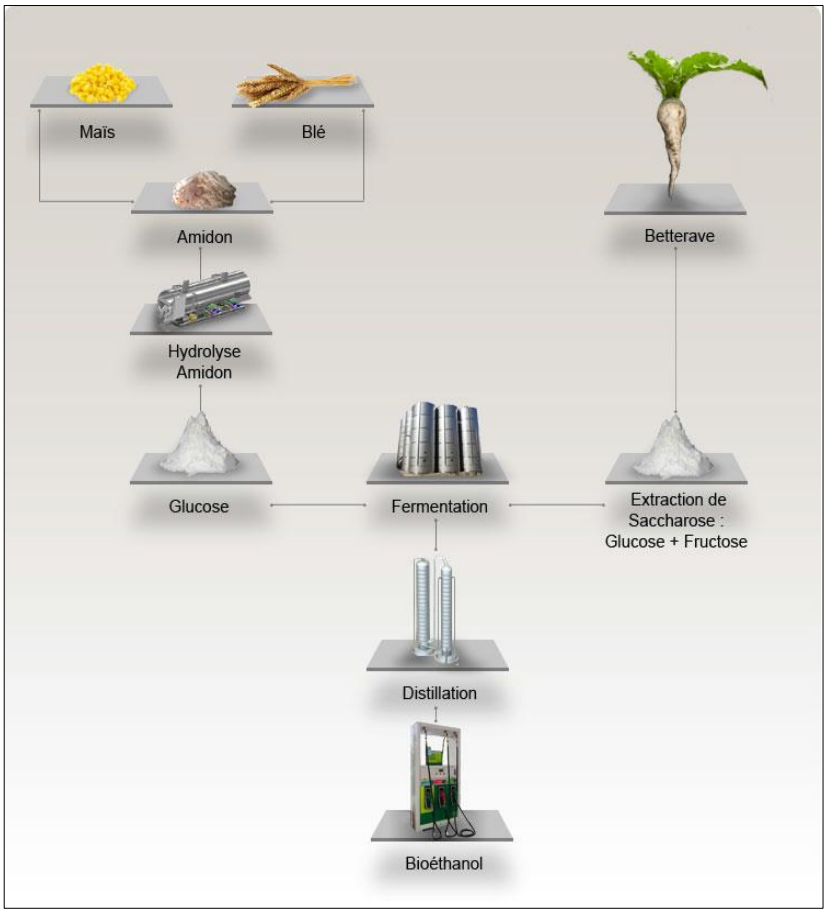


Figure 1: Procédé de production d'éthanol de 1ere génération
Le glucose extrait de la betterave ou après hydrolyse de l'amidon du maïs et du blé est fermenté en éthanol qui est purifié et concentré par distillation avant d'être mélangé aux carburants conventionnels. (www.bioethanolcarburant.com).

1.1.2.2. La deuxième génération de biocarburants

Les biocarburants de deuxième génération utilisent la lignocellulose contenue dans toutes les parois végétales. Il est ainsi possible de valoriser les résidus agricoles et forestiers (pailles, tiges, feuilles), les résidus de l'industrie papetière ou même des plantes dédiées à croissance rapide (miscanthus, peuplier…). Ces différentes ressources sont disponibles en grande quantité (Ballerini, 2011). La valorisation de cette lignocellulose étant plus complexe, elle fait intervenir plus d'étapes que pour les biocarburants de première génération et elle se répartit en deux filières :

- la **voie thermochimique** débute avec un traitement thermique permettant de déstructurer la biomasse qui sera ensuite gazéifiée. Le gaz de synthèse obtenu est purifié puis transformé en hydrocarbures de synthèse par la réaction de Fischer-Tropsch (Froment et al., 2004). L'inconvénient majeur de cette méthode est que la gazéification nécessite une

production importante de chaleur, ce qui contribue à dégrader le bilan énergétique de ce procédé,

- la **voie biochimique** fait intervenir quatre étapes : une première étape de prétraitement physico-chimique vise à rendre la cellulose et les hémicelluloses, principaux composants des parois végétales, accessibles à un cocktail enzymatique qui va, dans une seconde étape, les hydrolyser en monosaccharides de glucose. Enfin, les sucres libérés sont fermentés en éthanol qui sera concentré et purifié par distillation (Figure 2) (Margeot et al., 2009). Chacune des 4 étapes doit être optimisée et plus particulièrement l'étape d'hydrolyse enzymatique qui fait généralement intervenir les cellulases produites par un seul microorganisme : le champignon filamenteux *Trichoderma reesei*. Cette étape peut représenter à elle seule entre 15 et 30 % du coût total de production en fonction de la configuration des procédés choisis (quantité d'enzymes utilisée, hydrolyse et fermentation simultanées ou séquentielles...) (National Renewable Energy Laboratory, 1999; Lynd et al., 2005; Klein-Marcuschamer et al., 2012).

Leur production permettraient de réduire les émissions nettes de CO_2 de 70 % (Simbolotti, 2007).

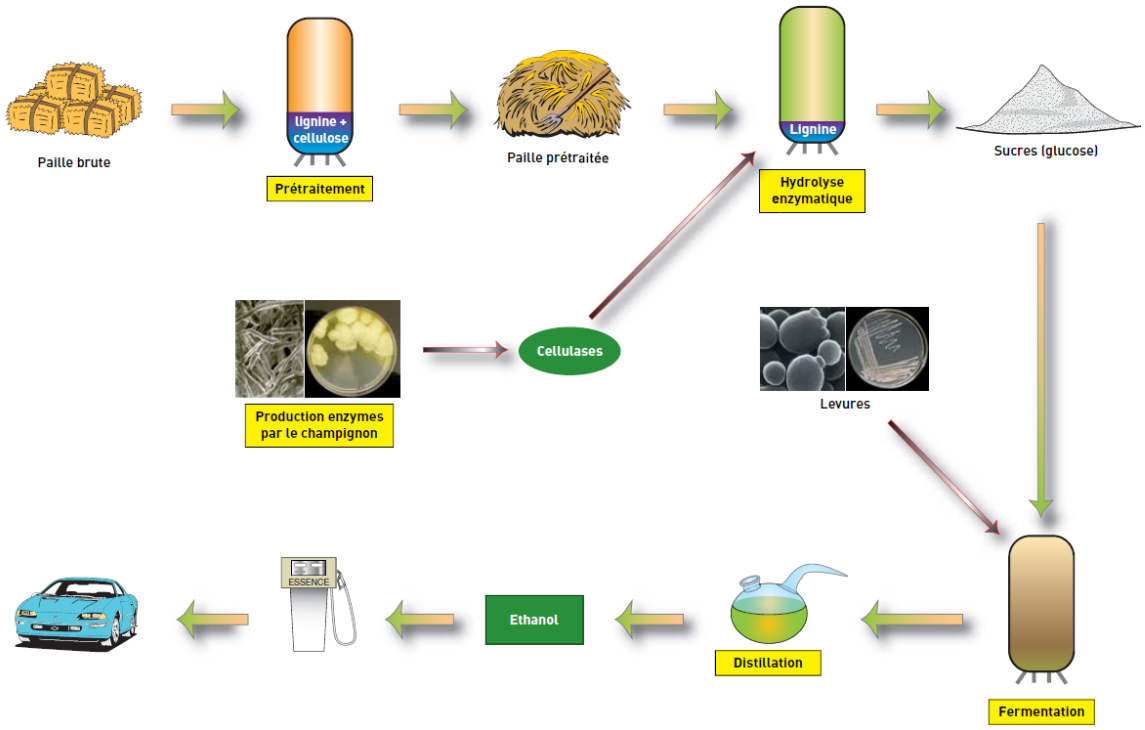


Figure 2 : Procédé de production d'éthanol de 2eme génération par la voie biochimique.
(IFP Énergies nouvelles).

De nombreux programmes de recherche dans le monde visent à lever les derniers verrous empêchant la commercialisation à prix compétitifs des biocarburants et avec les meilleurs bilans environnementaux possibles. Aujourd'hui, quelques unités préindustrielles utilisant la voie biochimique ont vu le jour aux États-Unis, au Brésil, et en Italie. En France, le projet Futurol

(http://www.projetfuturol.com/) vise à développer et à mettre sur le marché un procédé, des technologies et des produits (enzymes, levures) pour la production de bioéthanol par voie biochimique.

1.1.2.3. Troisième génération

Les biocarburants de 3eme génération, qui sont encore au stade de recherche en laboratoire, mettent en jeu des algues. En effet, les algues présentent de nombreux avantages : certaines d'entre elles produisent naturellement beaucoup d'huile (environ 80 % de la matière sèche, donc présentant des rendements en biocarburants potentiellement élevés), se développent en captant du CO_2 (ce qui permettrait de recycler les émissions de l'industrie), et ont une croissance plus rapide que les plantes terrestres en accaparant pas ou peu de surfaces agricoles. Si théoriquement, les biocarburants de troisième génération semblent prometteurs, les procédés de fabrications actuels présentent encore trop d'inconvénients. Les méthodes existantes d'extraction des huiles nécessitent des équipements coûteux et énergivores, et la culture en bassin à ciel ouvert nécessite par unité de production autant d'eau qu'une unité de blé ou coton. De plus, les algues ont besoin comme les plantes pour leur croissance de phosphore, d'azote et de potassium qui sont les composants majeurs des engrais agricoles, ce qui va avoir un impact sur ces approvisionnements déjà limités. Enfin, au vu des rendements d'extractions et des stratégies de cultures actuelles, pour pouvoir remplacer significativement les carburants conventionnels, la surface terrestre dédiée à leur culture risque d'occuper beaucoup plus d'espace que prévu (Hannon, Gimpel et al. 2010 - Biofuels from algae).

1.1.2.4. Conclusion

Le biocarburant de deuxième génération est, hormis celui de la première, la génération la plus proche du développement industriel et de la mise sur le marché. Actuellement, les biocarburants de deuxième génération produits par voie fermentaire sont ceux sur lesquels se porte l'intérêt des politiques et des scientifiques. Même si toutes les étapes de ce procédé doivent être optimisées, un effort particulier est porté sur l'étape d'hydrolyse enzymatique mettant en jeu les enzymes du champignon filamenteux *T. reesei*. Parmi les améliorations envisagées pour une diminution du coût de l'hydrolyse, l'ingénierie génétique de *T. reesei* est une solution. Elle permettrait d'obtenir un champignon produisant par exemple plus d'enzymes ou produisant des enzymes plus performantes. Même si le champignon filamenteux qui nous intéressera dans la suite de cet exposé est *T. reesei*, il est important de dresser un état de l'art des différentes stratégies d'amélioration de souches utilisées par les industriels.

1.2. Les champignons dans l'industrie et l'alimentation

1.2.1. L'utilisation des champignons dans l'industrie

Les champignons, du fait de leur capacité de biotransformation (processus consistant à réaliser une transformation chimique avec l'organisme lui-même ou à l'aide de ses enzymes purifiées) et de leur capacité à produire une extraordinaire palette de métabolites secondaires, sont utilisés à des fins industrielles et commerciales depuis de nombreuses décennies. Ainsi, les levures et certains champignons filamenteux jouent un rôle essentiel dans des domaines d'activité aussi divers que l'agriculture et des industries alimentaires et pharmaceutiques.

Dans l'agroalimentaire, pains à pâte levée, brioches, charcuteries et fromages n'existeraient pas sans ces organismes à fort potentiel de biotransformation. Le vin et la bière sont ainsi obtenus respectivement grâce à *Saccharomyces cerevisiae* (Figure 3A) ou *Saccharomyces carlsbergensis*, tandis que le saké est obtenu par la coopération entre le champignon filamenteux *Aspergillus oryzae* et la levure *S. cerevisiae*. Si la fabrication du fromage ne repose pas directement sur les capacités métaboliques des levures et champignons filamenteux, ces derniers contribuent à leurs qualités gustatives. Ils interviennent lors de l'étape d'affinage : la croûte blanche des camemberts et bries est obtenue par ensemencement de *Penicillium camenberti* (Figure 3B), tandis que les bleus (roquefort, gorgonzola, stilton) sont obtenus par ajout de *Penicillium roqueforti*. Quant aux saucissons, c'est le développement à leur surface de *Penicillium nalgiovense* qui leur confère leur robe blanche typique, leur texture et leur goût.

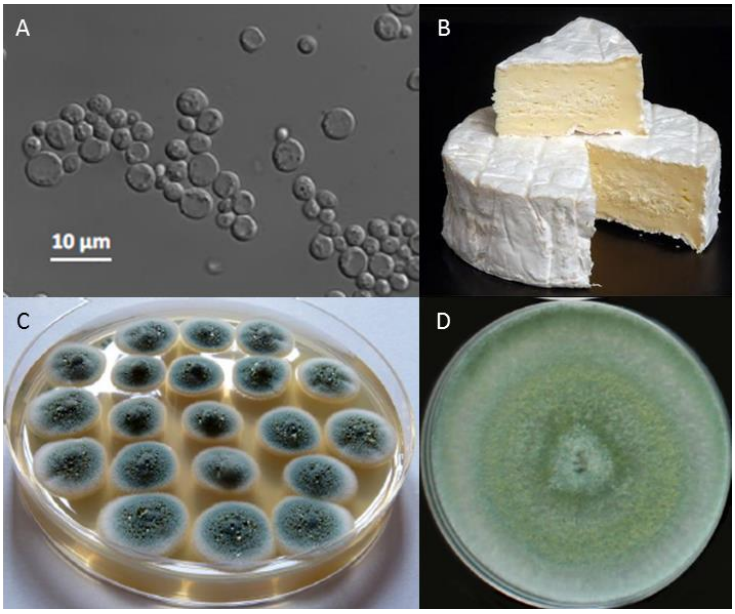


Figure 3 : Les champignons dans l'industrie.
S. cerevisiae (A), *P. camenberti* forme la croûte blanche du camembert (B), *P. chrysogenum* (C) et *T. harzianum* (D). (Photos A et C : Silar, 2016 ; Photo B : http://www.cheesewiki.com ; Photo D : Błaszczyk et al., 2014).

Dans le domaine pharmaceutique, l'exemple le plus célèbre est celui de la pénicilline produite par *Penicillium notatum* (aussi appelé *Penicillium chrysogenum* Figure 3C) et découvert par Alexander Fleming en 1928. D'autres molécules antibiotiques (céphalosporines), anticholestérolémiques (statines), immunosuppresseurs (cyclosporines), antifongiques, anticancéreux, alcaloïdes… sont sécrétées par des champignons filamenteux (Wenger, 1984; Manzoni and Rollini, 2002; Campos Muñiz et al., 2007; Mahmood et al., 2010; Schuster and Schmoll, 2010). À l'échelle industrielle, les souches productrices, dont le rendement métabolique aura préalablement été amélioré par sélection et/ou génie génétique, sont cultivées en fermenteurs. Les molécules d'intérêt, sécrétées dans le milieu de culture, peuvent alors être purifiées. Si les industriels exploitent d'abord les molécules naturellement produites par les champignons, ils s'en servent également pour produire des molécules provenant d'autres organismes. Par exemple, *S. cerevisiae* est utilisé pour produire de l'insuline humaine, des albumines et les antigènes nécessaires à la fabrication des vaccins contre l'hépatite B et les papillomavirus humains. *S. cerevisiae* sert ainsi d' « usine » pour l'expression de 20 % des protéines hétérologues du domaine des biopharmaceutiques (Nielsen, 2013).

D'autres secteurs industriels utilisent la capacité de biotransformation et la production des métabolites fongiques. Ainsi, les industriels piochent régulièrement dans le répertoire des acides organiques (acide citrique, acide lactique), des vitamines (riboflavine), des hormones (gibbérellines), des colorants, des arômes (arômes bananes ou noix de coco) et des enzymes (cellulases, amylases, phospholipases, protéases, hémicellulases…) produits. Le marché des enzymes vaut 3 milliards d'euros (http://www.novozymes.com) et l'Association des fabricants de produits enzymatiques de fermentation (Amfep - http://www.amfep.org/) répertorie plus de 70 enzymes. Les producteurs d'enzymes utilisées par les acteurs industriels du secteur des enzymes sont principalement sélectionnés parmi les espèces *Trichoderma* et *Aspergillus* (Paloheimo et al., 2016). Leurs enzymes peuvent être utilisées dans des procédés agro-alimentaires, dans l'alimentation animale et dans divers processus industriels tels que la production de bioéthanol, le traitement du papier et des pulpes, et des procédés de l'industrie textile (Tableau 1) (Paloheimo et al., 2016). Les cellulases de *T. reesei* sont utilisées pour produire du bioéthanol de deuxième génération (Kumar et al., 2008; Bischof et al., 2016) mais aussi dans les procédés de l'industrie textile (Paloheimo et al., 2016). Les amylases, les glucoamylases et les glucose isomérase sont par exemple utilisés pour augmenter la pureté et le rendement du glucose produit à partir d'amidon (Charnock and McCleary, 2005). Les xylanases sont utilisés pour le blanchiment du papier mais également comme additif dans la farine de blé pour améliorer la manipulation de la pâte et des produits cuits au four et en association avec la pectinase, et la cellulase participe à la clarification des jus de fruits (Beg et al., 2001).

Tableau 1 : Listes des enzymes fongiques
Cette liste est non exhaustive. Adapté de Charnock and McCleary, (2005) et Paloheimo et al., (2016).

Application	Enzymes
Conversion de l'amidon	Glucoamylases, amylases
Agro-alimentaire	Oxydoréductases, pectinases, protéases, cellulases
Alimentation animale	Phytases, protéases, xylanases
Traitement des pulpes et du papier	Oxydoréductases, phospholipases, xylanases
Industrie textile	Cellulases, oxydoréductases
Détergents	Oxydoréductases, lipases, cellulases
Biocarburant	Cellulases, beta-glucanases

Dans un tout autre domaine, les champignons filamenteux comme *Pleurotus ostreatus* sont capables de métaboliser un large spectre de composés toxiques comme par exemple des dérivés d'explosifs (Axtell et al., 2000) ou encore des dérivés du pétrole (Stamets, 2005) et sont donc utilisés à des fins de bioremédiation des sols contaminés. Enfin, les champignons peuvent servir d'agents de bio-contrôle comme *Trichoderma harzianum* (Figure 3D) (Verma et al., 2007) pour empêcher la prolifération des maladies du système racinaire des plantes ou encore comme *Beauveria bassiana* pour contrôler les populations de parasites tels que les charançons rouges du palmier (Dembilio et al., 2010) ou les moustiques (Scholte et al., 2004).

Au-delà de leur capacité de biotransformation et de production de molécules à haute valeur ajoutée, les champignons filamenteux sont faciles à manipuler et peu exigeants en nutriments. Ils peuvent être cultivés en grande quantité en bioréacteur et surtout sécrètent dans le milieu extérieur les métabolites (primaires ou secondaires) qu'ils produisent, ce qui facilite leur purification. Cependant, pour des raisons de rentabilité et de performance inhérentes à toutes industries, les champignons filamenteux, ne peuvent pas être utilisés tels qu'ils sont dans la nature, et sont donc souvent améliorés par génie génétique.

1.2.2. Les méthodes d'amélioration des souches fongiques

L'amélioration génétique vise à améliorer les voies métaboliques responsables de la production de composés d'intérêts (enzymes, antibiotiques…) pour améliorer leurs titres et/ou générer de nouveaux composés. Elle vise aussi à améliorer la maniabilité des souches, c'est-à-dire leur stabilité et leur comportement en bioréacteur, mais aussi de permettre la production des molécules d'intérêt à l'aide de substrats moins coûteux. La mutagénèse est une technique communément utilisée pour améliorer des souches et vise à introduire des mutations de façon volontaire dans l'ADN afin de créer des gènes génétiquement modifiés. Les mutations peuvent toucher les éléments régulateurs du gène ou son produit et peuvent engendrer des souches aux caractéristiques intéressantes d'un point de vue industriel. Il existe deux méthodes d'amélioration couramment utilisées chez les bactéries et champignons filamenteux : la mutagénèse aléatoire et l'ingénierie génétique.

1.2.2.1. La mutagénèse aléatoire

Les isolats naturels à l'origine des souches industrielles ont dans un premier temps été génétiquement améliorés par **mutagénèse aléatoire** qui consiste à générer aléatoirement dans l'ADN des mutations. Les modifications engendrées peuvent être des substitutions, insertions ou suppressions d'un ou plusieurs nucléotides, mais aussi des translocations de fragments d'ADN. Ces mutations sont provoquées par l'exposition de l'organisme cible à des agents mutagènes d'origine chimique ou physique tels que des agents alkylants (nitrosoguanidine et éthylméthylsulfonate) ou des rayons UV et rayons ionisants. La collection de mutants obtenue (quelques milliers d'individus) est alors sélectionnée pour un phénotype d'intérêt donné à l'aide d'un crible à petite échelle qui tente d'imiter les conditions de cultures réelles.

La mutagénèse aléatoire est relativement simple à mettre en œuvre, ne nécessite pas une connaissance approfondie de l'organisme à muter mais un crible adapté pour identifier le phénotype recherché. De plus, si elle intervient dans une souche qui n'a jamais été modifiée génétiquement, alors l'organisme généré n'est pas considéré comme OGM (organisme génétiquement modifié) selon l'article D531-2 du Code de l'Environnement français. Cette méthode efficace a permis d'obtenir la souche NRRL-1951 (CBS307.48) de *P. chrysogenum* qui produit 150 mg/L de pénicilline, soit 100 000 fois plus que la souche utilisée par Fleming, après une série de mutagénèses aléatoires (Kück and Böhm, 2013). De même, le meilleur producteur de cellulases du domaine public, la souche de *T. reesei* RutC30, a été obtenue après trois étapes de mutagénèses aléatoires (Peterson and Nevalainen, 2012).

Néanmoins, cette méthode présente quelques désavantages comme l'imprévisibilité du résultat obtenu, la difficulté à identifier la mutation responsable du caractère d'intérêt et la génération d'un grand nombre de mutations collatérales qui peuvent affaiblir la souche. Ainsi, la physiologie générale, le taux de croissance, les performances dans des procédés à grande échelle, etc du microorganisme muté peuvent être affectés. De surcroît, plusieurs tours de mutagénèses sont souvent nécessaires pour améliorer les microorganismes ce qui a pour conséquence d'augmenter le nombre de mutations collatérales. Bien qu'efficace, cette méthode ne peut donc pas être l'unique technique mise en œuvre pour l'amélioration des microorganismes.

1.2.2.2. L'ingénierie génétique

L'ingénierie génétique est un ensemble de techniques de manipulation des génomes qui permet de générer des organismes possédant de nouvelles caractéristiques. Ainsi, il est possible de contrôler l'expression des gènes à l'aide de promoteurs forts, d'augmenter le nombre de copies du gène

d'intérêt, d'invalider des gènes présentant des activités non désirées (facteur de transcription avec une activité répresseur ou protéases dégradant les protéines produites…), d'introduire des nouvelles propriétés ou encore d'améliorer les performances des protéines elles-mêmes. Les modifications souhaitées (substitutions, insertions ou suppressions) sont introduites de façon précise dans le génome de l'organisme étudié, par transformation génétique. Néanmoins, les organismes ainsi obtenus sont considérés comme des OGM.

La transformation des champignons se déroule en trois étapes. D'abord, il faut rendre le champignon compétent à recevoir l'ADN puis il faut introduire le matériel génétique à l'intérieur des noyaux des cellules devenues compétentes. Enfin, les cellules transformées sont sélectionnées afin de différencier parmi les nombreuses cellules compétentes utilisées celles qui ont été génétiquement modifiées. La transformation peut se faire dans un protoplaste, cellule dont la paroi a été préalablement digérée, ou dans des conidies. Trois techniques de pénétration d'ADN dans la cellule sont disponibles. Une méthode « universelle » qui est efficace chez de nombreux champignons filamenteux utilise du polyéthylène-glycol (PEG) qui perméabilise de façon temporaire et réversible la membrane plasmique des protoplastes et permet l'entrée de l'ADN dans la cellule. La perméabilisation de la membrane plasmique de protoplastes ou de la paroi de conidies par application d'un courant électrique ou électroporation est aussi couramment utilisée. La méthode du biolistique qui vise à bombarder des conidies intactes à l'aide de micro-projectiles d'or ou de tungstène enrobés de l'ADN recombinant, a été mise en place. Enfin, la méthode de transformation utilisant *Agrobacterium tumefaciens*, et son ADN-Ti (tumor inducing), présente de très bonnes fréquences de transformation. Ces méthodes sont utilisées avec succès chez *T. reesei*, *Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*… (de Groot, M J et al., 1998; Ruiz-Diez, 2002; Nevalainen and Te'o, 2004; Zeilinger, 2004).

La transformation de l'ADN recombinant nécessite l'utilisation de marqueurs de sélection, comme les marqueurs d'auxotrophie (*pyr4*, *ade2*…) ou de résistance aux antibiotiques (*hph*, *ble*, *amds*…). Le gène d'intérêt peut être sur le même vecteur que le marqueur de sélection ou il peut être co-transformé avec lui. Cependant, comme la majorité des marqueurs de sélection sont des gènes de résistance à des antibiotiques, une dissémination des OGM dans la nature pourrait entrainer des transferts de leurs gènes de résistance à des organismes de l'environnement, créant ainsi des organismes résistants aux antibiotiques. Ainsi, en vertu du principe de précaution, il est préférable qu'une souche industrielle utilisée à grande échelle soit dépourvue de marqueurs de résistance aux antibiotiques, ce qui nécessite de s'en débarrasser après la génération de souches améliorées. D'autre part, leur nombre étant limité, des systèmes permettant leur recyclage après transformation ont été développés.

Le gène *pyr4* de *T. reesei*, codant une orotidine 5'-monophosphate carboxylase (OMP), est utilisé comme marqueur bidirectionnelle de sélection. Les souches mutées dans ce gène sont auxotrophes

pour l'uracile mais prototrophes et résistantes à l'acide 5-fluoroorotique (5'FOA) qui est converti par l'OMP en un intermédiaire toxique (Hartl and Seiboth, 2005). Les souches auxotrophes à l'uracile qui intègrent le marqueur de sélection *pyr4* dans leur génome deviennent prototrophes à l'uracile et sont capables de pousser sur un milieu minimum contenant de l'uracile (Figure 4A). Suite à la transformation, ce marqueur peut être recyclé grâce à la recombinaison homologue lorsque deux sites répétés bordant le gène *pyr4* ont été intégrés dans la cassette. Les clones dont le marqueur de sélection *pyr4* a été éliminé, sont sélectionnés par culture sur un milieu contenant le 5-FOA et pour leur auxotrophie à l'uridine (Figure 4B) (Hartl and Seiboth, 2005). L'utilisation d'un marqueur bi-directionnel permet d'avoir un crible de sélection à la fois lors de la transformation et lors de l'étape de recyclage.

Une méthode alternative de recyclage s'inspirant du système de recombinaison Cre/loxP du bactériophage P1 (Thomson and Ow, 2006) a également été mise en place chez *T. reesei*. Dans ce type de cassette, le gène de résistance bi-directionnel est bordé par deux sites loxP. Lorsque la recombinase Cre, qui a été co-introduite avec la cassette de sélection, est induite, elle catalyse la recombinaison homologue entre les deux sites loxP. Dans le cas d'une cassette Cre/loxP portant le marqueur *pyr4*, l'excision sera sélectionnée sur milieu 5-FOA en s'assurant de l'auxotrophie à l'uracile des transformants (Figure 4C) (Seidl and Seiboth, 2014).

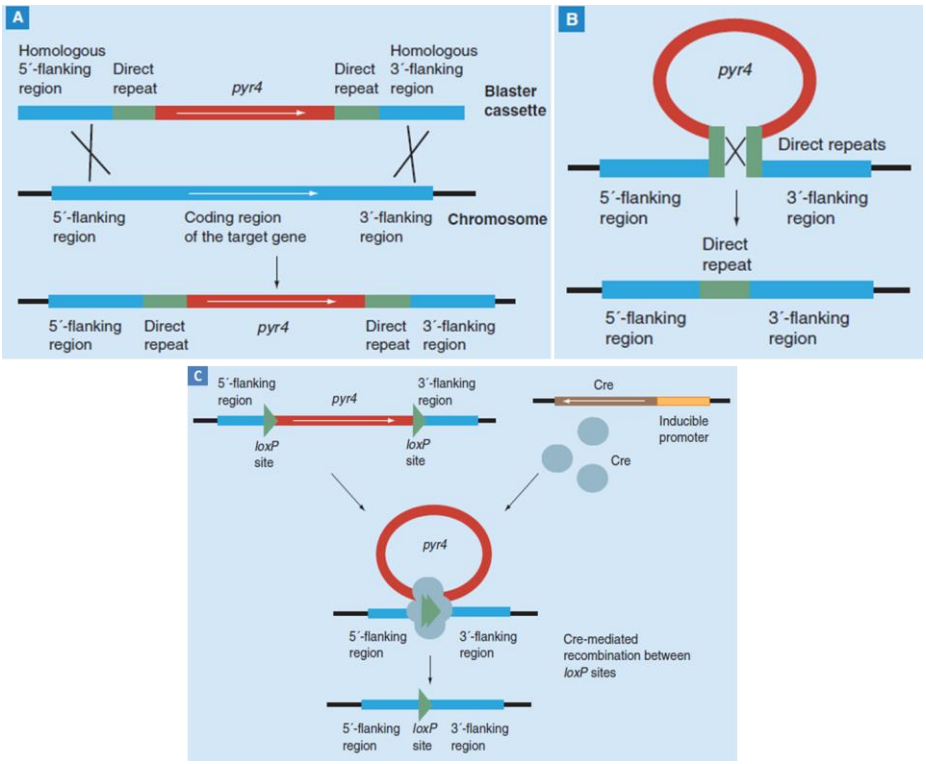


Figure 4 : Systèmes de recyclage des marqueurs de sélection.
La cassette recyclable est composée du marqueur *pyr4* qui est bordé de deux séquences répétées. Lors d'une invalidation, cette cassette va remplacer dans le gène cible par recombinaison homologue rendant le champignon prototrophe à l'uridine **(A).** Pour exciser le marqueur de sélection, la souche est cultivée en présence de 5-FOA et d'uridine. La recombinaison homologue entre les deux sites répétés permet d'éliminer le marqueur **(B).** Dans le système de recombinaison Cre/*loxP*, le marqueur de sélection est bordé de deux sites *loxP*. Lorsque la recombinase Cre est induite, un dimère Cre se forme au niveau de chaque site *loxP* et induit une recombinaison des deux sites. Le succès de l'excision de *pyr4*, rend la souche auxotrophe à l'uridine **(C)** (Seidl and Seiboth, 2014).

L'intégration de l'ADN en ingénierie génétique, repose sur les mécanismes de réparation homologue et non homologue de l'ADN qui permettent soit une intégration à un locus précis soit une intégration ectopique de l'ADN. La voie de réparation homologue (HR) repose sur l'action des protéines RAD52 qui permettent l'interaction entre les séquences d'ADN homologues (Shrivastav et al., 2008). Cette voie est en compétition avec la voie de recombinaison non homologue qui repose sur l'action de l'hétérodimère Ku70/Ku80 et la ligase IV-Xrcc4. Ce dernier mécanisme est conservé chez les eucaryotes et est favorisé chez les champignons filamenteux (Krogh and Symington, 2004; Ninomiya et al., 2004). Lorsqu'on souhaite complémenter une mutation ou surexprimer un gène, l'intégration ectopique de l'ADN est généralement favorisée mais peut également se faire à un locus précis. Par contre, l'invalidation d'un gène ne peut se faire que par remplacement du gène natif par la cassette d'invalidation et nécessite donc l'utilisation de la voie HR. Pour favoriser l'intégration *in situ*, il faut abolir la voie du NHEJ par l'invalidation des gènes *ku70* ou *mus53*. Des souches invalidées pour cette voie sont disponibles pour différents champignons et présentent une fréquence de recombinaison homologue proche de 100 % (Krappmann, 2007). Cependant, son abolition peut engendrer une hypersensibilité aux UV et une dégénérescence sur le long terme des souches modifiées (Guangtao et al., 2009). Afin de minimiser l'impact de la lésion génétique que représente

l'invalidation du complexe *ku,* il est préférable de restaurer la voie NHEJ. Cela peut se faire soit en réintroduisant par transformation le gène sauvage invalidé, mais cela nécessite l'utilisation d'un nouveau marqueur de sélection, soit en éliminant l'invalidation par la reproduction sexuée.

Enfin, l'ingénierie génétique des champignons filamenteux peut s'appuyer sur l'édition de génome (*genome editing*) qui utilise les ciseaux moléculaires que sont les nucléases, pour insérer, remplacer et supprimer un fragment d'ADN du génome. La technique de génie génétique CRISPR/Cas9 est une technique qui permet de modifier précisément le génome de n'importe quel type de cellules (bactéries, végétaux, champignons, animaux). À l'origine, il s'agit d'un système de défense immunitaire qui empêche l'invasion de bactéries par des phages et virus. La séquence CRISPR est une région de l'ADN bactérien contenant de courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées – « *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* », qui correspondent en fait à de petits morceaux d'ADN étranger qui, intégrés dans le génome, confèrent une résistance aux phages et virus. Comme toute séquence d'ADN, la séquence CRISPR est transcrite en ARN qui va aller se fixer à l'endonucléase Cas9. Si le complexe ARN/Cas9 rencontre l'ADN viral complémentaire à l'ARN produit, il s'y fixe et Cas9 clive l'ADN étranger. En génie génétique, l'ADN étranger est remplacé par un ARN guide qui cible le gène à couper et un ADN contenant les mutations souhaitées va servir de matrice de réparation de la cassure qui mettra en jeu le système de réparation homologue de la cellule (Doudna and Charpentier, 2014). Ainsi, la séquence d'ADN d'intérêt sera intégrée dans le génome au site désiré. Cette méthodologie mise en place en 2014 chez *E. coli* (Doudna and Charpentier, 2014) commence à être appliquée chez les champignons filamenteux comme *Aspergillus aculeatus, Aspergillus nidulans, Ustilago maydis, T. reesei* (Liu et al., 2015; Nødvig et al., 2015; Schuster et al., 2016; Zhang et al., 2016).

1.2.2.3. Conclusion

Les techniques communément utilisées pour l'amélioration des souches fongiques possèdent toutes des avantages et des inconvénients qui sont résumés dans le Tableau 2. Une autre méthode d'amélioration envisageable mais qui n'a pas été mentionnée ici est la reproduction sexuée. Elle est en effet peu ou pas utilisée car de nombreuses espèces fongiques industrielles sont considérées comme asexuelles et se multiplient exclusivement de façon clonale.

Tableau 2: Récapitulatif des avantages et inconvénients des différentes techniques d'amélioration de souche.

Méthodes d'amélioration	Avantages	Inconvénients
Mutagénèse aléatoire	Mise en œuvre simple Pas besoin de connaissances du génome de l'organisme Ne sont pas des OGM	Génère des mutations collatérales Identification difficile des mutations causatives du phénotype d'intérêt Nécessite un crible adapté Criblage de très nombreux mutants
Ingénierie génétique	Mutations bien identifiées Criblage de peu de mutants	Connaissance du génome de l'organisme à améliorer Mise en œuvre chronophage Nécessite des marqueurs de sélection OGM Voie de réparation NHEJ Introduire le transgène dans la cellule

1.2.3. La reproduction sexuée

1.2.3.1. Reproduction sexuée et multiplication clonale

Dans la nature, de nombreux champignons alternent entre reproduction asexuée et reproduction sexuée. La reproduction asexuée, ou multiplication végétative, se base sur le phénomène de mitose et permet de générer rapidement un grand nombre de descendants possédant le même patrimoine génétique que le parent et entre eux. A l'inverse, la reproduction sexuée permet, grâce à la fusion des gamètes de deux parents génétiquement différents et au phénomène de méiose, d'obtenir des descendants présentant une diversité génétique (Tableau 3).

Approximativement 20% des espèces connues de champignons sont définies comme asexuelles (Dyer and Kück, 2017). Pourtant, la majorité des champignons filamenteux utilisés à des fins industrielles ont longtemps été considérés comme asexués. Toutefois, une absence de reproduction sexuée peut signifier que les conditions d'observation du cycle sexuel n'ont pas été identifiés ou que le partenaire sexuel compatible n'est pas présent (Dyer and O'Gorman, 2012). Enfin, comme les champignons filamenteux peuvent produire des structures de reproduction asexuée et sexuée aux morphologies très différentes, le même organisme peut avoir été décrit par les mycologues sous deux noms différents. Le champignon sous sa forme sexuée est appelée téléomorphe tandis que la forme asexuée porte le nom d'anamorphe.

Il a fallu attendre le milieu des années 1990 et l'avènement du séquençage et de l'analyse génomique, pour démontrer que les organismes dits anamorphes, également appelés *fungi imperfecti*, présentaient des signes de recombinaison sexuelle et possédaient les gènes nécessaires à la reproduction sexuée (Kück and Pöggeler, 2009; Billiard et al., 2012; Kück and Böhm, 2013).

Lors de la reproduction asexuée, la réplication de l'ADN doit être hautement fidèle afin de permettre le maintien du patrimoine génétique sur de nombreuses générations. Bien que le taux d'erreur de réplication de l'ADN polymérase soit très faible, des erreurs peuvent subsister (Kunkel, 2004). Ces « erreurs » constituent des variations génétiques qui sont à l'origine de l'évolution des espèces. Ainsi, dire que la reproduction asexuée est purement clonale et permet de conserver le patrimoine génétique, n'est pas totalement exact. Grace à ces erreurs, l'adaptation d'une population asexuelle à un environnement nouveau peut être très rapide si une mutation favorable apparaît et envahit la population. Cependant, l'accumulation de certaines variations génétiques peut conduire à l'apparition et l'accumulation de mutations délétères pouvant entraîner la mort de l'individu. Le basculement vers la reproduction sexuée permet de ramener les mutations à leur état d'origine quasiment systématiquement (Lehtonen et al., 2012; Heitman et al., 2013).

Tableau 3 : Comparaison entre la reproduction sexuée et la multiplication clonale

La reproduction sexuée nécessite de l'énergie pour trouver un partenaire sexuel puis pour effectuer la méiose qui nécessite plus d'énergie que la mitose (a), alors que la multiplication végétative ne nécessite pas d'interagir avec un partenaire sexuel et qu'il n'y a pas de méiose (b). La diversité est stable s'il y a une distribution aléatoire des allèles de gènes et elle est augmentée s'il y a des associations préférentielles entre les allèles (c). La diversité est stable s'il n'y a pas de sélection, mais elle est diminuée s'il y a une expansion clonale (d). Chez les champignons, la méiose peut générer des spores capables de résister à des conditions environnementales rudes et d'être plus efficacement dispersées (e). L'adaptation d'une population provenant de la multiplication végétative peut être efficace s'il existe un génotype favorable et qu'il se répand dans la population (f). D'après Heitman et al., (2013).

	Reproduction sexuée	**Multiplication végétative**
Cout énergétique	Élevé (a)	Faible (b)
Niveau de recombinaison	Élevé	Faible
Diversité génétique	Stable ou augmentée	Stable ou diminuée (d)
Adaptation à un environnement changeant/fluctuant	Rapide (e)	Lente (f)
Purge des mutations délétères	Efficace	Peu efficace
Sélection des mutations bénéfiques	Efficace	Peu efficace

La reproduction sexuée nécessite deux parents pour produire une descendance, à laquelle, seulement 50 % du patrimoine génétique de chaque parent sont transmis alors que la reproduction asexuée ne nécessite qu'un parent qui produit un descendant à qui 100 % de son patrimoine génétique sont transmis (Lehtonen et al., 2012; Heitman et al., 2013). D'autre part, elle permet d'obtenir de très nombreux descendants rapidement et à un faible cout énergétique (Heitman et al., 2013). En effet, tous les individus de la population sont capables de se multiplier et, ne gaspillent pas d'énergie à trouver un partenaire et à fabriquer les structures nécessaires à la reproduction sexuée (Lehtonen et al., 2012). A l'inverse, bien que la reproduction sexuée soit importante pour l'évolution et le maintien des espèces, elle a un coût considérable. Elle requiert de l'énergie et du temps pour trouver le partenaire adéquat, pour réaliser les trois étapes nécessaires à l'accomplissement de la reproduction sexuée, à savoir, la

réunion des gamètes, la caryogamie et la méiose, et pour fabriquer les structures qui contiendront la descendance (Lehtonen et al., 2012). La méiose a un coût énergétique supérieur à celui de la mitose notamment parce qu'il y a deux étapes de division au lieu d'une seule. Dans la nature, si un individu possède un génotype adapté à une niche écologique, la reproduction asexuée va lui permettre de la coloniser par expansion clonale et d'évincer d'éventuels compétiteurs. Cependant, en cas de fluctuations environnementales rapides, ces individus ne seraient plus adaptés au milieu et pourraient disparaître sauf s'ils réussissent à faire évoluer rapidement leur information génétique en enclenchant une reproduction sexuée (Holmström and Jensen, 2004) qui va produire une diversité de descendants parmi lesquels certains seront en mesure de faire face à la pression de sélection de leur environnement.

La reproduction sexuée est gouvernée par les gènes du type sexuel qui assure la compatibilité entre les partenaires mis en jeu. Pour certains champignons, la reproduction sexuée ne peut avoir lieu qu'entre individus possédant des allèles opposés du type sexuel : c'est l'hétérothallisme. Inversement, d'autres champignons sont considérés comme homothalliques, c'est-à-dire, que la compatibilité sexuelle ne requiert pas de différence génétique notamment car ces espèces possèdent dans leur génome les différents allèles du type sexuel. Chez les individus hétérothalliques, dès lors que les types sexuels sont compatibles la reproduction sexuée peut survenir selon deux stratégies qui sont l'autogamie (selfing ou intratetrad mating) ou l'allogamie (outcrossing) comme présenté Figure 5 (Giraud et al., 2008). Le selfing ou l'intratetrad mating ont lieu entre individus génétiquement identiques (sauf au niveau du type sexuel) mais issus d'événements méiotiques différents (Figure 5) tandis que l'outcrossing se fait entre individus génétiquement différents. Les homothalliques en plus d'être capables de faire du selfing, de l'intratetrad mating et de l'outcrossing sont également capables de se reproduire avec un individu issu du même événement méiotique (**Intra-haploid mating** dans la Figure 5) (Giraud et al., 2008).

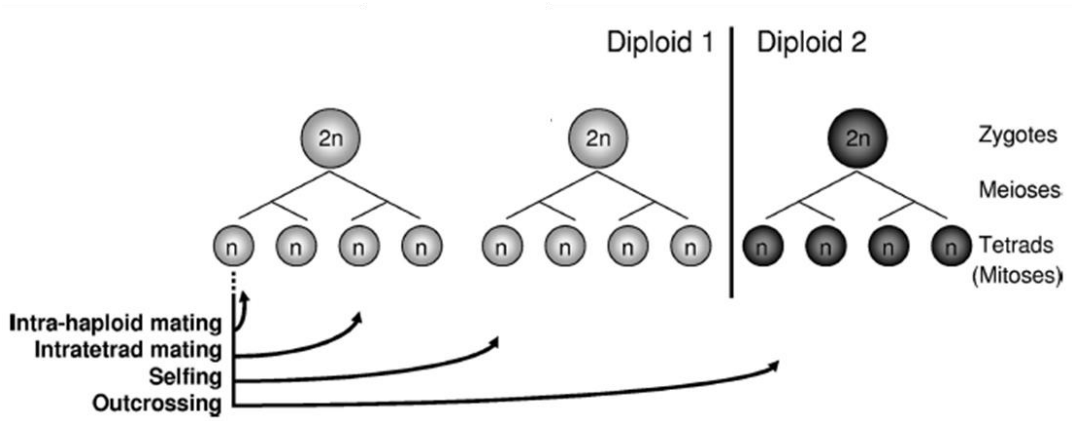


Figure 5 : Les différentes stratégies de croisements de descendants issus de la méiose de deux génotypes diploïdes
Sont représentés les produits de deux méioses. Les différents modes de reproduction sexuée sont indiqués par les flèches provenant de l'individu de l'extrémité de gauche. L'intra-haploid mating qui est caractéristique des espèces homothalliques se fait entre individus issus d'un même évènement méiotique tandis que l'intratetrad mating implique les descendants de deux produits méiotiques différents au sein d'une même tétrade. Le selfing se fait entre individus de même génotype mais issus d'asque différent. L'outcrossing a lieu entre individus de génotype différent. (Giraud et al., 2008).

D'un point de vue génomique, la stratégie de reproduction choisie a un impact sur son évolution. Chez les souches asexuelles ou celles qui subissent un haut degré d'autogamie, le faible taux de recombinaison favorise l'homozygotie, l'accumulation de mutations récessives délétères et peut avoir un impact défavorable sur la valeur sélective ou fitness de l'individu (Charlesworth and Charlesworth; Keller and Waller, 2002). La théorie veut donc que les souches asexuées ou hautement autogames soient des culs-de-sac évolutifs (Takebayi and Morrell, 2001). La stratégie d'outcrossing, quant à elle, devrait permettre d'empêcher l'extinction des espèces. En effet, l'allogamie présente tous les bénéfices que confère la reproduction sexuée, à savoir, l'élimination des mutations délétères, la création de diversité génétique, l'augmentation de la vigueur des descendants par rapport aux parents grâce à l'hétérosis… (Ingvarsson, 2001)

1.2.3.2. Reproduction sexuée : un outil d'amélioration et de génétique

La reproduction sexuée est la méthode la plus répandue pour l'amélioration des animaux et des végétaux et comme il s'agit d'un processus naturel, les descendants obtenus par ce biais ne sont pas soumis aux mêmes obligations de traçabilité que les OGM obtenus par ingénierie génétique et ils sont mieux acceptés par les utilisateurs et consommateurs. Enfin, la reproduction sexuée peut être utilisée chez les organismes pour lesquels la manipulation génétique n'est pas possible.

La découverte d'une sexualité chez certains champignons industriels tels que, *Aspergillus flavus* (Horn et al., 2009), *Aspergillus tubingensis* (Horn et al., 2013), *Penicillium chrysogenum* (Hoff et al., 2008), *Penicillium roqueforti* (Ropars et al., 2012), *Rhizopus oryzae* (Gryganskyi et al., 2010) et *T. reesei* (Seidl et al., 2009) ouvre de nouvelles possibilités en termes d'amélioration génétique de ces souches.

Ainsi, dans le cadre de l'amélioration de souches industrielles, la reproduction sexuée permettrait de croiser des souches présentant des caractères d'intérêt afin de sélectionner parmi la descendance les individus les combinant. Par exemple, une souche industrielle produisant un métabolite secondaire important mais possédant une vitesse de croissance faible pourra être croisée avec une souche produisant peu de métabolites secondaires mais présentant une forte croissance (Figure 6A). La descendance générée sera alors criblée pour sa forte production de métabolites secondaires et pour une meilleure vitesse de croissance. La reproduction sexuée comme moyen d'amélioration est déjà utilisée en routine chez la levure *S. cerevisiae* (Marullo et al., 2006; Marullo et al., 2009). La levure est sensible à l'élévation de la température au cours de la fermentation du vin rouge, ce qui peut entrainer un arrêt du processus. Le croisement entre deux souches commerciales, l'une thermosensible et l'autre thermorésistante a permis d'obtenir des souches à la fois thermorésistantes et efficaces pour la fermentation alcoolique (Marullo et al., 2009). Chez les champignons filamenteux, une amélioration

réussie des performantes a été démontrée chez *P. chrysogenum* (Böhm et al., 2013) entre la souche Q176 et IB 08/921. La souche Q176, bien que produisant un fort titre de pénicilline, fabrique un pigment jaune appelé chrysogénine. Inversement, la souche IB 08/921 sécrète très peu de pénicilline et pas de chrysogénine. Le croisement de type allogame a généré des descendants présentant diverses associations des caractéristiques parentales, dont la souche AS 1-2-54 produisant un fort titre de pénicilline et pas de chrysogénine (Böhm et al., 2013; Böhm et al., 2015). Ce croisement a permis d'améliorer la maniabilité de la souche puisque l'élimination de la chrysogénine améliore la purification de la pénicilline.

En plus de permettre la combinaison des caractéristiques parentales, la recombinaison au cours du cycle de reproduction sexuée peut générer des descendants possédant des effets bénéfiques inattendus. Ce phénomène est connu sous le nom de « ségrégation transgressive » (Rieseberg et al., 1999). Chez *A. flavus*, la reproduction sexuée a généré le descendant IC2193 qui est capable de produire quatre fois plus d'aflatoxine que la meilleure souche parentale IC278 (Olarte et al., 2012).

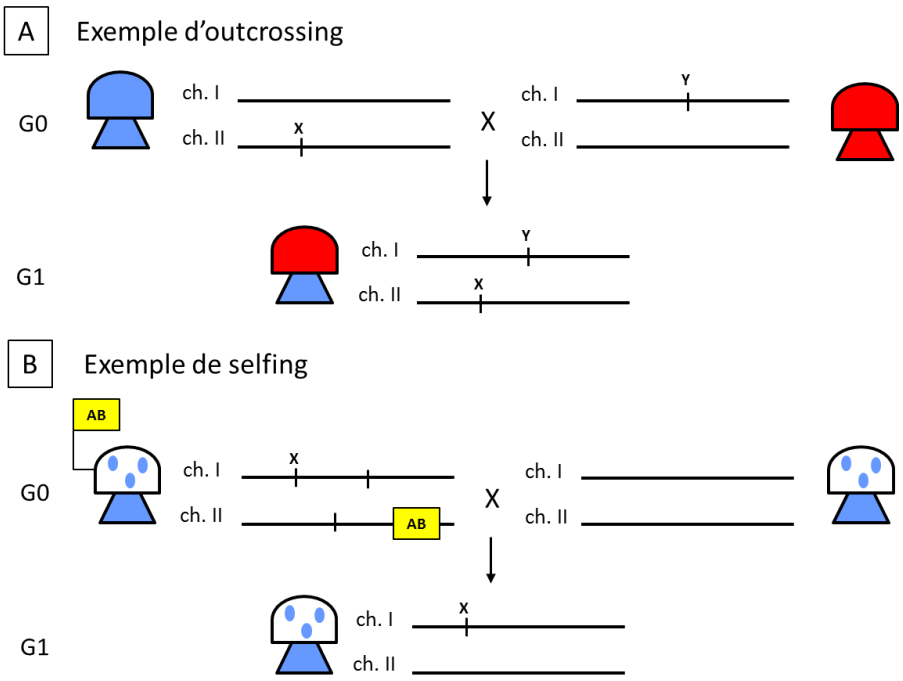


Figure 6 : Exemples d'amélioration génétique par reproduction sexuée.
Exemple d'outcrossing où le croisement entre deux souches génétiquement différentes permet de générer des descendants dont certains possèdent les caractéristiques intéressantes des parents (A). Exemple de selfing entre une souche générée par mutagénèse aléatoire et ingénierie génétique et sa souche parente. Ce croisement va permettre d'éliminer le marqueur de sélection et des mutations collatérales (B). Marqueur de sélection antibiotique (AB) par reproduction sexuée. X et Y représentent 2 mutations d'intérêts. ch. I = chromosome I ; ch II = chromosome II ; G0 = génération zéro ; G1 = génération un.

Par ailleurs, la reproduction sexuée avec une souche sauvage permettrait d'éliminer les marqueurs de sélection et les mutations collatérales issus de l'amélioration par ingénierie génétique et les mutagénèses aléatoires à l'origine des souches industrielles (Figure 6B).

La reproduction sexuée est aussi un outil de génétique classique important. Elle permet d'identifier les bases génétiques de phénotypes d'intérêt. Ainsi, associée à de la cartographie de gènes, de l'analyse de ségrégation en mélange (Bulk Segregant Analysis : BSA) ou de l'analyse de locus de caractères quantitatifs (LCQ ou QTL), elle permet de vérifier la fonction d'un gène ou encore d'identifier des gènes d'intérêt (Ashton and Dyer, 2016). Chez le champignon *Botrytis cinerea*, la reproduction sexuée a permis d'identifier le gène responsable de la résistance aux antifongiques (Kretschmer et al., 2009). Trois souches de *B. cinerea*, respectivement MDR1, MDR2 et MDR3, présentent un phénotype de multirésistance différent. Grace à la technique du clonage positionnel, il été déterminé que les phénotypes observés chez les individus MDR1 et MDR2 avaient pour origine deux loci et que le croisement entre ces deux individus pouvait mener à la production d'individus MDR3 via la recombinaison génétique.

La reproduction sexuée est utile lors des études de complémentation de gènes. Lorsque des ADN recombinants porteur de mutations sont transformés et des invalidations de gènes sont faites, il faut que la souche mutée soit complémentée avec le gène original afin d'en démontrer la restauration et par la même occasion confirmer la fonction du gène. Cette tâche peut être rendue difficile par l'absence de multiples marqueurs de sélection ou peut être plus longue et fastidieuse qu'un croisement. En croisant la souche invalidée avec une souche complémentée avec le gène sauvage, si une corrélation peut être établie entre la présence du gène sauvage et la restauration du phénotype sauvage dans la descendance, alors l'implication du gène est confortée (Schmoll and Dattenböck, 2016).

Enfin, parfois il est nécessaire de générer des souches porteuses de multiples invalidations pour démontrer la fonction ou l'effet synergique de ces gènes. La manipulation génétique peut être utilisée mais peut poser problème si le nombre de gènes à invalider successivement est trop grand. La reproduction sexuée peut alors être une alternative : il suffit de croiser les souches complémentaires contenant les invalidations d'intérêt. La descendance obtenue est alors criblée pour identifier ceux qui possèdent la combinaison d'invalidations désirée. L'usage de la reproduction sexuée comme outil de génétique classique est appliqué avec succès chez les champignons modèles tels que *P. anserina, A. nidulans, N. crassa* (Todd et al., 2007). Elle a permis de générer chez *P. anserina* un sextuple mutant pour les facteurs de transcription à homéodomaine (Coppin et al., 2012).

Ces croisements doivent idéalement être entrepris entre souches génétiquement similaires afin de limiter les effets dus aux interactions génétiques (Ashton and Dyer, 2016). La combinaison de caractéristiques d'intérêt via la reproduction sexuée entre souches industrielles va se heurter à la difficulté de trouver des partenaires de croisement possédant des caryotypes compatibles. En effet, les traitements mutagènes sévères qui ont permis l'obtention de ces souches ont parfois généré des réarrangements chromosomiques importants. Or il a été démontré que l'hétérogénéité des

chromosomes pouvait conduire à une réduction de la viabilité de la descendance obtenue ou à une stérilité totale. Notamment des expériences de reproduction sexuée entre différents isolats géographiques de *Neurospora tetrasperma*, présentant des caryotypes différents, ont généré des croisements totalement stériles ou une descendance à la viabilité diminuée (Jacobson, 1995; Poggeler et al., 2000). Des résultats similaires ont été obtenus chez *P. chrysogenum* et chez *P. roqueforti*, confirmant que l'homogénéité des chromosomes parentaux contribue au succès de l'événement de reproduction sexuée (Ropars et al., 2016).

1.2.4. Le cycle parasexuel et la fusion de protoplastes

Le cycle parasexuel est une stratégie employée par les champignons sans cycle sexuel ou en possédant un très lent pour échanger de l'information génétique, générer de nouvelles associations alléliques et donc accroître la biodiversité. Le cycle parasexuel a été mis en évidence chez de nombreux champignons dont *A. nidulans, P. roqueforti, M. oryzae*… (Pontecorvo, 1956; Durand et al., 1992; Zeigler et al., 1997). Il consiste en trois étapes : l'hétérocaryotisation (formation d'un mycélium hétérocaryotique), la diploïdisation (fusion des noyaux) avec une recombinaison par crossing-over mitotique et enfin l'haploïdisation (formation de descendants haploïdes) (Figure 7). Le cycle parasexuel est initié par la fusion (ou anastomose) des hyphes. Ce processus naturel présente les mêmes étapes que celles qui ont lieu lorsque deux protoplastes fusionnent. La fusion des protoplastes peut avoir lieu spontanément mais est généralement induite par l'ajout de PEG et est utilisée pour obtenir des souches améliorées. La fusion de protoplastes de deux mutants auxotrophes de l'agent de bio-contrôle *Trichoderma harzianum* Rifai (ATCC 32173) peut générer des souches de type non parentale et prototrophe. Le pouvoir antagoniste de ces nouvelles souches vis-à-vis de pathogènes des sols a été testé : une des souches prototrophes a poussé plus rapidement que les souches parentales et a surpassé tous les champignons pathogènes, contrôlant ainsi efficacement la maladie fongique induite par *Rhizoctonia* (Pe'er and Chet, 1990). La fusion des protoplastes présente l'avantage de pouvoir contourner l'incompatibilité végétative (Dales and Croft, 1977) qui conduit à la destruction programmée de l'hétérocaryon formé par deux souches incompatibles (Bégueret et al., 1994).

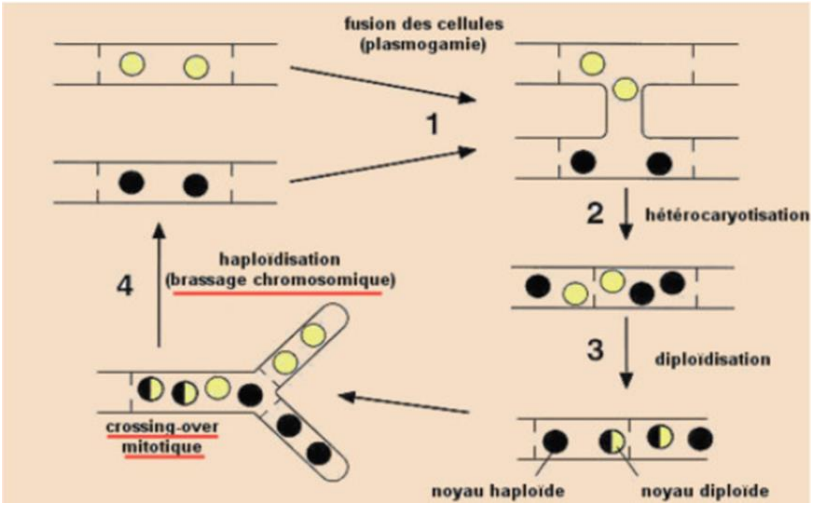


Figure 7 : Représentation schématique d'un cycle parasexuel chez un champignon filamenteux.
Deux mycéliums haploïdes fusionnent (1), puis après plasmogamie l'échange de noyaux aboutit à la formation d'un mycélium hétérocaryotique (2). Des événements de fusions entre les deux types de noyaux peuvent survenir, aboutissant alors à la formation de noyaux diploïdes hétérozygotes (3). Il s'en suit une étape de crossing-over mitotique consistant en une recombinaison intrachromosomique suivie d'une étape d'haploïdisation (4) qui conduit à la formation de plusieurs descendants haploïdes. Tiré de la thèse d'Anne Goarin, 2011.

1.3. Le champignon *Trichoderma reesei*

1.3.1. Origines, taxonomie et écologie

La première description d'un spécimen du genre *Trichoderma* remonte à 1794 (Persoon, 1794). Un lien avec leurs téléomorphes *Hypocrea* a été suggéré quelques décennies plus tard (Tulasne et al., 1861), mais il faudra attendre les années 1990, avec l'établissement de profils génétiques (PCR fingerprinting) et l'analyse de leurs ADN ribosomaux (ITS1, ITS2, gène 5.8S) pour en avoir la confirmation (Kuhls et al., 1996). Le potentiel de ces champignons en tant que producteurs d'antibiotiques, d'antifongiques (pyridone, trichodine, pyridoxatine ; Wu et al., 2014), agents de biocontrôle (*T. harzianum, T. atroviride, T. asperellum* ; Zeilinger and Omann, 2007), producteurs d'enzymes cellulolytiques (Mandels and Reese, 1957) n'a été découvert qu'au milieu du 20^{e} siècle. Récemment, *T. longibrachiatum* a été reconnu comme pathogène opportuniste de mammifères immunodéprimés dont les humains (Kredics et al., 2003).

Les champignons du genre *Trichoderma* font partie des saprophytes les plus communément isolés. Ils sont fréquemment retrouvés dans les sols, sur les bois en décomposition, sur d'autres champignons et sur d'innombrables autres substrats dans de nombreuses zones géographiques (aussi bien tempérées que tropicales) et systèmes écologiques, démontrant ainsi leur caractère opportuniste et leur grande adaptabilité (Druzhinina et al., 2011). De nombreuses espèces de *Trichoderma* ont été découvertes et la Sous-commission internationale de taxonomie des *Trichoderma* et *Hyprocrea* (ISTH : http://www.isth.info/biodiversity/index.php) répertorie 104 espèces caractérisées au niveau

moléculaire qui sont réparties en cinq sections. D'un point de vue morphologique, les espèces du genre *Trichoderma* se caractérisent par leur croissance rapide, leur production abondante de conidies portées par des conidiophores embranchés et la capacité à produire des stromata (Gams and Bissett, 1998; Błaszczyk et al., 2014). Ces souches produisent des pigments allant du jaune au rouge, bien que certains spécimens incolores existent également. Les conidies peuvent également avoir une coloration variée allant de l'incolore à diverses teintes de vert voire de gris ou marron.

Trichoderma reesei (Tableau 4) est un champignon filamenteux isolé dans les Iles Salomon durant la Seconde Guerre Mondiale alors que ce dernier dégradait rapidement les équipements en coton de l'armée américaine. Face à ce problème, le corps des intendants militaires a mis en place un programme d'étude visant à identifier l'agent responsable (Mandels and Reese, 1957). C'est ainsi que fut isolée la souche QM6a (pour « quarter master » qui est un grade militaire) qui a été rattachée dans un premier temps à l'espèce des *Trichoderma viride.* En 1977, l'unique isolat naturel QM6a a été ensuite reconnu comme une espèce à part entière et a été baptisée *T. reesei* en l'honneur de son découvreur Elwyn T. Reese. Il appartient à la section *Longibrachiatum* et se caractérise par une croissance rapide, sa production abondante de conidies vertes (Figure 8A) portées par des conidiophores embranchés et sa sécrétion de pigments jaunes (Gams and Bissett, 1998). Ce champignon appartient à la classe des *Sordariomycetes* et à l'ordre des *Hypocreales*.

Tableau 4 : Classification de *T. reesei*

Règne :	*Fungi*
Embranchement :	*Ascomycota*
Sous-embranchement :	*Pezizomycotina*
Classe :	*Sordariomycetes*
Sous-classe :	*Hypocreomycetidae*
Ordre :	*Hypocreales*
Famille :	*Hypocreaceae*
Genre :	*Trichoderma*
Espèce :	*reesei*

Les champignons modèles *Neurospora crassa* et *Podospora anserina* sont des *Sordariomycetes* (mais de l'ordre des *Sordariales*) pour lesquels de nombreuses études sur la reproduction sexuée ont été menées (Figure 8B) et seront utilisés à titre comparatif tout au long de ce manuscrit.

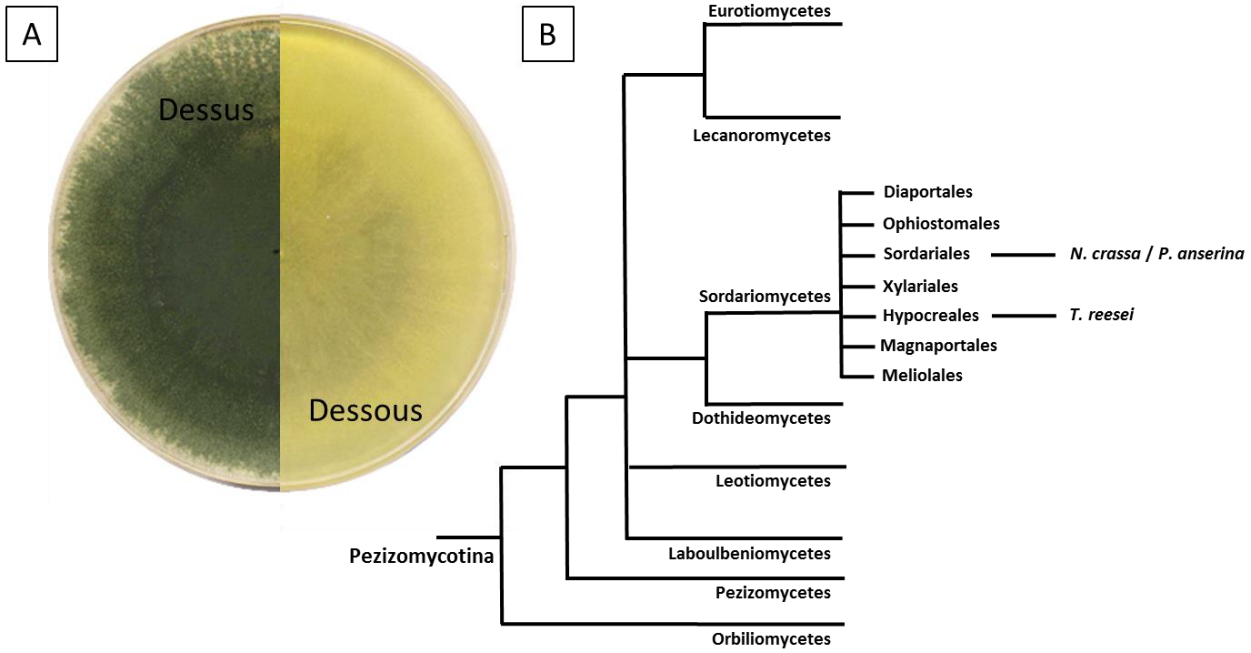


Figure 8 : *Trichoderma reesei*.
T. reesei sur milieu PDA (A). Son mycélium porte des conidies vertes en surface et sécrète un pigment jaune qui lui est caractéristique. Arbre phylogénétique des Pezizomycotina auquel appartiennent les espèces du genre *Trichoderma* (B). D'après http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf.

1.3.2. Le champignon cellulolytique *T. reesei*

T. reesei est un outil majeur pour la production industrielle de différentes enzymes (phospholipases, protéases, amylases, cellulases) (Seiboth et al., 2011; Bischof et al., 2016) utilisées dans le traitement du papier et des pulpes (Buchert et al., 1998), dans les procédés textiles, dans des procédés agro-alimentaires (Seiboth et al., 2011) et surtout dans la production de biocarburant de deuxième génération (Kumar et al., 2008). Ce choix est motivé par des considérations technologiques et économiques liées à sa forte capacité sécrétoire, sa facilité de culture en fermenteurs industriels. L'utilisation sûre et de longue date de ce champignon, lui a valu l'attribution du statut GRAS (Generally Recognized as Safe) par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis.

T. reesei est reconnu pour son efficacité à dégrader les parois végétales et est le principal organisme producteur de cellulases utilisé par l'industrie (Kubicek et al., 2009). Le terme générique « cellulases » correspond en fait à un cocktail enzymatique contenant :

- des cellulases, dont l'action synergique des endoglucanases, exoglucanases ou cellobiohydrolases et β-glucosidases (Kubicek et al., 2009) permet d'hydrolyser la cellulose (chaîne de résidus glucoses assemblés par des liaisons glycosidiques β-1-4) qui est le polysaccharide majoritaire restant suite à l'étape de prétraitement physico-chimique de la biomasse,

- d'hémicellulases qui hydrolysent l'hémicellulose (hétéropolymère constitué de pentoses comme le xylose ou l'arabinose et d'hexoses comme le mannose, glucose ou galactose) (Kubicek et al., 2009)
- et d'enzymes auxiliaires qui hydrolysent la lignine (polymères phénoliques complexes).

Si l'on considère uniquement les cellulases, *T. reesei* produit et sécrète majoritairement deux exoglucanases (CBHI et CBHII), cinq endoglucanases (EGI, EGII, EGIII, EGVI, EGV) et deux β-glucosidases (BGLI et BGLII) (Lynd et al., 2002). À elles seules, les enzymes CBHI, CBHII, EGI et EGII dans une proportion approximative de 60 : 20 :10 : 10, peuvent représenter jusqu'à 90 % de la quantité totale de protéines sécrétées tandis que les β-glucosidase représentent moins de 1 % (Markov et al., 2005; Herpoël-Gimbert et al., 2008; Margeot et al., 2009; Gusakov, 2011)

En 2008, le génome de la souche *T. reesei* QM6a a été séquencé par le Joint Genome Insitute (JGI) (Martinez et al., 2008). Le génome de 33,4 Mb a été assemblé en 89 scaffolds et 9129 gènes ont été prédits. L'utilisation de la technique de capture de conformation de la chromatine ou Hi-C permettant de générer une matrice de contact des séquences d'ADN, associée à l'outil bioinformatique GRAAL, a permis de réassembler les scaffolds en 7 chromosomes et d'identifier ceux, riches en AT (< 67 %), qui correspondent aux centromères (Figure 9) (Marie-Nelly et al., 2014; Jourdier et al., 2017). Le nombre de chromosomes assemblés est conforme au caryotype connu pour cette souche (Carter et al., 1992; Mantyla et al., 1992). Toutefois, ce nouvel assemblage ne comprend pas les régions télomériques et les intervalles entre les scaffolds ne sont pas comblés.

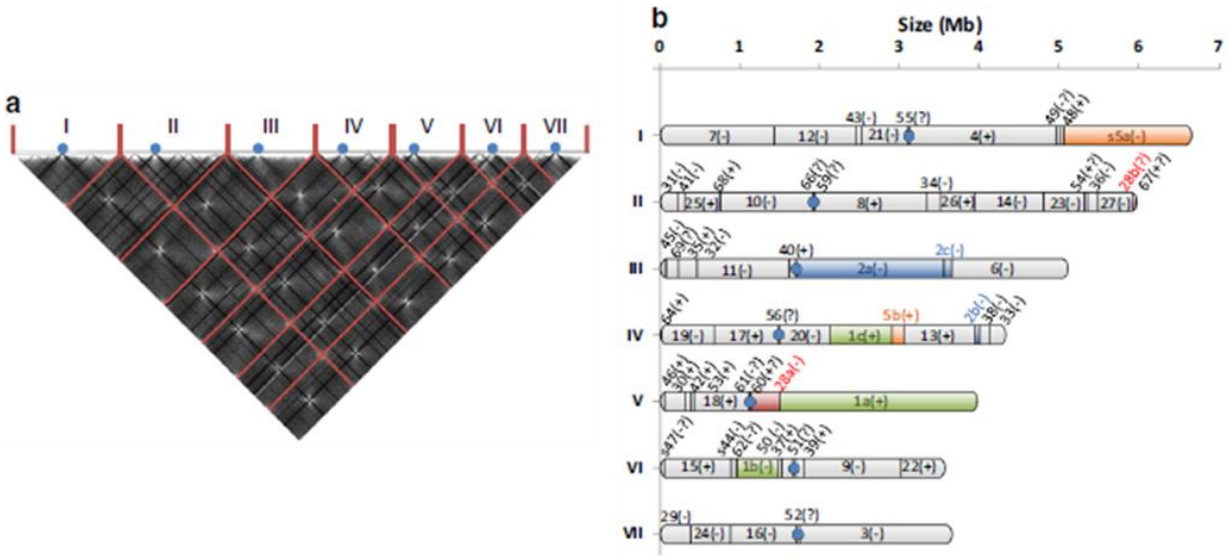


Figure 9 : Réassemblage des scaffolds de *T. reesei* en sept chromosomes.
Le génome de référence de *T. reesei* du JGI a été réassemblé à l'aide de la technique de Hi-C associée à l'outil de bioinformatique GRAAL. **a.** La matrice de contact généré par le réassemblage GRAAL : les bars rouges indiquent les limites des chromosomes et les points bleus représentent les centromères. **b.** Ordre et orientation des scaffolds réassemblés. Les incertitudes d'orientation sont notées avec un point d'interrogation. Les scaffolds 1, 2, 5 et 28 qui étaient mal assemblés dans le génome de référence sont respectivement représentés en vert, bleu, orange et rouge. Les centromères sont représentés par des losanges bleus. D'après Jourdier et al., (2017).

Très récemment, l'association de la technologie Pacific Biosciences (PacBio) et du séquençage Illumina, par Li et al. (2017), a permis d'obtenir sept chromosomes complétés des régions télomériques et des régions entre les scaffolds. Ce nouvel assemblage révèle un génome plus grand que précédemment (34,9 Mb) avec 10 877 gènes dont 1 630 nouvellement prédits. Les 1,5 Mb de séquences nouvelles correspondent à des régions riches en AT, dont 7 centromères, 14 subtélomères et 2 329 zones riches en AT.

En 2008, le premier inventaire du répertoire d'enzymes cellulolytiques de *T. reesei* avait permis d'identifier seulement 200 séquences codantes d'enzymes cellulolytiques contre 211 en moyenne chez les autres sordariomycètes étudiés et 265 chez les *Eurotiomycetes*, faisant conclure à Martinez et al., 2008) que *T. reesei* ne possédait qu'un petit nombre de gènes cellulolytiques pour un dégradeur efficace de biomasse végétale. Une ré-annotation des gènes de cellulases sur les nouvelles versions du génome de *T. reesei* fait finalement passer ce nombre à 228 dont seulement un tiers est regroupé en cluster (Häkkinen et al., 2012). Ces gènes sont majoritairement situés dans les régions subtélomériques des chromosomes et le regroupement en cluster n'a pas d'impact sur leur expression (Druzhinina et al., 2016).

1.3.3. Les souches hyper-productrices

Bien que la souche QM6a produise des cellulases, elle ne peut pas être utilisée telle quelle en industrie pour produire un cocktail enzymatique rentable. Des campagnes d'amélioration génétique visant à augmenter la production de cellulases et basées essentiellement sur de la mutagénèse aléatoire, ont été initiées depuis les années 1970 dans différents laboratoires publics et privés. Toutes les souches utilisées de nos jours par les chercheurs et les industriels dérivent de l'isolat QM6a (Figure 10). Combinées à des cribles de sélection adéquats, ces campagnes ont généré des souches ayant une forte capacité de sécrétion (40 à 100 g/L de protéines, en fonction des souches et des protocoles de production) (Cherry and Fidantsef, 2003; Kubicek et al., 2009), des activités enzymatiques spécifiques meilleures et la capacité de produire les cellulases à partir de sucres inducteurs solubles et métabolisables (Seiboth et al., 2011).

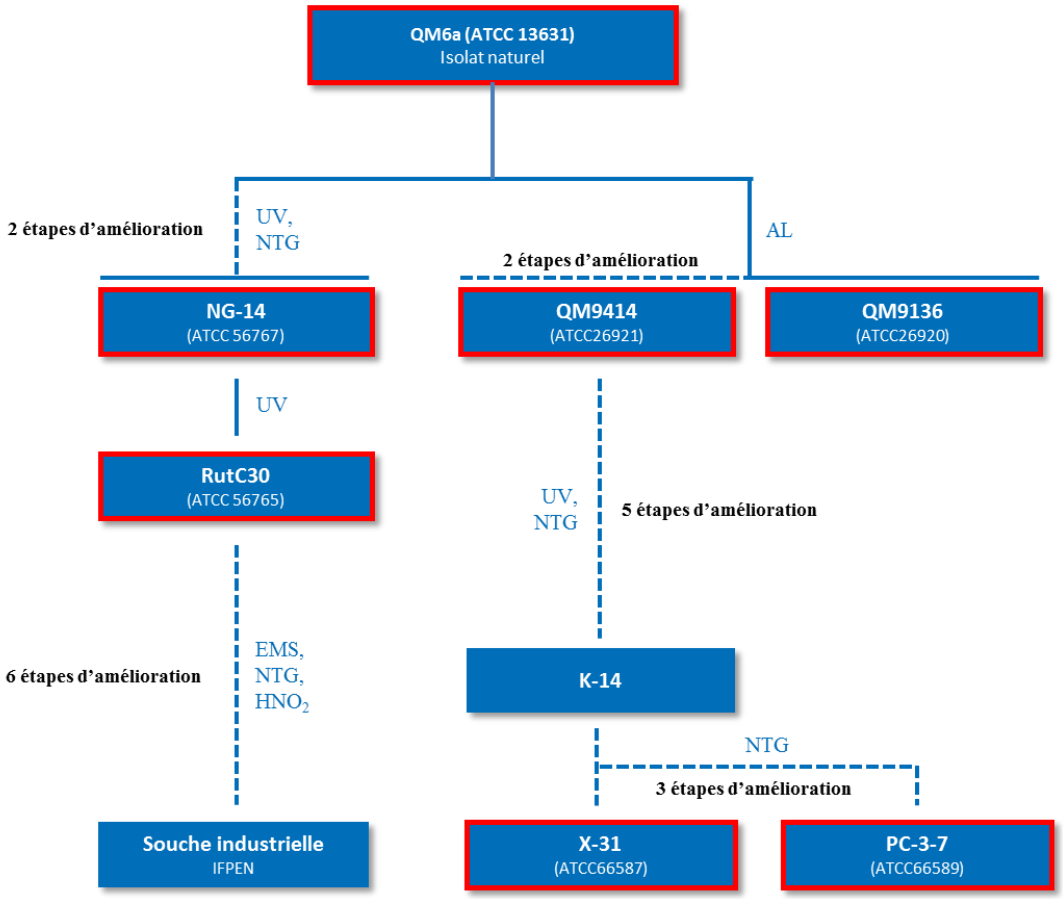


Figure 10 : Généalogie simplifiée des souches hyper-productrices dérivant de la QM6a.
Les agents mutagènes utilisés et le nombre de mutagénèses réalisées par rapport à la QM6a sont mentionnés. Les traits pleins correspondent à une seule étape d'amélioration tandis que les traits en pointillé correspondent à plusieurs étapes d'amélioration. Les souches entourées de rouge sont celles pour lesquelles un séquençage est disponible. UV : rayonnement ultra-violet ; NTG : nitrosoguanidine ; AL : accélérateur linéaire ; EMS : éthylméthylsulfonate ; HNO_2 : acide nitreux.

La première souche améliorée, QM9123, produit deux fois plus de cellulases que la souche d'origine (Mandels et al., 1971). Deux mutagénèses supplémentaires ont abouti à la souche QM9414 qui a un niveau de production quatre fois supérieure à celui de la souche QM6a (Mandels, 1975). Cette souche est souvent utilisée comme référence en recherche (Mach et al., 1995; Biely et al., 2014) et a servi de souche parentale à de nombreux programmes d'amélioration dont dérivent notamment les souches K-14, X-31 et PC-3-7 (Kawamori et al., 1985; Kawamori et al., 1986). Néanmoins, les mutations responsables du phénotype d'hyperproduction des souches QM9123 et QM9414 ne sont pas connues.

Les souches X-31 et PC3-7 ont été obtenues suite à deux tours de mutagénèse qui visaient à sélectionner des mutants résistant à la répression catabolique et dont la production de cellulases est fortement induite par du sophorose. La souche PC3-7 présenterait selon le Dr K. Tokuyasu (communication personnelle) un phénotype de faible viscosité, caractère essentiel pour une conduite de fermentation bien contrôlée.

La première tentative de mutagénèse a aussi généré le mutant QM9136 (Mandels et al., 1971) qui possède dans son génome 8 InDel et 6 SNV et qui *a contrario* ne produit plus aucune cellulase. Le déterminant de ce phénotype cellulase-négatif sera élucidé grâce au séquençage de son génome en 2015 par Lichius et al. qui a mis en évidence un InDel dans le gène *xyr1*, régulateur majeur de la production de cellulases, et dont la complémentation restaure la production de cellulases.

Au même moment, l'université Rutgers (USA) génère sa propre lignée dont le mutant le plus connu est la souche hyper-productrice de référence du domaine public, RutC30 (Peterson and Nevalainen, 2012). Elle est obtenue suite à 3 étapes de mutagénèse dont le but final était de s'affranchir de la répression catabolique. En effet, l'induction de la majorité des gènes de cellulases est forte en présence cellulose ou de ses dérivés, comme le sophorose et le lactose…, mais quasi nulle en présence de glucose (Kubicek and Penttila, 1998).

Pour ce faire, la souche QM6a exposée aux UV et soumise à un crible sélectionnant la capacité accrue à hydrolyser la cellulose a conduit à la souche M7 qui n'est plus disponible. Ensuite la souche M7 a été soumise à un traitement à la nitrosoguanidine (NTG). La souche NG14 qui présentait une capacité de sécrétion et une activité cellulase accrues, mais une répression catabolique encore trop importante a ainsi été isolée (Montenecourt and Eveleigh, 1979). L'analyse de mutations présentes dans cette souche a permis d'identifier 90 SNV, 3 InDel, 4 translocations, 2 délétions et une inversion ((Le Crom et al., 2009). La souche NG14 a subi une nouvelle mutagénèse UV et les mutants ont été criblé pour une forte activité cellulolytique et une résistance au 2-deoxyglucose (2-DG), permettant ainsi l'isolement de la souche RutC30 (Montenecourt and Eveleigh, 1979). Le 2-DG est un analogue du glucose qui est assimilé par la cellule mais non métabolisable par la voie de la glycolyse, ce qui conduit à l'inhibition de croissance des clones ayant un mécanisme de répression catabolique intact. La RutC30 sécrète deux fois plus de protéines que son parent NG14, et peut produire plus de 30 g/l de protéines en suivi un protocole de production industriel. Les recherches des deux dernières décennies ont révélé de nombreux changements génétiques dans RutC30 par rapport à QM6a dont 179 SNV, 5 InDel et 8 larges variations structurales (4 translocations, 3 délétions et une inversion). Tout d'abord, les caryotypes établis présentent des réarrangements chromosomiques avec un gain en taille des chromosomes III et VI (numérotation selon Jourdier et al., (2017)) et une diminution en taille du chromosome I (Carter et al., 1992; Mantyla et al., 1992; Vitikainen et al., 2010). À cela s'ajoute, une troncation d'environ 2,5 kb dans le gène *cre1*, régulateur clé de la répression catabolique chez les champignons, qui a été montrée par Ilmen et al., (1996). Une large région génomique d'environ 85 kb, comprenant 29 gènes codant entre autres pour des facteurs de transcription, des transporteurs et des enzymes du métabolisme primaire, a été perdue (Seidl et al., 2008). Egalement, un nombre important de mutations ponctuelles a été identifié (Vitikainen et al., 2010, Le Crom et al., 2009, Koike et al., 2013). Plus récemment, un nouveau assemblage avec la technique Hi-C (Jourdier et al., 2017) a

permis de préciser les point de cassure des larges variations structurales de reconstruire le caryotype (Figure 11).

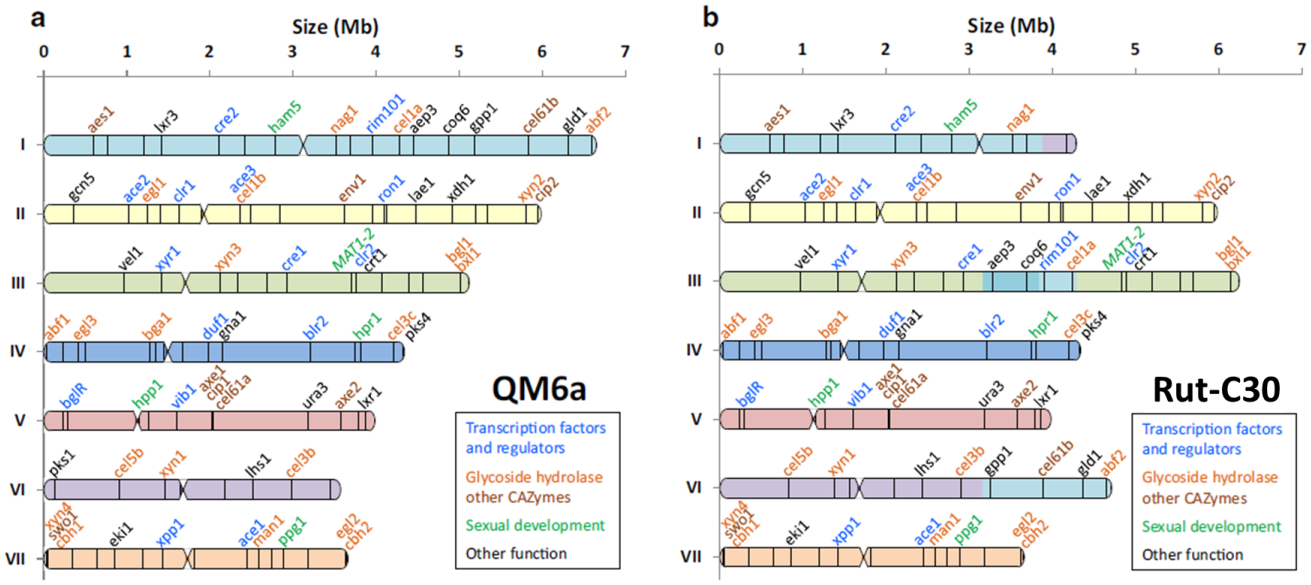


Figure 11: Réarrangements chromosomiques de la souche RutC30 par rapport à la souche QM6a.
Les cartes chromosomiques des souches QM6a (a) et RutC30 (b) ont été établies par Jourdier et al., (2017). Le caryotype final de la RutC30 montre des changements significatifs des chromosomes I, III et VI par rapport à ceux de la QM6a. Des gènes emblématiques de *T. reesei* ont été placés le long des chromosomes pour servir de bornes de localisation. La délétion de 85kb présente sur le chromosome VI est matérialisée par l'absence du gène *pks1*. Adaptée de Jourdier et al., (2017)

Pour toutes les souches générées par mutagénèse aléatoire, bien que les variations génétiques par rapport à l'isolat naturel QM6a soient connues il est difficile d'établir un lien formel entre mutation et phénotype à cause du grand nombre d'évènements génétiques identifiés.

Actuellement, ces souches continuent à être améliorées par des techniques de génie génétique (Cherry and Fidantsef, 2003; Percival Zhang et al., 2006) aussi bien dans la recherche publique qu'industrielle et font l'objet de nombreux brevets.

1.4. Reproduction sexuée et cycle de vie chez les souches sauvages de *T. reesei*

1.4.1. *T. reesei,* un champignon hétérothallique

La relation téléomorphe/anamorphe qui existe entre les *Hypocrea* et les *Trichoderma* est connue depuis longtemps (voir ci-dessus ; Kuhls et al., 1996) ont montré que *T. reesei* est en fait un isolat anamorphe de l'espèce *Hypocrea jecorina*. Cette espèce est très proche mais distincte de *Hypocrea schweinitzii* (Kuhls et al., 1996), une espèce considérée pendant un temps comme synonyme (Samuels

et al., 1994). Il a été décidé par la communauté scientifique que les individus *Trichoderma/Hypocrea* seraient regroupés sous le nom de *Trichoderma* (http://www.isth.info/). Dans la suite de ce manuscrit, afin d'en simplifier la lecture, seul le nom de *Trichoderma* sera utilisé, même si dans la littérature, l'organisme apparait tantôt sous le nom de *Trichoderma reesei* ou d'*Hypocrea jecorina.* La souche QM6a est en fait une souche homocaryotique ne possédant qu'un seul des deux types sexuels requis pour la reproduction sexuée. Pour bien comprendre ceci, il est nécessaire de faire un court rappel sur la reproduction sexuée chez les ascomycètes filamenteux ou *Pezizomycotina*.

Les ascomycètes filamenteux sont hermaphrodites c'est-à-dire qu'ils différencient à la fois des structures mâles et femelles et peuvent respectivement donner ou recevoir un noyau (Leslie and Klein, 1996; Nieuwenhuis et al., 2011). La reproduction sexuée peut être contrôlée par deux types sexuels, *MAT1-1* et *MAT1-2*. Chez les champignons dits hétérothalliques bipolaires, la reproduction sexuée s'effectue entre individus de types sexuels compatibles *MAT1-1* et *MAT1-2* (Figure 12). Ainsi les structures femelles de la souche *MAT1-1* seront fécondées par les structures males de la souche *MAT1-2* ou vice-versa. En effet, pour qu'un croisement entre deux souches fonctionne, il suffit que l'une des deux souches soit femelle fertile et l'autre mâle fertile (Saleh et al., 2012).

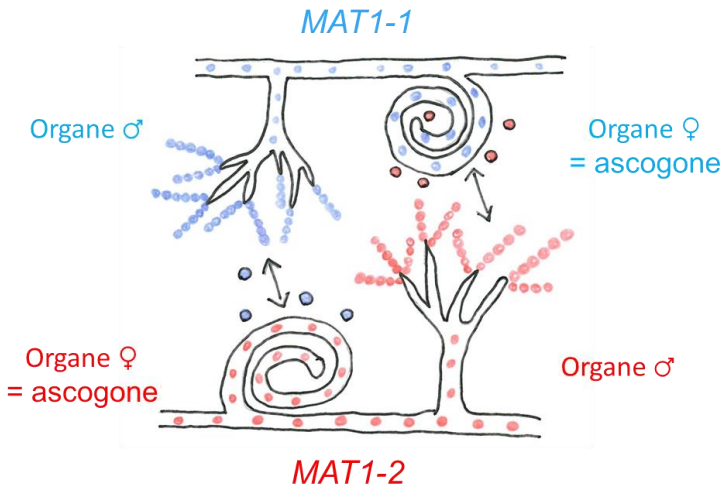


Figure 12 : Reproduction sexuée chez un champignon ascomycète filamenteux hétérothallique et hermaphrodite.

Lieckfeldt et al., (2000) ont isolé trois souches sauvages de *T. reesei* à partir de terre provenant de régions tropicales (Guyane française pour CBS999.97 et Brésil pour les deux autres souches 97-177 et 97-178). La souche CBS999.97 (nommée 97-38 dans l'article) est capable de former spontanément des fructifications dont les ascospores produits montrent une ségrégation bipolaire des types sexuels (50 % *MAT1-1* et 50 % *MAT1-2*) prouvant que *T. reesei* est un champignon hétérothallique. La souche CBS999.97 est donc hétérocaryotique et possède les deux types sexuels. Quant aux deux autres souches 97-177 et 97-178, elles sont incapables de former des fructifications spontanées ou par

confrontation l'une avec l'autre, suggérant qu'elles sont homocaryotiques et du même type sexuel. En revanche, elles forment des fructifications en confrontation avec la souche CBS999.97.

L'analyse de plus de vingt isolats sauvages de *T. reesei* issus de diverses zones géographiques montre que les deux types sexuels sont répartis équitablement (Seidl et al., 2009). Ce résultat est en adéquation avec ce qui est observé chez les champignons hétérothalliques (Dyer et al., 2016). Lorsque certains de ces isolats géographiques sont croisés avec les ascospores *MAT1-1* et *MAT1-2* issues de la souche CBS999.97 et isolées par Chuang et al., 2015, des fructifications sont obtenues. Mais de façon surprenante, ces différents isolats géographiques ne sont pas capables de se croiser entre eux (Chuang et al., 2015).

Le croisement entre souches sauvages CBS999.97 *MAT1-1* et CBS999.97 *MAT1-2* de *T. reesei* produit des stromata (Figure 13A et B). Ces structures macroscopiques (3-4 mm à 2 cm) constituées d'hyphes condensés et pigmentés en surface, regroupent sous leur surface des périthèces (Figure 13C et D) contenant la progéniture qui se présente sous forme d'asques. Les asques contiennent 16 ascospores uninucléées et non mélanisées (Figure 13E à G) (Seidl et al., 2009**)**. Leur morphogénèse est décrite plus loin dans ce manuscrit.

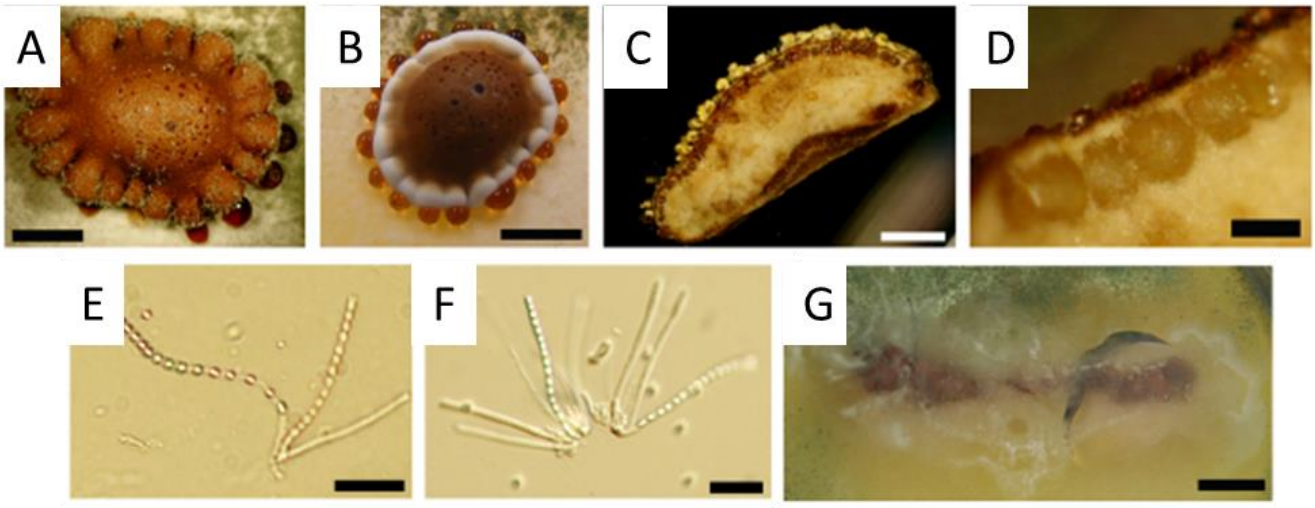


Figure 13 : Morphologie des fructifications et des ascospores de *T. reesei*.
Les stromata (A-B) présentent des périthèces qui sont enchâssés sous leur surface (C-D). Ils contiennent des asques à 16 ascospores (E-F) qui sont éjectés hors du périthèce et forment un halo blanchâtre sur les couvercles de boîtes de Petri (G). Échelle : 2 mm (A, B, C) ; 0,5 mm (D) ; 30 µm (E, F) ; 1 cm (G). Adapté de Seidl et al., 2009.

La dissection des asques de croisements entre CBS999.97 *MAT1-1* et CBS999.97 *MAT1-2* ou QM6a pour comprendre comment les gènes ségrégent dans la descendance ont mis en évidence que la souche CBS999.97 *MAT1-1* a un patrimoine génétique significativement différent de celui de la CBS999.97 *MAT1-2* (Chuang et al., 2015). Les souches ont alors été renommées CBS999.97

MAT1-1re (*re* pour *recombinant*) et CBS999.97 *MAT1-2wt (wt* pour *wild type)* pour indiquer le réarrangement chromosomique présent dans la souche CBS999.97 *MAT1-1re* mais absent de CBS999.97 *MAT1-2wt*, de la souche QM6a et des autres souches sauvages de *T. reesei* analysées. L'analyse détaillée (séquençage, nombre de copies de gènes) de la descendance montre qu'en présence d'hétérozygotie de séquence, la méiose génère de l'aneuploïdie segmentale qui peut être positive (i.e. augmentation de la production d'hémicellulases) ou négative (ascospores non viables). Par exemple, l'augmentation de la production d'hémicellulases dans certains descendants aneuploïdes est due au fait que l'un des clusters de gènes de cellulases se trouve être en deux copies au lieu d'une seule dans le génome (Chuang et al., 2015).

Comme la découverte de la reproduction sexuée est relativement récente chez *T. reesei* et qu'elle n'a pas encore été exhaustivement étudiée, il est supposé que son cycle sexuel (Figure 14) ressemble à celui des autres *Pezizomycotina*, dont *P. anserina*, au moins sur les étapes les plus importantes. Toutefois il est possible que certaines étapes décrites ci-dessous soient très différentes chez *T. reesei*. Le cycle sexuel implique une alternance entre phases haploïde et diploïde ponctuées par la caryogamie et la méiose à l'origine de nouvelles combinaisons génétiques (Peraza-Reyes and Berteaux-Lecellier, 2013). La reproduction sexuée a lieu à l'intérieur de fructifications pluricellulaires qui sont constituées de tissu sexuel (hyméniums) entourés d'une enveloppe protectrice (Peraza-Reyes and Berteaux-Lecellier, 2013).

Le cycle sexuel de *T. reesei* débute avec la libération d'ascospores (« ascospore discharge », Figure 14), de chacun des deux types sexuels, qui en germant vont être à l'origine d'un mycélium capable, dans des conditions favorables, de différencier les organes mâle (conidiophores) et femelle (que nous supposons être des ascogones ; ascogonium, Figure 14). *T. reesei* étant un champignon hétérothallique bipolaire, la fertilisation n'a lieu qu'entre gamètes mâle et femelle de types sexuels opposés (Coppin et al., 1997). La reconnaissance entre les structures de reproduction compatibles fait intervenir le système phéromone/récepteur (description au Chapitre 1.4.3) qui guide la fusion du gamète male avec le gamète femelle et déclenche la différenciation des stromata.

Il n'existe aucune indication concernant les événements ayant lieu dans les stromata de *T. reesei* mais les étapes qui s'y déroulent sont probablement les mêmes que chez les autres ascomycètes comme *P. anserina* (Peraza-Reyes and Malagnac, 2016). Chez cette espèce, les noyaux parentaux ne fusionnent pas immédiatement mais se divisent pour former dans un premier temps un syncytium (Coppin et al., 1997). Les noyaux nouvellement divisés migrent par paires de types sexuels opposés pour former un hyphe spécialisé en forme de crochet (crozier formation, Figure 14) composé de trois cellules : une cellule apicale binucléée et deux cellules basales uninucléées. La caryogamie a alors lieu dans la cellule apicale qui va s'allonger pour donner l'asque final. Les deux cellules basales fusionnent

et se divisent pour donner un nouveau syncytium et une nouvelle cellule en forme de crochet (Peraza-Reyes and Berteaux-Lecellier, 2013). Ce mécanisme, appelé la propagation de l'état dicaryotique, est à l'origine de la présence de nombreux asques dans un même périthèce. Dans l'asque, le dicaryon subit alors la méiose et une mitose post méiotique qui va aboutir à la formation de 8 noyaux qui sont empaquetés deux par deux dans des ascospores pour former des asques avec quatre ascospores. Chez *T. reesei*, le dicaryon subit la méiose et deux mitoses post méiotiques qui vont aboutir à la formation de 16 ascospores uninucléés (Chuang et al., 2015). Le cycle sexuel s'achève alors avec l'expulsion des ascospores matures.

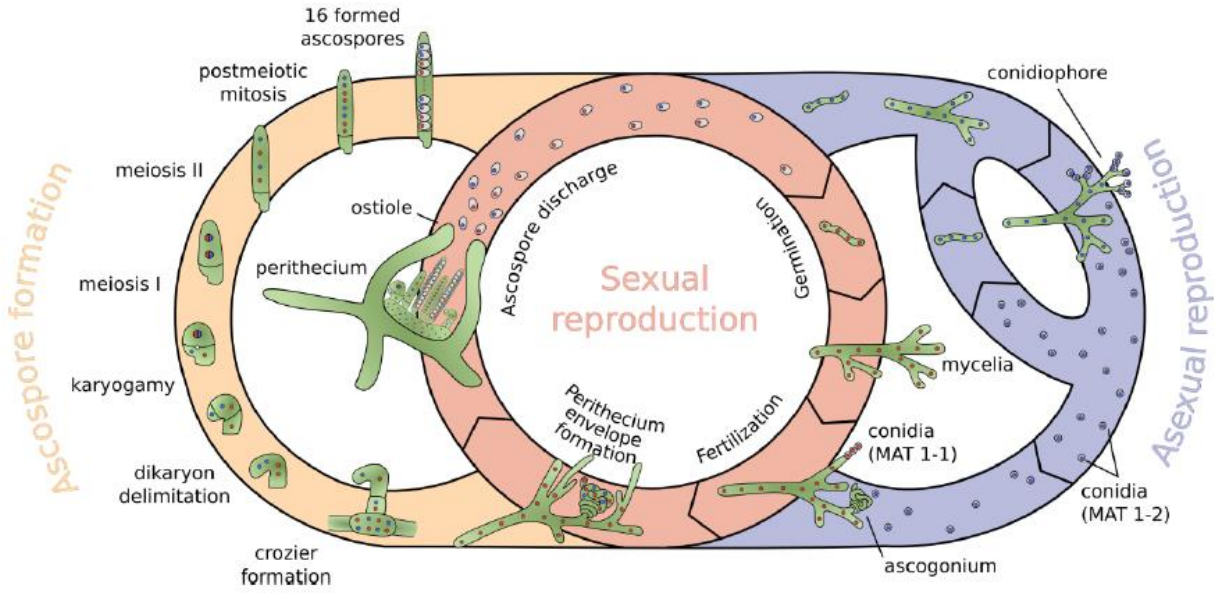


Figure 14 : Cycle de vie théorique de *T. reesei* combinant un cycle sexué et un cycle asexuée.
Le cycle de vie débute par la germination d'ascospores et la formation de mycéliums de types sexuels opposés. Le mycélium peut amorcer une reproduction asexuée (en bleu) et produire des conidies asexuées capables de germer et de former un nouveau mycélium. Il peut aussi amorcer une reproduction sexuée (en rouge) au cours de laquelle des ascogones seront différenciés, fertilisés par les conidies et transformés en périthèces au sein desquels (en jaune) aura lieu la caryogamie, les méioses et les mitoses successives conduisant à la production de 16 ascospores uninucléés. Le cycle de reproduction est inspiré du cycle de vie du champignon ascomycète *P. anserina*. Tiré de la thèse de Dante Parodi, (2014).

1.4.2. Les types sexuels

Chez les champignons hétérothalliques bipolaires comme *T. reesei*, la reproduction sexuée ne peut avoir lieu qu'entre partenaires de types sexuels compatibles. Les types sexuels sont déterminés par les deux allèles ou idiomorphes *MAT1-1* et *MAT1-2* présents au locus MAT (Figure 15) sur le chromosome III (Figure 11). Ces idiomorphes correspondent à des séquences génomiques différentes contenant un ou plusieurs gènes (Debuchy and Turgeon, 2006). Ce système bipolaire est aussi présent chez les levures *S. cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* chez qui il a été largement étudié. Les types sexuels codent des facteurs de transcription (matTFs) qui sont impliqués dans la régulation de l'expression des gènes phéromone/récepteur, et agissent sur la caryogamie et la méiose (Coppin et al., 1997).

La souche *T. reesei* QM6a porte l'idiomorphe *MAT1-2*, d'une taille de 4,3 kb et composé du gène unique *MAT1-2-1* (ID 124341) codant pour une protéine à domaine HMG (Seidl et al., 2009). La structure de l'idiomorphe *MAT1-1* (GenBank accession no. FJ599756) a été déterminée à partir de descendants de type sexuel *MAT1-1* de la souche sauvage CBS999.97. L'idiomorphe *MAT1-1* a une taille de 5,5 kb et se compose des trois gènes qui par analogie avec d'autres ascomycètes hétérothalliques bipolaires sont les gènes *MAT1-1-1*, *MAT1-1-2* et *MAT1-1-3* codant respectivement pour une protéine de la famille MATα-HMG, une protéine à domaine PF17043 et une protéine de la famille MATA-HMG (Seidl et al., 2009). Par ailleurs, il est intéressant de noter que 486 bp (paire de bases) de la partie 3' du gène *MAT1-1-1* sont présents dans les deux idiomorphes mais inactifs chez la souche *MAT1-2* (Seidl et al., 2009). Les données de RNAseq dont nous disposons au laboratoire montrent cependant qu'il sont transcrits (Poggi-Parodi et al., 2014). Ce gène tronqué a également été retrouvé chez les membres du genre *Grosmania* et *Ophiostoma* (Tsui et al., 2013). Une recombinaison inégale entre les loci MAT lors de l'appariement des chromosomes est l'événement le plus probable à l'origine de la présence du morceau du gène *MAT1-1-1* dans le locus *MAT1-2*. Dans un premier temps le gène *MAT1-1-1* aurait été intégré par recombinaison dans le locus *MAT1-2* puis au cours du temps, il aurait dégénéré puis aurait été inactivé ; enfin une partie aurait été perdue (Tsui et al., 2013). A l'exception de cette particularité, l'organisation des idiomorphes est similaire à celle observée chez les champignons modèles *N. crassa* et *P. anserina*. Ainsi, l'idiomorphe *MAT1-1* de *T. reesei* est l'homologue des idiomorphes **A** de *N. crassa* et **mat-** de *P. anserina*, tandis que l'idiomorphe *MAT1-2* de *T. reesei* est l'homologue des idiomorphes **a** de *N. crassa* et **mat+** de *P. anserina* (Coppin et al., 1997).

Les gènes situés de part et d'autre du locus MAT sont très conservés chez les ascomycètes. Il s'agit des gènes *APN2*, qui code pour une DNA lyase, et *SLA2* qui code pour un facteur contrôlant l'assemblage du cytosquelette (Kück and Böhm, 2013). Chez *T. reesei*, le gène *APN2* (Trire2 : 59147) est bien présent mais l'orthologue de *SLA2* est remplacé par un gène codant pour une protéine de fonction inconnue (Trire2 : 76930) (Seidl et al., 2009). Chez *T. atroviride* et *T. virens*, ce même gène ainsi que la même organisation des loci MAT sont retrouvés (Seidl et al., 2009).

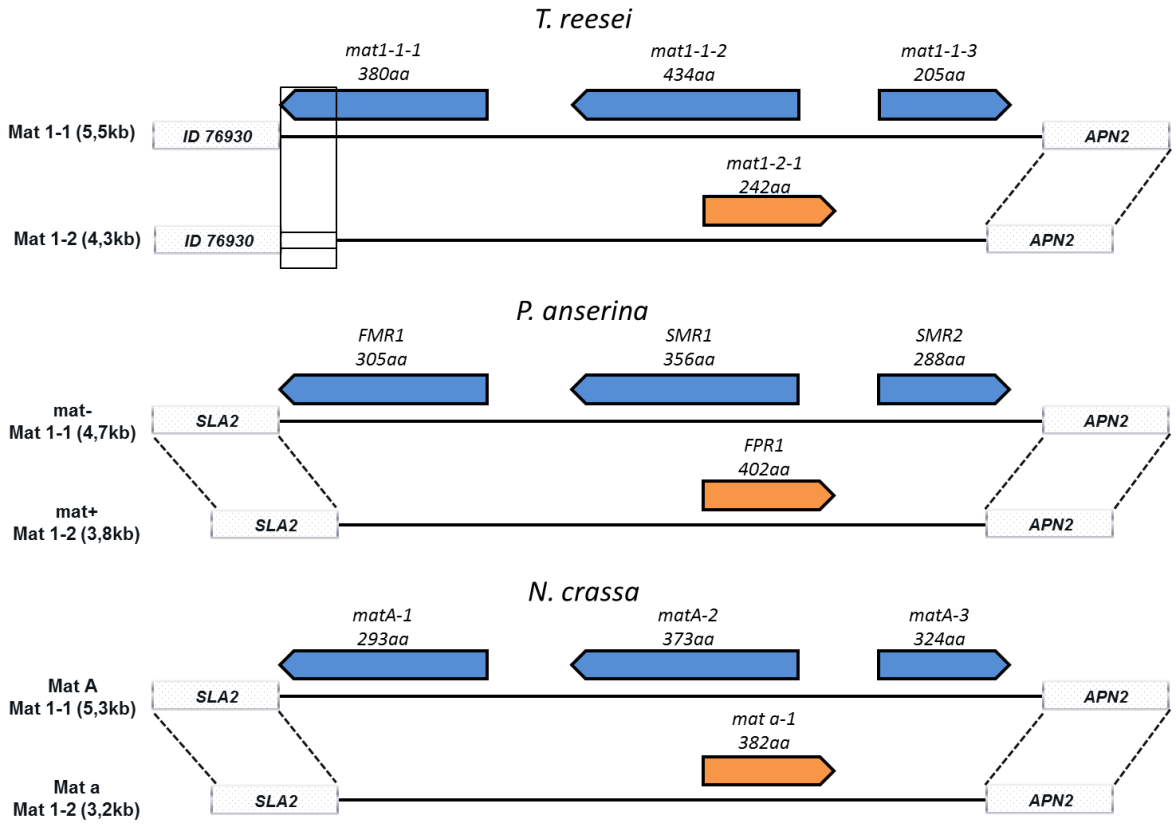


Figure 15 : Idiomorphes du locus MAT chez *T. reesei, P. anserina et N. crassa.*
Le locus *MAT1-1* contient trois gènes, et le locus *MAT1-2* en contient qu'un seul. La boîte blanche à gauche du locus *MAT1-2* de *T. reesei* correspond aux 437 aa présents chez les deux idiomorphes mais inactifs dans le locus *MAT1-2*. Adapté de Coppin et al., 1997; Seidl et al., 2009.

L'invalidation du locus MAT chez *P. anserina* (Coppin et al., 1993) et *N. crassa* (Ferreira et al., 1998) entraine une absence complète de reproduction sexuée, même si des structures reproductives mâle et femelle sont produites. Les gènes *FMR1* ou *MAT1-1-1* et *FPR1* ou *MAT1-2-1* sont requis lors de la fertilisation qu'ils régulent, et sont impliqués tout comme *SMR2* ou *MAT1-1-3* dans la reconnaissance intercellulaire (entre partenaires compatibles) (Figure 16) (Arnaise et al., 2001a). Quant au gène *SMR1* ou *MAT1-1-2* sa fonction est inconnue mais c'est un gène conservé chez les *Sordariomycetes* (Debuchy and Turgeon, 2006).

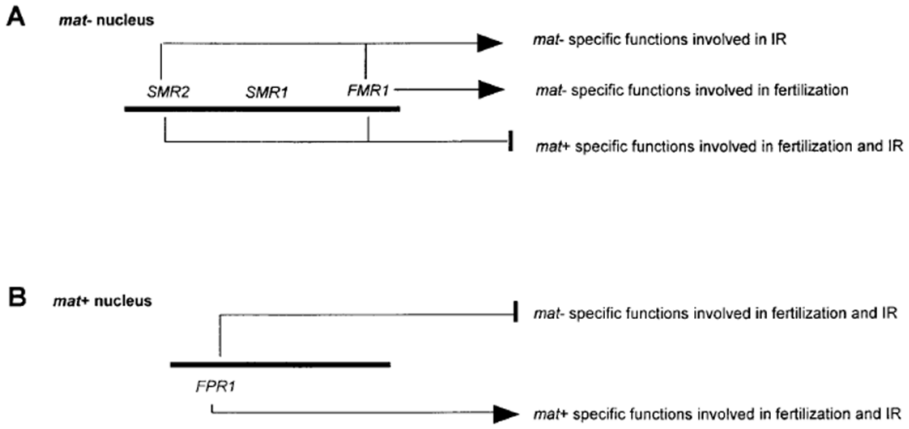


Figure 16 : Rôle des gènes des loci MAT dans la reproduction sexuée.
Le rôle de régulation de la fécondation et de la reconnaissance internucléaire (IR) par les gènes *FMR1, SMR1, SMR2* et *FPR1*. L'activation est représentée par une flèche tandis que la répression est représentée par une barre (Arnaise et al., 2001a).

Outre des actions sur la reproduction sexuée, des études transcriptomiques ont mis en évidence que l'action des matTFs s'exerce aussi dans le contrôle de nombreux processus biologiques n'ayant pas de lien direct avec la reproduction sexuée comme par exemple le métabolisme général, la morphologie ou le métabolisme secondaire (Coppin et al., 1997; Kück and Böhm, 2013; Dyer and Kück, 2017). Chez *P. anserina*, 157 gènes sont régulés par les gènes des types sexuels parmi lesquels des gènes directement impliqués dans la reproduction sexuée mais aussi des gènes du métabolisme primaire et secondaire (Bidard et al., 2011). Une des hypothèses pour expliquer ce grand nombre de gènes est la nécessité de mobiliser l'énergie et les ressources nécessaires au développement des périthèces. Chez *Penicillium chrysogenum*, 254 gènes sont sous le contrôle direct du facteur de transcription à α-domaine *MAT1-1*-1, parmi lesquels des gènes impliqués dans la reproduction sexuée mais aussi des gènes du développement asexué, de la morphogénèse, du métabolisme des acides-aminés, du fer et du métabolisme secondaire (Becker et al., 2015). Parallèlement, il a été démontré que le facteur de transcription à domaine HMG *MAT1-2* avait en plus d'un rôle dans la reproduction sexuée, un impact sur des processus développementaux tels que la sporulation, la germination des conidiospores et leur propriété de surface (Böhm et al., 2015). Enfin, il est bien connu chez *N. crassa*, que les loci du type sexuel contrôlent également l'incompatibilité végétative (Coppin et al., 1993; Saupe, 2000).

À ce jour, chez *T. reesei*, aucune étude n'a été réalisée quant au rôle exact des gènes *mat* dans la reproduction sexuée et sur d'autres processus. Il est cependant fort probable que ces gènes soient, à l'image des autres champignons filamenteux, surtout impliqués dans la reproduction sexuée mais également possiblement dans le développement asexué, le métabolisme secondaire et la morphogénèse.

1.4.3. Le système phéromone récepteur

Une des premières étapes de la reproduction sexuée est la détection de la présence du partenaire de type sexuel compatible. Chez les levures et les champignons filamenteux, cette reconnaissance du partenaire s'appuie sur le système phéromones/récepteurs et va conduire à la fusion des gamètes de type sexuel opposé.

Les phéromones sont des petites molécules diffusibles ou « signal » chimique (Figure 17) qui peuvent diffuser dans le milieu et qui sont perçues par des récepteurs spécifiques (Figure 17). La levure de type sexuel **a** va produire les phéromones bleues qui seront senties par les cellules **α** grâce à leur récepteur bleu tandis que les levures de type sexuel **α** vont produire des phéromones rouges qui seront senties par les récepteurs des cellules **a**. La production de ces molécules dépend du type sexuel (Merlini et al., 2013).

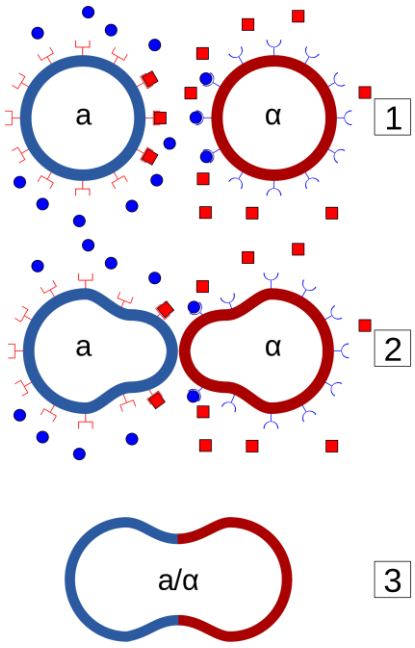


Figure 17 : Le système phéromone/récepteur chez les levures.
Lors de la reproduction sexuée entre deux levures haploïdes compatibles, celles-ci émettent des phéromones (rond bleu ou carré rouge) (1) qui sont reconnues par des récepteurs ancrés à leur surface (bleu ou rouge) (2). La perception des phéromones entraine un rapprochement des partenaires (2) qui finissent par fusionner pour former une cellule diploïde (3). Source : **https://en.wikipedia.org/wiki/Mating_of_yeast**

Chez les champignons, deux types de phéromones existent : les **phéromones-a** et les **phéromones-α** (Schmoll et al., 2010). *P. anserina*, possède deux gènes codant pour les précurseurs de phéromones mfm et mfp (Figure 18). La phéromone mfm (*mating facteur minus*) est une **phéromone-α** de 13 acides aminés qui résulte du traitement d'une molécule précurseur se composant de plusieurs répétitions du peptide **α** bordées par des sites d'action de la protéase Kex2 tandis que la phéromone mfp (*mating facteur plus*) est un polypeptide de 24 acides aminés qui se termine par un

motif CAAX similaire à la phéromone hydrophobe **a** de *S. cerevisiae* (Coppin et al., 2005). Pour être actives, ces pré-phéromones doivent subir plusieurs étapes de maturation. Chez *N. crassa*, la phéromone de **type-a** est connue sous le nom de mfa-1 et la phéromone de type-α est connue sous le nom de ccg-4 (Figure 18) (Bobrowicz et al., 2002). Chez tous les ascomycètes, les phéromones sont essentielles pour la fertilité mâle car si les gènes les codant sont invalidés, il n'y plus d'attraction du trichogyne par le gamète male (Bistis, 1983; Coppin et al., 2005). Chez *N. crassa* et *P. anserina*, la transcription des gènes de précurseurs de phéromones est mating-type dépendante. Leurs gènes sont transcrits de façon basale pendant la croissance mais dès que le mycélium entre en phase stationnaire et devient sexuellement compétent, le niveau de transcrits augmente drastiquement chez *P. anserina* (Debuchy and Turgeon, 2006) et chez *N. crassa* (Bobrowicz et al., 2002).

Chez *T. reesei*, un peptide **phéromone-α**, nommé **ppg1** présente les mêmes caractéristiques que ses homologues chez les autres champignons (Schmoll et al., 2010). Bien qu'aucun gène codant pour un peptide **phéromone-a** n'ait été trouvé dans le génome de *T. reesei*, il a été montré que le peptide phéromone **hpp1** assume cette fonction (Schmoll et al., 2010). Il est appelé **phéromone-h** (type-hybride) et possède les caractéristiques des deux types de phéromones précédemment décrites : 3 domaines CAAX en C-terminal et deux sites Kex2 qui ne semblent pas fonctionner.
La transcription des gènes des précurseurs *ppg1* et *hpp1* n'est pas claire car les deux seules études à ce sujet sont contradictoires (Schmoll et al., 2010; Seibel et al., 2012b). L'analyse de l'expression de *ppg1* et *hpp1* par quantification des ARN par Northern Blot mené par Schmoll et al., (2010) montre que leur expression est indépendante du type sexuel tandis que l'étude par PCR quantitative de Seibel et al., (2012b) indique que l'expression de *ppg1* est dépendante du type sexuel *MAT1-1* et que celle de *hpp1* dépend du type sexuel *MAT1-2*. Les données transcriptomiques dont nous disposons au laboratoire et qui portent uniquement sur des souches *MAT1-2* montrent que *ppg1* n'est pas exprimé dans ces souches quelle que soit la condition testée. Bien sûr, ces données devraient être confirmées par une étude dédiée. Dans les études menées par Schmoll et al., (2010) et Seibel et al., (2012b), *hpp1* et *ppg1* sont exprimés à plusieurs stades de la reproduction sexuée, depuis le contact entre les souches compatibles jusqu'à l'apparition des fructifications. La localisation génomique de HPP1 est différente de celle des gènes de **phéromones-a**, qui est conservée chez de nombreux *Sordariomycetes*. En revanche, chez les espèces proches de *T. reesei*, *T. atroviride* et *T. virens*, le locus HPP1 est synténique (Schmoll et al., 2010).

Des récepteurs de phéromones, à la surface des cellules, vont permettre de « sentir » le signal chimique émis par le partenaire compatible et activer les voies de signalisation en aval. Chez les ascomycètes hétérothalliques, il existe deux types de récepteurs, associés chacun à un type sexuel. Ainsi chez *P. anserina* et *N. crassa*, les récepteurs PaPRE2 et NcPRE2 perçoivent les **phéromones-α** tandis que les récepteurs PaPRE1 et NcPRE1 perçoivent les **phéromones-a** (Figure 18). Les gènes des

récepteurs sont également transcrits de façon mating-type dépendante chez *P. anserina* mais pas chez *N. crassa* (Debuchy et al., 2010a). Ces récepteurs appartiennent à la famille des protéines transmembranaires couplées aux protéines G, également appelées protéines à 7 domaines transmembranaires. L'invalidation des gènes de récepteurs dans *N. crassa* et *P. anserina* conduit à une stérilité femelle (Bidard et al., 2011; Kim et al., 2012) .

T. reesei possède deux récepteurs couplés aux protéines G (Figure 18) : HPR1 perçoit les **phéromones-h** (*MAT1-2*) et est associé au type sexuel *MAT1-1* et HPR2 perçoit les **phéromones-α** (*MAT1-1*) et est associé au type sexuel *MAT1-2*. Ces récepteurs sont importants pour la fertilité femelle. Pour que le développement sexué puisse avoir lieu, une paire fonctionnelle de phéromone et récepteur, HPP1-HPR1 ou PPG1-HPR2, est nécessaire (Seibel et al., 2012b). Par ailleurs, il a été montré que les récepteurs jouaient un rôle dans les événements de post-fertilisation comme la genèse des ascospores (Seibel et al., 2012b). Les quatre gènes de précurseurs de phéromones et de récepteurs sont transcrits dans les souches de chacun des deux types sexuels. Cependant leur niveau d'expression est augmenté dans le type sexuel correspondant (Seibel et al., 2012b).

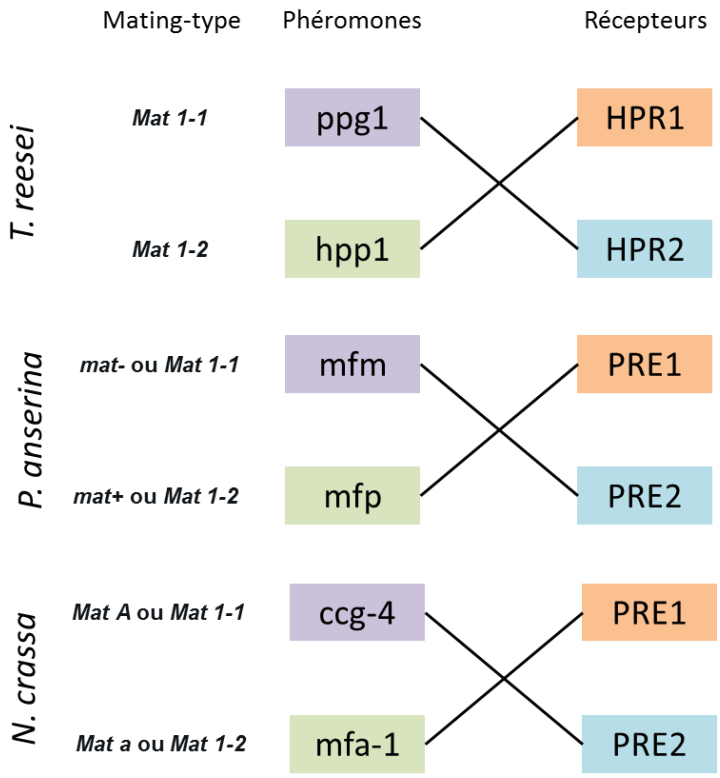


Figure 18 : Le système phéromone/récepteur mating-type dépendant chez *T. reesei*, *P. anserina* et *N. crassa*.
En violet, les phéromones du type-α ; en vert, les phéromones du type-a ; en orange, les récepteurs de type-a et en bleu, les récepteurs de type- α. Les lignes pleines permettent d'associer la phéromone avec son récepteur.

1.4.4. Développement des périthèces

Suite à l'attraction entre des différents partenaires, la fabrication des fructifications est initiée. Il n'existe aucune étude sur la morphogénèse des stromata et des périthèces dans *T. reesei*. Les seules données existantes sur le genre *Hypocrea* portent sur *H. gelatinosa* (Vincens, 1917) et *H. schweinitzii* (Hanlin, 1965). D'un point de vue phylogénétique, *H. gelatinosa* appartient au clade *Harzianum* tandis que *T. reesei/H. jecorina* appartient au clade *Longibrachiatum* (Druzhinina et al., 2006). *H. schweinitzii* dont l'anamorphe est *T. citrinoviride* est très proche de *T. reesei/H. jecorina* puisque leurs séquences ITS1 ne diffèrent que par seulement 5pb (soit 2,2 %) (Kuhls et al., 1996).

Les fructifications, chez *H. gelatinosa* et *H. schweintzii*, sont des stromata charnus (Figure 19A ; Figure 20A) qui englobent sous leur surface des périthèces dont les ostioles dépassent, et qui deviennent spongieux en vieillissant. Ils se présentent isolés ou parfois soudés les uns aux autres en un amas difforme.

Chez *H. gelatinosa* (Vincens, 1917), le développement des périthèces débute avec l'apparition sur le mycélium d'ébauches de stromata qui sont le résultat d'amas de mycélium grêles et condensés. À mesure que le stromata mûrit, le mycélium devient compact et forme une croûte qui est d'abord blanche puis prend une teinte marron. Au plus jeune stade où le stromata d'*H. gelatinosa* a pu être coupé, deux hyphes, plus épais que les cellules avoisinantes, sont observés sous sa surface dont l'un s'enroule autour de l'extrémité de l'autre (Figure 19B). De façon similaire, chez *H. schweinitzii*, un hyphe recroquevillé, septé et uninucléé qui est plus épais que ceux environnant et qui ressemble à un initial d'ascogone est observé (Figure 20B).

Une anastomose se fait entre les deux hyphes épais de *H. gelatinosa*, et le noyau de l'hyphe donneur passe dans l'hyphe receveur et la cellule receveuse se multiplie activement (Figure 19C). C'est également ce qui est observé chez *H. schweinitzii* (Figure 20C), même si aucune fusion entre les hyphes donneur et receveur n'a pu être mise en évidence par Hanlin (1965).

Les cellules entourant la cellule multinucléée prolifèrent pour former une assise de cellules concentriques qui sont à l'origine de l'enveloppe externe du périthèce. Si selon Vincens (1917) ces cellules sont d'origine stromatique (Figure 19D), aucune précision n'est donnée par Hanlin (1965) quant à leur origine (Figure 20C, D).

Parallèlement, la cellule receveuse multinucléée des deux espèces décrites se multiplie activement pour former un groupe de cellules plectenchymateuses volumineuses. Chez *H. gelatinosa* les cellules centrales s'écartent les unes des autres pour laisser place à une cavité (Figure 19E). Se faisant, les

cellules les plus périphériques sont comprimées contre les cellules de l'enveloppe et s'aplatissent verticalement pour former la paroi interne du périthèce. Chez *H. schweinitzii,* la taille du périthèce augmente et les cellules les plus internes de la cavité périthéciale croissent de quelques microns vers le centre la cavité (Figure 20E).

Les cellules plectenchymateuses apicales sont différenciées en paraphyses tandis que les cellules basales sont différenciées en pseudoparenchyme et pseudohyménium (Figure 20F) chez *H. schweinitzii*. De la même façon, les cellules plectenchymateuses de *H. gelatinosa* se spécialisent mais l'auteur ne fait pas de distinction en fonction de leur origine et les considèrent toutes comme étant des paraphyses.

Chez *H. gelatinosa,* aucun détail n'est donné sur la formation de l'hyménium qui apparait selon Vincens (1917) suite à la résorption des paraphyses et qui va être à l'origine d'asques depuis le centre de la cavité vers les parties latérales et presque jusqu'à la voûte (Figure 19F, G). La genèse des ascospores n'a pas pu être observée chez *H. gelatinosa,* mais celles obtenues sont ovales, allongées, hyalines et sont éjectées du périthèce à peu près simultanément et de façon rapide. Chez *H. schweinitzii,* c'est la propagation de la cellule receveuse multinucléée qui est à l'origine d'une couche de cellules ascogènes à la base du périthèce (Figure 20G). Au fur et à mesure que les asques croissent vers le haut et se mêlent aux paraphyses, ces dernières se désintègrent (Figure 20I, H). Les cellules ascogènes multinucléées se divisent en plusieurs cellules dans lesquelles migrent deux noyaux (Figure 20J). Les cellules binucléées forment un crochet qui s'allonge pour donner l'asque (Figure 20K) dans lequel les deux noyaux fusionnent. La caryogamie est suivie d'une méiose puis d'une mitose donnant naissance à 8 noyaux qui sont encapsulés et qui se divisent à nouveau. Les noyaux mère et fille migrent chacun à une extrémité de la spore et un septum se forme pour donner deux cellules accolées. À maturité, chaque paire de cellules se disloquent et libèrent 16 spores.

Parallèlement, l'ostiole qui permet l'expulsion des ascospores est formé. Pour Vincens (1917), sa formation résulte du soulèvement de la croute du stromata à cause de l'allongement tangentiel continu du plectenchyme de la voute qui, se faisant, pousse les cellules de l'enveloppe du périthèce. L'ostiole est tapissé de périphyses issues d'hyphes de l'enveloppe ou du plectenchyme de la voûte (Figure 19F). Hanlin (1965) ne détaille pas le développement de l'ostiole mais dit qu'il provient de la différenciation des cellules de l'enveloppe externe du périthèce (Figure 20F, G, H). Le col de ce dernier est tapissé de paraphyses et il dépasse légèrement de la surface du stromata (Figure 20H).

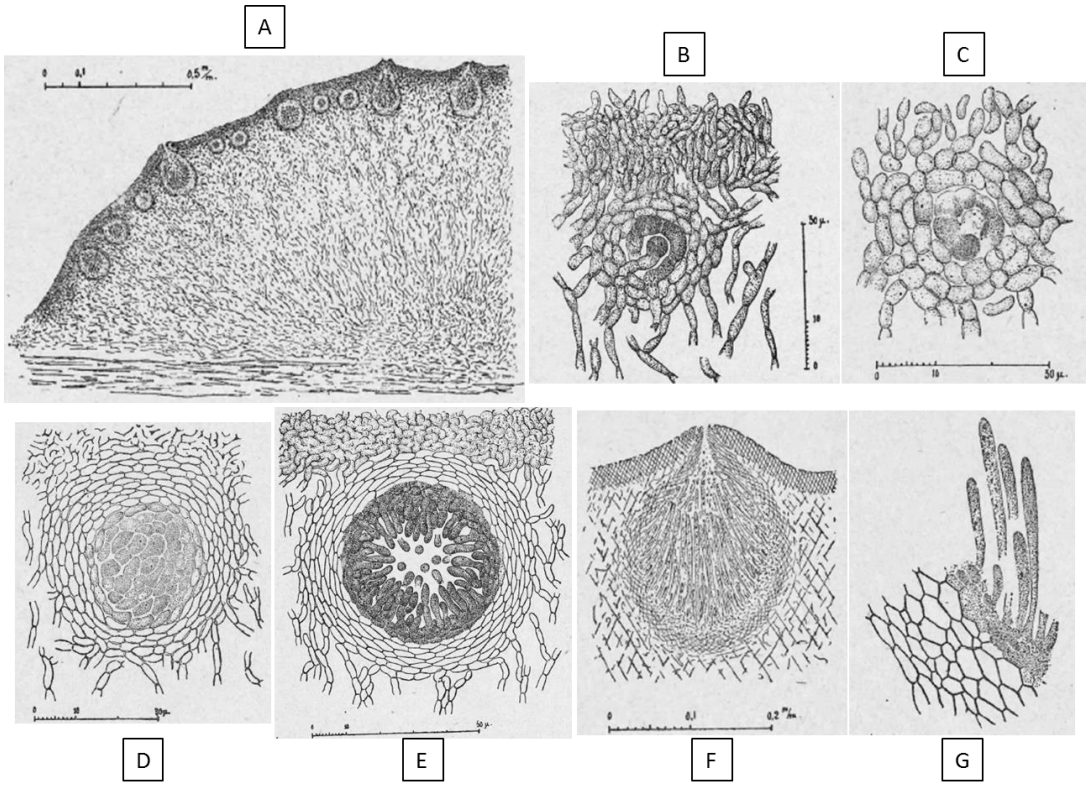


Figure 19 : Développement des périthèces chez *H. gelatinosa*.
La fructification ou stromata englobe de nombreux périthèces qui présentent divers états de développement **(A).**
Dans l'ébauche de fructification, il y a deux hyphes plus épais que ceux avoisinants, dont l'un s'enroule autour de l'extrémité de l'autre **(B)**. Il y a anastomose entre les deux hyphes et le noyau de l'hyphe enveloppant passe dans la cellule centrale **(C).** Une ébauche de périthèce après la multiplication de la cellule centrale **(D).** Les parois du jeune périthèce sont tapissées de paraphyses qui s'écartent les uns des autres **(E)** et se résorbent pour laisser la place au développement de l'hyménium **(F)** dont on voit une partie de l'hyménium ainsi que la paroi du périthèce **(G).** Adapté de la thèse de François Vincens (1917)**.**

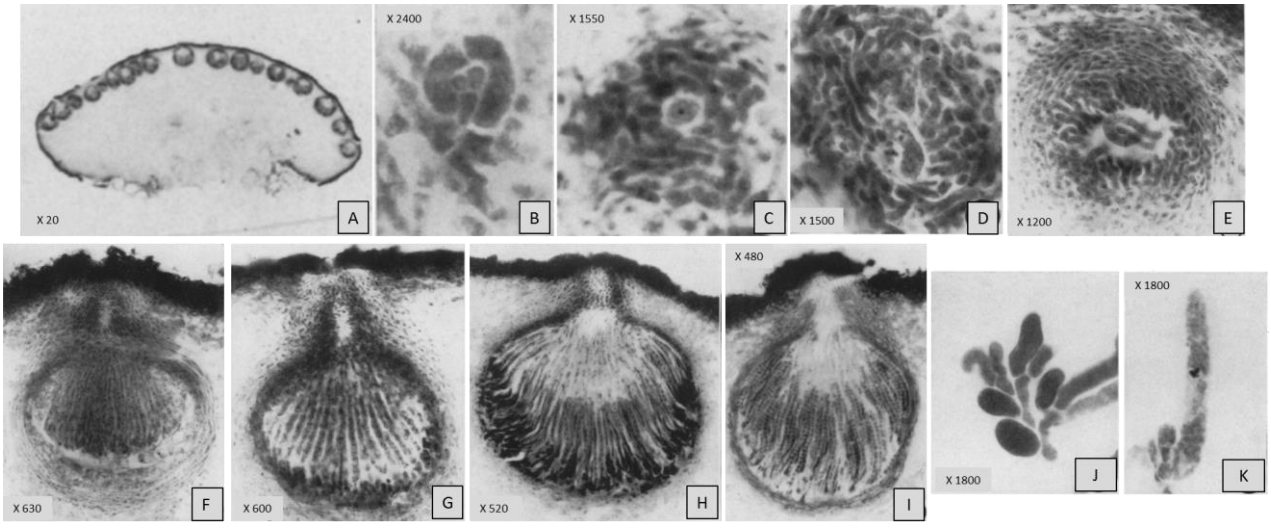


Figure 20 : Développement des périthèces chez *H. schweinitzii.*
Stromata présentant sous sa surface les périthèces **(A).** L'Initial d'ascogone est un hyphe épais recroquevillé **(B)**. Lorsqu'il devient multinucléé, les cellules qui l'entourent prolifèrent pour former l'enveloppe du périthèce **(C et D).** Les cellules de la cavité se développent **(E)** puis celles de l'apex se transforment en paraphyses tandis que celles de la base forme les tissus pseudo-parenchymateux et hyméniales **(F).** Les cellules ascogènes se forment à la base du périthèce **(G)** et donnent naissance aux asques **(H)** qui contiennent les ascospores **(I).** Des cellules ascogènes **(J)** parmi lesquelles on distingue un crochet, des grosses cellules ovales binucléées et une cellule allongée qui est l'ébauche d'un asque **(K).** Adapté d'après Hanlin (1965).

Chez *H. gelatinosa* et *H. schweinitzii*, le développement du périthèce semble similaire et en adéquation avec ce qui est décrit chez les *Pezizomycotina*. Néanmoins, ni Vincens (1917) ni Hanlin (1965), ne traitent de l'origine des nombreux périthèces qui constituent un stromata ni de l'origine des tissus stromatique.

1.4.5. Régulation du développement sexuel par la lumière

Il est reconnu que la lumière a un impact sur la croissance du mycélium, la conidiation et le développement sexuel de nombreux champignons dont *A. nidulans, N. crassa, P. anserina* (Fuller et al., 2015). L'équilibre entre reproduction sexuée et reproduction asexuée est influencé par la lumière (Debuchy et al., 2010b). La reproduction sexuée de *T. reesei* est favorisée par une alternance de 12h de lumière et 12h d'obscurité (Chen et al., 2012). Chez *N. crassa*, la réponse à la lumière est médiée par le complexe White Collar (WCC) qui se compose des deux photorécepteurs white-collar 1 (WC-1) et white-collar 2 (WC-2). Ce dernier agit comme activateur du troisième photorécepteur VDD qui permet d'adapter la réponse à la lumière et d'inactiver le complexe WC (Schafmeier and Diernfellner, 2011). Chez *T. reesei*, les orthologues de WC-1, WC-2 et VVD sont respectivement BLR1, BLR2 et ENV1 qui permettent de percevoir la lumière bleue (Castellanos et al., 2010). Il a été montré précédemment que BLR1 et BLR2 ne sont pas essentiels dans le processus d'induction de la reproduction sexuée mais influencent positivement la formation des fructifications : leur inactivation n'empêche pas la formation de stromata mais entraine une diminution de leur nombre (Chen et al., 2012; Seibel et al., 2012a).

ENV1 a quant à lui une influence considérable sur le développement sexué : il est essentiel pour la fertilité femelle puisque aucun stromata n'est obtenu lors du croisement entre une souche sauvage invalidée pour ENV1 et la souche femelle stérile QM6a alors qu'un croisement entre une souche sauvage et la souche QM6a est parfaitement fertile. ENV1 régule négativement l'expression des gènes des précurseurs de phéromones *hpp1* et *ppg1* et des récepteurs *hpr1* et *hpr2*, et son absence entraine une dérégulation de leur expression et un défaut d'identité sexuelle (Seibel et al., 2012a).

Un autre facteur important du développement des champignons est le complexe VELVET (VeA), qui est bien étudié chez les *Aspergilli* (Bayram and Braus, 2012) et qui a un rôle crucial dans tous les processus développementaux dépendant de la lumière. Chez *T. reesei*, il a été démontré que l'orthologue de VeA, appelé VEL1, est indispensable pour la régulation de la production des métabolites secondaires ainsi que les développements sexué et asexué (Karimi Aghcheh et al., 2014). VEL1 a un impact sur la régulation du système phéromone-récepteur et plus particulièrement sur la régulation de la transcription des récepteurs de phéromones. En effet en son absence, le récepteur hpr1 est cinq fois moins transcrit dans les souches *MAT1-1* et hpr2 est vingt-cinq fois moins transcrit dans

les souches *MAT1-2*. C'est donc l'absence des récepteurs de phéromone correspondant au type sexuel qui est responsable de la stérilité femelle.

Une étude récente a mis en évidence une interconnexion entre les voies de régulation impliquant ENV1 et VEL1 (Bazafkan et al., 2017). Cette étude montre que ces deux protéines interviennent dans la régulation de processus impliquant la lumière et que cette régulation est dépendante du type sexuel *MAT1-1*. A la lumière, l'action de ces deux régulateurs se complètent tandis qu'à l'obscurité leur action est antagoniste.

1.5. Reproduction sexuée et cycle de vie chez la souche industrielle QM6a

1.5.1. QM6a est femelle stérile

La souche QM6a est la souche à l'origine de toutes les souches industrielles. Jusqu'à récemment, aucune des tentatives de reproduction sexuée décrites dans la littérature entre la souche QM6a et d'autres souches de *T. reesei* n'a abouti, suggérant que la souche QM6a est asexuelle et se reproduit exclusivement de façon clonale (Kuhls et al., 1996). L'identification du locus *MAT1-2*, dans la souche QM6a (Seidl et al., 2009) a permis de faire des essais de croisement avec une souche de type sexuel compatible c'est-à-dire avec une souche *T. reesei* CBS999.97 *MAT1-1* (Figure 21). Les auteurs de cet essai parviennent à obtenir la formation de stromata fertiles à la confrontation des deux souches (Figure 21).

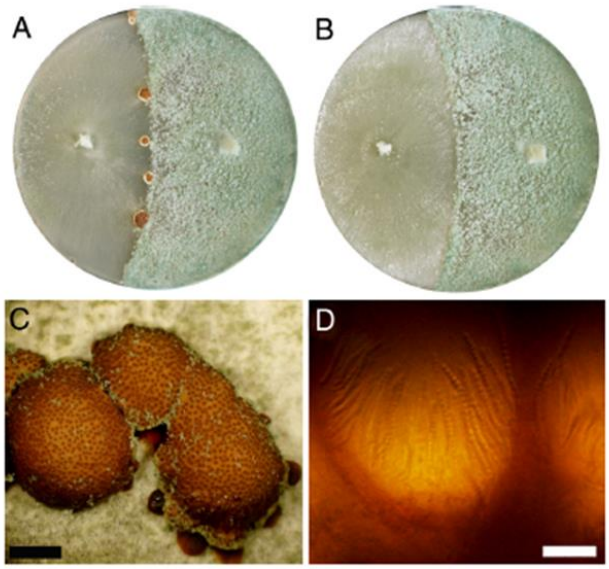


Figure 21 : Reproduction sexuée de *T. reesei.*
(A) Le croisement entre QM6a (*MAT1-2*) et *H. jecorina* (*MAT1-1*) sur boîte de Petri donne lieu à la formation de stromata au niveau de la zone de rencontre des 2 souches fongiques. (B) Lorsque QM6a (*MAT1-2*) est croisée avec une souche du même type sexuel, aucun stromata ne se forme. (C) Les petits points noirs à la surface du stromata correspondent aux ostioles des périthèces cachés sous sa surface (Échelle : 2mm). (D) Les périthèces fertilisés contiennent des asques à 16 ascospores (Échelle : 2 mm). (Seidl et al., 2009)

Fort de ce succès, Seidl et al. testent la capacité de quelques souches hyper-productrices de cellulases, dont la RutC30, à faire de la reproduction sexuée avec *T. reesei* CBS999.97 *MAT1-1*. Bien que ces souches présentent de nombreuses mutations dues aux nombreuses mutagenèses subies, elles sont capables de se croiser avec l'isolat naturel *T. reesei* CBS999.97 *MAT1-1*.

Les auteurs poursuivent en réalisant une conversion de type sexuel, c'est-à-dire en changeant la cassette *MAT1-2* par la cassette *MAT1-1* provenant de la souche CBS999.97 dans la souche QM6a. Cette nouvelle souche, QM6a *MAT1-1* est alors croisée avec les souches *T. reesei* CBS999.97 *MAT1-2* et QM6a *MAT1-2*. Dans le premier cas, le croisement est fertile alors que dans le second il est stérile. Ce résultat suggère donc que la souche QM6a est femelle stérile (Figure 22) car pour qu'un croisement entre deux souches aboutisse, il faut qu'au moins l'une des deux souches soit femelle fertile et l'autre mâle fertile (Saleh et al., 2012). Il est important de rappeler que toutes les souches hyper-productrices de cellulases ont été générées à partir de la QM6a, ce qui veut dire qu'elles sont toutes de type sexuel *MAT1-2* et qu'elles sont femelles stériles mais mâles fertiles.

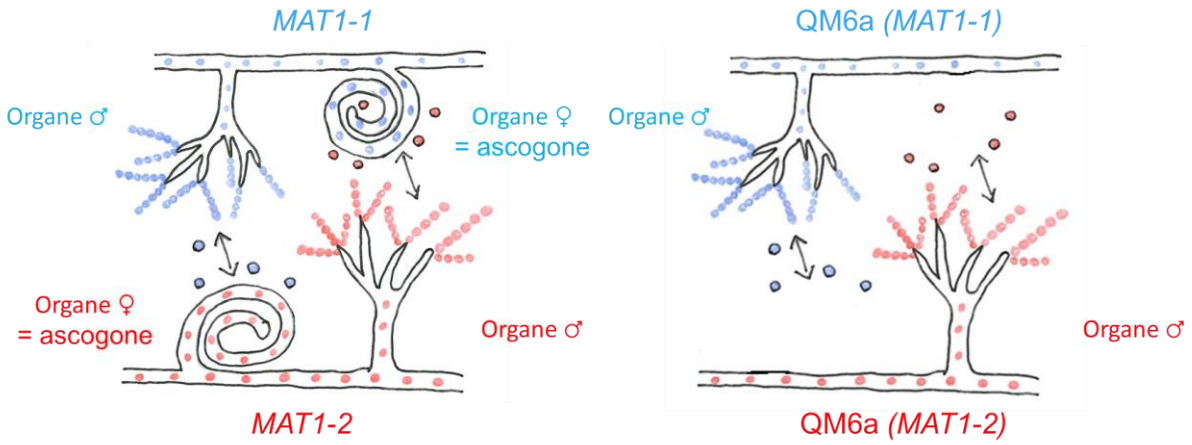


Figure 22 : La reproduction sexuée chez *T. reesei*.
À gauche, une reproduction sexuée entre souches mâle et femelle fertiles qui aboutira à l'obtention d'une descendance. À droite, une reproduction sexuée entre souches QM6a mâle fertile mais femelle stérile, qui ne permettra pas d'obtenir de descendants.

L'hypothèse la plus probable pour expliquer la stérilité femelle de la souche QM6a est que cette fertilité femelle ait été perdue en raison de son maintien au laboratoire depuis des décennies où elle a été propagée de façon asexuelle. En effet, Saleh et al., (2012) ont montré, chez le pathogène du riz *Magnaporthe oryzae*, qu'une propagation asexuelle durant 10 à 19 générations aboutit à la perte de la fertilité femelle chez toutes les souches testées. Ce résultat s'expliquerait par une dérive génétique ayant lieu lorsque le champignon est maintenu dans des conditions environnementales favorables (abondance de nutriments, pas de pression de sélection, pas de compétiteurs). La fertilité femelle peut donc être perdue facilement et rapidement.

Par ailleurs, le développement sexué est un mécanisme complexe qui implique plusieurs étapes : la reconnaissance et l'attraction du partenaire, la fertilisation, la formation de la fructification dans laquelle va avoir lieu la fusion des noyaux mâle et femelle qui est immédiatement suivie de la caryogamie et de la méiose. De plus, la fabrication des fructifications intervient dans des conditions environnementales spécifiques mettant en jeu différents stimuli environnementaux comme les nutriments, la lumière, l'oxygénation, la présence du partenaire de reproduction, la température, le pH. Leur perception se fait à l'aide de récepteurs couplés à des protéines relais qui sont soit des protéines G soit des protéines RAS. Ces dernières activent les cascades de régulation dépendantes des PKA-AMPc ou des MAPK qui vont amplifier les stimuli environnementaux et activer les facteurs de transcription activateur ou répresseur de l'expression des gènes responsables de la formation de la fructification. Au minimum, quelques 200 autres gènes sont impliqués à différents niveaux dans le développement sexuel des champignons (Pöggeler et al., 2006; Dyer and O'Gorman, 2012; Dyer and Kück, 2017). Ainsi le développement sexué est un mécanisme complexe qui requiert la coordination de nombreux processus biologiques dont certains ne sont pas spécifiques du sexe. La perte de la

fertilité peut donc être multifactorielle et être due à un ou des gènes défectueux intervenant à différents niveaux du processus et ayant un rôle de près ou de loin sur lui.

1.5.2. Remédier à la stérilité femelle

La découverte d'une reproduction sexuée chez un champignon d'une telle importance industrielle ouvre de nouvelles perspectives d'amélioration des souches et de nouveaux champs de recherche. La reproduction sexuée peut être un outil d'amélioration rapide et efficace, mais si elle ne peut pas avoir lieu entre les souches industrielles, son utilité reste limitée. Des études tentent de comprendre pourquoi les souches industrielles de *T. reesei* sont femelles stériles et comment y remédier.

En 2012, Seibel et al., (2012) s'intéressent à la régulation du système phéromone/récepteur entre les souches sauvages CBS999.97 *MAT1-1* et CBS999.97 *MAT1-2* avec la souche QM6a. Ils montrent que les gènes de la souche QM6a sont exprimés au même moment que ceux de la CBS999.97 *MAT1-2* mais avec un niveau de transcription différent. Ainsi, vingt fois plus de transcrits du gène *hpp1* sont détectés dans la souche QM6a par rapport à la souche CBS999.97 *MAT1-2*. Cette dérégulation transcriptionnelle pourrait entrainer une réponse retardée et inappropriée pouvant contribuer au défaut de stérilité femelle de QM6a.

Rapidement, Linke et al., (2015) et Schmoll et al., (2015) recherchent les gènes capables de restaurer la fertilité femelle chez QM6a. Pour cela, ils croisent la QM6a avec une CBS999.97 *MAT1-1*. La descendance est rétrocroisée (ou backcross) huit fois de suite avec la QM6a pour obtenir des souches *MAT1-1* fertiles contenant un pourcentage minimum de matériel génétique de la CBS999.97 (Figure 23).

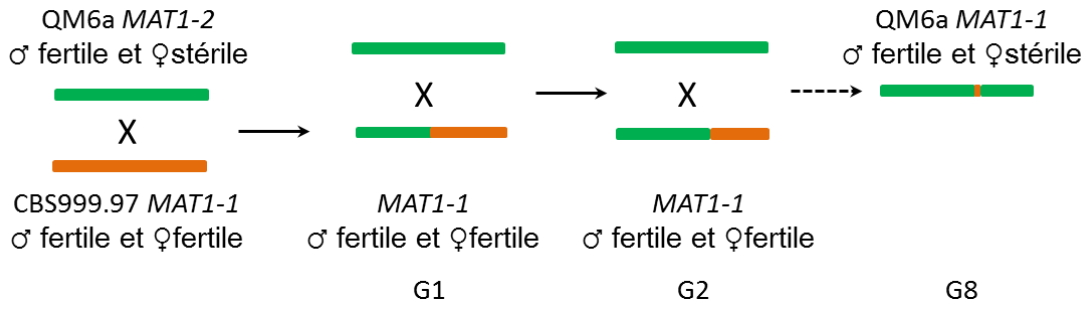


Figure 23 : Recherche des gènes capables de restaurer la fertilité femelle chez QM6a.
À chaque rétrocroisement, la quantité du patrimoine génétique CBS999.97 diminue dans la descendance (notée G1 à G8, pour génération 1 à 8). D'après Linke et al., (2015).

La comparaison génomique des descendants *MAT1-1* fertiles avec la QM6a permet d'identifier quatre gènes pour Linke et al., (2015) et six gènes candidats pour Schmoll et al., (2015). Seul le gène

Trire2 :67350 (appelé *idc1* dans la suite du manuscrit), commun aux deux brevets, permet de restaurer la production des stromata. Le séquençage de l'allèle fonctionnel du gène *idc1* dans les souches femelles fertiles RL1/A8-02 and RL2/A8-11 générées par Linke et al., (2015) a permis de déterminer que ce gène *idc1* a une taille de 5121 nucléotides et est interrompu par trois introns (Figure 24). La séquence du gène *idc1* (Trire2 :67350) non fonctionnel issue de QM6a diffère de 91 nucléotides, dont neuf sont localisés dans des introns, par rapport à la séquence sauvage. L'introduction d'une version sauvage du gène *idc1* dans la souche QM6a *MAT1-1* entraine une restauration de sa fertilité et l'obtention des stromata fertiles (Linke et al., 2015) lors d'un croisement avec une souche QM6a *MAT1-2*. Toutefois la régulation du gène doit être importante car sur plusieurs transformants un seul présente une restauration complète de la fertilité (communication personnelle). Cette souche à la fertilité femelle restaurée n'existait pas au début de cette thèse et a été mise à disposition que très récemment.

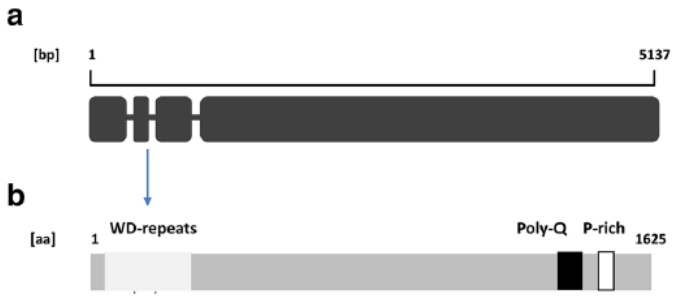


Figure 24 : Le gène *idc1* de *T. reesei*.
(a) Le gène *idc1* est interrompu par 3 introns. (b) L'ADNc et la traduction *in silico* de ce gène révèlent l'existence d'une région répétée riche en sérine (WD-repeats) en N-terminal, d'une région riche en proline (P-rich) en C-terminal et d'un stretch de glutamine (Linke et al., 2015).

Ce gène a pour orthologue *ham-5* chez *N. crassa,* (Aldabbous et al., 2010) et *IDC1* chez *P. anserina,* (Jamet-Vierny et al., 2007). La perte de fonction du gène *ham-5* de *N. crassa* (Aldabbous et al., 2010) et *IDC1* chez Podospora (Chan Ho Tong et al., 2014) entraine un défaut de la fusion entre hyphes. Or, la fusion des hyphes est un processus important du développement des champignons et notamment pour la croissance végétative et la reproduction sexuée. Chez *N. crassa, ham-5* est impliqué dans la mobilisation de la cascade de signalisation MAPK et de ses composants NRC-1, MEK-2 et MAK-2, nécessaires à la fusion hyphale. *ham-5* interagit grâce à sa partie N-terminale avec MEK-2 et permet de les transporter du cytoplasme jusqu'à l'extrémité de l'hyphe où a lieu la fusion. (Jonkers et al., 2014; Jonkers et al., 2016).

Chez *P. anserina, IDC1* est un composant d'une des trois cascades MAP kinase qui sont impliquées dans la transmission de signal. La présence de mutations dans le gène *IDC1* empêche la formation de pigments et d'hyphes aériens, empêche le développement de la « dégénérescence Crippled Growth », cause une stérilité femelle et affecte la capacité de *P. anserina* à enclencher le mécanisme de défense d'interférence hyphale en présence d'un autre champignon (Jamet-Vierny et al., 2007). Le gène *idc1*

est requis dans le développement du protopérithèce en périthèce, et de son niveau d'expression dépend le nombre de fructifications. Une souche exprimant peu *IDC1* produit peu de fructifications tandis que la surexpression du gène entraîne la production de nombreux protopérithèces dont un faible nombre deviendra mature. En effet, la production de protopérithèces et de périthèces nécessite des nutriments qui sont puisés dans les hyphes avoisinants. Ainsi, si trop de protopérithèces sont produits, il n'y aura plus suffisamment de nutriments pour permettre aux périthèces de se développer jusqu'au bout (Jamet-Vierny et al., 2007).

1.6. Enjeux et objectifs de la thèse

Dans le cadre de la production de bioéthanol de deuxième génération, parmi les améliorations envisagées pour diminuer le coût de l'étape d'hydrolyse enzymatique, l'ingénierie génétique de *T. reesei* est une des solutions. Elle permettrait d'améliorer les performances de sécrétion du champignon filamenteux producteur de cellulases, les propriétés des enzymes et de maitriser la stabilité des souches en conditions industrielles. Il est cependant crucial de maitriser les outils de modifications génétiques permettant d'obtenir des souches industrielles performantes et génétiquement stables.

Comme de nombreux champignons industriels, *T. reesei* a longtemps été considéré comme ayant exclusivement un cycle asexuel. La mise en évidence de l'existence d'un cycle de reproduction sexuée chez le champignon filamenteux *T. reesei* ouvre de nouvelles perspectives d'amélioration des souches utilisées en biotechnologies. L'utilisation de la reproduction sexuée en complément des outils de génétique et de biologie moléculaire classiques ouvre de nouvelles perspectives pour :

- servir de socle pour de nouvelles méthodes de criblage et de sélection de mutations pouvant conférer des caractères d'intérêt dépendants de gènes nombreux ou non identifiés,
- éliminer les mutations délétères s'accumulant dans les souches ayant une reproduction clonale et contribuer à stabiliser les souches industrielles en conservant leurs performances,
- éliminer les marqueurs de sélection de type résistance à un antibiotique dans les souches industrielles.

Les objectifs de cette thèse sont :

- dans un premier temps, de maitriser le développement de la reproduction sexuée dans des souches sauvages qui sont à la fois mâle et femelle fertiles et la reproduction entre souches sauvages femelles fertiles et souches industrielles mâles fertiles. L'étude de la reproduction sexuée chez *T. reesei* est récente et la littérature sur le sujet est limitée.

Étudier les étapes et les mécanismes du cycle sexué pourra nous permettre d'être plus efficace pour le développement d'outils,

- dans un second temps, de mettre en place cette reproduction sexuée entre des souches industrielles qui sont mâle fertile et femelle stérile, à l'aide de la stratégie originale de la « souche assistante » développée chez le champignon ascomycète *P. anserina* (Jamet-Vierny et al., 2007). Cette stratégie fait intervenir une souche qui « prêtera » sa capacité à développer des fructifications aux souches industrielles,
- dans un dernier temps, de mettre en application la reproduction sexuée entre les souches industrielles et les souches sauvages. Ce croisement a pour but de générer de la diversité génétique parmi laquelle de nouvelles souches améliorées pour leurs performances cellulolytiques seront isolées. Il permettra aussi d'identifier les mutations impliquées dans la production de cellulases et/ou dans d'autres phénotypes d'intérêt industriel. Pour l'identification des mutations, la technique du *Bulk Segregant Analysis*, associée aux nouvelles techniques de séquençage haut débit a été utilisée. Cette nouvelle méthodologie est en plein essor et n'a pas encore été utilisée chez *T. reesei.*

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériel biologique

Les souches utilisées dans le cadre de ce projet sont répertoriées dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Souches utilisées dans ce projet.

Nom	Type sexuel	Référence
CBS999.97 (ATCC204423)	*MAT1-1/ MAT1-2*	Lieckfeldt et al., 2000
QM6a (ATCC 13631)	*MAT1-2*	Mandels and Reese, 1957
RutC30 (ATCC 56765)	*MAT1-2*	Montenecourt and Eveleigh, 1977
QM9136 (ATCC 26920)	*MAT1-2*	Mandels, 1975; Linke et al., 2015
QM6a MAT1-1	*MAT1-1*	Linke et al., 2015
A2	*MAT1-1*	Cette étude
B31	*MAT1-2*	Cette étude
B31 ::Δ*MAT1-2-hph* n°60	Locus *MAT1-2* invalidé	Cette étude

2.2. Milieux et conditions standards de culture

Tous les milieux standards de culture sont préparés à l'aide du préparateur de milieu MEDIACLAVE (Integra) à partir de préparations déshydratées mélangées à de l'eau déminéralisée, puis autoclavés 20 minutes à 121 °C sauf mention contraire (Annexe 1). Vingt-cinq millilitres sont ensuite coulés dans chaque boîte de Pétri en conditions stériles à l'aide du distributeur de milieu MEDIAJET (Integra).

Les différentes souches sont ensemencées sur milieu gélosé Potato Dextrose Agar ou PDA (Difco Laboratories USA) à partir de conidies issues d'une boîte de culture ou d'un cryotube. Elles sont ensuite incubées à 30°C à la lumière. Après sporulation, les conidies peuvent être récupérées à l'aide d'un râteau et d'une solution stérile de CTS50 (137 g/l Saccharose ; 0,1M Tris-HCl ; 50mM CaCl2 ; pH 7,5) et conservées à -80 °C en cryotube.

Le PDA peut être rendu sélectif par ajout des antibiotiques hygromycine et phléomycine (Invivogen). L'ajout de 50 µg/mL d'hygromycine permet de sélectionner les cellules possédant dans leur génome le gène de résistance *hph*, codant pour une hygromycine B phosphotransférase. Ce gène confère une résistance à l'antibiotique hygromycine B, produit par la bactérie *Streptomyces hygroscopicus, en le phosphorylant*. L'ajout de 30 à 60 µg/mL de phléomycine (Invivogen) permet de sélectionner les cellules possédant dans leur génome le gène de résistance Sh *ble,* codant une protéine qui se fixe sur l'antibiotique, et l'empêche de couper l'ADN au sein duquel il se serait intercalé.

2.3. Étude de la reproduction sexuée

2.3.1. Reproduction sexuée

La reproduction sexuée par confrontation, arrosage, dicaryon/tricaryon se fait sur milieu PDA. Les boîtes sont ensuite incubées à 24 °C avec une alternance de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité après inoculation.

En confrontation, les souches sont ensemencées en ligne l'une en face de l'autre, avec environ 1,5 cm entre les deux souches. Chaque ligne contient de quatre à six inocula de la même souche provenant soit d'une boîte de conidies soit d'un cryotube.

En arrosage, la souche mâle, donneuse de conidies est ensemencée sept jours avant arrosage et incubée à 30 °C à la lumière pour favoriser la production de conidies. Trois jours avant arrosage, la souche femelle est inoculée et incubée à 24 °C à l'obscurité. Le jour de l'arrosage, 4 ml d'eau stérile sont déposés sur la souche mâle et les conidies sont récoltées à l'aide d'un râteau. Les conidies sont comptées et leur concentration ajustée entre 10^3 et 10^8 conidies/ml. La souche femelle est arrosée avec 1 ml de conidies réparties uniformément sur toute la boîte à l'aide d'un râteau.

Pour faire un dicaryon ou un tricaryon, les souches sont incubées séparément deux jours à 30 °C à l'obscurité pour éviter la formation de conidies. Un implant d'agar de 0,5 cm sur 0,5 cm de chacune des souches impliquées (deux pour dicaryon et trois pour un tricaryon) est découpé et placé dans un tube Eppendorf de 2 ml contenant 500 µL d'eau stérile. Les mycéliums sont mixés à l'aide du FastPrep®-24 (MP Biomedicals) pendant 20 s à une vitesse de 4 m/s et 10 µL du broyat sont déposés sur PDA.

2.3.2. Observation du cycle de reproduction sexuée

Trois séries de quatre boîtes du même croisement sont initiées à deux jours d'intervalle les uns des autres selon la méthode décrite au paragraphe 2.3.1. Tous les jours, les boîtes des croisements sont prises en photos à l'aide du scanner HP Scanjet G2710. Des prélèvements des structures (mycélium et stromata) apparaissant au fil de la cinétique sont effectués sur deux des quatre boîtes. L'agar contenant le mycélium est découpé, et le mycélium est coloré au Bleu-Lactophénol (Merck) puis observé à l'aide du microscope AxioImager M2p Carl Zeiss portant les objectifs N-Achroplan 40X et N-Achroplan 100x/1.25 Oil Iris M27 (Carl Zeiss) et les images ont été prises à l'aide de la caméra Axiocam 105 Color (Carl Zeiss). Les stromata à différents stades sont observés à l'aide de la loupe binoculaire Leica S8 APO qui permet un grossissement x10 à x80. Les images sont prises à l'aide de la caméra Leica

MC170 HD et traitées à l'aide du logiciel Leica Application Suite (LAS). Les coupes de stromata sont effectuées à l'aide de scalpel et de lame de rasoir.

2.3.3. Test MAT

Le test MAT permet de définir le type sexuel d'une souche. La souche à tester est inoculée 6 fois en ligne au milieu de la boîte de Petri. À chacun des deux pôles de la boîte sont inoculées la souche *MAT1-1* d'un côté et la souche *MAT1-2* de l'autre. La boîte est incubée à 24 °C avec une alternance de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité. Il y aura production de stromata à la confrontation de la souche testée avec une des deux souches « test » et par déduction, la souche testée est du type sexuel opposé à celui de la souche « test » avec laquelle elle se croise.
La validation moléculaire des types sexuels s'effectue par l'amplification d'un fragment interne de 1 kb pour le locus *MAT1-1* avec le couple d'amorces *MAT1-1*-F interne et *MAT1-1*-R interne (Tableau 6) ou d'un fragment de 500 pb pour le locus *MAT1-2* avec le couple d'amorce *MAT1-2*-F interne et *MAT1-2*-R interne (Tableau 6).

2.3.4. Obtention de descendants isolés à partir d'ascospores

Le milieu Agar-H_2O est utilisé pour la germination des ascospores et se compose de 15 g/L d'agar (VWR chemicals BDH Prolabo). Les ascospores expulsées sur le couvercle de la boîte de Pétri sont récupérées par rinçage avec la solution CTS50. Elles sont comptées à l'aide de la cellule de Malassez puis diluées pour qu'environ 30 à 50 ascospores soient étalées sur le milieu de germination, afin de faciliter la récupération des thalles. Les boîtes de Petri sont incubées à 30 °C à la lumière pendant 48 h minimum, jusqu'à apparition des colonies isolées. Puis les thalles isolés sont récupérés en découpant le morceau d'agar qui les contient l'aide d'une plume. Chaque thalle est repiqué sur PDA et incubé à 30°C jusqu'à l'apparition de conidies, puis purifié comme décrit plus bas (chapitre 2.5.2.3) et repiqué sur PDA.

2.3.5. Test de viabilité des ascospores

Les ascospores expulsées sur le couvercle de la boîte de Petri sont récupérées par rinçage avec la solution CTS50. Elles sont comptées, ajustées à une concentration de 1.10^6 cellules/ml et conservées dans des cryotubes à 4 °C, -20 °C et -80 °C (trois tubes par température et par temps). Le jour de la récolte puis après deux semaines, un mois et six mois de stockage, 2, 20 et 200 ascospores sont mises à germer sur milieu Agar-H_2O. Après 48 h d'incubation les colonies sont comptées. Chaque expérience est réalisée en triplicat.

2.3.6. Test d'incompatibilité végétative

Le protocole utilisé pour visualiser l'incompatibilité végétative par mort cellulaire est adapté de celui de Silar (2005). Les souches entre lesquelles le test d'incompatibilité végétative est effectué sont inoculées l'une en face de l'autre puis incubées à 30 °C à la lumière pendant 3 à 4 jours jusqu'à ce qu'elles entrent en confrontation. Puis, elles sont mises en contact avec 3 ml d'une solution de Bleu de trypan 0,05 % répartie de façon homogène à l'aide d'un râteau. La boîte de Petri est ensuite incubée pendant 10 min à température ambiante sur un agitateur à mouvement circulaire. Après incubation, le colorant est éliminé et la boîte de Pétri rincée à l'eau claire toutes les 10 min jusqu'à ce qu'apparaisse clairement une bande bleu foncé correspondant aux cellules mortes ou que l'eau de rinçage soit limpide.

2.3.7. Observation des anastomoses

Les souches à observer sont inoculées sur milieu Agar-H_2O et incubées à 30 °C à l'obscurité. Le mycélium obtenu est repiqué deux fois de suite sur milieu Agar-H_2O pour obtenir un mycélium grêle. Enfin il est repiqué sur milieu Agar-H_2O recouvert d'une feuille de cellophane (Biorad) et incubé à 30 °C à l'obscurité jusqu'à ce qu'il fasse quelques centimètres. Le jour de l'observation, la feuille de cellophane est découpée, et colorée avec la solution de Lactophénol-Blue (Lactophenol Cotton Blue Solution, Lactophenol Aniline Blue Solution -Sigma) diluée au demi. Les anastomoses sont observées à l'aide du microscope AxioImager M2p Carl Zeiss portant les objectifs N-Achroplan 40X et N-Achroplan 100x/1.25 Oil Iris M27 (Carl Zeiss) et les images ont été prises à l'aide de la caméra Axiocam 105 Color (Carl Zeiss).

2.4. Élaboration du plan d'expérience

Le plan d'expérience a été établi à l'aide du logiciel Design-Expert® Version 9. Les quatre facteurs sélectionnés pour l'étude sont la souche femelle (2 possibilités), la luminosité (3 possibilités), la durée de pré-incubation avant arrosage (3 niveaux) et la concentration de conidies utilisée pour l'arrosage (4 niveaux). Les différentes valeurs à tester pour chacun de ces facteurs sont résumées dans le paragraphe 3.1.4. La réponse est modélisée en utilisant un modèle quadratique, comprenant les effets principaux des quatre facteurs (4 termes), les effets d'interactions des facteurs 2 à 2 (6 termes), ainsi qu'un terme polynomial pour la concentration de conidies (1 terme). D'après le logiciel, 21 expériences au minimum sont nécessaires pour identifier les 11 termes du modèle. Dix-neuf expériences, dont des expériences en duplicata, ont été ajoutées pour améliorer la robustesse du modèle, et calculer sa précision. L'analyse statistique des résultats expérimentaux a été réalisée avec le même logiciel.

2.5. Transformations

2.5.1. Transformation bactérienne

Les cellules compétentes (DH5α, Top10, 10-beta) utilisées ont été achetées auprès de New England Biolabs (NEB). 50 µL de cellules sont mis en contact avec 1 à 5 µL de plasmide (soit 1 à 100 ng d'ADN). Le tube réactionnel est placé dans la glace pendant 30 minutes. La transformation se fait par un choc thermique à 42 °C pendant 30 secondes. Les cellules sont ensuite remises dans la glace pour 5 minutes. Une phase de régénération permet ensuite au gène de résistance de s'exprimer. Pour cela les cellules sont reprises dans le milieu SOC (950 µL) fourni et incubées 1 h à 37 °C avec une agitation de 225 rpm. 100 µL sont ensuite étalés sur milieu gélosé LB contenant l'antibiotique nécessaire à la sélection des clones ayant intégré le plasmide. Après une incubation à 37 °C sur la nuit, les colonies sont repiquées. Des PCR sur colonies sont ensuite réalisées pour vérifier la présence du gène d'intérêt. Les colonies portant le gène désiré sont alors mises en culture liquide en vue d'une extraction d'ADN plasmidique.

2.5.2. Transformation fongique par la méthode des protoplastes

2.5.2.1. Préparation des protoplastes

Les fioles de Roux contenant 200 mL de milieu Potato Dextrose ou PD (Difco Laboratories USA) sont ensemencées avec 200 µL de conidies et incubées à 30 °C durant 4 jours. Le mycélium est récupéré par filtration sur gaze et incubé à 37 °C dans du tampon KPam ($(NH4)_2SO_4$ à 0,6M, KH_2PO_4 à 25 mM, pH 5,8). Le mélange est à nouveau filtré et incubé 2 h 30 à 37 °C dans du KPam contenant 30 mg/mL de Glucanase (novozymes). Après digestion, les protoplastes sont filtrés sur du verre fritté et de la gaze. Le mélange est réparti dans 4 tubes corex et centrifugés 5 min à 4000G à 4°C. Les 4 culots sont suspendus dans du CTS-10 (27,4 g/l saccharose ; 0,1 M Tris HCl pH 7,5 ; 10 mM $CaCl_2$) et centrifugés. Les 4 culots obtenus sont réunis dans deux tubes qui sont centrifugés à nouveau. Les 2 nouveaux culots sont réunis dans un seul tube et recentrifugés. Les protoplastes obtenus sont suspendues dans du CTS-50 (137 g/l saccharose ; 0,1 M Tris-Hcl pH 7,5 ; 50 mM $CaCl_2$) afin d'obtenir une concentration de 2.10^8 protoplastes/mL et sont conservés à -80 °C jusqu'à leur utilisation.

2.5.2.2. Transformations des protoplastes

5 µL d'ADN sont additionnés à 45 µL des protoplastes et le mélange est incubé 10 min à température ambiante. Après addition de 500 µL de PEG (60 % polyéthylène glycol 4000 ; 10 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 50 mM $CaCl_2$), on incube à nouveau 20 min à température ambiante avant d'ajouter

450 µL de CTS50. Ce mélange est additionné de 40 mL de PDA en surfusion contenant 0,8 M de saccharose et de l'antibiotique adéquat puis coulé sur boîtes de sélection PDA. Les boîtes de transformation sont incubées 3 jours à 30 °C.

2.5.2.3. Purification des transformants

Plusieurs étapes de purification sont alors nécessaires. Les colonies sont d'abord repiquées une première fois sur milieu sélectif. À partir de ce repiquage, elles sont isolées par stries sur le même milieu sélectif. Une colonie isolée est alors repiquée à l'aide d'un cure-dent stérile selon le schéma ci-dessous.

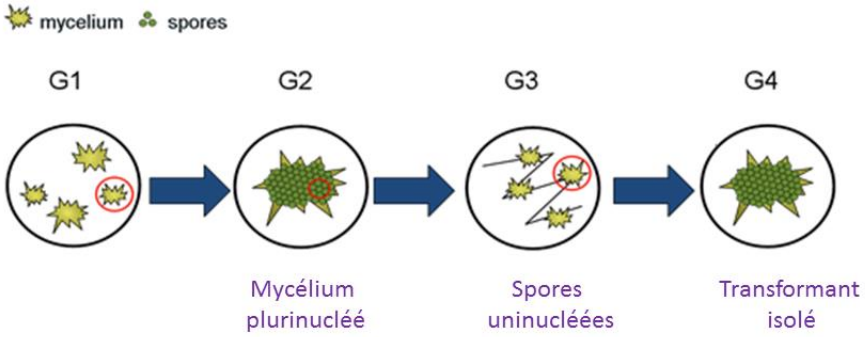


Figure 25 : Etapes de purification des transformants (IFPEN)
G1 : génération 1 : il s'agit de la boîte sur laquelle les protoplastes ont été étalés après la transformation,
G2 : génération 2 : les transformants sont repiquées sur milieu sélectif,
G3 : génération 3 : les conidies sont isolées par stries avec une oese stérile,
G4 : génération 4 : un thalle isolé est repiqué pour donner un transformant isolé et purifié.

2.5.3. Transformation fongique par électroporation des conidies

Une semaine avant l'électroporation, les souches sont mises en culture pour produire les conidies. Ces dernières sont récoltées dans de l'eau milliQ stérile et centrifugées à 4000 g pendant 10 min deux fois de suite afin de les rincer puis sont suspendues dans 95 µL du sorbitol 1,1 M froid. Les conidies sont mises en contact avec 5 µL d'ADN (750 ng/µL à 1 µg/µl) et le mélange est transféré dans une cuve pour être l'électroporation qui est réalisée en utilisant les paramètres suivants : 1.8 kV, 800 Ω et 25 µF.

Une fois le choc électrique appliqué, les cellules sont régénérées dans une solution de PD additionnée de sorbitol 1,1 M, à 30 °C avec une agitation douce (120 rpm) pendant 3 à 5 heures. Les cellules régénérées sont rincées à l'eau milliQ stérile par centrifugation à 3000 g pendant 10 min puis 5000 g pendant 5 min et suspendues dans 200 µL d'eau milliQ stérile. Enfin, les conidies transformées sont étalées sur les milieux contenant les antibiotiques appropriés et incubées pendant 2 à 3 jours à 30 °C. Comme précédemment, les transformants obtenus sont purifiés.

2.6. Construction de souches

Le logiciel de bio-informatique Geneious® 9.1.8 (Kearse et al., 2012) a été utilisé pour construire théoriquement les différents plasmides de cette section, pour dessiner les amorces utilisées dans ce manuscrit et aligner les séquences d'ADN. Toutes les amorces utilisées au cours de ce travail sont répertoriées dans le Tableau 6.

2.6.1. Invalidation du locus MAT

Pour construire la cassette de délétion du locus *MAT1-2*, le gène de résistance à l'hygromycine B et les séquences 5' et 3' du locus *MAT1-2* sont assemblés dans le plasmide pUC19 (Figure 11) grâce au Gibson Assembly Kit (New England Biolabs) en suivant les recommandations du fabricant. Le plasmide receveur pUC19 a préalablement été digéré par les enzymes XbaI et EcoRI. Les séquences adjacentes en amont (1,5 kb) et en aval (1,1 kb) du locus *MAT1-2* ont été amplifiées en utilisant respectivement les couples d'amorces 5'*MAT1-2*-F/5'*MAT1-2*-R (Tableau 6) et 3'*MAT1-2*-F / 3'*MAT1-2*-R (Tableau 6). Ces amorces contiennent des régions d'homologies permettant la fusion avec pUC19 d'un côté et le gène de résistance à l'hygromycine de l'autre. Le gène de résistance à l'hygromycine B (2,6 kb) a été amplifié à partir du plasmide pUT1140 à l'aide des amorces *MAT1-2*/Hph-F et *MAT1-2*/Hph-R (Tableau 6).

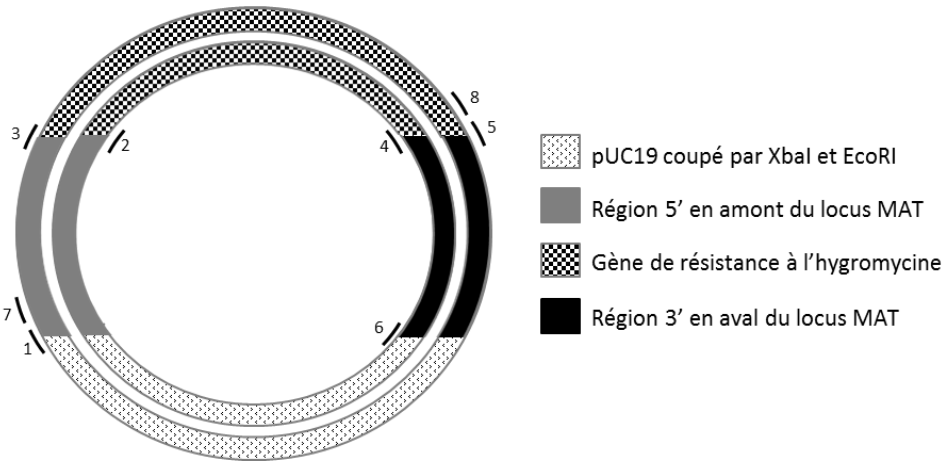


Figure 26 : Assemblage final de la cassette de délétion dans le plasmide pUC19.
Les traits correspondent aux amorces qui ne sont pas positionnées à l'échelle. Les numéros correspondent aux amorces : 1 = 5'*MAT1-2*-F ; 2 = 5'*MAT1-2*-R ; 3 = *MAT1-2*/Hph-F ; 4 = *MAT1-2*/Hph-R ; 5 = 3'*MAT1-2*-F ; 6 = 3'*MAT1-2*-R ; 7 = K7-Del-*MAT1-2*-F et 8 = K7-Del-*MAT1-2*-R.

Dans un second temps, la cassette de délétion (5,2 kb) est amplifiée à partir du plasmide construit à l'aide des amorces K7-Del-*MAT1-2*-F et K7-Del-*MAT1-2*-R. Les produits PCR obtenus sont purifiés à l'aide du QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) et utilisés pour transformer les protoplastes de la souche B31. Les transformants sont sélectionnés sur PDA-hygromycine. Les transformants, purifiés

puis soumis à un crible phénotypique consistant à croiser les transformants B31 avec la souche compatible A2 : si le locus MAT a bien été invalidé, alors il n'y aura pas de reproduction sexuée. Puis, une amplification PCR permet de vérifier d'un point de vue moléculaire que le gène natif a bien été remplacé par la cassette de délétion. Cette validation se fait en deux étapes : vérifier la présence du gène natif et vérifier l'insertion de la cassette d'invalidation au locus. L'amplification d'un fragment interne de 500 pb au locus *MAT1-2* s'effectue à l'aide des amorces *MAT1-2*-F interne/*MAT1-2*-R interne en tandem avec celles du gène de ménage *tef1*, EF1 et EF2, qui amplifient 880 pb. L'insertion au locus est vérifiée par les couples d'amorces D*MAT1-2*verif5F/verifHygro5' et D*MAT1-2*verif3R/verifHygro3' qui amplifient respectivement 3 kb et 3,1 kb. Les différentes amorces utilisées sont positionnées comme représentées sur la Figure 27.



Figure 27 : Position des amorces choisies pour l'amplification des différents fragments de la cassette d'invalidation.
Les amorces bleues permettent d'amplifier le gène natif tandis que les amorces rouges (1) et vertes (2) permettent d'amplifier les jonctions 5' et 3' qui témoignent de l'insertion au locus de la cassette d'invalidation.

La même stratégie a été utilisée pour invalider le locus *MAT1-1* de la souche A2 en utilisant les amorces *MAT1-1*-A et *MAT1-1*-B pour amplifier la région adjacente 5' de 1,5 kb, les amorces *MAT1-1*-C et *MAT1-1*-D pour amplifier la région adjacente 5' de 1,6 kb et les amorces *MAT1-1*-E et *MAT1-1*-F pour amplifier le gène de résistance à l'hygromycine de 2,6 kb. La cassette d'invalidation d'une taille totale de 5,7 kb est amplifiée avec les amorces Del*MAT1-1*-A et Del*MAT1-1*-D puis transformée dans des protoplastes de la souche A2 qui sont sélectionnés sur PDA-hygromycine. Les transformants obtenus sont purifiés puis croisés avec la souche compatible B31. Puis, une amplification d'un fragment interne de 1000 pb du locus *MAT1-1* natif est faite, à l'aide des amorces *MAT1-1*-F interne et *MAT1-1*-R interne, en tandem avec celles du gène de ménage *tef1*. Les jonctions 5' et 3' n'ont jamais été amplifiées étant donné que le locus *MAT1-1* n'était pas invalidé.

2.6.2. Remplacement du locus MAT

Pour le remplacement du locus *MAT1-2* selon la stratégie présentée (Figure 47B), les 5,5 kb du locus *MAT1-1* ainsi que les 3,3 kb et 1,9 kb des régions le bordant (soit un total d'environ 11 kb) sont amplifiés avec la LongAmp *Taq* DNA Polymerase (New England Biolabs) à l'aide des amorces Mat 1-1-F et Mat 1-1-R. Le fragment *MAT1-1* de 11 kb est co-transformé avec le plasmide pUT1140 porteur du gène de résistance à l'hygromycine B, dans des protoplastes de la souche QM6a. Les

transformants purifiés obtenus sont criblés pour leur capacité à se croiser avec la souche B31. Aucun transformant n'a été obtenu par cette méthode.

Pour le remplacement du locus *MAT1-2* selon la stratégie alternative présentée (Figure 52), le locus *MAT1-1* ainsi que ses régions adjacentes d'environ 11 kb sont amplifiés comme précédemment. Puis le fragment de 11 kb est cloné dans le plasmide commercial TOPO® XL PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific). Pour cela, le mélange de ligation (PCR-XL-TOPO® vector) est ajouté aux fragments d'ADN générés par PCR contenant des nucléotides A libres à leurs extrémités. Le plasmide fournit par le kit fait 3,5 kb et contient le gène de résistance à la kanamycine chez *E. coli*. Le mélange est incubé 16 h à 16 °C puis 10 min à 65 °C puis transformé dans les cellules compétentes Top10 *d'E. coli*. Toutefois, j'ai rencontré plusieurs difficultés : tout d'abord, comme la taille de la cassette à construire était de 11 kb, j'ai dû trouver un moyen adapté pour la purifier. Les colonnes de purification disponibles (QIAquick PCR Purification kit) au laboratoire sont limitées à des fragments de 10 kb et les autres colonnes de purification testées (QIAEX II Gel Extraction Kit et Zymoclean Large Fragment DNA Recovery Kit) et adaptées aux grands fragments ont un rendement insuffisant. Finalement, le moyen le plus efficace a été d'utiliser les colonnes fournies dans le kit d'extraction d'ADN plasmidique QIAprep® Miniprep. Néanmoins, le clonage du locus *MAT1-1* dans ce plasmide n'a jamais abouti.

2.6.3. Complémentation de l'invalidation du locus *MAT1-2*

Pour construire le plasmide de complémentation, le locus *MAT1-2* ainsi que le gène de résistance à la phléomycine ont été assemblés dans le plasmide pUC19, préalablement digéré par les enzymes EcoRI et BamHI, grâce au Gibson Assembly Kit (New England Biolabs) selon les recommandations du fabricant. Le locus *MAT1-2* de 3,2 kb a été amplifié avec les amorces Comp*MAT1-2*-F et Comp*MAT1-2*-R à partir de l'ADN de la souche B31 tandis que le gène de résistance de 2,1 kb a été amplifié avec les amorces Comp-PhleoF et Comp-PhleoR à partir du plasmide pUT1040.

Deux plasmides de complémentation sont séquencés pour s'assurer qu'ils ne contiennent pas de mutations. Ils sont ensuite transformés dans des protoplastes de la souche B31::Δ*MAT1-2-hph n°60* qui sont sélectionnés sur milieu PDA contenant 50 µg/µL de phléomycine. Les transformants purifiés sont soumis à un crible de sélection qui consiste à les croiser avec la souche stérile QM6a *MAT1-1*. Seuls les transformants ayant intégré le plasmide de complémentation dans leur génome sont capables de faire de la reproduction sexuée avec la souche QM6a *MAT1-1*. Enfin l'ADN des transformants positifs est extrait et la présence de la cassette de complémentation est vérifiée en amplifiant la jonction « locus *MAT1-2*/gène de résistance à la phléomycine » de 2 kb à l'aide des amorces *MAT1-2*-F interne et Phleo-internR.

2.6.4. Construction des souches sauvages marquées

Les souches sauvages A2 et B31 ont été transformées par électroporation avec les plasmides pUT-1040 et pUT-1140, portant respectivement un gène de résistance à la phléomycine et à l'hygromycine. Les transformants ont été sélectionnés sur milieu PDA contenant l'antibiotique approprié puis purifiés. La présence du gène de résistance a ensuite été vérifiée par PCR grâce aux couples d'amorces Hygro-Intern-F/ Hygro-Intern-R et Phleo-Intern-F/ Phleo-Intern-R, qui s'hybrident à l'intérieur des gènes de résistance. Ces amorces permettent d'amplifier un fragment de 1000 pb pour la phléomycine et de 843 pb pour l'hygromycine. Enfin, le type sexuel de chaque transformant a été vérifié à l'aide du test MAT afin de s'assurer qu'il est bien celui attendu.

2.7. Extraction de l'ADN

2.7.1. ADN plasmidique

Afin d'extraire un plasmide bactérien, les souches sont incubées 16 h dans 45 mL (ou 5 mL) de LB broth additionné de l'antibiotique adéquat. L'extraction se fait grâce au kit QUIAGEN Plasmid *Plus* Midi Kit ou QIAprep Spin Miniprep Kit (QUIAGEN).

2.7.2. ADN génomique

Les ADN génomiques pour des besoins de biologie moléculaire sont obtenus par extraction au phénol/chloroforme. Cinq inocula par souches sont déposés sur boîte de PDA comportant une feuille de cellophane (Biorad). Les boîtes sont incubées à 30 °C pendant 48 h maximum et à l'obscurité pour éviter la conidiation. Un quart du mycélium est transféré dans des tubes de broyage Lysing Matrix C, 2 mL Tube (MP Biomedicals) pour l'extraction tandis que le reste du mycélium est conservé à -20 °C. 600 µl de la solution TNE/SDS (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM et SDS 2 %) à préparer à partir d'un stock de SDS 20 % et d'une solution de TNE 2X. Le mycélium est broyé à l'aide du FastPrep®-24 (MP Biomedicals) pendant 20 s à une vitesse de 4 m/s. Un volume de phénol pH8 (Roti®-Phenol / Carl Roth) est ajouté puis incubé 5 min et centrifugé à 13 000 rpm. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube de 2 mL et un volume de phénol + chloroforme est ajouté, incubé 5 min et centrifugé à 13 000 rpm. Le surnageant est transféré à nouveau et un volume chloroforme Chloroforme 99,0-99,4 % stabilisé AnalaR NORMAPUR® ACS (VWR) est ajouté, incubé 5 min et centrifugé à 13 000 rpm. Enfin l'ADN est précipité en ajoutant 2 volumes d'EtOH 100° et 1/10^{e} de volume de AcNa 3 M pH = 6 et centrifuger 10 min à 13 000 rpm. Le culot est rincé à l'EtOH 70°, puis séché et resuspendu dans 100 µL d'eau milliQ stérile. La concentration de l'ADN est mesurée à l'aide d'un Nanodrop 1000 (Thermo scientific) selon les recommandations du fabricant.

L'ADN des souches à séquencer a été extrait et purifié selon le protocole fourni par Francis Martin et modifié par le professeur Pietro Spanu, disponible sur le site du JGI à l'adresse suivante : http://1000.fungalgenomes.org/home/protocols/high-quality-genomic-dna-extraction/.

Deux Erlenmeyers de 250 mL par souche contenant 100 mL de milieu PD et 50 µg/µL de tétracycline sont ensemencés avec 100µL de conidies puis incubées dans un Infors à 30 °C et une agitation de 150 rpm pendant cinq jours. Le milieu de culture est filtré sur filtre Whatman GF/C 0.2 µm et le « gâteau » de mycélium est rincé plusieurs fois à l'eau milliQ stérile pour éliminer tous les pigments jaunes. Le mycélium est pesé et quatre échantillons de 500 mg chacun sont congelés à l'azote liquide et conservés à -80 °C jusqu'à l'extraction. L'ADN obtenu au terme de l'extraction est mesuré du Fluorimètre Qubit 2.0 (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant.

2.8. PCR et amorces

Pour les amplifications de moins de 6 kb, le mélange réactionnel pour la PCR contient 1X du tampon de réaction Q5, 0,2 mM de dNTP, 0,5 µM de chaque amorce, 0,02 U/µL de la Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) et la matrice ADN.

Pour les amplifications de plus de 6 kb, le mélange réactionnel pour la PCR contient 1X du tampon de réaction LongAmp *Taq*, 0,3 mM de dNTP, 0,4 µM de chaque amorce, 0,1 U/µL de la LongAmp® Taq DNA Polymerase (New England Biolabs) et la matrice ADN.

Pour les PCR de vérifications, le mélange réactionnel pour la PCR contient le tampon de réaction One Taq Standard 5X, 0,2 mM de dNTP, 0,2 µM de chaque amorce, 0,125 U/µL de la LongAmp® Taq DNA Polymerase (New England Biolabs) et la matrice ADN.

Les fragments PCR sont déposés sur gel d'agarose et migrent dans le tampon TBE 1X (89 mM Tris-Borate ; 2 mM EDTA) à 100 V pendant 1 h. Les échantillons sont mélangés au tampon de charge EZ-Vision DNA Dye and Buffer 6X (Amresco) et sont visualisés à l'aide du trans-illuminateur UV G-box (Syngene). Nous avons utilisé le marqueur de poids moléculaire 2-log DNA Ladder (New England Biolabs) qui contient des fragments de taille connue et comprise entre 0,1 et 10 kb.

Tableau 6 : Récapitulatif des amorces utilisées au cours de ce projet de thèse.
Les amorces ont été dessinées avec le logiciel Geneious® 9.1.8 (Kearse et al., 2012).

Nom des amorces	Séquence des amorces (5' -> 3')
5'*MAT1-2*-F	TGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGACCCTTCCTGACCCTGGACTG
5'*MAT1-2*-R	GGTACACTTGGACTGCGTTGACTGATGGTG
MAT1-2/Hph-F	CAACGCAGTCCAAGTGTACCTGTGCATTCTG
MAT1-2/Hph-R	CCTTTGCCAAGGCAGTGCTAGTGTGTGTAC
3'*MAT1-2*-F	TAGCACTGCCTTGGCAAAGGCTAGACACTAC
3'*MAT1-2*-R	TTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCATGTACAATTACCACATGCG
K7-Del-*MAT1-2*-F	CCAGGGCTTTGAGAGCAGTA
K7-Del-*MAT1-2*-R	CTGGTGGCTGACACTTGCTA
D*MAT1-2*verif5F	GTACTGGTTGTTGGGCTGTG
D*MAT1-2*verif3R	CGGAGCAACTCTCAGGAAAC
verifHygro5'	CTCCGTAACACCCAATACGC
verifHygro3'	CTCTGGGCAAAGCACCAATC
Mat 1-1-F	CATCGAAGCATCTACCTACTTG
Mat 1-1-R	CGAAGCGAAACACACGAC
MAT1-1-A	TGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGATGACGGCGTAGAAAGAGG
MAT1-1-B	GGTACACTTGTTTAGAGAACGCAGGTGGATCAGAATC
MAT1-1-C	ACACACACTAGCACTGCCCAGAGCCTCGTTCTTTCTCG
MAT1-1-D	TTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCCGAAGCGAAACACACGAC
Mat 1-1-F	CATCGAAGCATCTACCTACTTG
Mat 1-1-R	CGAAGCGAAACACACGAC
MAT1-1-F interne	GTTGAATGGCGAGGATAGGA
MAT1-1-R interne	GGTGAATTCTGCCGAGTGAT
MAT1-2-F interne	TTCAGTGTTGGCCATTTTGA
MAT1-2-R interne	GCTTCTCAAGCAAGGCAAGT
EF1	ATGGGTAAGGAGGACAAGAC
EF2	GGAAGTACCAGTGATCATGTT
Comp*MAT1-2*-F	TTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCCCTTCCTGACCCTGGAC
Comp*MAT1-2*-R	CTGCCCCACCAGACTGTCGTGCTTACTGC
Comp-PhleoF	ACGACAGTCTGGTGGGGCAGTGCTAGTG
Comp-PhleoR	CCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCTAGAAAGAAGGATTACCTCTAAACAAGTG
Hygro-Intern-F	ATTTGTGTACGCCCGACAG
Hygro-Intern-R	CTCGGAGGGCGAAGAATCTC
Phleo-Intern-F	GTGGATCTCCGAGGAGCTTG
Phleo-Intern-R	TCTGCAACCAAATCCACCCT
BGL1-verif-F	TCGCTATGCCTTCAAGACGG
BGL1-verif-R	GCATTGGTGAGAGCTGGACC
BGL1-seq-F	CGTGGACAGTTCATCGGTGA
BGL1-seq-R	CGTTCCAGTCCGTCATGACA
Cre1-verif-F	AGCAGGGGAGAAATGGAAGC
Cre1-verif-R	ATTCCATCCAAGCGAGCCAA
5'-F-85kb	CGGCCCAACGCATATTATAG
5'-R-verif85kb	GTGATGAGGAGGATGCGAGG
Del85kb-F	CAGCATCCCCGCACAGATAT
3'-R-85kb	ACGGCGAATCTACCACAGTC
IDC1-F	CGGTTCGTCGTGAGCTATGA
IDC1-R	CGGTCCAAGGGTGAAGAGAC
IDC1-seq-F	TGTGGGATCTAATGACGGGC
IDC1-seq-R	AGGAAGTTCTCGTTCCTGCG
Xyr1-F	GTCCCCCAATCCAACGTCAT
Xyr1-R	TCCATGACGGACGAGTTTGG
Xyr1-seq-F	TATAGTGCAAGAAGCTCGCG
Xyr1-seq-R	GTTTGGCGATAGTCCCCGG

2.9. Criblage de souches Ru-A

2.9.1. Crible primaire : culture en microplaque

Pour le crible primaire les souches sont cultivées dans le milieu F45 Solka Floc additionné de 10 g de lactose (Annexe 1) qui permet d'induire la production de cellulases. La culture se fait en plaques de 24 puits contenant 2 ml de milieu. Les plaques ensemencées sont scellées avec des films adhésifs poreux (VWR) et incubées à 30 °C sous agitation douce (125 rpm) pendant 7 jours. Le mycélium est récupéré dans des Eppendorf de 2 ml et conservé à -20 °C pour d'éventuelles vérifications de biologie moléculaire. Le dosage de la concentration des protéines produites est réalisé sur le surnageant par la méthode Bradford (Bradford, 1976) avec le kit Protein Assay Kit II (Biorad, Hercules, États-Unis d'Amérique) selon les recommandations du fabricant. Il s'appuie sur une gamme de sérum-albumine bovine (BSA, 0 - 1,5 g.L-1). Trois réplicas biologiques sont effectués pour ce crible primaire.

2.9.2. Crible secondaire : culture en fioles alimentées

Les souches sont cultivées en fioles alimentées selon le protocole mis en place par Jourdier et al., 2012). Une pré-culture (correspondant à la phase de croissance) est réalisée en fiole Fernbach pendant 72 h à 30 °C et 150 rpm. Le milieu de culture pH 6 utilisé contient 0,8 mL/L H_3PO_4 85 %, 4.2 g/L $(NH_4)2SO_4$, 0,3 g/L $MgSO_4$, $7H_2O$, 0,15 g/L $CaCl_2$, 1 mL de la solution d'oligoéléments, 1,5 g/L cornsteep, 6 g/L di-potassium phtalate. Suite à la pré-culture, le pH est remonté à 5 et 50mL du volume de préculture est réparti dans des fioles Erlenmeyer de 250 mL, puis incubé à 27°C et 150 rpm en incubateur Infors. Chaque fiole est alimentée par le système de pompe FedBatchPro (Dasgip) à 0,3 mL/h avec une solution contenant 50 g/L de sucres totaux, 0,8 g/L de (NH4)2SO4, (stérilisé par filtration) et 160 mM NH3 (ajouté sous hotte). La culture dure 96 h.

2.9.3. Culture en bioréacteurs de laboratoire

Les souches sélectionnées lors du crible secondaire sont cultivées en bioréacteurs de laboratoire, avec le système Fed-batch Pro (Dasgip) composé de quatre réacteurs de 1,5 L (0,75 L utile) qui permet de cultiver en parallèle quatre souches. Les réacteurs additionnés des sondes étalonnées de température, de pH et d'oxygène dissous, et des piquages pour l'alimentation et la régulation de pH sont préparés puis leur étanchéité est vérifiée. Puis ils sont remplis avec 375 mL (50 %v/v) de milieu 4N (Annexe 1) et stérilisé à l'autoclave 20 minutes à 121 °C. Une solution contenant 11,25 g de dans 300 mL est stérilisée à part, puis ajoutée dans le réacteur (donnant une concentration de 15 g/L pour la phase de croissance en batch). Puis le réacteur est ensemencé avec 75 mL de pré-culture (paragraphe 2.9.2). La phase de croissance ou batch a lieu jusqu'à consommation complète du glucose, avec un pH régulé à

4,8, une température de 27 °C, et un taux d'oxygène dissous à 40 % de la saturation. La phase de de production ou fed-batch s'effectue avec alimentation à 2,5 mL/h avec une solution de lactose à 250 g/L. La température de culture est abaissée à 25 °C et le pH à 4. L'antimousse Struktol® SB 2121 est ajouté si nécessaire. Pendant toute la fermentation, le pH est régulé automatiquement par ajout d'une solution de NH_4OH à 5,5N et des prélèvements sont effectués pour mesurer la concentration en biomasse, la concentration en protéines, et la concentration résiduelle en sucres.

2.9.4. Mesure d'activité enzymatiques

L'activité enzymatique cellulase FP (Filter paper) (Figure 28) est mesurée selon le protocole standardisé par l'IUPAC (Ghose, 1987). Comme l'hydrolyse du papier filtre par le cocktail enzymatique n'est pas linéaire, on recherche la dose d'enzyme qui réalise 4 % d'avancement de la réaction d'hydrolyse en 1 h.

Les solutions enzymatiques à doser sont diluées dans du tampon citrate 50 mM pH 4,8 afin d'avoir environ 0.2 g/L de concentration en protéines. Puis une gamme de dilutions enzymatiques est préparée avec 25, 50, 75 et 100 µL de solution à doser diluée dans du tampon citrate (volume final 100 µL) dans des tubes de 2 mL.

Pour l'hydrolyse, un disque en papier Whatman N°1 de 6 mm de diamètre (préparé avec une perforatrice de bureau) est ajouté dans chaque tube, puis ceux-ci sont placés au bain-marie à 50 °C pendant 1 h. Les sucres réducteurs libérés lors de l'hydrolyse sont mesurés par la méthode DNS aussi appelée dosage au 3,5-dinitrosalicylique (3,5-DNS). Lorsque le réactif alcalin DNS réagit avec les sucres réducteurs libérés. Le 3,5-DNS est alors converti en 3-amino-5-nitrosalicylique de couleur orange. L'intensité de la couleur est mesurée par absorbance.

Le réactif DNS est préparé comme suit : pour 1 L de solution, dissoudre dans l'ordre dans 500 mL d'eau distillée 10 g de soude NaOH, 10 g d'acide 3,5 dinitrosalicylique, 0,5 g de sulfite de sodium, 2 g de phénol, 200 g de tartrate double de sodium et potassium, puis compléter à 1 L par de l'eau distillée. La solution est stockée à 4°C. Pour la mesure, l'échantillon contenant 200 µL du réactif DNS est dilué avec environ 1,7 volumes d'eau distillée, puis porté à ébullition pendant 5 minutes. Pour la lecture, le liquide total est transféré dans une cuve de lecture, puis laissé reposer 20 minutes pour que les résidus solides de filtre décantent. L'absorbance est mesurée à 540 nm.

Le calcul des concentrations équivalentes en glucose est réalisé grâce à une gamme de glucose de 0,5, 1 et 1,5 g/L réalisée en parallèle des échantillons, avec soustraction de la concentration en glucose mesurée dans un témoin avec substrat papier filtre mais sans enzyme.

Pour le calcul de l'activité, la gamme de 4 dilutions enzymatiques est modélisée par régression polynomiale d'ordre 2 pour rechercher la dilution enzymatique théorique qui aurait réalisé 4 % d'avancement (soit 1,04 g/L de glucose pour 4 % d'hydrolyse d'un filtre de 2,6 mg dans un volume de

100 µL). Pour cette dilution théorique, on peut alors calculer l'activité enzymatique du cocktail, en µmol min-1 mL-1 (ou IU/mL).

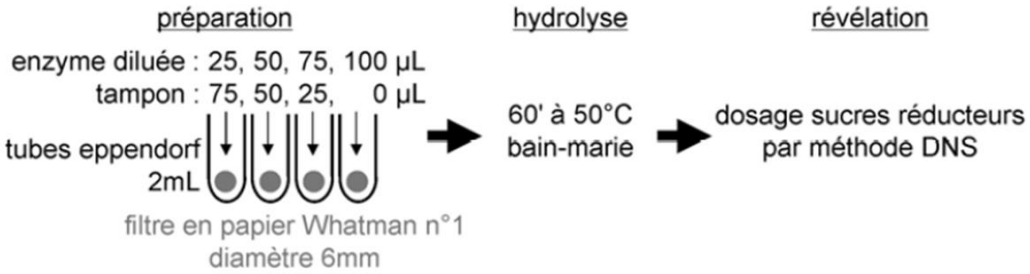


Figure 28 : Protocole pour le dosage de l'activité FP
Tiré de la thèse d'Etienne Etienne Jourdier.

2.9.5. Dosage de l'activité β-glucosidase

L'activité enzymatique de la β-glucosidase est mesurée par hydrolyse de *p*-nitrophenyl-β-Dglucopyranoside (pNPG, réactif incolore), qui libère du *p*-nitrophénol (pNP, produit jaune), dosé en milieu alcalin par absorbance à 410 nm. Les échantillons à doser sont dilués dans du tampon citrate 50 mM additionné de 0,5 g/L d'albumine sérique bovine (ou Bovine Serum Albumin) pour avoir une concentration en protéines de l'ordre de 50 à 100 mg/L.

Pour l'hydrolyse, 10 µL de dilution enzymatique et 90 µL de substrat pNPG préparé à 5 mM dans du tampon citrate 50 mM pH 4,8 dans des tubes de 1,5 mL. Les tubes sont placés 30 minutes au bain marie à 50 °C. 100 µL de Na_2CO_3 2 % sont ajoutés pour la révélation. Après 20 minutes d'incubation l'absorbance est mesurée à 410 nm, et la concentration équivalente en *p*-nitrophénol est calculée grâce à une gamme à 25, 50, 100 et 200 µM de tampon citrate 50 mM additionné de 0,5 g/L d'sérum-albumine bovine (BSA).

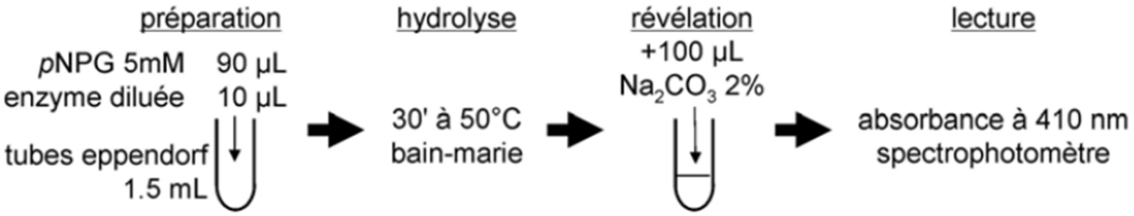


Figure 29 : Protocole pour le dosage de l'activité β-glucosidase
Tiré de la thèse d'Etienne Etienne Jourdier.

2.10. BSA-Seq

2.10.1. Criblage sur milieu AZCL-He-Cellulose

Le milieu de criblage AZCL-He-Cellulose est un milieu minimum (Annexe 1) contenant 0,1 % d'AZCL-He-Cellulose (Megazyme). Il est autoclavé à 110 °C pendant 20 min puis coulé dans des plaques de 24 puits contenant 2 ml de milieu. La lecture de ce crible se fait après une semaine d'incubation à 30 °C par le dessous de la plaque car le mycélium et les conidies recouvrant la surface sur milieu masquent les couleurs et la présence de cristaux caractéristiques de la cellulose non hydrolysée. La lecture du crible est fixée de la façon suivante : si le milieu reste transparent, alors le descendant testé ne produit pas de cellulases tandis que si le milieu devient bleu alors il y a eu sécrétion de cellulases

2.10.2. Préparation de librairies, séquençage et assemblage du génome de la souche A2

La construction des banques, le séquençage et l'assemblage ont été réalisés par la plateforme de Séquençage à Haut Débit de l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC) de Saclay (http://www.i2bc.paris-saclay.fr/).

Les librairies paired-end et mate-pair ont été construites en utilisant respectivement le « Nextera DNA Library Prep Kit » (Illumina) et le « Nextera Mate Pair Library preparation kit » (Illumina) selon le protocole « Gel-plus 3-5kb » en suivant les recommandations du fabricant. La qualité de la bibliothèque a été évaluée à l'aide d'un Bioanalyseur (Agilent technologies) avant le séquençage sur un appareil Miseq System (Illumina).
8,3 et 9,7 millions de lectures (reads) paired-end de 250 nucléotides ont été produits respectivement à partir des librairies paired-end et mate-pair. L'analyse d'images, l'appel de bases (base calling) ont été effectués à l'aide du pipeline d'analyse de données Illumina. La qualité des lectures a été vérifiée par FastQC 0.10.1. Les séquences adaptateurs ont été coupées en utilisant le logiciel Cutadapt-1.3 et les adaptateurs internes des fragments mate-pair ont été coupés à l'aide de Nextclip-1.3.1. Un script de filtrage « fait maison » a été ajouté pour garder la plus longue partie 3' de chaque lecture qui doit contenir une qualité de base supérieure à 30 pour tous les nucléotides. Avant de lire l'assemblage avec Velvet, la commande fastx_reverse_complement de l'outil fastx a été utilisée pour « reverse-complement » les lectures 1 et 2 issues des fragments mate-pair.
Un assemblage Velvet_1.2.10 à partir des lectures paired-end et mate-pair en utilisant une longueur k-mer de 89 et le scaffolding a produit 54 contigs/scaffold dont l'analyse révèle un N50 qui équivaut à 1,4 Mb et le contig le plus long est égal à 2,7 Mb.

2.10.1. Culture et extraction de l'ADN des groupes de ségrégants

Les descendants de chaque groupe sont cultivés individuellement en microplaques de 12 puits contenant du milieu PD et 50 µg/mL de tétracycline. Les microplaques sont incubées dans un Infors à 30 °C et avec une agitation de 150 rpm pendant cinq jours. Le contenu de chaque puits est filtré sur filtre Whatman GF/C 0,2 µm et le « gâteau » de mycélium est rincé plusieurs fois à l'eau milliQ stérile pour éliminer tous les pigments jaunes. Pour chaque descendant, 50 mg de mycélium sont pesés puis congelés à l'azote liquide et conservés à -80 °C jusqu'à l'extraction. Le jour de l'extraction, les mycéliums de chaque groupe sont regroupés et soumis au protocole d'extraction présenté à la section 2.7.2. L'ADN obtenu est conservé à -80 °C jusqu'à ce qu'il soit envoyé au séquençage.

2.10.2. Séquençage des groupes de descendants et détection des polymorphismes

La construction des banques, le séquençage et l'analyse des données ont été réalisés par la plateforme de Séquençage à Haut Débit de l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC) de Saclay (http://www.i2bc.paris-saclay.fr/).

La librairie paired-end a été préparée en utilisant le « Nextera DNA Library Prep Kit » (Illumina) suivant les recommandations du fabricant. La qualité de la bibliothèque a été évaluée à l'aide d'un Bioanalyseur (Agilent technologies) avant le séquençage paired-end de 250 nucléotides sur un appareil Miseq System (Illumina).

Après séquençage, les séquences adaptateurs ont été coupées par le logiciel Cutadapt-1.3. Les lectures sont positionnées contre le génome de la souche A2 à l'aide de logiciel BWA-0.6.2 en utilisant un algorithme d'échantillon. L'étape de filtrage par le programme Samtools-1.3.1 a permis d'éliminer les lectures multiples ou dupliquées et a permis d'obtenir 6,2 et 5,6 millions de lectures provenant respectivement des groupes cellulase-positif (couverture de 67x) et cellulase-négatif (couverture de 61x). Les variants ont finalement été détectés en alignant les séquences des deux groupes en utilisant Freebayes soft v1.0.2-16-gd466dde avec pooled-discrete and ploidy = 40 paramètres. 241 000 variants pour le groupe cellulase-négatif et 236 000 variants pour le groupe cellulase-positif ont été obtenus.

3. Résultats et discussions

3.1. Maîtrise du cycle sexué

Pour mettre en place la reproduction sexuée entre souches industrielles via la stratégie de la souche assistante (Chapitre 3.2), pour utiliser la reproduction sexuée comme méthode d'amélioration des souches industrielles (Chapitre 3.3) et pour pouvoir identifier les mutations responsables de certains phénotypes d'intérêt (Chapitre 3.4) à l'aide de la méthode du « Bulk Segregant Analysis », il est nécessaire de comprendre précisément comment fonctionne la reproduction sexuée entre souches sauvages d'une part et entre souches sauvages et industrielles d'autre part. De plus, l'outil génétique reproduction sexuée étant nouveau à IFP Energies nouvelles, il est essentiel de mettre en place les protocoles adéquats : isolement et conservation des ascospores, identification du type sexuel, optimisation de la formation des stromata.

3.1.1. Isolement de souches sauvages des deux types sexuels

La reproduction sexuée pour les champignons de type hétérothallique bipolaire comme *T. reesei* exige deux souches de type sexuel compatible *MAT1-1* et *MAT1-2*. Les souches industrielles, toutes issues de la souche QM6a, sont de type sexuel *MAT1-2* et femelle stérile. La première étape du travail consiste à identifier des souches sauvages des deux types sexuels à la fois femelle et mâle fertiles. La souche sauvage *T. reesei* CBS999.97 (Lieckfeldt et al., 2000), est hétérocaryotique c'est-à-dire qu'elle possède un mélange de noyaux des deux types sexuels qui sont végétativement compatibles. Cette souche autofertile est utilisée pour ces isolements.

La reproduction sexuée est décrite optimale lorsqu'elle s'effectue à 25 °C avec une alternance de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité sur le milieu PDA (Chen et al., 2012). Après incubation de la souche CBS999.97 dans des conditions induisant un cycle sexuel, les ascospores obtenues sont hyalines comme décrit par Seidl et al. (2009). Les ascospores expulsées sont mises à germer sur PDA puis repiquées sur milieu PDA : 7 ascospores sur 15 portant les numéros A2, A6, A7, A8, A10, A11, A14 sont ainsi isolées.

Afin de déterminer leur type sexuel, les isolats sont placés en confrontation les uns avec les autres : lorsqu'une confrontation entraine la formation de stromata, les souches sont de type sexuel opposé, au contraire lorsqu'aucun stromata apparaît entre les deux souches, celles-ci sont de même type sexuel (Figure 30A). Pour simplifier, dans la suite du manuscrit ce test sera appelé « test MAT » (Figure 31A). Deux groupes contenant respectivement A6, A7, A8, A10, A11 et A2, A10, A14 sont ainsi obtenus. La souche A10 se trouvant dans les 2 groupes est considérée comme hétérocaryotique et est exclue de la suite de l'analyse. Pour identifier leur type sexuel, les isolats sont croisés avec la souche QM6a de type sexuel *MAT1-2*. Les croisements avec les souches de type *MAT1-1* sont fertiles

alors que ceux avec les souches de type *MAT1-2* sont stériles (Figure 30B). De cette façon, il est déterminé que les souches A6, A7, A8, A11 sont de type sexuel *MAT1-2* et que les souches A2, A14 sont de type sexuel *MAT1-1*.

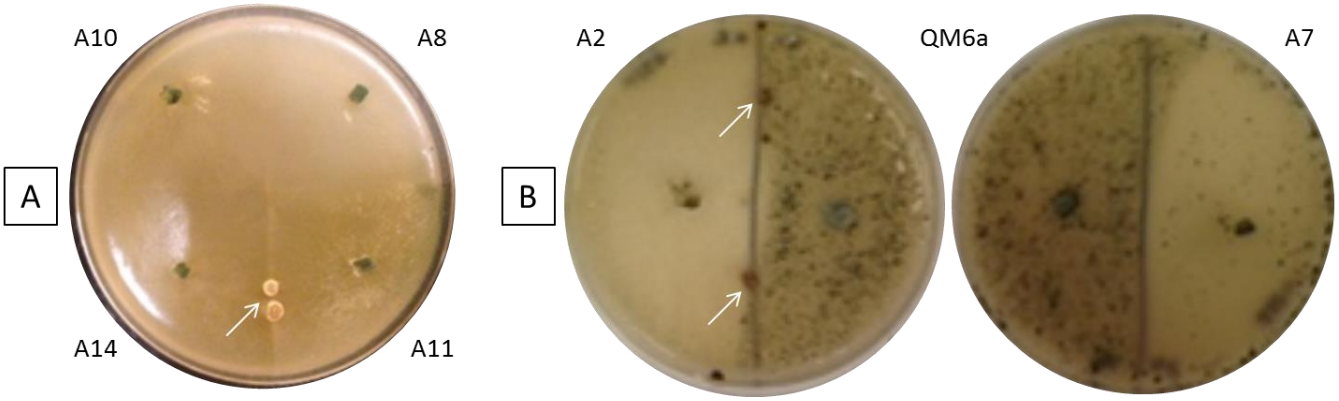


Figure 30 : Test Mat ou croisements sexués pour l'identification des types sexuels.
Les stromata sont pointés par les flèches blanches.

Afin d'identifier les isolats les plus fertiles, c'est-à-dire ceux produisant de façon répétable le plus de stromata, les souches compatibles entre elles sont croisées. La souche A2 de type sexuel *MAT1-1* est capable de se croiser avec toutes les souches qui lui sont compatibles.

Un nouveau croisement de la souche CBS999.97 permet d'isoler une souche sauvage de type sexuel *MAT1-2*. Vingt-neuf colonies issues d'ascospores isolées sont soumises au test MAT contre les souches A2 et QM6a (Figure 31A). Les types sexuels ont été définis pour 27 souches dont 15 sont de type sexuel *MAT1-1* et 12 de type sexuel *MAT1-2*. Parmi les souches MAT1-2, la souche B31 est sélectionnée car elle produit de nombreux stromata en confrontation avec la souche A2 de manière reproductible. Les souches A2 et B31 ont un phénotype vert foncé et plat (Figure 31C) et leur vitesse de croissance est identique, d'environ 3 cm par jour. Leurs types sexuels sont vérifiés par amplification d'un fragment interne de 500 pb dans le locus du type sexuel MAT1-2 et d'un fragment interne de 995 pb dans le locus du type sexuel MAT1-1 (Figure 31B).

La souche A2 de type sexuel *MAT1-1* et la souche B31 de type sexuel *MAT1-2* sont les deux souches sauvages de référence qui seront utilisées dans ce projet.

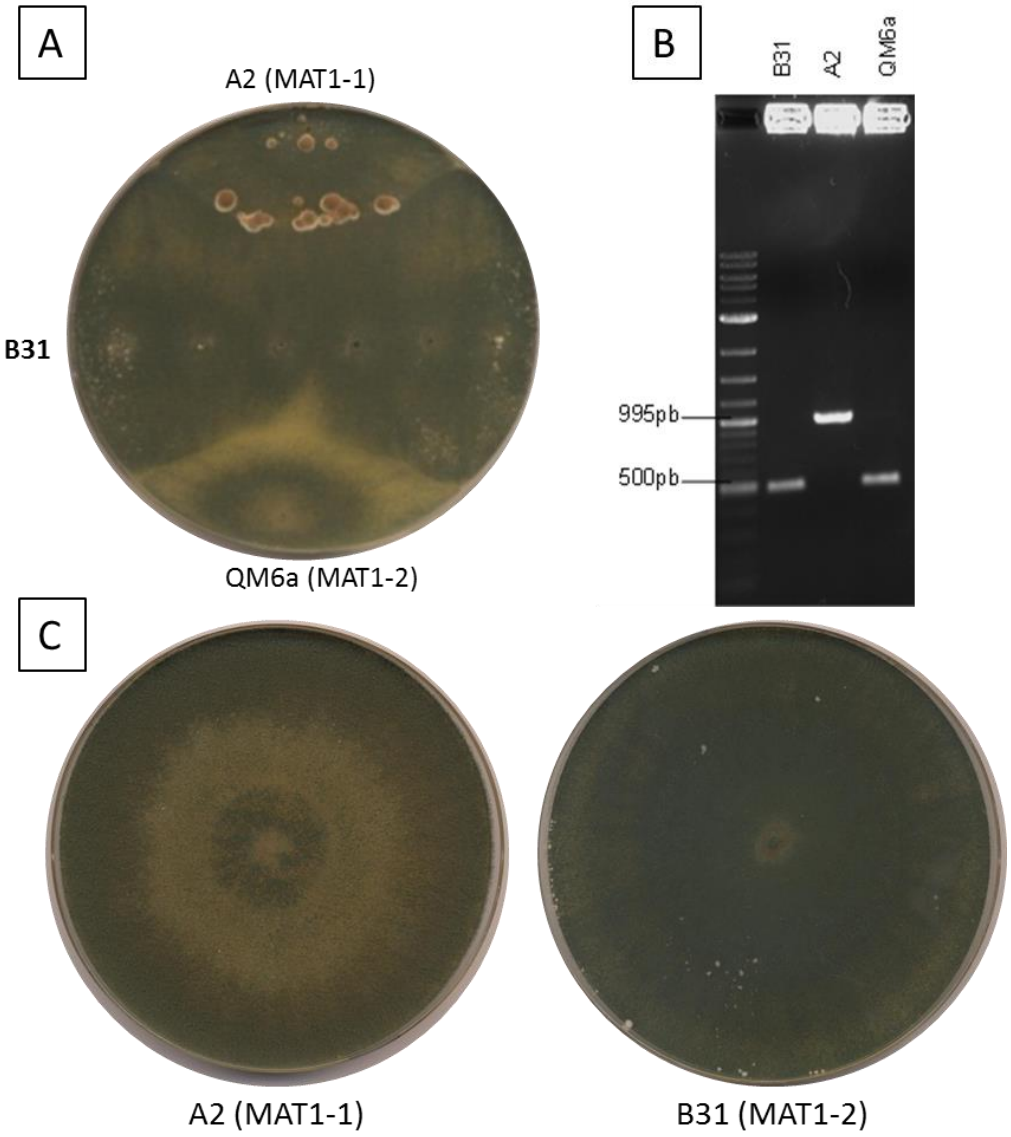


Figure 31 : Identification de la souche B31.
(A) Test MAT de la souche B31 : formation de stromata avec la souche A2 indiquant le type sexuel MAT1-2. **(B)** Amplification en PCR tandem d'un fragment interne de 500 pb dans le locus du type sexuel MAT1-2 des souches B31 et QM6a et d'un fragment interne de 995 pb dans le locus du type sexuel MAT1-1 des souches A2 à l'aide des couples d'amorces *MAT1-2*-F interne/ *MAT1-2*-R interne et *MAT1-1*-F interne/ *MAT1-1*-R interne. **(C)** Phénotypes des souches A2, A8 et B31 sur PDA.

3.1.2. Cycle de vie de *T. reesei*

Des croisements entre l'isolat d'origine QM6a et la souche A2 sont entrepris sur milieu PDA afin d'établir la cinétique du cycle sexuel. Le cycle présenté en Figure 38 est une compilation des résultats de trois croisements initiés avec 2 jours de décalage. Les observations sont faites à « l'œil nu », à la loupe binoculaire et au microscope. La reproduction sexuée débute avec la mise en confrontation de la souche QM6a et A2. À J+1 (un jour après inoculation) et J+2 le mycélium croît et les conidies commencent à apparaitre. À J+3, les mycéliums développent des hyphes aériens et se couvrent de conidiophores (Figure 32).

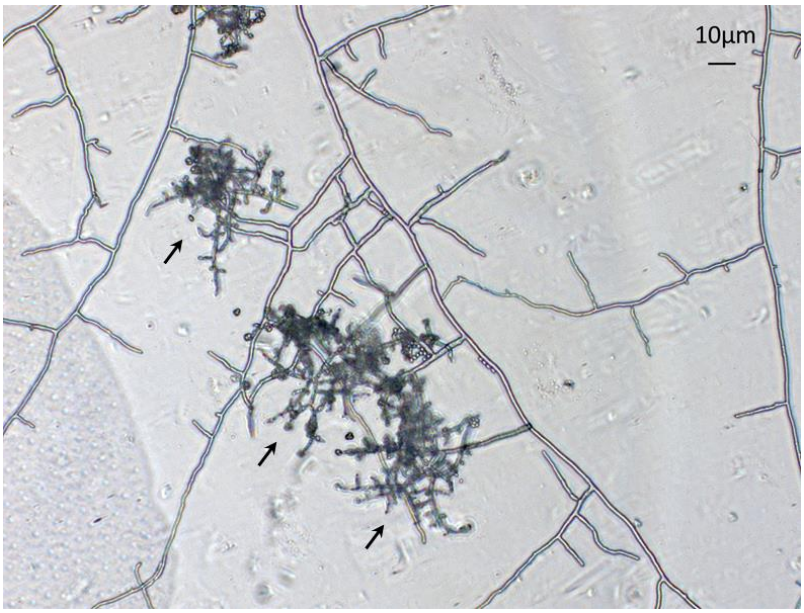


Figure 32 : Hyphes ayant différencié des conidiophores

Les conidiophores sont indiqués par les flèches noires. Ils portent les conidies. Les observations sont faites à l'aide du microscope AxioImager M2p Carl Zeiss et les images ont été prises à l'aide de la caméra Axiocam 105 Color (Carl Zeiss).

Les mycéliums des deux partenaires entrent en confrontation et forment comme une ligne de démarcation. En plus des conidiophores, nous observons la présence d'hyphes entrelacées présentant des ressemblances avec des ascogones (Figure 33) et que nous n'avons jamais pu observer ailleurs que sur des boîtes de reproduction sexuée. Ces hyphes entrelacées ne ressemblent à aucune des structures décrites par Vincens et Hanlin chez *H. gelatinosa* et *H. schweinitzii* et sont probablement des ébauches de stromata qui sont décrites dans la littérature comme des hyphes condensées (Vincens, 1917).

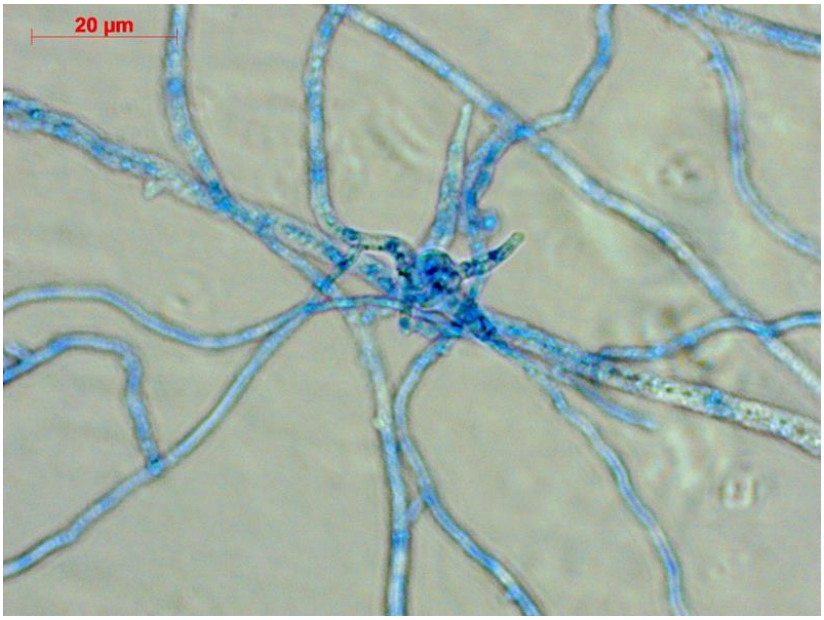


Figure 33 : Hyphes entrelacées colorées au Bleu de lactophénol

Les observations sont faites à l'aide du microscope AxioImager M2p Carl Zeiss et les images ont été prises à l'aide de la caméra Axiocam 105 Color (Carl Zeiss).

Toujours au niveau du front de confrontation, de petites boules cotonneuses blanches apparaissent à J+4 (Figure 34). Ces structures cotonneuses évoluent pour donner des structures solides qui grossissent et brunissent à J+5 et correspondent à des stromata dont la surface est constellée de cratères (Figure 34).

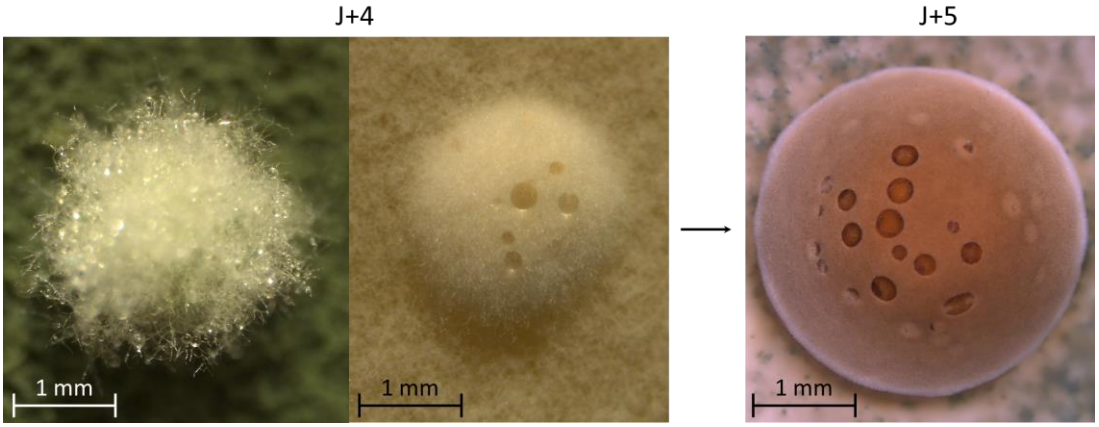


Figure 34 : Des boules cotonneuses et un stromata

Les boules cotonneuses observées à J+4 évoluent en stromata marron à J+5. Ces observations ont été faites à l'aide de la loupe binoculaire Leica S8 APO. Les images ont été prises à l'aide de la caméra Leica MC170 HD et traitées à l'aide du logiciel Leica Application Suite (LAS).

Les stromata poursuivent leur maturation jusqu'à l'apparition à J+8 de gouttes logées dans les cratères décrits précédemment (Figure 35). À J+9, les gouttes s'assèchent et laissent apparaitre à la surface du stromata des petits points noirs qui sont bien marqués à J+10 (Figure 35). La coupe transversale du stromata (Figure 35B) laisse voir un noyau brun. La coupe longitudinale du stromata (Figure 35D) montre que la coloration brune se limite à la surface du stromata et que les tissus internes sont blancs.

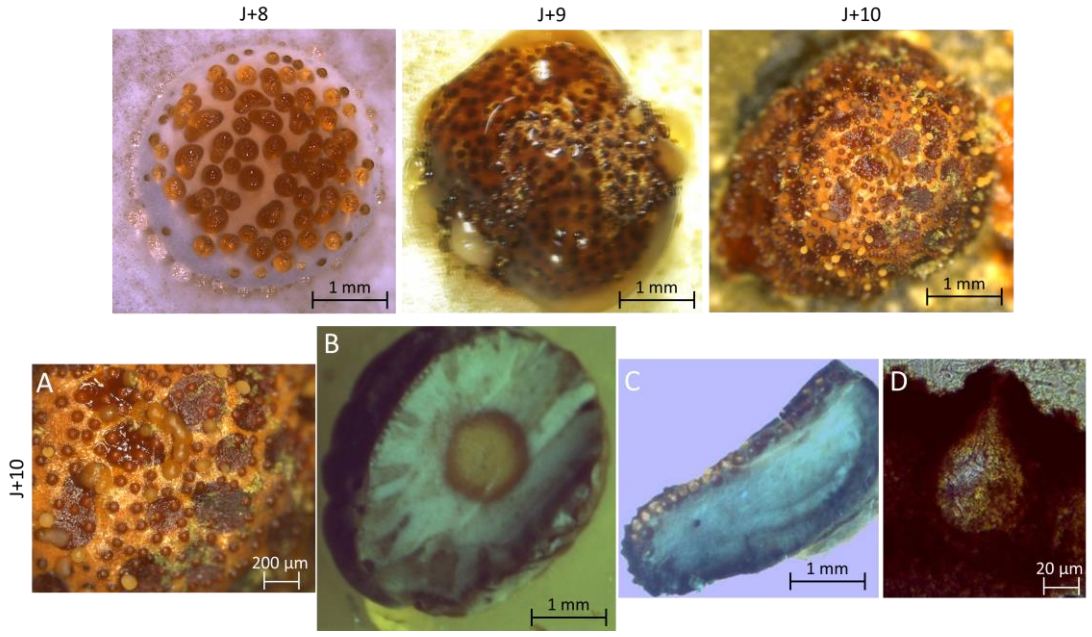


Figure 35 : Les stromata à divers stades de développement

Les observations des stromata et des coupes B et C ont été faites à l'aide de la loupe binoculaire Leica S8 APO. L'observation du périthèce a été faite à l'aide du microscope AxioImager M2p Carl Zeiss.

Par ailleurs, sous la surface du stromata, il y a formation de petites cavités en forme de poires dont les cols aboutissent à la surface du stromata par des ostioles superposables aux points noirs observés précédemment (Figure 35D). L'organisation interne du stromata correspond aux observations faites par Vincens, 1917 et Hanlin, 1965 chez *H. gelatinosa* et *H. schweinitzii*. C'est d'ailleurs à J+10 que les premières ascospores sont expulsées (Figure 36) contre le couvercle de la boîte de Petri sous la forme d'un nuage laiteux. L'observation microscopique des ascospores montre qu'elles ne sont pas éjectées en asques mais en vrac. Chez *H. gelatinosa* et *H. schweinitzii*, ce point n'a pas été évoqué, mais nous supposons que les asques intacts ont été récupérés directement dans le périthèce.

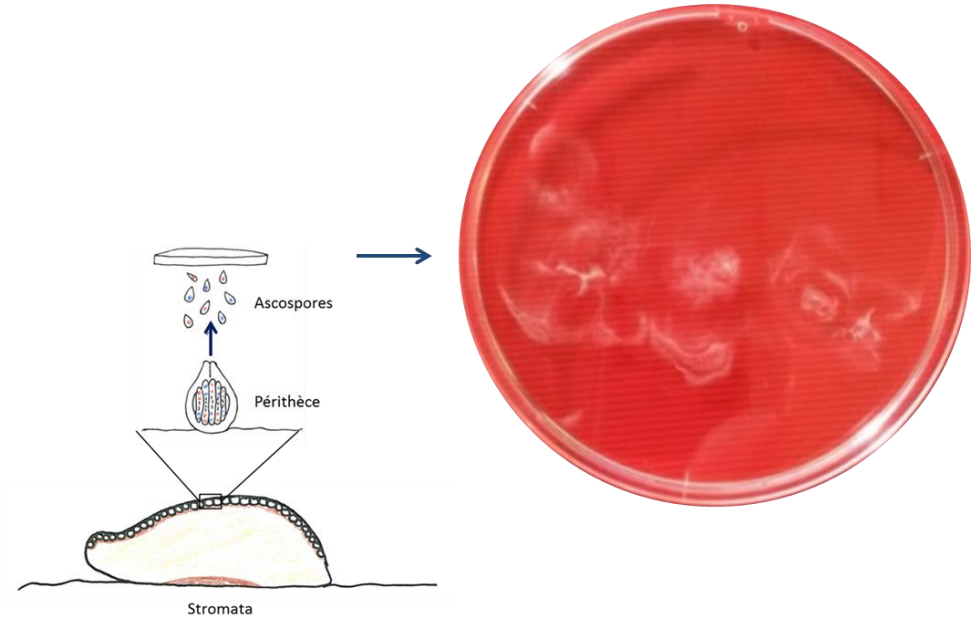


Figure 36 : Libération des ascospores
La reproduction sexuée est complète lorsque les ascospores sont libérées. Elles sont expulsées contre le couvercle de la boîte de Petri sous la forme d'un nuage blanc laiteux.

L'éjection de la progéniture est visible sur le couvercle de la boîte de Petri jusqu'à J+15 mais se poursuit peut-être au-delà. La boucle du cycle de reproduction sexuée est accomplie dès lors que la progéniture est expulsée. Néanmoins, à partir de J+15 et jusqu'à la fin de notre cinétique, un changement de l'apparence des stromata intervient : ils se recouvrent progressivement d'une couche verdâtre qui semble constituée de mycélium (Figure 37).

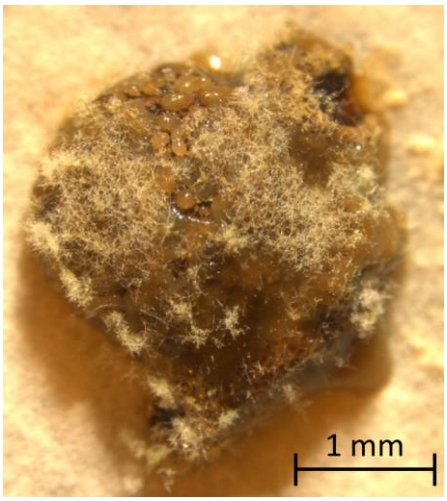


Figure 37 : Le stromata en fin de cycle de reproduction
L'observation du stromata a été faite à l'aide de la loupe binoculaire Leica S8 APO.

La reproduction sexuée entre les deux souches sauvages A2 et B31 se déroule avec la même chronologie que pour l'exemple présenté ci-dessus. Quant aux cycles de reproduction sexuée entre souches sauvages et souches industrielles telles que la RutC30 et la CL847, nous observons les mêmes étapes avec un retard d'environ 24 à 48 h selon les expériences. La quantité d'ascospores expulsées n'a pas été estimée.

Nous avons observé le déroulement des changements externes des stromata mais les événements à l'intérieur du stromata n'ont pas été étudiés. Ils ne peuvent donc pas être rapprochés des observations effectuées par Vincens et Hanlin qui décrivent plutôt l'initiation et le développement des fructifications à l'intérieur du stromata.

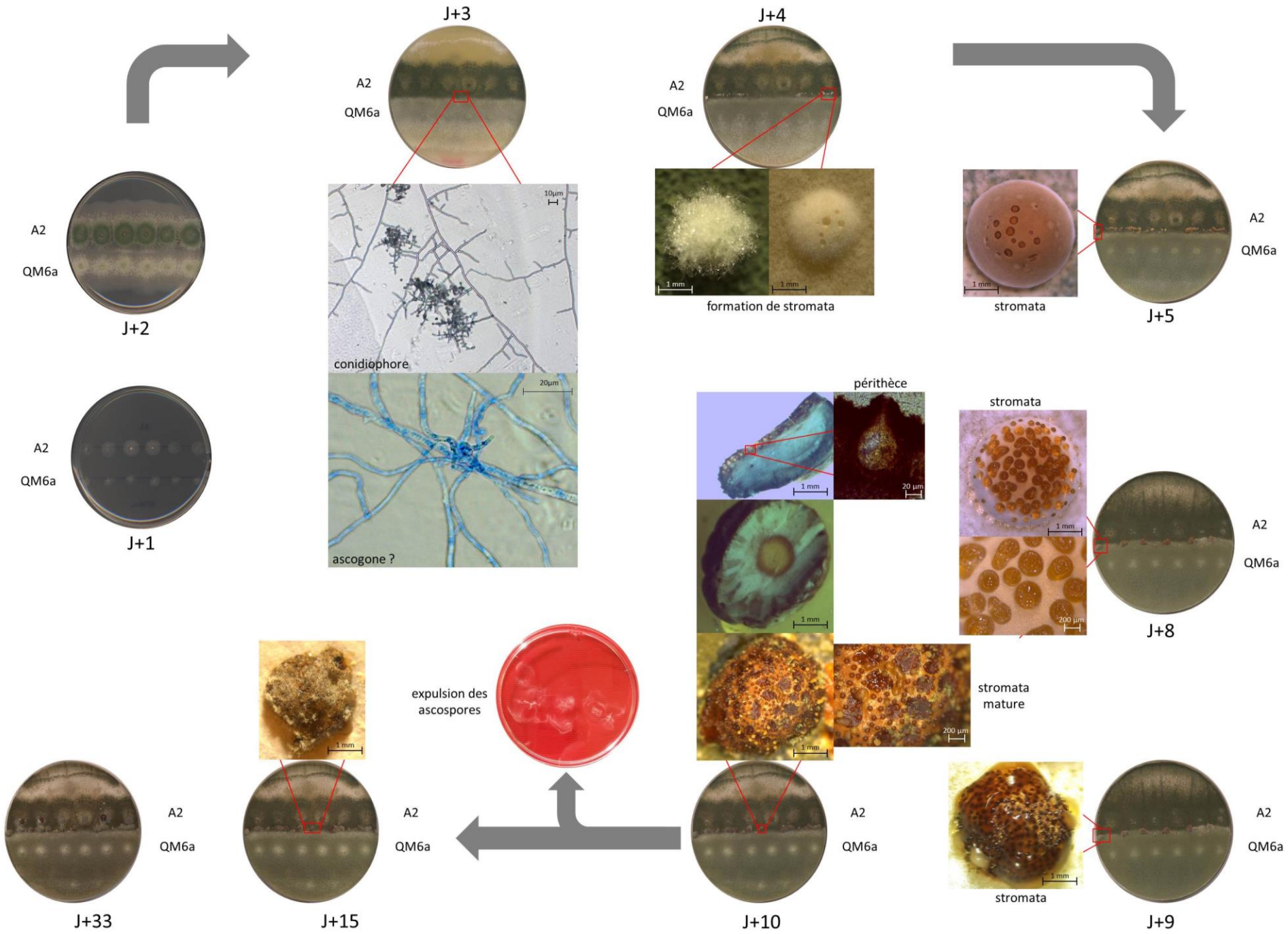


Figure 38 : Cycle de reproduction entre les souches QM6a et A2

3.1.3. Récupération, conservation et germination des ascospores

Certaines expériences décrites dans la suite de ce manuscrit nécessitent d'obtenir des centaines de colonies indépendantes provenant d'ascospores isolées, c'est pourquoi il est nécessaire de pouvoir les isoler et les conserver.

Les ascospores expulsées sur le couvercle de la boîte de Petri (Figure 36) sont récupérées par rinçage du couvercle et mises à germer afin d'obtenir des colonies isolées ou stockées pour une utilisation ultérieure. Les conidies étant pulvérulentes, elles peuvent contaminer les ascospores récupérées et stockées. Il est impératif que le milieu de germination des ascospores ne permette pas la germination des conidies.

Les ascospores non mélanisées peuvent germer facilement et rapidement car le tube germinatif n'a pas à traverser une paroi rigidifiée par la mélanine comme chez les conidies pour lesquelles cette étape nécessite des nutriments (Šimkovič et al., 2015). Le milieu agar-eau qui ne contient aucun nutriment a été testé pour différencier les ascospores des conidies. Une concentration équivalente de conidies et d'ascospores a été étalée, puis après étalement d'ascospores diluées, des colonies isolées apparaissent au bout de 48 h d'incubation à 30 °C et continuent leur développement, tandis que parmi les conidies étalées quelques-unes germent mais ne se développent pas. Le milieu agar-eau servira dorénavant de milieu de germination.

Chez *N. crassa*, les ascospores peuvent être conservées dans de l'eau stérile pendant 18 mois à 4 °C sans perte de viabilité (Smith, 1973). Cette méthode de conservation est testée en comptant le nombre d'ascospores capables de germer au moment de la récolte et au bout d'une semaine. Si au moment de la récolte seules 50 % des ascospores étalées germent, au bout d'une semaine il n'y en a plus aucune. La conservation dans l'eau n'est donc pas une méthode adéquate pour *T. reesei*.

Comme les ascospores de *T. reesei* ne sont pas mélanisées, j'ai émis l'hypothèse qu'elles sont aussi fragiles que des protoplastes, qui sont stockés (dans notre laboratoire) dans une solution contenant du saccharose comme stabilisant osmotique et appelée CTS50. Cette nouvelle solution de stockage est testée en vérifiant le taux de germination des ascospores conservées à 4 °C, -20 °C et -80 °C à une concentration de 1.10^6 cellules/ml, le jour de la récolte (T0) et après deux semaines, un mois et six mois de conservation.

Tableau 7: Taux de germination des ascospores

Les ascospores du croisement A2x RutC30 sont récoltées et leur concentration est ajustée à 1.10^6 cellules/ml de CTS50. Elles sont stockées en cryotubes à 4 °C, -20 °C et -80 C. Le jour de la récolte (T0) et après deux semaines, un mois et six mois de conservation, 2, 20 et 200 ascospores sont mises à germer sur milieu Agar-H_2O puis comptées après 48 h d'incubation à 30 °C

	4 °C	**-20 °C**	**-80 °C**
T0	55 %	55 %	55 %
2 semaines	35 %	41 %	40 %
1 mois	47 %	42 %	46 %
6 mois	0 %	30 %	33 %

Les taux de germination observés sont présentés dans le Tableau 7. Plusieurs conclusions peuvent être tirées de cette expérience : tout d'abord, le CTS50 est un milieu adapté pour la conservation des ascospores puisque la perte de germination au cours du temps est faible. De plus, les ascospores expulsées de la fructification ne sont pas toutes capables de germer, puisque 45 % des ascospores étalées ne germent pas. Ensuite, il y a une perte de germination supplémentaire d'environ 15 % après 15 jours de stockage, ce qui porte la perte totale à environ 60 %. Cependant, entre deux semaines et un mois, il y a une légère augmentation de la germination puisque 1 à 10 % d'ascospores supplémentaires sont capables de pousser. Enfin, entre un et six mois, le taux de germination chute pour être nul à 4°C et atteindre environ 70 % de perte totale à -20 °C et -80°C. La température de stockage a donc une influence sur la perte du taux de germination et c'est à -80 °C que le meilleur taux de germination est observé sur la durée testée. C'est à cette température que seront dorénavant conservées les ascospores. Les croisements entre les souches sauvages A2xB31 ou A2xQM6a ont généré le même type de profils de germination.

3.1.4. Optimisation de la formation des stromata

Dans la méthode de reproduction sexuée par confrontation utilisée précédemment, il est impossible de connaître la souche à l'origine des fructifications et donc de savoir si l'une des souches est femelle stérile. Une méthode, dite par arrosage, décrite pour d'autres champignons (Arnaise et al., 2001b; Chinnici et al., 2014) a donc été développée pour *T. reesei* en utilisant les souches A2, B31 et QM6a. Lorsque la souche QM6a est utilisée comme souche femelle et est arrosée avec les conidies de la souche A2, aucun stromata ne se forme, confirmant que la souche QM6a est stérile en tant que femelle. Cette méthode résumée sur la Figure 39 permet d'évaluer la fertilité femelle des souches et de diriger le sens des croisements mâle par femelle.

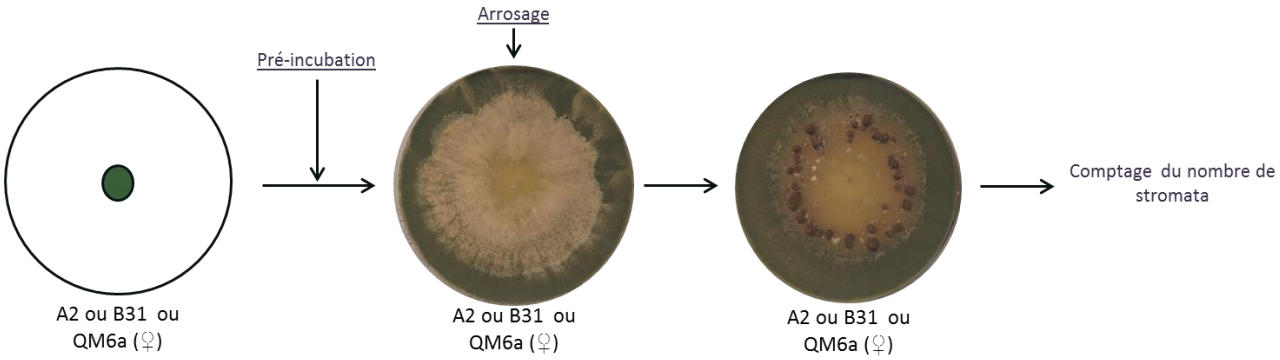


Figure 39 : Méthode de reproduction sexuée par arrosage.
La souche qui sert de femelle est inoculée toute seule sur la boîte. Lorsqu'elle l'a totalement envahie, elle est arrosée par les conidies issues de la souche mâle. Si la femelle est fertile, elle fabriquera des stromata contenant une descendance, sinon il n'y aura pas de stromata produits.

En fonction des croisements et des expériences, les stromata obtenus peuvent être plus ou moins nombreux et leur diamètre peut varier de 0,1 mm à 10 mm. La reproduction sexuée par arrosage met en jeu plusieurs paramètres que nous soupçonnons d'interagir les uns avec les autres. Afin d'identifier les conditions favorables à l'obtention de nombreux stromata et comprendre l'interaction entre les différents paramètres, il nous a semblé judicieux d'avoir recours à un plan d'expérience. Ce plan d'expérience nous permettra de définir les conditions expérimentales conduisant à l'obtention de stromata de manière reproductible en termes de nombre et de taille. Ce calibrage est important pour les expériences de fécondation et de souche assistante du chapitre 3.2.5.

Un plan d'expérience permet de répondre à la question posée paramètre par paramètre mais également de fournir des informations concernant les interactions entre les différents paramètres. Le plan d'expérience est une stratégie de planification d'expérience qui consiste à proposer un minimum d'expériences faisant varier simultanément tous les paramètres afin d'obtenir le maximum d'informations (Tinsson, 2010; Goupy and Creighton, 2013).

Dans le croisement par arrosage quatre paramètres susceptibles d'avoir une influence sur le nombre de stromata produits ont été choisis. Pour chacun de ces facteurs, il y a différents niveaux à tester (Figure 40) :

- différentes **souches femelles**, les souches A2 et B31 sont testées afin de comparer leur fertilité femelle,
- différents **temps de pré-incubation** de la souche femelle sont testés afin d'identifier la phase de croissance au cours de laquelle son mycélium présente la meilleure compétence de fécondation. Toutefois, nous n'avons pas testé en dessous de 3 jours d'incubation car c'est le temps nécessaire pour que le mycélium envahisse toute la boîte de Petri et pas au-delà de 5 jours car à ce stade le mycélium ne croit plus et il est recouvert de conidies. Nous pensons

que la présence de conidiophores peut empêcher l'accès au mycélium receveur par les conidies arrosées,

- comme la lumière est un régulateur important de la reproduction sexuée chez *T. reesei* (Chen et al., 2012; Seibel et al., 2012a), trois **régimes lumineux** sont testés afin d'identifier celui favorisant le plus la compétence sexuelle,
- comme la reproduction sexuée est un processus très coûteux en énergie, il existe un mécanisme de contrôle qui permet le développement d'un petit nombre de protopérithèces en périthèces afin de garantir suffisamment d'énergie pour atteindre la maturité et pouvoir expulser les ascospores (Jamet-Vierny et al., 2007). Ainsi, différentes **concentrations de conidies** sont testées afin d'identifier celle qui favorise la formation d'un maximum de stromata. Préalablement, nous avions évalué le nombre de stromata produits en fonction de la concentration de conidies arrosées (Annexe 2) afin de fixer l'intervalle de concentration à utiliser dans le plan d'expérience. Des stromata sont formés dès 10^2 conidies arrosées, et augmentent fortement dès 10^3 conidies. Leur nombre double de 10^3 à 10^4 conidies, passant d'environ 60 à 120 stromata, et se maintient autour d'une centaine au-delà de 10^4 conidies.

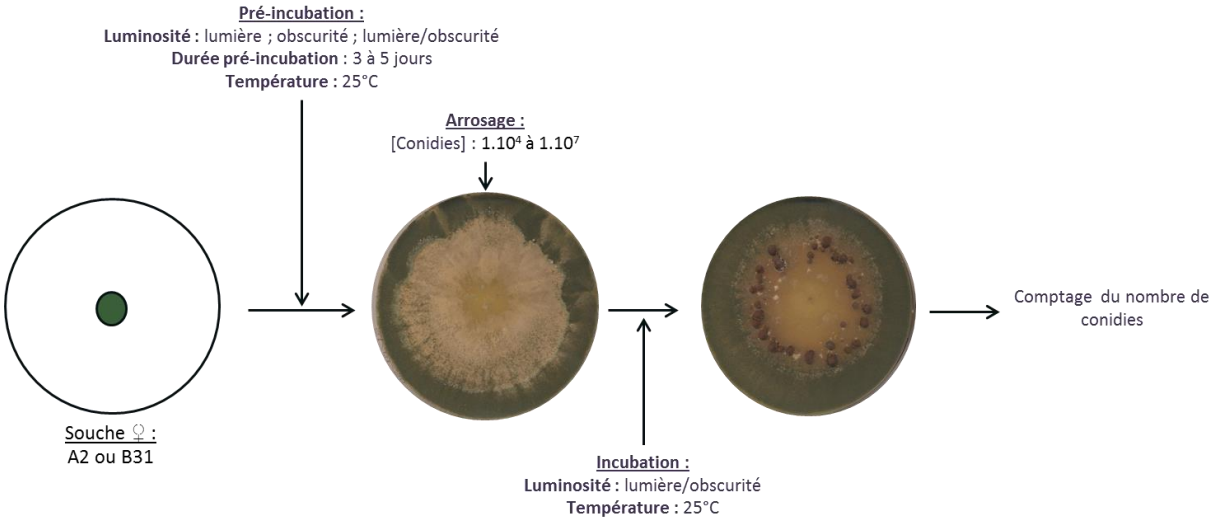


Figure 40 : Récapitulatif des paramètres expérimentés pour optimiser la formation des stromata.

Pour chacun de nos 4 paramètres, entre deux et quatre conditions sont intéressantes à tester (Figure 40), ce qui représente au maximum soixante-douze expériences différentes si on croisait toutes les conditions de chaque paramètre. Le plan d'expérience (paragraphe 2.4) permet de ramener le nombre d'expériences de 72 à 40, tout en conservant une diversité suffisante pour identifier, via l'utilisation d'un modèle mathématique, les conditions optimales pour l'obtention d'un maximum de stromata. L'influence des différents paramètres est mesurée par le nombre de stromata obtenu sept jours après arrosage à condition qu'ils soient capables d'expulser des ascospores. L'intégralité du plan d'expérience et des résultats expérimentaux est présentée dans l'Annexe 3.

Les premières observations avant l'analyse du plan d'expérience ont montré qu'en fonction du régime lumineux lors de la phase de pré-incubation, des phénotypes différents de mycélium peuvent être observés. Les souches incubées à l'obscurité présentent un mycélium blanc dénué de conidies mélanisées. En revanche, celles incubées à la lumière ou avec une alternance lumière/obscurité présentent un mycélium porteur de conidies vertes (Figure 41A). La lumière favorisant la conidiation (Chen et al., 2012), ce résultat est cohérent et attendu. Par ailleurs il faut noter que les stromata apparaissent sous la forme d'anneaux, comme chez *P. anserina* (Coppin et al., 2012), soit près du centre de la boîte soit près du bord (Figure 41B) suggérant que seules certaines zones du mycélium sont compétentes à la fécondation.

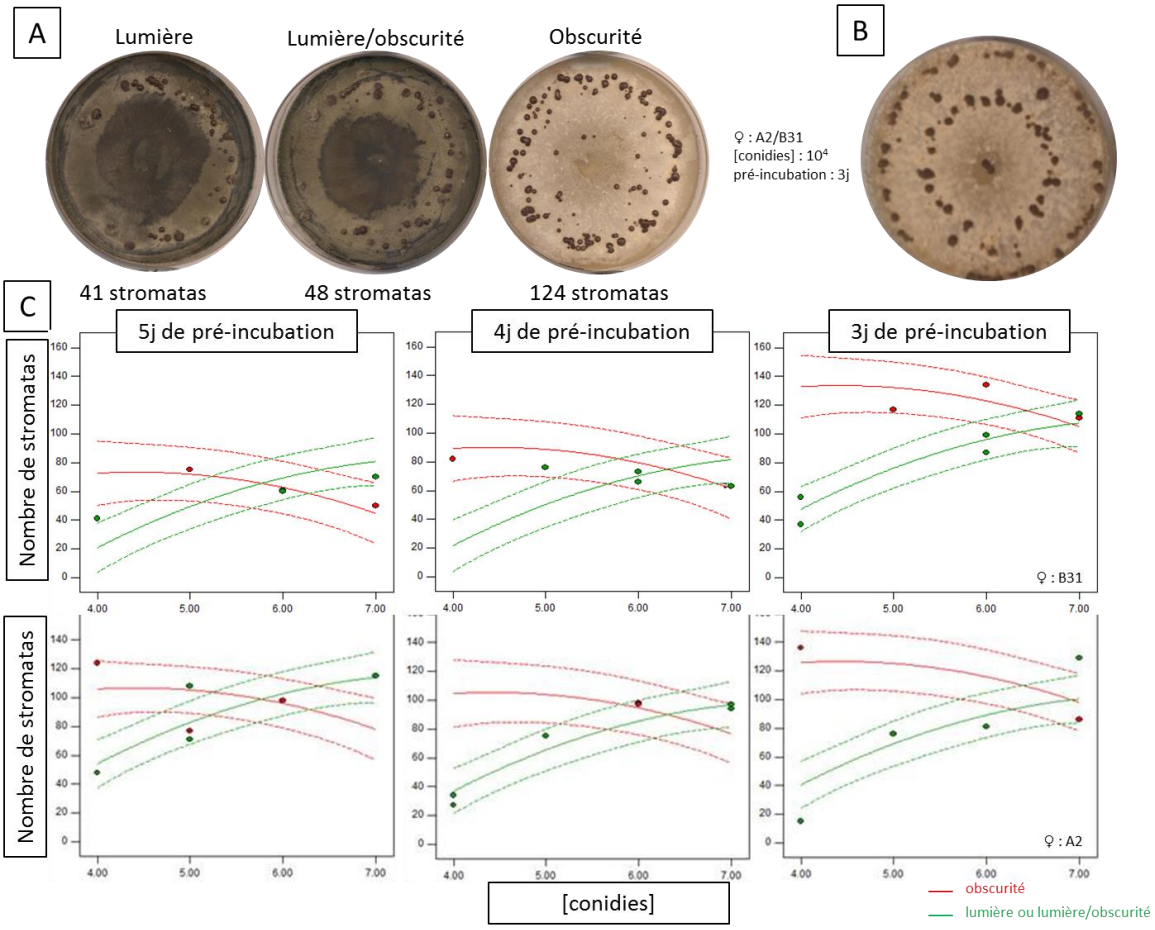


Figure 41: Optimisation de la reproduction sexuée par arrosage.
(A) La souche femelle B31 a été pré-incubée 4 jours dans différentes conditions lumineuses puis arrosée avec 10^8 conidies provenant de la souche A2. L'obscurité favorise l'apparition des stromata. (B) Apparition des stromata sous la forme deux cercles concentriques. (C) Nombre de stromata produits en fonction de la quantité de conidies utilisées pour la fertilisation du mycélium femelle B31 (en haut) et A2 (en bas). Les lignes représentent le modèle mathématique issu de l'analyse des valeurs expérimentales (traits pleins : modèle, traits pointillés : précision du modèle).

Les conditions de pré-incubation à la lumière et à l'alternance lumière/obscurité donnant des résultats statistiquement identiques et les données obtenues pour ces deux groupes ont été regroupées

(Figure 41C). Notre plan d'expérience permet de montrer que les quatre paramètres testés ont une influence sur la quantité de stromata obtenus :

La représentation graphique (Figure 41C) de notre plan d'expérience montre que :

- plus la pré-incubation est courte plus il y a de stromata formés,
- la pré-incubation à l'obscurité permet d'obtenir plus de stromata qu'à la lumière (ou l'alternance lumière/obscurité). L'obscurité favorise la compétence sexuelle et la production de stromata contrairement à la lumière qui l'inhibe. Ce résultat est cohérent avec le fait que chez *T. reesei* la lumière défavorise la reproduction sexuée (Chen et al., 2012),
- à l'obscurité, plus la quantité de conidies utilisées est faible plus il y a de stromata formés tandis qu'à la lumière c'est l'inverse qui est observé,
- enfin, les souches femelles ont un effet, mais il est différent selon les conditions. En effet, la souche femelle B31 est plus fertile que la souche A2 si elle est pré-incubée 3 jours, tandis que c'est la souche femelle A2 qui est la plus fertile après 4 et 5 jours de pré-incubation,
- plus la durée de pré-incubation des souches femelles est courte (3 jours) plus elles produisent de stromata, suggérant que la compétence sexuelle intervient rapidement après la confluence du mycélium. Un résultat identique est observé chez *P. anserina* (Coppin et al., 2012).

L'étude de la reproduction sexuée à l'aide de ce plan d'expérience confirme qu'il y a des interactions entre les paramètres :

- plus le temps de pré-incubation est long, moins la luminosité a d'effet sur la quantité de stromata produits comme le montre le chevauchement croissant des courbes de tendance,
- plus la concentration de conidies augmente et moins les paramètres tels que la souche femelle, le régime lumineux et la durée de pré-incubation n'ont d'importance.

Dorénavant, pour obtenir des stromata, nous pré-incuberons la souche femelle à l'obscurité pendant 3 jours puis pour obtenir plus ou moins de stromata, nous ferons varier la concentration de conidies à arroser, qui est le paramètre le plus facile à moduler.

Ce plan d'expérience a permis grâce à un faible nombre d'expériences d'identifier les conditions pour l'obtention d'un nombre voulu de stromata mais aussi d'appréhender les interactions existant entre les paramètres régissant la reproduction sexuée. Grâce à cette étude nous sommes en mesure d'initier des croisements sexués calibrés.

Par ailleurs, au cours de ces différents croisements, nous avons remarqué que lorsque les stromata sont très nombreux, ils sont de petites tailles (1 à 2 mm) et souvent soudés les uns aux autres. Inversement, lorsqu'il y a peu de stromata sur la boîte de Petri, ces derniers sont de grande taille (environ 6 millimètres) et sont isolés les uns des autres. Ce résultat suggère que l'énergie disponible pour le développement des stromata n'est pas infinie et qu'elle est réparti entre ceux présents. Ainsi, moins il y aura de stromata formé et plus ils recevront de nutriments et seront gros.

3.1.5. Effets de différents milieux sur la formation des stromata

Toujours dans l'optique d'optimiser le nombre de stromata obtenus, et grâce à la méthode de l'arrosage mise au point, l'efficacité de différents milieux à induire la reproduction sexuée est étudiée. Nous testons donc l'effet de l'addition de différentes sources de carbone et d'azote au milieu PDA et les milieux complexes cornmeal et oatmeal sur la production de stromata de croisements utilisant la souche A2 comme femelle et B31 comme mâle et vice-versa. Afin d'obtenir une quantité de stromata facilement dénombrables, et donc bien isolés les uns des autres, nous avons choisi d'induire leur formation en arrosant avec 10^3 conidies pour obtenir entre 30 et 70 stromata (Annexe 2) individualisés. Les stromata obtenus sont comptabilisés lorsqu'ils ont expulsé les ascospores, soit 11 jours après arrosage (Figure 42). Les croisements utilisant A2 comme souche femelle produisent sur la plupart des milieux plus de stromata que les croisements mettant en jeu la souche B31.

L'ajout d'une source de carbone supplémentaire telle que la cellophane n'entraine pas une augmentation du nombre de stromata. Un résultat identique a été obtenu avec l'addition d'autres sources de carbone (cellulose et papier Whatman). La source de carbone dans le milieu PDA doit donc être suffisante pour une induction maximum des stromata. En revanche, les sources d'azote utilisées entrainent une diminution drastique du nombre de stromata obtenus. En effet, si l'ajout de Yeast Nitrogen Base (YNB) sans acide aminé entraine une diminution du nombre de stromata formés, l'ajout de Yeast Nitrogen Base additionné d'histidine, méthionine et tryptophane entraine une absente totale de stromata. Enfin, les milieux complexes oatmeal et cornmeal entrainent un doublement du nombre de stromata formés et plus particulièrement pour le croisement A2 par B31. Les stromata générés sur ces deux milieux font 1 à 2 mm, et une forte augmentation de la conidiation par rapport au milieu PDA est observée.

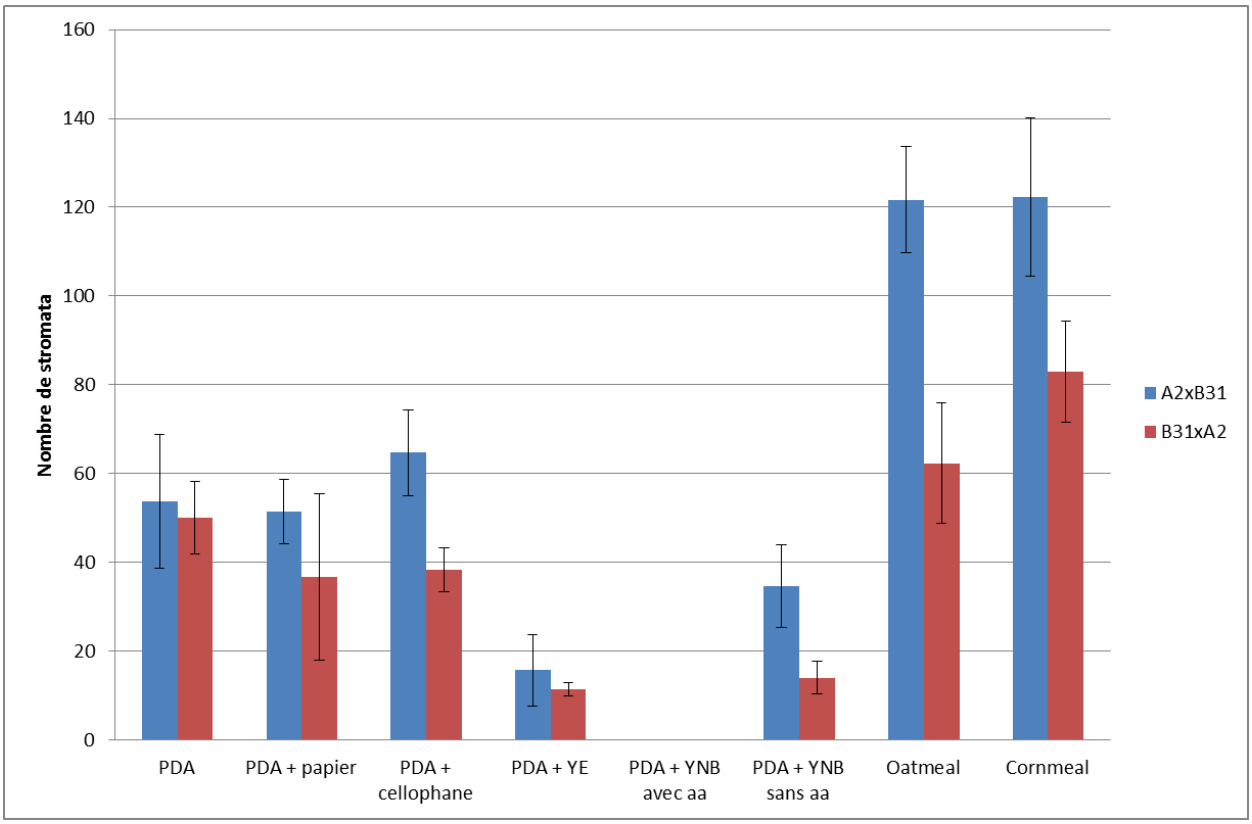


Figure 42 : Quantification des stromata obtenus sur différents milieux de culture.
Pour chaque condition, six boîtes de Petri sont arrosées. La souche femelle est arrosée avec 10^3conidies de la souche mâle. Le nombre de stromata est compté après expulsion des ascospores, soit 11 jours après l'arrosage. YE : Yeast Extract ; YNB avec aa : Yeast Nitrogen Base additionné d'histidine, méthionine et tryptophane ; YNB sans aa : Yeast Nitrogen Base sans aucun acide aminé. Pour chaque milieu testé, 3 réplicas biologiques ont été réalisés.

3.1.6. Comparaison des méthodes de croisement

Pour finir, nous avons établi la cinétique de la reproduction sexuée en arrosant la souche femelle A2 avec 10^3 conidies de la souche QM6a afin d'évaluer les différences avec la méthode par confrontation. Le cycle démarre lorsque la souche femelle est arrosée. A J+1, nous observons des boules cotonneuses qui forment à J+2 des petits stromata blancs, lesquels brunissent, avec une apparition des gouttes d'exsudats à leur surface à J+6. À J+7 commencent à apparaître les ostioles qui sont bien marquées à J+8. Cette étape coïncide avec le début de l'expulsion des ascospores qui dure environ dix jours. Cette même cinétique est observée pour le croisement sauvage A2 par B31 et vice-versa. Quant au croisement avec les souches industrielles, nous avons observé un retard allant de 8/12 h à un jour. Le Tableau 8, montre que les étapes clés de la reproduction sexuée interviennent avec trois jours d'avance par rapport à la méthode par confrontation. Cette avance correspond en fait au temps d'incubation nécessaire pour que la souche femelle envahisse la boîte de Petri. Si la méthode de l'arrosage ne permet pas de gagner du temps sur le cycle de reproduction, elle permet de contrôler et maitriser chaque paramètre.

Tableau 8 : Comparatif des méthodes de reproduction sexuée par arrosage et confrontation

Etapes clés	Arrosage	Confrontation
Début de la cinétique	J+0 = arrosage	J+0 = inoculation de la boîte
Rencontre des partenaires	J+0 = arrosage	J+3
Apparition de boules cotonneuses	J+1	J+4
Apparition fructifications marron avec des cratères	J+2	J+5
Apparition des gouttes d'exsudat	J+5	J+8
Apparition des ostioles	J+7 à J+8	J+9 à J+10
Début de l'expulsion	J+8	J+10
Fin de l'expulsion	environ J+20	environ J+25

3.1.7. Discussion

Ces différentes expériences nous ont permis de mettre en place au laboratoire des protocoles expérimentaux robustes qui sont essentiels à la suite de mon projet. La maitrise de la reproduction sexuée est primordiale pour la mise en œuvre des stratégies de « souche assistante », d'amélioration des performances par la reproduction sexuée et de Bulk Segregant Analysis.

Dans un premier temps nous avons mis au point une méthode de stockage et de germination des ascospores qui nous a permis d'isoler les deux souches sauvages monocaryotiques et femelles fertiles A2 (*MAT1-1*) et B31 (*MAT1-2*) qui seront utilisées dans la suite de ce manuscrit. Puis nous avons établi que le cycle sexuel se déroule en 10 à 12 jours selon les souches utilisées, et présente vraisemblablement un cycle de reproduction typique des ascomycètes (Peraza-Reyes and Berteaux-Lecellier, 2013). Nous avons mis au point la méthode de reproduction sexuée par arrosage qui permet d'avoir une reproduction sexuelle calibrée en variant la durée de pré-incubation, le régime lumineux lors de la pré-incubation et la quantité de conidies utilisées. Les conditions optimales d'obtention des stromata ont été identifiées à l'aide d'un plan d'expérience. De plus, la méthode d'arrosage permet d'évaluer le niveau de fertilité femelle et male.

L'observation du déroulement du cycle sexué a permis de mieux en appréhender les différentes étapes. Les retards observés lors des croisements entre souches sauvages et souches industrielles peuvent être dus au fait que les souches industrielles ont une croissance plus lente que les souches sauvages d'une part et qu'il y a une différence de génotype importante entre les souches du croisement d'autre part. En effet, les souches industrielles descendant de la souche QM6a ont subi de nombreux réarrangements chromosomiques (Le Crom et al., 2009; Vitikainen et al., 2010; Koike et al., 2013; Marie-Nelly et al., 2014) et leur différence de caryotype avec celui de la souche sauvage peut être problématique lors de la méiose car des crossing-over inégaux peuvent survenir et ralentir la méiose (Billiard et al., 2012).

Lors de la reproduction sexuée par arrosage, la production de stromata est favorisée après une pré-incubation de trois jours à l'obscurité ce qui suggère que c'est le moment où le mycélium est sexuellement le plus compétent et que l'obscurité favorise la rencontre entre les gamètes mâles et femelles. La compétence sexuelle du mycélium intervient avant la phase stationnaire comme chez *P. anserina*, chez qui elle est optimale 72 à 96 h après l'inoculation de la souche femelle, et correspond à une forte transcription des gènes du locus *MAT* (Bidard et al., 2011). Ce dernier point serait à vérifier chez *T. reesei*.

Dans ce mode de reproduction, les stromata se développent en anneaux seulement à certains endroits sur la boîte, comme chez *P. anserina* (Coppin et al., 2012), suggérant que seules quelques régions du mycélium sont sexuellement compétentes. La plus grande quantité de stromata est obtenue avec des concentrations en conidies entre 10^4 à 10^5. Au-delà, la quantité de stromata diminue et il semble qu'à 10^5 conidies un seuil de saturation soit atteint. Par ailleurs, nous avons observé que lorsqu'un stromata commence à se développer, ceux environnants s'arrêtent de croitre. L'explication la plus probable est que, comme chez *P. anserina*, pour qu'un maximum de stromata puissent aller jusqu'au bout de leur développement et expulser leur progéniture, un mécanisme de contrôle intervient pour économiser l'énergie nécessaire et n'autorise qu'un faible nombre d'entre eux à poursuivre leur développement (Jamet-Vierny et al., 2007; Xie et al., 2017).

Grâce à la calibration de la reproduction, conférée par la méthode par arrosage, nous avons étudié l'effet de différents milieux sur la reproduction sexuée. Elle fonctionne efficacement sur les milieux riches oatmeal et cornmeal ce qui est cohérent avec le fait que le champignon *T. reesei* se reproduit exclusivement sur milieu riche et suit le même schéma que le champignon *Aspergillus nidulans* alors que le champignon modèle *P. anserina* privilégie les milieux plutôt pauvres (Debuchy et al., 2010a). Néanmoins, l'ajout d'azote dans le milieu de culture inhibe la reproduction sexuée et à plus forte raison lorsque de l'histidine, de la méthionine et du tryptophane sont ajoutés. Soit l'ajout d'un des acides aminés à un effet sur la formation des stromata, soit c'est l'apport supplémentaire d'azote par leurs ajouts qui est responsable de l'inhibition observée. En effet, les effets inhibiteurs de l'azote sur la reproduction sexuée ont déjà été décrits chez d'autres champignons filamenteux (Agnihotri, 1968; Paster and Chet, 1980; Moore-Landecker, 1992; McAlpin, 2004; Mc Alpin and Wicklow, 2005) et un déséquilibre de la balance carbone/azote aboutit souvent à une inhibition de la reproduction sexuée (Moore-Landecker, 1992; Han et al., 2003).

Enfin, la conservation des ascospores obtenues est possible dans la durée à -80 °C mais elle entraine une diminution de leur taux de germination. Cependant, il est important de noter que parmi les ascospores expulsées, 45 % sont incapables de germer. Chuang et al. (2015) ont comptabilité la présence d'environ 25 % d'ascospores non viables dans la descendance provenant d'un croisement

entre des souches sauvages de *T. reesei* possédant des caryotypes différents. Cette équipe a montré que les réarrangements chromosomiques étaient à l'origine d'ascospores porteuses d'aneuploïdie segmentale viables et non viables. Notre observation est cohérente avec les résultats théoriques de viabilité des ascospores d'un croisement entre une souche de type QM6a et la souche RutC30 qui présente d'importants réarrangements chromosomiques inférés par Jourdier et al., 2017. Le croisement réalisé ici entre la souche sauvage A2 et la souche RutC30 équivaut au croisement théorique QM6a par RutC30 présenté par Jourdier et al., 2017., et pour lequel seulement 37,5 % d'ascospores seraient viables contre 55 % dans notre croisement. Il faut toutefois noter que dans notre expérience, nous nous basons sur une quantité globale d'ascospores que nous avons étalées et non d'une analyse en asque.

Etant donné que les croisements entre souches de caryotypes différents engendrent de l'aneuploïdie segmentale, les croisements génétiques, pour éliminer les mutations ou les marqueurs de sélection et identifier des mutations d'intérêt, doivent se faire entre souches identiques. Mais comme les souches industrielles de *T. reesei* ont subi de nombreux réarrangements chromosomiques, et sont très différentes des isolats sauvages, pour appliquer avec succès la reproduction sexuée et conserver les caryotypes intacts, il est capital de réussir à croiser les souches industrielles entre elles.

3.2. Mise au point de la stratégie « souche assistante »

3.2.1. Stratégie de la « souche assistante »

La mise en place d'une reproduction sexuée entre souches industrielles permettrait d'éliminer les marqueurs de résistance aux antibiotiques utilisés en ingénierie génétique, de régénérer les souches stables et de se débarrasser des mutations inutiles après une mutagénèse aléatoire. Elle permettrait aussi de combiner les propriétés intéressantes de deux souches industrielles.

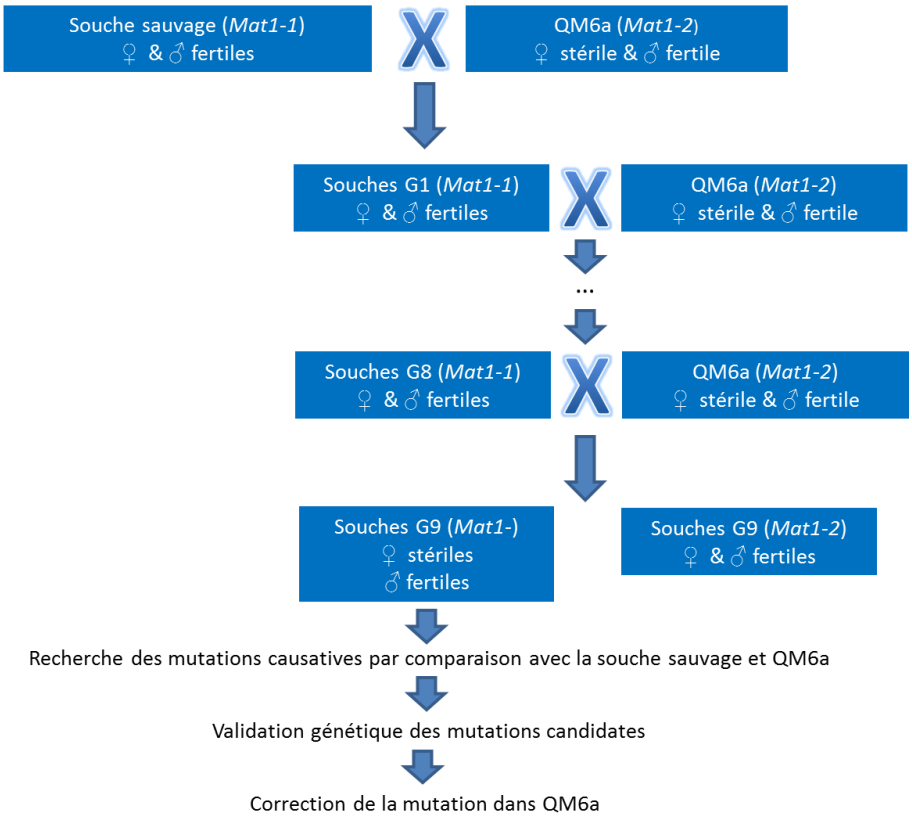


Figure 43 : Stratégie d'identification du gène responsable de la stérilité femelle de QM6a.
Adapté de Kubicek et al., 2014

Une stratégie d'identification du gène responsable de la stérilité femelle de la souche QM6a (Linke et al., 2015) a désigné *idc1*, comme gène responsable de sa fertilité femelle (Figure 43). L'insertion d'une version sauvage du gène dans le génome d'une souche QM6a rétablit la capacité à former des stromata (Linke et al., 2015). Cette stratégie présente un inconvénient majeur car elle nécessite d'introduire le gène fonctionnel dans chacune des souches industrielles concernées pour pouvoir rétablir la fertilité femelle. De plus les souches industrielles étant issues de mutagénèses successives, il est possible que d'autres gènes importants pour la fertilité femelle aient été mutés. Ainsi une translocation entre le chromosome I et le III a été identifiée dans la région codante du facteur de transcription *ste12* (Trire2 : 36543) (Vitikainen et al., 2010; Jourdier et al., 2017). L'implication de ce

gène dans la fertilité a été montré chez *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*, *Sordaria macrospora* et *Cryphonectria parasitica* (Wong Sak Hoi and Dumas, 2010). Autre exemple, le gène *pro1* (Trire2 :76590) qui code pour un régulateur du développement des fructifications dans *Sordaria macrospora* et *Epichloë festucae* (Masloff et al., 1999; Tanaka et al., 2013) contient une mutation de type SNV dans un exon dans la souche QM9414.

L'apport du gène *idc1* fonctionnel peut donc ne pas être suffisant pour rétablir la fertilité femelle et rétablir la reproduction sexuée entre deux souches femelles stériles de *T. reesei*. Ainsi, être capable de rétablir la fertilité femelle dans la souche QM6a, ne signifie pas qu'elle pourra être rétablie dans les souches industrielles.

Chez *P. anserina*, pour pouvoir croiser deux souches qui présentent un défaut de fabrication de la fructification, Jamet-Vierny et al. (2007) ont eu recours à une complémentation hétérokaryotique de la stérilité femelle à l'aide d'une souche assistante femelle fertile invalidée pour le locus *MAT* (la souche Δ*MAT*). Cette souche assistante ne participe pas au processus de caryogamie car l'invalidation du locus *MAT* contrôlant la fécondation et la caryogamie, conduit à une souche qui ne peut pas fertiliser et être fertilisée (Silar, 2014). Cette stratégie repose sur la formation d'un tricaryon à partir des deux souches mutantes femelles stériles de types sexuels opposés et de la souche assistante (Figure 44). Même si l'étape où intervient la complémentation est inconnue, la formation d'un tricaryon stable entraine le recrutement d'hyphes pour la formation de la fructification.

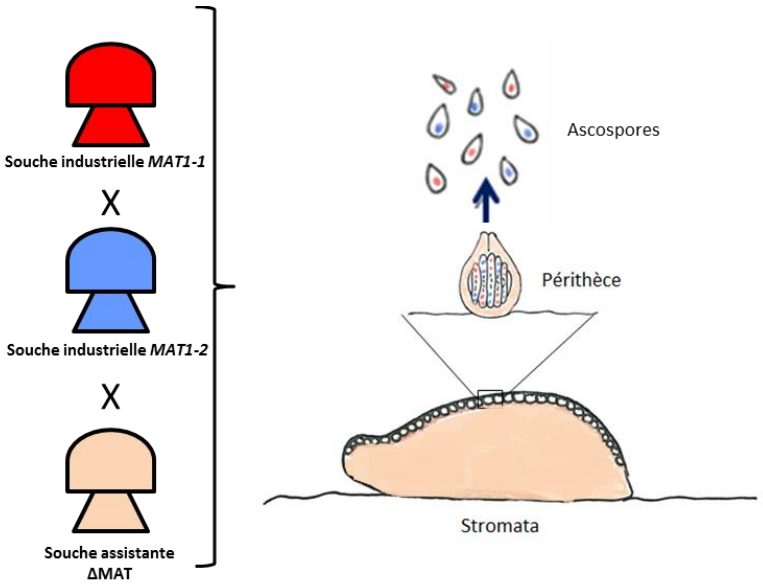


Figure 44 : Stratégie de la souche assistante appliquée à *T. reesei*.

La stratégie de la souche assistante permettrait de contourner le problème de fertilité femelle sans avoir besoin d'identifier la ou les mutations responsables de l'infertilité, ce qui signifie qu'il n'y a pas

besoin de corriger la ou les mutations dans toutes les souches industrielles. La mise en œuvre de cette méthode demande moins d'étapes que la méthode utilisée par Kubicek et al. (2014). Toutefois, cette méthodologie n'a été décrite que chez le champignon *P. anserina* et il est possible qu'elle soit difficile à mettre au point dans le champignon *T. reesei* car le déroulement de la différenciation des fructifications diffère par la présence de la structure stromata. De surcroit, cette méthode permet de complémenter les mutations affectant les tissus maternels mais pas celles impliquées dans les tissus zygotiques (Silar, 2014). Or le gène *idc1* de *T. reesei* n'est, pour l'heure, connu que pour son rôle dans les hyphes et les tissus maternels (Linke et al., 2015) mais s'il est aussi impliqué dans le processus zygotique alors cette stratégie n'aboutira pas.

Dans un premier temps, nous voulons mettre au point cette stratégie à partir de la souche QM6a. Par la suite, si nos résultats sont concluants, nous l'étendrons à des souches industrielles. Pour mettre en œuvre cette méthode, il faut construire deux souches outils :

- une souche assistante Δ*MAT* qui pourra servir pour tous les croisements entre souches industrielles,
- une souche de type sexuel opposé QM6a *MAT1-1*.

3.2.2. Prérequis à la stratégie de la souche assistante

Avant de construite les souches nécessaires, il est impératif de s'assurer que la souche dont le locus *MAT* sera invalidé est femelle fertile, qu'elle n'est pas végétativement incompatible avec la souche femelle stérile QM6a (*MAT1-2*) et qu'elle est capable de faire des anastomoses avec elle.
Chez champignons filamenteux, les cellules hétérocaryotiques formées par la fusion de souches incompatibles sont rapidement détruites. Ce mécanisme de reconnaissance du non-soi est appelé incompatibilité végétative (Bégueret et al., 1994). La stratégie reposant sur la formation d'un hétérocaryon, l'existence d'une incompatibilité entre les souches conduirait à un échec de cette approche. Enfin, il est important de vérifier la capacité des souches à faire des anastomoses entre elles pour qu'il puisse y avoir formation d'hétérocaryon.

La vérification de la fertilité femelle s'effectue en réalisant une reproduction sexuée par arrosage (paragraphe 3.1.4). C'est la présence de stromata contenant des ascospores qui définit si la souche est femelle fertile. Comme toutes les souches industrielles sont femelles stériles, les souches sauvages A2 et B31, isolées précédemment, doivent être utilisées comme souches assistantes. Lors de l'étude de la formation des stromata, des arrosages sur les souches A2 ou B31 ont été effectués et ont montré que les deux souches étaient bien femelles fertiles (Figure 45).

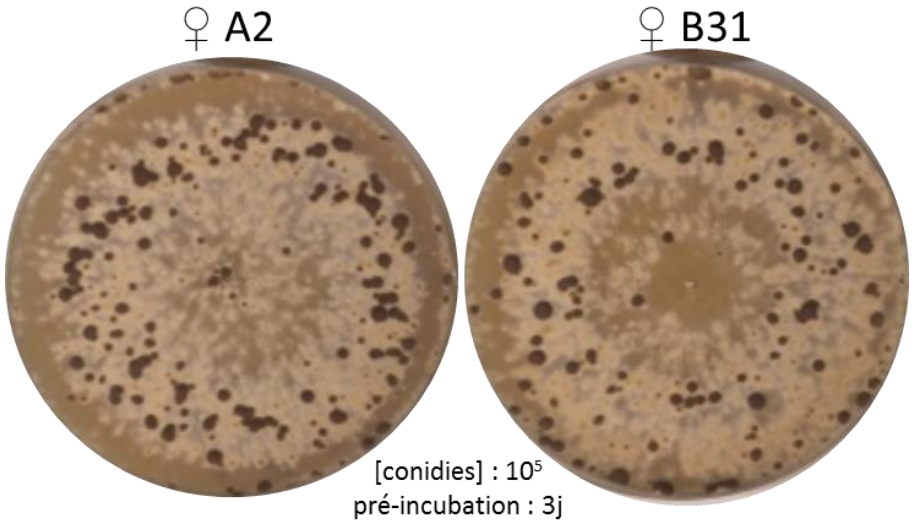


Figure 45 : Test de la fertilité femelle des souches A2 et B31.

Pour vérifier la compatibilité végétative, des dicaryons entre souches sauvages et industrielles sont fabriqués et incubés dans les conditions de reproduction sexuée. Une croissance mycélienne et la fabrication de stromata fertiles indiquent que les souches sont compatibles entre elles. Les dicaryons ainsi formés sont capables de se développer et de former des fructifications contenant une descendance (Figure 46A). Pour confirmer ce résultat, une expérience d'interférence hyphale a été faite selon Silar (2005). Elle consiste à mettre en confrontation les souches à tester. Le système d'incompatibilité végétative entraîne la mort cellulaire des cellules se trouvant à la confrontation lorsque les souches sont incompatibles. La présence de cette mort cellulaire est détectée par une coloration au Bleu de Trypan qui pénètre dans le cytoplasme des cellules mortes dont la membrane plasmique est devenue perméable tandis que les cellules vivantes restent intactes. Une coloration à la confrontation entre deux souches indique donc une incompatibilité végétative. Aucune mort cellulaire n'a été observée, confirmant que les souches sauvages et industrielles ne sont pas incompatibles entre elles. Quant aux anastomoses, elles ont bien lieu entre toutes les souches testées bien qu'elles soient moins nombreuses dès que des souches industrielles sont mises en jeu (Figure 46B). Lorsque ces vérifications ont été faites nous ne disposions pas de souche QM6a *MAT1-1*. Dès la réception de la souche construite par Linke et al. (2015) et utilisée dans la suite du manuscrit, nous avons procédé à ces mêmes vérifications et les résultats obtenus sont similaires à ceux-ci.

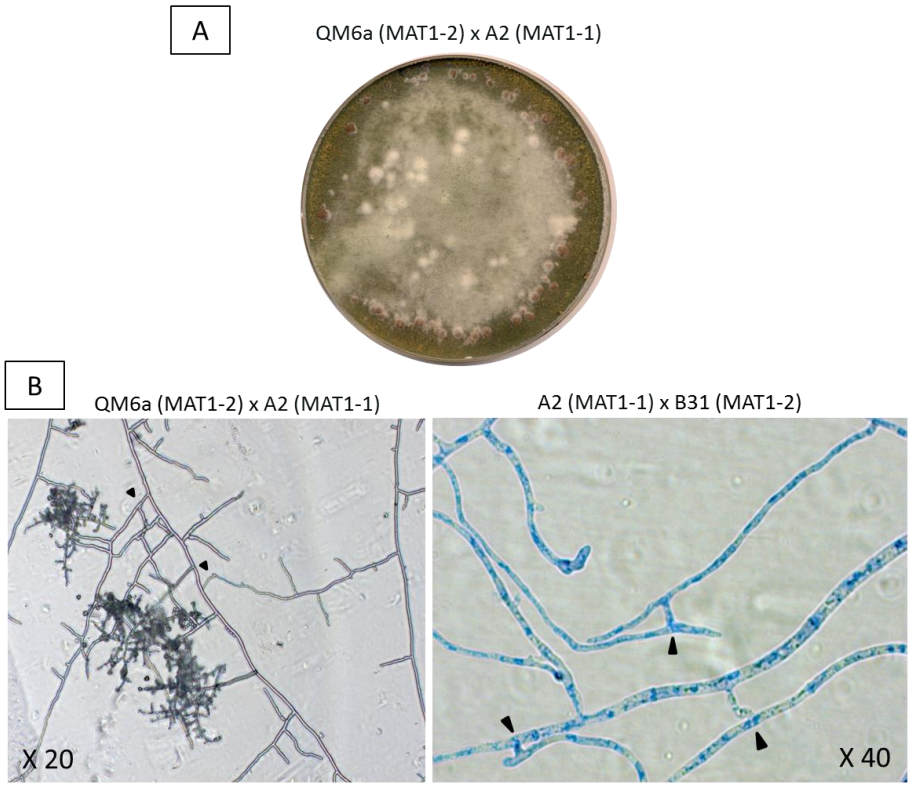


Figure 46 : Validation des prérequis.
Test d'incompatibilité végétative par formation de dicaryons entre la souche sauvage A2 et l'isolat naturel QM6a (A). Observation des anastomoses (B). Les flèches noires indiquent les anastomoses. Les mêmes résultats ont été obtenus avec la souche QM6A *MAT1-1* fournie par Linke et al., 2015.

Puisque tous les prérequis sont validés, aucun obstacle ne s'oppose à la mise en place de la stratégie de la souche assistante.

3.2.3. Construction des souches outils

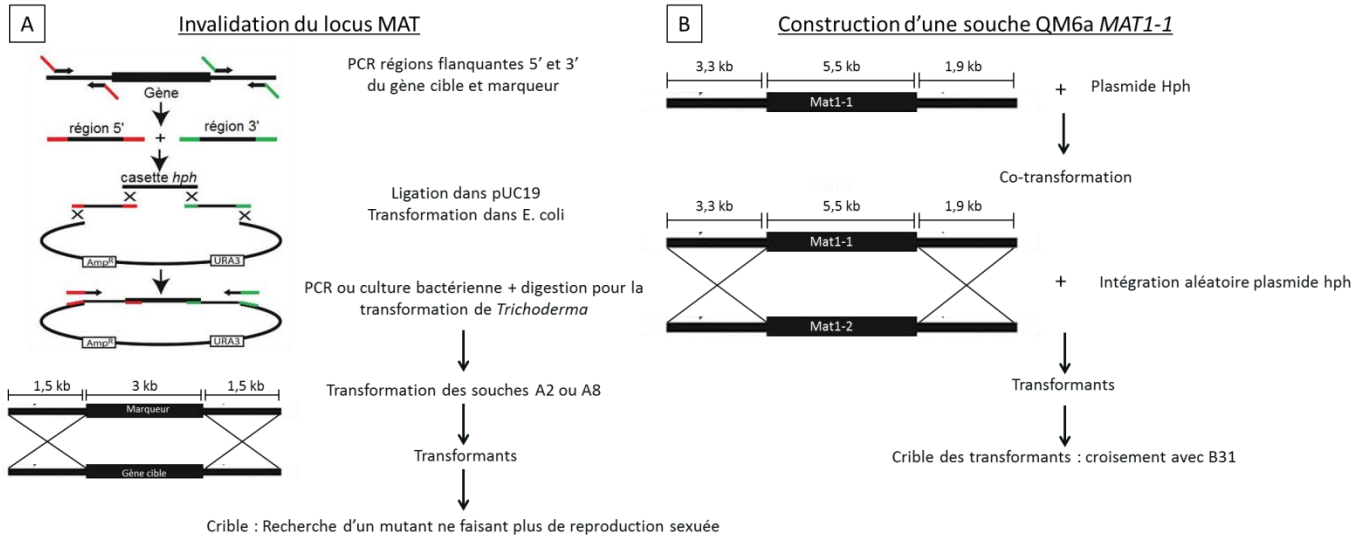


Figure 47 : Stratégie de construction des souches outils.
Stratégie d'invalidation du locus *MAT* (A) et stratégie de remplacement du locus *MAT1-2* de QM6a par le locus *MAT1-1* (B).

3.2.3.1. Souche assistante Δ*MAT*

La construction de la souche assistante nécessite d'invalider le locus *MAT* en le remplaçant par un marqueur de sélection grâce au mécanisme de recombinaison homologue. Une cassette d'invalidation portant le gène de résistance *hph* bordé de fragments de 1000pb homologues aux régions de part et d'autre du locus *MAT* de la souche sauvage, a été construite (Figure 47).

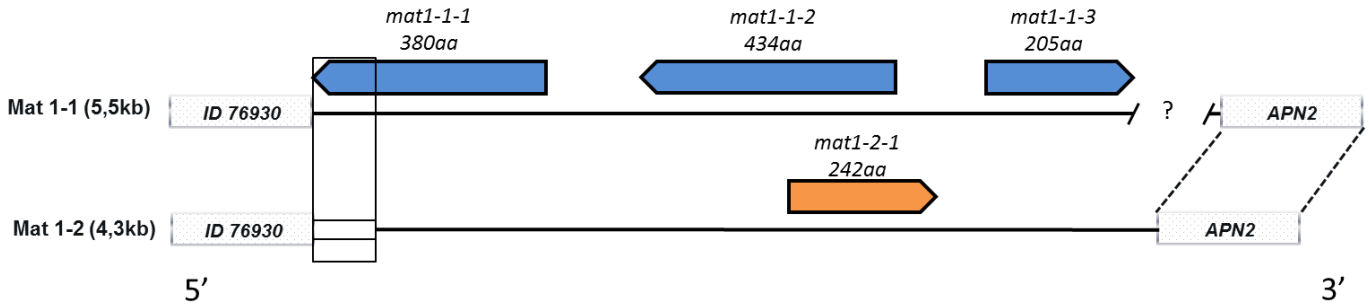


Figure 48 : Les loci *MAT* de *T. reesei*.
Dans la souche de type sexuel *MAT1-1,* il n'existe pas de séquençage de la région se trouvant entre les gènes *MAT1-1-3* et *APN2* qui est marquée d'un point d'interrogation. Les régions adjacentes choisies bordent les gènes *MAT1-1-1* et *MAT1-1-3.*

Selon le locus *MAT* à invalider les régions adjacentes sont différentes. Des difficultés ont été rencontrées lors du design de la cassette d'invalidation du locus *MAT1-1*. En effet, si la séquence du locus *MAT1-1* soumise par Seidl et al. débute au niveau du gène ID76930, elle s'arrête juste après la fin du gène *MAT1-1-3* (Figure 48) et nous ne disposons d'aucune séquence entre les gènes *MAT1-1-3* et *APN2*. Les idiomorphes *MAT1-1* ou *MAT1-2* occupant une région identique du génome, les gènes encadrant le locus MAT sont conservés (Seidl et al., 2009). La région adjacente 3' a donc été choisie dans le gène conservé *APN2* en nous basant sur le génome de la souche QM6a (*MAT1-2*). Ainsi une cassette a bien été obtenue pour l'invalidation du locus *MAT1-1* (Figure 49).

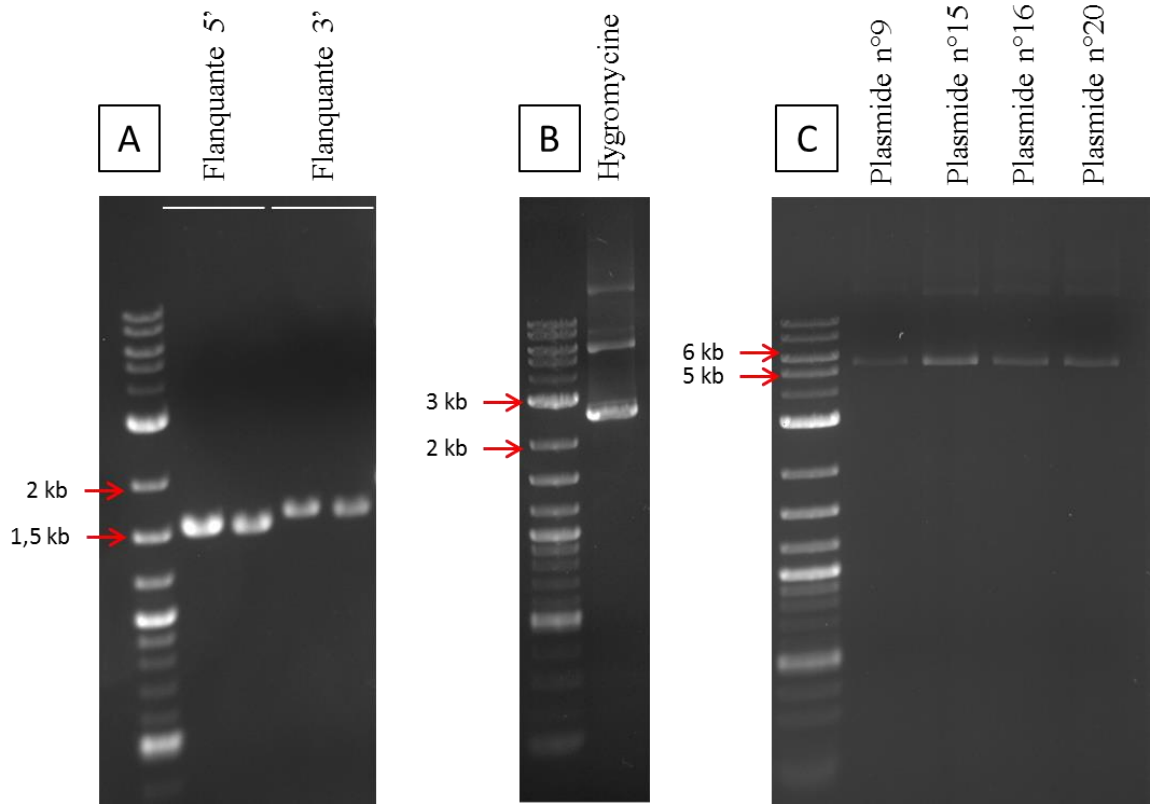


Figure 49 : obtention de la cassette d'invalidation du locus *MAT1-1*

Les régions adjacentes 5' de 1,5 kb et 3' de 1,6 kb sont amplifiées avec les couples d'amorces Mat1-1-A/Mat1-1-B et Mat1-1-C/Mat1-1-D (A). Le gène de résistance à l'hygromycine de 2,6 kb est amplifiée avec les amorces Mat1-1-E et Mat1-1-F (B). La cassette d'invalidation d'une taille totale de 5,7 kb est amplifiée avec les amorces DelMat1-1-A et DelMat1-1-D (C).

Les cassettes d'invalidation ont ensuite été utilisées pour la transformation des souches sauvages A2 (cassette d'invalidation *MAT1-1*) et B31 (cassette d'invalidation *MAT1-2*) par la méthode des protoplastes. Les transformants purifiés sont soumis à un crible (Figure 47A) basé sur la stérilité des souches ayant le locus *MAT* invalidé (paragraphe 2.6.1). Puis une validation par amplification PCR (paragraphe 2.6.1) est menée afin de vérifier que la cassette d'invalidation a bien été intégrée au site souhaité.

Pour l'invalidation du locus *MAT1-2* dans la souche B31, sur 121 transformants purifiés, 22 ont été sélectionnés par le crible. Après vérification par PCR, 10 clones s'avèrent ne plus posséder le locus *MAT* (Figure 50). L'invalidation du locus *MAT1-1* dans la souche sauvage A2 n'a quant à elle pas abouti malgré plusieurs tentatives de transformation. Néanmoins, comme nous disposons de souches B31 ::Δ*MAT1-2-hph*, nous avons fait le choix de ne pas persister quant à l'invalidation dans la souche A2.

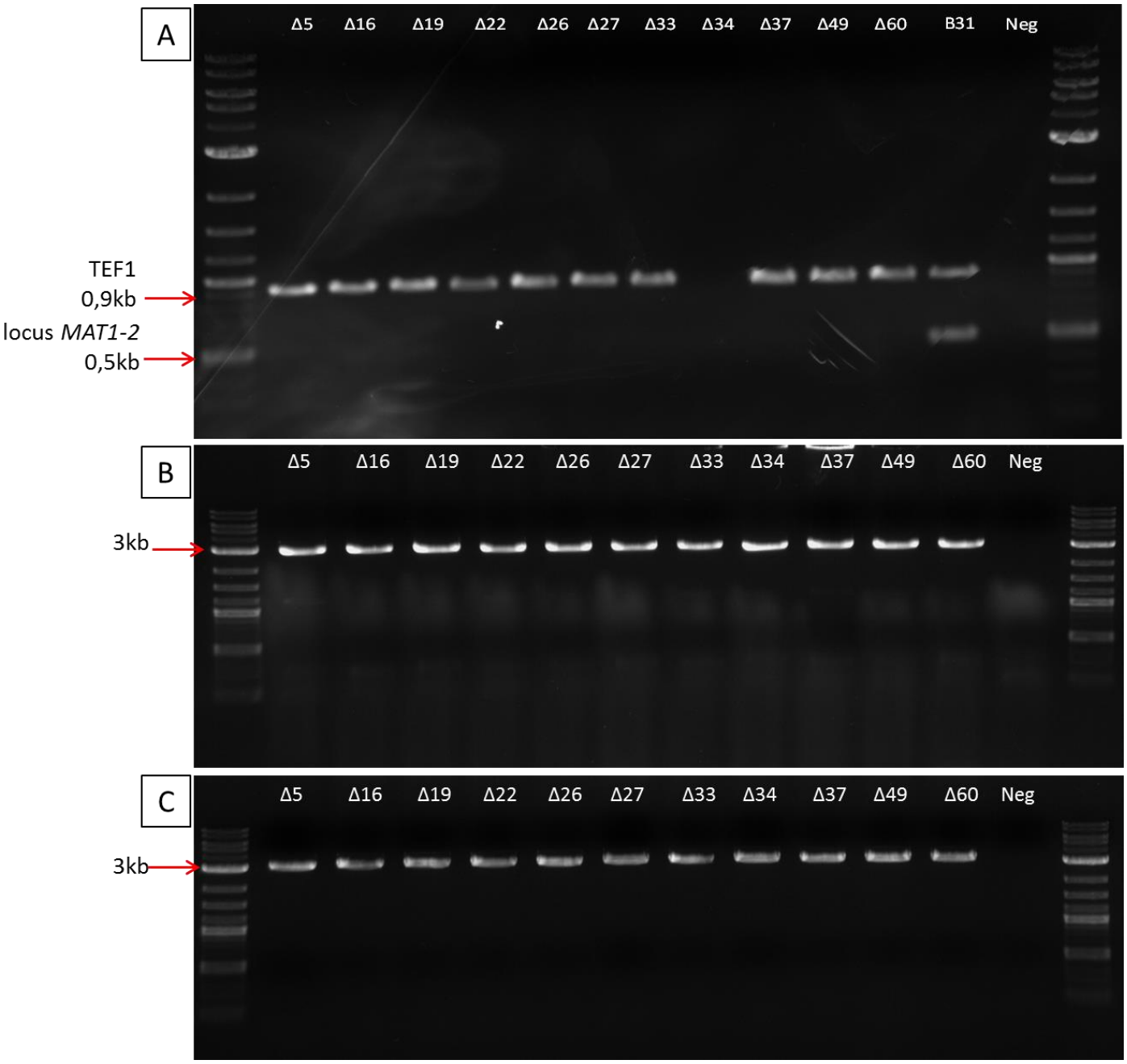


Figure 50 : Vérification par amplification PCR de l'invalidation du locus *MAT 1-2*

L'invalidation du gène est vérifiée en amplifiant avec les amorces *MAT1-2*-F interne et *MAT1-2*-R interne un fragment interne de 500 pb du locus *MAT1-2*. Cette amplification se fait en tandem avec celle d'un fragment de 880 pb du gène de ménage *tef1* à l'aide du couple d'amorce EF1/EF2 (A). Pour valider l'insertion de la cassette d'invalidation au locus, la jonction 5' (3 kb) est amplifiée à l'aide du couple d'amorces D*MAT1-2*verif5F/verifHygro5'(B) tandis que la jonction 3' (3,1 kb) est amplifiée à l'aide du couple d'amorces D*MAT1-2*verif3R/verifHygro3' (C).

Afin de vérifier que le phénotype observé provient de l'invalidation du locus MAT, un test de complémentation a été réalisé. Le plasmide de complémentation portant le locus *MAT1-2* sauvage ainsi que le gène de résistance à la phléomycine est transformé dans la souche B31 ::Δ*MAT1-2-hph* n°60 par la méthode des protoplastes. Cette expérience contrôle a généré 11 transformants purifiés qui ont été soumis à un crible (Figure 47A) basé sur la fertilité des souches ayant intégré dans leur génome le locus *MAT1-2*. Sur 11 transformants purifiés, 7 sont capables de produire des stromata fertiles (Figure 51).

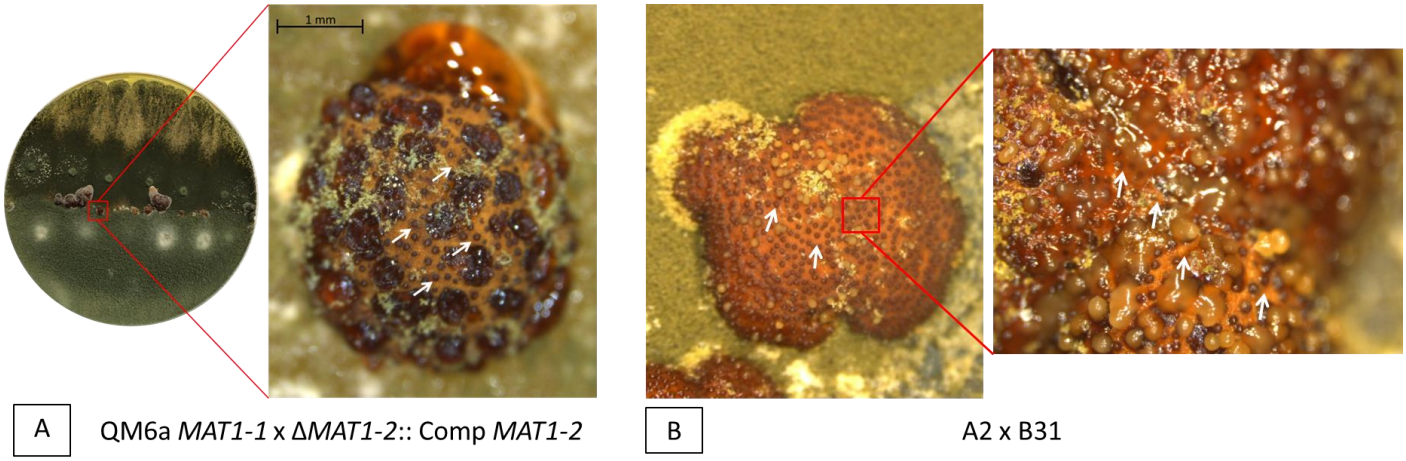


Figure 51 : Reproduction sexuée après complémentation de l'invalidation du locus *MAT1-2*
Suite à la complémentation du locus *MAT1-2* par le locus sauvage, les transformants sont croisés avec la souche QM6a *MAT1-1* (A). Le croisement par confrontation génère des stromata là où les deux souches se rencontrent. Ces stromata portent de nombreux ostioles (flèches blanches) comme dans un croisement entre souches sauvages fertiles (B).

3.2.3.2. Souche QM6a *MAT1-1*

La construction de la souche QM6a *MAT1-1* par changement du type sexuel de la souche QM6a d'origine a été entreprise comme décrit dans l'article de Seidl et al. (2009). Le locus *MAT1-1* ainsi que les régions adjacentes de 3,3 kb en amont et 1,9 kb en aval ont été amplifiés par PCR puis co-transformés avec le plasmide porteur du marqueur de résistance à l'hygromycine dans la souche QM6a *MAT1-2*. La co-transformation doit permettre le remplacement du locus *MAT1-2* résident par le locus *MAT1-1* par recombinaison homologue, et une intégration aléatoire du plasmide porteur du marqueur de sélection (Figure 47B). Les transformants obtenus sont purifiés et soumis à un crible qui va permettre d'identifier ceux qui sont devenus *MAT1-1* et donc capables de se reproduire avec la souche sauvage B31 de type sexuel *MAT1-2*. Malgré plusieurs tentatives de transformation et plus de 300 transformants criblés, aucun clone ayant un type sexuel remplacé n'a été obtenu. Au vu de ce résultat d'autres stratégies de remplacement ont été envisagées.

Une des stratégies alternatives, met en jeu la reproduction sexuée entre la souche sauvage A2 et QM6a et vise à obtenir dans la descendance une souche *MAT1-1* stérile. Soixante-douze descendants (référencés QM-A) ont été criblés à la recherche d'une souche de type sexuel *MAT1-1* femelle stérile et mâle fertile (Figure 52B) : 10 souches QM-A portant ces caractéristiques ont été obtenues. Ces souches sont utilisées pour de premiers essais de tricaryon.

Parallèlement, une autre stratégie de génie génétique visant à remplacer le locus *MAT1-2* directement par un fragment d'ADN comprenant le locus *MAT1-1* dans lequel aura préalablement été intégré le marqueur de sélection (Figure 52A) a été envisagée. Ce gène de sélection doit être intégré entre le gène *mat1.1.3* et le gène *APN2* comme décrit dans le brevet de Kubicek et al. (2014). Pour

construire cette nouvelle cassette j'ai choisi de procéder de la façon suivante : amplifier le locus *MAT1-1* et l'insérer dans un plasmide pour en faciliter la manipulation, puis dans un second temps insérer le marqueur de sélection entre le gène *mat1-1-3* et le gène *APN2*. Le clonage du locus *MAT1-1* dans le plasmide commercial n'a pas abouti en raison de problèmes techniques liés principalement à la taille importante du fragment d'ADN à amplifier.

Finalement, les difficultés d'obtention de la souche QM6a *MAT1-1* nous ont conduits à faire une demande auprès de l'équipe l'ayant construite. Cette demande a été acceptée après un délai correspondant à la publication de l'article de Linke et al. (2015).

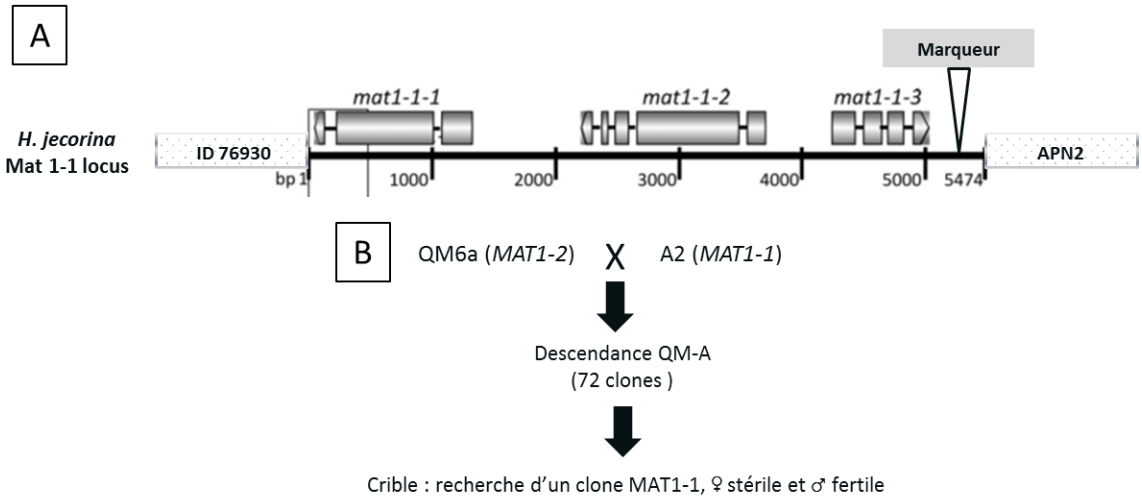


Figure 52 : Stratégies alternatives pour l'obtention d'une souche *MAT1-1*.
Soit par remplacement du locus *MAT1-2* selon la stratégie de Kubicek et al. (2014) (A) soit par reproduction sexuée (B).

3.2.4. Essais de reproduction sexuée à l'aide de la souche assistante

Les premiers essais de reproduction sexuée mettant en jeu une souche assistante B31 ::Δ*MAT1-2-hph*, une souche QM-A *MAT1-1* et la souche QM6a *MAT1-2* ont été entrepris. Deux souches B31 ::Δ*MAT1-2-hph* et QM-A *MAT1-1* choisies aléatoirement ont été testées afin de s'assurer qu'en cas d'absence de reproduction sexuée, les résultats obtenus ne proviennent pas de souches outils défectueuses pour un mécanisme mis en jeu lors de la formation du tricaryon et de la complémentation du gène muté. Dans un premier temps, comme chez *P. anserina* (Jamet-Vierny et al., 2007), nous avons induit la formation d'hétérocaryons en mixant les fragments de mycéliums des différentes souches. Puis des boîtes de Petri ont été ensemencées avec ce mélange et incubées à 24 °C avec une alternance de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité.

Les résultats de cette première expérience sont présentés dans le Tableau 9. Les tricaryons contenant la souche assistante B31 ::Δ*MAT1-2-hph* n°5 (abrégé en B31::Δ*MAT* n°5) présentent

uniquement des petites boules blanches cotonneuses comme présenté à J+4 dans le cycle de reproduction sexuée (Figure 34). En revanche, les tricaryons contenant la souche assistante B31 ::Δ*MAT1-2-hph* n°60 (abrégé en B31::Δ*MAT* n°60) produisent au bout de dix jours d'incubation des petits stromata comme présenté à J+5 (Figure 34). C'est cette dernière souche assistante qui sera dorénavant utilisée pour les essais de tricaryon. Par ailleurs, il faut noter que les stromata sont beaucoup plus nombreux lorsque les souches QM-A12 et QM-A29 sont utilisées. Cependant, les stromata obtenus sont de petite taille (1-2 mm), ne semblent pas dépasser le stade présenté à J+5 (Figure 34) et finissent par être recouverts de mycélium et de conidies. Néanmoins, il faut noter que sur les croisements contrôles aucune structure de type stromata n'a été observée ce qui confirme que l'obtention des stromata résulte bien de la mise en contact des trois partenaires. La formation d'un tricaryon permet de complémenter partiellement la stérilité femelle des souches industrielles.

Tableau 9: Essais de tricaryon.
Des plugs de mycélium des trois partenaires sont broyés et 10 µL du broyat sont déposés au centre de chaque boîte de Petri. Chaque essai a été répété trois fois.

	Souche ::Δ*MAT*	Souche *MAT1-1*	Souche *MAT1-2*	Résultats
Essais	B31 ::Δ*MAT* n°5	QM-A n°12	QM6a	Boules cotonneuses
	B31 ::Δ*MAT* n°5	QM-A n°29	QM6a	Boules cotonneuses
	B31 ::Δ*MAT* n°5	QM-A n°46	QM6a	Boules cotonneuses
	B31 ::Δ*MAT* n°60	QM-A n°12	QM6a	11 Petits stromata immatures
	B31 ::Δ*MAT* n°60	QM-A n°29	QM6a	30 Petits stromata immatures
	B31 ::Δ*MAT* n°60	QM-A n°46	QM6a	7 Petits stromata immatures
Contrôles	B31 ::Δ*MAT* n°5		QM6a	-
	B31 ::Δ*MAT* n°60		QM6a	-
		QM-A n°12	QM6a	-
		QM-A n°29	QM6a	-
		QM-A n°46	QM6a	-
	B31 ::Δ*MAT* n°5	QM-A n°12		-
	B31 ::Δ*MAT* n°5	QM-A n°29		-
	B31 ::Δ*MAT* n°5	QM-A n°46		-
	B31 ::Δ*MAT* n°60	QM-A n°12		-
	B31 ::Δ*MAT* n°60	QM-A n°29		-
	B31 ::Δ*MAT* n°60	QM-A n°46		-

Afin d'obtenir des stromata matures et contenant des ascospores, des essais supplémentaires ont été entrepris en faisant varier les proportions de chaque partenaire du tricaryon ou en préparant d'abord un dicaryon entre la souche assistante B31::Δ*MAT* n°60 et la souche QM6a *MAT1-2* ou la souche QM-A *MAT1-1* suivi d'un arrosage avec les conidies de la souche restante. Ces essais ont permis comme précédemment d'obtenir quelques petits stromata immatures qui n'ont pas poursuivi leur développement.

Les différents essais n'ont jamais abouti à l'obtention de stromata matures capables d'expulser des ascospores.

Après réception de la souche QM6a *MAT1-1* construite par Kubicek et al., 2014), les expériences réalisées avec la souche QM-A (*MAT1-1*) ont été répétées mais aucun stromata n'a été obtenu. Suite à ce résultat, d'autres méthodes pour former des tricaryons ont été testées, répertoriées dans l'Annexe 4, et une seule a permis d'obtenir des stromata de façon répétable. Cette méthode est une variante de la méthode d'arrosage vue au paragraphe 3.1.4 et nous l'avons nommée « arrosage séquentiel ».

Dans cette procédure, les paramètres mis au point dans le paragraphe 3.1.4 et permettant une reproduction sexuée optimisée, ont été conservés. La souche assistante B31::Δ*MAT* n°60 est pré-incubée à l'obscurité pendant 3 jours (ou parfois 4 si la souche assistante n'a pas envahi la boîte) à 24 °C puis arrosée avec 10^5 conidies d'une des souches QM6a, incubée pendant sept jours avec une alternance de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité et finalement arrosée avec les conidies de la souche QM6a restante et incubée jusqu'à apparition des stromata. Cet essai aboutit à l'obtention, au bout de 10 jours d'incubation, d'un seul stromata qui atteint 0,5 cm de diamètre et dont la couleur passe du marron clair au marron foncé, typique des stromata matures (Figure 53). Néanmoins, ce stromata est plutôt plat et ne présente aucun ostiole à sa surface.

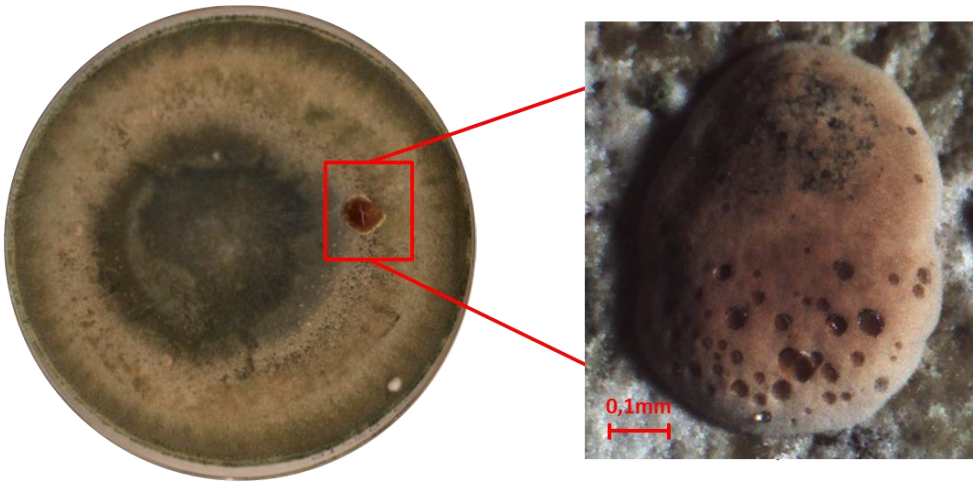


Figure 53 : Stromata obtenu avec la stratégie de la souche assistante
Les mycéliums des souches B31::Δ*MAT* n°60, QM6a *MAT1-1* et QM6a *MAT1-2* ont été mixés puis les boîtes de Petri ont été ensemencées avec ce mélange et incubées à 24 °C avec une alternance de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité.

Suite à l'obtention de ce stromata par « arrosage séquentiel », dans un premier temps, nous en optimisons les conditions afin d'obtenir plus de stromata et de façon répétable. Pour cela, nous avons fait varier les paramètres listés dans le Tableau 10. Pour fixer les bornes des paramètres à tester, nous nous sommes appuyés sur les résultats de l'optimisation de la méthode d'arrosage présentée précédemment (paragraphe 3.1.4) Chacun des paramètres testés permettra d'apporter des réponses utiles à la mise en place de l'arrosage séquentiel :

- comme pour un arrosage classique nous souhaitions pré-incuber la souche assistante 3 jours mais puisqu'elle n'avait pas totalement envahi la boîte de Petri, nous avons décidé de réévaluer l'effet de 4 à 6 jours de pré-incubation,
- deux ordres d'arrosage sont testés afin d'identifier si une des deux souches donneuses de conidies favorise la production de stromata,
- différentes concentrations de conidies sont testées afin d'identifier celle qui favorise la production de stromata. Comme les essais de reproduction sexuée à l'aide de la souche assistante faits ci-dessus suggèrent que la formation des tricaryons par arrosage est un évènement rare, nous émettons l'hypothèse qu'en arrosant avec un maximum de conidies nous augmentons la probabilité de former des tricaryons et d'obtenir des stromata.

Tableau 10 : Récapitulatif des paramètres à faire varier pour l'arrosage séquentiel

Paramètres	Conditions à tester
Durée de pré-incubation de la souche assistante avant arrosage	4 à 6 jours
Souche donneuse de conidies pour les arrosages 1 et 2	QM6a *MAT1-1* ou QM6a *MAT1-2*
Concentration des conidies	1.10^{6} à 1.10^{8}

Des expériences faisant varier ces différents paramètres ont été réalisées et le nombre de stromata obtenus dans les différentes conditions sont présentés Figure 54. Tout d'abord, ces expériences montrent que plus la durée de pré-incubation de la souche assistante est longue et moins elle favorise la formation de stromata, ce qui est cohérent avec le résultat obtenu précédemment (paragraphe 3.1.4). D'autre part, lorsque le 1er arrosage est fait avec des conidies de type sexuel *MAT1-1*, le nombre de stromata obtenus est plus élevé que si le 1er arrosage est fait avec des conidies de type sexuel *MAT1-2*. Enfin, plus la concentration des conidies est élevée, plus le nombre de stromata obtenus est grand, confirmant notre hypothèse selon laquelle la probabilité de former des tricaryons augmente avec la concentration de conidies arrosées.

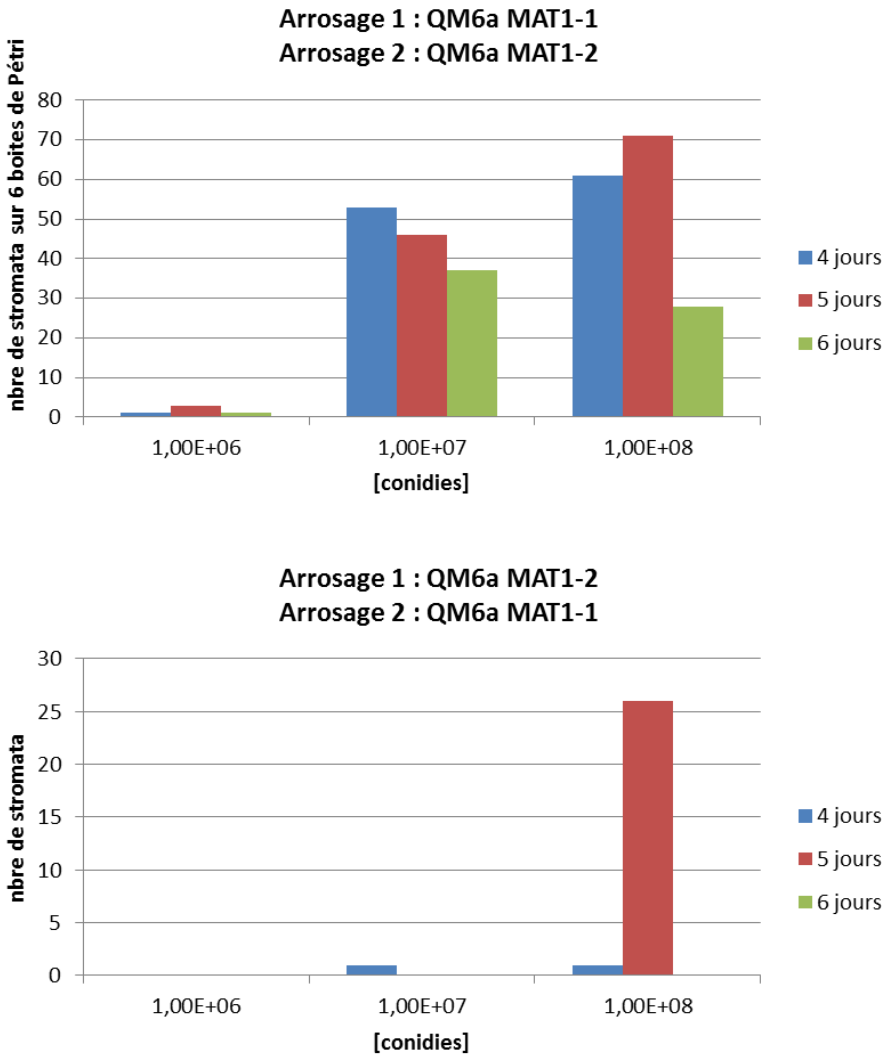


Figure 54 : Nombre de stromata obtenus suite à la variation des paramètres de l'arrosage séquentiel
Sont représentés les stromata totaux de six expériences par condition.

Donc les conditions optimales pour l'obtention systématique de stromata sont : une pré-incubation de la souche assistante au noir pendant 4 ou 5 jours, l'utilisation d'une forte concentration de conidies comprise entre 10^7 et 10^8 conidies/ml et un 1^{er} arrosage effectué avec des conidies de type sexuel *MAT1-1*.

Les stromata ainsi produits ont une taille et une couleur similaires à ceux obtenus lors d'un croisement sauvage (J+9 Figure 35). Néanmoins ils sont plats, ne présentent aucun ostiole à leur surface et n'émettent pas d'ascospores. Leur coupe longitudinale ne laisse entrevoir aucun périthèce sous leur surface, confirmant la stérilité des stromata obtenus.

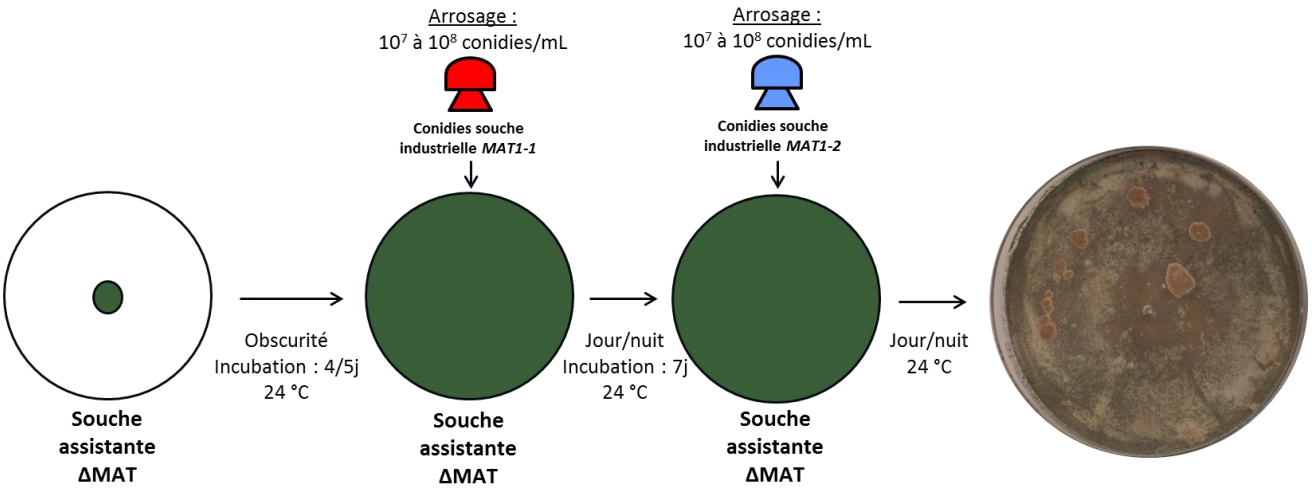


Figure 55 : Conditions optimales pour l'obtention de stromata par la stratégie de la souche assistante

Si le croisement de deux souches industrielles femelles stériles aboutit à la formation d'aucun stromata, leur croisement à l'aide de la souche assistante génère des stromata suggérant qu'il y a une complémentation partielle de leur stérilité. Ainsi, bien qu'ils soient stériles, l'obtention de stromata représente une étape importante du processus de restauration de la fertilité des souches industrielles.

L'étape suivante est de trouver les conditions permettant de différencier les périthèces et les ascospores. Il est bien connu que la reproduction sexuée est un processus couteux en énergie (Heitman et al., 2013) or, dans la méthode de l'arrosage séquentiel, le temps entre l'inoculation de la souche assistante et l'apparition de stromata est d'une vingtaine de jours, ce qui résulte en un épuisement du milieu de culture. Afin de continuer à fournir des nutriments au stromata, nous les avons greffés, selon la méthode décrite par Silar (2011), soit sur le mycélium de la souche assistante soit sur une nouvelle boîte de milieu PDA. Les stromata greffés sur le mycélium de la souche assistante ne poursuivent pas leur développement et sont rapidement recouverts de mycélium tout comme ceux greffés sur milieu PDA. Toutefois, sur milieu PDA, les stromata greffés développent un mycélium capable de générer de nouveaux stromata, ce qui suggère que le mycélium a été enrichi en tricaryon. Parmi les stromata nouvellement formés, nous avons pu observer quelques individus présentant des structures similaires aux ostioles des croisements sauvages (Figure 56A). Toutefois, le nombre d'ostioles est faible en comparaison à un croisement sauvage et aucune ascospore n'est libérée. L'observation microscopique de l'intérieur de la structure située sous l'ostiole montre la présence de cellules allongées uninucléées pouvant être des paraphyses (Figure 56B). Or chez *H. gelatinosa* et *H. schweinitzii*, ce type de cellules allongées et uninuclées ont pour origine la différenciation des cellules plectenchymateuses au fur et à mesure du développement de la cavité périthéciale (Vincens, 1917; Hanlin, 1965). Par ailleurs, chez ces deux espèces, les paraphyses tapissent les cols des ostioles lorsqu'ils sont formés. Cette observation suggère donc que des périthèces sont présents sous les ostioles.

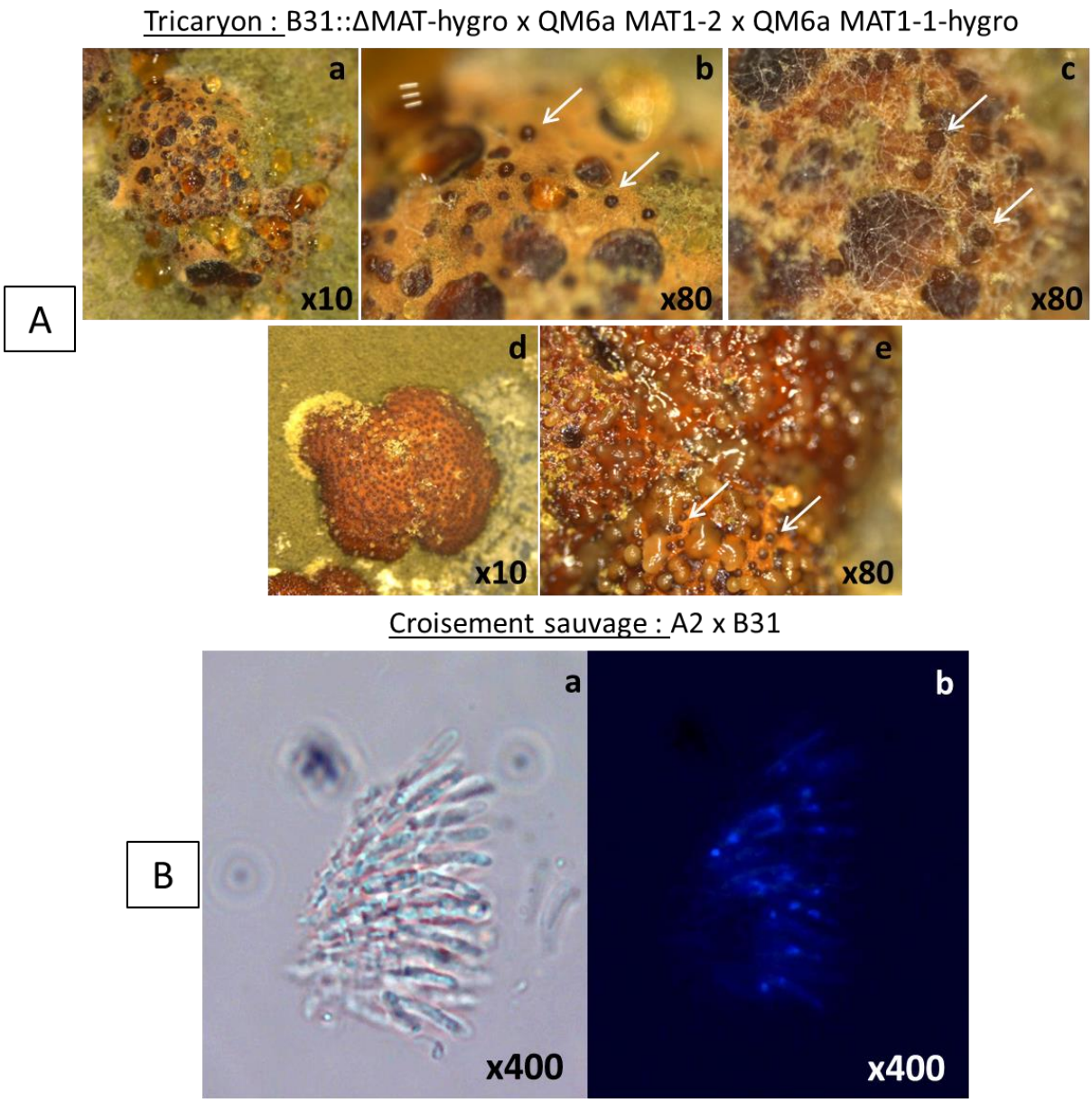


Figure 56 : Observation d'un stromata issu d'un tricaryon

Le stromata issu du tricaryon présente des ostioles (A-a/b) mais il ne poursuit pas son développement et est finalement recouvert de mycélium et de conidies (A-c) tandis que le stromata issu d'un croisement sauvage (A-d) en plus de présenter des ostioles est capable d'expulser les ascospores qui sont dans le liquide laiteux (A-e). Observation microscopique des tissus présents dans l'ostiole en lumière polarisé (B-a) et avec un marquage DAPI (B-b). Les flèches blanches désignent les ostioles.

Ainsi, à l'aide de la stratégie de la souche assistante nous sommes en mesure de complémenter partiellement la stérilité femelle et de former des stromata assez aisément. Néanmoins, la formation des périthèces est difficile et l'obtention d'ascospores semble bloquée. Pour résoudre ce blocage il faut dans un premier temps comprendre s'il a lieu lors de la fécondation à l'origine de l'initiation du périthèce ou lors de la différenciation de l'hyménium. Or, les observations et les données dont nous disposons actuellement ne permettent pas de répondre à cette question.

Au préalable, il faut comprendre quels évènements sont responsables de l'initiation du développement des périthèces. Chez *P. anserina*, c'est la fécondation d'un gamète femelle par le gamète mâle qui est à l'origine du développement d'un périthèce, de son hyménium et des ascospores (Coppin et al., 1997). Chez *T. reesei*, le processus peut être différent car les périthèces sont inclus dans un stromata, rendant difficile la compréhension de leurs origines. Nos observations suggèrent que le stromata se développe en premier et que les périthèces se différencient dans un second temps (J+5 Figure 34 ; J+8 et J+10 Figure 35). Or nous ignorons si le développement du stromata puis des périthèces a pour origine un seul et même événement de fécondation, si une première fécondation est à l'origine du stromata puis qu'une 2^{e} engendre les périthèces ou s'il s'agit d'un mécanisme totalement différent. Par ailleurs, chez *T. reesei*, nous ignorons si les différents périthèces d'un même stromata proviennent de la fécondation par le même gamète mâle ou de plusieurs gamètes mâles. Néanmoins d'après la littérature, chez les ascomycètes, les descendants de chaque périthèce proviennent d'un seul événement de fécondation (Coppin et al., 1997; Debuchy et al., 2010b), nous supposons donc que *T. reesei* ne fait pas exception.

3.2.5. Etude de l'événement de fécondation

La méthode la plus simple pour obtenir des indices quant à l'origine des périthèces est d'initier un croisement génétique utilisant des conidies portant des marqueurs de sélection différents. Ainsi l'étude de la descendance de chaque stromata, pourra nous indiquer si les périthèces d'un stromata sont issus d'un ou plusieurs événements de fécondation. Le principe de l'expérience décrite Figure 57 repose sur la méthode d'arrosage. La souche dite femelle est fécondée par un mélange de conidies portant les gènes de résistance à deux types d'antibiotiques et le phénotype de résistance aux antibiotiques des descendants par stromata est analysé.

Dans cette optique, des souches sauvages, A2 (*MAT 1-1*) et B31 (*MAT 1-2*), porteuses du gène de résistance à la phléomycine ou à l'hygromycine ont été construites. Leurs conidies servent de gamètes mâles dans les différents croisements. Les souches A2 et B31, sans gène de résistance, servent de souche femelle et sont arrosées selon les conditions mises au point précédemment (paragraphe 3.1.4) par :

- des conidies de la souche sauvage compatible pour contrôler la sensibilité des ascospores sauvages aux antibiotiques,
- des conidies de la souche sauvage compatible portant le gène de résistance à l'hygromycine pour s'assurer que le gène de résistance est bien transmis à la descendance,
- des conidies de la souche sauvage compatible portant le gène de résistance à la phléomycine pour vérifier sa transmission à la descendance,
- un mélange de conidies compatibles et résistantes à l'hygromycine et à la phléomycine.

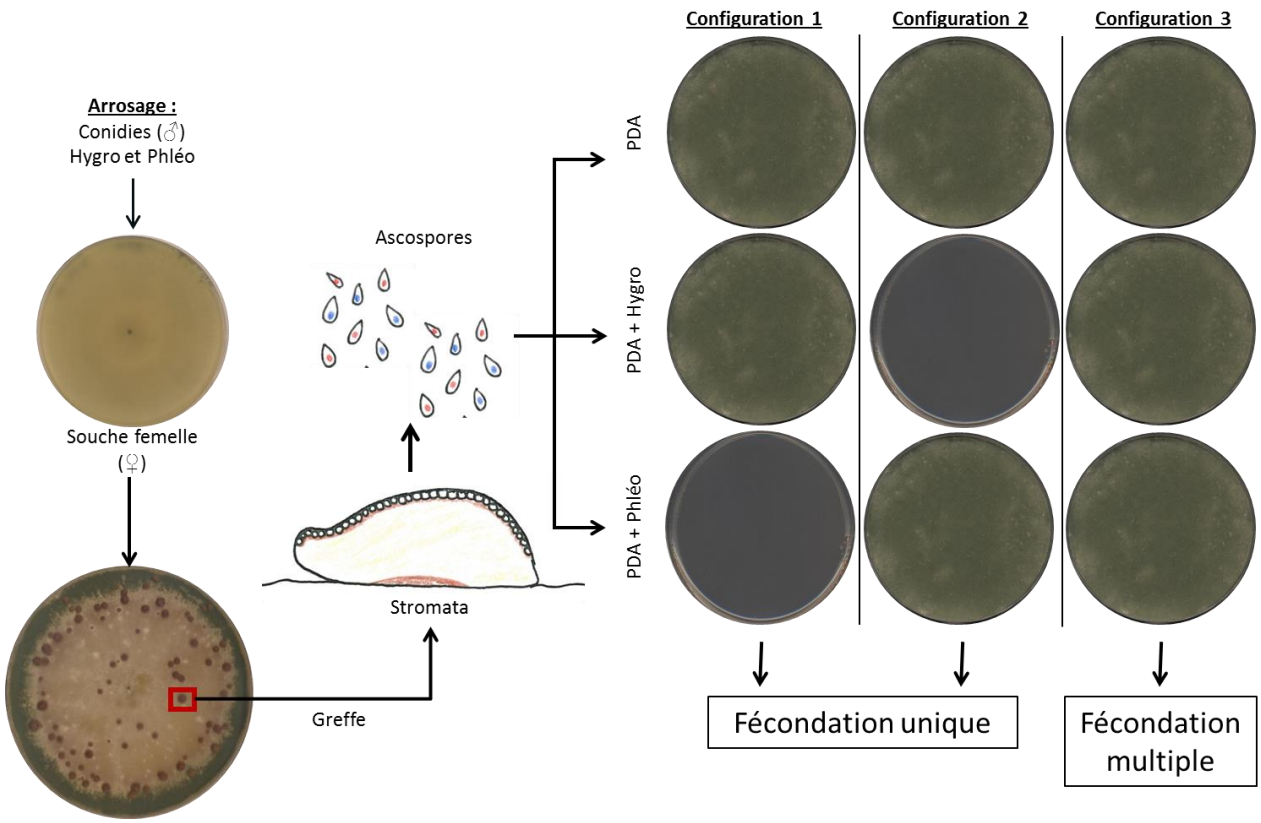


Figure 57 : Principe de l'expérience de fécondation
PDA-Hygro = PDA-Hygromycine et PDA-Phléo = PDA-Phléomycine

Les stromata obtenus sont isolés les uns des autres et leurs ascospores respectives sont alors récoltées et incubées sur les différents milieux sélectifs. Si les ascospores sont résistantes à un seul des antibiotiques alors les périthèces du stromata sont potentiellement le fruit d'une fécondation unique. Au contraire, si elles résistent aux deux antibiotiques, c'est que les périthèces du stromata sont issus d'une fécondation multiple. Les croisements par arrosage sont désignés de la manière suivante : **femelle (mâle)**. Le Tableau 11 répertorie les différents croisements à réaliser.

Tableau 11 : Croisements à réaliser pour étudier l'événement de fécondation

Souche femelle	Souche mâle	Rôle du croisement
A2	B31	Contrôles
	B31-Hygro	
	B31-Phléo	
	B31-Hygro + B31-Phléo	Test
B31	A2	Contrôles
	A2-Hygro	
	A2-Phléo	
	A2-Hygro + A2-Phléo	Test

La descendance issue des différents croisements d'un groupe de stromata (vrac) ou d'un stromata isolé est ensuite analysée par étalement sur milieux PDA, PDA-Hygromycine (PDA-Hygro) et PDA-Phléomycine (PDA-Phléo). Les différents résultats possibles ainsi que leur interprétation sont répertoriés dans le Tableau 12. Le milieu PDA étant non sélectif, les ascospores de chacun des croisements réalisés devraient pouvoir germer sur ce milieu. En revanche, les milieux PDA-Hygro et PDA-Phléo étant sélectifs, ils devraient permettre de visualiser la transmission ou non à la descendance du gène de résistance de l'antibiotique correspondant.

Précédemment, les ascospores étaient mis à germer sur Agar-eau afin d'éviter que des conidies contaminantes puissent germer, or dans cette expérience, les ascospores sont étalées en vrac et sur des milieux sélectifs. Pour éviter une contamination par les conidies, des précautions sont prises et les couvercles des boîtes de Petri contre lesquelles sont expulsées les ascospores sont changés avant les récoltes. Par ailleurs, le mycélium produit sur le milieu de greffe utilisé produit très peu de conidies (décrit ci-dessous).

Tableau 12 : Résultats attendus et interprétations

Résistance de la souche mâle	Stromata vrac ou isolé	Croissance			Interprétation
		PDA	PDA-Hygro	PDA-Phléo	
Sauvage	vrac	+	-	-	La reproduction sexuée donne naissance à une descendance viable
	isolé	+	-	-	
Hygromycine	vrac	+	+	-	La reproduction sexuée conduit au brassage génétique avec transmission du facteur de résistance
	isolé	+	+	-	
Phléomycine	vrac	+	-	+	
	isolé	+	-	+	
Mélange	vrac	+	+	+	Les deux facteurs peuvent être transmis
	isolé	+	+	+	Fécondation multiple
		+	-	+	Fécondation unique
		+	+	-	

3.2.5.1. Construction des souches résistantes à l'hygromycine et à la phléomycine

Les souches sauvages A2 et B31 ont été transformées par électroporation avec les plasmides portant le gène de résistance à la phléomycine ou à l'hygromycine. À l'issue des différentes transformations, 15 clones ont pu être validés :

- 2 clones B31-1040 (résistant à la phléomycine)
- 1 clone B31-1140 (résistant à l'hygromycine)
- 3 clones A2-1040 (résistant à la phléomycine)
- 10 clones A2-1140 (résistant à l'hygromycine)

Les clones choisis pour cette étude sont ceux dont la vitesse de développement et l'aspect phénotypique se rapprochent le plus de la souche sauvage d'origine.

3.2.5.2. Mise en place du protocole

Un premier essai de mise au point a été réalisé pour calibrer les étapes clés de l'expérimentation (Figure 58). Ainsi, le choix du moment opportun pour la greffe des stromata dépend de leur maturité, une greffe trop précoce entraine un arrêt du développement des fructifications. Deux séries de greffes espacées de deux jours d'intervalle sont donc réalisées à J+3 et J+5. Par ailleurs, les milieux de greffe PDA et Agar-eau ont été testés. Les résultats montrent que la descendance est libérée au même moment quel que soit le milieu ou le moment de la greffe. Cependant, les stromata greffés sur milieu PDA ont donné naissance à un mycélium dense rapidement recouvert de conidies tandis que sur milieu Agar-eau, le mycélium produit est grêle et dépourvu de conidies. De plus, des stromata secondaires apparaissent au bout de 11 jours sur les boîtes de PDA. Afin d'éviter la contamination des ascospores

récoltées par des conidies et ainsi fausser les résultats avec les stromata secondaires, les greffes seront effectuées sur le milieu Agar-H_2O.

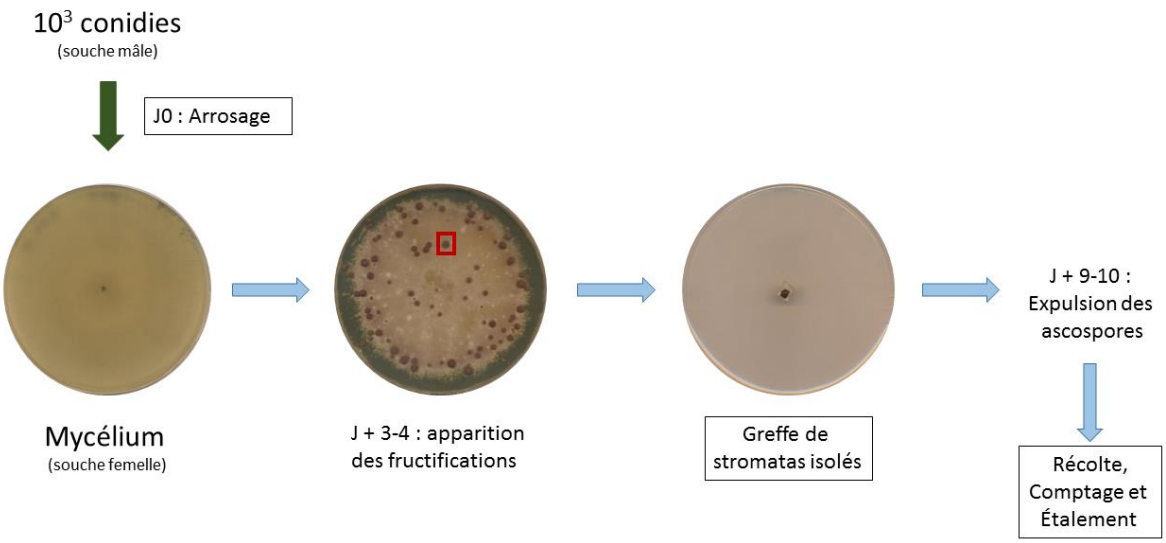


Figure 58 : Mise en œuvre de la reproduction sexuée par arrosage pour l'étude de l'événement de fécondation

Les ascospores issues de stromata isolés et de ceux restant sur les boîtes de croisements (stromata en vrac sur milieu PDA) sont récoltées dans du CTS 50 et comptées sur cellule de Malassez. La concentration moyenne d'ascospores récoltées est d'environ 10^5 cellules/mL pour celles issues de stromata isolés et 10^6 cellules/mL pour les stromata en vrac. Afin d'avoir suffisamment de matériel, les ascospores sont récoltées une seconde fois deux jours après. 100 µL d'ascospores issues de chaque stromata greffé et des trois boîtes de croisement sont ensuite étalés sur milieux PDA, PDA-Hygro et PDA-Phléo. Les profils de résistance sont obtenus après 48 h d'incubation à 30 °C.

3.2.5.3. Réalisation et analyse des différents croisements

Les différents arrosages ont été réalisés avec quelques jours de décalage afin d'éviter les risques de contamination entre les différentes souches et les erreurs de manipulation lors de l'arrosage. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 13 mais le détail pour chaque croisement étudié est disponible à l'Annexe 5. Les profils de croissance des différents croisements sont présentés à la Figure 59 et à la Figure 60.

Pour faciliter la lecture des résultats, nous analysons d'abord les résultats des croisements contrôles puis ceux des croisements tests.

Tableau 13: Récapitulatif des profils de résistance obtenus lors des différents croisements
Les différents croisements sont désignés par : femelle (mâle)

	Stromata isolé ou vrac	Croissance			Rôle du croisement
		PDA	PDA-Hygro	PDA-Phleo	
A2 (B31)	vrac (3 boîtes)	+	−	−	Contrôle
	isolé (8 greffes)	+	−	−	
A2 (B31-Hygro)	vrac (3 boîtes)	+	+	−	Contrôle
	isolé (8 greffes)	+	+	−	
A2 (B31-Phleo)	vrac (3 boîtes)	+	−	+	Contrôle
	isolé (8 greffes)	+	−	+	
A2 (B31-Hygro + B31-Phleo)	vrac (3 boîtes)	+	+	+	Test
	isolé (23 greffes)	+	−	+	
		+	+	+	
B31 (A2)	vrac (3 boîtes)	+	−	−	Contrôle
	isolé (8 greffes)	+	−	−	
B31 (A2-Hygro)	vrac (3 boîtes)	+	+	−	Contrôle
	isolé (20 greffes)	+	+	−	
B31 (A2-Phleo)	vrac (3 boîtes)	+	−	+	Contrôle
	isolé (20 greffes)	+	−	+	
B31 (A2-Hygro + A2-Phleo)	vrac (3 boîtes)	+	+	+	Test
	isolé (20 greffes)	+	+	−	
		+	+	+	
		+	−	+	

Dans les croisements contrôles A2 (B31) et B31 (A2) les deux souches parentales présentent un phénotype sauvage, et la descendance ne doit pas être en mesure de germer sur les milieux sélectifs. Les résultats obtenus sont satisfaisants et témoignent de la viabilité de la descendance issue de ces croisements ainsi que de l'absence de contamination par des conidies résistantes.

En ce qui concerne les croisements A2 (B31-Hygro) et A2 (B31-Phleo) ou B31 (A2-Hygro) et B31 (A2-Phleo), la germination des ascospores sur le milieu de sélection adéquat indique qu'il y a bien eu transmission à la descendance du gène de résistance présent chez la souche mâle. Pour 100 % des stromata étudiés, le profil de germination correspondait au phénotype attendu. Toutefois, il faut noter qu'un faible nombre d'ascospores issues du croisement A2 (B31-Hygro) sont capables de germer sur le milieu sélectif par rapport aux ascospores issues du croisement A2 (B31-Phleo) (Figure 59).

Par ailleurs, l'étalement des ascospores issues des stromata en vrac des croisements mixtes A2 (B31-Hygro + B31-Phleo) et B31 (A2-Hygro + A2-Phleo), permet de s'assurer que l'arrosage a été fait avec les deux types de conidies. Ces ascospores contrôles poussent comme attendu sur les deux milieux sélectifs.

Tous les contrôles étant validés, les croisements peuvent être interprétés.

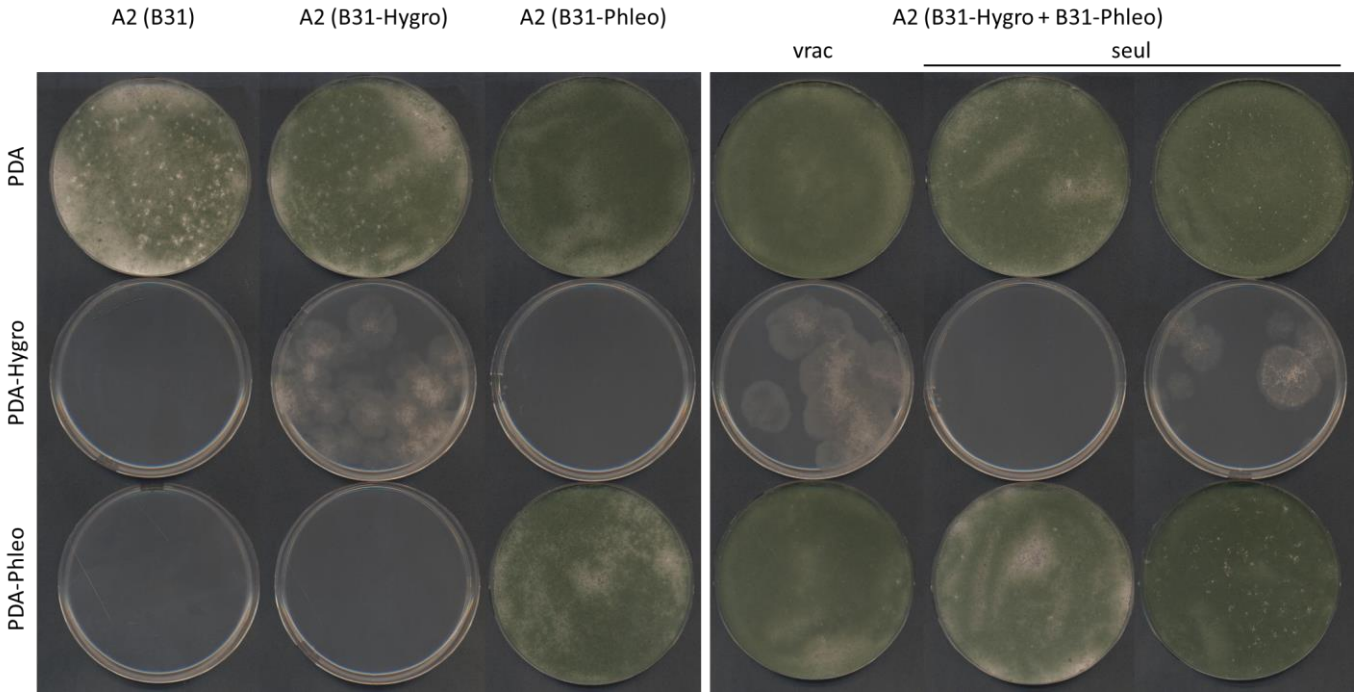


Figure 59 : Profils de croissance des ascospores issues des croisements A2 (B31)

Lors de la lecture des résultats du croisement mixte A2 (B31-Hygro + B31-Phleo) présentés dans la Figure 59, le profil de croissance des ascospores issues de stromata isolés s'est révélé surprenant. En effet, les ascospores issues des 23 stromata isolés présentaient uniquement une résistance à la phléomycine, tandis que la descendance récoltée des stromata en vrac était capable de pousser sur les trois milieux testés. Afin de vérifier ce résultat, mais ne disposant plus des ascospores de la 1ère récolte, nous avons étalé ceux de la seconde récolte. Cette fois la descendance de douze stromata isolés a germé sur l'ensemble des milieux, indiquant une double résistance à l'hygromycine et à la phléomycine. Les ascospores des onze stromata restants sont sensibles à l'hygromycine, ne germant que sur les milieux PDA et PDA-Phléo. Cependant, les ascospores résistantes à la phléomycine forment un tapis confluent sur les boîtes de Petri, tandis que le nombre de celles résistantes à l'hygromycine semble faible suggérant que parmi les ascospores étalées, un plus grand nombre est résistant à la phléomycine qu'à l'hygromycine.

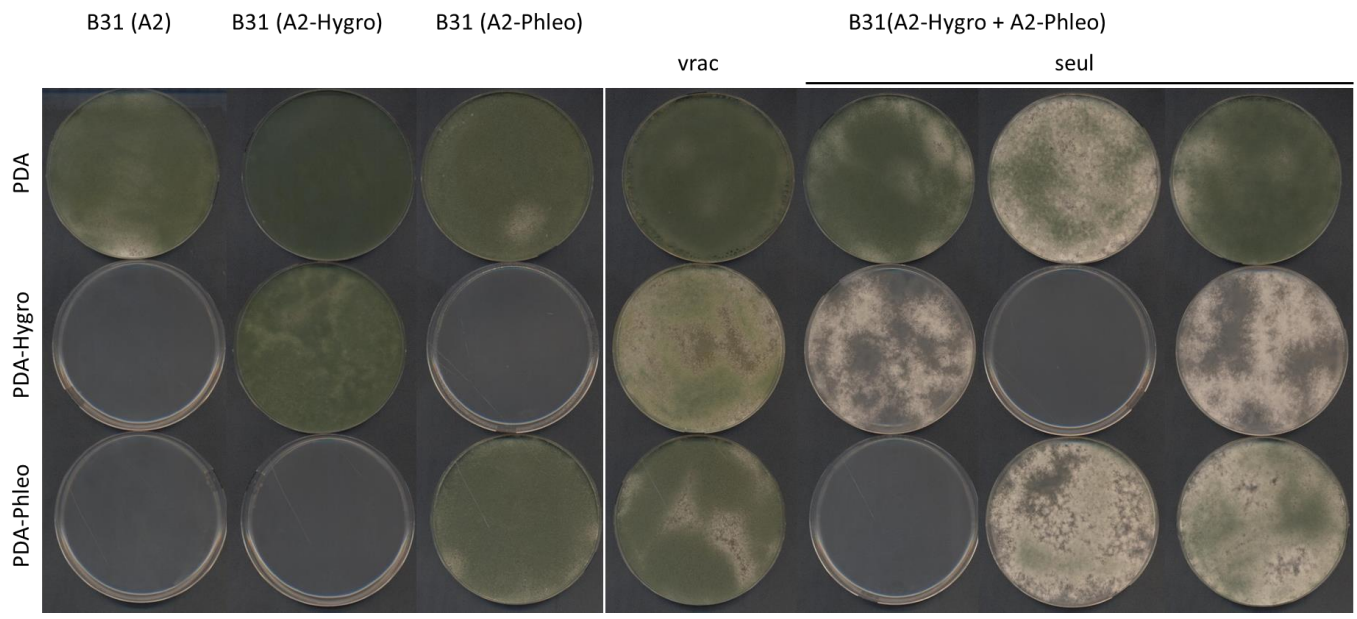


Figure 60 : Profils de croissance des ascospores issues des croisements B31 (A2)

Les ascospores des stromata du croisement mixte B31 (A2-Hygro + A2-Phleo) (Figure 60) présentent trois profils de résistance différents dont 70 % (14 stromata sur 20) sont résistants à l'hygromycine. Deux stromata produisent des ascospores uniquement résistantes à la phléomycine et quatre, des ascospores multi-résistantes.

Les résultats de ces deux expériences ne nous permettent pas de conclure sur l'origine des périthèces dans les stromata. Toutefois, nous observons que dans les deux croisements, A2 (B31-Hygro + B31-Phleo) et B31 (A2-Hygro + A2-Phleo), il y a à la fois des stromata ne produisant qu'un type d'ascospores et deux types d'ascospores. Ce résultat suggère des stromata à la fois issus de fécondations multiples et de fécondations simples.

Dans nos expérimentations, nous avons mis en compétition les conidies résistantes à l'hygromycine ou à la phléomycine pour féconder les structures femelles. Or nous avions choisi de générer les souches résistantes en introduisant le gène de résistance de façon ectopique. Ainsi selon le locus d'intégration, le niveau d'expression des gènes de résistance peut varier. Afin d'éliminer ce biais, il aurait fallu insérer le gène de résistance à un endroit précis du génome. Cette différence d'expression se retrouve dans les croisements utilisant la souche mâle B31-Hygro qui semble être une souche présentant une faible résistance à l'hygromycine ce qui peut introduire un biais dans la lecture des résultats.

3.2.6. Discussion

La mise en place d'une reproduction sexuée entre souches industrielles ouvrirait de nouvelles perspectives pour leur amélioration. Le gène *idc1* a été identifié comme responsable de la stérilité femelle des souches de *T. reesei*. L'insertion d'une version sauvage de ce gène dans le génome de la souche QM6a rétablit la capacité à faire de la reproduction sexuée (Linke et al., 2015). Cependant, cette stratégie présente l'inconvénient majeur de devoir introduire le gène fonctionnel dans chacune des souches industrielles pour pouvoir rétablir leur fertilité femelle. De surcroit, les souches industrielles étant issues de mutagénèses successives, il est possible que d'autres gènes importants pour la fertilité femelle aient été modifiés et que l'apport du gène *idc1* fonctionnel ne suffise pas pour rétablir la fertilité femelle. Afin de contourner le problème de fertilité femelle sans avoir besoin d'identifier et de corriger la ou les mutations responsables de l'infertilité dans chacune des souches industrielles, nous avons proposé la stratégie de la souche assistante.

Pour que cette stratégie puisse fonctionner, nous nous sommes assurés que les souches A2 et B31 utilisées pour construire les souches assistantes sont femelles fertiles, qu'elles ne présentent pas d'incompatibilité végétative avec les souches industrielles qui sont impliquées dans cette stratégie et qu'elles sont capables de faire des anastomoses. Une souche assistante B31::Δ*MAT* est obtenue par invalidation du locus *MAT1-2* de la souche B31.

Quant à la souche QM6a *MAT1-1*, nous avions entamé sa construction selon la stratégie décrite en Figure 52A, mais elle nous a finalement été fournie par Linke et al., 2015. Notre stratégie d'origine s'inspirait de l'article de Seidl et al. (2009) mais elle n'a jamais permis d'obtenir des transformants positifs. Il est probable que la souche QM6a *MAT1-1* de l'article de Seidl et al. (2009) possède un locus *MAT1-1* intégré de façon ectopique (M. Bernhard Seiboth, communication personnelle). En effet, El-Khoury et al., 2008) ont échoué à convertir directement un locus *MAT* par celui du type opposé dans une souche de *P. anserina* dont la voie NHEJ n'est pas inactivée. Cette équipe a finalement utilisé une stratégie en deux étapes : une invalidation du locus *MAT* suivie par une insertion au site du locus de type opposé. Cette difficulté de recombinaison au niveau des locus *MAT* peut s'expliquer par la découverte récente de l'existence, chez *P. anserina* et *Neurospora tetrasperma*, autour du locus *MAT* d'une région allant de 0,8 Mb à 7 Mb respectivement, au sein de laquelle la fréquence de recombinaison est très faible (Grognet and Silar, 2015; Idnurm et al., 2015). L'existence d'une zone similaire dans *T. reesei* a été suggérée lors de la comparaison des génomes de deux descendants *MAT1-1* issus d'un croisement entre la souche sauvage CBS999.97 *MAT1-1* et la souche QM6a *MAT1-2* (Linke et al., 2015). L'absence de recombinaison entrainant une accumulation des polymorphismes, les auteurs ont observé une région portant un fort polymorphisme autour du locus *MAT* dans le génome de *T. reesei*. De plus, une analyse des génomes de quatre souches issues d'un

croisement entre deux types sauvages ne montre aucun événement de recombinaison méiotique dans cette région (M. Ting-Fang Wang, communication personnelle). L'analyse de la position de ces polymorphismes à l'aide du réassemblage en chromosome du génome de *T. reesei* (Marie-Nelly et al., 2014) nous a permis de définir une région d'environ 1,5 Mb autour du locus *MAT* (Figure 61).

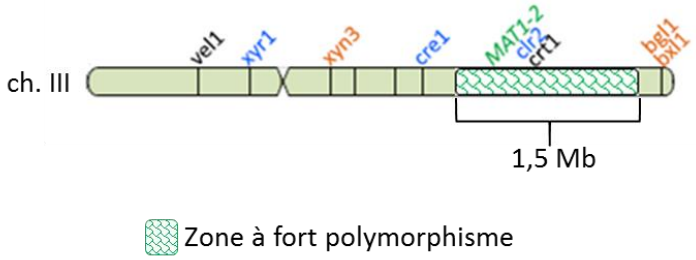


Figure 61 : Zone de non recombinaison autour du locus *MAT1-2* chez QM6a.

Parallèlement, la mise en œuvre de la stratégie décrite en Figure 52B, nous a permis d'obtenir des souches QM-A (*MAT1-1*) femelles stériles et mâles fertiles. Ces souches ne peuvent pas être assimilées à une QM6a car possédant un fond génétique contenant 50 % du patrimoine de la souche A2 et 50 % de celui de QM6a. Pour qu'elles deviennent des souches QM6a, elles doivent subir une série de rétrocroisements avec QM6a *MAT1-2* qui permettrait d'obtenir un fond génétique quasi identique à celui de la QM6a à l'exception de quelques gènes de la souche A2 et de la région mentionnée plus haut (Figure 61). Ces souches ont néanmoins permis de réaliser les premiers essais expérimentaux de complémentation de la stérilité femelle.

La fabrication d'un tricaryon doit permettre de complémenter le défaut de la protéine IDC1 qui est responsable de la fertilité femelle (Linke et al., 2015). Les premiers essais entrepris avec les souches B31::Δ*MAT* n°60, QM6a *MAT1-1* et QM6a *MAT1-2* en fabriquant un tricaryon selon la méthode décrite par Jamet-Vierny et al. (2007) ont généré quelques stromata mais pas de façon répétable. Ce résultat suggère que la souche assistante n'est pas systématiquement recrutée.

Nous avons donc mis au point une méthode permettant de générer systématiquement des stromata. Il s'agit d'une variante de la méthode de reproduction par arrosage, que nous avons nommé « arrosage séquentiel » dans laquelle la souche assistante est considérée comme la souche femelle fournissant les tissus maternels nécessaires à la fabrication des stromata et est arrosée d'abord par la souche QM6a *MAT1-1* et arrosée à nouveau après sept jours d'incubation avec la souche QM6a *MAT1-2*. Chez *N. tetrasperma*, une différence dans le profil d'expression des souches *mata* (équivalent de *MAT1-2*) et *matA* (équivalent de *MAT1-1*) a été mise en évidence. Il existe un biais dans l'expression des gènes en fonction du type sexuel : la souche *matA* promeut la formation de protopérithèces tandis que la souche *mata* est plutôt dédiée au développement végétatif et à la fonction

mâle (Samils et al., 2013). Ainsi, chez *T. reesei*, chaque type-sexuel possède peut-être des fonctions préférées comme chez *N. tetrasperma*, permettant d'expliquer pourquoi la formation des stromata est favorisé lorsque les conidies *MAT1-1* sont arrosées en premiers. Une étude similaire à celle menée par Samils et al., 2013 serait nécessaire pour confirmer cette hypothèse.

Par la méthode de l'arrosage séquentiel, des stromata sont obtenus mais ils ne contiennent pas de descendants. Des essais de greffes de stromata sur milieu riche ont été réalisés. Ce transfert génère un nouveau mycélium sur lequel de nouveaux stromata apparaissent suggérant que le mycélium a été enrichi en tricaryon.

En greffant systématiquement les stromata nouvellement produits, nous avons pu observer quelques stromata présentant des ostioles mais aucune ascospore n'a été produite. La présence d'ostioles et de paraphyses laisse penser que des périthèces se sont développés mais l'absence d'ascospores suggère que la reproduction sexuée est bloquée, soit lors de l'initiation du développement des périthèces, soit lors de la différenciation de l'hyménium.

Il faut noter que dans l'article de Linke et al. (2015) décrivant la restauration de la production de stromata par complémentation avec le gène sauvage *idc1* sous son propre promoteur, les auteurs ne mentionnent jamais l'obtention d'une descendance. Des échanges avec les auteurs nous apprennent qu'ils parviennent très difficilement à obtenir des ascospores. En janvier 2017, nous avons reçu sept de leurs clones QM6a *MAT1-1* complémentés avec le gène sauvage *idc1*. Nous avons entrepris des essais de reproduction sexuée selon nos méthodes et une descendance a été obtenue avec deux souches sur sept. Comme la complémentation du gène *idc1* a été faite de façon ectopique, le niveau d'expression du transgène dépend du locus d'intégration et peut avoir un impact sur la restauration du phénotype sauvage. En effet, il a été montré chez *P. anserina* que de son niveau d'expression dépend la quantité de fructifications fabriquée (Jamet-Vierny et al., 2007). Quand *idc1* est peu exprimé, il y a un faible nombre de périthèces fertiles, mais sa surexpression est également responsable d'un faible nombre de périthèce fertiles dont le développement est retardé.

Notre stratégie de la mère porteuse n'a peut-être pas pu aboutir car la quantité de protéines IDC1 apportée par la souche assistante n'est pas suffisante, puisque divisée par trois (si les 3 partenaires sont en quantité équivalente), pour déclencher la caryogamie. S'intéresser à la quantité de protéines IDC1 dans notre système est une piste à suivre pour espérer achever la restauration de la fertilité.

Dans la stratégie de la souche assistante, la souche B31::Δ*MAT* n°60 n'intervient pas dans la caryogamie qui s'effectue entre les souches QM6a *MAT1-2* et QM6a *MAT1-1*. Or, la QM6a *MAT1-1* que nous utilisons dans notre stratégie n'ayant pas été générée au laboratoire, nous ne pouvons exclure

le fait que la souche parentale QM6a *MAT1-2* utilisée par Linke et al. puisse présenter quelques polymorphismes par rapport à notre QM6a *MAT1-2*. En effet, le maintien en laboratoire par multiplication clonale favorise l'accumulation de mutations propice à la perte de la fertilité femelle (Saleh et al., 2012). Il est donc possible que notre souche QM6a *MAT1-2* porte des mutations supplémentaires impliquées dans le processus de reproduction sexuée. Enfin, il n'est pas à exclure que la protéine IDC1 ait une double fonction dans *T. reesei* et soit requise à la fois pour la formation du stromata et lors de la caryogamie contrairement à *P. anserina* où elle n'est requise que dans les tissus maternels (Silar, 2011).

Pour lever le blocage empêchant l'obtention des ascospores, il faut dans un premier temps comprendre s'il a lieu lors de la fécondation à l'origine de l'initiation du périthèce ou lors de la différenciation de l'hyménium. Une première étape serait de comprendre si le développement du stromata puis des périthèces a pour origine un seul et même événement de fécondation. Ainsi, pour répondre au moins partiellement à cette question, une analyse de la descendance de chaque stromata, pourra nous indiquer si les périthèces d'un stromata sont issus d'un ou plusieurs évènements de fécondation. Nous avons pu étudier la descendance de chaque stromata, en les isolant les uns des autres par greffe sur un nouveau milieu. Cette étude montre que les ascospores issues d'un stromata obtenu suite à un arrosage par un mélange de conidies peuvent être résistantes à un seul ou aux deux antibiotiques suggérant que la fécondation peut être unique ou multiple.

Par ailleurs, une résistance à l'hygromycine apparaît chez certains stromata lors du second étalement. Cette évolution suggère que les périthèces d'un même stromata seraient issus de fécondations multiples et non synchronisées et que du fait de leur degré de maturité différent leurs ascospores ne seraient pas expulsées de façon simultanée. Ainsi, les deux récoltes réalisées ne suffisent pas à analyser l'ensemble de la descendance émise par le stromata. Il faudrait continuer à étaler les ascospores sur les différents milieux tout au long de l'expulsion des ascospores afin de pouvoir confirmer cette théorie.

Toutefois, il faut noter que les expériences portant sur l'étude de la fécondation n'ont été réalisées qu'une seule fois. Afin d'obtenir des résultats plus robustes, ces expériences doivent être répétées et un nombre de stromata supérieur doit être analysé. Toutefois, l'expérience de fécondation que nous avons planifiée ne permet pas de répondre clairement à la question initiale. Des expériences supplémentaires devront être réalisées comme le prélèvement des ascospores directement à l'intérieur de plusieurs périthèces d'un même stromata ou l'analyse des tissus stromatiques pour déterminer leur provenance.

3.3. Mise en application de la reproduction sexuée entre souches sauvages et hyper-productrices

La restauration de la fertilité femelle de la souche QM6a a été faite par complémentation de la version mutée du gène *idc1* par l'allèle sauvage (Linke et al., 2015). Cependant, il convient de noter que les souches industrielles ont été soumises à de nombreuses mutagenèses et il est possible que d'autres gènes impliqués dans la fertilité femelle aient également été mutés. Ainsi, dans les souches industrielles, la complémentation de la mutation du gène *idc1* risque de ne pas suffire à rétablir la fertilité. Nous avons néanmoins décidé d'explorer les possibilités offertes par la reproduction sexuée entre souches sauvages et industrielles pour améliorer les performances cellulolytiques de *T. reesei* ou pour identifier des mutations d'intérêt par la méthode du BSA-Seq.

3.3.1. La reproduction sexuée pour améliorer les performances cellulolytiques de *T. reesei*

3.3.1.1. La stratégie d'amélioration des performances

La reproduction sexuée, comme outil d'amélioration génétique, a et est toujours utilisée chez *S. cerevisiae* (Esser, 1977; Marullo et al., 2009). En revanche, jusqu'à très récemment, cette méthodologie n'avait jamais été mise en œuvre chez les champignons filamenteux industriels, en raison de l'absence d'un cycle sexuel. La découverte d'une sexualité chez certains champignons industriels (Hoff et al., 2008; Horn et al., 2009; Seidl et al., 2009; Gryganskyi et al., 2010; Ropars et al., 2012) ouvre de nouvelles possibilités d'amélioration génétique des souches. Chez *T. reesei*, toutes les souches industrielles ont été générées à partir du même isolat, la souche femelle stérile QM6a (Seidl et al., 2009), rendant impossible toute reproduction sexuée entre souches industrielles.

Notre stratégie pour l'amélioration des performances de *T. reesei* consiste donc à croiser les souches industrielles avec de nouveaux isolats afin d'en exploiter la diversité génétique. Cette approche, appelée outcrossing (croisement externe) confère les bénéfices de la reproduction sexuée, tels que : l'élimination des mutations délétères, la création de diversité génétique et le gain de performance qui résultent du brassage des divers allèles des différentes souches mises en jeu (Ingvarsson, 2001).

Dans cette optique, nous avons choisi de croiser la souche hyper-productrice de cellulases RutC30 (Montenecourt and Eveleigh, 1977) avec l'isolat sauvage A2. La souche RutC30 a été obtenue par trois étapes de mutagénèse depuis la souche QM6a et est la meilleure productrice de cellulases du domaine public (Peterson and Nevalainen, 2012). L'analyse extensive de son génome a mis en

évidence de nombreuses mutations dont des translocations, des délétions de régions génomiques de taille importante et des variations nucléotidiques. Certaines de ces mutations sont directement liées à l'hyper-production des cellulases comme la troncation dans le gène du régulateur de la répression catabolique *cre1* (Ilmen et al., 1996). Toutes les mutations répertoriées ne sont pas nécessairement liées à la production de cellulases et peuvent avoir des effets négatifs sur la production, la croissance végétative ou la stabilité génétique. Ainsi le croisement entre cette souche mutante et l'isolat sauvage A2 pourrait permettre de gagner en productivité et en stabilité.

3.3.1.2. Crible de sélection des descendants RuA

Nous avons réalisé des croisements entre la souche hyper-productrice de cellulases RutC30 et l'isolat sauvage A2, et plusieurs campagnes d'isolement d'ascospores. Nous avons obtenu 295 descendants purifiés. Ces derniers ont été ensuite soumis à un criblage en trois étapes. Ces cribles successifs permettent de réduire le nombre de candidats de quelques centaines à l'individu le plus performant pour la production de cellulases.

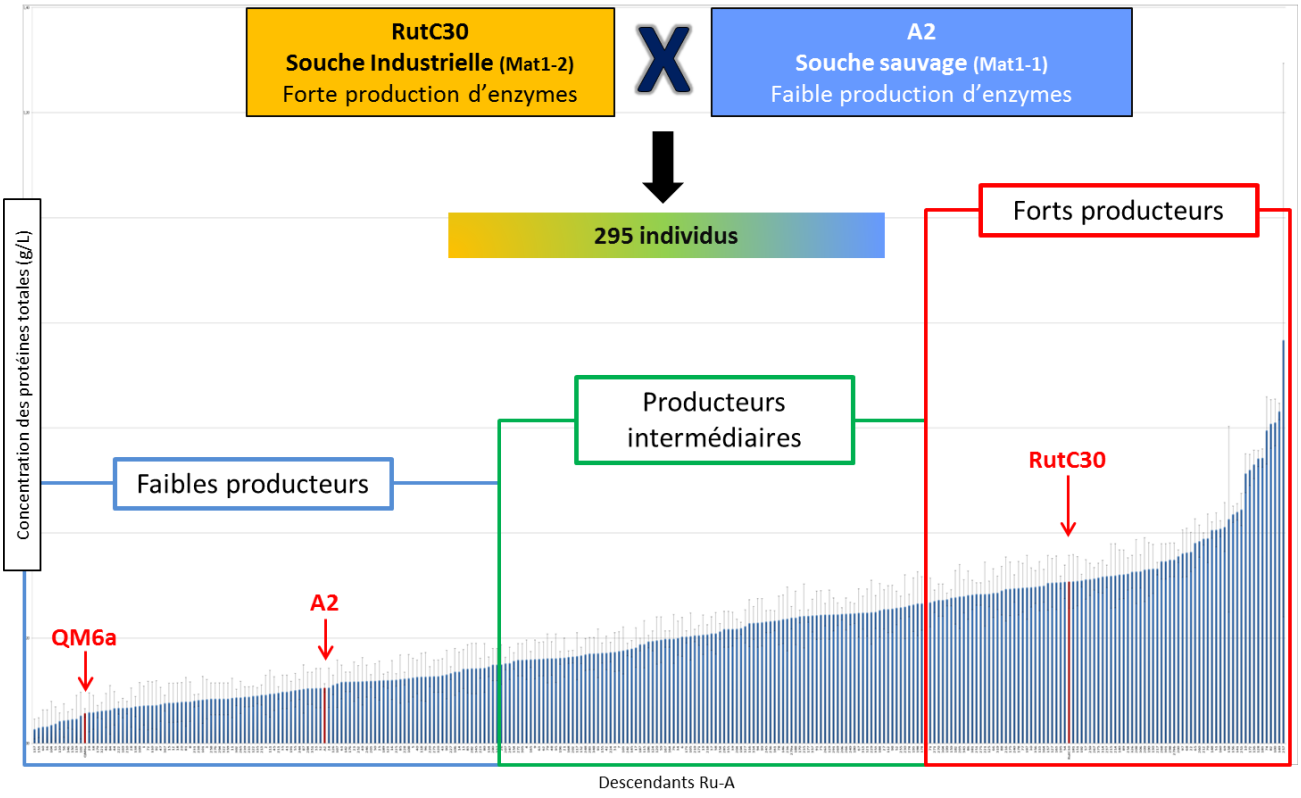
La première étape du criblage repose sur une méthode de mesure de la production de protéines extracellulaires permettant de classer les candidats et visant à en réduire drastiquement le nombre pour ne transférer à la seconde étape qu'une dizaine des individus les plus intéressants. Le second crible est basé sur une miniaturisation des conditions industrielles et permet de sélectionner quelques individus pour lesquels les performances seront testées en bioréacteurs.

Lors du premier crible, les descendants sont cultivés en microplaque dans 2 mL de milieu inducteur de cellulase. Après sept jours de culture, la production de cellulases est mesurée par le dosage de la quantité de protéines totales sécrétées dans le surnageant selon la méthode de Bradford. Une corrélation entre protéines totales sécrétées et cellulases peut être faite car chez *T. reesei*, les exoglucanases (CBHI, CBHII) et les endoglucanases (EGI, EGII) principales peuvent représenter jusqu'à 90 % de la quantité totale de protéines sécrétées (Markov et al., 2005; Herpoël-Gimbert et al., 2008; Margeot et al., 2009; Gusakov, 2011)

La quantification des protéines présentée en Figure 62 est issue de la moyenne des mesures obtenues pour trois réplicats biologiques.

L'isolat sauvage A2 produit 200 % de plus de cellulases par rapport à la souche QM6a mais sa production ne représente que 34 % de celle de la souche de référence RutC30. La descendance a été divisée en trois classes contenant respectivement 98, 98 et 99 individus (Figure 62) :

- les faibles producteurs (encadré bleu) regroupent les descendants qui produisent entre 9% et 42,5% par rapport à celle de la RutC30,
- les forts producteurs (encadré rouge) regroupent les souches dont la production représente entre 81 % et 250 % de celle de la souche RutC30,
- et les producteurs intermédiaires (encadré vert) présentent une production intermédiaire qui représente entre 34 % et 97 % de la production de la souche de référence.



Observée	Faible	Intermédiaire	Forte	Totaux
Mat1-1	83 (84,3%)	69 (70,4%)	63 (63,6%)	**215 (73%)**
Mat1-2	15 (15,3%)	29 (29,6%)	36 (36,4%)	**80 (27%)**
Totaux	**98 (33,2%)**	**98 (33,2%)**	**99 (33,6%)**	**295 (100%)**

Figure 62 : Profil de sécrétion protéiques des 295 descendants issus du croisement A2 par RutC30.
La sécrétion protéique a été évaluée grâce au dosage Bradford et le type sexuel déterminé à l'aide du test *MAT*. Les descendants ont été divisés en trois classes de 98, 98 et 99 individus et les proportions des types-sexuels dans chaque catégorie sont présentées dans le tableau ci-dessus. Seuls les dix meilleurs producteurs de cellulases, présentant un écart-type correct, sont sélectionnés.

Les concentrations des protéines totales sécrétées présentent une distribution continue confirmant le caractère quantitatif du phénotype de production de cellulases. La production de cellulases est donc très probablement gouvernée par plusieurs gènes. Si ces 295 individus sont rangés par catégorie en fonction de leur production de protéines alors ils sont répartis selon une distribution unimodale asymétrique à gauche (Figure 63). Cette distribution suggère que la production de cellulases est due à

l'addition des effets de plusieurs gènes. Ce résultat est cohérent avec la littérature qui répertorie des mutations dans de nombreux gènes impliqués dans la régulation de la production de cellulases tels que *cre1*, *xyr1*, *ace2*, etc… (Ilmen et al., 1996; Portnoy et al., 2011; Seiboth et al., 2011), sans compter ceux potentiellement présents dans les gènes codant pour des différentes endonucléases, exonucléases et β-glucosidases que compte le répertoire enzymatique de *T. reesei* (Aro et al., 2005; Herpoël-Gimbert et al., 2008).

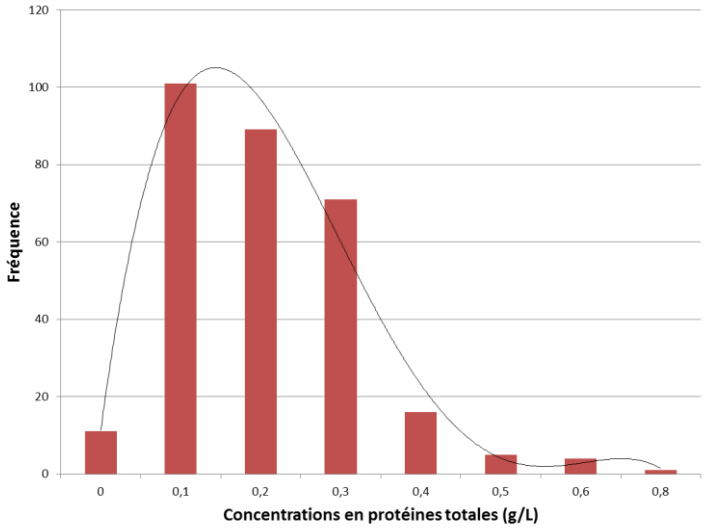


Figure 63 : Répartition des individus par classe en fonction de leur production de protéines.

Des études transcriptomiques ayant mis en évidence un lien entre les types sexuels et le contrôle de la transcription de divers gènes, dont des gènes impliqués dans le métabolisme secondaire (Coppin et al., 1997; Bidard et al., 2011; Kück and Böhm, 2013; Becker et al., 2015), il est intéressant de vérifier quel est l'effet des types sexuels sur la production de cellulases de *T. reesei*.

Nous avons donc déterminé le type sexuel de chacun des descendants à l'aide du test *MAT*. De façon inattendue, 73 % de la descendance est du type sexuel *MAT1-1* et 27 % est du type sexuel *MAT1-2* (Figure 62). Le pourcentage de chaque type sexuel dans les 3 classes de populations définies selon la production de protéines a été également calculé. Nous avons constaté que la proportion d'individus *MAT1-1* est plus forte parmi les faibles producteurs tandis que la proportion d'individus *MAT1-2* est la plus forte dans la classe des forts producteurs. Plus la concentration en protéines sécrétées augmente, plus le nombre d'individus *MAT1-2* par classe augmente. Le test statistique du χ^2 confirme l'existence d'un biais vers un type sexuel en fonction du niveau de sécrétion des cellulases ($\chi^2 = 11,5$, df = 2, $P < 0,005$).

Les dix meilleurs producteurs de cellulases, présentant un écart-type correct, sont sélectionnés pour être soumis à un second crible qui utilise le protocole « fioles alimentées » développé par

Jourdier et al., 2012. Ce protocole permet de produire des cellulases en fiole avec une alimentation contrôlée par un mélange stœchiométrique de substrat carboné et azoté, basé sur la composition en azote et en carbone des cellulases. Cette conduite permet de maintenir une condition de limitation en carbone (favorable à l'induction d'enzymes) et un pH stabilisé sans système de régulation de pH. Un incubateur avec un agitateur rotatif est utilisé pour contrôler l'agitation et la température (Jourdier et al., 2012).

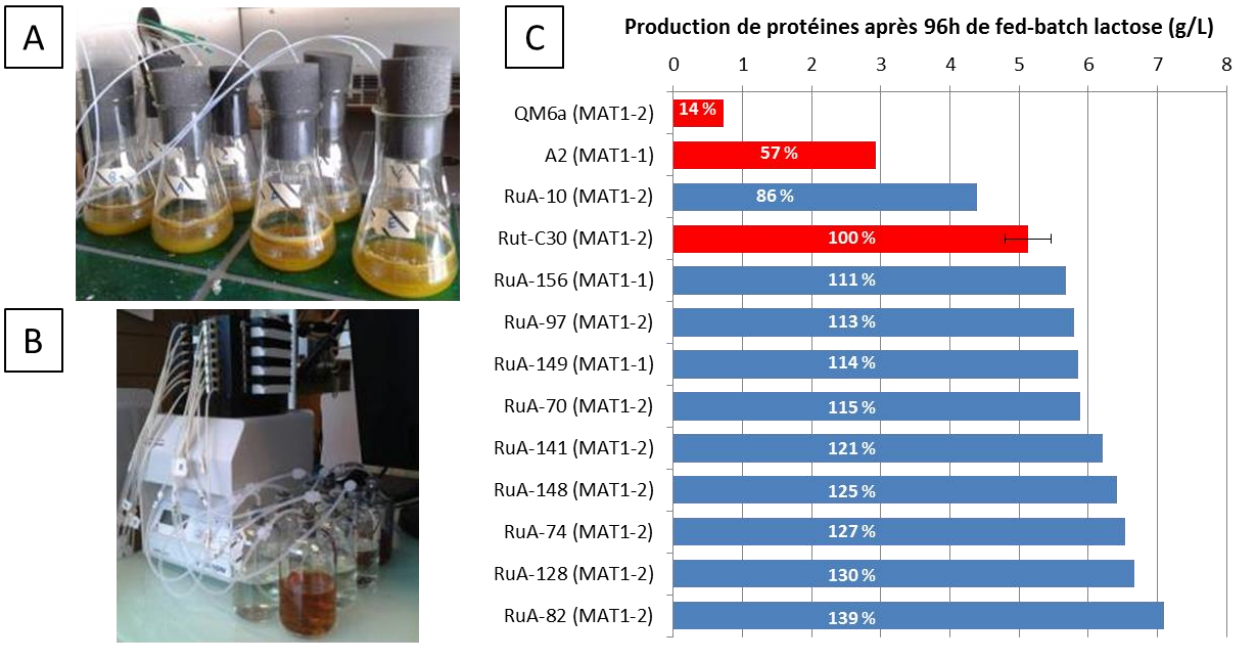


Figure 64 : Crible de la production de protéines en fioles alimentées
La méthodologie des fioles alimentées permet de tester huit souches en parallèle (A). Chaque fiole est alimentée par des pompes avec un débit de 0,3 mL/h avec une solution contenant 50 g/L de lactose, 0.8 g/L de $(NH_4)2SO_4$, et 160 mM NH_3 (B). À 96 h, les protéines totales sécrétées sont dosées (C). La production de protéines en fioles alimentées n'a été évaluée qu'une seule fois pour toutes les souches sauf pour la souche de référence RutC30. Les pourcentages représentent le taux de production de protéines par rapport à la souche de référence RutC30.

Cette méthode de production permet de classer les souches selon leur production de protéines sécrétées qui correspondent chez *T. reesei* à des cellulases (Gusakov, 2011). Parmi les dix souches soumises à ce crible, deux souches sont de type sexuel *MAT1-1* et huit de type sexuel *MAT1-2*. Après un fed-batch en lactose de 96 h, le dosage des protéines produites (Figure 64) confirme que l'isolat sauvage A2 produit plus de protéines que la souche QM6a et deux fois moins que la souche hyper-productrice RutC30. Neuf des dix souches testées produisent entre 11 % et 39 % plus de protéines que la souche de référence RutC30 confirmant les résultats obtenus lors du premier crible.

Quant à la distribution du type sexuel, les deux individus *MAT1-1* présentent une production légèrement supérieure à celle de la souche de référence tandis que sept des huit individus *MAT1-2* produisent plus que la RutC30.

Grace à ce second crible, trois souches, les deux meilleurs individus *MAT1-2*, RuA-82 et RuA-128, et la souche de type sexuel *MAT1-1*, RuA-149, sont sélectionnées pour être testées en bioréacteurs (Figure 66C) qui miment à petite échelle les conditions industrielles. La culture en bioréacteur s'effectue selon le protocole de production d'IFP Énergies nouvelles (Pourquie et al., 1988) et qui comporte deux phases (Figure 65) :

- une phase de batch d'environ 30 h au cours de laquelle *T. reesei* fabrique de la biomasse jusqu'à la consommation totale du glucose,
- une phase de fed-batch d'environ 200 h au cours de laquelle la production de cellulases est induite par un ajout à débit constant de lactose afin de maximiser et de maintenir constante la vitesse la production. En effet, l'excès de sucres facilement métabolisables ralentit la production des cellulases et favorise la production de biomasse cellulaire au détriment de la production d'enzymes. En plus d'une alimentation en lactose contrôlée, l'oxygène dissous (en agissant sur l'agitation et l'aération), la température et le pH sont également contrôlés. *T. reesei* étant un microorganisme aérobie strict, sa croissance optimale ne peut avoir lieu qu'en présence d'oxygène dissous (pO_2= 40 %) et une température constante d'environ 27 °C. Par ailleurs, le pH est maintenu à 4 par ajout de NH_4OH sinon le métabolisme s'arrête et les cellulases produites sont dénaturées (Jourdier et al., 2012). Ce protocole robuste n'est pas adapté pour cribler de nombreuses souches.

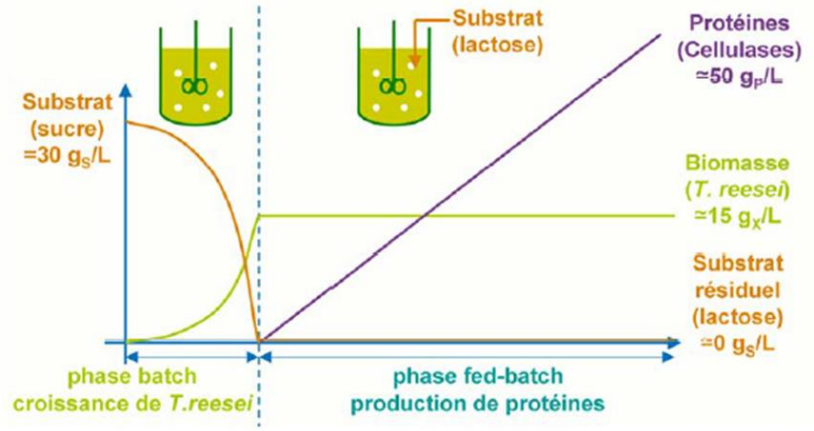
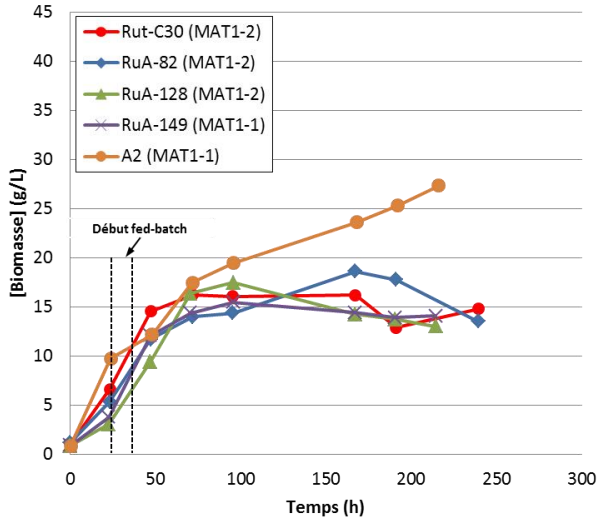


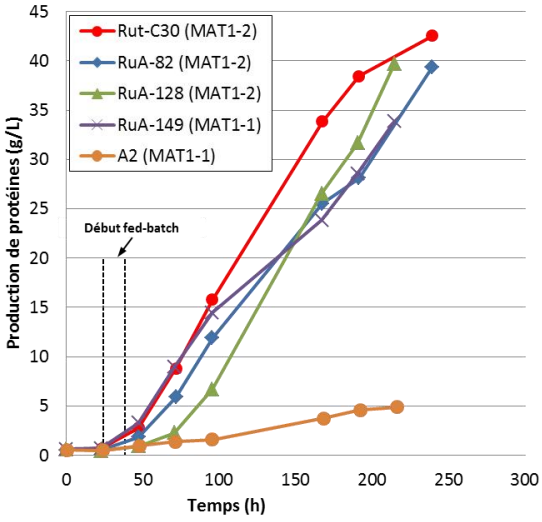
Figure 65 : Principe du procédé de production de cellulases d'IFP Énergies nouvelles.
Extrait de Jourdier et al., 2012.

N'ayant aucune connaissance du comportement fermentaire des souches à tester et de la souche A2, nous avons choisi de conduire cette fermentation avec les paramètres optimaux pour le RutC30. La concentration résiduelle en sucre du milieu (Annexe 6), la production de biomasse (Figure 66A) et de protéines (Figure 66B) sont évaluées tout au long de la fermentation.

A



B



C



D

Souche	Activité FP (IU/mg)	Activité β-glucosidase (IU/mg)
Rut-C30	0,77 ± 0,11	0,45 ± 0,07
A2	0,41 ± 0,01	0,72 ± 0,03
RuA-82	0,81 ± 0,14	0,98 ± 0,09
RuA-128	0,64 ± 0,16	1,27 ± 0,14
RuA-149	0,8 ± 0,13	1,33 ± 0,09

Figure 66 : Évaluations de la productivité en bioréacteur.
Tout au long de la fermentation dans les bioréacteurs DASGIP (C), la quantité de biomasse (A) et de protéines (B) est évaluée. L'activité spécifique Filter Paper (FP) et β-glucosidase est dosée uniquement pour les prélèvements finaux (après 200 h) (D). Ces expérimentations ont été répétées deux fois et les résultats obtenus sont similaires.

Pendant la phase de croissance, les souches parentales RutC30 et A2 produisent progressivement jusqu'à 5 g/L et 10 g/L respectivement de biomasse jusqu'à la consommation totale du glucose qui intervient après 30 h pour la souche de référence RutC30 et 24 h pour la souche A2. Durant la phase de fed-batch, la biomasse de la souche RutC30 se stabilise autour de 15 g/L tandis que celle de la souche A2 continue d'augmenter pour atteindre environ 30 g/L en fin de fermentation. La production de protéines de la souche RutC30 démarre dès le début de l'induction par le lactose et atteint environ 43 g/L en fin de fermentation. De son côté, l'isolat sauvage A2 produit à peine 5 g/L de protéines. Ces résultats suggèrent que la souche A2 consomme le glucose plus rapidement que la souche RutC30 et contrairement à cette dernière, elle favorise la production de biomasse à la production de protéines même en présence de lactose (Annexe 6).

Les trois souches sélectionnées, RuA-82, RuA-128 et RuA-149, produisent progressivement environ 5 g/L de biomasse jusqu'à la consommation totale du glucose qui intervient après 30 h pour

RuA-82 et 34 h pour RuA-128 et RuA-149. Durant la phase de fed-batch, leurs biomasses se stabilisent autour 15 g/L. La production de protéines des souches RuA-82 et RuA-149 débutent aussitôt l'induction faite mais elle est ralentie à partir de 100 h. Quant à la souche RuA-128, elle démarre sa production avec environ 24 h de retard par rapport à la souche RutC30 mais avec une vitesse de production similaire (courbes parallèles de concentrations en fonction du temps, Figure 66B). La production de protéines des souches RuA-82 et RuA-128 est de 40 g/L et celle de la souche RuA-149 de 34 g/L.

Les trois souches sélectionnées ont un comportement fermentaire similaire à celui de la souche de référence RutC30 mais présentent une concentration finale en protéines légèrement inférieure. Néanmoins, la souche RuA-128 présente une vitesse de production similaire à celle de la RutC30 mais avec un délai de 24 h en début de production. Ce retard provient de la présence de glucose résiduel lors du lancement du fed-batch, l'effet inducteur du lactose n'intervenant qu'après la consommation complète du glucose (Annexe 6).

Les résultats en bioréacteurs n'ont pas permis d'obtenir avec les trois souches sélectionnées, des vitesses spécifiques de production de protéines supérieures à la RutC30 comme avec les fioles alimentées. Nous avons toutefois obtenu des enzymes avec une activité spécifique β-glucosidase environ 2 à 3 fois supérieures à la RutC30 (validée sur 2 séries d'expériences indépendantes)

L'hydrolyse efficace de la cellulose nécessite l'action synergique des endoglucanases, exoglucanases et des β-glucosidase (Kubicek et al., 2009). Les endoglucanases et exoglucanases peuvent représenter jusqu'à 90 % de la quantité totale de protéines sécrétées tandis que la β-glucosidase représente moins de 1 % (Lynd et al., 2002; Herpoël-Gimbert et al., 2008). La β-glucosidase principale (codée par le gène *bgl1* ou *cel3a* chez *T. reesei)* intervient pour hydrolyser le cellobiose (dimère) lors de la dernière étape avant l'obtention du monomère de glucose (Margeot et al., 2009). Sa faible proportion dans le cocktail cellulolytique de *T. reesei* entraine une accumulation de cellobiose dont l'effet inhibiteur sur les exoglucanases entraine un ralentissement significatif de l'hydrolyse (Chauve et al., 2010). Une amélioration de l'activité β-glucosidase dans le cocktail enzymatique est essentielle pour une hydrolyse plus efficace lors de la production du bioéthanol de deuxième génération.

En fin de fermentation, la qualité du cocktail enzymatique produit est évaluée par la mesure des activités enzymatiques (Figure 66C). L'activité des endoglucanases et exoglucanases est dosée par le test FP (filter-paper) qui donne une indication de l'efficacité globale du cocktail de cellulases (Ghose, 1987). L'activité limitante de la β-glucosidase est évaluée séparément par mesure de l'hydrolyse de p-nitrophenyl-β-Dglucopyranoside (pNPG).

Le dosage FP montre que la souche sauvage A2 présente une activité cellulolytique spécifique faible par rapport à la souche de référence RutC30 mais son activité β-glucosidase est presque deux fois supérieure à celle de la RutC30.

Les trois souches sélectionnées, RuA-82, RuA-128 et RuA-149 ont une activité FP globale similaire à celle de la souche de référence RutC30 mais elles présentent une activité β-glucosidase jusqu'à trois fois supérieure.

Ces résultats suggèrent que le croisement entre la souche sauvage A2 et la souche hyper-productrice RutC30 a permis de générer des souches hyper-productrices améliorées pour l'activité β-glucosidase qui pourrait avoir été héritée du parent A2.

3.3.1.3. Recherche des fondements génétiques de l'amélioration des souches RuA

L'obtention d'une activité β-glucosidase améliorée permet d'augmenter la performance du cocktail d'enzymes car il s'agit de l'enzyme limitante de la dégradation de la cellulose. Dans *T. reesei*, la β-glucosidase principale présente dans le cocktail enzymatique est codée par le gène *bgl1* (Trire2 :76672). Afin de comprendre si l'amélioration génétique résulte du fait que les souches améliorées portent le gène *bgl1* de la souche sauvage A2, nous avons séquencé ce gène dans les trois souches RuA-82, RuA-128 et RuA-149. Les séquences des gènes *bgl1* des souches parentales ont été alignées et 73 SNPs répartis uniformément ont été répertoriés. Un fragment interne de 656 pb a été séquencé pour les descendants et les parents et contient 18 SNP entre les souches parentales (Annexe 7). Les souches RuA-82 et RuA-128 portent la version parentale RutC30 tandis que la souche RuA-149 porte la version parentale A2 (Tableau 14). La présence des deux versions parentales chez ces souches à l'activité β-glucosidase améliorée, suggère que le gène *bgl1* n'est pas responsable de l'amélioration de l'activité.

Par ailleurs, nous remarquons que les souches RuA-82 et RuA-128 de type sexuel *MAT1-2* portent la version de la souche RutC30 qui est également de type sexuel *MAT1-2* tandis que la souche RuA-149 qui est *MAT1-1* porte la version de la souche A2. Le gène *bgl1* semble co-ségréger avec le type sexuel. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons séquencé le gène *bgl1* des huit autres souches du crible secondaire. Les sept descendants *MAT1-2* portent la version parentale RutC30 tandis que le descendant *MAT1-1* porte la version de la souche A2. Ce résultat suggère que le gène *bgl1* est lié génétiquement au locus *MAT*. De fait, le gène *bgl1* est localisé à l'extrémité télomérique du chromosome III (Jourdier et al., 2017) et dans la zone de « non recombinaison » d'environ 1,5 Mb autour du locus *MAT* que nous avons pu établir précédemment (paragraphe 3.2.6).

Parmi les souches retenues dans notre crible nous avons voulu vérifier si l'une des mutations décrites comme essentielles pour l'amélioration de la productivité est bien présente. La troncation du gène *cre1*, régulateur clé de la répression catabolique chez les champignons, est responsable d'une partie de l'augmentation de la production de cellulases dans la souche RutC30 (Ilmen et al., 1996). Nous avons donc examiné si cette troncation est présente dans les souches hyper-productrices. Comme précédemment, nous avons vérifié si les dix descendants possèdent la version tronquée de la RutC30 ou la version sauvage de la souche A2 (Figure 67 et Tableau 14). Tous les descendants à l'exception de deux souches portent la version tronquée du gène *cre1*. Les trois souches finales sélectionnées possèdent la version tronquée. L'effet positif connu de la troncation *cre1* sur la production de cellulases (Ilmen et al., 1996; Peterson and Nevalainen, 2012) se confirme chez nos descendants. Sa présence contribue sans doute au phénotype d'hyperproduction observé mais n'est pas lié de façon évidente à l'augmentation de l'activité β-glucosidase. Néanmoins, le fait que les deux souches, RuA-97 et RuA-156 ne présentent pas la troncation du gène *cre1* mais montrent des performances cellulolytiques similaires à celles de la souche RutC30 est surprenant. De plus, elles démarrent leur production en même temps et à la même vitesse que la RutC30, suggérant que dans ces souches, il n'y a pas de répression catabolique et que ce phénotype est liée à un autre élément génétique que la troncation du gène *cre1*.

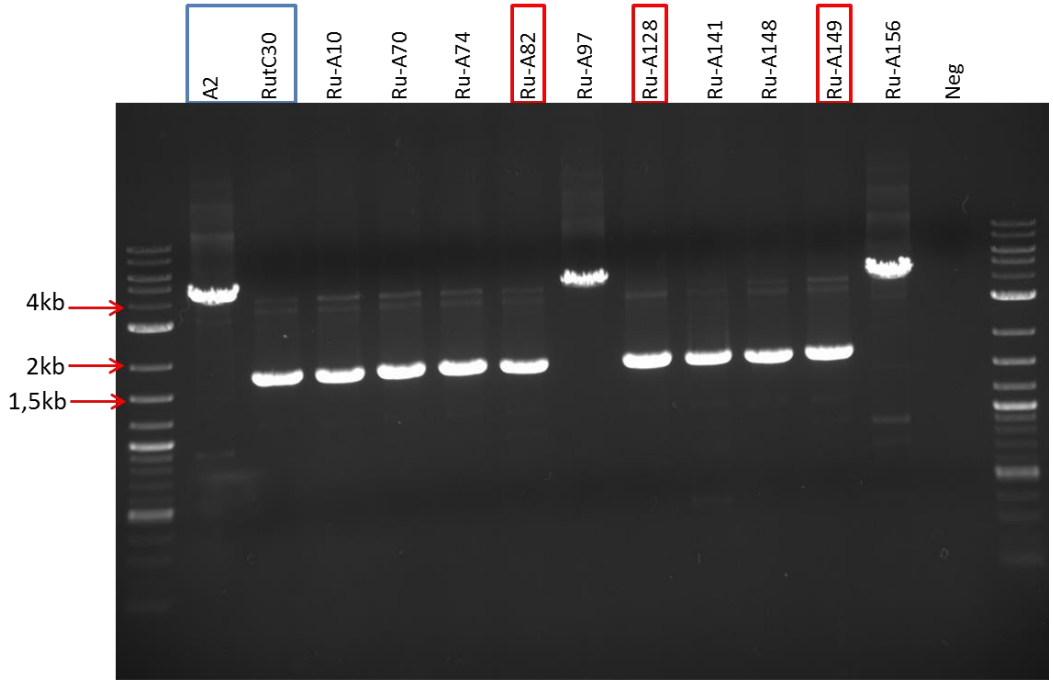
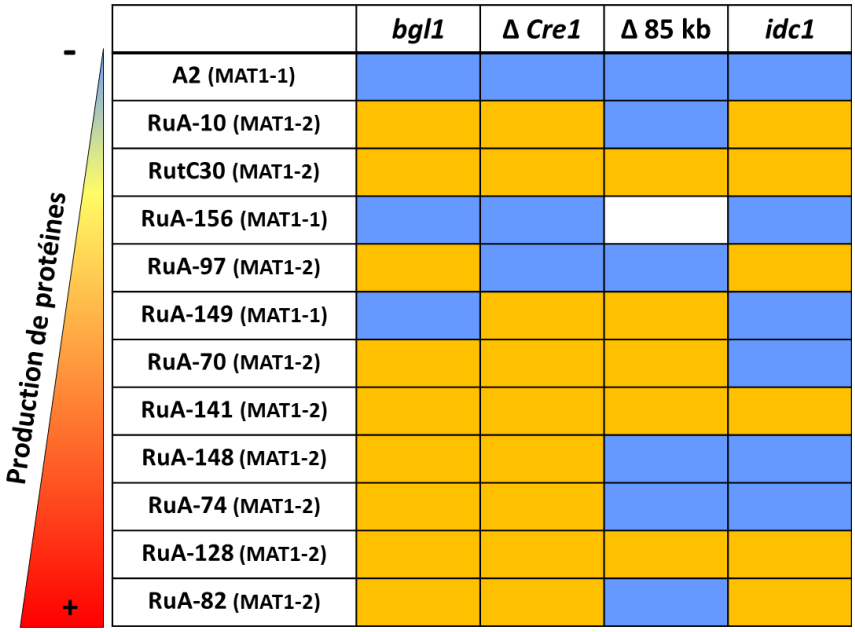


Figure 67 : Détection par PCR de la troncation du gène *cre1*.
La présence de la troncation est détectée par l'amplification à l'aide des amorces Cre1-verif-F et Cre1-verif-R d'un fragment de 1,6 kb si le gène est tronqué contre un fragment de 4,1 kb si le gène est intact. L'encadré bleu correspond aux souches parentales et l'encadré rouge correspond aux trois souches sélectionnées.

Nous nous sommes aussi intéressés à une autre caractéristique de la souche hyper-productrice RutC30 : la délétion d'une région de 85kb qui cependant ne semble pas avoir d'impact sur la production de cellulase (Vitikainen et al., 2010).

Sur les dix descendants, quatre possèdent la région complète, cinq possèdent la version tronquée et cela n'a pas pu être défini pour un individu (Tableau 14). Parmi les trois souches hyper-productrices, RuA-82 contient la région complète et les RuA-128 et RuA-149 la version délétion, confirmant que cette région de 85 kb n'a aucun impact sur la production de cellulases comme décrit dans la littérature (Vitikainen et al., 2010).



	bgl1	Δ *Cre1*	Δ 85 kb	*idc1*
A2 (MAT1-1)				
RuA-10 (MAT1-2)				
RutC30 (MAT1-2)				
RuA-156 (MAT1-1)				
RuA-97 (MAT1-2)				
RuA-149 (MAT1-1)				
RuA-70 (MAT1-2)				
RuA-141 (MAT1-2)				
RuA-148 (MAT1-2)				
RuA-74 (MAT1-2)				
RuA-128 (MAT1-2)				
RuA-82 (MAT1-2)				

Tableau 14 : Récapitulatif des versions alléliques héritées par les descendants issus du croisement A2 par RutC0. Les souches sont classées selon leur production de cellulases. Le bleu correspond à la version allélique héritée du parent sauvage A2 tandis que le jaune correspond à la version allélique héritée du parent hyper-producteur RutC30. La case blanche signifie que nous n'avons pas pu établir quelle est la version héritée.

3.3.1.4. Étude de la fertilité femelle

La reproduction sexuée nous a permis d'obtenir des souches possédant des performances cellulolytiques améliorées. Il serait intéressant de pouvoir utiliser ces souches dans de nouveaux tours d'améliorations par croisement et donc nous avons testé la fertilité femelle de ces souches.

Afin de tester la fertilité femelle de dix souches du crible secondaire, nous les avons croisées par confrontation avec les souches stériles QM6a *MAT1-1* ou QM6a *MAT1-2* en fonction de leur compatibilité. Des stromata sont apparus sur cinq des dix croisements (RuA-70, 74, 148, 149 et 156), néanmoins, pour la majorité d'entre eux les stromata ne sont pas parvenus à maturité. Nous avons donc évalué la fertilité femelle à l'aide du croisement par arrosage développé précédemment

(paragraphe 3.1.4). Les souches RuA-70, RuA-74 et RuA-148, toutes de type sexuel *MAT1-2*, ont produit des stromata qui n'ont pas continué leur développement et ont été recouverts de mycélium et de conidies. Par contre les souches RuA-149 et RuA-156, de type sexuel *MAT1-1*, ont produit des stromata matures et fertiles capables d'expulser des ascospores. Néanmoins, si cette fertilité semble stable et répétable pour la souche RuA-149, elle ne l'est pas pour la souche RuA-156. En effet, en fonction des expériences, les stromata n'ont pas toujours émis d'ascospores.

Parallèlement, nous avons vérifié pour les dix descendants s'ils portaient la version mutée ou non du gène *idc1*, dont la version mutée est responsable de la stérilité femelle dans les souches industrielles. Le séquençage du gène a montré que tous les descendants capables de faire des stromata portaient la version sauvage du gène *idc1*, tandis que les souches ne formant pas de stromata portaient la version mutée (Annexe 8). Néanmoins, toutes les souches porteuses de la version sauvage ne sont pas capables d'aller au bout de leur cycle de reproduction sexuée, suggérant qu'il y a dans la souche RutC30 des mutations supplémentaires responsables de stérilité.

Le criblage de la production des descendants du croisement A2xRutC30 ainsi que le test *MAT* ont permis d'identifier la souche RuA-149 qui est femelle fertile de type sexuel *MAT1-1*, compatible avec les souches industrielles et présentant une activité β-glucosidase améliorée.

3.3.2. Identification de mutations d'intérêts par la méthode du BSA-Seq

3.3.2.1. La stratégie du BSA-Seq

L'identification de mutations responsables de phénotypes d'intérêts peut représenter une première étape pour le développement de souches industrielles adaptées au procédé industriel de production ou présentant un rendement amélioré. Ainsi, des mutations modifiant la morphologie du champignon, améliorant les capacités de sécrétion ou la résistance à des pH acide peuvent être intéressantes à identifier pour ensuite modifier une souche industrielle par ingénierie génétique. Plusieurs approches d'identification des mutations causatives ont été développées.

La méthode couramment utilisée chez les champignons filamenteux est la complémentation de la souche mutante à l'aide d'une banque génomique. Cette méthode nécessite d'avoir à disposition une banque de cosmides de complémentation et de posséder un crible simple mais efficace pour sélectionner le transformant complémenté. Afin de resserrer la région génomique contenant la mutation, le fragment d'ADN (en moyenne 40kb) du cosmide qui a permis la complémentation de la fonction défectueuse subit une digestion enzymatique. Les fragments (en moyenne 5kb) obtenus sont transformés dans la souche mutante et les transformants sont à nouveau criblés pour la restauration du

phénotype sauvage. Enfin, le fragment permettant la restauration du phénotype sauvage est finalement séquencé pour identifier la mutation responsable du phénotype mutant. Cette méthode bien qu'efficace est chronophage.

La cartographie génétique peut également être utilisée pour réduire la région génomique contenant la mutation causative mais elle nécessite au préalable l'identification de marqueurs polymorphes entre les deux parents et le génotypage des marqueurs répartis à intervalles réguliers le long des chromosomes, afin d'identifier ceux dont les allèles ségrégent spécifiquement avec le phénotype associé à la mutation. Ces marqueurs définissent un intervalle de liaison au sein duquel se trouve la mutation responsable. Lorsque cette méthode est appliquée à l'« analyse de ségrégants en mélange » (Bulk Segregant Analysis : BSA), elle permet d'identifier plus finement la région chromosomale contenant la mutation responsable du phénotype d'intérêt (Michelmore et al., 1991). Cette approche a d'abord été développée pour identifier les marqueurs génétiques liés à un phénotype mutant chez les plantes (Michelmore et al., 1991) et a permis d'identifier des mutations pertinentes pour expliquer les phénotypes observés.

Le séquençage du génome complet des mutants est une troisième solution. Cependant les mutagénèses aléatoires ont pour conséquence de générer de nombreuses mutations et il peut être difficile de différencier les mutations d'intérêts des mutations fortuites. La récente mise en évidence de la reproduction sexuée chez le champignon filamenteux *T. reesei*, ouvre de nouvelles perspectives pour l'identification des mutations causatives.

L'utilisation de la technique d'analyse de ségrégants en mélange associé avec les nouvelles techniques de séquençage (NGS : Next –generation sequencing) permet par le calcul de la fréquence allélique dans une population, d'identifier la région contenant la mutation mais aussi d'obtenir la séquence de la région et donc de la mutation. Ainsi, la localisation et l'identification de la mutation causative sont faites simultanément. Cette méthode a été utilisé avec succès chez *S. cerevisiae* (Wenger et al., 2010), *N. crassa* (Pomraning et al., 2011), *Sordaria macrospora* (Nowrousian et al., 2012) et *A. niger* (Niu et al., 2015).

Le but de ce travail est de déterminer si l'analyse de ségrégants en mélange associé aux nouvelles techniques de séquençage est une approche pertinente pour identifier des mutations responsables de phénotypes d'intérêts chez *T. reesei*. Nous nous proposons donc de mettre au point chez *T. reesei* la méthode du BSA couplé à du séquençage haut débit que nous appellerons BSA-Seq dans la suite de ce manuscrit.

Dans notre approche (Figure 68), le mutant d'intérêt est croisé avec une souche sauvage. Puis, deux groupes de descendants présentant des phénotypes opposés pour un même caractère d'intérêt sont formés. L'analyse de la ségrégation de la descendance doit permettre d'évaluer l'origine monogénique ou polygénique du phénotype. Les ADN génomiques des descendants de chaque groupe sont rassemblés formant ainsi deux pools d'ADN qui sont séquencés par du séquençage haut-débit puis analysés par bio-informatique. Les génomes parentaux sont également séquencés et comparés afin d'identifier les SNPs (*Single nucleotide polymorphisms*). Les SNPs responsables du phénotype ou liés au locus en cause seront conservés chez tous les descendants présentant le phénotype d'intérêt (SNPs homozygotes) et proviennent de la souche parentale mutante, tandis que les autres SNPs proviendront à parts égales des deux souches parentales (SNPs hétérozygotes) (Pomraning et al., 2011; Niu et al., 2015).

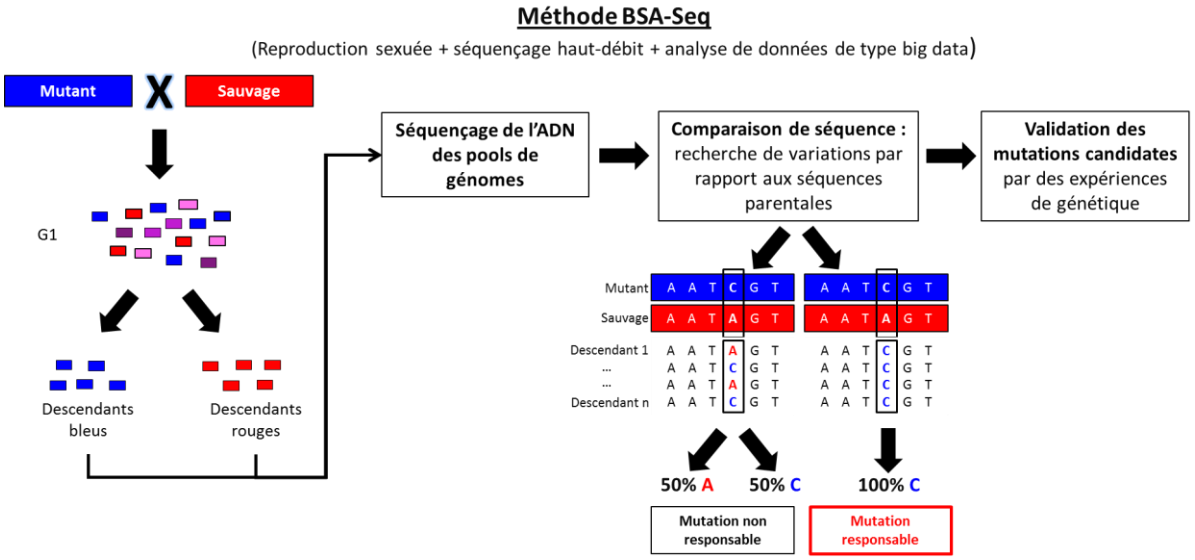


Figure 68 : Principe de la méthode BSA-Seq.
La souche mutante est croisée avec une souche sauvage. Les descendants obtenus sont criblés pour le phénotype d'intérêt afin de former deux groupes d'individus possédant les phénotypes parentaux. L'ADN de chacun de ces groupes ainsi que celui des souches parentales est séquencé. Puis les génomes parentaux sont comparés afin d'identifier les SNPs. Les SNPs causaux/responsables seront conservés chez tous les descendants possédant le phénotype d'intérêt tandis que les SNPs non responsables ont 50% de chance de se retrouver dans l'ADN du groupe. Enfin, les mutations candidates seront validées par des expériences génétiques.

3.3.2.2. Choix de la stratégie pour la mise au point du BSA-Seq chez *T. reesei*

Afin de développer la méthode du BSA-Seq dans notre organisme modèle, nous avons choisi de la mettre au point à l'aide de la souche mutante QM9136 (Mandels et al., 1971) et de la souche sauvage A2.

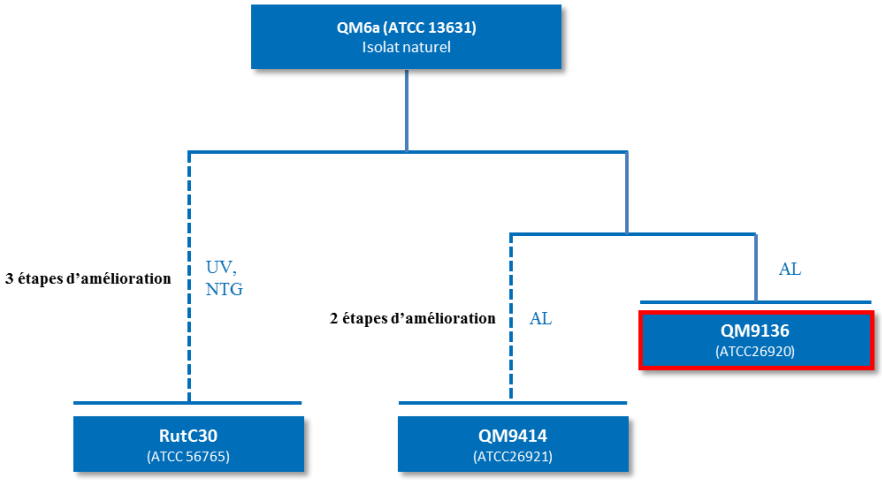


Figure 69 : Généalogie de la souche QM9136
La souche QM9136 a été obtenue suite à une étape de mutagénèse aléatoire par accélération linéaire (AL).

La souche QM9136 a été généré suite à une de mutagénèse de l'isolat naturel QM6a (Mandels et al., 1971). Contrairement à la souche QM6a, la souche QM9136 ne produit plus aucune cellulase. La mutation responsable de ce phénotype cellulase-négatif a été élucidée grâce au séquençage de son génome par Lichius et al., (2015) et l'analyse des fonctions des gènes touchés par des mutations. Le séquençage a mis en évidence une mutation de type InDel dans le gène majeur de la production de cellulases *xyr1* (Trire2 : 122208) qui est un régulateur de la régulation de l'expression des gènes de cellulases. La délétion de la base A2294 est à l'origine d'un décalage de la phase de lecture du gène *xyr1* qui produit une protéine XYR1 tronquée à qui il manque les 140 acides aminés de la partie C-terminale. La complémentation de cette mutation restaure la production de cellulase.

Dans nos conditions de culture, la souche sauvage A2 produit des cellulases qui représentent 200% de la production de la souche QM6a mais seulement 34% de la production de la souche hyper-productrice de référence RutC30 (paragraphe 3.3.1.2). Par ailleurs elle est de type sexuel compatible avec la souche QM9136.

Pour pouvoir constituer les différents groupes de descendants nécessaires à la technique du BSA-Seq, il faut disposer d'un crible permettant de distinguer les deux phénotypes parentaux opposés. Le crible mis au point repose sur la capacité du champignon à sécréter les enzymes dans le milieu et d'utiliser la cellulose marqué avec un chromophore (AZCL-He-cellulose, Megazymes) comme source de carbone. Ainsi, les endo-cellulases sécrétées dans le milieu par le champignon vont hydrolyser la cellulose et libérer l'azurine qui colore le milieu en bleu.

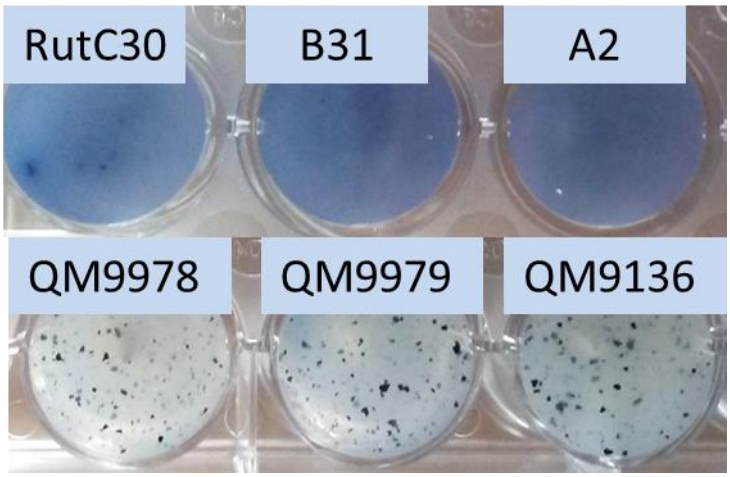


Figure 70 : Crible AZCL-He-Cellulose pour distinguer les souches productrices ou non de cellulases
Le crible se fait en plaque de 24 puits à l'aide d'un milieu minimum contenant comme seule source de carbone 0,1 % de poudre AZCL-He-Cellulose (azurine crosslinked He-cellulose) provenant de chez Megazyme. Les souches à tester sont incubées à 30 °C pendant une semaine. La lecture de ce test se fait par le dessous de la plaque. La lecture du crible est fixée de la façon suivante : milieu blanc = souche cellulase-négative ; milieu bleu = souche productrice.

Pour tester la capacité du crible à différencier des souches cellulases-négatives des souches productrices de cellulases, nous avons utilisé les souches QM9136, QM9979 et QM9978 qui ne produisent pas de cellulases (Mandels et al., 1971; Kubicek, 2013), les souches A2 et B31 et la souche hyper-productrices RutC30 (Montenecourt and Eveleigh, 1979). L'observation de la microplaque montre que pour les souches QM9978, QM9979 et QM9136, l'azurine ne s'est pas diffusé dans le milieu et donc que ces souches ne sécrètent pas d'endoglucanases. Pour la souche hyper-productrice RutC30, le milieu est devenu bleu grâce aux sécrétions des enzymes. Un phénotype similaire est observé pour les souches A2 et B31 signifiant que ces souches sécrètent des endoglucanases dans le milieu. Ce crible ne permet pas de distinguer une souche hyper-productrice d'une souche faiblement productrice comme A2 (paragraphe 3.3.1.2) mais il est suffisant pour distinguer la souche cellulase-négative QM9136 de la souche productrice A2. Les descendants qui formeront les deux groupes de phénotypes opposés seront donc différenciés à l'aide du milieu AZCL-He-cellulose.

Enfin, pour que l'analyse des SNPs soit des plus robustes, il faut que le nombre d'individus par groupe soit suffisamment grand afin de pouvoir différencier les vrais variations des erreurs de séquençage (Nowrousian et al., 2012). L'identification des mutations affectant des processus développementaux chez *S. macrospora* a été faite à l'aide de groupe contenant 40 descendants (Nowrousian et al., 2012) tout comme l'identification des mutations responsables de la thermosensibilité chez *N. crassa* (Pomraning et al., 2011). Et l'identification du phénotype non-acide d'*A. niger* a été faite avec 78 descendants (Niu et al., 2015). Etant donné que le phénotype cellulase-négatif est monogénique et que la souche QM9136 présente peu de mutation, nous avons fait notre mise au point avec le nombre minimum d'individus par pool, c'est-à-dire, 40 descendants.

3.3.2.3. Constitution des groupes de ségrégants

Au terme du croisement entre la souche QM9136 et la souche sauvage A2, 159 descendants purifiés ont été obtenus. Ils ont été soumis au crible AZCL-He-cellulose présenté précédemment.

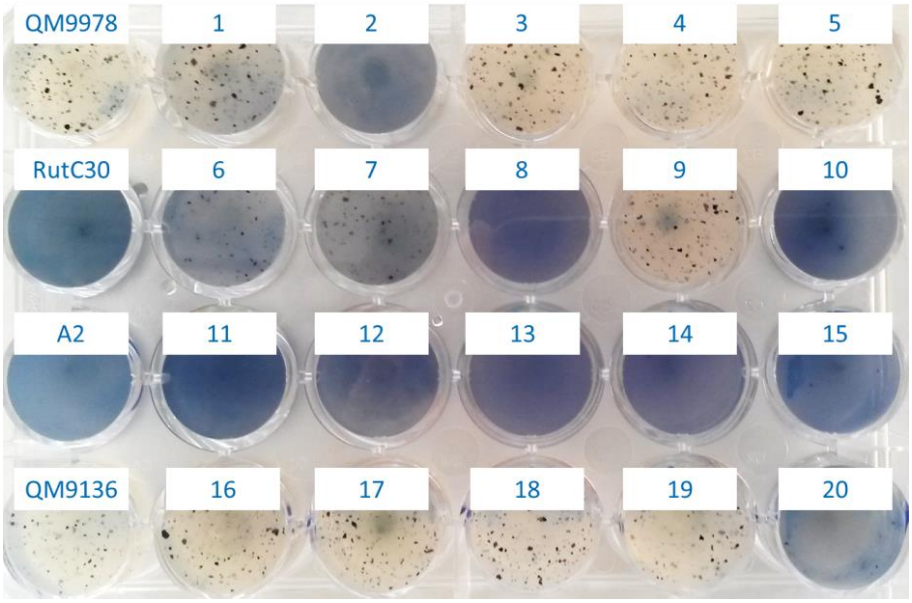


Figure 71 : Criblage des descendants du croisement A2xQM9136
Les souches à tester sont incubées à 30 °C pendant une semaine. La lecture de ce test se fait par le dessous de la plaque. La lecture du crible est fixée de la façon suivante : milieu blanc = souche cellulase-négative ; milieu bleu = souche productrice ; milieu bleu avec des cristaux = souche intermédiaire qui sont mises de côté.

A la suite du criblage des descendants (Figure 71) nous avons observé des puits blancs et des puits bleus comme précédemment qui correspondent respectivement à des souches cellulases-négatives et à des souches productrices de cellulases. Mais nous avons constaté la présence de puits présentant un phénotype intermédiaire c'est-à-dire une coloration bleu avec des cristaux d'AZCL-He-cellulose. Cette catégorie de descendants produits des enzymes mais sans doute pas en quantité suffisante pour dégrader tout l'AZCL-He-cellulose. Nous avons donc décidé d'écarter ce type d'individus et de ne pas les inclure dans notre analyse.

Sur 159 descendants, 77 (soit 48,4%) ont un phénotype cellulase-négatif, 68 individus (soit 43%) produisent des cellulases et 14 (soit 8,8%) ont un phénotype intermédiaire. Après exclusion du phénotype intermédiaire, la proportion des populations cellulase-négative (53%) et productrice (47%) indique que le phénotype cellulase-négatif est bien dû à une seule mutation.

3.3.2.4. Extraction et séquençage de l'ADN des deux groupes

Une recherche de SNPs par rapport aux génomes parentaux ainsi que le calcul de leur fréquence d'apparition seront effectués sur un mélange d'ADN des deux groupes après leur séquençage. Afin de

ne pas introduire de biais dans chaque groupe, il faut que l'ADN de chaque descendant soit en quantité équivalente. De cette exigence a découlé une stratégie à adopter pour obtenir ces groupes d'ADN. Nous avons donc fait croître individuellement chacun des 40 individus de chaque groupe, prélevé pour chaque individu une quantité équivalente de mycélium, regroupés en suite en pool pour l'extraction d'ADN selon le protocole préconisé par le JGI (http://1000.fungalgenomes.org/home/protocols/high-quality-genomic-dna-extraction/).

Le séquençage des deux groupes, cellulase-négatif et cellulase-positif, ont été réalisés par la plateforme de Séquençage à Haut Débit de l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC) de Saclay (http://www.i2bc.paris-saclay.fr/).

Groupe séquencé	Nombre de lectures	Taux de couverture
Cellulase-positif	6 259 771 Mb	67x
Cellulase-négatif	5 624 025 Mb	61x

Tableau 15 : Résumé du séquençage des deux groupes de descendants
Le nombre de lectures et les taux de couvertures indiqués sont ceux obtenus après les étapes de filtrages.

La technologie de séquençage « paired-end» générant des lectures (reads) de 250nt a été utilisée. Les taux de couvertures et le nombre de lecture après les étapes de filtrages sont indiqués pour chacun des groupes dans le Tableau 16.

3.3.2.5. Séquençage et analyses des génomes parentaux

Le génome de la souche QM9136 séquencé par Lichius et al., 2015 présente une structure identique à celui de la souche QM6a séquencé et assemblé par Martinez et al., (2008) et Jourdier et al., (2017). Une version plus complète du génome est disponible depuis peu (Li et al., 2017) mais n'était pas accessible lors de nos analyses du BSA-Seq.

Type de séquençage	Nombre de lectures	Taux de couverture
Mate pair	9 690 093	46x
Paired-end	8 398 725	33x

Tableau 16 : Résumé du séquençage de la souche sauvage A2
Le nombre de lectures et les taux de couvertures indiqués sont ceux obtenus après les étapes de filtrages et de trimming.

Le séquençage, l'assemblage et l'analyse des polymorphismes entre les souches QM6a et A2 ont été réalisés par la plateforme de Séquençage à Haut Débit de l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC) de Saclay (http://www.i2bc.paris-saclay.fr/).

Pour faciliter l'assemblage et obtenir une couverture suffisante, les technologies de séquençage « paired-end » et « mate-pair » avec des lectures de 250 nt ont été associées. Les paired-end permettent de construire un assemblage de bonne qualité qui servira ensuite de base pour utiliser les mate-pair

afin d'augmenter la continuité de l'assemblage. En effet les mate-pair ont la capacité de résoudre des régions compliquées à assembler (régions répétées plus ou moins longues, région de faible complexité…) car la distance séparant les 2 lectures (ou reads) d'un même fragment est de l'ordre de plusieurs kb (contrairement aux paired-end où cette distance ne dépasse pas quelques centaine de bases). Les taux de couverture et le nombre de lectures après les étapes de filtrage et d'élimination des séquences des adaptateurs (trimming) sont indiqués dans le Tableau 16. Un assemblage *de novo* de la souche A2 a permis de constituer 54 contigs totalisant 32 830 333 bases. La taille du génome de la souche A2 étant probablement proche de celui de la souche QM6a (33,9 Mb) et en considérant qu'il n'y a pas de redondance dans l'assemblage (prouvé par la Figure 73), une couverture de 96,8% du génome a été obtenue. La taille minimale et maximale des contigs est respectivement de 600 bases et 2 764 002 bases avec une taille médiane de 1 447 869 bases.

Chuang et al., 2015, ont montré une hétérozygotie de séquence dans des souches *MAT1-1* et *MAT1-2* descendantes de la souche hétérokaryotique CBS999.97. La structure du génome de la souche *MAT1-2* étant identique à celle de QM6a alors que celui de la souche CBS999.97 présente un réarrangement entre les extrémités des chromosomes II et IV (Chuang et al., 2015; Jourdier et al., 2017). Les caryotypes des deux types de souches sont présentés à la Figure 72. Pour la suite des analyses, nous avons voulu déterminer si notre souche sauvage A2 possède un génome de type QM6a ou de type CBS999.97 *MAT1-1,re.*

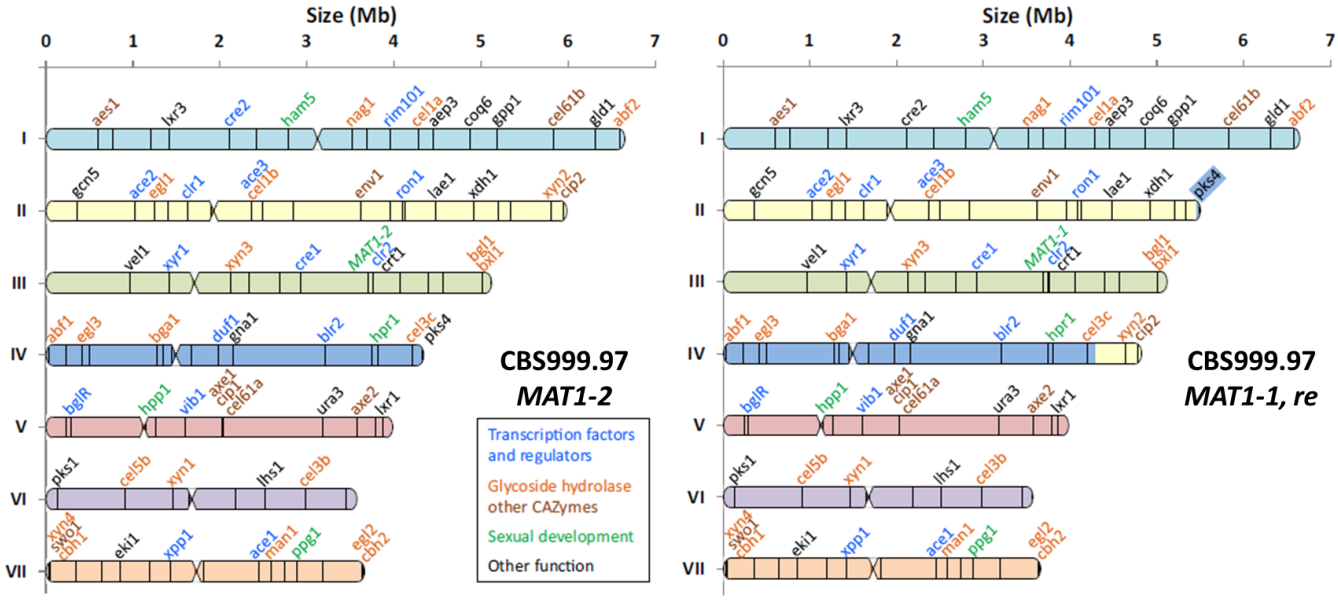


Figure 72 : Différence de caryotype entre les descendants *MAT1-2* et *MAT1-1re* de la souche CBS999.97
Dans la souche CBS999.97 *MAT1-1*, *re*, un bout de chromosome a été échangé entre les chromosomes II et IV. Sur le chromosome II, l'échange est représenté par le gène surligné *pks4*. Adapté de **Jourdier et al., 2017**.

Une matrice de similarité des contigs de la souche A2 sur les chromosomes de la souche QM6a (Druzhinina et al., 2016; Jourdier et al., 2017) montre une colinéarité sur le génome complet (Figure 73).

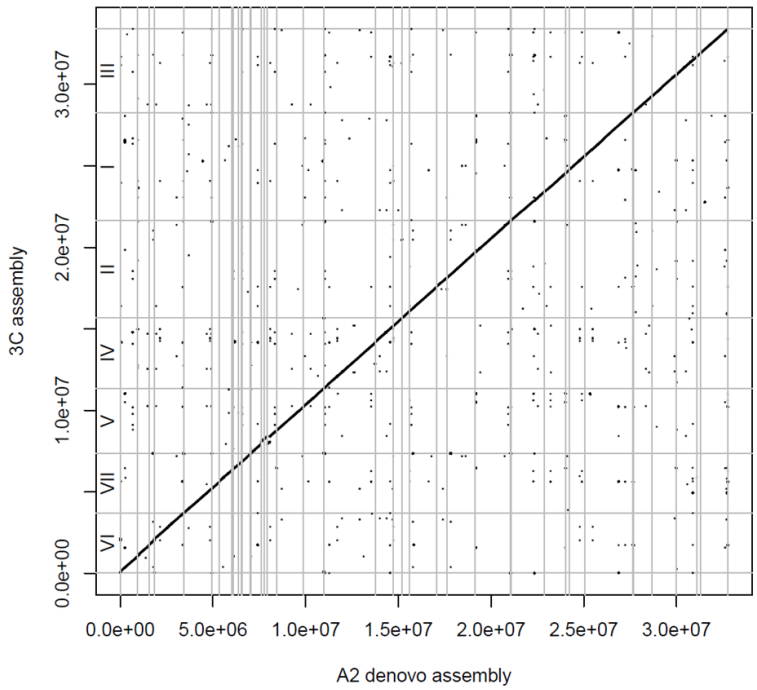


Figure 73 : Matrice de similarité entre les souches A2 et QM6a

Ce sont les séquences (contigs/scaffolds) de l'assemblage *de novo* de la souche A2 et la séquence réassemblée de la souche QM6a (Jourdier et al., 2017) qui sont comparées. Les contigs et les chromosomes résultant de l'assemblage des lectures A2 et QM6a ont été concaténés et comparés. Les lignes horizontales correspondent aux extrémités chromosomiques de l'assemblage QM6a et les lignes verticales à celles de l'assemblage A2 *de novo*. Les contigs de la souche A2 ont été ordonnés et inversés quand c'était nécessaire afin d'obtenir une diagonale.

Ce résultat, associé à l'analyse des contigs 117 et 129 qui recouvrent les régions recombinantes, indique une structure chromosomique identique entre les souches A2 et QM6a. L'assemblage des contigs de la souche A2 en chromosomes à l'aide du caryotype de la souche QM6a est présenté sur la Figure 74. L'analyse comparative des deux souches a permis d'identifier 327 040 variants (dont 290 818 SNPs) ce qui donne une densité de 1 SNP pour 100pb et 99% d'identité.

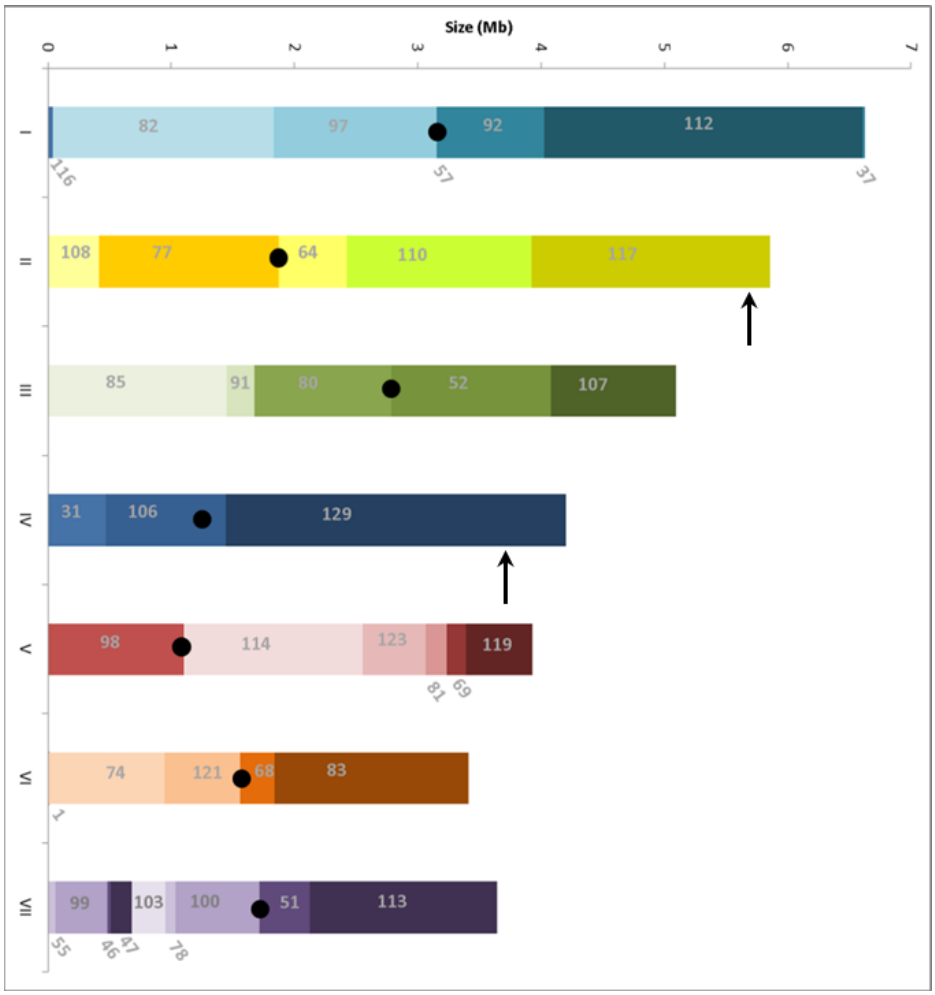


Figure 74 : Caryotype de la souche sauvage A2

Il a été réalisé en alignant les contigs de la souche A2 sur l'assemblage de la souche QM6a par Blast. Les flèches sur les contigs 117 et 129 indiquent la position approximative des réarrangements chromosomiques présents dans la souche CBS999.97 *MAT1-1*,re.

3.3.2.6. Identification des mutations candidates

Groupe séquencé	Nombre de variants détectés
Cellulase-positif	229 488
Cellulase-négatif	230 826

Tableau 17 : Nombre de variants détectés par groupe de descendants

C'est le nombre de SNPs présentant au moins une couverture de 20X.

Pour identifier les polymorphismes, les séquences des deux groupes de descendants ont été comparées à celle de la souche de référence A2 (assemblée) et leur nombre est indiqué dans le Tableau 17. Seuls les SNPs présentant une couverture d'au moins 20X ont été conservés.

La fréquence allélique de chaque SNP de chaque groupe est ensuite calculée. Les deux versions du SNP peuvent être présentes en part égale (50 :50) ou par exemple à 80% en faveur d'un parent et 20% en faveur de l'autre parent et vice-versa. Le logiciel Freebayes (Garrison and Marth, 2012) permet de dire pour chaque groupe de quelle souche parentale le SNP provient et à quelle fréquence il apparaît.

Cette analyse permet de générer un fichier qui contient entre autres informations, la fréquence allélique de chaque variant ainsi que leur coordonnée par rapport au génome assemblé de la souche A2. Sur la Figure 75b est représentée la fréquence allélique des variants du pool cellulase-négatif d'origine QM9136 (en bleu) et sur la Figure 75c est représentée la fréquence allélique des variants du pool cellulase-positif d'origine A2 (en rouge) sur le chromosome III.

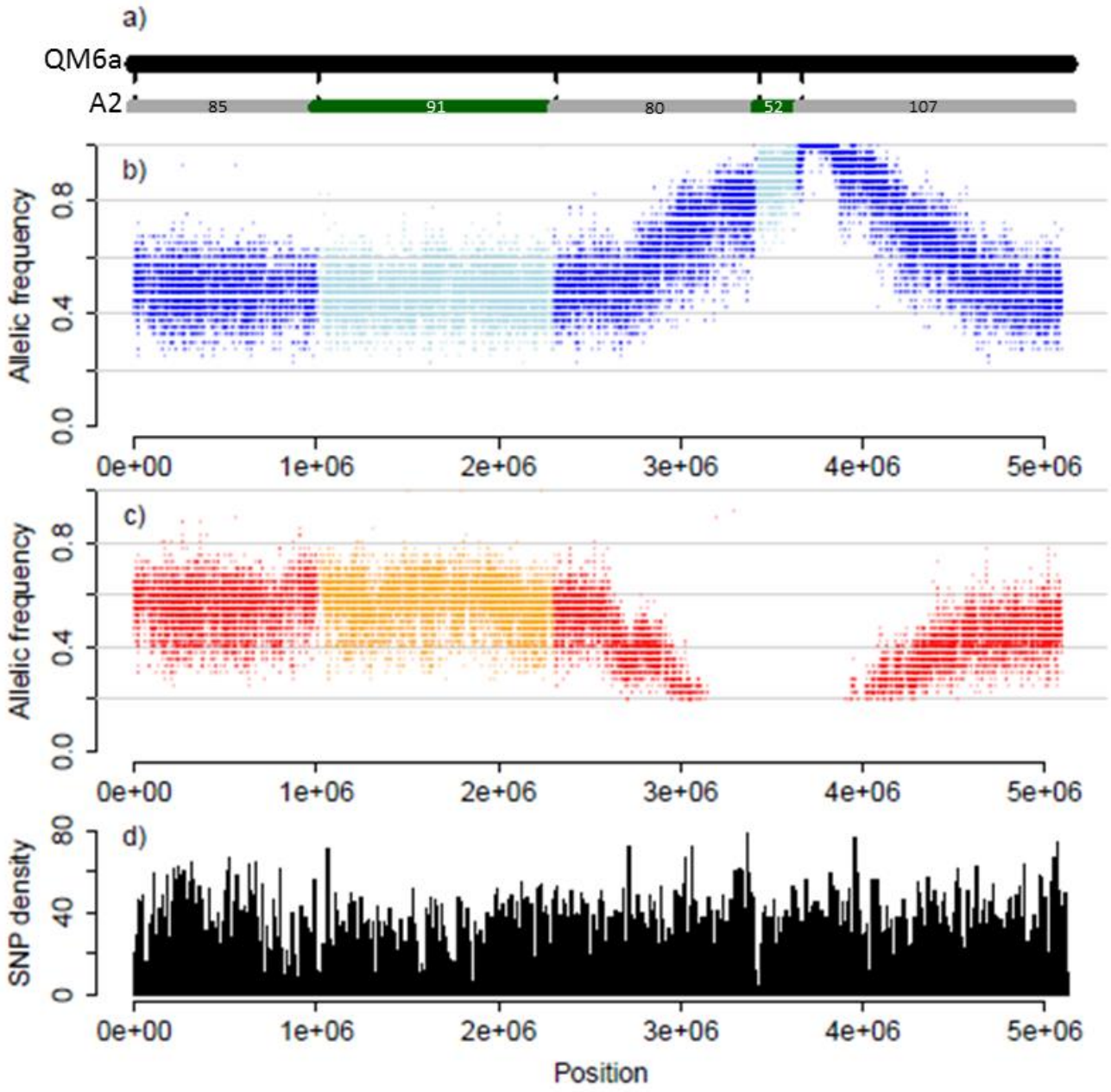


Figure 75 : Cartographie des SNPs sur le génome A2 et représentation de leurs fréquences alléliques
(a) Le trait noir représente le chromosome III de la souche QM6a contre lequel ont été aligné les contigs 85, 91, 80, 52 et 107 e la souche sauvage A2, représentés par une alternance de gris et de vert. (b-c) Les profils des fréquences alléliques des SNPs pour le pool cellulase-positif (rouge) et pour le pool cellulase-négatif (bleu) trouvés par rapport à la souche A2 en fonction de leur position sur le chromosome III de la QM6a. Les différentes couleurs représentent la succession des contigs de la souche A2. (d) La densité de SNPs (de 0 à 79 SNPs par fenêtre de 5kb) obtenue en comparant l'assemblage A2 avec la région correspondante sur le chromosome III de la souche QM6a.

Les mutations responsables du phénotype ou liés au locus en cause proviennent de la souche parentale mutante et sont conservés chez tous les descendants présentant le phénotype d'intérêt, alors que les mutations n'ayant aucun lien avec le phénotype apparaissent avec une probabilité de 50% (Pomraning et al., 2011; Niu et al., 2015). Afin de déterminer la région contenant la mutation responsable du phénotype cellulase négatif, nous recherchons les régions dans lesquelles les SNPs provenant de la souche parentale QM9136 (pool cellulase-négatif) ont une pénétrance avoisinant les 100 % et où ces mêmes SNPs ont une pénétrance avoisinant les 0% dans la souche parentale A2 (pool cellulase-positif).

La seule région présentant ces caractéristiques se trouve à cheval sur les contigs 52 et 107 du chromosome III de la souche A2 (Figure 75a, b et c). Nous avons ainsi pu déterminer une région de 715kb contenant 179 gènes et 273 polymorphismes répartis uniquement dans 28 gènes.

Le génome de la souche QM9136 a préalablement été séquencé par Lichius et al., 2015 et possède huit mutations de type InDel et six de type SNV par rapport à la QM6a. En comparant la région réduite de 715kb avec la région correspondante du génome de la souche QM9136, nous avons identifié une seule mutation dans cette région. Cette mutation se trouve dans le gène *xyr1* (Trire2 : 122 008).

3.3.2.7. Validation génétique de la mutation candidate

Selon la méthodologie du BSA-Seq, la mutation causative du phénotype cellulase-négatif a été identifiée dans le gène *xyr1*. Afin de valider ce résultat, il faut s'assurer que les descendants du groupe de cellulase-négatif possèdent bien une mutation dans le gène *xyr* et qu'au contraire les descendants du groupe producteur n'en possèdent pas.

Pour le gène candidat *xyr1*, la comparaison des souches parentales a mis en évidence l'absence de l'adénine de la position 2994 dans la souche QM9136 qui devrait également être présente chez les descendants du pool non producteur. En séquençant le gène *xyr1* dans les souches parentales utilisées et les pools de descendants producteur et non producteur, nous avons effectivement retrouvé une mutation identique dans la souche parentale QM9136 et dans le pool non producteur. L'alignement des gènes *xyr1* de nos différentes souches et pools avec la séquence QM9136 de Lichius et al., (2015), montre que la mutation identifiée est la même (Figure 76).

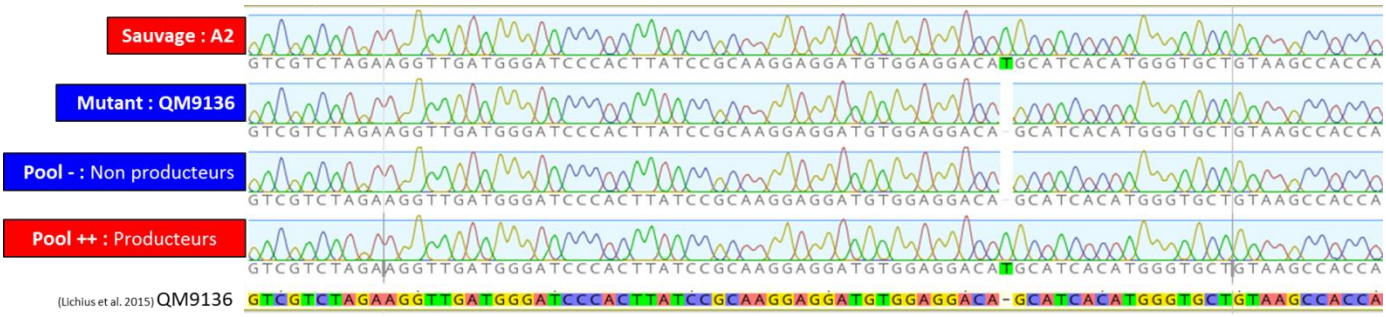


Figure 76 : Alignement des gènes *xyr1* des différentes souches parentales et groupe de descendants
Un fragment interne de 1000pb du gène *xyr1* a été amplifié à l'aide du couple d'amorces Xyr1-F/ Xyr1-R puis il a été séquencé à l'aide du couple d'amorces Xyr1-seq-F/ Xyr1-seq-R.

La méthode du BSA-Seq est donc pertinente et efficace chez *T. reesei* pour identifier des mutations responsables d'un phénotype d'intérêt.

3.3.3. Conclusion et discussion

La reproduction sexuée est un outil génétique qui permet de combiner ou générer de nouveaux caractères intéressants et d'identifier les mutations responsables d'un phénotype d'intérêt. En exploitant la reproduction sexuée entre souches sauvages et industrielles, nous souhaitions améliorer les performances cellulolytiques de *T. reesei* et évaluer la pertinence de la méthode du BSA-Seq chez *T. reesei* pour identifier des mutations d'intérêt.

3.3.3.1. L'amélioration des performances de *T. reesei* par la reproduction sexuée

Le croisement de l'isolat sauvage A2 avec la souche hyper-productrice RutC30 génère effectivement de nouvelles souches présentant des variations dans la production de cellulases. Les 295 descendants obtenus ont été soumis à un crible de sélection en trois étapes. La hiérarchisation des descendants selon le crible primaire été obtenue par des dosages des protéines extracellulaires de trois réplicas biologiques. Les dix meilleurs individus sont soumis à un crible secondaire, qui reproduit en miniature les conditions de culture industrielle. Si dans le premier crible, la production de protéines totales des meilleurs individus est entre une fois et demie et deux fois supérieure à celle de la souche de référence, lorsque ces mêmes individus sont cultivés en fioles alimentées, nous observons une diminution de cette proportion, ce qui est normal puisque les techniques diffèrent. Toutefois les souches choisies à l'exception d'une présentent toutes une production supérieure à la souche hyper-productrice RutC30. Cependant, si le crible primaire était à refaire, nous ne ferions pas de réplicas biologiques, comme cela a été fait, et nous nous contenterions des dosages d'une seule culture par individus, même si cela signifie prendre le risque de laisser de côté des individus potentiellement intéressants.

Le crible secondaire a permis de sélectionner les deux meilleures souches de type sexuel *MAT1-2*, RuA-82 et RuA-128, et la meilleure souche de type sexuel *MAT1-1*, RuA-149, pour une validation de leurs performances en bioréacteurs.

Finalement, la production protéique totale de ces souches n'est pas supérieure à celle de la souche hyper-productrice RutC30, mais leur activité spécifique β-glucosidase est jusqu'à trois fois supérieure. Néanmoins, les conditions de culture utilisées, optimisées pour la RutC30, ne sont pas les mieux adaptées pour ces individus puisque la souche RuA-128 par exemple n'a pas consommé la totalité des sucres du milieu de culture lorsque la phase de production est induite. Il serait intéressant de développer des conditions adaptées aux souches sélectionnées pour évaluer leurs performances réelles.

Comme la β-glucosidase codée par le gène *bgl1* est l'enzyme limitante des cocktails enzymatiques, un effort considérable est fait pour améliorer son activité, d'où les nombreux brevets déposés par les acteurs industriels du secteur (brevets WO2009035537 A1 et US 9447400 B2 déposés par Danisco, brevet US8486683 B2 déposé par Iogen, etc). Nous avons cherché à identifier les bases génétiques de l'amélioration observée dans les trois souches sélectionnées. L'analyse montre que les souches ont héritées soit de la version parentale RutC30 du gène *bgl1* s'ils sont de type sexuel *MAT1-2*, ou de la version parentale A2 s'ils sont de type sexuel *MAT1-1*. En effet, le gène *bgl1* est lié avec locus *MAT*, ce qui suggère que l'augmentation de l'activité β-glucosidase observée n'est pas liée à la version du gène *bgl1* présent.

Il est possible que l'amélioration de l'activité β-glucosidase soit liée à la présence de deux copies du gène *bgl1*, résultant d'une diploïdie segmentale engendrée par la différence de caryotype entre les souches parentales. D'après Jourdier et al., (2017), dans le cas d'un croisement entre la souche RutC30 et une souche sauvage ayant un caryotype similaire à celui de la souche QM6a, ce qui est le cas de la souche A2, la seule région chromosomique pouvant être dupliquée est une région du chromosome I qui a été transloquée dans le chromosome III. Or cette région ne contient pas le gène *bgl1*, donc il est peu probable que l'amélioration de l'activité β-glucosidase provienne de la présence de plusieurs copies de ce gène. Toutefois, un séquençage des souches avec une β-glucosidase améliorée est indispensable pour conclure sur ce point. Il faut noter que la région transloquée contient le gène de la β-glucosidase *bgl2* (aussi appelé *cel1a*). Bien que cette β-glucosidase soit intracellulaire (Saloheimo et al., 2002), son rôle dans l'induction de la production des cellulases en présence de lactose a été démontré (Xu et al., 2014). La présence de deux copies de ce gène pourrait amplifier l'induction de la production des cellulases et des β-glucosidases. L'activité β-glucosidase améliorée pourrait également être un effet indirect de dérégulation de l'expression d'autres enzymes du cocktail cellulolytique.

Parmi les souches retenues dans notre crible nous avons voulu vérifier si la troncation du gène *cre1,* décrite comme essentielle pour l'amélioration de la productivité est bien présente. Les deux souches, RuA-97 et RuA-156 ne présentent pas la troncation du gène *cre1* mais montrent pourtant des performances cellulolytiques similaires à celle de la souche RutC30. Ce résultat suggère qu'il y a bien levée de la répression catabolique dans ces souches mais qu'elle n'est pas liée à la troncation du gène *cre1*. La présence d'autres mutations dans des gènes impliqués dans la répression catabolique pourrait être responsable de ce phénotype. Par exemple, le gène *bglR,* pourrait être un acteur majeur de la voie de répression catabolique chez *T. reesei.* En effet, il a été démontré chez *N. crassa,* que son orthologue *col-26* joue un rôle important dans la répression catabolique et que la protéine COL-26 inhibe l'action de l'expression du gène *cre1* (Xiong et al., 2014). Afin d'expliquer ce résultat surprenant, il faudrait dans un premier temps évaluer la production de cellulases de ces souches en bioréacteur afin de s'assurer qu'elle est bien similaire à celle de la souche RutC30 malgré l'absence de la troncation du gène *cre1*.

Parallèlement, nous avons vérifié si les souches du crible étaient capables de faire de la reproduction sexuée et si elles portaient la version mutée du gène *idc1,* responsable de la stérilité femelle. Si toutes les souches porteuses de la version mutée ne forment pas de stromata, certaines souches porteuses de la version sauvage du gène *idc1* ne sont pourtant pas capables d'aller au bout de leur cycle de reproduction sexuée, suggérant qu'il y a dans la souche RutC30 des mutations supplémentaires responsables de la stérilité. C'est à notre connaissance le premier résultat expérimental suggérant qu'il pourrait y avoir d'autres mutations, que celle du gène *idc1,* impliquées dans le phénotype de stérilité chez *T. reesei*.

Au cours de la reproduction sexuée, en plus de combiner des caractéristiques parentales, la méiose a donc pu engendrer de la « ségrégation transgressive » (Rieseberg et al., 1999) à l'origine des descendants possédant les effets bénéfiques inattendus. Pour comprendre l'origine de cette amélioration, une analyse plus avancée du génome des trois souches sélectionnées, et de leurs cocktails enzymatiques doit être réalisée. Le séquençage de la souche RuA-149 est en cours et celui des souches RuA-82 et RuA-128 devrait suivre.

Au sein des 295 descendants obtenus, nous avions dénombré de façon surprenante, 73 % de la descendance sont du type sexuel *MAT1-1* et 27 % sont du type sexuel *MAT1-2* (Figure 62), alors que 50 % de chaque type sexuel étaient attendus. Le caryotype des deux souches parentales ne permet pas d'expliquer ce résultat. En effet, le croisement A2 par RutC30 équivaut au croisement théorique RutC30 par QM6a *MAT1-1* présenté par Jourdier et al., (2017), et pour lequel la répartition des types sexuels est inversée à la nôtre. En plus de contrôler la reproduction sexuée, les gènes du locus *MAT* régulent de nombreux autres processus biologiques comme le métabolisme général, la morphologie ou

le métabolisme secondaire (Coppin et al., 1997; Bidard et al., 2011; Dyer and Kück, 2017). Chez *P. anserina*, les gènes contenus dans la zone de non-recombinaison entourant le locus *MAT* sont également impliqués dans la régulation de nombreux processus métaboliques. Un profil transcriptionnel différent entre une souche *mat+* et *mat-* est obtenu pour 10 % des gènes de *P. anserina*, confirmant que les souches des deux types sexuels ont une physiologie légèrement différente (Grognet et al., 2014). Comme, la souche RutC30 a été générée par mutagénèse aléatoire, il est envisageable que des mutations se soient accumulées dans les gènes contenus dans la zone de non-recombinaison, affectant ainsi des processus métabolique impliqués dans la morphologie et pouvant entrainer un défaut de germination et/ou de croissance des individus de type sexuel *MAT1-2*. Il se peut aussi que l'association létale d'un gène lié au type sexuel *MAT1-2* avec un autre gène ait défavorisé les ascospores *MAT1-2*.

Malgré ce déséquilibre entre les types sexuels, dans la descendance RuA, nous avons démontré l'existence d'un biais vers le type sexuel *MAT1-2* au sein des souches hyper-productrices de cellulases. Ce phénotype peut être lié au locus *MAT1-2* et/ou à des mutations contenues dans les gènes de la région de non-recombinaison. Pour établir un lien entre la production de cellulases et les gènes de la région *MAT* des expériences supplémentaires sont nécessaires. Le locus *MAT1-2* d'une souche hyper-productrice pourrait être remplacé par le locus *MAT1-1* afin d'en évaluer le rôle ou alors, les mutations de la région de non-recombinaison pourraient être complémentées. Nous avons donc recherché les mutations impactant des gènes présents dans la région *MAT* entre les souches RutC30 et QM6a. Parmi les sept gènes mutés, un seul code pour un facteur de transcription (Trire2 :106009) mais son rôle dans la régulation de la croissance ou de la production de cellulases n'est pas démontré. En effet, il a été montré que l'orthologue de ce gène chez *N. crassa*, appelé *acu-15*, est impliqué dans l'utilisation d'acétate (Bibbins et al., 2002).

Enfin, l'évaluation de la fertilité femelle des dix descendants testés montre que les souches capables de produire des stromata possèdent la version sauvage du gène *idc1* tandis que ceux qui ne font pas de stromata possèdent la version mutée du gène. Cette observation est conforme aux résultats de Linke et al., 2015) pour qui la mutation dans le gène *idc1* est responsable de la stérilité femelle. Néanmoins, nous observons que bien que les souches RuA-70, RuA-74 et RuA-148 possèdent la version sauvage du gène, leurs stromata ne murissent pas et ne donnent pas d'ascospores. De même, la souche RuA-156 possède une fertilité fluctuante puisque ses stromata ne sont pas systématiquement capables de murir et d'expulser des ascospores. En revanche, la souche RuA-149 a une fertilité femelle stable puisqu'elle est capable d'émettre des ascospores systématiquement. Ces observations vont dans le sens de notre hypothèse sur la présence de mutations supplémentaires responsables de la stérilité femelle dans la souche RutC30 transmises à la descendance. Ce résultat renforce encore l'intérêt de notre approche « souche assistante » développée au chapitre 3.2.

Ainsi, la souche RuA-149 est la plus intéressante des descendants RuA. En effet, en plus de présenter une production de cellulases ainsi qu'une activité β-glucosidase améliorée, elle est de type sexuel *MAT1-1* donc compatible avec toutes les souches industrielles et possède une fertilité femelle stable. Cette souche non OGM fait l'objet d'un brevet en cours de dépôt et peut servir d'outil pour réaliser des croisements avec d'autres souches industrielles issues de mutagénèses pour les améliorer mais aussi avec des souches issues de manipulation génétique pour éliminer les marqueurs de sélection.

3.3.3.2. L'identification de mutations d'intérêt par la méthode du BSA-Seq

Les souches industrielles de *T. reesei* possédant de trop nombreuses mutations, l'identification de mutations responsables de phénotypes d'intérêts par les méthodes traditionnelles peut s'avérer longue et fastidieuse tandis que la stratégie du séquençage complet du génome ne permet pas de distinguer les mutations responsables des mutations collatérales. La méthode du BSA-Seq, qui combine l'analyse de ségrégants en mélange (BSA) et le séquençage haut-débit permet de délimiter la région du génome responsable des mutations causatives et d'identifier la mutation. Pour prouver que cette méthode fonctionne et est pertinente chez *T. reesei* nous avons utilisé la souche cellulase-négative QM9136 dont la mutation causative a déjà été identifiée (Lichius et al., 2015) pour en faire la preuve de concept.

Le BSA-Seq repose sur le croisement de la souche mutante avec une souche sauvage et la constitution de deux groupes de descendants présentant des phénotypes opposés. La recherche de polymorphismes et l'établissement de leur fréquence allélique dans les séquences des descendants par rapports à la séquence de référence A2 permet d'identifier des régions génomiques où les variants ont une haute fréquence allélique dans un pool de descendants mutants alors que ces mêmes variants ont une fréquence allélique très faible (voire nulle) dans l'autre pool de descendants. Il permet ainsi de réduire le nombre de régions génomiques responsable du phénotype. Lors du croisement, il est important d'utiliser des souches présentant une forte densité de SNPs afin de pouvoir éliminer les mutations collatérales et avoir suffisamment de polymorphismes pour pouvoir distinguer la version allélique des deux parents.

L'étape de criblage est importante car il ne doit y avoir aucun doute sur le phénotype de chaque descendant. Un descendant mal criblé, c'est-à-dire un descendant désigné mutant mais qui porte probablement un allèle sauvage pour le locus responsable du phénotype, va induire l'identification d'une région causative plus grande que prévu (Schneeberger, 2014). Le crible que nous avons mis en

place a permis de sélectionner sans ambiguïté suffisamment de descendants pour constituer chaque groupe.

Pour pouvoir analyser les séquences de chacun des groupes, il faut pouvoir les comparer avec les séquences des souches parentales. C'est pourquoi il est important de séquencer les souches parentales. La souche QM9136 a été séquencée par Lichius et al., (2015) tandis que la souche sauvage A2 a été séquencée au cours de cette étude. Son séquençage a permis de couvrir 96,8% de son génome par rapport à celui de la souche de référence QM6a. La souche A2 possède un caryotype identique à celui de la souche QM6a et leur pourcentage d'identité est de 99%. Son génome assemblé est 1Mb plus petit que celui de la souche de référence QM6a. Cette différence provient probablement de la difficulté d'assemblage des régions riches en AT, fréquentes dans le génome de *T. reesei* (Li et al., 2017).

La région génomique identifiée par le BSA-Seq a une taille de 715kb située sur le chromosome III. La connaissance préalable des mutations de la souche QM9136 ainsi que leur faible nombre a permis malgré la dimension de la région identifiée de déterminer la mutation causative du phénotype. Un croisement supplémentaire entre un descendant cellulase-négatif de la souche QM9136 avec la souche A2 permettrait probablement de réduire la région où la mutation est présente. Une augmentation du nombre d'individu par pool est aussi envisageable.

Par ailleurs, les deux souches parentales utilisées possèdent un caryotype similaire et sans réarrangements chromosomiques majeurs telles que des inversions ou translocations. La présence de tels réarrangements identifiés chez les souches industrielles (Vitikainen et al., 2010; Chuang et al., 2015; Ivanova et al., 2017; Jourdier et al., 2017) et la souche sauvage pourrait engendrer la présence de plusieurs copies de régions chromosomiques dans des descendants et aurait pour conséquence de fausser l'analyse des SNPs et de leurs fréquences alléliques. Dans l'optique d'élucider des mutations causatives, nous préconisons d'utiliser pour le croisement initial une souche de référence possédant un caryotype similaire à celui de la souche mutante mais dont les génomes présentent une forte densité de SNPs afin de pouvoir identifier sans ambiguïté le locus responsable. Une autre option serait de réaliser une série de croisement avec la souche parentale A2 pour retrouver un caryotype identique. Toutefois il faut noter que les translocations peuvent aussi être des mutations causatives comme cela a été montré par Ivanova et al., (2017).

La méthode du BSA-Seq est pertinente et efficace chez *T. reesei* pour identifier des mutations responsables d'un phénotype d'intérêt. Appliquée à des souches comportant de très nombreux SNPs, elle permet plus aisément de distinguer les mutations d'intérêts des mutations fortuites, alors que le séquençage du génome complet comme effectué par Lichius et al., (2015) ne permet d'identifier la

mutation causative que s'il y a un faible nombre de mutations détectées et que les fonctions des gènes mutés sont évidents.

La méthode du BSA-Seq est déjà été mise en œuvre au laboratoire pour identifier les mutations responsables du phénotype de faible viscosité de la souche PC3-7.

4. Conclusion et perspectives

.

Afin de diminuer le cout de l'étape d'hydrolyse enzymatique du procédé de production de bioéthanol de deuxième génération, les industriels du secteur ont dans un premier temps amélioré *T. reesei* par de la mutagénèse aléatoire qui a donné des résultats prometteurs mais a atteint ses limites. Puis plus récemment, des stratégies de modifications génétiques ciblées, dirigées spécifiquement contre les acteurs moléculaires impliqués dans les processus de production de cellulases ont été mise en place. Des souches améliorées pour leur productivité ou pour la qualité de leur cocktail ont ainsi été générées. Toutefois, le nombre de gènes qu'il est possible de modifier par ces techniques et le peu de marqueurs de sélection et de leur recyclage réduisent les modifications possibles.

La reproduction sexuée est la méthode la plus répandue pour l'amélioration des animaux et des végétaux. Comme de nombreux champignons industriels, *T. reesei* a longtemps été considéré comme possédant exclusivement un cycle asexuel. La mise en évidence récente d'un cycle de reproduction sexuée chez ce champignon filamenteux ouvre de nouvelles perspectives d'amélioration des souches utilisées en biotechnologie. Cependant, il a été démontré que l'isolat sauvage QM6a présente un problème de stérilité femelle (Seidl et al., 2009). Par ailleurs, la reproduction sexuée chez *T. reesei*, un champignon hétérothallique, nécessite pour se faire deux individus de type sexuel compatible *MAT1-1* et *MAT1-2*. Comme toutes les souches industrielles de *T. reesei* dérivent de l'isolat sauvage QM6a, elles sont toutes stériles en tant que femelles et toutes de type sexuel *MAT1-2*. La reproduction sexuée peut être un outil d'amélioration rapide et efficace particulièrement si elle peut advenir entre les souches industrielles.

Mon travail de thèse a consisté à mettre en place la reproduction sexuée dans *T. reesei* afin de pouvoir l'utiliser comme outil génétique et d'amélioration des performances des souches industrielles. La démarche que j'ai suivie pour atteindre ces objectifs a été dans un premier temps de mettre au point des méthodologies robustes et développer des connaissances sur un mécanisme biologique essentiel qui n'a jamais été utilisé sur notre organisme modèle et dans notre laboratoire. Ensuite j'ai décidé de tirer profit de cet outil selon diverses approches. La première approche visait à croiser les souches industrielles stériles entre elles grâce à une méthode originale, encore jamais utilisée chez les microorganismes à usage industriel. La seconde approche consistait à utiliser les croisements avec des souches sauvages pour générer de la biodiversité mais aussi pour élucider les bases moléculaires responsables de phénotype intéressant.

La première partie de mon travail a donc été consacrée à l'optimisation de la reproduction sexuée et à la mise en place de protocoles expérimentaux essentiels à son exploitation. La mise au point d'une méthode de germination des ascospores nous a permis d'isoler les deux souches sauvages monocaryotiques et femelles fertiles A2 (*MAT1-1*) et B31 (*MAT1-2*) qui ont été utilisées tout au long de ce travail de thèse. Le génome de la souche A2 (*MAT1-1*) a été séquencé et assemblé tandis que le

séquençage de la souche B31 (*MAT1-2*) est en cours. La souche A2 possède un caryotype, sans translocation ni inversion, identique à celui de la souche QM6a. Elle pourra servir d'outil pour de futurs croisements avec des souches d'intérêt, aussi bien pour obtenir des souches améliorées pour la production d'enzymes que pour identifier des mutations causatives. Les croisements effectués à l'aide de ces deux souches sauvages A2 (*MAT1-1*) et B31 (*MAT1-2*) ont permis d'établir que le cycle de reproduction de *T. reesei* se déroule en 10 à 12 jours et qu'il est typique des ascomycètes (Peraza-Reyes and Berteaux-Lecellier, 2013). Un protocole de reproduction sexuée parfaitement établi est disponible et permet de calibrer tous les croisements en minimisant la variabilité expérimentale lors de l'étude de mécanismes complexes liés à la reproduction sexuée (événement de fécondation, effet des nutriments…).

La deuxième partie de cette thèse a été dédiée à la mise en place de la reproduction sexuée entre des souches hyper-productrices femelles stériles, à l'aide de la stratégie originale de la « souche assistante ». Cette stratégie permet de se soustraire à la réintroduction systématique du gène *idc1,* responsable de la stérilité chez la souche QM6a (Linke et al., 2015), et de contourner les éventuelles autres mutations impliquées dans la stérilité femelle des souches industrielles. La mise en œuvre de cette stratégie a permis de restaurer partiellement mais de façon répétable la reproduction sexuée entre les souches industrielles. Si la stratégie de la souche assistante n'a pas débouché sur l'obtention d'une descendance, un certain nombre de pistes reste à explorer, en particulier la présence de mutation(s) supplémentaire(s) dans nos souches industrielles affectant le développement sexué au niveau zygotique.

La restauration de la formation des périthèces sans le développement d'une descendance m'a conduit à envisager qu'un blocage au niveau de l'étape de fécondation pouvait être responsable de l'absence d'ascospores. Comme aucune littérature ne traite de la fécondation chez *T. reesei*, j'ai initié l'étude de cet évènement dans des croisements entre souches sauvages. Il est en effet maintenant nécessaire de mieux comprendre le processus sexuel chez *T. reesei*. Contrairement aux systèmes modèles bien connus (*Podospora*, *Sordaria*, *Neurospora*, *Ascobolus*, *Aspergillus*…), cette espèce forme des stromata dont l'origine n'est pas complètement élucidée. En particulier, il serait intéressant de savoir le moment exact de la fécondation. Celle-ci pourrait avoir lieu une seule fois avant la formation des stromata ou bien de manières indépendantes à l'origine de chacun des perithèces. Nous savons que les stromata ne se développent que si les deux types sexuels sont en présence, mais nous ne savons pas si les tissus stromatiques sont hétérocaryotiques ou homocaryotiques, ni si l'hétérocaryose potentielle a une origine végétative ou sexuelle. Les résultats préliminaires suggèrent que les descendants d'un stromata peuvent provenir d'un ou d'au moins deux événements de fécondation ce qui suggère une présence précoce des deux types sexuels dans les stromata. Avec le recul, la stratégie utilisée pour l'étude de la fécondation n'était probablement pas la plus pertinente car les résultats

obtenus me paraissent peu informatifs. La construction de souches sauvages porteuses de noyaux marqués à l'aide de protéines fluorescentes pourrait permettre de suivre leur progression en procédant à une étude histologique des stromata tout au long de leur développement. En parallèle, une étude similaire, sur le développement des stromata issus de la méthode de la souche assistante permettrait d'identifier précisément les étapes qui ont lieu dans ces stromata et leur cinétique afin de mieux comprendre pourquoi il n'y a pas de descendants.

La souche assistante utilisée ici dérive de la souche sauvage B31 *(MAT1-2).* Il est possible que le fort polymorphisme existant entre cette souche sauvage et les souches QM6a puisse affecter le processus de complémentation de la stérilité femelle. Enfin, il serait intéressant de construire des souches hyper-productrices *MAT1-1* et complémentées avec le gène fonctionnel *idc1*, afin de vérifier s'il n'y a pas d'autres gènes responsables de la stérilité femelle. En effet, si cette complémentation n'aboutit pas à l'obtention de descendants alors la stratégie de la souche assistante pourrait être testée et aurait encore plus de valeur.

La dernière partie de ma thèse visait à mettre à profit la reproduction sexuée entre souches sauvages et hyper-productrices de cellulases pour générer de la diversité et sélectionner de nouvelles souches hyper-productrices. En associant la reproduction sexuée avec un crible en trois étapes, nous avons identifié la souche hyper-productrice RuA-149 qui possède une activité β-glucosidase améliorée. De plus, elle est de type sexuel *MAT1-1* et possède une fertilité femelle stable ce qui la rend compatible avec toutes les souches industrielles. Cette souche non OGM fait l'objet d'un brevet en cours de dépôt et pourra servir d'outil pour réaliser de futurs croisements avec d'autres souches d'intérêt.

Dans cette étude, nous avons démontré l'existence d'un biais vers le type sexuel *MAT1-2* au sein des souches hyper-productrices de cellulases. Ce phénotype pourrait provenir directement du locus *MAT1-2* et/ou à des mutations contenues dans les gènes de la région de non-recombinaison du locus *MAT*. Des expériences supplémentaires sont nécessaires : le rôle du locus *MAT1-2* pourrait être évalué par le remplacement par le locus *MAT1-1* dans une souche hyper-productrice.

Par ailleurs, certaines souches hyper-productrices possèdent des réarrangements chromosomiques majeurs qui peuvent avoir un effet sur la viabilité des ascospores mais aussi sur la production de cellulases (Vitikainen et al., 2010; Ivanova et al., 2017). D'une part, il faudrait faire une dissection d'asques pour évaluer l'impact des translocations sur la viabilité des descendants dans des souches hyper-productrices. Et d'autre part, il serait intéressant de séquencer dix descendants hyper-producteurs et dix souches faiblement productrices afin d'évaluer l'effet du caryotype sur la production de cellulases. Cette expérience permettrait en même temps de disposer des séquences

nécessaires à des analyses plus minutieuses pour identifier des bases moléculaires de l'augmentation de la production de cellulases chez ces descendants. Une étude de type BSA-Seq n'est pas envisageable car le phénotype d'hyper-production est trop complexe et que trop de mutations sont impliquées dans ce phénomène (Ilmen et al., 1996; Vitikainen et al., 2010; Portnoy et al., 2011).

Parallèlement, la reproduction sexuée a été mise à profit pour mettre en place la méthode du BSA-Seq pour identifier les mutations responsables de phénotypes d'intérêt. L'efficacité et la pertinence de cette méthode pour *T. reesei* ont été démontrées. Cette technologie est déjà en cours d'utilisation au laboratoire pour identifier une mutation causative d'un phénotype essentiel pour un meilleur fonctionnement du procédé industriel.

En conclusion, les travaux menés au cours de cette thèse ont permis de mettre en place la reproduction sexuée chez *T. reesei* qui s'avère être un outil génétique efficace pour générer de nouvelles souches hyper-productrices de cellulases et pour identifier les mutations causatives de phénotypes d'intérêt. De plus, la mise au point de la stratégie originale de la souche assistante a permis de restaurer partiellement la reproduction sexuée chez les souches industrielles. Complété par différentes études suggérées ci-dessus, l'événement empêchant la production des ascospores devrait pouvoir être compris et levé, et permettre l'achèvement du cycle de reproduction sexuée.

À terme, les outils, le savoir-faire et les connaissances générées par la mise en place de la reproduction sexuée chez *T. reesei* pourront être transférés à d'autres microorganismes eucaryotes susceptibles d'être utilisés au laboratoire dans le futur. Par ailleurs, les souches hyper-productrices générées par la reproduction sexuée pourront contribuer à améliorer le coût de l'étape d'hydrolyse lors de la production du bioéthanol de deuxième génération et ainsi favoriser le développement de ce type de carburant qui est plus bénéfique pour l'environnement.

5. Références

Agnihotri, V.P. (1968). Effects of nitrogenous compounds on sclerotium formation in *Aspergillus niger*. Canadian journal of microbiology *14*, 1253-1258.

Aldabbous, M.S., Roca, M.G., Stout, A., Huang, I., Read, N.D., and Free, S.J. (2010). The ham-5, rcm-1 and rco-1 genes regulate hyphal fusion in *Neurospora crassa*. Microbiology (Reading, England) *156*, 2621-2629.

Arnaise, S., Zickler, D., Le Bilcot, S., Poisier, C., and Debuchy, R. (2001a). Mutations in mating-type genes of the heterothallic fungus *Podospora anserina* lead to self-fertility. Genetics *159*, 545-556.

Arnaise, S., Zickler, D., Le Bilcot, S., Poisier, C., and Debuchy, R. (2001b). Mutations in Mating-Type Genes of the Heterothallic Fungus *Podospora anserina* Lead to Self-Fertility. Genetics *159*.

Aro, N., Pakula, T., and Penttilä, M. (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. FEMS microbiology reviews *29*, 719-739.

Ashton, G., and Dyer, P. (2016). Sexual Development in Fungi and Its Uses in Gene Expression Systems. In Gene expression systems in fungi. Advancements and applications, M. Schmoll and C. Dattenböck, eds. (New York NY: Springer Science+Business Media), pp. 335–350.

Axtell, C., Johnston, C.G., and Bumpus, J.A. (2000). Bioremediation of Soil Contaminated with Explosives at the Naval Weapons Station Yorktown. Soil & Sediment Contamination: An Int. J. *9*, 537-548.

Ballerini, D. (2011). Les biocarburants. Répondre aux défis énergétiques et environnementaux des transports (Éd. Technip).

Bayram, O., and Braus, G.H. (2012). Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. FEMS microbiology reviews *36*, 1-24.

Bazafkan, H., Dattenbock, C., Stappler, E., Beier, S., and Schmoll, M. (2017). Interrelationships of VEL1 and ENV1 in light response and development in *Trichoderma reesei*. PloS one *12*, e0175946.

Becker, K., Beer, C., Freitag, M., and Kück, U. (2015). Genome-wide identification of target genes of a mating-type α-domain transcription factor reveals functions beyond sexual development. Molecular microbiology *96*, 1002-1022.

Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L., and Hoondal, G.S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. Appl Microbiol Biotechnol, 326-338.

Bégueret, J., Turcq, B., and Clavé, C. (1994). Vegetative incompatibility in filamentous fungi: het genes begin to talk. Trends in Genetics *10*, 441-446.

Bibbins, M., Crepin, V.F., Cummings, N.J., Mizote, T., Baker, K., Mellits, K.H., and Connerton, I.F. (2002). A regulator gene for acetate utilisation from Neurospora crassa. Molecular genetics and genomics : MGG *267*, 498-505.

Bidard, F., Aït Benkhali, J., Coppin, E., Imbeaud, S., Grognet, P., Delacroix, H., and Debuchy, R. (2011). Genome-wide gene expression profiling of fertilization competent mycelium in opposite mating types in the heterothallic fungus *Podospora anserina*. PloS one *6*, e21476.

Biely, P., Puchart, V., Stringer, M.A., and Mørkeberg Krogh, Kristian B R (2014). *Trichoderma reesei* XYN VI--a novel appendage-dependent eukaryotic glucuronoxylan hydrolase. The FEBS journal *281*, 3894-3903.

Billiard, S., López-Villavicencio, M., Hood, M.E., and Giraud, T. (2012). Sex, outcrossing and mating types: unsolved questions in fungi and beyond. Journal of evolutionary biology *25*, 1020-1038.

Bischof, R.H., Ramoni, J., and Seiboth, B. (2016). Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. Microbial cell factories *15*, 106.

Bistis, G. (1983). Evidence for diffusible, mating-type-specific trichogyne attractants in *Neurospora crassa*. Experimental Mycology *7*, 292-295.

Błaszczyk, L., Siwulski, M., Sobieralski, K., Lisiecka, J., and Jędryczka, M. (2014). *Trichoderma spp*. – application and prospects for use in organic farming and industry. Journal of Plant Protection Research *54*.

Bobrowicz, P., Pawlak, R., Correa, A., Bell-Pedersen, D., and Ebbole, D.J. (2002). The *Neurospora crassa* pheromone precursor genes are regulated by the mating type locus and the circadian clock. Molecular microbiology *45*, 795-804.

Böhm, J., Dahlmann, T.A., Gümüşer, H., and Kück, U. (2015). A *MAT1-2* wild-type strain from *Penicillium chrysogenum :* functional mating-type locus characterization, genome sequencing and mating with an industrial penicillin-producing strain. Molecular microbiology *95*, 859-874.

Böhm, J., Hoff, B., O'Gorman, C.M., Wolfers, S., Klix, V., Binger, D., Zadra, I., Kürnsteiner, H., Pöggeler, S., and Dyer, P.S., et al. (2013). Sexual reproduction and mating-type-mediated strain development in the penicillin-producing fungus *Penicillium chrysogenum*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *110*, 1476-1481.

BP (2015). BP Statistical Review of World Energy.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry *72*, 248-254.

Buchert, J., Oksanen, T., Pere, J., Siika-Aho, M., Suurnäkki, A., and Viikari, L. (1998). Applications of *Trichoderma reesei* enzymes in the pulp and paper industry. In *Trichoderma* and *Gliocladium*, C.P. Kubicek, G.E. Harman and K.L. Ondik, eds. (London, Bristol, PA: Taylor & Francis), pp. 343–363.

Campos Muñiz, C., Cuadra Zelaya, T.E., Rodríguez Esquivel, G., and Fernández, F.J. (2007). Penicillin and cephalosporin production: A historical perspective. Revista Latinoamericana de Microbiologie *49*, 88-98.

Carter, G.L., Allison, D., Rey, M.W., and Dunn-Coleman, N.S. (1992). Chromosomal and genetic analysis of the electrophoretic karyotype of *Trichoderma reesei*: mapping of the cellulase and xylanase genes. Molecular microbiology *6*, 2167-2174.

Castellanos, F., Schmoll, M., Martínez, P., Tisch, D., Kubicek, C.P., Herrera-Estrella, A., and Esquivel-Naranjo, E.U. (2010). Crucial factors of the light perception machinery and their impact on growth and cellulase gene transcription in *Trichoderma reesei*. Fungal genetics and biology : FG & B *47*, 468-476.

Chan Ho Tong, L., Silar, P., and Lalucque, H. (2014). Genetic control of anastomosis in *Podospora anserina*. Fungal genetics and biology : FG & B *70*, 94-103.

Charlesworth, D., and Charlesworth, B. Inbreeding Depression and its Evolutionary Consequences.

Charnock, S.J., and McCleary, B.V. (2005). Les enzymes : applications inustrielles. Revue des oenologues.

Chauve, M., Mathis, H., Huc, D., Casanave, D., Monot, F., and Lopes Ferreira, N. (2010). Comparative kinetic analysis of two fungal beta-glucosidases. Biotechnology for biofuels *3*, 3.

Chen, C., Kuo, H., Tung, S., Hsu, P.W., Wang, C., Seibel, C., Schmoll, M., Chen, R., and Wang, T. (2012). Blue light acts as a double-edged sword in regulating sexual development of *Hypocrea jecorina (Trichoderma reesei)*. PloS one *7*, e44969.

Cherry, J.R., and Fidantsef, A.L. (2003). Directed evolution of industrial enzymes: an update. Current opinion in biotechnology *14*, 438-443.

Chinnici, J.L., Fu, C., Caccamise, L.M., Arnold, J.W., and Free, S.J. (2014). *Neurospora crassa* female development requires the PACC and other signal transduction pathways, transcription factors, chromatin remodeling, cell-to-cell fusion, and autophagy. PloS one *9*, e110603.

Chuang, Y., Li, W., Chen, C., Hsu, P.W., Tung, S., Kuo, H., Schmoll, M., and Wang, T. (2015). *Trichoderma reesei* meiosis generates segmentally aneuploid progeny with higher xylanase-producing capability. Biotechnology for biofuels *8*, 30.

Coppin, E., Arnaise, S., Contamine, V., and Picard, M. (1993). Deletion of the mating-type sequences in *Podospora anserina* abolishes mating without affecting vegetative functions and sexual differentiation. Molecular genetics and genomics : MGG *241*.

Coppin, E., Berteaux-Lecellier, V., Bidard, F., Brun, S., Ruprich-Robert, G., Espagne, E., Aït-Benkhali, J., Goarin, A., Nesseir, A., and Planamente, S., et al. (2012). Systematic deletion of

homeobox genes in *Podospora anserina* uncovers their roles in shaping the fruiting body. PloS one *7*, e37488.

Coppin, E., Debuchy, R., Arnaise, S., and Picard, M. (1997). Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. Microbiology and molecular biology reviews *61*.

Coppin, E., Renty, C. de, and Debuchy, R. (2005). The function of the coding sequences for the putative pheromone precursors in *Podospora anserina* is restricted to fertilization. Eukaryotic cell *4*, 407-420.

Dales, R., and Croft, J. (1977). Protoplast fusion and isolation of heterokaryons and diploids from vegetatively incompatible strains of *Aspergillus nidulans*. FEMS microbiology letters *1*, 201-203.

de Groot, M J, Bundock, P., Hooykaas, P.J., and Beijersbergen, A.G. (1998). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. Nature biotechnology *16*, 839-842.

Debuchy, R., Berteaux-Lecellier, V., and Silar, P. (2010a). Mating Systems and Sexual Morphogenesis in Ascomycetes. In Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi, K.A. Borkovich and D.J. Ebbole, eds. (American Society of Microbiology), pp. 501–535.

Debuchy, R., Berteaux-Lecellier, V., and Silar, P. (2010b). Mating Systems and Sexual Morphogenesis in Ascomycetes. In Cellular and molecular biology of filamentous fungi, K.A. Borkovich and D.J. Ebbole, eds. (Washington, DC: ASM Press).

Debuchy, R., and Turgeon, B.G. (2006). Mating-Type Structure, Evolution, and Function in Euascomycetes. In Growth, Differentiation and Sexuality, U. Kües and R. Fischer, eds. (Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag), pp. 293–323.

Dembilio, O., Quesada-Moraga, E., Santiago-Alvarez, C., and Jacas, J.A. (2010). Potential of an indigenous strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as a biological control agent against the Red Palm Weevil, Rhynchophorus ferrugineus. Journal of invertebrate pathology *104*, 214-221.

Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science (New York, N.Y.) *346*, 1258096.

Druzhinina, I.S., Kopchinskiy, A.G., and Kubicek, C.P. (2006). The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. Mycoscience *47*, 55-64.

Druzhinina, I.S., Kopchinskiy, A.G., Kubicek, E.M., and Kubicek, C.P. (2016). A complete annotation of the chromosomes of the cellulase producer *Trichoderma reesei* provides insights in gene clusters, their expression and reveals genes required for fitness. Biotechnology for biofuels *9*, 75.

Druzhinina, I.S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B.A., Kenerley, C.M., Monte, E., Mukherjee, P.K., Zeilinger, S., Grigoriev, I.V., and Kubicek, C.P. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. Nature reviews. Microbiology *9*, 749-759.

Durand, N., Reymond, P., and Fevre, M. (1992). Transmission and modification of transformation markers during an induced parasexual cycle in *Penicillium roqueforti*. Curr Genet *21*, 377-383.

Dyer, P., Inderbitzin, P., and Debuchy, R. (2016). Mating-Type Structure, Function, Regulation and Evolution in the Pezizomycotina. In Growth, Differentiation and Sexuality, J. Wendland, ed. (Cham: Springer International Publishing; Springer e-books; Imprint: Springer), pp. 351–385.

Dyer, P.S., and Kück, U. (2017). Sex and the Imperfect Fungi. Microbiology spectrum *5*.

Dyer, P.S., and O'Gorman, C.M. (2012). Sexual development and cryptic sexuality in fungi: insights from *Aspergillus* species. FEMS microbiology reviews *36*, 165-192.

El-Khoury, R., Sellem, C.H., Coppin, E., Boivin, A., Maas, M., Debuchy, R., and Sainsard-Chanet, A. (2008). Gene deletion and allelic replacement in the filamentous fungus *Podospora anserina*. Current genetics *53*, 249-258.

Esser, K. (1977). Concerted breeding in fungi and its biotechnological application. Endeavour *1*, 143-148.

Etienne Jourdier. Modélisation et optimisation de la production de cellulases par *Trichoderma resei* pour les bioraffineries lignocellulosiques.

Ferreira, A.V., An, Z., Metzenberg, R.L., and Glass, N.L. (1998). Characterization of mat A-2, mat A-3 and deltamatA mating-type mutants of *Neurospora crassa*. Genetics *148*, 1069-1079.

Froment, G.F., Bischoff, K.B., and De Wilde, J. (2004). Chemical Reactor Analysis and Design. In Islands in the clickstream. Reflections on life in a virtual world, R. Thieme and A. Briney, eds. (Rockland, MA: Syngress Publ), p. 337.

Fuller, K.K., Loros, J.J., and Dunlap, J.C. (2015). Fungal photobiology: visible light as a signal for stress, space and time. Current genetics *61*, 275-288.

Gams, W., and Bissett, J. (1998). Morphology and identification of *Trichoderma*. In *Trichoderma* and *Gliocladium*, C.P. Kubicek, G.E. Harman and K.L. Ondik, eds. (London, Bristol, PA: Taylor & Francis), pp. 3–34.

Garrison, E., and Marth, G. (2012). Haplotype-based variant detection from short-read sequencing.

Ghose, T.K. (1987). Measurement of cellulase activities. Pure and Applied Chemistry *59*.

Giec (2014). Changements climatiques 2014 : rapport de synthèse.

Giraud, T., Yockteng, R., López-Villavicencio, M., Refrégier, G., and Hood, M.E. (2008). Mating system of the anther smut fungus *Microbotryum violaceum*: selfing under heterothallism. Eukaryotic cell *7*, 765-775.

Goarin, A. (2011). Etude de la variabilité phénotypique chez une souche industrielle de Penicillium roqueforti.

Goupy, J., and Creighton, L. (2013). Introduction aux plans d'expériences. Toutes les techniques nécessaires à la conduite d'une étude (Paris, France: Dunod).

Grognet, P., Bidard, F., Kuchly, C., Tong, Laetitia Chan Ho, Coppin, E., Benkhali, J.A., Couloux, A., Wincker, P., Debuchy, R., and Silar, P. (2014). Maintaining two mating types: structure of the mating type locus and its role in heterokaryosis in Podospora anserina. Genetics *197*, 421-432.

Grognet, P., and Silar, P. (2015). Maintaining heterokaryosis in pseudo-homothallic fungi. Communicative & integrative biology *8*, e994382.

Gryganskyi, A.P., Lee, S.C., Litvintseva, A.P., Smith, M.E., Bonito, G., Porter, T.M., Anishchenko, I.M., Heitman, J., and Vilgalys, R. (2010). Structure, function, and phylogeny of the mating locus in the *Rhizopus oryzae* complex. PloS one *5*, e15273.

Guangtao, Z., Hartl, L., Schuster, A., Polak, S., Schmoll, M., Wang, T., Seidl, V., and Seiboth, B. (2009). Gene targeting in a nonhomologous end joining deficient *Hypocrea jecorina*. Journal of biotechnology *139*, 146-151.

Gusakov, A.V. (2011). Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. Trends in biotechnology *29*, 419-425.

Häkkinen, M., Arvas, M., Oja, M., Aro, N., Penttilä, M., Saloheimo, M., and Pakula, T.M. (2012). Re-annotation of the CAZy genes of *Trichoderma reesei* and transcription in the presence of lignocellulosic substrates. Microbial cell factories *11*, 134.

Han, K.-H., Lee, D.-B., Kim, J.-H., Kim, M.-S., Kyu-Yong, H., Won-Shin, K., Young-Soon, P., Heui-Baik, K., and Dong-Min, H. (2003). Environmental factors affecting development of *Aspergillus nidulans*. The Journal of Microbiology, 34-40.

Hanlin, R.T. (1965). Morphology of *Hypocrea schweinitzii*. American Journal of Botany *52*, 570-579.

Hannon, Gimpel et al. 2010 - Biofuels from algae.

Hartl, L., and Seiboth, B. (2005). Sequential gene deletions in Hypocrea jecorina using a single blaster cassette. Current genetics *48*, 204-211.

Heitman, J., Sun, S., and James, T.Y. (2013). Evolution of fungal sexual reproduction. Mycologia *105*, 1-27.

Herpoël-Gimbert, I., Margeot, A., Dolla, A., Jan, G., Mollé, D., Lignon, S., Mathis, H., Sigoillot, J., Monot, F., and Asther, M. (2008). Comparative secretome analyses of two *Trichoderma reesei* RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains. Biotechnology for biofuels *1*, 18.

Hoff, B., Pöggeler, S., and Kück, U. (2008). Eighty years after its discovery, Fleming's *Penicillium* strain discloses the secret of its sex. Eukaryotic cell *7*, 465-470.

Holmström, K., and Jensen, H.J. (2004). Who runs fastest in an adaptive landscape: sexual versus asexual reproduction. Physica A: Statistical Mechanics and its Applications *337*, 185-195.

Horn, B.W., Moore, G.G., and Carbone, I. (2009). Sexual reproduction in *Aspergillus flavus*. Mycologia *101*, 423-429.

Horn, B.W., Olarte, R.A., Peterson, S.W., and Carbone, I. (2013). Sexual reproduction in *Aspergillus tubingensis* from section *Nigri*. Mycologia *105*, 1153-1163.

Idnurm, A., Hood, M.E., Johannesson, H., and Giraud, T. (2015). Contrasted patterns in mating-type chromosomes in fungi: hotspots versus coldspots of recombination. Fungal Biology Reviews *29*, 220-229.

Ilmen, M., Thrane, C., and Penttila, M. (1996). The glucose repressor gene cre1 of *Trichoderma*: isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form. Molecular & general genetics *251*, 451-460.

Ingvarsson, P.K. (2001). Restoration of genetic variation lost – the genetic rescue hypothesis. Trends in ecology & evolution *16*.

International Energy Agency (2014). World Energy Outlook.

Ivanova, C., Ramoni, J., Aouam, T., Frischmann, A., Seiboth, B., Baker, S.E., Le Crom, S., Lemoine, S., Margeot, A., and Bidard, F. (2017). Genome sequencing and transcriptome analysis of *Trichoderma reesei* QM9978 strain reveals a distal chromosome translocation to be responsible for loss of vib1 expression and loss of cellulase induction. Biotechnol Biofuels *10*, 962.

Jacobson, D.J. (1995). Sexual Dysfunction Associated with Outcrossing in *Neurospora tetrasperma*, a Pseudohomothallic Ascomycete. Mycologia *87*, 604.

Jamet-Vierny, C., Debuchy, R., Prigent, M., and Silar, P. (2007). IDC1, a pezizomycotina-specific gene that belongs to the PaMpk1 MAP kinase transduction cascade of the filamentous fungus *Podospora anserina*. Fungal genetics and biology : FG & B *44*, 1219-1230.

Jonkers, W., Fischer, M.S., Do, H.P., Starr, T.L., and Glass, N.L. (2016). Chemotropism and Cell Fusion in *Neurospora crassa* Relies on the Formation of Distinct Protein Complexes by HAM-5 and a Novel Protein HAM-14. Genetics *203*, 319-334.

Jonkers, W., Leeder, A.C., Ansong, C., Wang, Y., Yang, F., Starr, T.L., Camp, D.G.2., Smith, R.D., and Glass, N.L. (2014). HAM-5 functions as a MAP kinase scaffold during cell fusion in *Neurospora crassa*. PLoS genetics *10*, e1004783.

Jourdier, E., Baudry, L., Poggi-Parodi, D., Vicq, Y., Koszul, R., Margeot, A., Marbouty, M., and Bidard, F. (2017). Proximity ligation scaffolding and comparison of two *Trichoderma reesei* strains genomes. Biotechnol Biofuels *10*, 106.

Jourdier, E., Poughon, L., Larroche, C., Monot, F., and Ben Chaabane, F. (2012). A new stoichiometric miniaturization strategy for screening of industrial microbial strains: application to cellulase hyper-producing Trichoderma reesei strains. Microbial cell factories *11*, 70.

Karimi Aghcheh, R., Németh, Z., Atanasova, L., Fekete, E., Paholcsek, M., Sándor, E., Aquino, B., Druzhinina, I.S., Karaffa, L., and Kubicek, C.P. (2014). The VELVET A orthologue VEL1 of *Trichoderma reesei* regulates fungal development and is essential for cellulase gene expression. PloS one *9*, e112799.

Kawamori, M., Morikawa, Y., Shinsha,, Y., Takayama, K., and Takasawa, S. (1985). Preparation of Mutants Resistant to Catabolite Repression of Trichoderma reesei. Agricultural and Biological Chemistry *49*.

Kawamori, M., Morikawa, Y., and Takasawa, S. (1986). Applied and Microbiology Biotechnology Induction and production of cellulases by L-sorbose in Trichoderma reesei. Applied microbiology and biotechnology *24*, 449-453.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., and Duran, C., et al. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics (Oxford, England) *28*, 1647-1649.

Keller, L., and Waller, D. (2002). Inbreeding effects in wild populations. Trends in ecology & evolution *17*, 230-241.

Kim, H., Wright, S.J., Park, G., Ouyang, S., Krystofova, S., and Borkovich, K.A. (2012). Roles for Receptors, Pheromones, G Proteins, and Mating Type Genes During Sexual Reproduction in *Neurospora crassa*. Genetics *190*, 1389-1404.

Klein-Marcuschamer, D., Oleskowicz-Popiel, P., Simmons, B.A., and Blanch, H.W. (2012). The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. Biotechnology and bioengineering *109*, 1083-1087.

Koike, H., Aerts, A., LaButti, K., Grigoriev, I.V., and Baker, S.E. (2013). Comparative Genomics Analysis of *Trichoderma reesei* Strains. Industrial Biotechnology *9*, 352-367.

Krappmann, S. (2007). Gene targeting in filamentous fungi. The benefits of impaired repair. Fungal Biology Reviews *21*, 25-29.

Kredics, L., Antal, Z., Dóczi, I., Manczinger, L., Kevei, F., and Nagy, E. (2003). Clinical importance of the genus *Trichoderma*. A review. Acta microbiologica et immunologica Hungarica *50*, 105-117.

Kretschmer, M., Leroch, M., Mosbach, A., Walker, A.-S., Fillinger, S., Mernke, D., Schoonbeek, H.-J., Pradier, J.-M., Leroux, P., and Waard, M.A. de, et al. (2009). Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. PLoS pathogens *5*, e1000696.

Krogh, B.O., and Symington, L.S. (2004). Recombination proteins in yeast. Annual review of genetics *38*, 233-271.

Kubicek, C., Linke, R., Seiboth, B., Haarmann, T. and Lorenz, P. (2014). Genes/Genetic Elements Associated With Mating Impariment In *Trichoderma Reesei* QM6a And Its Derivatives And Process For Their Identification.

Kubicek, C., and Penttila, M. (1998). Regulation of Production of Plant Polysaccharide Degrading Enzymes by *Trichoderma*. In *Trichoderma* and *Gliocladium*, C.P. Kubicek, G.E. Harman and K.L. Ondik, eds. (London, Bristol, PA: Taylor & Francis), pp. 49–72.

Kubicek, C.P. (2013). Systems biological approaches towards understanding cellulase production by *Trichoderma reesei*. Journal of biotechnology *163*, 133-142.

Kubicek, C.P., Mikus, M., Schuster, A., Schmoll, M., and Seiboth, B. (2009). Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. Biotechnology for biofuels *2*, 19.

Kück, U., and Böhm, J. (2013). Mating type genes and cryptic sexuality as tools for genetically manipulating industrial molds. Applied microbiology and biotechnology *97*, 9609-9620.

Kück, U., and Pöggeler, S. (2009). Cryptic sex in fungi. Fungal Biology Reviews *23*, 86-90.

Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G.J., Kovacs, W., Meyer, W., Petrini, O., Gams, W., Börner, T., and Kubicek, C.P. (1996). Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *93*, 7755-7760.

Kumar, R., Singh, S., and Singh, O.V. (2008). Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. Journal of industrial microbiology & biotechnology *35*, 377-391.

Kunkel, T.A. (2004). DNA replication fidelity. The Journal of biological chemistry *279*, 16895-16898.

Le Crom, S., Schackwitz, W., Pennacchio, L., Magnuson, J.K., Culley, D.E., Collett, J.R., Martin, J., Druzhinina, I.S., Mathis, H., and Monot, F., et al. (2009). Tracking the roots of cellulase

hyperproduction by the fungus *Trichoderma reesei* using massively parallel DNA sequencing. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 16151-16156.

Lehtonen, J., Jennions, M.D., and Kokko, H. (2012). The many costs of sex. Trends in ecology & evolution *27*, 172-178.

Leslie, J.F., and Klein, K.K. (1996). Female Fertility and Mating Type Effects on Effective Population Size and Evolution in Filamentous Fungi. Genetics *144*, 557-567.

Li, W.-C., Huang, C.-H., Chen, C.-L., Chuang, Y.-C., Tung, S.-Y., and Wang, T.-F. (2017). *Trichoderma reesei* Complete Genome Sequence, Repeat-Induced Point Mutation And Partitioning Of CAZyme Gene Clusters. Biotechnol Biofuels *10*.

Lichius, A., Bidard, F., Buchholz, F., Le Crom, S., Martin, J., Schackwitz, W., Austerlitz, T., Grigoriev, I.V., Baker, S.E., and Margeot, A., et al. (2015). Genome sequencing of the *Trichoderma reesei* QM9136 mutant identifies a truncation of the transcriptional regulator XYR1 as the cause for its cellulase-negative phenotype. BMC genomics *16*, 326.

Lieckfeldt, E., Kullnig, C., Samuels, G.J., and Kubicek, C.P. (2000). Sexually Competent, Sucrose- and Nitrate-Assimilating Strains of *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) from South American Soils. Mycologia *92*, 374.

Linke, R., Thallinger, G.G., Haarmann, T., Eidner, J., Schreiter, M., Lorenz, P., Seiboth, B., and Kubicek, C.P. (2015). Restoration of female fertility in *Trichoderma reesei* QM6a provides the basis for inbreeding in this industrial cellulase producing fungus. Biotechnology for biofuels *8*, 155.

Liu, R., Chen, L., Jiang, Y., Zhou, Z., and Zou, G. (2015). Efficient genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* using the CRISPR/Cas9 system. Cell Discov. *1*, 15007.

Lynd, L.R., van Zyl, W.H., McBride, J.E., and Laser, M. (2005). Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. Current opinion in biotechnology *16*, 577-583.

Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., and Pretorius, I.S. (2002). Microbial Cellulose Utilization. Fundamentals and Biotechnology. Microbiology and molecular biology reviews *66*, 506-577.

Mach, R.L., Seiboth, B., Myasnikov, A., Gonzalez, R., Strauss, J., Harkki, A.M., and Kubicek, C.P. (1995). The *bgl1* gene of *Trichoderma reesei* QM 9414 encodes an extracellular, cellulose-inducible beta-glucosidase involved in cellulase induction by sophorose. Molecular microbiology *16*, 687-697.

Mahmood, Z.A., Ahmed, S.W., Azhar, I., Sualeh, M., Baig, M.T., and Zoha, S. (2010). Bioactive alkaloids produced by fungi. I. Updates on alkaloids from the species of the genera Boletus, Fusarium and psilocybe. Pakistan journal of pharmaceutical sciences *23*, 349-357.

Mandels, M. (1975). Microbial sources of cellulase. Biotechnology and bioengineering symposium, 81-105.

Mandels, M., and Reese, E.T. (1957). Induction Of Cellulase In *Trichoderma Viride* As Influenced By Carbon Sources And Metals. Journal of bacteriology *73*.

Mandels, M., Weber, J., and Parizek, R. (1971). Enhanced cellulase production by a mutant of Trichoderma viride. Applied microbiology *21*.

Mantyla, A.L., Rossi, K.H., Vanhanen, S.A., Penttila, M.E., Suominen, P.L., and Nevalainen, K.M. (1992). Electrophoretic karyotyping of wild-type and mutant *Trichoderma longibrachiatum (reesei)* strains. Current genetics *21*, 471-477.

Manzoni, M., and Rollini, M. (2002). Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. Applied microbiology and biotechnology *58*, 555-564.

Margeot, A., Hahn-Hagerdal, B., Edlund, M., Slade, R., and Monot, F. (2009). New improvements for lignocellulosic ethanol. Current opinion in biotechnology *20*, 372-380.

Marie-Nelly, H., Marbouty, M., Cournac, A., Flot, J., Liti, G., Parodi, D.P., Syan, S., Guillén, N., Margeot, A., and Zimmer, C., et al. (2014). High-quality genome (re)assembly using chromosomal contact data. Nature communications *5*, 5695.

Markov, A.V., Gusakov, A.V., Kondratyeva, E.G., Okunev, O.N., Bekkarevich, A.O., and Sinitsyn, A.P. (2005). New Effective Method for Analysis of the Component Composition of Enzyme Complexes from Trichoderma reesei. Biochemistry (Moscow) *70*, 657-663.

Martinez, D., Berka, R.M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Arvas, M., Baker, S.E., Chapman, J., Chertkov, O., Coutinho, P.M., and Cullen, D., et al. (2008). Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). Nature biotechnology *26*, 553-560.

Marullo, P., Bely, M., Masneuf-Pomarede, I., Pons, M., Aigle, M., and Dubourdieu, D. (2006). Breeding strategies for combining fermentative qualities and reducing off-flavor production in a wine yeast model. FEMS yeast research *6*, 268-279.

Marullo, P., Mansour, C., Dufour, M., Albertin, W., Sicard, D., Bely, M., and Dubourdieu, D. (2009). Genetic improvement of thermo-tolerance in wine *Saccharomyces cerevisiae* strains by a backcross approach. FEMS yeast research *9*, 1148-1160.

Masloff, S., Pöggeler, S., and Kück, U. (1999). The pro1(+) gene from *Sordaria macrospora* encodes a C6 zinc finger transcription factor required for fruiting body development. Genetics *152*, 191-199.

Mc Alpin, C.E., and Wicklow, D.T. (2005). Culture media and sources of nitrogen promoting the formation of stromata and ascocarps in *Petromyces alliaceus* (*Aspergillus* section *Flavi*). Canadian journal of microbiology *51*.

McAlpin, C.E. (2004). Synnema and sclerotium production in *Aspergillus caelatus* and the influence of substrate composition on their development in selected strains. Mycologia *96*, 937-947.

Merlini, L., Dudin, O., and Martin, S.G. (2013). Mate and fuse: how yeast cells do it. Open biology *3*, 130008.

Michelmore, R.W., Paran, I., and Kesseli, R.V. (1991). Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *88*, 9828-9832.

Montenecourt, B.S., and Eveleigh, D.E. (1977). Preparation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. Applied and environmental microbiology *34*.

Montenecourt, B.S., and Eveleigh, D.E. (1979). Selective Screening Methods for the Isolation of High Yielding Cellulase Mutants of *Trichoderma reesei*. In Hydrolysis of Cellulose: Mechanisms of Enzymatic and Acid Catalysis, R.D. Brown and L. Jurasek, eds. (WASHINGTON, D. C.: AMERICAN CHEMICAL SOCIETY), pp. 289–301.

Moore-Landecker, E. (1992). Physiology and biochemistry of ascocarp induction and development. Mycological Research *96*, 705-716.

National Renewable Energy Laboratory (1999). Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Prehydrolysis and Enzymatic Hydrolysis Current and Futuristic Scenarios.

Nevalainen, H., and Te'o, V. (2004). Application of Genetic Engineering for Strain Improvement in Filamentous Fungi. In Handbook of fungal biotechnology, D.K. Arora, P.D. Bridge and D. Bhatnagar, eds. (New York: Marcel Dekker), pp. 193–208.

Nielsen, J. (2013). Production of biopharmaceutical proteins by yeast: advances through metabolic engineering. Bioengineered *4*, 207-211.

Nieuwenhuis, B.P.S., Debets, A.J.M., and Aanen, D.K. (2011). Sexual selection in mushroom-forming basidiomycetes. Proceedings. Biological sciences *278*, 152-157.

Ninomiya, Y., Suzuki, K., Ishii, C., and Inoue, H. (2004). Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *101*, 12248-12253.

Niu, J., Arentshorst, M., Nair, P.D.S., Dai, Z., Baker, S.E., Frisvad, J.C., Nielsen, K.F., Punt, P.J., and Ram, A. (2015). Identification of a Classical Mutant in the Industrial Host *Aspergillus niger* by Systems Genetics: LaeA Is Required for Citric Acid Production and Regulates the Formation of Some Secondary Metabolites. G3 (Bethesda, Md.) *6*, 193-204.

Nødvig, C.S., Nielsen, J.B., Kogle, M.E., and Mortensen, U.H. (2015). A CRISPR-Cas9 System for Genetic Engineering of Filamentous Fungi. PloS one *10*, e0133085.

Nowrousian, M., Teichert, I., Masloff, S., and Kück, U. (2012). Whole-Genome Sequencing of *Sordaria macrospora* Mutants Identifies Developmental Genes. G3 (Bethesda, Md.) *2*, 261-270.

Olarte, R., Horn, B., Dorner, J., Monacell, J., Singh, R., Stone, E., and Carbone, I. (2012). Effect of sexual recombination on population diversity in aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and evidence for cryptic heterokaryosis. Molecular ecology *21*, 1453-1476.

Paloheimo, M., Haarmann, T., Mäkinen, S., and Vehmaanperä, J. (2016). Production of Industrial Enzymes in *Trichoderma reesei*. In Gene expression systems in fungi. Advancements and applications, M. Schmoll and C. Dattenböck, eds. (New York NY: Springer Science+Business Media), pp. 23–57.

Parodi, D.P. (2014). Une approche de biologie systémique pour développer des souches industrielles performantes de *Trichoderma reesei*.

Paster, N., and Chet, I. (1980). Effects of environmental factors on growth and sclerotium formation in *Aspergillus ochraceus*. Can. J. Bot. *58*, 1844-1850.

Pe'er, S., and Chet, I. (1990). *Trichoderma* protoplast fusion. A tool for improving biocontrol agents. Can. J. Microbiol. *36*, 6-9.

Peraza-Reyes, L., and Berteaux-Lecellier, V. (2013). Peroxisomes and sexual development in fungi. Front. Physiol. *4*.

Peraza-Reyes, L., and Malagnac, F. (2016). Sexual Development in Fungi. In Growth, Differentiation and Sexuality, J. Wendland, ed. (Cham: Springer International Publishing; Springer e-books; Imprint: Springer), pp. 407–455.

Percival Zhang, Y.-H., Himmel, M.E., and Mielenz, J.R. (2006). Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. Biotechnology Advances *24*, 452-481.

Persoon, C.H. (1794). Disposita methodica fungorum. Römer's Neues Mag Bot., 81-128.

Peterson, R., and Nevalainen, H. (2012). *Trichoderma reesei* RUT-C30--thirty years of strain improvement. Microbiology *158*, 58-68.

Poggeler, Masloff, Jacobsen, and Kuck (2000). Karyotype polymorphism correlates with intraspecific infertility in the homothallic ascomycete *Sordaria macrospora*. J Evolution Biol *13*, 281-289.

Pöggeler, S., Nowrousian, M., and Kück, U. (2006). Fruiting-Body Development in Ascomycetes. In Growth, Differentiation and Sexuality, U. Kües and R. Fischer, eds. (Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag), pp. 1–4.

Poggi-Parodi, D., Bidard, F., Pirayre, A., Portnoy, T., Blugeon, C., Seiboth, B., Kubicek, C.P., Le Crom, S., and Margeot, A. (2014). Kinetic transcriptome analysis reveals an essentially intact induction system in a cellulase hyper-producer *Trichoderma reesei* strain. Biotechnology for biofuels *7*, 173.

Pomraning, K.R., Smith, K.M., and Freitag, M. (2011). Bulk segregant analysis followed by high-throughput sequencing reveals the *Neurospora* cell cycle gene, *ndc-1*, to be allelic with the gene for ornithine decarboxylase, *spe-1*. Eukaryotic cell *10*, 724-733.

Pontecorvo, G. (1956). The Parasexual Cycle in Fungi. Annual review of microbiology *10*.

Portnoy, T., Margeot, A., Seidl-Seiboth, V., Le Crom, S., Ben Chaabane, F., Linke, R., Seiboth, B., and Kubicek, C.P. (2011). Differential regulation of the cellulase transcription factors XYR1, ACE2, and ACE1 in *Trichoderma reesei* strains producing high and low levels of cellulase. Eukaryotic cell *10*, 262-271.

Pourquie, J., Warzywoda, M., Chevron, F., Thery, D., and Lonchamp, D. (1988). Scale up of cellulase production and utilization. In FEMS Symposium n°43: Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation., J.-P. Aubert, P. Beguin and J. Millet, eds., pp. 71–86.

Rieseberg, L.H., Archer, M.A., and Wayne, R.K. (1999). Transgressive segregation, adaptation and speciation. Heredity *83*, 363-372.

Ropars, J., Dupont, J., Fontanillas, E., Rodríguez de la Vega, R., Malagnac, F., Coton, M., Giraud, T., and López-Villavicencio, M. (2012). Sex in cheese: evidence for sexuality in the fungus *Penicillium roqueforti*. PloS one *7*, e49665.

Ropars, J., Lo, Y.-C., Dumas, E., Snirc, A., Begerow, D., Rollnik, T., Lacoste, S., Dupont, J., Giraud, T., and López-Villavicencio, M. (2016). Fertility depression among cheese-making Penicillium roqueforti strains suggests degeneration during domestication. Evolution; international journal of organic evolution *70*, 2099-2109.

Ruiz-Diez, B. (2002). Strategies for the transformation of filamentous fungi. Journal of Applied Microbiology *92*, 189-195.

Saleh, D., Milazzo, J., Adreit, H., Tharreau, D., and Fournier, E. (2012). Asexual reproduction induces a rapid and permanent loss of sexual reproduction capacity in the rice fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*: results of in vitro experimental evolution assays. BMC evolutionary biology *12*, 42.

Saloheimo, M., Kuja-Panula, J., Ylosmaki, E., Ward, M., and Penttila, M. (2002). Enzymatic Properties and Intracellular Localization of the Novel *Trichoderma reesei* -Glucosidase BGLII (Cel1A). Applied and environmental microbiology *68*, 4546-4553.

Samils, N., Gioti, A., Karlsson, M., Sun, Y., Kasuga, T., Bastiaans, E., Wang, Z., Li, N., Townsend, J.P., and Johannesson, H. (2013). Sex-linked transcriptional divergence in the hermaphrodite fungus Neurospora tetrasperma. Proceedings. Biological sciences *280*, 20130862.

Samuels, G.J., Petrini, O., and Manguin, S. (1994). Morphological and Macromolecular Characterization of *Hypocrea schweinitzii* and Its *Trichoderma* Anamorph. Mycologia *86*, 421.

Saupe, S.J. (2000). Molecular Genetics of Heterokaryon Incompatibility in Filamentous Ascomycetes. Microbiology and molecular biology reviews *64*, 489-502.

Schafmeier, T., and Diernfellner, A.C.R. (2011). Light input and processing in the circadian clock of *Neurospora*. FEBS letters *585*, 1467-1473.

Schmoll, M. and Dattenböck, C. (2016). Gene expression systems in fungi. Advancements and applications (New York NY: Springer Science+Business Media).

Schmoll, M., Seibel, C., Tisch, D., Dorrer, M., and Kubicek, C.P. (2010). A novel class of peptide pheromone precursors in ascomycetous fungi. Molecular microbiology *77*, 1483-1501.

Schmoll, M., Tisch, D., Schuster, A., Freitag, M., POMRANING, K. and Wang, T.F. (2015). Introduction ou inactivation de la fertilité femelle dans des cellules fongiques filamenteuses (Google Patents). http://www.google.com/patents/WO2015086701A1?cl=fr.

Schneeberger, K. (2014). Using next-generation sequencing to isolate mutant genes from forward genetic screens. Nature reviews. Genetics *15*, 662-676.

Scholte, E., Knols, B., Samson, R.A., and Takken, W. (2004). Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. Journal of Insect Science *4*, 1-24.

Schuster, A., and Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. Applied microbiology and biotechnology *87*, 787-799.

Schuster, M., Schweizer, G., Reissmann, S., and Kahmann, R. (2016). Genome editing in *Ustilago maydis* using the CRISPR-Cas system. Fungal genetics and biology : FG & B *89*, 3-9.

Seibel, C., Tisch, D., Kubicek, C.P., and Schmoll, M. (2012a). ENVOY is a major determinant in regulation of sexual development in *Hypocrea jecorina (Trichoderma reesei)*. Eukaryotic cell *11*, 885-895.

Seibel, C., Tisch, D., Kubicek, C.P., and Schmoll, M. (2012b). The role of pheromone receptors for communication and mating in *Hypocrea jecorina (Trichoderma reesei)*. Fungal genetics and biology : FG & B *49*, 814-824.

Seiboth, B., Ivanova, C., and Seidl-Seiboth, V. (2011). *Trichoderma reesei:* A Fungal Enzyme Producer for Cellulosic Biofuels. In Biofuel Production-Recent Developments and Prospects, Dos Santos Bernardes,Marco Aurelio, ed. (InTech).

Seidl, V., Gamauf, C., Druzhinina, I.S., Seiboth, B., Hartl, L., and Kubicek, C.P. (2008). The *Hypocrea jecorina (Trichoderma reesei)* hypercellulolytic mutant RUT C30 lacks a 85 kb (29 gene-encoding) region of the wild-type genome. BMC genomics *9*, 327.

Seidl, V., Seibel, C., Kubicek, C.P., and Schmoll, M. (2009). Sexual development in the industrial workhorse *Trichoderma reesei*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 13909-13914.

Seidl, V., and Seiboth, B. (2014). *Trichoderma reesei*. Genetic approaches to improving strain efficiency. Biofuels *1*, 343-354.

Shrivastav, M., Haro, L.P. de, and Nickoloff, J.A. (2008). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. Cell research *18*, 134-147.

Silar, P. (2005). Peroxide accumulation and cell death in filamentous fungi induced by contact with a contestant. Mycological Research *109*, 137-149.

Silar, P. (2011). Grafting as a method for studying development in the filamentous fungus *Podospora anserina*. Fungal biology *115*, 793-802.

Silar, P. (2014). Simple Genetic Tools to Study Fruiting Body Development in Fungi. The open mycology journal *8*, 148-155.

Silar, P. (2016). Protistes Eucaryotes : Origine, Evolution et Biologie des Microbes Eucaryotes.

Simbolotti, G. (2007). IEA Energy Technology Essentials : Biofuel Production. International energy Agency.

Šimkovič, M., Olejníková, P., Mat'at'a, M., Žemla, P., Vilimová, V., Farkašová, L., and Varečka, L. (2015). Nutrient transport into germinating *Trichoderma atroviride* conidia and development of its driving force. Microbiology (Reading, England) *161*, 1240-1250.

Smith, B.R. (1973). Storage of ascospores in water. Neurospora newsletter.

Stamets, P. (2005). Mycelium Running: How Mushrooms Can Help Save the World (Ten Speed Press).

Takebayi, N., and Morrell, P. (2001). Is self-fertilization an evolutionary dead end? Revisiting an old hypothesis with genetic theories and a macroevolutionary approach. American Journal of Botany *88*, 1143-1150.

Tanaka, A., Cartwright, G.M., Saikia, S., Kayano, Y., Takemoto, D., Kato, M., Tsuge, T., and Scott, B. (2013). ProA, a transcriptional regulator of fungal fruiting body development, regulates leaf hyphal network development in the *Epichloë festucae-Lolium* perenne symbiosis. Molecular microbiology *90*, 551-568.

Thomson, J.G., and Ow, D.W. (2006). Site-specific recombination systems for the genetic manipulation of eukaryotic genomes. Genesis (New York, N.Y. : 2000) *44*, 465-476.

Tinsson, W. (2010). Plans d'expérience: constructions et analyses statistiques (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg).

Todd, R.B., Davis, M.A., and Hynes, M.J. (2007). Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction. Nature protocols *2*, 811-821.

Tsui, C.K.-M., DiGuistini, S., Wang, Y., Feau, N., Dhillon, B., Bohlmann, J., and Hamelin, R.C. (2013). Unequal recombination and evolution of the mating-type (*MAT*) loci in the pathogenic fungus *Grosmannia clavigera* and relatives. G3 (Bethesda, Md.) *3*, 465-480.

Tulasne, L.R., Geney-Gros, Tulasne, C., and Typographeo, I. (1861). Selecta fungorum carpologia :ea documenta et icones potissimum exhibens (Parisiis: Imperatoris Jussu, In Imperiali Typographeo Excudebatur).

Verma, M., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., and Valéro, J.R. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. Biochemical Engineering Journal *37*, 1-20.

Vincens, F. (1917). Recherche organogéniques sur quelques Hypocréales.

Vitikainen, M., Arvas, M., Pakula, T., Oja, M., Penttilä, M., and Saloheimo, M. (2010). Array comparative genomic hybridization analysis of *Trichoderma reesei* strains with enhanced cellulase production properties. BMC genomics *11*, 441.

Wenger, J.W., Schwartz, K., and Sherlock, G. (2010). Bulk segregant analysis by high-throughput sequencing reveals a novel xylose utilization gene from *Saccharomyces cerevisiae*. PLoS genetics *6*, e1000942.

Wenger, R.M. (1984). Synthesis of cyclosporine. Total syntheses of Cyclosporin A and cyclosporin H, two fungal metabolites isolated from the species *Tolypocladium inflatum* GAMS. Helv. Chim. Acta *67*, 502-525.

Wong Sak Hoi, J., and Dumas, B. (2010). Ste12 and Ste12-like proteins, fungal transcription factors regulating development and pathogenicity. Eukaryotic cell *9*, 480-485.

Wu, B., Oesker, V., Wiese, J., Schmaljohann, R., and Imhoff, J.F. (2014). Two new antibiotic pyridones produced by a marine fungus, *Trichoderma* sp. strain MF106. Marine drugs *12*, 1208-1219.

Xie, N., Ruprich-Robert, G., Chapeland-Leclerc, F., Coppin, E., Lalucque, H., Brun, S., Debuchy, R., and Silar, P. (2017). Inositol-phosphate signaling as mediator for growth and sexual reproduction in *Podospora anserina*. Developmental biology.

Xiong, Y., Sun, J., and Glass, N.L. (2014). VIB1, a link between glucose signaling and carbon catabolite repression, is essential for plant cell wall degradation by *Neurospora crassa*. PLoS genetics *10*, e1004500.

Xu, J., Zhao, G., Kou, Y., Zhang, W., Zhou, Q., Chen, G., and Liu, W. (2014). Intracellular β-glucosidases CEL1a and CEL1b are essential for cellulase induction on lactose in *Trichoderma reesei*. Eukaryotic cell *13*, 1001-1013.

Zeigler, R.S., Scott, R.P., Leung, H., Bordeos, A.A., Kumar, J., and Nelson, R.J. (1997). Evidence of parasexual exchange of DNA in the rice blast fungus challenges its exclusive clonality. Phytopathology *87*, 284-294.

Zeilinger, S. (2004). Gene disruption in *Trichoderma atroviride* via *Agrobacterium*-mediated transformation. Current genetics *45*, 54-60.

Zeilinger, S., and Omann, M. (2007). *Trichoderma* Biocontrol: Signal Transduction Pathways Involved in Host Sensing and Mycoparasitism. Gene Regulation and Systems Biology, 227-234.

Zhang, C., Meng, X., Wei, X., and Lu, L. (2016). Highly efficient CRISPR mutagenesis by microhomology-mediated end joining in *Aspergillus fumigatus*. Fungal genetics and biology : FG & B *86*, 47-57.

6. Annexes

<u>Annexe 1 :</u> Composition des milieux et des solutions

Tous les milieux sont autoclavés 20 minutes à 120 °C sauf mention contraire.

Milieux PDA et PD :

	Pour 1 litre
PDA / PD (Fisher Scientific)	**39 g / 24 g**
H_2O purifiée par osmose inverse	**qsp 1 litre**

Les antibiotiques, le papier Whatman 25 mm (VWR), et les feuilles de cellophanes (Biorad) sont ajoutés après stérilisation. L'addition de 10 g/L de Solka Floc ((International Fiber Corp., North Tonawanda, NY), 10 g/L de cellulose (Sigma), 5 g/L de Yeast Extract (Merck), 5 g/L de Yeast Nitrogen Base without Amino Acid (Sigma) et 5 g/L de Yeast Nitrogen Base with Amino Acid (Sigma), se fait avant stérilisation et le milieu obtenu est stérilité par autoclavage (**20 minutes à 110 °C**).

Milieux LB Agar et LB :

	Pour 1 litre
LB Agar / LB (Fisher Scientific)	**39 g / 24 g**
H_2O purifiée par osmose inverse	**qsp 1 litre**

Les antibiotiques sont ajoutés après stérilisation.

Milieux Oatmeal :

	Pour 1 litre
Oatmeal (Sigma)	**72,5 g**
H_2O purifiée par osmose inverse	**qsp 1 litre**

Milieux Cornmeal :

	Pour 1 litre
Cornmeal (Sigma)	**17 g**
H_2O purifiée par osmose inverse	**qsp 1 litre**

Milieux Agar-H_2O :

	Pour 1 litre
Agar Powder (VWR)	**15 g**
H_2O purifiée par osmose inverse	**qsp 1 litre**

Solution CTS50 :

	Pour 1 litre
Saccharose	**13,7 g**
Tris-HCl (1 M) pH 7,5	**10 mL**
$CaCl_2$ (1 M)	**5 mL**
H_2O purifiée par osmose inverse	**qsp 1 litre**

Le milieu est stérilisé par autoclavage (**20 minutes à 110 °C**).

Éléments traces (1000X) :

	Pour 1 litre
$FeSO_4$	**5 g**
$MnSO_4$	**1,4 g**
$ZnSO_4$	**1,4 g**
$CoCl_2$	**3,7 g**
H_2O purifiée par osmose inverse	**qsp 1 litre**

La solution est stérilisée par **filtration** à l'aide de filtres 0,2 µm.

Milieu F45 Solka – 10 g Lactose :

	Pour 1 litre
KH_2PO_4 (50mM)	**8,7 g**
$(NH_4)_2SO_4$	**4,2 g**
$MgSO_4$, $7H_2O$	
CornSteep	**1,5 g**
Acide maléique (100mM)	**11,6 g**
Lactose	**10 g**
Solka Floc	**10 g**
H_2O (ville)	**qsp 1 litre**

Le pH est ajusté à 6 avec du KOH (2 M) et le milieu est passé à l'UltraTurax plusieurs minutes afin de broyer la Solka Floc. Le milieu est stérilisé par autoclavage (**20 minutes à 110 °C**) puis les éléments traces sont ajoutés.

Milieu Minimum Solide + 0,1 % AZCL-He-Cellulose (Megazyme) :

	Pour 1 litre
KH_2PO_4	**5 g**
$(NH_4)SO_4$	**5 g**
Tris-Sodium Citrate	**11,7 g**
Source de carbone*	**20 g**
H_2O (ville)	**qsp 1 litre**
Agar	**20 g**
0,1% AZCL-He-Cellulose	**100 mg**

Le milieu est stérilisé par autoclavage (**20 minutes à 110 °C**), puis sont ajouté :

	solution stock	**pour 1 litre**
MgSO4	200X (120 g/l)	**5 ml**
CaCl2	200X (120 g/l)	**5 ml**
Éléments Traces	1000X	**1ml**

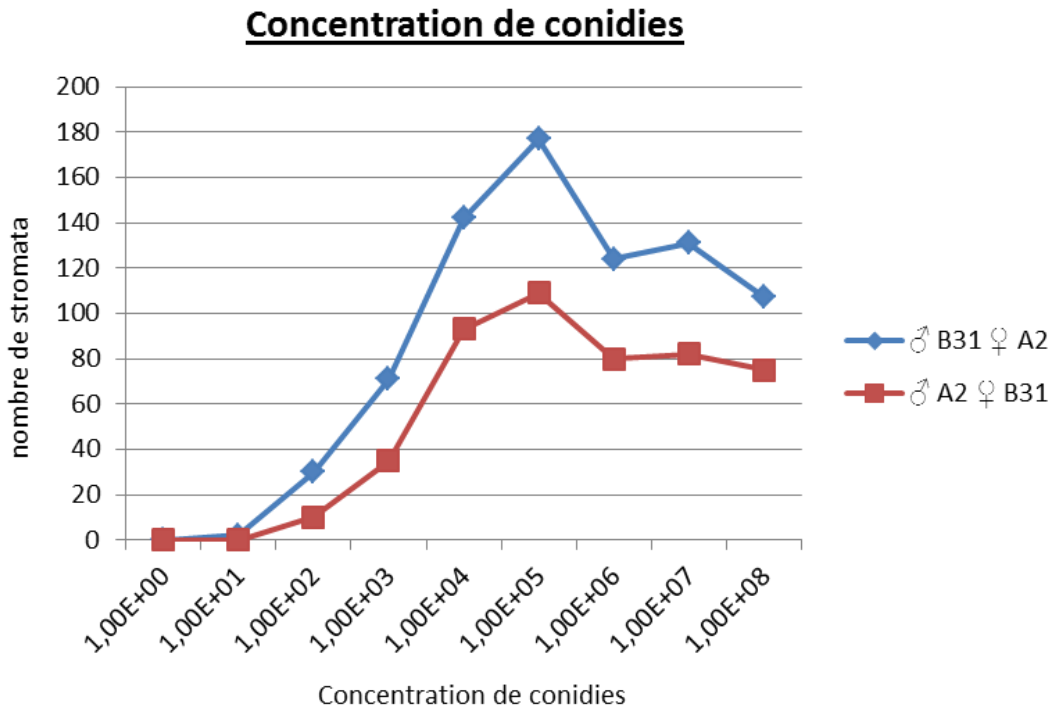
Milieu 4N :

	Pour 1 litre
KOH	**3,32 g**
H_3PO_4	**6 g**
$(NH_4)SO_4$	**5,6 g**
$MgSO_4$, $7H_2O$	**1,2 g**
$CaCl_2$, $2H_2O$	**1,2 g**
H_2O	**Qsp 1L**
H_2SO_4	**Jusqu'à pH 1,8**

Le réacteur contenant le milieu est stérilisé par autoclavage (**20 minutes à 110 °C**), puis sont ajouté 2 mL/L d'oligo-éléments.

Oligo-éléments :	**pour 1 litre**
$FeSO_4$, $7H_2O$	**30 g**
$Co(NO_3)_2$,$6H_2O$	**9 g**
$MnSO_4$,$7H_2O$	**6,4 g**
$ZnSO_4$,$7H_2O$	**8,4 g**
H_3PO_4 85 %	**Jusqu'à pH 1,8**

Annexe 2 : Test préliminaire d'arrosage



Une semaine avant l'arrosage des boîtes des souches A2 (*MAT1-1*) et B31 (*MAT1-2*) sont incubées à la lumière à 30°C pour favoriser la production de conidies. Trois avant l'arrosage les souches femelles A2 (bleu) et B31 (rouge) sont inoculées sur milieu PDA et incubées à l'obscurité à 24 °C.

Les conidies sont récoltées dans de l'eau purifiée par osmose inverse stérile et comptés à l'aide d'une cellule de Malassez. Puis les différentes dilutions de conidies sont arrosées sur les souches femelles A2 ou B31 en fonction de la compatibilité de leur type-sexuel.

Pour chaque arrosage, 3 réplicas ont été fait. La courbe représente la moyenne du nombre de stromata comptés par dilution.

Annexe 3 : Résultats du plan d'expérience

N°	Souche femelle	Durée	Luminosité	Concentration	Nombre
1	A2	3	jour/nuit	4	41
6	B31	3	jour	4	48
33	B31	3	nuit	4	124
37	B31	3	jour/nuit	5	71
9	A2	3	nuit	5	75
5	B31	3	nuit	5	77
29	B31	3	jour/nuit	5	108
3	A2	3	jour	6	60
36	A2	3	jour	6	61
21	B31	3	nuit	6	98
34	A2	3	nuit	7	50
25	A2	3	jour/nuit	7	70
31	B31	3	jour	7	115
4	B31	4	jour/nuit	4	34
18	A2	4	nuit	4	82
28	B31	4	jour	4	27
24	B31	4	jour	5	75
39	A2	4	jour	5	76
8	B31	4	nuit	6	98
16	B31	4	nuit	6	97
23	A2	4	jour/nuit	6	73
26	A2	4	jour/nuit	6	66
11	B31	4	jour/nuit	7	97
13	A2	4	nuit	7	63
15	B31	4	jour	7	94
32	A2	4	jour	7	63
7	A2	5	jour/nuit	4	37
10	A2	5	jour	4	56
20	B31	5	nuit	4	136
27	B31	5	jour/nuit	4	15
22	B31	5	jour	5	76
40	A2	5	nuit	5	117
12	A2	5	jour/nuit	6	99
14	A2	5	jour/nuit	6	87
35	B31	5	jour	6	81
38	A2	5	nuit	6	134
2	B31	5	jour/nuit	7	129
17	A2	5	nuit	7	111
19	A2	5	jour	7	114
30	B31	5	nuit	7	86

<u>Annexe 4 :</u> Listes des différents procédés testés visant à rétablir la reproduction sexuée entre deux souches industrielles QM6a de *T. reesei*

Tous les essais ont été effectués dans des boîtes de Pétri contenant du milieu PDA. C'est le milieu le plus optimal pour la reproduction sexuée de *T. reesei*.

a/ Méthode 1 : fabrication d'un tricaryon

Il s'agit de la même méthode que celle décrite chez *P. anserina* (Jamet-Vierny et al., 2007). Pour obtenir un tricaryon, les souches ont été incubées séparément pendant deux jours maximum à 30 °C pour éviter la formation de conidies et obtenir seulement du mycélium. Après deux jours de croissance, un implant d'agar de 0,5 cm sur 0,5 cm de chacune des souches impliquées (trois pour un tricaryon) a été découpé et placé dans un tube Eppendorf de 2 ml contenant 500 µL d'eau stérile. Les mycéliums ont été mixés à l'aide d'un FastPrep®-24 (MP Biomedicals) pendant 20 secondes à une vitesse de 4 m/s, et 10 µL du broyat ont été déposé sur les boîtes de Pétri. Les boîtes ont été incubées dans une étuve à 24 °C avec une alternance de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité.

L'expérience a été réalisée une première fois en triplicata. Aucun stromata n'a été obtenu. Les boîtes ont été maintenues à l'étuve jusqu'à ce que le milieu soit sec, soit environ 1 mois.

L'obtention d'un tricaryon étant un évènement rare, l'expérience a été répétée et 10 boîtes de Pétri différentes ont été inoculées. Aucun stromata n'a été obtenu.

b/ Méthode 2 : fabrication d'un tricaryon

Cette méthode est identique à la méthode 1 mais diffère par son incubation. Ici les boîtes de Pétri ne sont pas placées dans une étuve où il fait 24°C et où il y a 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité, mais sont laissées sur la paillasse du laboratoire dans lequel la température n'est pas constante (variation journalière) et où il n'y a pas de contrôle de la luminosité (luminosité naturelle). Le mélange des trois souches a été inoculé sur 10 boîtes de Pétri différentes. Aucun stromata n'a été obtenu.

c/ Méthode 3 : confrontation des trois souches

Les trois souches ont été inoculées sur une boîte de Pétri à distance égale les unes des autres et à distance maximale du centre de la boîte de Pétri. La boîte a été incubée à 24 °C avec une alternance jour/nuit (12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité). Aucun stromata n'a été obtenu.

d/ Méthode 4 : mélange des trois souches au centre d'une boîte de Pétri

Les trois souches ont été inoculées isolément sur une feuille de cellophane placée sur une boîte de Pétri. Après 2-3 jours de croissance à l'obscurité, les mycéliums ont été prélevées, broyés à l'aide de

billes dans un Fastprep®, mélangés dans un ratio 1:1:1 puis déposés au centre d'une boîte de Pétri avec différentes concentrations (1, 1/10, 1/100,1/1000). Aucun stromata n'a été obtenu.

e/ Méthode 5 : inoculation isolée des trois souches

Les trois souches ont été inoculées isolément sur une feuille de cellophane placée sur une boîte de Pétri. Après 2-3 jours de croissance à l'obscurité, les mycéliums ont été prélevés, broyés à l'aide de billes dans un Fastprep, puis mélangés dans un ratio 1:1:1. Ce mélange a été inoculé dans un milieu liquide PD (Potatoes Dextose Broth) additionné de 1 % de KH_2PO_3 et incubé (avec ou sans agitation) pour un à deux jours pour être ensuite déposé au centre d'une boîte de Pétri avec différentes concentrations (1, 1/10), avec ou sans addition de 5 mM d'acide ascorbique. Aucun stromata n'a été obtenu.

f/ Méthode 6 : inoculation des trois souches

Les trois souches ont été inoculées ensemble à partir de conidies dans un milieu liquide PD (Potatoes Dextose Broth) additionné de 1 % de KH_2PO_3, et incubé (avec ou sans agitation) pour 1 à 2 jours pour être ensuite déposé au centre d'une boîte de PDA avec différentes concentrations (1, 1/10), avec ou sans addition de 5 mM d'acide ascorbique. Aucun stromata n'a été obtenu.

g/ Méthode 7 : inoculation isolée des trois souches

Les trois souches ont été inoculées isolément sur une feuille de cellophane placée sur une boîte de Pétri. Après 2-3 jours de croissance à l'obscurité, les mycéliums ont été prélevés, broyés à l'aide de billes dans un Fastprep, puis mélangés avec un ratio 1:1:1 (QM6a 1-1 : QM6a 1-2 : *ΔMAT*), ou 1:1 :2 ou 1:1 :5. Le mélange a été (i) soit étalé sur l'intégralité de la boîte, (ii) soit inoculé au centre de la boîte avec différentes dilutions (1, 1/10 et 1/100) sur milieu PDA, avec ou sans addition de 5mM d'acide ascorbique. Les boîtes ont ensuite été incubées à 24 °C, (i) soit en alternance jour/nuit, (ii) soit pour une incubation d'une nuit à l'obscurité puis une alternance jour/nuit, (iii) soit à l'obscurité pour trois jours suivi d'une alternance jour/nuit, (iv) soit à l'obscurité pour 15 jours suivi d'une alternance jour/nuit. Aucun stromata n'a été obtenu.

h/ Méthode 8 : arrosage séquentiel avec ajout d'extraits cellulaires

Des isolats sauvages fertiles de souches de *T. reesei* ont été mis en confrontation sur une feuille de cellophane déposée sur du PDA. Le matériel biologique de ces croisements a été récupéré de T = 0 à T = 96 h après inoculation et est soumis à une extraction de protéines. Les extraits protéiques ont été stérilisés par filtration. Enfin, la méthode de l'arrosage a été appliquée et les différents extraits cellulaires obtenus ont été ajoutés aux conidies. Un premier arrosage avec les conidies *MAT1-1*, puis un deuxième arrosage avec les conidies *MAT1-2* (ou vice-versa) a été effectué. Aucun stromata n'a été obtenu.

i/ Méthode 9 : arrosage séquentiel selon l'invention

Obtention des conidies :

Quatre à six jours avant l'arrosage, des boîtes de Pétri sont ensemencées avec chacune des souches donneuses de conidies (*MAT1-1* puis *MAT1-2*) qui serviront pour l'arrosage de la souche assistante, et incubées à 30 °C à la lumière pour qu'il y ait production de conidies.

Le jour de l'arrosage, on dépose 4 ml d'eau stérile sur la souche donneuse (*MAT1-1* ou *MAT1-2*) et on récolte les conidies. Les conidies sont comptées et leur concentration est ajustée entre 10^6 et 10^8 conidies/ml.

Arrosage :

Dans la technique de l'arrosage, la souche assistante Δ*MAT* a la fonction de souche femelle qui va fournir les tissus maternels nécessaires à la fabrication des stromata. La souche assistante va être successivement arrosée par les conidies *MAT1-1* puis *MAT1-2*.

La souche assistante Δ*MAT* est arrosée uniformément avec 1 ml de conidies du premier type sexuel, puis incubée 7 jours, arrosée avec 1 ml de conidies du deuxième type sexuel et incubée jusqu'à l'obtention de stromata.

La souche assistante Δ*MAT* est mise en culture sur un milieu PDA et incubée à 24 °C pendant 4 jours et à l'obscurité. Après 4 jours d'incubation la souche assistante a été arrosée avec 1 mL de conidies de type-sexuel *MAT1-1* et mise à incuber à 24 °C pendant 7 jours avec une alternance de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité.

Enfin, la souche assistante a été arrosée avec 1 mL de conidies *MAT1-2* et mise à incuber à 24°C avec une alternance de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité jusqu'à apparition des stromata. Cette méthode a permis l'obtention de stromata et est celle présenté à la section **3.2.4**.

<u>Annexe 5 :</u> Résultats des différents croisements de l'étude de fécondation

Croisement	Tube	Milieu	Stromata seul ou vrac	Date de greffe	Date de récolte	Concentration initiale (ct/ml)	Ecart-type	Croissance		
								PDA	PDA-Hygro	PDA-Phleo
A2 (B31)	1	PDA	vrac		07/11/2016	2,00E+06	5,14E+05	+	-	-
	2	PDA	vrac		07/11/2016	2,80E+06		+	-	-
	3	PDA	vrac		07/11/2016	1,84E+06		+	-	-
	4	Agar-H2O	seul	02/11/2016	07/11/2016	7,20E+05	1,35E+05	+	-	-
	5	Agar-H2O	seul	02/11/2016	07/11/2016	6,40E+05		+	-	-
	6	Agar-H2O	seul	02/11/2016	07/11/2016	7,20E+05		+	-	-
	7	Agar-H2O	seul	02/11/2016	07/11/2016	8,80E+05		+	-	-
	8	Agar-H2O	seul	04/11/2016	07/11/2016	4,80E+05		+	-	-
	9	Agar-H2O	seul	04/11/2016	07/11/2016	7,20E+05		+	-	-
	10	Agar-H2O	seul	04/11/2016	07/11/2016	4,80E+05		+	-	-
	11	Agar-H2O	seul	04/11/2016	07/11/2016	7,20E+05		+	-	-
A2 (B31-Hygro)	23	PDA	vrac		07/11/2016	9,60E+05	1,39E+05	+	+	-
	24	PDA	vrac		07/11/2016	7,20E+05		+	+	-
	25	PDA	vrac		07/11/2016	9,60E+05		+	+	-
	26	Agar-H2O	seul	02/11/2016	07/11/2016	4,00E+05	1,08E+05	+	+	-
	27	Agar-H2O	seul	02/11/2016	07/11/2016	4,00E+05		+	+	-
	28	Agar-H2O	seul	02/11/2016	07/11/2016	4,80E+05		+	+	-
	29	Agar-H2O	seul	02/11/2016	07/11/2016	4,80E+05		+	+	-
	30	Agar-H2O	seul	04/11/2016	07/11/2016	5,60E+05		+	-	-
	31	Agar-H2O	seul	04/11/2016	07/11/2016	4,80E+05		+	+	-
	32	Agar-H2O	seul	04/11/2016	07/11/2016	4,00E+05		+	+	-
	33	Agar-H2O	seul	04/11/2016	07/11/2016	7,20E+05		+	+	-
A2 (B31-Phleo)	41	PDA	vrac		28/11/2016	2,08E+06	4,10E+05	+	-	+
	42	PDA	vrac		28/11/2016	2,80E+06		+	-	+
	43	PDA	vrac		28/11/2016	2,16E+06		+	-	+
	44	Agar-H2O	vrac	21/11/2016	28/11/2016	1,84E+06		+	-	+
	45	Agar-H2O	seul	21/11/2016	28/11/2016	3,20E+05	1,38E+05	+	-	+
	46	Agar-H2O	seul	21/11/2016	28/11/2016	5,60E+05		+	-	+
	47	Agar-H2O	seul	21/11/2016	28/11/2016	3,20E+05		+	-	+
	48	Agar-H2O	seul	21/11/2016	28/11/2016	6,40E+05		+	-	+
	49	Agar-H2O	seul	23/11/2016	28/11/2016	3,20E+05		+	-	+
	50	Agar-H2O	seul	23/11/2016	28/11/2016	4,00E+05		+	-	+
	51	Agar-H2O	seul	23/11/2016	28/11/2016	4,80E+05		+	-	+
	52	Agar-H2O	seul	23/11/2016	28/11/2016	2,40E+05		+	-	+

Croisement	Tube	Milieu	Stromata seul ou vrac	Date de greffe	Date de récolte	Concentration initiale (¢/mL)	Ecart-type	Croissance					
								1ère récolte			etalement 16/06/17 Phleo=60µg/ml		
								PDA	PDA-H	PDA-Phleo	PDA	PDA-H	PDA-Phleo
A2 (B31-H+P)	65	PDA	vrac		12/12/2016	2,16E+06	4,62E+04	+	-	+	+	+	+
	66	PDA	vrac		12/12/2016	2,08E+06		+	+	+	+	+	+
	67	PDA	vrac		12/12/2016	2,08E+06		+	+	+	+	+	+
	68	Agar-H2O	vrac	05/12/2016	12/12/2016	2,16E+06		+	+	+	+	+	+
	69	Agar-H2O	seul	05/12/2016	12/12/2016	4,00E+05	2,21E+05	+	-	+	+	+	+
	70	Agar-H2O	seul	05/12/2016	12/12/2016	1,60E+05		+	-	+	+	+	+
	71	Agar-H2O	seul	05/12/2016	12/12/2016	1,60E+05		+	-	+	+	+	+
	72	Agar-H2O	seul	05/12/2016	12/12/2016	2,40E+05		+	-	+	+	+	+
	73	Agar-H2O	seul	07/12/2016	12/12/2016	4,80E+05		+	-	+	+	+	+
	74	Agar-H2O	seul	07/12/2016	12/12/2016	1,00E+05		+	-	+	+	+	+
	75	Agar-H2O	seul	07/12/2016	12/12/2016	5,60E+05		+	-	+	+	+	+
	76	Agar-H2O	seul	07/12/2016	12/12/2016	2,40E+05		+	-	+	+	+	+
	77	Agar-H2O	seul	07/12/2016	12/12/2016	1,60E+05		+	-	+	+	+	+
	78	Agar-H2O	seul	07/12/2016	12/12/2016	1,60E+05		+	-	+	+	-	+
	79	Agar-H2O	seul	07/12/2016	12/12/2016	1,60E+05		+	-	+	+	-	+
	80	Agar-H2O	seul	07/12/2016	12/12/2016	3,20E+05		+	-	+	+	+	+
	81	Agar-H2O	seul	07/12/2016	12/12/2016	1,60E+05		+	-	+	+	-	+
	82	Agar-H2O	seul	07/12/2016	12/12/2016	4,80E+05		+	-	+	+	-	+
	83	Agar-H2O	seul	07/12/2016	12/12/2016	8,80E+05		+	-	+	+	-	+
	84	Agar-H2O	seul	07/12/2016	12/12/2016	5,60E+05		+	-	+	+	-	+
	85	Agar-H2O	seul	07/12/2016	12/12/2016	5,60E+04		+	-	+	+	-	+
	86	Agar-H2O	seul	07/12/2016	12/12/2016	4,00E+05		+	-	+	+	+	+
	87	Agar-H2O	seul	07/12/2016	12/12/2016	3,20E+05		+	-	+	+	+	+
	88	Agar-H2O	seul	07/12/2016	12/12/2016	5,60E+05		+	-	+	+	-	+
	89	Agar-H2O	seul	07/12/2016	12/12/2016	7,20E+05		+	-	+	+	-	+
	90	Agar-H2O	seul	07/12/2016	12/12/2016	6,40E+05		+	-	+	+	-	+
	91	Agar-H2O	seul	07/12/2016	12/12/2016	2,40E+05		+	-	+	+	-	+

Croisement	Tube	Milieu	Stromata seul ou vrac	Date de greffe	Date de récolte	Concentration initiale (¢/mL)	Ecart-type	Croissance		
								PDA	PDA-H	PDA-Phleo
B31 (A2)	12	PDA	vrac		07/11/2016	2,08E+06	8,00E+04	+	-	-
	13	PDA	vrac		07/11/2016	2,00E+06		+	-	-
	14	PDA	vrac		07/11/2016	2,16E+06		+	-	-
	15	Agar-H2O	seul	02/11/2016	07/11/2016	3,20E+05	1,70E+05	+	-	-
	16	Agar-H2O	seul	02/11/2016	07/11/2016	5,60E+05		+	-	-
	17	Agar-H2O	seul	02/11/2016	07/11/2016	8,80E+05		+	-	-
	18	Agar-H2O	seul	02/11/2016	07/11/2016	5,60E+05		+	-	-
	19	Agar-H2O	seul	04/11/2016	07/11/2016	7,20E+05		+	-	-
	20	Agar-H2O	seul	04/11/2016	07/11/2016	6,40E+05		+	-	-
	21	Agar-H2O	seul	04/11/2016	07/11/2016	4,80E+05		+	-	-
	22	Agar-H2O	seul	04/11/2016	07/11/2016	4,80E+05		+	-	-
B31 (A2-Hygro)	92	PDA	vrac		20/01/2017	2,16E+06	7,34E+05	+	+	-
	93	PDA	vrac		20/01/2017	3,04E+06		+	+	-
	94	PDA	vrac		20/01/2017	2,32E+06		+	+	-
	95	Agar-H2O	vrac	12/01/2017	20/01/2017	3,76E+06		+	+	-
	96	Agar-H2O	seul	13/01/2017	20/01/2017	7,20E+05	2,45E+05	+	+	-
	97	Agar-H2O	seul	13/01/2017	20/01/2017	2,40E+05		+	+	-
	98	Agar-H2O	seul	13/01/2017	20/01/2017	6,40E+05		+	+	-
	99	Agar-H2O	seul	13/01/2017	20/01/2017	2,40E+05		+	+	-
	100	Agar-H2O	seul	13/01/2017	20/01/2017	6,40E+05		+	+	-
	101	Agar-H2O	seul	13/01/2017	20/01/2017	2,80E+04		+	+	-
	102	Agar-H2O	seul	13/01/2017	20/01/2017	2,40E+05		+	+	-
	103	Agar-H2O	seul	13/01/2017	20/01/2017	5,60E+05		+	+	-
	104	Agar-H2O	seul	13/01/2017	20/01/2017	2,40E+05		+	-	-
	105	Agar-H2O	seul	13/01/2017	20/01/2017	8,00E+03		+	-	-
	106	Agar-H2O	seul	16/01/2017	20/01/2017	2,40E+05		+	+	-
	107	Agar-H2O	seul	16/01/2017	20/01/2017	3,20E+05		+	+	-
	108	Agar-H2O	seul	16/01/2017	20/01/2017	2,40E+05		+	+	-
	109	Agar-H2O	seul	16/01/2017	20/01/2017	3,20E+05		+	+	-
	110	Agar-H2O	seul	16/01/2017	20/01/2017	5,60E+05		+	+	-
	111	Agar-H2O	seul	16/01/2017	20/01/2017	1,60E+04		+	+	-
	112	Agar-H2O	seul	16/01/2017	20/01/2017	5,60E+05		+	-	-
	113	Agar-H2O	seul	16/01/2017	20/01/2017	1,60E+04		+	+	-
	114	Agar-H2O	seul	16/01/2017	20/01/2017	6,40E+05		+	+	-
	115	Agar-H2O	seul	16/01/2017	20/01/2017	1,60E+04		+	+	-

Croisement	Tube	Milieu	Stromata seul ou vrac	Date de greffe	Date de récolte	Concentration initiale (¢/mL)	Ecart-type	Croissance		
								PDA	PDA-H	PDA-Phleo
B31 (A2-Phleo)	116	PDA	vrac		27/01/2017	1,68E+06	2,85E+05	+	-	+
	117	PDA	vrac		27/01/2017	1,92E+06		+	-	+
	118	PDA	vrac		27/01/2017	1,28E+06		+	-	+
	119	Agar-H2O	vrac	23/01/2017	27/01/2017	1,84E+06		+	-	+
	120	Agar-H2O	seul	20/01/2017	27/01/2017	2,40E+05	2,05E+05	+	-	+
	121	Agar-H2O	seul	20/01/2017	27/01/2017	1,60E+05		+	-	+
	122	Agar-H2O	seul	20/01/2017	27/01/2017	7,20E+05		+	-	+
	123	Agar-H2O	seul	20/01/2017	27/01/2017	4,00E+05		+	-	+
	124	Agar-H2O	seul	20/01/2017	27/01/2017	2,40E+05		+	-	+
	125	Agar-H2O	seul	20/01/2017	27/01/2017	2,00E+04		+	-	+
	126	Agar-H2O	seul	23/01/2017	27/01/2017	6,40E+05		+	-	+
	127	Agar-H2O	seul	23/01/2017	27/01/2017	2,40E+05		+	-	+
	128	Agar-H2O	seul	23/01/2017	27/01/2017	4,00E+05		+	-	+
	129	Agar-H2O	seul	23/01/2017	27/01/2017	4,00E+05		+	-	+
	130	Agar-H2O	seul	23/01/2017	27/01/2017	2,40E+05		+	-	+
	131	Agar-H2O	seul	23/01/2017	27/01/2017	2,40E+05		+	-	+
	132	Agar-H2O	seul	23/01/2017	27/01/2017	2,40E+05		+	-	+
	133	Agar-H2O	seul	23/01/2017	27/01/2017	4,80E+05		+	-	+
	134	Agar-H2O	seul	23/01/2017	27/01/2017	2,40E+05		+	-	+
	135	Agar-H2O	seul	23/01/2017	27/01/2017	5,60E+05		+	-	+
	136	Agar-H2O	seul	23/01/2017	27/01/2017	3,20E+05		+	-	+
	137	Agar-H2O	seul	23/01/2017	27/01/2017	6,40E+05		+	-	+
	138	Agar-H2O	seul	23/01/2017	27/01/2017	4,00E+04		+	-	+
	139	Agar-H2O	seul	23/01/2017	27/01/2017	1,20E+04		+	-	+

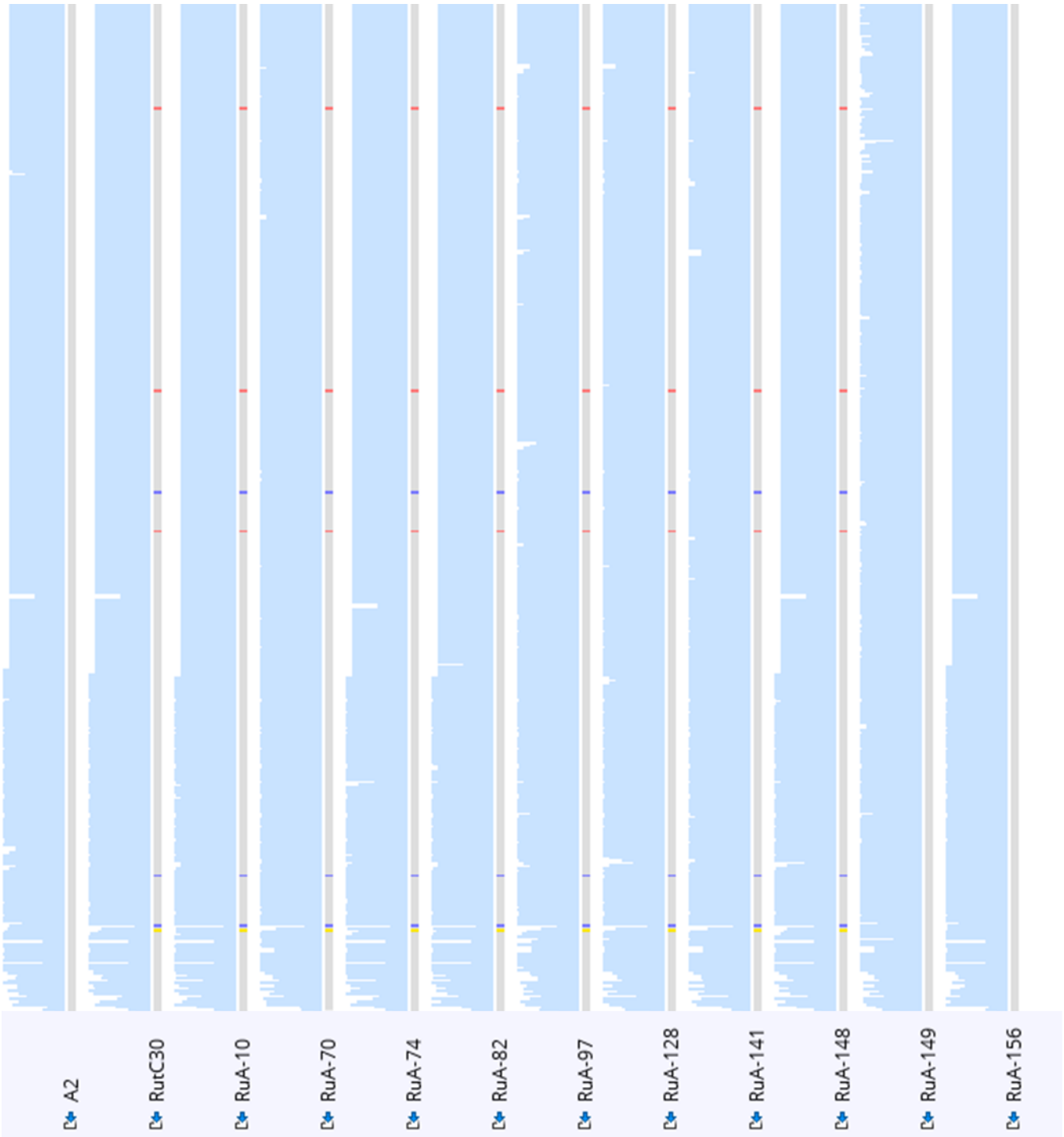
Croisement	Tube	Milieu	Stromata seul ou vrac	Date de greffe	Date de récolte	Concentration initiale (¢/mL)	Ecart-type	Croissance					
								1ère récolte			étalement 16/06/17 phleo=60µg/ml		
								PDA	PDA-H	PDA-Phleo	PDA	PDA-H	PDA-Phleo
B31 (A2-Hygro + A2-Phleo)	140	PDA	vrac		31/01/2017	3,44E+06	7,17E+05	+	+	+	+	+	+
	141	PDA	vrac		31/01/2017	3,92E+06		+	+	+	+	+	+
	142	PDA	vrac		31/01/2017	2,24E+06		+	+	+	+	+	+
	143	Agar-H2O	vrac	24/01/2017	31/01/2017	2,96E+06		+	+	+	+	+	+
	144	Agar-H2O	seul	24/01/2017	31/01/2017	2,40E+05	1,99E+05	+	+	-	+	+	-
	145	Agar-H2O	seul	24/01/2017	31/01/2017	1,60E+05		+	+	-	+	+	-
	146	Agar-H2O	seul	24/01/2017	31/01/2017	4,00E+05		+	+	-	+	+	-
	147	Agar-H2O	seul	24/01/2017	31/01/2017	5,60E+05		+	+	-	+	+	-
	148	Agar-H2O	seul	24/01/2017	31/01/2017	6,40E+05		+	+	-	+	+	-
	149	Agar-H2O	seul	24/01/2017	31/01/2017	2,40E+05		+	-	+	+	-	+
	150	Agar-H2O	seul	24/01/2017	31/01/2017	3,20E+05		+	+	+	+	+	-
	151	Agar-H2O	seul	24/01/2017	31/01/2017	4,80E+05		+	+	+	+	-	+
	152	Agar-H2O	seul	24/01/2017	31/01/2017	2,40E+05		+	+	-	+	+	+
	153	Agar-H2O	seul	24/01/2017	31/01/2017	2,40E+05		+	+	-	+	+	-
	154	Agar-H2O	seul	26/01/2017	31/01/2017	8,80E+05		+	+	+	+	+	+
	155	Agar-H2O	seul	26/01/2017	31/01/2017	4,80E+05		+	+	-	+	+	-
	156	Agar-H2O	seul	26/01/2017	31/01/2017	5,60E+05		+	+	-	+	+	-
	157	Agar-H2O	seul	26/01/2017	31/01/2017	4,00E+05		+	+	-	+	+	-
	158	Agar-H2O	seul	26/01/2017	31/01/2017	1,20E+04		+	-	+	+	-	+
	159	Agar-H2O	seul	26/01/2017	31/01/2017	4,00E+05		+	+	-	+	+	-
	160	Agar-H2O	seul	26/01/2017	31/01/2017	6,40E+05		+	+	-	+	+	-
	161	Agar-H2O	seul	26/01/2017	31/01/2017	2,40E+05		+	+	-	+	+	-
	162	Agar-H2O	seul	26/01/2017	31/01/2017	4,00E+05		+	+	-	+	+	-
	163	Agar-H2O	seul	26/01/2017	31/01/2017	4,00E+05		+	+	+	+	+	+

Annexe 6 : Dosage des sucres résiduels des milieux de fermentation

Sample Name	Concentration g/L	concentration g/L	Concentration g/L	Concentration g/L	Concentration g/L	Concentration g/L	Concentration g/L	Total
	Cellobiose	Lactose	Glucose	Xylose	Galactose	Arabinose	Mannose	
STD-A	0,9978	5,259	5,512	5,003	1	n.a.	1,005	
STD-B	0,3596	1,9126	1,995	1,968	0,259	0,333	0,309	
STD-C	0,5359	1,0538	1,106	1,098	0,599	0,512	0,576	
STD-D	0,317	0,8079	0,806	0,77	0,342	0,387	0,32	
STD-E	0,2758	0,4929	0,524	0,447	0,211	0,2032	0,212	
control	0,50	-	1,03	0,93	-	-	-	
RutC30 0	-	-	19,16	-	-	-	-	19,2
RutC30 23	-	-	2,73	-	-	-	-	2,7
RutC30 47	-	-	-	-	-	-	-	0,0
RutC30 72	-	-	-	-	-	-	-	0,0
RutC30 95	-	-	-	-	-	-	-	0,0
RutC30 167	-	-	-	-	-	-	-	0,0
RutC30 191	-	-	-	-	-	-	-	0,0
RutC30 N7	-	-	-	-	-	-	-	0,0
RutC30 215	-	275,26	-	-	-	-	-	275,3
control	0,51	-	1,01	0,94	-	-	-	
RuA-128 0	-	-	18,43	-	-	-	-	18,4
RuA-128 23	-	-	15,38	-	-	-	-	15,4
RuA-128 47	-	6,26	-	-	-	-	-	6,3
RuA-128 72	-	2,29	-	-	-	-	-	2,3
RuA-128 95	-	-	-	-	-	-	-	0,0
RuA-128 167	-	-	-	-	-	-	-	0,0
RuA-128 191	-	-	-	-	-	-	-	0,0
RuA-128 215	-	-	-	-	-	-	-	0,0
RuA-128 fed	-	242,90	-	5,80	-	-	-	248,7
control	0,51	-	1,02	0,92	-	-	-	
RuA-149 0	-	-	19,20	-	-	-	-	19,2
RuA-149 23	-	-	11,66	-	-	-	-	11,7
RuA-149 47	-	-	-	-	-	-	-	0,0
RuA-149 72	-	-	-	-	-	-	-	0,0
RuA-149 95	-	-	-	-	-	-	-	0,0
RuA-149 167	-	-	-	-	-	-	-	0,0
RuA-149 191	-	-	-	-	-	-	-	0,0
RuA-149 215	-	-	-	-	-	-	-	0,0
RuA-149 fed	-	274,41	-	-	-	-	-	274,4
control	0,51	-	1,05	0,95	-	-	-	
RuA-82 0	-	-	17,35	-	-	-	-	17,4
RuA-82 23	-	-	8,935	-	-	-	-	8,9
RuA-82 47	-	-	-	-	-	-	-	0,0
RuA-82 72	-	-	-	-	-	-	-	0,0
RuA-82 95	-	-	-	-	-	-	-	0,0
RuA-82 167	-	-	-	-	-	-	-	0,0
RuA-82 191	-	-	-	-	-	-	-	0,0
RuA-82 239	-	-	-	-	-	-	-	0,0
RuA-82 fed	-	243,534	-	-	-	-	-	243,5
control	0,531	-	1,084	1,085	-	-	-	
A2 0	-	-	17,09	-	-	-	-	17,1
A2 23	-	-	-	-	-	-	-	0,0
A2 47	-	10,19	0,68	-	0,64	-	-	11,5
A2 72	-	6,56	0,56	-	0,62	-	-	7,7
A2 95	-	2,43	-	-	-	-	-	2,4
A2 167	-	2,58	-	-	-	-	-	2,6
A2 191	-	-	-	-	-	-	-	0,0
A2 215	-	-	-	-	-	-	-	0,0
A2 fed	-	222,47	-	-	-	-	-	222,5
CONTROL	0,51	-	1,11	0,98	-	-	-	

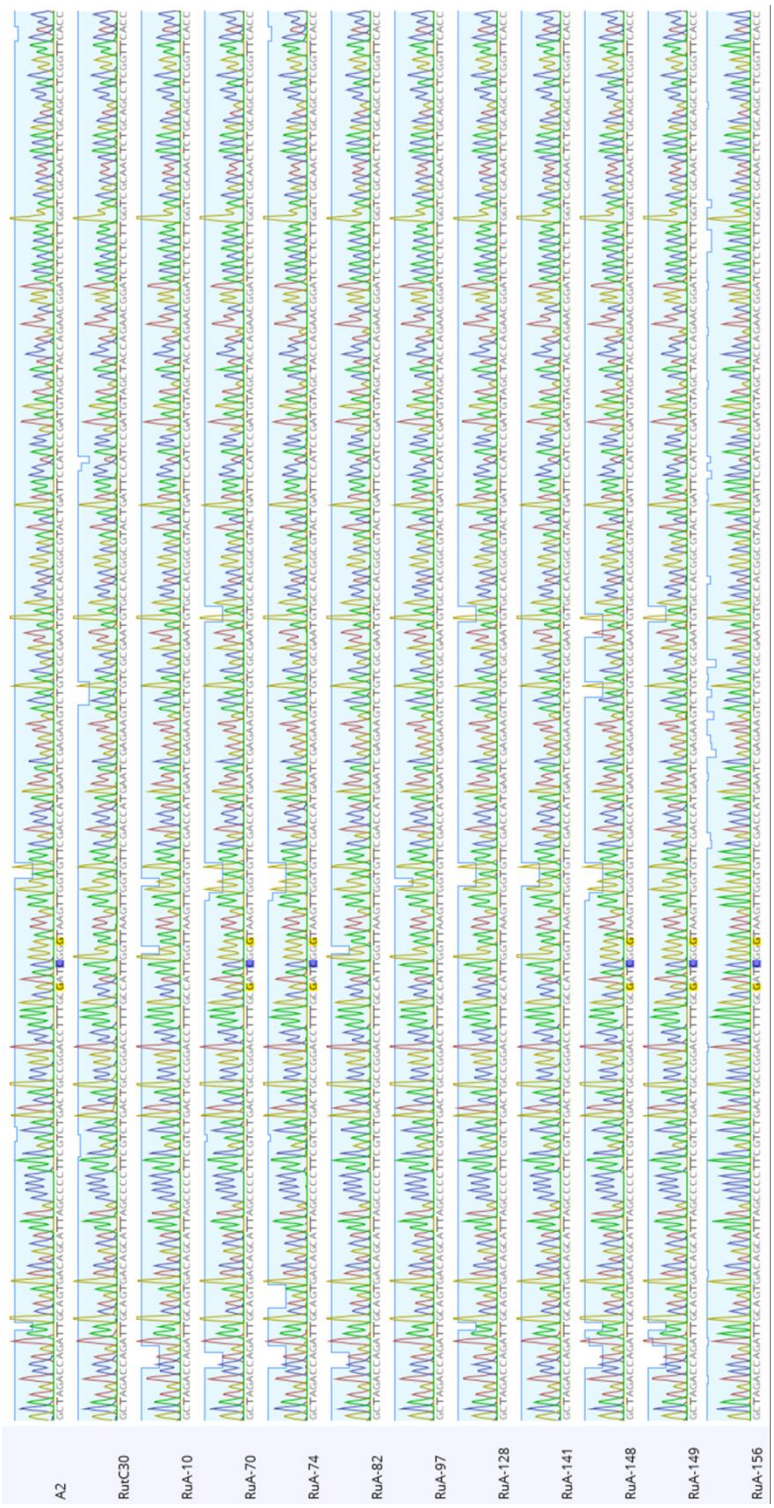
Le dosage HPLC des sucres résiduels est fait sur les surnageants de culture à 0, 23,47, 72, 95, 167, 191 ou 215/239 heures après le début de la fermentation ou au moment de l'induction de la phase de fed-batch (fed).

<u>Annexe 7 :</u> Alignement des séquences *bgl1* des descendants RuA



Un fragment interne de 656 pb a été séquencé pour les descendants et les parents et contient 18 SNP entre les souches parentales. Les traits de couleurs représentent les polymorphismes existants par rapport à la souche A2.

<u>Annexe 8 :</u> Alignement des séquences *icd1* des descendants RuA



Un fragment interne de 939pb contenant la mutation décrite par Linke et al., (2015) a été séquencé pour les descendants et les parents. La souche RutC30 et les descendants sont comparés à la souche sauvage A2.

Title : Improvement of the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* by sexual reproduction

Keywords : *Trichoderma reesei*, sexual reproduction, female sterility, genetic improvement, BSA-seq, 2nd generation bioethanol

Abstract :

Genetic engineering of *Trichoderma reesei* is one of the solutions considered to reduce the cost of the enzymatic hydrolysis step in second-generation ethanol production processes. It allows the improvement of the secretory performances of this cellulase producer fungus and the properties of its enzymes. Like many industrial fungi, *T. reesei* has long been considered to possess exclusively an asexual cycle. The recent discovery of a sexual reproduction cycle in this filamentous fungus opens up new prospects of improvement for strains used in biotechnology. However, all industrial strains of *T. reesei* are derived from the wild isolate QM6a and therefore possess the *MAT1-2* mating type and are female sterile.

The aim of this work was to develop sexual reproduction as a genetic tool and to improve the performance of the industrial strains. In combination with the genetic engineering tools, it would enable combination of interesting traits or generation of new ones, improve strains stability by purging deleterious mutations, selection markers elimination and identification of genes and mutations responsible of interesting characteristics.

The first part of this work was dedicated to the optimization of sexual reproduction and to the study of the steps and mechanisms of sexual reproduction between wild-type and hyperproducer strains. In a second step, we set up sexual reproduction between female sterile hyperproducer strains, using the original "assistant strain" strategy, which resulted in the partial restoration of their sexual reproduction. A study of the fertilization step was also initiated, as we suspect it to be the blocking point in our strategy. In a second part, we took advantage of sexual reproduction between wild-type and hyperproducer strains for (i) the generation of a *MAT1-1* mating-type strain compatible with all industrial strains, female fertile and possessing improved β-glucosidase activity and (ii) the implementation of a bulk segregation analysis associated with high-throughput sequencing techniques to identify mutations involved in phenotypes of interest.

Titre : Amélioration du champignon cellulolytique *Trichoderma reesei* par reproduction sexuée

Mots-clés : *Trichoderma reesei*, reproduction sexuée, stérilité femelle, amélioration génétique, BSA-séq, éthanol-2G

Résumé :

Dans le cadre de la production de bioéthanol de deuxième génération, l'ingénierie génétique de *Trichoderma reesei* est une des solutions envisagées pour diminuer le coût de l'étape d'hydrolyse enzymatique. Elle permet d'améliorer les performances de sécrétion de ce champignon filamenteux producteur de cellulases et les propriétés de ces enzymes. Comme de nombreux champignons industriels, *T. reesei* a longtemps été considéré comme possédant exclusivement un cycle asexuel. La mise en évidence récente d'un cycle de reproduction sexuée chez ce champignon filamenteux ouvre de nouvelles perspectives d'amélioration des souches utilisées en biotechnologie. Cependant, comme toutes les souches industrielles de *T. reesei* dérivent de l'isolat sauvage QM6a, elles sont toutes de type sexuel *MAT1-2* et stériles en tant que femelles.

L'objectif de ce travail de thèse est de mettre en place la reproduction sexuée comme outil génétique et d'amélioration des performances des souches industrielles. Son utilisation en complément des outils d'ingénierie génétique permet de combiner des caractères intéressants ou d'en générer de nouveaux, de stabiliser les souches industrielles en éliminant les mutations non désirées, de s'affranchir des marqueurs de sélection et d'identifier les gènes et mutations responsables d'un caractère d'intérêt.

La première partie de ce travail a été consacré à l'optimisation de la reproduction sexuée puis à l'étude des étapes et des mécanismes de la reproduction sexuée entre souches sauvages et hyperproductrices. Dans un deuxième temps, nous avons mis en place la reproduction sexuée entre des souches hyperproductrices femelles stériles, à l'aide de la stratégie originale de la « souche assistante », qui a abouti au rétablissement partiel de leur reproduction sexuée. Afin de compléter ce rétablissement, une étude de l'étape de fécondation que nous supposons être l'étape problématique dans notre stratégie a été initiée. Parallèlement, l'exploitation de la reproduction sexuée entre souches sauvage et hyperproductrices a permis de générer une souche hyperproductrice de cellulases, de type sexuel *MAT1-1* donc compatible avec toutes les souches industrielles, femelle fertile et possédant une activité β-glucosidase améliorée. Enfin, la reproduction sexuée associée à la génétique classique (« Bulk Segregant Analysis ») et aux techniques de séquençage haut débit a été mise en œuvre pour permettre l'identification de mutations impliquées dans des phénotypes d'intérêt.