



HAL
open science

Etude des gènes et des processus cellulaires impliqués dans la germination des ascospores et la formation de l'appressorium chez *Podospora anserina*

Alexander Demoor

► **To cite this version:**

Alexander Demoor. Etude des gènes et des processus cellulaires impliqués dans la germination des ascospores et la formation de l'appressorium chez *Podospora anserina*. Microbiologie et Parasitologie. Université Paris Cité, 2021. Français. NNT : 2021UNIP5109 . tel-04431508

HAL Id: tel-04431508

<https://theses.hal.science/tel-04431508v1>

Submitted on 1 Feb 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

École doctorale MTCI (Médicament, Toxicologie, Chimie, Imagerie) n°563

Laboratoire Interdisciplinaire des Energies de Demain / Equipe Génétique et
Epigénétique des Champignons

Etude des gènes et des processus cellulaires impliqués dans la germination des ascospores et la formation de l'appressorium chez *Podospora anserina*

Par Alexander Demoor

Thèse de doctorat de Microbiologie Eucaryote

Dirigée par Sylvain Brun

Présentée et soutenue publiquement le 9 février 2021 à Paris

Devant un jury composé de :

Présidente du jury

& rapporteur : DEBUCHY Robert / DR CNRS / Université Paris-Saclay

Rapporteurs : VENAULT-FOURREY Claire / DR INRAE/ INRAE - Nancy

Examineurs : AUCHERE Françoise / MCU / Université de Paris
GROGNET Pierre / MCU / Université Paris-Saclay

Directeur de thèse : BRUN Sylvain / MCU / Université de Paris

Co-directeur : SILAR Philippe / PR / Université de Paris



Titre : Etude des gènes et des processus cellulaires impliqués dans la germination des ascospores et la formation de l'appressorium chez *Podospora anserina*

Résumé : La germination des ascospores et la formation de l'appressorium, une structure de pénétration des champignons pathogènes et symbiotiques, sont deux processus clés dans le cycle de vie des champignons. Le laboratoire a montré que certains éléments de régulation comme la voie MAPK *Fus3/Mpk2* et la NADPH oxydase *Nox2* se trouvent être communs à la régulation de ces deux mécanismes. Afin d'identifier de nouveaux éléments de régulation de ces deux processus chez *Podospora anserina*, P. Silar a isolé au laboratoire six mutants de germination (Germination Uncontrolled – GUN) chez lesquels la dormance des ascospores est affectée conduisant à leur germination spontanée. Le séquençage de ces mutants m'a permis d'identifier 6 gènes candidats potentiellement impliqués dans les deux processus. Au cours de ma thèse, j'ai caractérisé 2 de ces gènes dont la mutation entraîne une levée incontrôlée de la dormance des ascospores. Le premier d'entre eux, *GUN1* code une carnitine acétyl-transférase mito/peroxisomale qui m'a conduit à m'intéresser au métabolisme primaire et au rôle de l'acétate dans la germination. Le deuxième, *GUN2*, qui code un facteur de transcription de la famille GAL4 jamais étudié chez les champignons filamenteux, m'a amené à réaliser une analyse RNAseq afin d'étudier le transcriptome de la germination des ascospores chez la souche sauvage et chez ce mutant. Outre les aspects génétiques, moléculaires, transcriptomiques, et biochimiques, cette thèse m'a aussi conduit à étudier les aspects cytologiques de la germination et de la formation de l'appressorium. J'ai montré que ce dernier, bien que peu étudié chez les champignons saprophytes, est pourtant présent chez de nombreux dicaryomycètes filamenteux.

Mots clefs : *Podospora anserina*, champignons, germination des ascospores, formation de l'appressorium

Table des matières

Remerciements	8
Préambule	11
Introduction	12
I – Les champignons : des organismes aux multiples intérêts	12
1. Des acteurs majeurs de la biosphère	12
2. Interactions avec l’environnement et intérêts biotechnologiques	14
a. Les espèces saprotrophes	14
b. Les espèces pathogènes	15
c. Les espèces symbiotiques	17
d. Les espèces carnivores	18
3. <i>Podospora anserina</i> : un modèle d’étude	19
II – L’appressorium : une structure de pénétration de la biomasse	23
1. Les différentes morphologies d’appressoria	25
a. Les appressoria de phytopathogènes	25
➤ L’appressorium unicellulaire	25
➤ L’appressorium composé	28
b. L’appressorium des entomopathogènes	29
c. La pénétration chez les espèces mycorhiziennes	30
d. L’appressorium de <i>Podospora anserina</i>	32
2. Mécanismes moléculaires de formation de l’appressorium	34
a. Initiation de la formation de l’appressorium	34
b. Le remodelage du cytosquelette durant la formation de l’appressorium	35
c. Les Nox et leur impact dans le remodelage du cytosquelette	36
d. Signalisation cellulaire dans la formation de l’appressorium	39
e. Métabolisme de la formation de l’appressorium	42
III – La germination des spores : naissance d’un nouvel individu	44
1. La germination des spores bactériennes	45
2. La germination chez les plantes	48
3. La germination chez les champignons	51
a. Les spores asexuelles	51

➤ Structure de la conidie.....	52
➤ L'activation des conidies	54
➤ Croissance isotrope	55
➤ Croissance polarisée.....	56
➤ Signalisation de la germination des conidies	56
➤ Métabolisme de la germination des conidies	59
b. Les spores sexuelles	60
➤ Les basidiospores	61
➤ Les ascospores.....	62
IV - Mon projet de thèse.....	69
Chapitre I : Etude de la formation de l'appressorium chez les eumycètes	71
Chapitre II : Etude du mutant de germination spontanée <i>GUN1^{SG}</i>	86
Introduction.....	88
Materials and Methods	91
Results	100
Discussion	114
Authors contribution	119
Bibliography	120
Chapitre III : Etude du mutant de germination spontanée <i>GUN2^{SG}</i>	140
I – Identification de <i>GUN2</i>, le gène muté dans <i>GUN2^{SG}</i>	140
1. Caractéristiques phénotypiques et séquençage de <i>GUN2^{SG}</i>	140
2. Délétion de <i>GUN2</i> , et complémentation génétique.....	141
3. Analyse phylogénétique de <i>GUN2</i>	145
II- Analyse du mutant Δ<i>GUN2</i>	149
1. Croissance du mutant Δ <i>GUN2</i>	149
2. Etude de l'effet du glucose sur les mutants Δ <i>GUN2</i> et <i>GUN2^{SG}</i>	150
3. Etudes d'épistasie avec <i>GUN1</i>	153
III - Analyse du transcriptome de la souche sauvage <i>S</i> et de la souche Δ<i>GUN2</i> au cours de la germination des ascospores.....	154
1. Protocole d'extraction des ARN	155
2. Description de l'échantillon	157
3. Analyses d'enrichissement.....	159

a.	Les gènes différentiellement régulés au cours de la germination induite par le milieu G+YE	163
b.	Les gènes différentiellement régulés au cours de la germination induite par l'absence de <i>GUN2</i>	165
c.	Analyse experte de l'expression des gènes impliqués ou potentiellement impliqués dans la germination des ascospores.....	170
4.	Recherche des séquences de fixation de <i>GUN2</i> à l'ADN.....	171
Chapitre IV : Etudes physiologiques et cytologiques de la germination des ascospores chez <i>P. anserina</i>		174
I - Etudes physiologiques de la germination des ascospores		175
1.	Rôle du Bacto peptone et de l'acétate d'ammonium.....	175
2.	Test de la concentration du Bacto peptone.....	178
3.	Test du choc thermique sur la germination des ascospores	179
4.	Effet de la pression osmotique sur la germination	180
II- Marquage des septines PaSpn2 et PaCdc3.....		181
1.	Etude phylogénétique des septines.....	181
2.	Stratégie de marquage de PaSpn2 et PaCdc3.....	183
a.	Construction de la souche PaCdc3-GFP	184
b.	Construction des souches PaSpn2-GFP et PaSpn2-mCherry.....	185
3.	Etudes phénotypiques et cytologiques des souches PaCdc3-GFP, PaSpn2-GFP et PaSpn2-mCherry	185
a.	Localisation des septines PaSpn2 et PaCdc3 dans le mycélium	186
b.	Localisation de la septine PaSpn2 dans les ascospores.....	188
c.	Localisation de PaCdc3 et PaSpn2 au cours de la formation de l'appressorium	189
➤	Etude de PaCdc3-GFP H1-mCherry	189
➤	Etude de PaSpn2-mCherry et PaSpn2-GFP	190
III - Marquage de l'actine et construction du rapporteur LifeAct		193
1.	Construction de LifeAct-GFP et LifeAct-mCherry	194
2.	Observations des spores LifeAct-GFP et LifeAct-mCherry	194
IV- Marquage de Nox2 par la GFP		196
Discussion-Conclusion		198
Annexes		207
Bibliographie		214

Remerciements

Sacrée aventure que la thèse ! On a beau être prévenu avant, ce n'est qu'une fois qu'on s'est lancé qu'on se rend compte du pétrin dans lequel on s'est fourré. Mais c'est une magnifique expérience, que je ne regrette pour rien au monde, tant elle m'a permis d'apprendre sur le plan scientifique et personnel. Durant de ces 4 années passées au LIED, j'ai eu la chance de rencontrer et de côtoyer avec des personnes formidables qui m'ont aidé à traverser cette période dans les meilleures conditions, et que je tiens à remercier ici.

Je tiens avant tout à remercier Isabelle Martin-Verstraete de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury, Claire Veneault-Fourrey et Robert Debuchy qui ont accepté d'examiner mon manuscrit, ainsi que Françoise Auchère et Pierre Grognon qui ont bien voulu évaluer ce travail et faire partie de ce jury.

Je souhaite ensuite remercier vivement Sylvain Brun (alias chef/patron/maître/grandschtroumpf) de m'avoir supporté et encadré depuis le M2 jusqu'au rendu. Merci pour ta guidance, ton soutien sans faille, ta patience, ton humour douteux et aussi vaseux que le mien, ta bienveillance et ta gentillesse. Je n'aurais pu rêver meilleur directeur de thèse pour encadrer mes premiers pas dans la jungle de la recherche scientifique. Et tu sais ce qu'on dit des premières fois, n'est-ce pas ? A l'instar de l'OM tu seras à jamais mon premier chef !

Je tiens également à remercier Philippe Silar pour m'avoir fait découvrir l'univers des champignons, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et m'avoir permis de travailler dans les meilleures conditions possibles. Merci pour ta patience, ta disponibilité et tes conseils.

Comme le répète mon illustre chef : « La Recherche, c'est avant tout des Hommes et des Femmes qui cherchent ». Ces Hommes et ces Femmes aux côtés de qui j'ai cherché pendant 4 ans me sont apparus petit à petit comme une seconde famille à mes yeux, et je tiens ici à les remercier individuellement pour chaque moment passé à leur côté au cours de cette thèse. Merci à Sylvie Cangemi pour ta douceur, ton écoute et ta bonne humeur. Merci à Valérie Gautier pour ta complicité, tes conseils scientifiques et personnels, les fous rires et tes punchlines tranchantes comme une lame de rasoir. Merci à Delphine Bonnin pour ta douceur et ta bonne humeur. Merci à Roselyne Ferrari (ma recruteuse !) pour ton soutien, ta gentillesse, ta patience et ton aide pour cette interminable manip CrAT, ta mauvaise humeur légendaire (« Kess ça peut te foutre ? » – Ronchelyne) et les fous rires (keskidit ?).

Merci à Frédéric Filaine pour les fous rires du midi, pour ta gentillesse, ton écoute, ton soutien, et ton aide « non-indispensable ». Enfin, merci à Christophe Lalanne pour ton humour décapant, pour tous les chocolats et clémentines, ton aide précieuse, et ta bienveillance. Je remercie également Tinh-Suong Nguyen (alias l'ancêtre) pour avoir formé le petit nouveau que j'étais et toute l'aide et les conseils que tu as pu m'apporter depuis ce fameux stage de M1. Merci aussi à Jonathan Dikec, et Charlie Boucher pour tous les bons moments passés en leur compagnie durant leur passage au labo. Merci aussi à Arthur Prévost pour ta sympathie, et m'avoir donné un aperçu (même bref) du théâtre.

Je tiens aussi à remercier Hervé Lalucque pour les fous rires partagés dans le labo pendant les manip comme en Happy Hour. Merci pour ta sympathie, ton écoute, tes conseils et ton éclectisme musical !

Un grand merci à l'ensemble des membres du LIED de m'avoir supporté pendant ces 4 longues années : Mathieu Arnoux, Christophe Goupil, Eric Herbert, Maxime Chaumont, Florence Chapeland-Leclerc, Gwenaël Ruprich-Robert, François Bouteau, Patrick Laurenti, Insaf Essadik, Tingting Zhao et Ling Shen.

Merci à Clara Ledoux pour m'avoir accompagné durant cette aventure. Merci pour ta douceur, ton soutien et pour tous ces bons moments partagés avec toi.

Au cours de cette thèse j'ai eu la chance de rencontrer d'autres stagiaires et étudiants avec qui j'ai noué de solides liens d'amitié : Amine Mamouni, Emily & Morgane Levert, Sebastian Castro-Ramirez (mon Titi !), Sarah Mourad (poto), Simine Pakzad & Antoine Vajou. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble, votre amitié, votre soutien et votre joie communicative.

D'autres personnes sont là depuis un peu plus longtemps (une vingtaine d'années, rien que ça). Merci à Quentin et Yon Ibarrart d'être toujours là, après toutes ces années. On est lààà.

Merci à Xavier De Launay (le 3ème frère) d'être toujours là depuis 8 ans. Merci pour les après-midi et soirées jeux de société, pour ton amitié et ton soutien.

Merci aussi aux boys/fratés (#GBC) : Clément Raynaud, Michel Portafax, Loïc Gaslonde, et Mathieu De Jode d'être là depuis la licence, ainsi que Sarah Madrières, Clothilde Levrat et Célia Vaslin. Merci pour toutes ces soirées, vacances passées ensemble, pour votre amitié et votre soutien sans faille.

Merci à Joanna Sujka-Czapla (Mamiie) pour ton amitié et ton soutien indéfectible. Merci d'avoir été là dans les moments difficiles.

Enfin, je remercie infiniment ma famille pour leur amour inconditionnel et leur soutien permanent. Merci William d'être toujours là en toutes circonstances. On va mener à bien nos projets !! Et les mots me manquent pour exprimer ma gratitude à mes parents. Merci pour tout ce que vous avez toujours fait pour moi, pour votre immense amour et pour avoir toujours cru en moi et m'avoir poussé à aller toujours plus loin.

Préambule

Le règne des champignons est vaste et hautement diversifié. Ces organismes discrets jouent des rôles majeurs au sein de nos écosystèmes. Néanmoins, ils demeurent peu connus du grand public. Durant l'écriture de cette thèse, l'un des premiers choix auquel j'ai été confronté a été celui du niveau de détail de mes propos. Cette thèse étant destinée au public, j'ai fait le choix de rentrer dans les détails pour que les lecteurs étrangers à la mycologie puissent avoir une vision un peu plus globale de l'ampleur que revêt ce règne ainsi que les enjeux qui y sont associés. J'ai cependant essayé de rendre mon discours aussi clair et condensé que possible pour ne pas perdre le lecteur. J'ai ainsi rédigé mon introduction dans l'optique de donner aux lecteurs une vue d'ensemble du règne fongique mais aussi de ce qu'est l'appressorium chez les champignons, ainsi qu'une vision globale de la germination au sein du monde vivant.

Introduction

I – Les champignons : des organismes aux multiples intérêts

1. Des acteurs majeurs de la biosphère

Principalement connus pour leur place au sein de notre alimentation ou pour les maladies qu'ils peuvent causer, les champignons constituent pourtant un groupe beaucoup plus vaste et diversifié d'organismes qui jouent des rôles essentiels au sein de notre biosphère. Loin de la vision réductrice des champignons à chapeaux ramassés en forêt, ces organismes sont constitués de cellules à noyaux ou eucaryotes et forment un assemblage polyphylétique regroupant les *Eumycota* (ou « vrais » champignons) et les *Pseudomycota* (« faux » champignons). Cette dichotomie est issue de la proximité génétique des *Eumycota* avec les animaux, et inversement, des *Pseudomycota* avec les plantes (**Figure 1**). La quasi-totalité des espèces fongiques qui seront présentées dans ce manuscrit sont des eumycètes, appartenant au phylum des *Eumycota*. Ces champignons adoptent différentes morphologies souvent dépendantes du milieu qu'ils colonisent : les espèces levuriformes (ou levures) telles que *Saccharomyces cerevisiae* arborent une forme unicellulaire; les espèces filamenteuses pluricellulaires (aussi appelées moisissures) développent des cellules capables de s'allonger nommées « hyphes », cloisonnées ou non, et qui au fur et à mesure de leur croissance vont se ramifier pour former un réseau interconnecté appelé le « mycélium », optimisé pour coloniser les milieux terrestres. Enfin les espèces dites dimorphiques sont capables d'adopter une forme filamenteuse ou levuriforme selon leur environnement, telles que *Candida albicans*.

Ainsi, au fil de leur évolution, les champignons ont su coloniser une large gamme de niches écologiques. Il en découle une vaste biodiversité fongique qui se traduit par un très grand nombre d'espèces différentes. En effet on ne dénombre pas moins de 120 000 espèces d'*Eumycota* décrites à ce jour. Toutefois, le nombre d'espèces fongiques existant est estimé entre 2,2 et 3,8 millions d'espèces (Hawksworth & Lücking, 2017). Mais malgré leur variété, les champignons partagent tous le même mode de nutrition. Ce sont des organismes hétérotrophes qui se nourrissent exclusivement par osmotrophie, une stratégie trophique consistant en l'absorption de nutriments dissous dans le milieu par diffusion au travers de la membrane ou à l'aide de transporteurs.

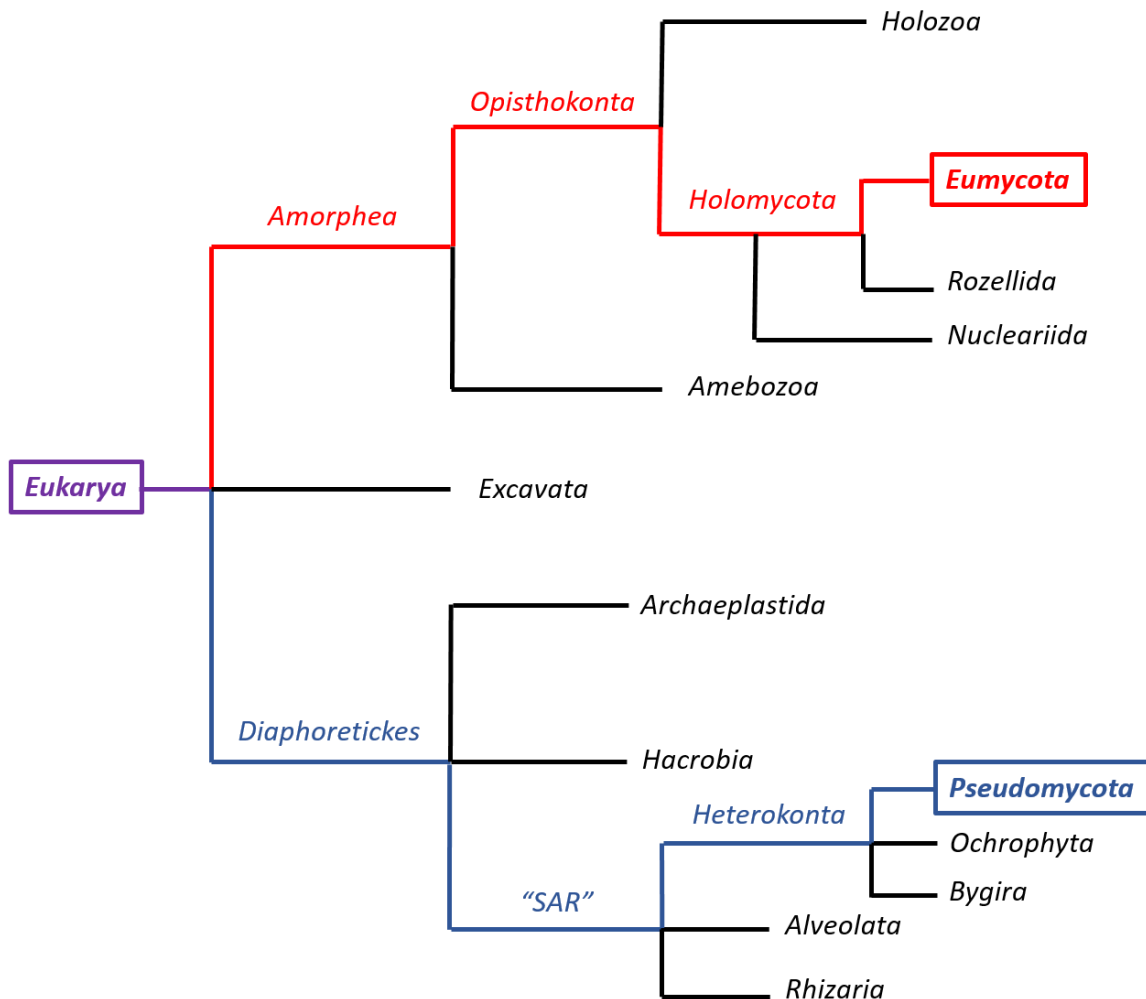


Figure 1 : Positionnement simplifié des *Eumycota* et des *Pseudomycota* dans l’arbre des *Eukarya*. Les eumycètes sont plus proches des animaux (ou métazoaires, inclus dans le phylum des *Holozoa*) tandis que les pseudomycètes sont génétiquement plus proches des plantes (*Archaeplastida*). Cet arbre a été construit à partir des arbres présentés par Silar (2016).

En outre, la majorité des espèces fongiques ont adopté un style de vie adapté à cette forme de nutrition : la saprotrophie (anciennement appelé saprophytisme). Ce mode de vie consiste en la sécrétion d’enzymes qui vont digérer la matière organique morte environnante pour permettre l’absorption des nutriments libérés par la digestion par osmotrophie (Malagnac & Silar, 2013). Néanmoins, la diversité de ce phylum se retrouve également dans la variété des interactions possibles des différentes espèces avec leur environnement.

2. Interactions avec l'environnement et intérêts biotechnologiques

A l'échelle des champignons, on distingue cinq principaux modes de vie différents : la saprotrophie, le parasitisme, le commensalisme, le mutualisme et la carnivorie. Par souci de clarté, les espèces commensales seront abordées en même temps que les espèces pathogènes.

a. Les espèces saprotrophes

Comme évoqué précédemment, la saprotrophie est le mode de vie le plus répandu parmi les espèces fongiques. En effet, l'arsenal enzymatique unique des champignons leur permet notamment de dégrader les composés organiques complexes tels que la biomasse lignocellulosique (Andlar et al., 2018). Ainsi, les champignons saprotrophes sont les principaux régulateurs du recyclage des nutriments et de la matière carbonée des écosystèmes terrestres (Baldrian & Valášková, 2008). Outre leur rôle essentiel dans la balance carbonée, certaines espèces saprotrophes présentent un intérêt industriel. L'exemple le plus probant est celui de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, dont la domestication par l'Homme est millénaire, et qui est impliquée dans l'industrie agroalimentaire, notamment pour la fabrication du vin, du pain et de la bière (Legras et al., 2007). On peut également citer certaines espèces de *Penicillium* telles que *Penicillium roqueforti* ou *Penicillium camemberti*, qui sont largement utilisées dans nos industries fromagères (Lund et al., 1995). D'autres espèces retrouvées à l'état de saprotrophes dans leur habitat naturel, occupent une place majeure au sein de l'industrie énergétique. C'est le cas de *Trichoderma reesei*, un ascomycète filamenteux à fort potentiel de sécrétions de cellulases. Ces enzymes, améliorées par bioingénierie ou non, sont ainsi exploitées dans le processus d'élaboration de bioéthanol de seconde génération, dans lequel elles digèrent la cellulose en sucres simples. Ces sucres simples subissent ensuite une fermentation par *S. cerevisiae* pour aboutir à du bioéthanol (Druzhinina & Kubicek, 2017). On peut aussi noter l'emploi de cette espèce dans l'industrie textile pour la fabrication de jeans délavés (Heikinheimo et al., 2000).

Mais le milieu utilisant le plus ces microorganismes demeure celui de l'industrie pharmaceutique. En effet, comme de nombreux autres organismes, les champignons produisent des métabolites secondaires, des molécules non indispensables à leur survie (donc n'entraînant pas de létalité si absentes), mais pouvant conférer un avantage sur les autres organismes vivant au sein du biotope, accroissant ainsi leur compétitivité. Certains de ces métabolites peuvent

avoir des propriétés thérapeutiques. L'exemple le plus connu est celui de la pénicilline, découverte en 1928 par Alexander Fleming. C'est une toxine synthétisée par certaines espèces appartenant notamment au genre *Penicillium* aux propriétés bactériostatiques. Sa découverte a permis l'élaboration des premiers antibiotiques à l'échelle industrielle (Bennett & Chung, 2001).

Cependant, certaines espèces saprotrophes peuvent présenter des risques pour nos habitations. C'est le cas de la mэрule pleureuse *Serpula lacrymans*, une pourriture brune s'attaquant à tous les matériaux contenant de la cellulose, et notamment le bois őruvré, occasionnant de lourds dégâts en s'attaquant aux charpentes, compromettant ainsi l'intégrité structurelle des bâtiments infectés (Watkinson & Eastwood, 2012).

b. Les espèces pathogènes

Toutefois, les espèces fongiques les plus délétères pour l'Homme sont les espèces dites parasitaires. Dans ce genre d'interaction, l'organisme parasite se nourrit aux dépens de son hôte. A l'échelle des champignons, on retrouve une large gamme d'hôtes, allant de l'Homme à la plante, en passant par les insectes et même d'autres champignons.

Longtemps considérés comme des pathogènes mineurs de l'Homme, les parasites fongiques humains revêtent une importance largement sous-estimée (Brown et al., 2012). On en distingue deux catégories : les pathogènes capables d'infecter l'Homme sain et les pathogènes opportunistes (Köhler et al., 2017).

La première catégorie intègre des espèces responsables de pathologies bénignes mais répandues, telles que les mycoses superficielles causées par les Dermatophytes, des champignons filamenteux regroupant les genres *Microsporum*, *Tricophyton* et *Epidermophyton*. Cependant, en l'absence de traitement, elles peuvent occasionner des dégâts sévères qui peuvent aboutir à l'amputation du membre infecté comme dans le cas des mycétomes causés par *Madurella mycetomatis*.

La seconde catégorie comprend des espèces qui sont en temps normal commensales, c'est-à-dire qu'elles se nourrissent grâce à leur hôte sans leur porter préjudice. Nous vivons ainsi quotidiennement avec de nombreuses espèces différentes de champignons sur notre peau, et nos différentes muqueuses. Mais suite à une immunodépression et/ou un déséquilibre du microbiote de l'hôte, certaines de ces espèces peuvent devenir invasives et engendrer des symptômes variant selon l'espèce (Neville et al., 2015). Ces espèces sont ainsi qualifiées de

« pathogènes opportunistes ». Néanmoins, leur importance ne doit pas être négligée, puisque le taux de mortalité d'un patient atteint d'une mycose invasive dépasse souvent les 50% (Brown et al., 2012). De plus, de nombreux facteurs tels que : le faible nombre de substances antifongiques à notre disposition, l'émergence de résistances à ces substances, l'augmentation du nombre de patients immunodéprimés, et les traitements immunosuppresseurs et anticancéreux, sont à l'origine d'une augmentation de la prévalence des infections fongiques invasives (Enoch et al., 2017). On peut mentionner le cas des aspergilloses invasives, à l'origine de complications mortelles chez plus de 10% des patients en rémission complète de leucémie (van de Peppel et al., 2018).

Paradoxalement, ce sont les champignons phytopathogènes qui impactent le plus l'Homme. En effet, contrairement aux parasites humains, les champignons constituent une des principales causes de maladies des plantes (Doehlemann et al., 2017). Et parmi ces espèces phytopathogènes, certaines peuvent être responsables de pertes de rendement, pour des cultures essentielles à l'alimentation humaine telles que le blé ou le riz, pouvant aller jusqu'à 70% (Dean et al., 2012). Elles peuvent donc engendrer des pertes considérables si leur propagation n'est pas enrayerée. D'autre part, ces espèces montrent une grande variété de stratégies infectieuses. Sur le plan du mécanisme d'action, on distingue trois grandes classes d'espèces fongiques pathogènes de plantes : les pathogènes biotrophes tels que *Cladosporium fulvum*, capables de coloniser l'hôte vivant et de persister en échappant à son système immunitaire, tout en tirant les nutriments nécessaires à sa survie; les pathogènes nécrotrophes tels que *Botrytis cinerea*, qui à l'inverse vont tuer les tissus de l'hôte pour en extraire les nutriments ; et les pathogènes hémibiotrophes tels que *Magnaporthe oryzae*, qui commencent leur cycle infectieux en tant que biotrophes puis deviennent nécrotrophes (Doehlemann et al., 2017).

Chaque espèce présente ainsi un mode d'infection « général », auquel viennent se rajouter des spécificités qui peuvent être propres à l'espèce ou partagées avec d'autres. L'étude de ces mécanismes infectieux est donc cruciale afin de trouver de nouvelles cibles spécifiques pour combattre ces espèces. De la même façon que pour les pathogènes humains, la lutte contre ces espèces phytopathogènes souffre du manque de substances antifongiques, et de l'émergence de résistances aux antifongiques disponibles sur le marché.

Mais tous les parasites fongiques ne sont pas forcément néfastes pour l'Homme. Contrairement aux précédentes, les espèces fongiques pathogènes d'insectes peuvent présenter un bénéfice biotechnologique majeur. En effet, certaines espèces d'insectes constituent un risque pour la santé humaine étant donné leur nature de vecteur de maladies infectieuses, telles que les moustiques, ou encore en ravageant les cultures et les forêts. Dans un premier temps,

ce phénomène a été combattu par l'emploi de pesticides chimiques. Mais leur usage excessif a conduit au développement de résistances à ces produits chez les insectes. Dans ce contexte, des espèces telles que *Metarhizium anisopliae* ou encore *Beauveria bassiana*, capables d'infecter et de tuer leur insecte hôte sans effets secondaires sur l'Homme, ont commencé à être employées en tant qu'agent biologique de régulation des populations d'insectes (**Figure 2**) (Dara et al., 2019; Lovett et al., 2019). Elles peuvent par conséquent protéger les récoltes et diminuer la propagation de maladies telles que le paludisme. Toutefois, ces espèces peuvent aussi s'avérer dangereuses vis-à-vis des autres espèces d'insectes essentielles au bon fonctionnement de l'écosystème et qui ne seraient pas visées par cette application, telles que les abeilles. Cela est dû à la capacité de ces espèces entomopathogènes d'infecter une vaste gamme d'hôtes (Devi et al., 2008). Pour cela leur utilisation doit être grandement maîtrisée (Gilbert & Gill, 2010).



Figure 2 : Cadavre sporulant de *Lymantria dispar* sous sa forme chenille, infectée par *B. bassiana*. D'après Dara *et al.*, 2019.

c. Les espèces symbiotiques

Il existe également des espèces fongiques capables d'établir une symbiose : une interaction bénéfique pour chacun des partenaires. La grande majorité de ces symbioses sont établies avec les racines des plantes dans une association appelée « mycorhize ». Ainsi, plus de 90% des espèces de plantes peuvent être associées à au moins un champignon mycorhizien (Lanfranco et al., 2016).

Dans cette interaction, le champignon peut fournir jusqu'à 80% des sources d'azote et jusqu'à 100% des sources de phosphore nécessaires au développement et à la prolifération de la plante en échange de 20% de ses ressources carbonées d'origine photosynthétique (Hoysted

et al., 2018). On distingue deux grands types de mycorhizes : les endomycorhizes, les plus répandues et formées uniquement par des espèces appartenant au groupe des Gloméromycètes, où le champignon pénètre à l'intérieur des racines pour mieux s'y associer ; et les ectomycorhizes formées par des espèces telles que *Laccaria bicolor*, qui concernent seulement 5% des plantes vasculaires, où le champignon forme un réseau mycélien dense autour des racines de son hôte. Mais les avantages de cette symbiose ne se limitent pas à une meilleure croissance, puisqu'elle améliore également la résistance de leur hôte aux pathogènes (Chen et al., 2018). En outre, les espèces mycorhiziennes sont aussi étudiées pour leur implication dans la santé des sols forestiers et agricoles.

Mais ces champignons mycorhiziens ne sont pas les seuls capables d'établir des symbioses avec les plantes. Les espèces endophytes se distinguent des mycorhiziennes par leur capacité à coloniser l'ensemble des tissus de la plante hôte. C'est le cas d'*Epichloë festucae*, un symbiote mutualiste commun à de nombreuses espèces de plantes graminées auxquelles il fournit de nombreux avantages (Schardl, 2001). De plus, ces espèces peuvent également jouer un rôle dans la défense des plantes contre des parasites, notamment contre les insectes herbivores (Bastias et al., 2017). Par ailleurs, certaines espèces entomopathogènes comme *M. anisopliae* et *B. bassiana* peuvent vivre sous forme endophyte sans causer aucun dégât à la plante hôte. Cette caractéristique est actuellement étudiée pour être exploitée sur les cultures, afin de réguler les populations d'insectes herbivores insensibles aux pesticides (Moonjely et al., 2016).

d. Les espèces carnivores

Enfin, bien que peu connues, il n'existe pas moins de 700 espèces de champignons carnivores nématophages. On y retrouve des espèces appartenant au genre *Nematophthora*, *Pochonia* ou *Arthrobotrys* spécialisées dans la capture des nématodes (**Figure 3**). Parmi elles, seules quelques-unes sont des parasites obligatoires des nématodes, la plupart étant des saprotrophes facultatifs. Ces espèces sont notamment étudiées pour une utilisation en tant qu'agent de bio-contrôle des nématodes parasites de plantes et d'animaux (Jiang et al., 2017).



Figure 3 : Nématode piégé par le champignon *Drechslerella stenobrocha*.

Ainsi, les champignons constituent un phylum hautement diversifié, tant sur le plan génétique que de leur mode de vie. Leur étude revêt une importance capitale sur le plan médical, écologique, et industriel. Cependant cette étude est parfois rendue difficile à cause de l'impossibilité de la mise en culture dans des conditions de laboratoire de certaines espèces (notamment les parasites et les symbiotes) d'une part, et par la complexité des approches génétiques d'autre part chez les espèces pour lesquelles le cycle sexuel n'est pas connu/maîtrisé ou trop long. Il est donc nécessaire de se référer à des espèces modèles, proches génétiquement, facilement cultivables et manipulables en laboratoire. L'utilisation de ces espèces nous permet ainsi d'étudier les processus biologiques fondamentaux et d'appliquer les résultats obtenus chez d'autres espèces de champignons d'intérêt proches. Au sein de notre laboratoire nous travaillons sur le champignon filamenteux *Podospora anserina*.

3. *Podospora anserina* : un modèle d'étude

Podospora anserina est un champignon filamenteux ascomycète, saprotrophe coprophile, que l'on retrouve généralement sur les excréments d'herbivores. C'est une espèce cosmopolite, qui appartient au sous-embranchement des *Pezizomycotina*, de la classe des *Sordariomycetes*, intégrée dans l'ordre des *Sordariales*. Cet organisme présente de nombreux atouts pour des études de biologie cellulaire et de génétique. Tout d'abord, son génome a été entièrement séquencé et annoté : il mesure 35 Mb, répartis sur 7 chromosomes, et un chromosome mitochondrial et comporte environ 10500 gènes (Espagne et al., 2008). D'autre part, il pousse relativement rapidement sur milieu standard de laboratoire : sa vitesse de croissance est de 6 à 7 mm par 24 heures.

Son cycle de vie est maîtrisé et se complète en 7 jours sur milieu standard et dans des conditions optimales de laboratoire : 27°C, hygrométrie supérieure à 70% et en présence de lumière (**Figure 4**). *P. anserina* est un organisme hermaphrodite : chaque individu porte à la fois les structures femelles (ascogones) et mâles (spermaties). Pour compléter son cycle de reproduction sexuée, il nécessite la présence des deux types sexuels complémentaires : *mat+* et *mat-*. En effet, les champignons possèdent un système de type phéromone/récepteur où les ascogones d'un type sexuel donné, ne peuvent être fécondés que par des spermaties du type sexuel compatible. On distingue à ce niveau deux grands types d'espèces de champignons : les espèces hétérothalliques, et les espèces homothalliques. L'hétérothallisme se caractérise par une interaction obligatoire d'un individu d'un type sexuel donné avec un autre individu de type sexuel compatible afin de parvenir à se reproduire sexuellement. A l'inverse, l'homothallisme se définit par la capacité d'un individu à se reproduire sexuellement indépendamment de la présence d'un individu de type sexuel opposé (Wilson et al., 2015). Sur le plan physiologique, *P. anserina* présente les caractéristiques d'un champignon homothallique : ses spores produisent des thalles auto-fertiles. Cependant, sur le plan moléculaire, cette auto-fertilité résulte du fait que les spores contiennent deux noyaux indépendants possédant chacun un des deux types sexuels opposés, caractéristique des espèces hétérothalliques. *P. anserina* est ainsi catégorisée comme espèce pseudo-homothallique (Wilson et al., 2015).

Ainsi, à l'issue de la fécondation, des fructifications (nommées périthèces) se forment autour des ascogones fécondés par les spermaties. Après environ 4 jours, ces périthèces contiennent alors des asques renfermant des ascospores. A partir du 7^{ème} jour, ces asques vont être dispersés en continu par éjection de ces derniers au travers des cols des périthèces. Après la caryogamie et à l'issue d'une méiose et d'une mitose post-méiotique se développent donc des asques renfermant généralement 4 ascospores dicaryotiques. La germination de ces ascospores conduit alors à la formation d'un mycélium hétérocaryotique (*mat+/mat-*) auto-fertile. Toutefois, dans 1% des cas, il y a un « accident » conduisant à la formation d'asques contenant des « grosses » spores dicaryotiques et des « petites » spores monocaryotiques n'exprimant donc qu'un seul type *mat*. La germination des petites spores produit ainsi un mycélium homocaryotique qui n'est donc pas auto-fertile. Du fait de leur nature homocaryotique, elles permettent de réaliser des croisements orientés. Bien que ce phénomène soit rare, la descendance issue d'un croisement étant d'environ 100 000 asques, il est aisé de récupérer ces petites spores (Silar, 2020).

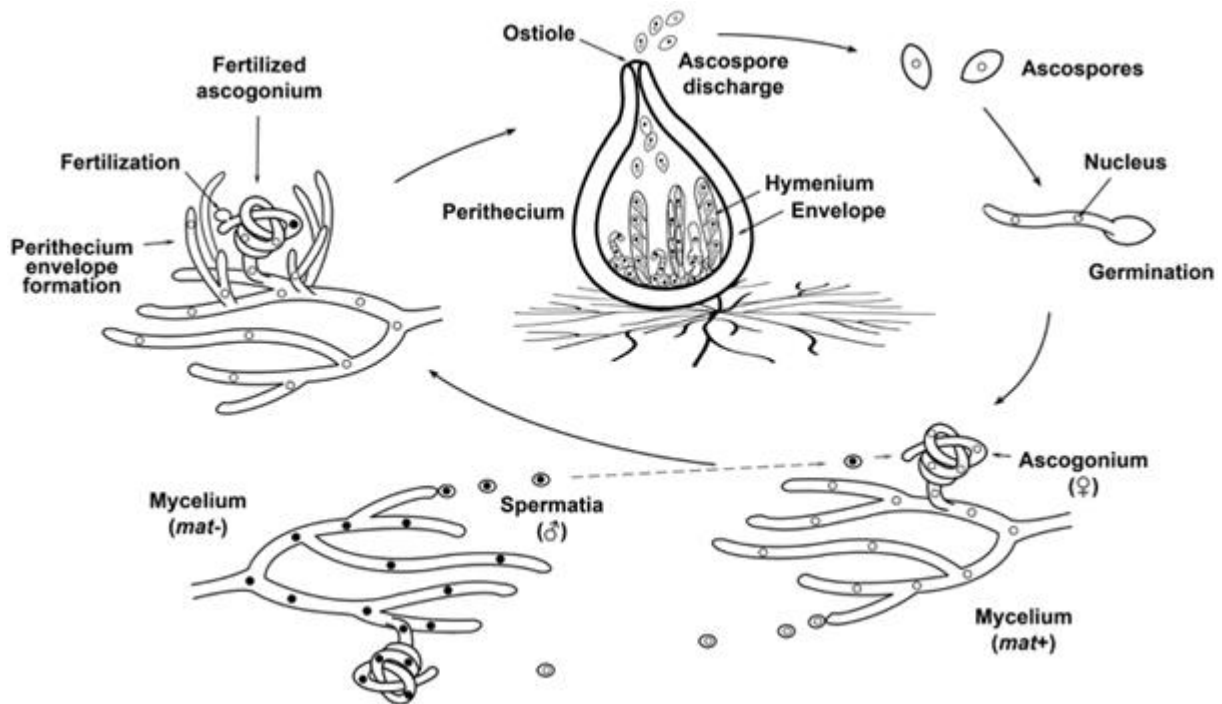


Figure 4 : Cycle de vie de *Podospora anserina*. D'après Peraza Reyes & Berteaux-Lecellier, 2013.

Ainsi, la fécondation se réalise en routine au laboratoire en faisant pousser deux individus de type sexuels compatibles sur une même boîte de Pétri et en l'arrosant après 72h de croissance. Cet arrosage permet la répartition des spermatis des deux individus sur l'ensemble de la boîte afin qu'elles fécondent les ascogones de l'autre individu. Toutefois, d'autres méthodologies de croisement telles que la confrontation, qui consiste à faire pousser deux individus de type sexuels compatibles en séparant les implants de chacun de 1,5 cm, ou encore l'hétérocaryon qui nécessite de fragmenter un implant de chaque individu de type sexuels compatibles dans 500 μL d' H_2O , puis de déposer une goutte de 10 μL sur milieu de croissance.

Pour l'analyse génétique, il faut néanmoins considérer 2 phénomènes importants : la pré-réduction et la post-réduction (**Figure 5**). Dans le cas de la pré-réduction (ou FDS : First Division Segregation) il n'y a pas de crossing-over entre le gène et son centromère. Les allèles représentés en noir et blanc sur la figure, sont donc séparés dès la première division de méiose. Après la mitose post méiotique les spores s'individualisent autour de deux noyaux génétiquement identiques mais non-frères.

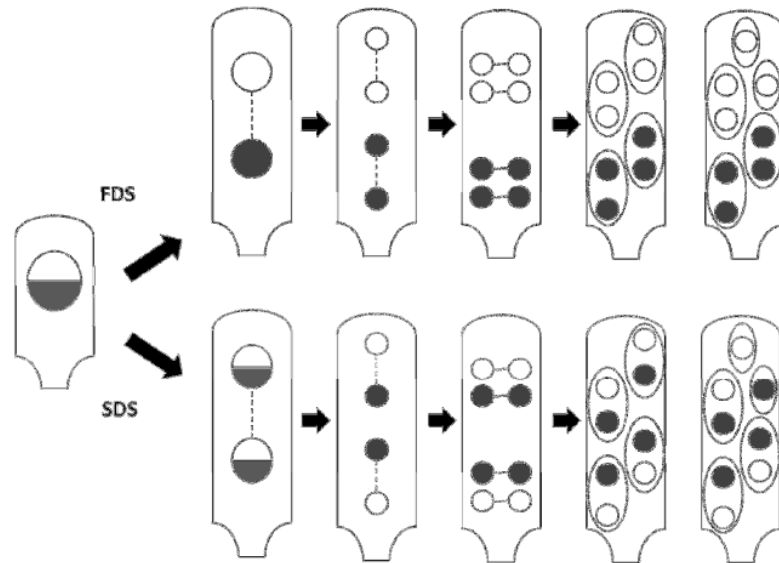


Figure 5 : Ségrégation des allèles pendant la méiose en cas de pré-réduction (FDS) ou de post-réduction (SDS) chez *P. anserina*. D'après Grognet *et al.*, 2014.

A l'inverse, dans le cas de la post-réduction, il y a un crossing-over entre le gène et son centromère. Les spores se forment alors autour de deux noyaux génétiquement différents et donneront des thalles hétérocaryotiques pour le gène en question. Le pourcentage de post-réduction donne ainsi une distance génétique entre le gène et le centromère du chromosome.

Dans la nature, la germination des ascospores de *P. anserina* est induite lors de leur transit par le tractus digestif des herbivores. C'est donc un processus qui est régulé par un stimulus qui va permettre cette germination. Au laboratoire, ce stimulus est reproduit par un milieu spécifique supplémenté en acétate d'ammonium, permettant d'induire la germination et d'obtenir un nouvel individu à partir d'une spore issue d'un croisement. Un autre atout majeur de ce champignon est sa capacité à être facilement transformé. Cette technique ouvre le champ à de nombreuses études telles que la délétion de gènes, la complémentation, la surexpression d'un gène, l'introduction d'un allèle mutant, ou bien encore le marquage du produit de l'expression d'un gène à l'aide d'une protéine fluorescente. *P. anserina* est ainsi un organisme chez lequel des études de génétique directe peuvent être réalisées. Contrairement à la génétique inverse, la génétique directe consiste à identifier les gènes responsables d'un phénotype donné sans a priori sur l'identité voire la fonction du gène. Cette méthode demeure encore aujourd'hui la plus efficace pour découvrir de nouveaux gènes.

Toutes ces caractéristiques font de cette espèce un excellent modèle pour les études génétiques de processus biologiques chez les champignons filamenteux. Il constitue ainsi un modèle d'étude du vieillissement chez les champignons, aussi appelé « sénescence » (Osiewacz, 2011; Osiewacz et al., 2010). Il a également permis de découvrir l'existence d'un mécanisme de défense des champignons contre les compétiteurs de son biotope nommé « Interférence hyphale » (Silar, 2005). On peut mentionner aussi son rôle crucial dans la découverte et l'étude des phénomènes de dégénérescence des spores ou du mycélium tels que le Spore killer, l'incompatibilité végétative, et Crippled growth etc. (Padieu & Bernet, 1967; Rizet & Esser, 1953; Silar *et al.*, 1999).

Quel que soit leur style de vie, toutes les espèces de champignons sont confrontées aux mêmes besoins majeurs : acquérir des nutriments pour croître et se développer, se disperser efficacement et résister aux conditions adverses. Durant ma thèse, je me suis consacré à l'étude de deux processus différents mis en place par les champignons pour répondre à ces besoins. Le premier est la formation de l'appressorium, une structure permettant au champignon qui la différencie de pénétrer mécaniquement la biomasse. Bien que largement étudiée chez les espèces phytopathogènes pour son importance dans leur cycle infectieux, elle n'a été que très peu étudiée chez les saprotrophes. Le second est la germination des ascospores, un processus clé et finement régulé dans le cycle de vie du champignon, mais dont la régulation génétique est peu connue par rapport à celle des conidies. Je vais maintenant décrire un peu plus chacun de ces deux processus.

II – L'appressorium : une structure de pénétration de la biomasse

En tant qu'organismes hétérotrophes, la question de l'accès aux nutriments représente un enjeu majeur pour les champignons. En effet, ces éléments nécessaires à leur croissance sont souvent protégés par des barrières physico-chimiques.

Afin de franchir ces barrières, les champignons ont évolué deux grandes stratégies. La première consiste en la dégradation enzymatique de ces barrières à l'aide d'un arsenal enzymatique permettant une dégradation efficace des sucres complexes tels que la cellulose et l'hémicellulose, ainsi que des polymères de lignine. Parmi ces enzymes, on retrouve des lipases, des protéases, des ligninases, ainsi qu'une catégorie particulière d'enzymes nommée

« Carbohyrate Active Enzymes » (CAZymes). Cette dernière regroupe des familles d'enzymes qui catalysent la modification de glycoconjugués (oligosaccharide ou polysaccharide) telles que les Glycosyltransferases ou les Glycoside hydrolases.

Celles-ci sont très répandues parmi les espèces filamenteuses (Couturier et al., 2016). La deuxième stratégie consiste en une pénétration mécanique de ces barrières. Pour ce faire, les espèces capables de percer ces parois vont différencier une structure spécialisée : l'appressorium. Selon l'espèce et son mode de vie, le champignon va alors utiliser soit une des deux stratégies, soit une combinaison des deux à l'image de *B. cinerea* (exemple détaillé plus bas).

Introduit en 1883 par Frank, le terme « appressorium », du latin « appressus », a d'abord désigné des structures en forme de disque permettant une adhésion à l'hôte chez 3 espèces de champignons parasites de plantes : *Colletotrichum lindemuthianum*, *Polystigma rubrum* et *Fusicladium tremulae* (Frank, 1883). Au fil du temps, son rôle dans la pénétration et l'infection des plantes s'est précisé, et de plus en plus d'espèces pour lesquelles des structures similaires pouvaient être observées, ont été étudiées. Définir précisément un appressorium s'est alors avéré difficile sur le plan morphologique. Suivant l'espèce qui le différencie et ses spécificités d'hôte, l'appressorium peut en effet se présenter sous des formes radicalement différentes, allant d'une structure avec des parois épaisses et fortement mélanisées délimitées par des septa, à des apex hyphaux non mélanisés et non septés (Emmett & Parbery, 1975). Pour résoudre ce problème de définition, Emmett et Parbery ont proposé de définir l'appressorium comme « Toute structure permettant d'adhérer à la surface de l'hôte pour permettre sa pénétration, quelle que soit sa morphologie ». Cette définition permet donc de regrouper des structures morphologiquement différentes mais dotées des mêmes fonctions : celles d'adhérer et de pénétrer mécaniquement le tissu hôte. Le terme « appressorium » devient alors synonyme de « structure infectieuse ».

Ainsi, les appressoria ont été étudiés de manière extensive chez les espèces phytopathogènes. Ils constituent en effet une « porte d'entrée » dans l'hôte, et jouent de ce fait un rôle crucial dans leur cycle infectieux. Toutefois, ces structures ont également été observées chez d'autres espèces telles que des entomopathogènes, des mutualistes mycorhiziens et également chez le groupe phylogénétiquement distant que sont les *Oomycetes*. Nous verrons dans un premier temps les différents types d'appressoria observables selon les espèces, puis nous nous pencherons sur les mécanismes moléculaires connus qui sous-tendent sa formation et son fonctionnement.

1. Les différentes morphologies d'appressoria

a. Les appressoria de phytopathogènes

Comme vu précédemment, les espèces phytopathogènes sont responsables de maladies dévastatrices pour les cultures pouvant engendrer de grosses pertes de rendement. A l'échelle mondiale, la perte de rendement des récoltes imputable aux maladies de plantes est ainsi estimée à 30% (Fisher et al., 2012). Or, vu le coût élevé des substances antifongiques et avec l'émergence de résistances à ces substances, le besoin d'identifier des cibles spécifiques et durables pour lutter contre ces espèces se fait plus pressant. L'appressorium, de par son importance dans le cycle infectieux, constitue ainsi une cible de choix à étudier.

Selon l'espèce phytopathogène étudiée, l'appressorium peut prendre différentes formes. On distingue ainsi l'appressorium unicellulaire et l'appressorium multicellulaire dit « composé ».

➤ L'appressorium unicellulaire

De manière générale, un appressorium unicellulaire est différencié peu de temps après la germination de la conidie de l'espèce étudiée, et permet l'entrée de celle-ci dans le tissu hôte. A cette notion simple, se rajoutent des spécificités propres aux espèces.

L'appressorium le plus étudié et décrit à ce jour est celui du pathogène biotrophe modèle *M. oryzae* (Dean et al., 2012; Ryder & Talbot, 2015). Ce champignon ascomycète est responsable de la pyriculariose, une maladie provoquant la nécrose des tiges au niveau des épis de riz. Il peut néanmoins s'attaquer aussi au blé, à l'orge, au seigle et au millet. La pyriculariose s'initie lorsqu'une spore asexuée (ou conidie) de ce champignon atterri sur la feuille de riz par l'intermédiaire des gouttes de pluie. Lorsque ces conidies tricellulaires perçoivent le signal de surface émis par la cuticule cireuse de la plante, et en présence d'eau libre, ces conidies se mettent à germer en 1h (Talbot, 2003). Un tube germinatif est alors émis par la spore, et au bout de 10 à 15 µm de croissance, son extrémité commence alors à s'aplatir, puis se crocheter, avant de se différencier en une structure en forme de dôme : l'appressorium unicellulaire (**Figure 6**) (Deising et al., 2000).

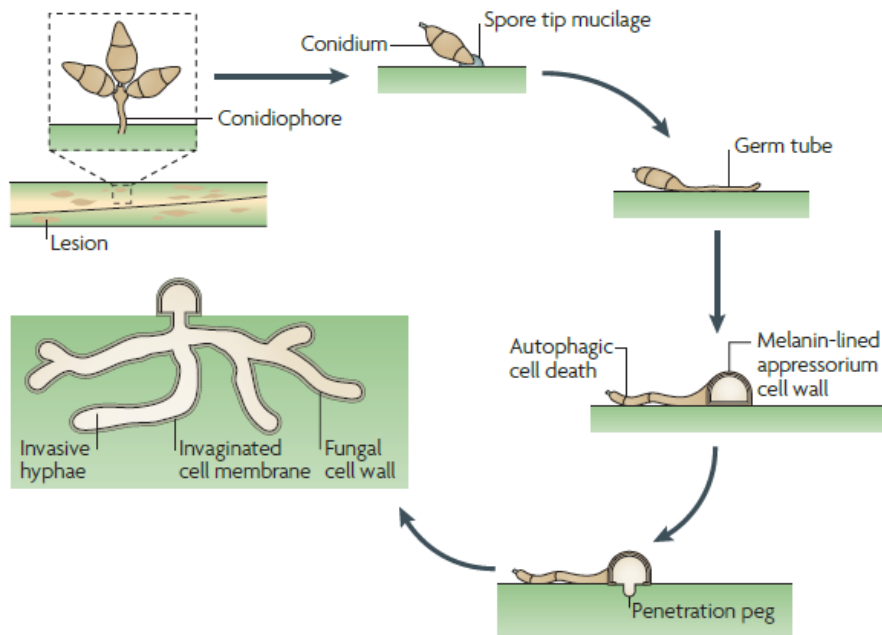


Figure 6 : Cycle de vie de *M. oryzae*. Lorsque la conidie arrive sur la feuille de riz, en présence des facteurs environnementaux requis, elle va germer et donner naissance à un appressorium. Cet appressorium va accumuler une haute pression de turgescence et émettre un peg de pénétration qui va percer la cuticule de la plante et permettre ainsi son invasion par le champignon. D'après Wilson & Talbot, 2009.

Une fois formé, cet appressorium va alors entrer en maturation, et générer une pression de turgescence pouvant atteindre jusqu'à 8 MPa, en accumulant des solutés à haute concentration tels que le glycérol et d'autres polyols (**Figure 7**) (Howard et al., 1991; Jong et al., 1997). L'appressorium possède en effet une paroi particulière dotée de couches de mélanines intercalées entre la paroi et la membrane plasmique. Cette mélanine empêche l'efflux du glycérol, permettant ainsi son accumulation et la génération de pression qui lui est associée (Chumley & Valent, 1990). La pression ainsi créée est convertie en énergie mécanique, exercée par un « peg » de pénétration qui émerge de l'appressorium et qui va grâce à cette force, percer la cuticule de la plante hôte. Mais *M. oryzae* n'est pas le seul champignon à différencier ce genre d'appressorium. De nombreux autres champignons tels que les espèces du genre *Colletotrichum* (*C. gloeosporioides* par exemple), *Cochliobolus*, *Ustilago maydis*, etc. (Mendgen et al., 1996). Les espèces du genre *Colletotrichum* sont responsables de l'antracnose, une maladie pouvant atteindre de nombreuses plantes cultivées, notamment les arbres fruitiers.

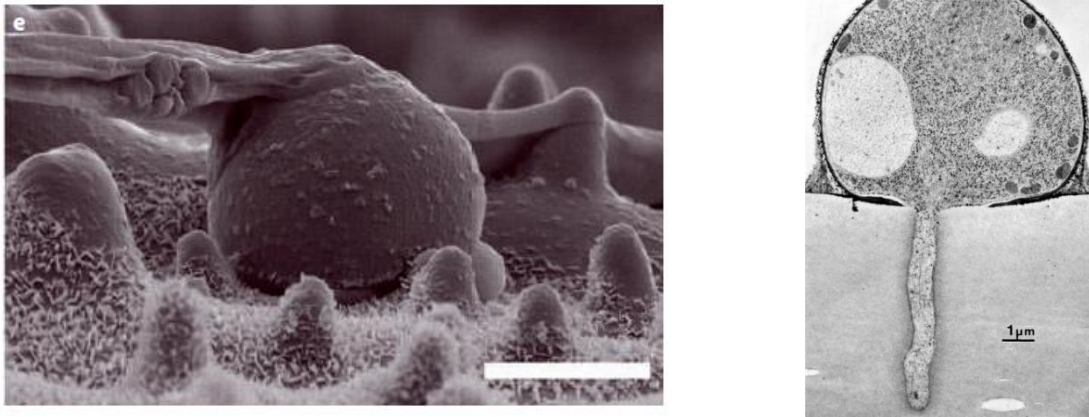


Figure 7 : Clichés en microscopie électronique d'un appressorium de *M. oryzae*. Cet appressorium peut générer une pression de turgescence allant jusqu'à 8 MPa, afin de percer la cuticule de la plante.

Gauche : Wilson & Talbot, 2009 ; Droite : Deising *et al.*, 2000

Ils peuvent ainsi engendrer une diminution de la production fruitière. L'appressorium que ces espèces peuvent différencier, sont ceux qui ressemblent le plus à celui formé par *M. oryzae* : une structure mélanisée en forme de dôme à l'extrémité de leur tube germinatif. Au-delà de leur ressemblance sur le plan morphologique, ces espèces partagent des similarités au niveau du programme génétique de développement qui seront abordées un peu plus tard. Chez de nombreuses espèces, l'appressorium unicellulaire n'est cependant qu'un simple renflement terminal à l'apex des tubes de germination. C'est le cas des espèces telles que *B. cinerea*, *Uromyces appendiculatus* ou *C. fulvum*. Ces espèces vont produire un appressorium généralement non mélanisé et non septé au niveau des stomates de la plante hôte qui va leur permettre s'insinuer entre les tissus de la plante (**Figure 8**). Contrairement à l'appressorium de *M. oryzae*, ces appressoria génèrent une pression de turgescence de l'ordre de 0,35 MPa (Mendgen *et al.*, 1996).

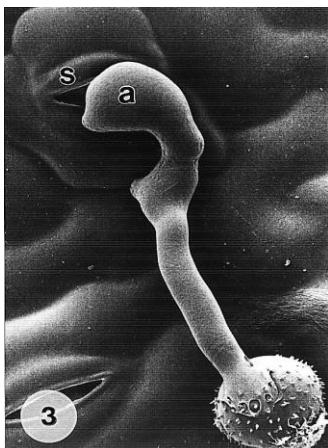


Figure 8 : Cliché en microscopie électronique d'un pore stomatal pénétré par un appressorium différencié peu après la germination d'une uredospore d'*Uromyces appendiculatus*. D'après Mendgen *et al.*, 1996.

Bien que cette pression puisse paraître très faible, elle est suffisante pour émettre un hyphe de pénétration avec assez de force pour élargir les parois du stomate et permettre ainsi au champignon d’envahir les tissus. Une fois le stomate franchi, les hyphes de ces espèces accroissent alors immédiatement leur diamètre afin de progresser dans le tissu.

➤ L’appressorium composé

De nombreuses espèces telles les *Rhizoctonia sp.*, les *Sclerotium sp.*, les *Sclerotinia sp.*, *Fusarium oxysporum* ou encore la pourriture noble *B. cinerea* ont évolué un appressorium multicellulaire appelé « coussin d’infection » afin de pénétrer leur plante hôte (Emmett & Parbery, 1975; Mendgen *et al.*, 1996). Sur le plan morphologique, ce coussin d’infection se différencie également à l’apex des tubes germinatifs et est constitué d’un dense faisceau d’hyphes en forme de dôme hautement mélanisé qui va croître de manière transversale vers la cuticule de l’hôte permettant ainsi sa pénétration (**Figure 9**). Bien que moins décrite que l’appressorium unicellulaire, cette structure infectieuse a été toutefois étudiée de manière approfondie chez *B. cinerea*, *S. sclerotiorum* et *R. solani* (Armentrout & Downer, 1987; Backhouse and Willetts, 1987; Garcia-Arenal and Sagasta, 1980; Hegedus and Rimmer, 2005; Jurick and Rollins, 2007). A l’instar des appressoria unicellulaires renflés qu’il peut différencier, l’appressorium composé de *B. cinerea* n’est pas mélanisé ni séparé du tube germinatif par un septum, rendant impossible l’accumulation de pression de turgescence.

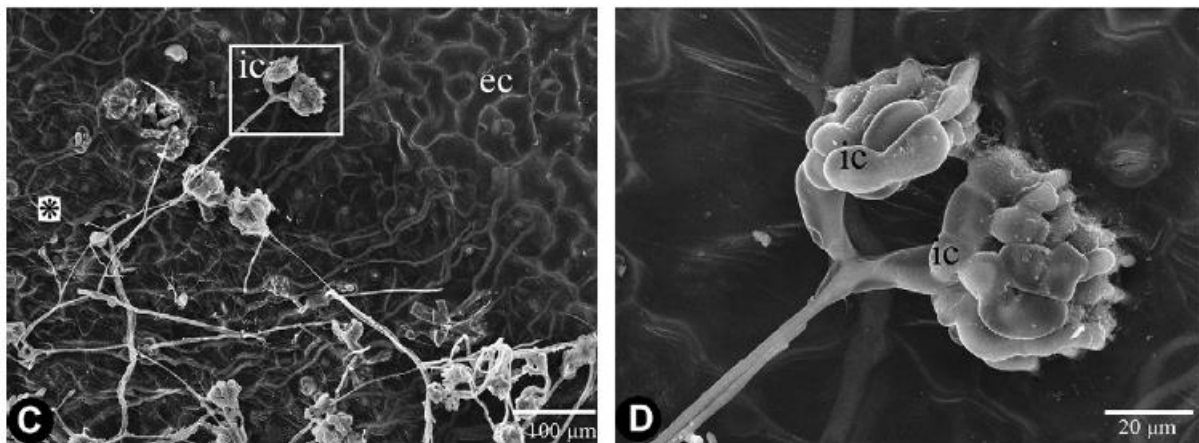


Figure 9 : Clichés en microscopie électronique de coussins de pénétration formés par *B. cinerea* sur feuilles de colza. D’après Zhang *et al.*, 2010.

Ec = cellules épidermiques de colza ; ic = coussin d’infection

Mais contrairement à eux, cet appressorium n'est pas fait pour élargir seulement les pores d'un stomate et doit percer la cuticule. Son mode de pénétration de la cuticule ne peut alors pas être purement mécanique. Certaines preuves suggèrent que cet appressorium médierait dans un premier temps une attaque oxydative par l'action d'enzymes cutinolytiques et la production de ROS tels que les ions superoxyde et l' H_2O_2 puis franchirait la cuticule ainsi dégradée (Tenberge, 2007). Toutefois le coussin d'infection, plus robuste et mélanisé, semble capable d'accumuler la force nécessaire pour percer mécaniquement la cuticule de la plante. Le critère de choix entre l'une ou l'autre de ces structures de pénétration semble être la nature de l'inoculum. Ainsi, en laboratoire, lorsque la concentration de conidies de départ est plus faible, la formation de coussin d'infection est favorisée par rapport à l'appressorium unicellulaire (Van Den Heuvel & Waterreus, 1983). Il en va de même lorsque l'inoculum de départ est directement du mycélium (Kunz et al., 2006).

b. L'appressorium des entomopathogènes

Bien que surreprésentés dans la littérature scientifique chez les phytopathogènes, les appressoria ne sont pas spécifiques à ces derniers. De nombreuses espèces de champignons entomopathogènes sont capables de différencier un appressorium, qui va de la même façon percer la cuticule de leur hôte pour permettre leur invasion. On en retrouve ainsi naturellement chez des espèces comme *B. bassiana*, ou *M. anisopliae* (Hatzipapas et al., 2002; St.Leger et al., 1989). Le processus infectieux de ces espèces est très similaire à celui de *M. oryzae* : lorsqu'une conidie atterrit à la surface d'un potentiel hôte insecte, si les conditions optimales de température, d'humidité et nutritives sont réunies, celle-ci se mettra à germer (Vega et al., 2012).

A l'extrémité du tube germinatif, un appressorium va alors se différencier et accumuler de la pression de turgescence afin de percer la cuticule au moyen d'un hyphe de pénétration qui va traverser ses différentes couches de la cuticule jusqu'à atteindre l'hémocèle, la cavité sanguine principale de l'insecte (McCauley *et al.*, 1968). Chez les insectes, cette cuticule est un réseau de polymères constitué essentiellement de chitine et de protéines la rendant particulièrement rigide (Clarkson & Charnley, 1996). A l'instar de *B. cinerea*, les espèces entomopathogènes combinent alors à la pression mécanique exercée par l'appressorium, l'action d'un cocktail enzymatique regroupant des protéases, des chitinases et des lipases qui vont dégrader la cuticule, rendant possible la perforation de cette dernière par l'appressorium

(Schrank & Vainstein, 2010; Wang & St Leger, 2007). Une fois dans l'hémocèle le champignon va alors différencier des « corps hyphaux » qui vont flotter librement dans l'hémolymphe et envahir les différents organes de l'insecte, puis éventuellement sécréter différents métabolites secondaires pouvant entraîner la mort de l'hôte (**Figure 10**).

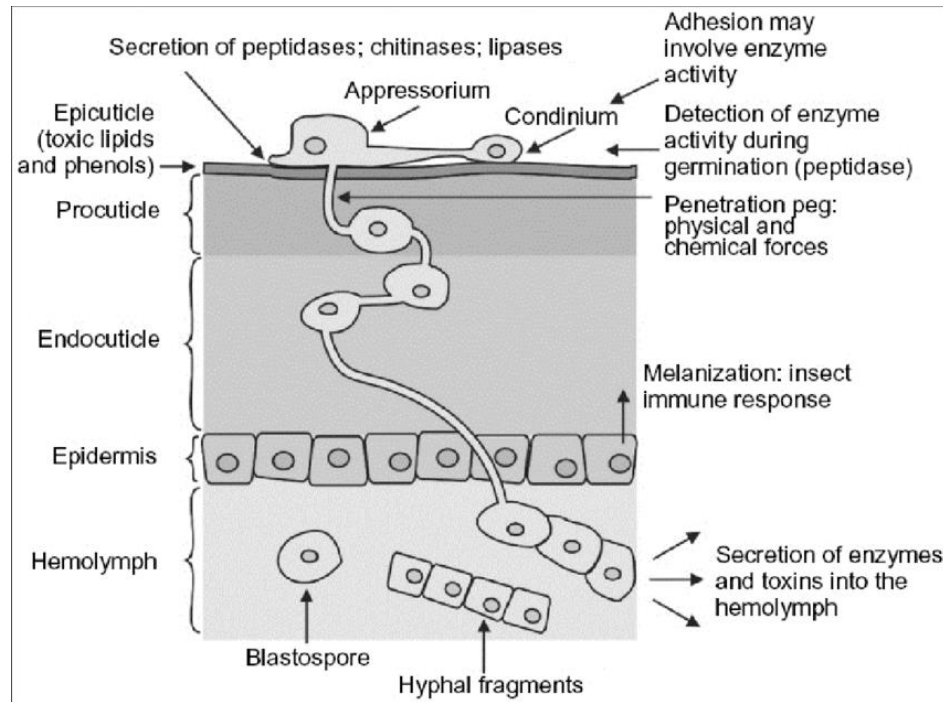


Figure 10 : Modèle générique montrant le processus infectieux des espèces fongiques entomopathogènes. D'après (Singh *et al.*, 2017).

Bien que moins étudiées, les espèces entomopathogènes suscitent un grand intérêt pour leur application potentielle en tant qu'agent insecticide biologique. Les données acquises sur leur mode infectieux ouvre le champ à la bioingénierie afin de générer des souches plus performantes qui vont infecter de manière efficace des cibles spécifiques (Zhao *et al.*, 2016).

c. La pénétration chez les espèces mycorrhiziennes

Certaines espèces mycorrhiziennes se servent d'une structure de pénétration pour établir la symbiose avec leur hôte. Leur formation n'a cependant pu être observée que chez des champignons mycorrhiziens arbusculaires. Ces espèces appartenant au phylum des *Glomeromycota*, forment la majeure partie des endomycorhizes puisqu'ils sont retrouvés en association avec plus de 80% des espèces de plante (Schüßler *et al.*, 2001). De manière générale

pour ces espèces, l'établissement de la symbiose s'initie lors du contact entre le tube germinatif émis par la spore du champignon avec des racines de plante. Si les deux espèces sont compatibles, une structure « infectieuse » sera alors différenciée et constituera le point de départ à partir de laquelle des hyphes invasifs partiront envahir les cellules de la plante hôte. Chez ces espèces, on retrouve une structure très similaire à l'appressorium car également impliquée dans l'adhésion aux racines et leur pénétration, mais néanmoins distincte nommée « hyphopode » (Bonfante & Genre, 2010). Contrairement à l'appressorium qui est formé à l'apex du tube germinatif, l'hyphopode est une structure étalée formée à partir d'un hyphe (Emmett & Parbery, 1975). Cette structure est retrouvée chez des espèces du genre *Gigaspora* ou *Glomus* capables d'établir une symbiose avec différentes espèces de plantes (Giovannetti et al., 1993; Tawaraya et al., 2007). Longtemps décrits comme des appressoria, ce n'est que récemment que le terme « hyphopode » a remplacé celui « d'appressorium » pour décrire les structures observées chez les champignons mycorhiziens arbusculaires (Balzergue et al., 2011). Il est donc important de noter que les appressoria décrits dans les articles antérieurs à cette date et les hyphopodes décrits dans les articles plus récents sont les mêmes structures.

Le mécanisme d'adhésion et de pénétration de l'hyphopode diffère sur plusieurs points de celui de l'appressorium. Une fois le contact établi entre le champignon et la plante, l'hyphopode est différencié pour permettre l'adhésion du champignon à la surface racinaire. Cette adhésion se fait au moyen de protrusions émises par l'hyphopode qui vont s'enchâsser dans les couches externes de la paroi cellulaire de la plante (Bonfante & Genre, 2010) (**Figure 11**). Une fois l'hyphopode formé, il y a une pause de quatre à six heures dans la croissance fongique durant laquelle les tissus de la plante se préparent à la colonisation avant l'élaboration de l'hyphe de pénétration (Genre et al., 2005). En effet, la formation de l'hyphopode déclenche une grosse accumulation de cytoplasme dans les cellules épidermiques et corticales externes de la plante nommée « Appareil de pré-pénétration » (APP). La pénétration fongique survient lorsque le champignon reprend sa croissance et suit strictement la route définie par cet APP de l'épiderme de la plante jusqu'à son cortex interne (Bonfante & Genre, 2010; Deising, 2009).

Ainsi malgré les divergences de mécanisme d'action avec l'appressorium, l'hyphopode est une structure dédiée à l'adhésion et à la pénétration adaptée aux besoins des champignons arbusculaires. Elle rentre de ce fait dans le cadre de la définition d'un appressorium donnée par Emmett & Parbery, et est ainsi considérée par beaucoup comme une forme particulière d'appressorium (Liu, 2012a; Varma et al., 2017).

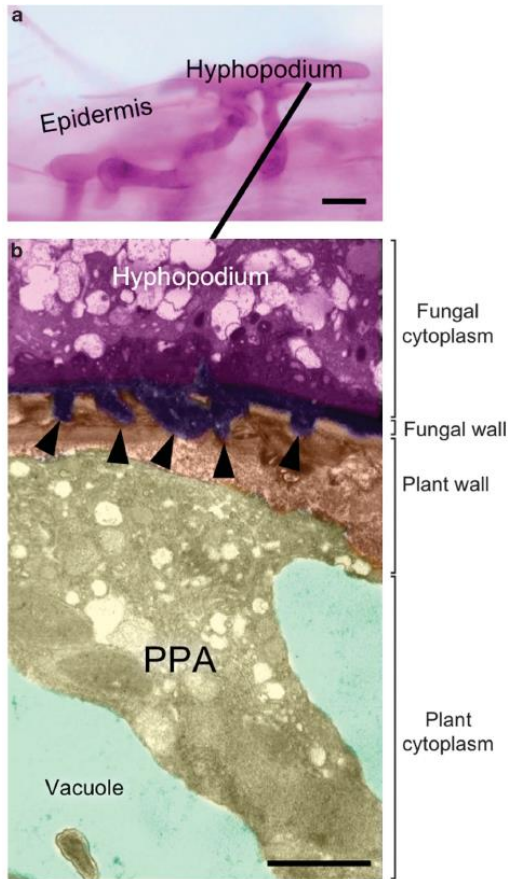


Figure 11 : Adhésion de l’hyphopode à l’épiderme racinaire dans les mycorhizes arbusculaires.

A : Hyphopode de *G. gigantea* sur épiderme racinaire de carotte, coloré à la fuchsine acide.

B : cliché en microscopie électronique à transmission montrant les protrusions émises (flèches noires) par l’hyphopode permettant son adhésion à la paroi racinaire. L’APP (PPA) formé par la plante suite au contact avec le champignon est constitué par une large colonne de cytoplasme traversant la vacuole sous l’hyphopode.

D’après Bonfante & Genre, 2010.

d. L’appressorium de *Podospora anserina*

Pendant très longtemps, la question de l’existence d’un appressorium chez les espèces saprotrophes telles que *P. anserina* ne s’est pas posée, car le mode de vie de ces espèces ne requiert pas à première vue de pénétrer un hôte. Ces espèces étant connues comme de puissants dégradeurs de biomasse, les recherches se sont donc naturellement portées sur leurs capacités enzymatiques. Ainsi, ce n’est que récemment qu’une structure similaire à l’appressorium a été identifiée au laboratoire chez *P. anserina*. Nommée dans un premier temps « appressorium-like », cette structure est différenciée par le champignon lorsqu’il pousse sur une couche de cellophane, un polymère de cellulose « mimant » la paroi cellulosique des plantes (**Figure 12**) (Brun et al., 2009). Comme nous avons pu le voir précédemment, les appressoria peuvent se présenter sous différentes morphologies, tant qu’elles remplissent leur fonction d’adhésion et de pénétration. Dans une optique de cohérence et de clarté, et tout en respectant la large définition donnée par Emmett & Parbery, j’ai renommé cette structure « appressorium » pour la suite du manuscrit.

Lorsque *P. anserina* croît sur un milieu minimum standard recouvert par cette couche de cellophane, les hyphes se réorientent afin de créer des points de contact, légèrement renflés, avec la surface à pénétrer. *P. anserina* différencie alors un hyphe de pénétration, extrêmement fin (1,5 μm de diamètre environ) qui va permettre au champignon de pénétrer l'épaisseur de la cellophane d'environ 10 μm (Brun et al., 2009). Cette étape est suivie par l'invasion de la cellophane et la différenciation d'une structure intra-cellophane tout d'abord appelée structure palmée que j'ai renommé « haustorium-like », en référence à l'haustorium, une structure différenciée par certaines espèces de champignons biotrophes qui permet d'absorber l'eau et les nutriments des cellules (Bushnell, 1972).

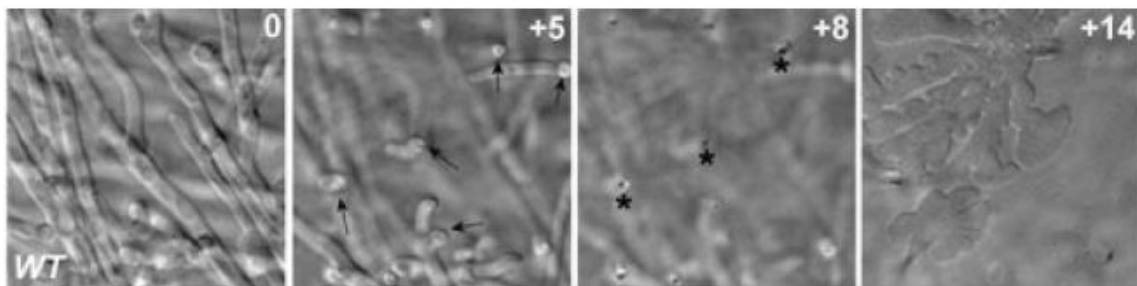


Figure 12 : La pénétration de la cellophane par *Podospora anserina*.

Après 3 jours de croissance sur cellophane, la souche sauvage crée des points de contact avec celle-ci (indiqués par des flèches) qui vont donner des hyphes de pénétration très fins (indiqués par des astérisques) qui vont transpercer la couche de cellophane et croître à l'intérieur jusqu'à différencier un haustorium-like. Les chiffres indiquent la distance en μm par rapport au premier cliché. D'après Brun *et al.*, 2009.

Dans le cas présent, cette structure dont la morphologie ressemble à celle des haustoria, permettrait au champignon d'assimiler les nutriments contenus dans la cellophane pour continuer de croître dans l'épaisseur de cellophane. A partir de ces haustoria-likes, de nouvelles hyphes de pénétration sont émises et de nouveaux haustoria-likes formés, plus profondément dans la cellophane. Simultanément, les haustoria-likes s'étendent radialement, envahissant littéralement l'épaisseur de la cellophane. Cette croissance intra-cellophane aboutit au transpercement du film de cellophane (d'une épaisseur d'environ 50-60 μm) en 2 à 3 jours. Il est important de mentionner que ce processus de différenciation morphologique est accompagné par la digestion enzymatique de la cellophane par *P. anserina*, cette dernière pouvant constituer l'unique source de carbone pour le champignon (Brun et al., 2009). Ce mode de pénétration présente des similitudes à celui retrouvé chez certaines pourritures molles, telles

que les espèces du genre *Chaetomium*. Ces champignons s'attaquent au bois en différenciant des microhyphes de pénétration qui sécrètent également des cellulases (Goodell et al., 2008). Une fois le bois pénétré, les microhyphes se réorientent afin de croître en parallèle des microfibrilles de cellulose.

2. Mécanismes moléculaires de formation de l'appressorium

Ici, je vais présenter les éléments moléculaires connus lors de la formation de l'appressorium notamment sur le plan de la signalisation, et les modifications sur le plan du cytosquelette. Comme évoqué précédemment, la plupart des données présentées ont été obtenues chez le modèle phytopathogène *M. oryzae*.

a. Initiation de la formation de l'appressorium

Chez *M. oryzae*, le contrôle de l'initiation de la formation de l'appressorium dépend de différents facteurs physico-chimiques tels que l'hydrophobicité de la surface, sa rigidité, et de la présence d'eau libre (Wilson & Talbot, 2009). Sa différenciation est notamment régulée par la progression du cycle cellulaire (Saunders et al., 2010). En effet, chaque compartiment de la conidie tricellulaire contient un noyau. Le noyau de la cellule de laquelle émerge le tube germinatif va alors migrer dans ce tube, et y subir une mitose, quatre à six heures après la germination. Après cette mitose, un des noyaux fils migre dans l'appressorium en cours de formation tandis que l'autre retourne dans la conidie où il sera dégradé avec les deux autres noyaux par autophagie. Ces deux étapes sont indispensables pour la formation de l'appressorium (Veneault-Fourrey et al., 2006a). De plus, le blocage de la réplication de l'ADN (phase S) au niveau des tubes germinatifs par des moyens chimiques empêche la différenciation de l'appressorium à leur apex (Saunders et al., 2010). Par conséquent, la maturation et notamment la mélanisation de l'appressorium dépendent de l'entrée de ce noyau en phase G2 puis en mitose. Ce contrôle du cycle cellulaire sur le développement de l'appressorium semble être un processus conservé chez les autres champignons, puisque chez *U. maydis*, un arrêt du cycle cellulaire en G2 est indispensable à la production de l'appressorium (Castanheira & Pérez-Martín, 2015).

b. Le remodelage du cytosquelette durant la formation de l'appressorium

Chez *M. oryzae*, un des composants cellulaires clés du fonctionnement de l'appressorium sont les septines. Ces protéines sont des guanosine tri-phosphatases (GTPases) conservées chez la levure et l'Homme, et impliquées dans les phénomènes de cytokinèse et de détermination de la polarité cellulaire (Spiliotis & Nelson, 2006). Elles sont notamment considérées comme étant à la base de l'orientation et de la réorganisation du cytosquelette, déterminant ainsi la forme cellulaire (Saunders et al., 2010). Il a ainsi été montré chez *M. oryzae* que les septines forment un anneau au niveau du pore à la base de l'appressorium duquel émerge le peg de pénétration (**Figure 13**) (Dagdas et al., 2012). En effet, les septines s'assemblent en un complexe hétéro-oligomérique toroïdal qui confère une rigidité corticale permettant à la membrane de s'incurver et la protrusion du peg de pénétration. La formation de ce complexe dépend de deux protéines : Cdc42, impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire, et Chm1, orthologue de Cla4 chez *S. cerevisiae* et impliquée dans la cytokinèse (Dagdas et al., 2012). De plus, cet anneau forme une barrière de diffusion qui permet notamment de localiser deux protéines essentielles pour l'organisation du réseau d'actine au point de pénétration : Las17 et Rvs167 (Dagdas et al., 2012).

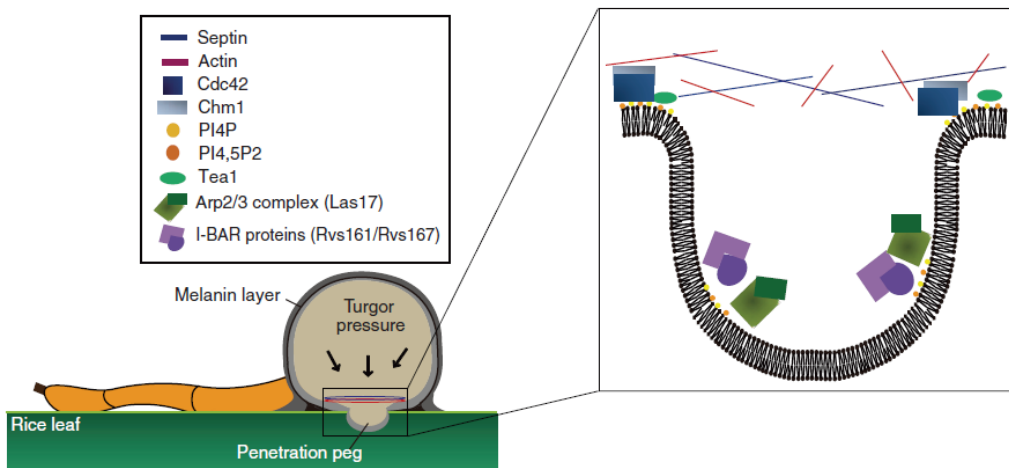


Figure 13 : Formation de l'anneau de septine et du réseau d'actine au pore de l'appressorium chez *M. oryzae*. En plus des partenaires précédemment mentionnés, les phosphatidylinositides associés à la membrane plasmique contribuent également à structurer le réseau d'actine.

Modifié à partir de Dagdas *et al.*, 2012.

Cet anneau constitue également le centre organisateur du réseau d'actine filamentaire (actine F) qui rigidifie le pore et l'hyphe de pénétration naissant. Afin de structurer le réseau

d'actine, les septines recrutent Tea1, une ezrin-radixin-moesin protein (ERM) (Dagdas et al., 2012). Les protéines appartenant à la famille ERM sont impliquées dans la réticulation du réseau d'actine. La rigidité conférée par le réseau d'actine est une condition indispensable à la pénétration de la cuticule par le champignon. D'autre part, il est à noter que ces septines semblent être régulées par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) produites par les NADPH oxydases (Nox).

c. Les Nox et leur impact dans le remodelage du cytosquelette

Les Nox constituent un groupe de flavoenzymes, responsables de la production d'anions superoxydes O_2^- , issu de la réduction du dioxygène en utilisant les électrons fournis par le NADPH. Absentes chez les procaryotes, ces enzymes sont retrouvées chez un grand nombre d'espèces eucaryotes multicellulaires (Lalucque & Silar, 2003). Chez les mammifères, la génération d'ERO par cette enzyme requiert l'assemblage d'un complexe constitué de plusieurs sous-unités incluant des régulateurs cytoplasmiques (Rac1/2, p40^{phox}, p47^{phox} et p67^{phox}) ainsi qu'un hétérodimère composé de la sous-unité catalytique gp91^{phox} et de la protéine adaptatrice p22^{phox} (**Figure 14**) (Scott, 2015). L'adaptateur p22^{phox} est essentiel à l'activité catalytique de gp91^{phox}. Les sous-unités p40^{phox} et p47^{phox} permettent quant à elles de recruter le régulateur p67^{phox} de la sous-unité catalytique. La fixation de Rac à p67^{phox} permise par la conversion de Rac-GDP en Rac-GTP à l'aide d'un Facteur d'échange de GTP (FEG) contribue à l'activation du complexe Nox (Scott, 2015).

Chez les champignons, on retrouve notamment deux homologues de gp91^{phox} qui sont largement distribués parmi les divers taxa fongiques : NoxA et NoxB, aussi nommés respectivement Nox1 et Nox2 selon les espèces (Aguirre et al., 2005; Takemoto et al., 2007). Ces deux isoformes jouent des rôles majeurs dans des processus cellulaires et développementaux distincts (Scott, 2015; Tudzynski et al., 2012). Nox1/A de son côté est impliqué dans le développement des fructifications, de l'appressorium, la croissance des hyphes chez les champignons symbiotiques et dans les réactions de défense inter-espèces. Nox2/B est quant à lui requis pour la germination des ascospores mélanisées et joue un rôle clé dans le développement de l'appressorium chez les phytopathogènes et le saprotrophe *P. anserina* (Brun et al., 2009; Malagnac et al., 2004). Le fonctionnement de ces deux complexes fait également intervenir des régulateurs cytoplasmiques ainsi qu'une protéine adaptatrice.

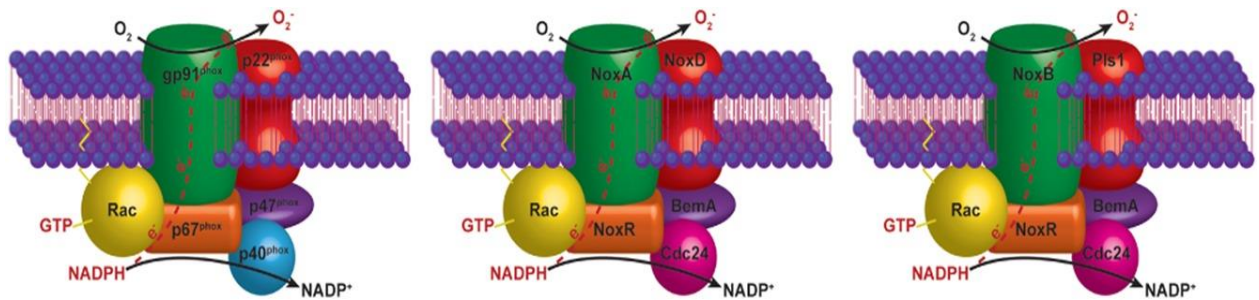


Figure 14 : Conservation des complexes NADPH oxydases de mammifères (à gauche) et fongiques (au milieu et à droite).

D'après Scott, 2015

Chez la plupart des champignons, on retrouve l'homologue de $p67^{phox}$: NoxR. Malgré leur homologie, NoxR est dépourvu des séquences permettant de fixer les protéines semblables à $p40^{phox}$. Cette absence est corroborée par l'absence d'homologues à $p40^{phox}$ et $p47^{phox}$ dans les génomes fongiques (Scott, 2015). Des expériences d'interaction protéine-protéine ont montré que les protéines Bem1 (ou BemA) et Cdc24 interagissent entre elles et avec NoxR chez les champignons, supportant l'hypothèse qu'elles font partie des complexes Nox fongiques (Scott, 2015). Cependant on note des différences sur la protéine adaptatrice entre les complexes. Pour le complexe Nox1, l'adaptateur est constitué par l'homologue de $p22^{phox}$ nommé NoxD, identifié chez *P. anserina* et *B. cinerea* (Lacaze et al., 2015; Siegmund et al., 2015). Il a de plus été montré que NoxD est l'orthologue de Pro41, une protéine de la membrane du réticulum endoplasmique impliquée dans le développement des fructifications chez *S. macrospora*, soutenant l'hypothèse de son implication dans le complexe Nox1 (Lacaze et al., 2015; Nowrousian et al., 2007). Cependant, NoxD n'interagit jamais avec le complexe Nox2, qui serait quant à lui associé à la téraspanine Pls1 (Lambou et al., 2008). Il s'agit d'une petite protéine membranaire très répandue chez les animaux ainsi que chez les ascomycètes et les basidiomycètes, connue pour réguler des activités cellulaires en interagissant avec d'autres composés membranaires (Clergeot et al., 2001).

Bien qu'aucune interaction physique n'ait été mise en évidence entre Nox2 et Pls1, cette dernière est requise pour les mêmes étapes de différenciation que Nox2, suggérant son implication dans ce complexe (Scott, 2015). Des expériences menées lors de la formation de l'appressorium chez *M. oryzae* montrent que Nox2 et les ERO qu'elle produit régulent la formation de l'anneau de septines au pore de l'appressorium (Ryder et al., 2013). De plus, NoxR est également requis pour l'assemblage de cet anneau de septines (Ryder et al., 2013).

Pls1 semble quant à elle nécessaire pour la repolarisation cellulaire lors de la formation du peg de pénétration à la base de l'appressorium (Veneault-Fourrey *et al.*, 2006b). Son impact sur la formation de l'appressorium est à première vue conservé, puisque ses orthologues chez *B. cinerea* ainsi que chez *P. anserina* sont également requis pour la formation de l'appressorium (Brun *et al.*, 2009; Gourgues *et al.*, 2004).

Le complexe Nox1, est lui impliqué dans la formation du réseau d'actine cortical, requis pour l'élongation de l'hyphe de pénétration (Ryder *et al.*, 2013). Il a notamment été montré que NoxD, est nécessaire à la formation de l'anneau de septines, indispensable à la formation du peg de pénétration (Galhano *et al.*, 2017). Les résultats suggèrent que le complexe Nox2 initie la formation de l'anneau de septines et que NoxD agit en amont pour recruter Nox1 et stabiliser le complexe septines/actine formé (Galhano *et al.*, 2017). Par ailleurs, l'expression de NoxD est régulée par un couple de facteurs de transcription : Tpc1 et Mst12, eux-mêmes contrôlés par la voie *Pmk1* que nous allons détailler juste après (Galhano *et al.*, 2017). L'importance des Nox dans la formation de l'appressorium se retrouve aussi chez *P. anserina*, pour lequel l'inactivation de *PaNox2*, *PaNox1*, *PaNoxR* et *PaNoxD* entraîne une incapacité à produire un appressorium fonctionnel (**Figure 15**) (Brun *et al.*, 2009; Lacaze *et al.*, 2015).

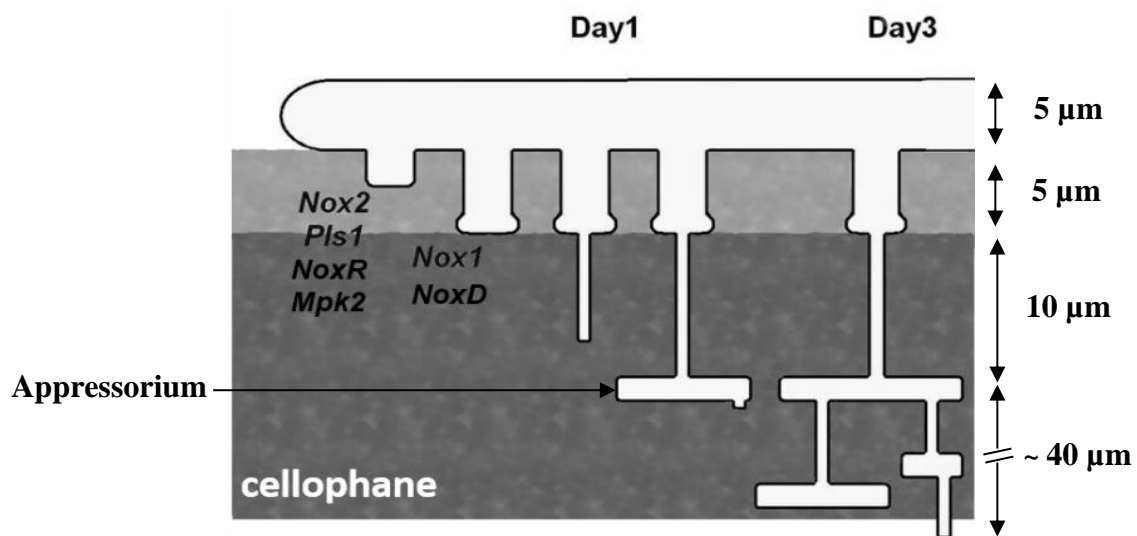


Figure 15 : Les acteurs de la pénétration de la cellophane chez *Podospira anserina*.

Les gènes *Nox2*, *Pls1*, *NoxD*, *NoxR* et *Mpk2* sont nécessaires à la réorientation des hyphes pour créer des points de contact avec la cellophane. *Nox1* et *NoxD* sont quant à eux requis pour différencier l'hyphe de pénétration nécessaire à la perforation de la cellophane.

Modifié à partir de Brun *et al.*, 2009.

La capacité des champignons filamenteux à développer un appressorium serait donc un caractère ancestral conservé au cours de l'évolution (Brun et al., 2009; Lambou et al., 2008).

d. Signalisation cellulaire dans la formation de l'appressorium

Sur le plan de la signalisation cellulaire, la voie de la mitogen-activated protein kinase (MAPK) *Pmk1*, orthologue de *Fus3* chez la levure *S. cerevisiae* et de *PaMpk2* chez *P. anserina*, ainsi que la voie de l'AMP cyclique (AMPC) sont essentielles à la formation et la maturation de l'appressorium, ainsi qu'à la croissance invasive des hyphes chez *M. oryzae* (Xu & Hamer, 1996). Les voies de signalisation MAPK occupent un rôle central dans le « sensing » de signaux extracellulaires en permettant de relayer l'information sous forme de messenger moléculaire qui va induire la régulation de certains gènes en réponse à la nature de ce signal. La voie AMPC/PKA est quant à elle requise dans la mobilisation des réserves lipidiques et la lipolyse pour générer du glycérol, dont l'accumulation induit une augmentation de la pression de turgescence chez *M. oryzae* (Thines et al., 2000). De ce fait, la délétion de la *Cpka*, la sous-unité catalytique de la PKA, entraîne un retard de différenciation de l'appressorium. Par ailleurs, la voie Ras semble agir en amont de la voie *Pmk1* et de l'AMPC. Les protéines Ras sont des GTPases connues pour leur rôle dans la transduction des signaux cellulaires en lien avec les protéines G (Cox & Der, 2010). Il a ainsi été montré que la génération d'un allèle constitutivement actif de *Ras2* (*RAS2^{G18V}*) provoque la formation d'un appressorium anormal en l'absence des stimuli de surface normalement requis pour sa différenciation (Zhou et al., 2014). De plus, cette même équipe a obtenu les mêmes résultats en exprimant cet allèle *RAS2^{G18V}* chez *C. graminicola* et *C. gloeosporioides*, ce qui suggère une conservation de la signalisation RAS/MAPK entre ces espèces. Cette conservation du rôle de la voie RAS/MAPK/AMPC se confirme chez de nombreuses autres espèces proches. En effet, la délétion de l'orthologue de *Pmk1* chez *B. bassiana* (*BbMPK1*), *P. anserina* (*PaMpk2*), *Cochliobolus heterotrophus* (*CHK1*) et *Colletotrichum lagenarium* (*Cmk1*) induit une incapacité à produire un appressorium fonctionnel chez ces espèces (Brun et al., 2009; Lev et al., 1999; Takano et al., 2000; Zhang et al., 2010). D'autre part, l'implication de la voie AMPC dans la formation du coussin d'infection chez *B. cinerea* a aussi été montrée, bien que la connexion entre cette voie et la voie RAS/MAPK ne soit toutefois pas encore clairement établie (Hegedus & Rimmer, 2005; Jurick & Rollins, 2007). Il est à noter aussi que la délétion de la protéine kinase A (PKA) de classe I de *M. anisopliae*, une enzyme clé du système de

transduction dépendant de l'AMPC, provoque des effets similaires à ceux observés chez les phytopathogènes lorsque cette voie est impactée : formation retardée d'un appressorium dysfonctionnel car incapable d'accumuler de la pression de turgescence (Fang et al., 2009).

En amont de ces voies RAS, AMPc/PKA et MAPK, la perception des signaux extérieurs et leur transduction se fait par l'intermédiaire des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (Martín et al., 2019). Le premier RCPG caractérisé pour son implication dans la formation et la maturation de l'appressorium est Pth11, identifié chez *M. oryzae*. En effet, la délétion de *Pth11* entraîne une chute drastique du taux de formation d'appressoria par la souche, de l'ordre de 90% comparé à la souche sauvage (DeZwaan et al., 1999). Cependant les quelques appressoria formés sont fonctionnels. Ceci suggère que Pth11 n'est pas requis pour la morphogenèse de l'appressorium, mais plutôt pour la reconnaissance de la surface de l'hôte (DeZwaan et al., 1999). Les auteurs ont ainsi montré que Pth11 induit la formation de l'appressorium en réponse à une surface inductrice. De plus, d'autres RCPG ont été mis en évidence comme essentiels à la perception des signaux extérieurs, mais aussi à la formation d'un appressorium fonctionnel, tels que *WISH*, identifié également chez *M. oryzae*, et *MrGpr8* chez *Metarhizium robertsii* (Sabnam & Roy Barman, 2017; Shang et al., 2020). Il y aurait ainsi plusieurs types de RCPG impliqués dans la transduction des signaux extracellulaires nécessaires à la formation de l'appressorium.

Mais une autre kinase a été récemment mise en évidence chez *M. oryzae* pour son rôle dans la formation de l'appressorium : Sln1 (Ryder et al., 2019). Il s'agit d'une histidine-aspartate kinase senseur, dont l'orthologue chez *S. cerevisiae* est connu pour réguler les adaptations hyperosmotiques via la voie de la MAPK *HOG1* (Tao et al., 1999). Chez *M. oryzae*, la délétion de *OSMI*, l'homologue de *HOG1*, n'entraîne pas de défaut de génération de pression de turgescence, les appressoria formés sont normaux et les souches sont pleinement pathogènes (Dixon et al., 1999). Cependant il a été montré précédemment que Sln1 est nécessaire à la virulence de *M. oryzae* en se localisant au pore de l'appressorium, et ce n'est que récemment que sa fonction a été élucidée (Ryder et al., 2019; Zhang et al., 2010). En effet, les appressoria formés par la souche délétée pour *SLN1* génèrent une très haute pression de turgescence mais ne sont pas fonctionnels (Zhang et al., 2010). De plus, les appressoria de cette souche sont hypermélanisés. Or, l'application d'un stress hyperosmotique provoque une augmentation des dépôts de mélanine chez la souche sauvage de *M. oryzae* (Ryder et al., 2019). Il a ainsi été

montré suite à des analyses RNAseq que *SLN1* régule la mélanisation de l'appressorium une fois qu'assez de pression de turgescence ait été accumulée (Ryder et al., 2019).

A côté de son rôle dans la mélanisation, des expériences d'interaction protéine-protéine ont montré que Sln1 interagit avec de nombreux partenaires différents. Le premier d'entre eux est Sum1, la sous-unité régulatrice de la PKA. En effet, l'expression de *SUM1* est augmentée chez le mutant délété pour *SLN1*, suggérant que Sln1 réprime la voie de la PKA pour réguler la biosynthèse du glycérol (Ryder et al., 2019). D'autre part, Sln1 interagit aussi avec la protéine kinase C (PKC) qui constitue le régulateur central de la voie de l'intégrité cellulaire. Connue pour son rôle d'activateur des complexes Nox, les données de phosphoprotéomique ont permis de confirmer la phosphorylation de NoxR par la PKC (Raad et al., 2009; Ryder et al., 2019). L'activation des Nox par la PKC est nécessaire pour la mise en place de l'anneau de septines. Par ailleurs, la PKC phosphoryle également une phosphodiesterase qui régule négativement la voie PKA : PdeH. PdeH contribue notamment à moduler les niveaux d'AMPc, et participe au couplage entre la PKA, HOG et la voie de l'intégrité cellulaire (Yin et al., 2016). L'ensemble de ces données permet d'établir un schéma de régulation et d'avoir un début de chronologie des évènements chez *M. oryzae* (**Figure 16**).

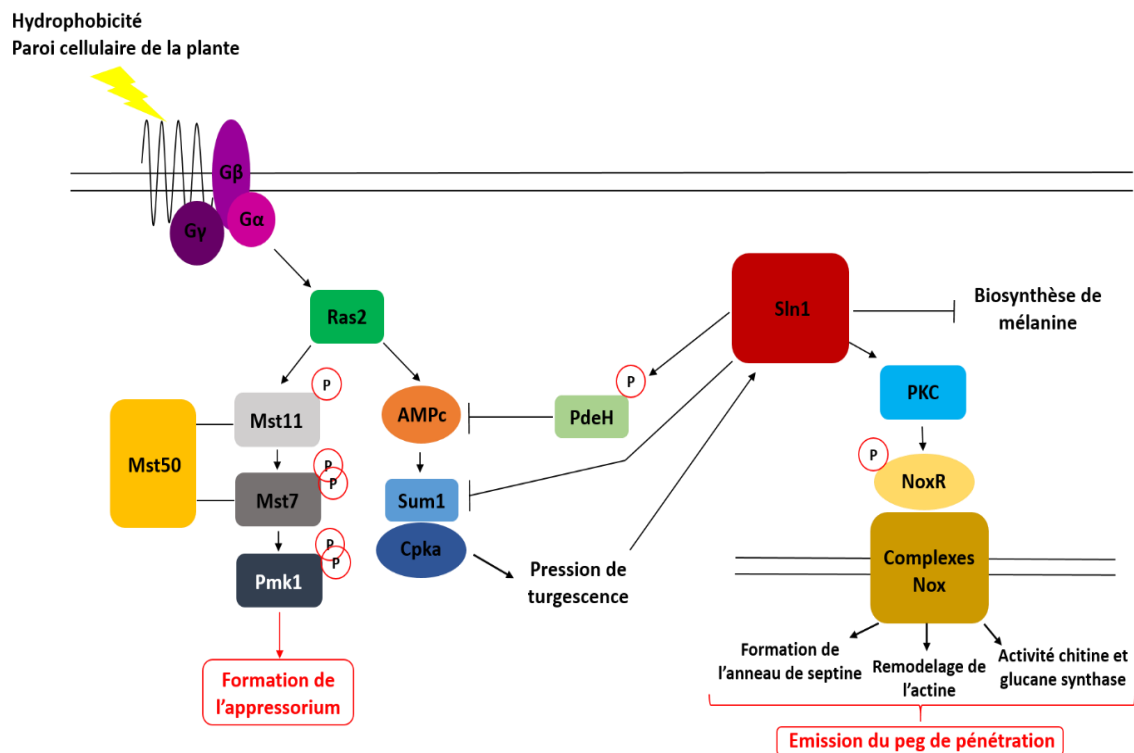


Figure 16 : Schéma récapitulatif de la régulation de la formation de l'appressorium chez *M. oryzae*.

Ce schéma a été construit à partir des données récoltées par Ryder et al., (2019)

Suite à la perception des signaux de surface, la voie AMPc/PKA est activée et permet de commencer à accumuler de la pression de turgescence. Lorsque le seuil de pression de turgescence a été atteint, Sln1 réprime la biosynthèse de mélanine et la production de glycérol en activant la PdeH qui va diminuer les taux d'AMPc et en inhibant directement la PKA par l'intermédiaire de Sum1. L'appressorium cesse alors de gonfler, puis Sln1 interagit avec la PKC pour activer les complexes Nox par l'intermédiaire de NoxR. En parallèle, l'activation de la voie *Pmk1* permet entre autres l'activation du régulateur Tpc1, qui couplé à Mst12 va activer la transcription d'éléments tels que *NoxD* indispensables à l'activation des complexes Nox. Les Nox vont ensuite recruter les septines au pore de l'appressorium, qui vont structurer le réseau d'actine F, ce dernier contribuant à la rigidité du peg de pénétration. Tous ces événements conduisent à la protrusion d'un hyphes de pénétration rigide qui va perforer la cuticule de la plante (Ryder et al., 2019).

Bien que ce schéma ne soit pas exhaustif, il reprend les éléments majeurs de la régulation de la formation de l'appressorium. La kinase Sln1 semble occuper un rôle de régulateur central des différentes voies nécessaires à la différenciation et la maturation de l'appressorium.

e. Métabolisme de la formation de l'appressorium

Au niveau métabolique, le métabolisme lipidique, et plus spécifiquement celui de l'Acétyl-CoA, semble jouer un rôle prépondérant dans l'établissement d'un appressorium fonctionnel. Chez *M. oryzae*, il a été montré que la β -oxydation peroxysomale des acides gras est indispensable à la formation de l'appressorium (Wang et al., 2007). En effet, la délétion de *PEX6*, une protéine essentielle pour la biogenèse des peroxysomes, et donc à la β -oxydation peroxisomale, entraîne une abolition quasi-totale du pouvoir pathogène des souches. Celles-ci forment toujours des appressoria mais anormaux (plus petits et moins mélanisés) et produits à une fréquence bien moindre (Wang et al., 2007). Les peroxysomes sont des organelles présents chez la plupart des organismes eucaryotes, et sont le siège de nombreuses fonctions biochimiques dont la β -oxydation des acides gras (Peraza-Reyes et al., 2010). Leur importance dans la formation d'un appressorium fonctionnel a été confirmée chez un autre champignon phytopathogène, *Colletotrichum orbiculare* (Fujihara et al., 2010).

Le transfert de l'acétyl-CoA ainsi généré par la β -oxydation entre les peroxysomes et les mitochondries à l'aide d'enzymes telles que la Carnitine acétyl-transférase (CAT), est crucial

dans la formation de l'appressorium (Bhambra *et al.*, 2006; Ramos-Pamplona & Naqvi, 2006). Cette enzyme catalyse la conversion de l'acétyl-CoA en acétylcarnitine, par le biais de la L-carnitine. Cette réaction réversible joue ainsi un rôle essentiel dans le métabolisme cellulaire, puisque la L-carnitine qui participe à cette réaction est un métabolite « carrier » qui va, entre autres, transporter les groupements acétyl produits par la β -oxydation peroxysomale vers les mitochondries (Strijbis *et al.*, 2010). Ces groupements acétyl servent ensuite à régénérer les CoA en acétyl-CoA afin d'alimenter les processus métaboliques tels que le cycle de Krebs selon les besoins de la cellule. Pour remplir cette fonction, ces CAT sont localisées dans les peroxysomes et dans les mitochondries (Strijbis *et al.*, 2010). Mais en plus de ce système de transport des produits de dégradation des acides gras par la β -oxydation peroxysomale, il a été montré chez la levure qu'il existe également une CAT cytoplasmique permettant le transport des groupements acétyl par la carnitine lors de leur croissance sur des milieux contenant de l'éthanol ou de l'acétate (Strijbis and Distel, 2010; Strijbis *et al.*, 2010). En effet, lors de la croissance de la levure sur ces sources de carbone, les groupement acétyl produits dans le cytoplasme doivent être transférés à la mitochondrie pour faire fonctionner le cycle de Krebs et aux peroxysomes pour faire fonctionner le cycle du glyoxylate (Strijbis and Distel, 2010; Strijbis *et al.*, 2010). Parmi ces différentes CAT, il a été montré que la délétion de la CAT peroxysomale *Pth2* de *M. oryzae*, qui est régulée par la voie AMPc/PKA, entraîne une incapacité à former un appressorium fonctionnel, associée à un retard d'utilisation des réserves lipidiques et à une distribution anormale de la chitine dans les structures d'infection défectueuses (Bhambra *et al.*, 2006).

Enfin, on peut aussi mentionner le cas de la protéine MLP1 de *M. anisopliae*, homologue des périlipines de mammifères (protéines impliquées dans le stockage des acides gras sous forme de gouttelettes lipidiques), qui est impliquée dans la génération de la pression de turgescence en protégeant les gouttelettes lipidiques de la dégradation par les lipases, qui permettent la rétention des solutés, responsables de la génération de la pression de turgescence (Wang & St Leger, 2007). Il en va de même chez *M. oryzae* pour qui la périlipine LDP1 est importante pour la formation des gouttelettes lipidiques et leur utilisation au cours de la formation de l'appressorium (Cai *et al.*, 2020).

L'appressorium est donc une structure de pénétration aux formes multiples. Selon le mode de vie du champignon, cette structure peut arborer différentes morphologies et caractéristiques qui sont adaptées au mode d'infection de l'hôte. Que ce soit dans un but pathogène ou symbiotique, l'appressorium occupe un rôle central dans la colonisation de l'hôte. Chez de

nombreuses espèces fongiques, sa formation est précédée d'une étape tout aussi cruciale : la germination de la spore.

III – La germination des spores : naissance d'un nouvel individu

Dans de nombreux phyla du vivant, la survie et la propagation des espèces repose sur l'élaboration d'une forme de résistance dispersible qui sous des conditions adéquates à l'espèce, permettra de générer un nouvel individu. Appelées graines chez les plantes et spores chez les champignons et les bactéries, ces structures présentent toutefois des particularités propres à l'espèce qui les produisent. La germination de ces structures est une étape cruciale à pour la survie de l'espèce. Celle-ci ne pouvant se produire que dans des conditions favorables à la croissance, la spore/graine doit pouvoir survivre et résister aux stress en attendant que les conditions soient favorables. Pour ce faire, ces structures sont placées dans un état dit de dormance ou de quiescence qui va leur permettre de persister jusqu'à leur germination. Ces deux états bien que similaires, présentent des différences importantes. De nombreux articles traitent de la dormance et de la quiescence en donnant des définitions différentes selon l'espèce étudiée (Burke et al., 1925; Fenner, 2000; Rocheteau et al., 2015; Velappan et al., 2017). Mais à l'heure actuelle, il n'y a pas de consensus clair établi pour ces deux définitions, celles-ci variant selon le règne étudié. Par soucis de clarté pour ce manuscrit, nous resterons sur une définition générale de ces deux états à l'échelle des spores et des graines données par Raghavan (Raghavan, 2000). La quiescence est un état qui se caractérise par l'incapacité à germer, due à l'absence de conditions environnementales requises à la germination (hygrométrie, température, pH...). La quiescence est donc levée et la spore germe dès lors que les conditions de germination requises apparaissent. A l'inverse, la dormance est définie comme une inhibition interne de la germination d'une graine ou spore qui peut persister même lorsque celle-ci se trouve dans un milieu adéquat pour la germination. Cette inhibition peut être de différentes natures : immaturité de la graine/spore, absence du stimulus de germination : un déclencheur qui peut aussi être de différentes natures (chimique, hormonal, etc.) ou présence d'un inhibiteur de germination. La dormance est ainsi considérée comme une forme particulière de quiescence.

La levée de cette dormance/quiescence est une étape clé pour l'initiation de la germination qui a été historiquement très étudiée chez les plantes et les bactéries et je vais brièvement évoquer les mécanismes qui contrôlent la germination chez ces organismes.

1. La germination des spores bactériennes

Parmi les stratégies de survie développées par les bactéries, la formation de spores est un des processus les plus connus de résistance aux stress environnementaux. Appelé « sporulation », ce mécanisme permet à certaines espèces de former une structure cellulaire dormante hautement spécialisée nommée « endospore » qui va être capable de résister à des conditions physico-chimiques extrêmes pendant des périodes souvent longues. Ces endospores constituent en effet les structures cellulaires les plus résistantes connues (Nicholson et al., 2000). Une fois les conditions favorables à la croissance réunies, ces spores peuvent germer pour reformer une bactérie viable. La sporulation a été largement étudiée et caractérisée chez *Bacillus subtilis* et *Clostridium difficile* (Driks, 2002). Les étapes morphologiques de la sporulation sont conservées entre ces deux espèces (Pereira et al., 2013). L'intérêt de l'étude de cette sporulation et de la germination s'est notamment porté sur les espèces pathogènes de l'homme, puisque les infections causées par les bactéries comme *Bacillus anthracis* ou *C. difficile* commencent par l'ingestion de leurs spores (Mock & Fouet, 2001; Rupnik *et al.*, 2009).

La sporulation est initiée lorsque l'organisme est confronté à une carence nutritive en carbone, phosphate ou azote dans son environnement (Nicholson et al., 2000). La spore ainsi générée présente plusieurs caractéristiques : elle est inactive sur le plan métabolique, montre une grande résistance à la chaleur, aux UV, aux agents oxydants, à la sécheresse ainsi qu'aux radiations gamma, et est extrêmement stable dans le temps (Driks, 2002; Nicholson et al., 2000). La formation de l'endospore se décline en 5 grandes étapes, présentées dans la revue de Higgins & Dworkin, 2012. La dormance métabolique qui caractérise ces endospores est instaurée notamment grâce à une compaction de l'ADN ainsi que par la substitution de l'eau contenue dans le cytosol par un complexe Ca^{2+} -Acide dipicolinique (CaDPA) qui contribue à maintenir la spore en état de dormance et protège la spore des rayonnements UV et de la chaleur (Setlow, 2014a). La faible teneur en eau du cytosol de la spore, empêche le fonctionnement normal du métabolisme (Setlow, 2014a). Ces spores ainsi formées peuvent survivre pendant des années en restant en état de dormance. Mais malgré son état inerte sur le plan métabolique, la spore est tout de même capable de percevoir les changements au sein de son environnement. Certains facteurs vont ainsi pouvoir, une fois perçus par la spore, initier le programme de germination de celle-ci.

Dans la littérature, ces facteurs nommés « germinants », sont distingués en deux grandes catégories : les germinants nutritionnels et non-nutritionnels (Moir & Cooper, 2015). Parmi les germinants nutritionnels, on retrouve des monosaccharides, des acides aminés, des acides organiques, ou encore des sels (Setlow et al., 2017). Les germinants non-nutritionnels quant à eux peuvent être de nature chimique (présence de CaDPA), enzymatiques (lysozyme) ou encore physiques tels que la pression. Les voies mises en jeu pour chaque type de stimulus sont décrites dans la revue de Moir & Cooper, 2015. Il est intéressant de noter que les spores de *C. difficile* vont plutôt répondre aux acides biliaires produits exclusivement dans les intestins de mammifères (Bhattacharjee et al., 2016), suggérant que les modalités de germination dépendent du mode de vie des bactéries. La transition d'une spore dormante à une spore germée par stimulus nutritionnel a été étudié de manière extensive chez *B. subtilis* (Setlow, 2014b). Malgré quelques différences au niveau moléculaire, le processus est sensiblement identique chez les *Clostridiales*. La germination se décline en 5 étapes : l'activation, engagement dans la germination, phase I et II de la germination, puis excroissance (**Figure 17**).

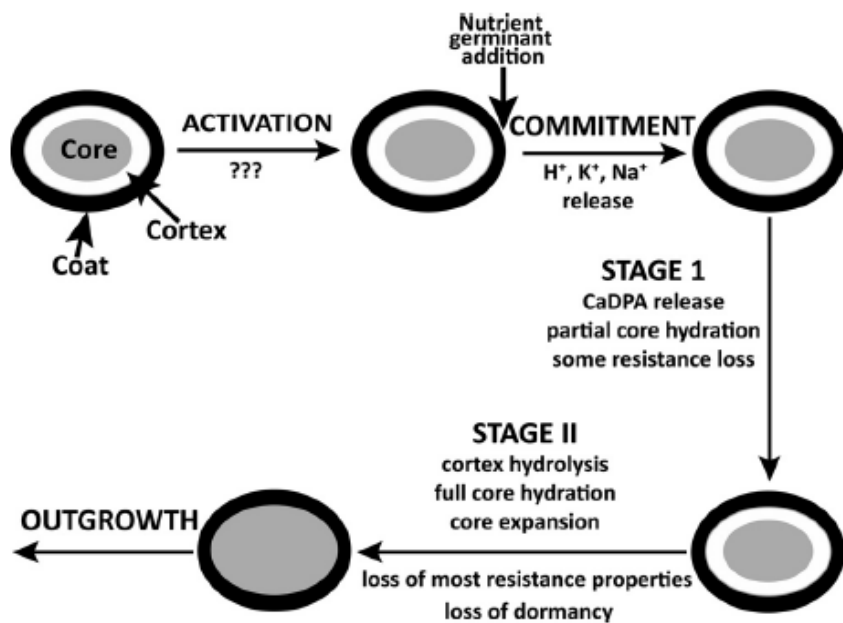


Figure 17 : Schéma de la germination nutritionnelle des spores des espèces de *Bacillus*.

Les événements se déroulant pendant l'activation ne sont pas encore connus et sont donc marqués par des points d'interrogation.

D'après Setlow, 2014b

L'activation est un processus spécifique à l'espèce qui va permettre à la spore de répondre plus rapidement aux germinants. Selon l'espèce, il peut s'agir d'un chauffage sublétal, ou encore d'un stockage prolongé à 4 °C (Moir & Cooper, 2015). Une fois ces spores activées et qu'elles rentrent en contact avec leur germinant, l'engagement dans la germination commence. Cet engagement est défini comme le point de non-retour à partir duquel la spore germera quoi qu'il advienne (Setlow, 2014b). Pour ce faire, le germinant va traverser le manteau et le cortex de la spore afin de se lier avec un récepteur spécifique aux germinants (GR) tels que GerA, qui est exprimé dans la membrane interne de la spore (Moir & Cooper, 2015). Cependant les événements moléculaires responsables de cet engagement ne sont pas encore connus. Une fois que la spore s'est engagée dans la germination, la phase I de la germination commence. Les intermédiaires de transduction du signal ne sont malheureusement pas connus (Moir & Cooper, 2015). Mais l'événement majeur de cette première phase est bien le relargage de CaDPA par la spore dans l'environnement. La perte du CaDPA pour la spore marque le début de la perte de ses capacités de résistance au stress. Cependant à ce stade, le métabolisme n'a pas encore repris. Il ne reprendra qu'au cours de la deuxième phase.

La deuxième phase de la germination consiste en l'hydrolyse du cortex de la spore. L'hydrolyse du cortex aboutit à une réhydratation du cœur de la spore et à une expansion de celui-ci. C'est la réhydratation qui permet aux protéines et aux lipides membranaires de redevenir mobiles, marquant ainsi la fin de la dormance ainsi que des capacités de résistance aux stress de la spore (Moir & Cooper, 2015). La transcription de l'ADN reprend, et des mécanismes de réparation de l'ADN s'activent afin de réparer les éventuels dommages subis par l'ADN (Ibarra et al., 2008). La synthèse d'ATP reprend grâce à la phosphoglycérate mutase activée en phase I. Quant au manteau de la spore, sa dégradation commence en même temps que l'hydrolyse du cortex et va se faire petit à petit au cours de la germination. Des traces de manteau peuvent toujours être observées même après la germination (Moir & Cooper, 2015). Enfin, la reprise du métabolisme permet la synthèse *de novo* de macromolécules, aboutissant à l'excroissance de la spore pour redevenir une cellule végétative. La **Figure 18** résume certains événements moléculaires se déroulant pendant la germination.

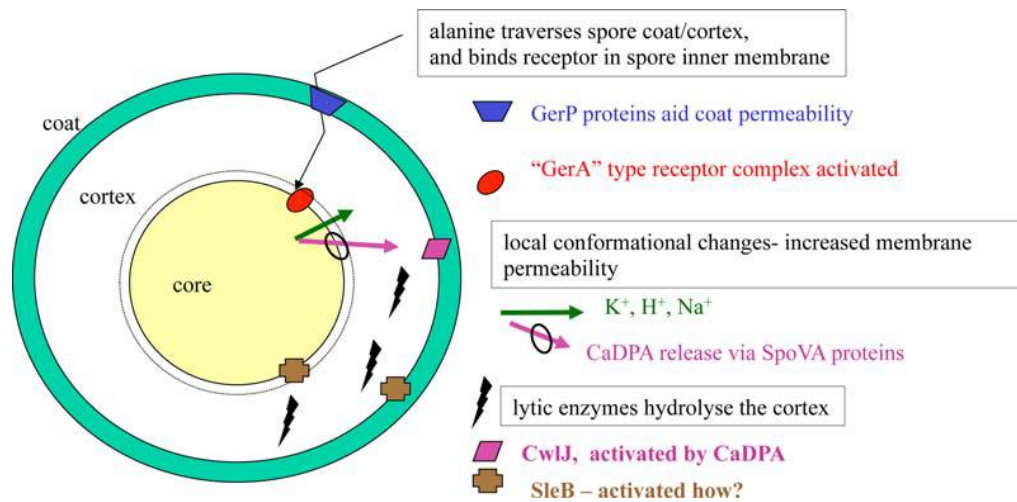


Figure 18 : Schéma représentant les événements moléculaires au cours de la germination.

La fixation du germinant sur GerA entraîne l'activation de la spore. Un relargage massif de cations (K^+ , H^+ , Na^+) se produit alors et permet d'activer la phosphoglycérate mutase. Cette enzyme va métaboliser les réserves de 3-phosphoglycérate, afin générer de l'ATP pendant la phase II (Magill *et al.*, 1996). L'efflux du CaDPA en phase I est principalement opéré par une catégorie de protéines nommées hautement conservées : spoVA (Li *et al.*, 2012). L'hydrolyse du cortex en phase II est quant à elle assurée par deux enzymes partiellement redondantes : CwlJ et SleB (Chirakkal *et al.*, 2002)

D'après Moir & Cooper, 2015.

2. La germination chez les plantes

Les graines sont le résultat de la reproduction sexuée chez les angiospermes (plantes à fleur) et gymnospermes (conifères essentiellement). Contrairement aux spores bactériennes, ce sont des structures pluricellulaires qui assurent ainsi la reproduction des plantes ainsi que leur dispersion. De nombreuses différences existent entre ces deux embranchements au niveau de la structure de la graine ainsi que des modalités de leur germination. Certaines de ces différences sont décrites dans la revue de Linkies *et al.*, (2010). Mais afin de conserver un discours simple et clair, seule la structure de la graine des angiospermes et sa germination seront abordées dans ce manuscrit.

On distingue 3 constituants principaux d'une graine : l'embryon diploïde, qui constitue l'individu en devenir, l'endosperme triploïde, tissu nutritif entourant la graine et le manteau

diploïde, aussi appelé « testa », constitué principalement de cellules mortes, qui va assurer la protection de l'embryon (Figueiredo & Köhler, 2018; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006) (**Figure 19**). A la fin de l'embryogenèse, le programme de maturation de la graine se lance, et celle-ci commence à accumuler des réserves de carbone et d'azote dans les cotylédons, qui assureront la croissance du futur individu (Lafon-Placette & Köhler, 2014). Au cours de cette maturation, les graines acquièrent les moyens de survivre à la dessiccation, et entrent en dormance primaire (Penfield, 2017). Cette maturation est associée à une condensation de la chromatine et une hypoacétylation des histones (Zanten et al., 2011; Zhang et al., 2012). En effet, à l'instar des spores bactériennes, les graines de plantes sont plongées dans un état de dormance une fois produites, leur permettant de résister aux stress environnementaux en attendant le retour de conditions favorables à la germination (Bewley, 1997).

Mais dans le domaine de la biologie de la graine, le concept de dormance est légèrement différent de celui décrit plus haut. Ici, la dormance est définie de manière générale comme un blocage intrinsèque à l'achèvement de la germination d'une graine viable dans des conditions favorables à la germination (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). Ce blocage a évolué différemment selon les espèces, afin de s'adapter au mieux aux conditions environnementales de leur biotope, de sorte que la germination ne se produise que lorsque les conditions d'établissement d'une nouvelle génération de plantes soient réunies (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). Les différents types de blocages (ou mécanismes de dormance) ont été décrits et classifiés par Baskin & Baskin (Baskin & Baskin, 2004).

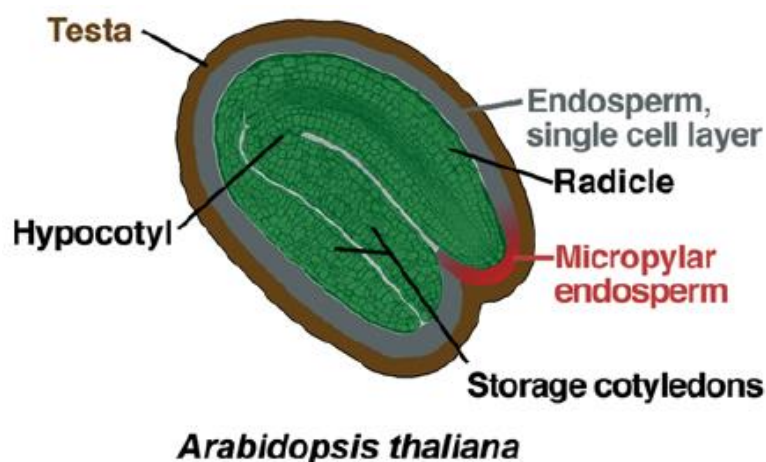


Figure 19 : Structure générale d'une graine de la plante modèle *Arabidopsis thaliana*.

La radicule constitue la racine embryonnaire de la plante. Celle-ci sera la première à émerger de la graine au cours de la germination au travers du micropyle. Au-dessus se trouve l'hypocotyle (ou tige embryonnaire), qui supporte les cotylédons de réserve.

Modifié à partir de Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006.

La dormance joue ainsi un rôle crucial dans l'évolution des plantes à graine et dans l'adaptation aux changements climatiques (Linkies et al., 2010). Elle constitue ainsi la pierre angulaire au cœur de la régulation de la germination de la graine. Chez les plantes, la germination est classiquement décrite en trois phases : l'imbibition, qui correspond à l'absorption rapide d'eau par la graine permettant l'hydratation des tissus et la reprise des activités métaboliques ainsi que de la respiration ; la germination *stricto sensu*, au cours de laquelle on assiste à l'émergence du radicule de la graine et qui se caractérise par un ralentissement de l'absorption de l'eau ; et enfin la croissance qui consiste en l'installation et au développement du plantule et qui se caractérise par une reprise de l'absorption d'eau (**Figure 20**) (Nonogaki et al., 2010).

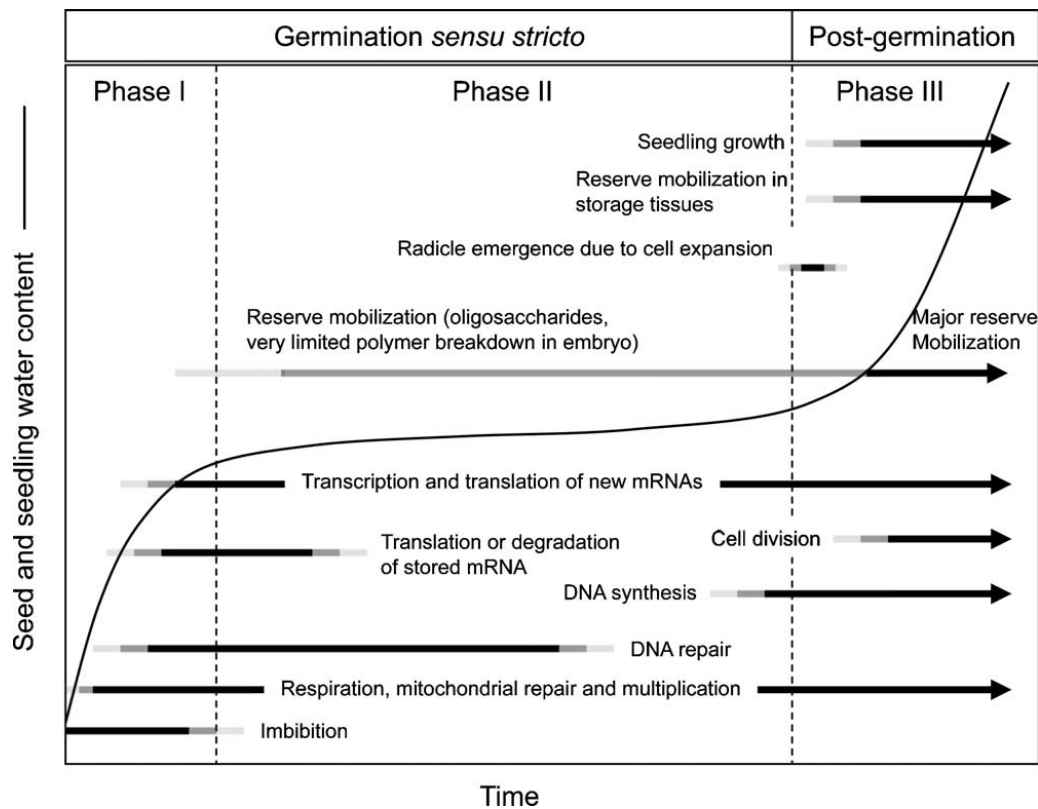


Figure 20 : Les différentes phases de la germination de la graine.

La courbe correspond à la quantité d'eau absorbée par la graine au fil des différentes phases. Les différents processus cellulaires mis en jeu au cours de la germination sont représentés par les barres qui les suivent ou les précèdent.

D'après Nonogaki *et al.* (2010).

Sur le plan moléculaire, peu de choses sont connues quant à régulation et la levée de ces mécanismes de dormance, à l'exception de la dormance physiologique. Les principaux acteurs connus de la régulation de la dormance et de la germination sont deux phytohormones : l'acide gibbérellique (GA) impliqué dans la levée de la dormance et la germination, ainsi que l'acide abscissique (ABA) inducteur et stabilisateur de la dormance (Han & Yang, 2015). L'équilibre ABA/GA détermine ainsi le destin de la graine quant à sa germination. Des taux élevés d'ABA et faibles de GA entraîneront une dormance profonde de la graine, tandis que l'inverse induira la germination. La régulation de la balance ABA/GA est donc le point culminant pour la régulation de la dormance et de la germination chez la graine (Shu et al., 2016).

Bien qu'il reste de nombreuses zones d'ombre sur la signalisation de ces deux hormones, des données suggèrent que les voies MAPK jouent un rôle fondamentale soit en favorisant le maintien de la dormance ou au contraire en favorisant la germination de la graine (Danquah et al., 2014; Liu, 2012; Mao et al., 2019).

3. La germination chez les champignons

Contrairement aux bactéries, les champignons présentent différents types de spores, variant par leur morphologie, leur mode de formation ainsi que par leur résistance aux stress environnementaux et leurs modalités de germination. Ces spores fongiques sont majoritairement unicellulaires, bien qu'il en existe certaines parfois constituées de plusieurs cellules. Par soucis de clarté, je vais simplement distinguer deux types de spores : celles issues de la reproduction sexuée et celles issues de la reproduction asexuée. Pour chacune, je vais dans un premier temps décrire brièvement ces deux types de spores avant d'évoquer leur processus de germination.

a. Les spores asexuelles

Les spores asexuelles (ou mitospores) sont formées suite à une mitose, et sans survenue de méiose, elles sont donc génétiquement homogènes et identiques au « parent » qui les produit ; le plus souvent, elle sont appelées conidies et produites par une structure de reproduction asexuée nommée conidiophore (Peberdy, 1980; Wyatt et al., 2013) On distingue

deux types principaux de mitospores : les sporangiospores et les conidies (Peberdy, 1980). Les sporangiospores sont formées dans les sporanges par clivage cytoplasmique notamment chez les zygomycètes, tandis que le terme « conidie » est utilisé pour décrire de manière plus vaste les autres formes de spores asexuelles. Nous ne nous traiterons ici que le cas des conidies. Certaines espèces sont capables de produire plusieurs types de spores asexuelles. Lorsqu'une espèce produit deux types de conidies de tailles significativement différentes comme *Neurospora crassa*, on les distingue par les termes de macroconidies et microconidies. On peut ainsi mentionner le cas de *F. oxysporum*, qui est capable de produire des macroconidies en forme de banane, des microconidies plus petites, et des conidies à parois épaisses nommées chlamydospores (Iida et al., 2008). Dans le cadre de ce manuscrit, et concernant les spores asexuelles, nous nous concentrerons sur ces conidies et leur mode de germination. La plupart des données dans ce domaine ont été acquises chez le genre *Aspergillus*, mais se généralisent bien aux autres genres (Baltussen et al., 2020).

➤ Structure de la conidie

Les conidies sont produites sur des structures spécialisées appelées « conidiophores » qui peuvent s'élever jusqu'à 100 µm de hauteur (Baltussen et al., 2020). La hauteur atteinte par cette structure permet une dispersion efficace des conidies dans le flux d'air (McCartney & West, 2007). Lorsque la conidie ainsi dispersée atterrit sur un substrat adéquat, celle-ci va germer et reformer un mycélium possédant un patrimoine génétique identique à l'individu ayant généré la conidie (**Figure 21**) (Osherov & May, 2001).

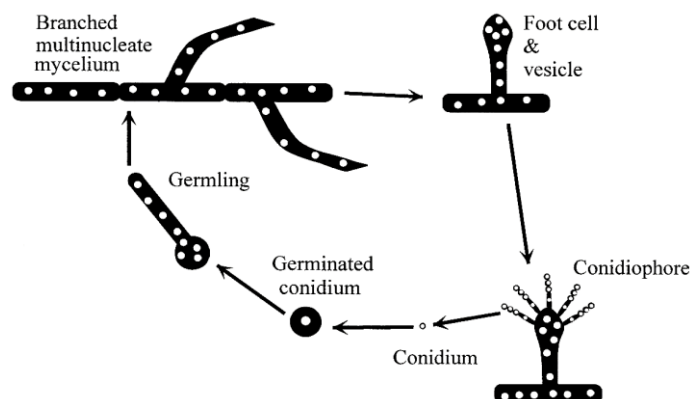


Figure 21 : Cycle de reproduction asexuée du champignon modèle *A. nidulans*.

D'après Osherov & May, 2001.

Afin de survivre jusqu'à la survenue de conditions favorables à la germination, ces conidies se trouvent dans un état de dormance qui va leur permettre de résister à une gamme de stress : thermique, dessiccation, pression osmotique, stress oxydant et UV (Baltussen et al., 2020). Cette dormance est assurée par certains composants de la conidie et peut permettre à une spore de toujours germer même après un stockage d'un an à température ambiante (Lamarre et al., 2008) (**Figure 22**).

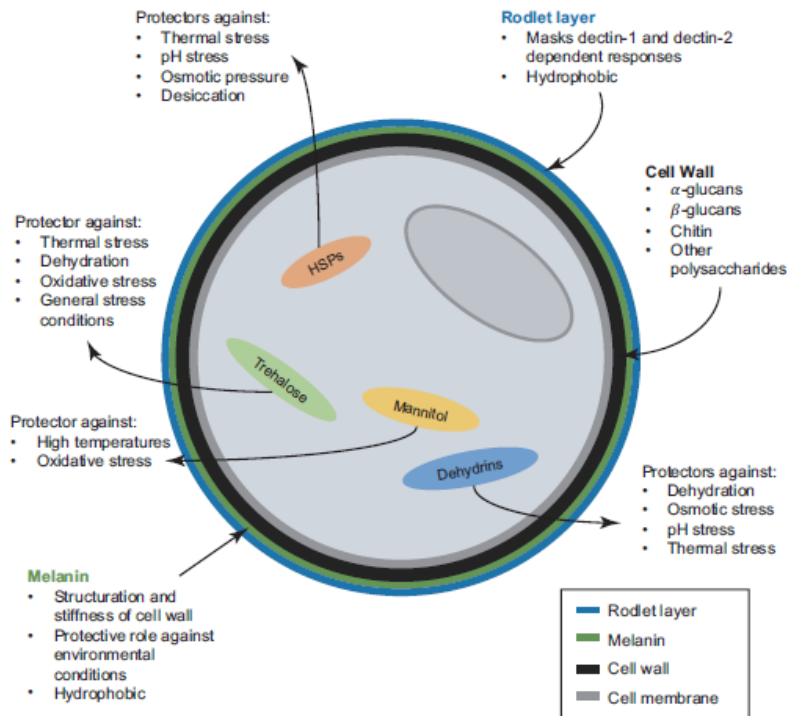


Figure 22 : Représentation schématique d'une conidie et de ses composants contribuant à sa résistance aux stress environnementaux. D'après Baltussen *et al.*, 2020.

Le détail de la résistance fournie par ces solutés et protéines comme est passé en revue par Baltussen et al., 2020. Mais certains de ces composants, tels que le tréhalose et le glycérol, jouent aussi un rôle essentiel dans la germination que nous verrons un peu plus bas. Les mécanismes de germination de la conidie sont aussi variés que le nombre d'espèces différenciant des conidies (Osherov & May, 2001). Néanmoins on peut distinguer trois phases communes à l'ensemble des espèces et auxquelles sont associées des activités métaboliques précises : l'activation, la croissance isotrope et la croissance polarisée (**Figure 23**) (Baltussen et al., 2020; d'Enfert, 1997). Je vais maintenant détailler ces phases sur les plans morphologiques et moléculaires.

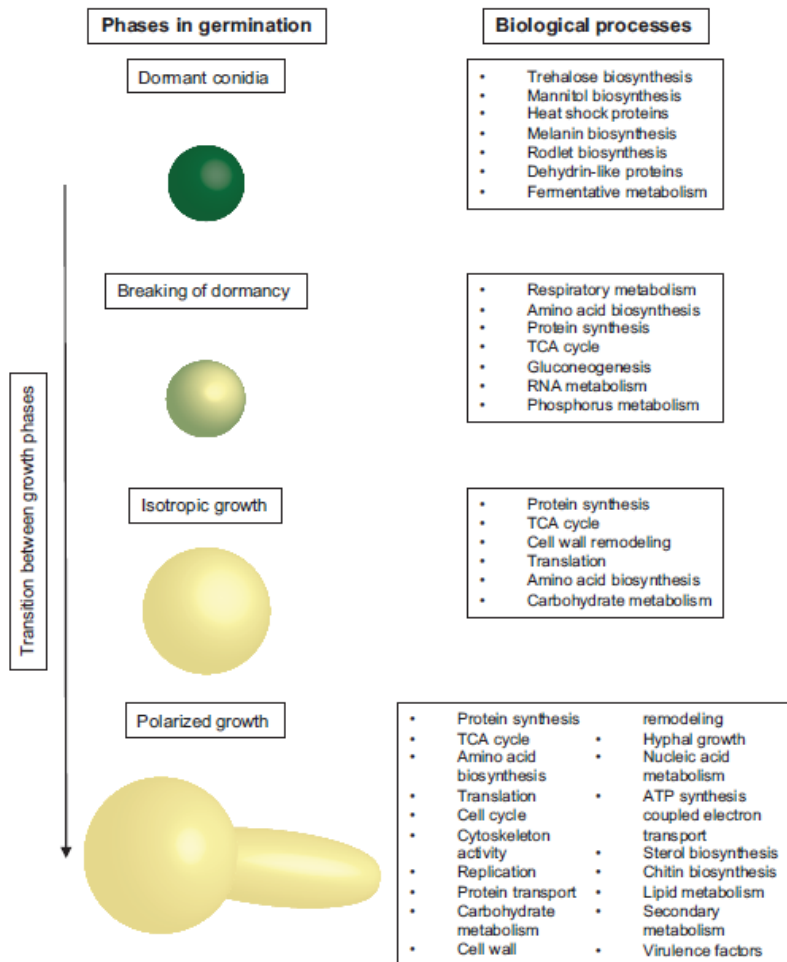


Figure 23 : Transition entre les différents stades la germination de la conidie.

Les processus biologiques importants pour chaque morphotype sont indiqués sur la droite.

D'après Baltussen *et al.*, 2020

➤ L'activation des conidies

L'activation constitue le point de départ de la germination mais ne s'accompagne d'aucun changement morphologique pour la spore. Cette initiation de la germination requiert un ou des signaux externes qui peuvent varier selon les espèces et que nous verrons plus bas. Néanmoins l'eau, l'oxygène et le dioxyde de carbone sont universellement requis (d'Enfert, 1997).

Au niveau moléculaire, l'activation consiste principalement en la levée de la dormance de la conidie. Elle est associée à une augmentation drastique de la synthèse protéique (Lamarre *et al.*, 2008; Oshero & May, 2000). En effet, l'exposition des conidies à des inhibiteurs de la synthèse protéique va bloquer la transition en croissance isotrope, tandis que leur exposition à des inhibiteurs de la synthèse d'ADN ou d'ARN n'empêche pas ce processus (Oshero & May, 2000). Les conidies se servent alors des réserves en ARNm dont elles disposent pour initier leur germination. Des analyses transcriptomiques des conidies dormantes et des conidies

activées ont permis d'identifier quels seraient dans cette réserve d'ARNm, ceux associés à la dormance ou à sa levée et à quels processus moléculaires ils appartiennent. Il a ainsi été montré que les conidies dormantes d'*A. niger* et d'*A. fumigatus* disposent de transcrits correspondant à des gènes impliqués dans la régulation de la traduction, le cycle du glyoxylate, et le métabolisme de l'alcool (qui correspond à du métabolisme fermentaire) (Lamarre et al., 2008; Novodvorska et al., 2013). La présence de pyruvate décarboxylase et d'alcool déshydrogénase dans les conidies dormantes confirme l'importance du métabolisme fermentaire à ce stade (Teutschbein et al., 2010).

Mais après la levée de la dormance, 30 minutes après l'activation, les gènes du métabolisme fermentaire et des activités oxydoréductases sont réprimés au profit de gènes impliqués dans la respiration qui deviennent à leur tour surexprimés : cycle de Krebs, métabolisme des ARN et du phosphore, et synthèse d'acides aminés et de protéines (Lamarre et al., 2008). La levée de la dormance se caractérise ainsi par une augmentation de la biosynthèse de protéines, par un turn-over d'ARN et par un switch d'un métabolisme fermentaire vers un métabolisme respiratoire (Lamarre *et al.*, 2008; Novodvorska *et al.*, 2013).

➤ Croissance isotrope

Une fois la dormance levée, la phase de croissance isotrope débute. Elle marque le premier changement morphologique de la conidie au cours duquel celle-ci va gonfler et se préparer à la croissance hyphale. A l'issue de cette phase, le diamètre de la cellule est multiplié par 2 ou plus (d'Enfert, 1997). Ce processus implique une absorption d'eau et une diminution de la microviscosité du cytoplasme (Van Leeuwen et al., 2010). Il s'accompagne également d'une adhésion augmentée au substrat, traduisant une modification des propriétés de surface (Osherov & May, 2001). Au niveau moléculaire, cette phase se caractérise principalement par un remodelage et une croissance importante de la paroi cellulaire (Baltussen et al., 2020). Les analyses transcriptomiques au cours du gonflement montrent une augmentation du nombre de transcrits de gènes impliqués dans la biosynthèse des parois tels que des chitines synthases (Baltussen et al., 2018; van Leeuwen et al., 2013; Suh et al., 2012). De plus, il a été montré que les gènes impliqués dans la synthèse protéique et le cycle de Krebs sont également induits pendant cette phase (Cagas et al., 2011; Suh et al., 2012). La croissance isotropique est ainsi

caractérisée par une reprise des activités métaboliques nécessaires à la croissance hyphale telles que la synthèse protéique et le métabolisme des glucides (Baltussen et al., 2020).

➤ Croissance polarisée

Enfin, la croissance polarisée se caractérise par des dépôts de paroi polarisés dans la conidie, aboutissant à la formation du tube germinatif à un des pôles de la spore (d'Enfert, 1997). Ces dépôts seraient le résultat de l'établissement d'un axe de polarité au cours de la croissance isotropique, à l'aide de complexes tels que le polarisome ou la petite protéine G Cdc42. Ces complexes sont recrutés au niveau de marqueurs corticaux et créent un site de polarisation au niveau duquel la machinerie morphogénétique va se concentrer pour ajouter du nouveau matériel cellulaire, membranaire et pariétal (Harris, 2006; Momany, 2002). Plusieurs analyses transcriptomiques ont été réalisées sur les conidies à cette étape de leur germination, et sont résumées dans la revue de Baltussen *et al.*, 2020. Bien que ces analyses ne montrent pas toutes les mêmes résultats, il en ressort globalement que les gènes codant des protéines impliquées dans le métabolisme des glucides, la transcription et sa régulation, la biosynthèse des protéines, le transport des protéines, la synthèse de composants de la paroi cellulaire, la réplication et la réparation de l'ADN, la biosynthèse d'acides aminés et le cycle cellulaire sont surexprimés (Baltussen et al., 2020).

➤ Signalisation de la germination des conidies

La signalisation impliquée dans la germination de la conidie prend sa source dans la perception du signal de germination. Chez la plupart des champignons filamenteux ce signal est constitué par des nutriments de faible poids moléculaire tels que des sels inorganiques, des sucres et des acides aminés (Baltussen et al., 2020). Mais ce signal peut varier selon l'espèce. On peut ainsi donner l'exemple de *N. crassa* dont les conidies germent une fois en présence d'une source de carbone et de sel (Schmit & Brody, 1976) tandis que pour les conidies d'*A. nidulans*, la présence de glucose seul suffit à induire la germination (Osheroov & May, 2000). Toutefois il est important de noter que pour ce dernier, le glucose n'est pas exclusif, puisque d'autres sources de carbone telles que le fructose ou l'acétate peuvent induire sa germination (Fillinger et al., 2002). Ce signal peut être assimilé aux germinants nutritionnels chez les bactéries.

La reconnaissance du signal et sa transduction au niveau moléculaire est assurée par la voie des protéines G trimériques (Lafon et al., 2005). Pour cela, un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) capte le signal externe, ce qui entraîne l'activation des protéines G, formées de 3 sous-unités respectivement α (GanB chez *A. nidulans* et GpaB chez *A. fumigatus*), β (SfaD), et γ (GpgA chez *A. nidulans* et GpaA chez *A. fumigatus*). Le détail du mécanisme conduisant à l'activation des protéines G et à la transduction du signal est décrit dans la revue de Li *et al.* (2007). Néanmoins, il est important de noter que chacune des sous-unités joue un rôle essentiel dans la germination. D'un côté, les sous-unités β et γ semblent jouer un rôle dans le processus de germination et dans le métabolisme du tréhalose (Shin et al., 2009). Mais leur rôle dans la transduction du signal semble être indirect puisque l'hétérodimère $G\beta\gamma$ est plutôt impliqué dans l'activation de la sous-unité α (Lafon et al., 2005). La sous-unité α quant à elle, semble jouer un rôle prépondérant dans l'initiation de la germination, puisque son activation constitutive permet d'activer la germination sans signal chez *A. nidulans* (Chang et al., 2004). En effet, il a été montré que cette sous-unité permet l'activation de la voie AMPc/PKA en activant l'adénylate cyclase (AcyA) en réponse au glucose (Lafon et al., 2005).

La voie PKA/AMPc est très bien caractérisée et fait intervenir différents acteurs en cascade. L'adénylate cyclase, catalyse la transformation de l'ATP en AMP cyclique (AMPc). La liaison de l'AMPc sur la sous-unité régulatrice (PKAR ou Sum1 chez *M. oryzae*) de la protéine kinase A (PKA) conduit à son activation en séparant sa sous-unité catalytique (PKAC) de la PKAR (Baltussen et al., 2020). La PKAC phosphoryle alors des cibles cytoplasmiques et/ou nucléaires impliquées notamment dans le métabolisme du tréhalose et dans la croissance du tube germinatif. La PKAR quant à elle est directement impliquée dans l'induction de la germination et de la croissance hyphale (Zhao et al., 2006). Mais cette voie AMPc/PKA, bien que très importante pour la germination, n'est pas pour autant essentielle puisque l'inactivation de l'adénylate cyclase provoque un retard mais pas une absence de germination (Fillinger et al., 2002). Cela peut s'expliquer par l'existence d'une autre voie impliquée dans la germination, en parallèle de la voie AMPc/PKA : la voie Ras (Baltussen *et al.*, 2020; Osherov & May, 2001).

Deux protéines Ras (RasA et RasB) ont été identifiées chez *A. fumigatus* et *A. nidulans*. Chacune de ces protéines joue un rôle différent dans le processus de germination, mais complémentaire : l'allèle dominant négatif de *RasA* réduit considérablement le taux de germination des conidies, tandis que l'allèle dominant négatif de *RasB* retarde leur germination. De plus, il a été montré que RasA régule la germination indépendamment de

l'adénylate cyclase (Fillinger et al., 2002). Enfin, il est important de mentionner que l'implication dans la germination des voies MAPK varie selon les espèces. On peut ainsi mentionner les cas de *Colletotrichum lagenarium* pour lequel la délétion de la MAPK *CMK1* bloque la germination, et *M. oryzae* dont la délétion de la MAPK *Pmk1* n'empêche pas la germination de la conidie (Osherov & May, 2001; Takano *et al.*, 2000).

La dernière voie connue impliquée dans la régulation de la germination est la voie de la calcineurine. La calcineurine est un hétérodimère constitué de 2 sous-unités : CnaA, la sous-unité catalytique et CnaB sa sous-unité régulatoire (Hemenway & Heitman, 1999). Son activité dépend de sa liaison avec un complexe calcium-calmoduline ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) (Fox & Heitman, 2002). La calcineurine semble impliquée dans la germination à plusieurs niveaux. D'une part, la délétion de CnaA et/ou de CnaB entraîne des retards de germination et des défauts de croissance (Baltussen et al., 2020). D'autre part, elle agit en déphosphorylant un facteur de transcription (CrzA) ce qui va permettre sa translocation nucléaire, le rendant ainsi actif. Sa délétion entraîne entre autres de sévères défauts de germination, soulignant son importance dans le processus (Cramer et al., 2008).

Enfin, un des partenaires notables de la calcineurine est la protéine Hsp90, dont le rôle, bien que non documenté, semble important puisque sa répression entraîne des défauts de germination (Lamoth et al., 2012). L'ensemble des données décrites a permis à Baltussen *et al.* (2020) d'établir un schéma récapitulatif des voies de signalisation impliquées dans la germination des conidies chez *A. nidulans* (**Figure 24**).

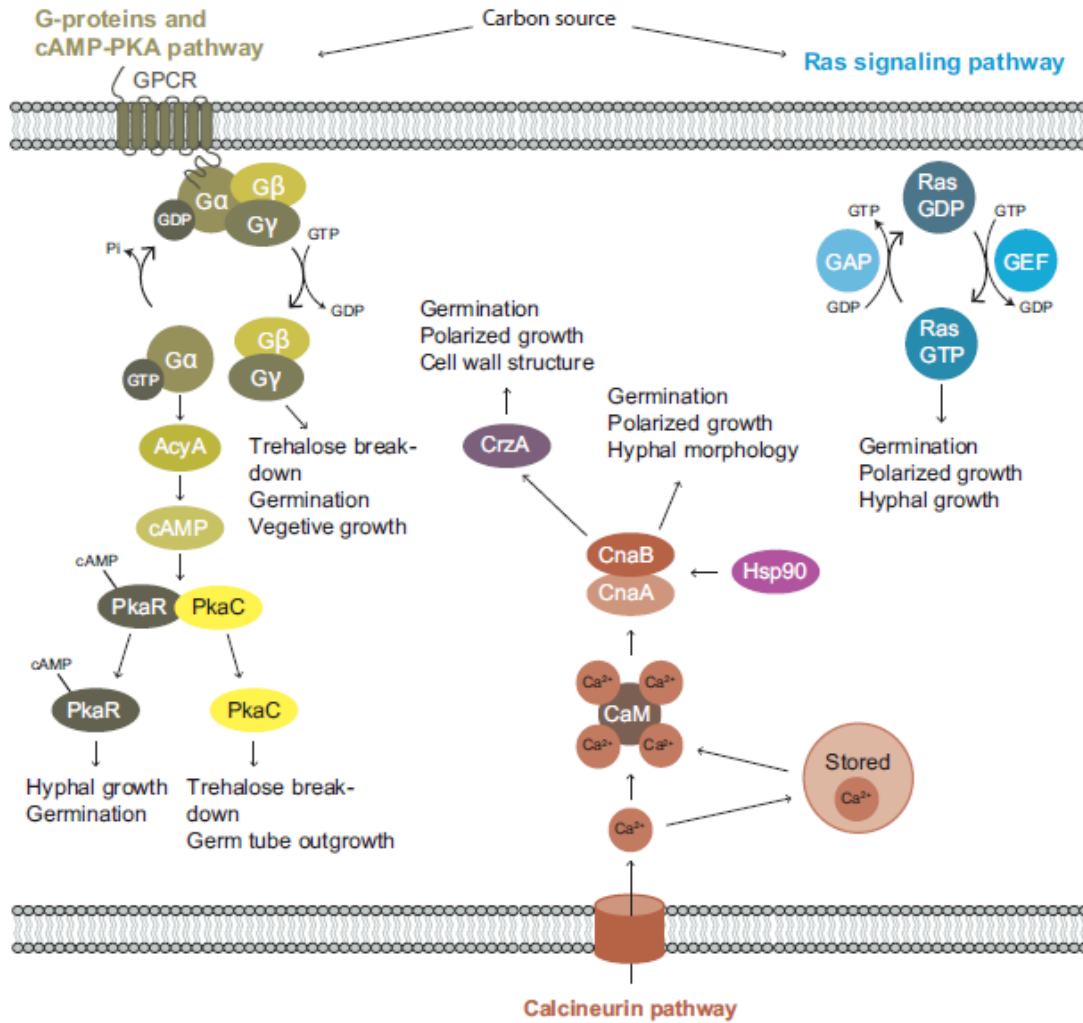


Figure 24 : Les voies de régulation impliquées dans la germination des conidies. On retrouve certains acteurs impliqués dans la formation de l'appressorium, mais qui semblent interagir différemment dans le cas de la germination des conidies.

Ce schéma a été établi à partir des données obtenues chez *A. fumigatus* et *A. nidulans*.

D'après Baltussen *et al.*, 2020

➤ Métabolisme de la germination des conidies

Enfin, sur le plan métabolique, la dégradation de deux osmoprotecteurs contenus dans les conidies est importante pour leur germination : celle du tréhalose et du mannitol. Le tréhalose d'abord, est un disaccharide qui s'accumule dans les conidies dormantes chez de nombreuses espèces telles que *A. nidulans*, ou *N. crassa* et qui contribue à la résistance aux stress thermique et oxydant des conidies (d'Enfert, 1997; d'Enfert et al., 1999). Les transcrits de gènes impliqués

dans la biosynthèse du tréhalose sont en effet retrouvés au sein de conidies dormantes (van Leeuwen et al., 2013). Les réserves de tréhalose ainsi constituées par la spore sont rapidement dégradées une fois la germination induite par la présence d'une source de carbone (d'Enfert & Fontaine, 1997). De plus, leur utilisation systématique au cours de la germination suggère que ce tréhalose constitue la réserve de glucide nécessaire au développement de la spore (Thevelein, 1996). La délétion d'enzymes impliquées dans la chaîne de biosynthèse du tréhalose entraîne la production de conidies non viables et celles qui restent viables montrent de grands retards dans leur germination et leur croissance (Al-Bader et al., 2010).

A l'instar du tréhalose, le mannitol est accumulé par de nombreuses espèces au sein des conidies dormantes afin d'accroître leur résistance au stress (Baltussen et al., 2020). De même, les réserves de ce soluté sont dégradées au cours de la germination, suggérant un rôle similaire à celui du tréhalose (van Leeuwen et al., 2013). Enfin, le métabolisme des acides gras, notamment la β -oxydation peroxysonale et la biosynthèse des peroxysones semblent être réprimés durant la germination (Seong et al., 2008). Les observations menées chez *F. graminearum* ont montré que le nombre de peroxysones dans les spores est corrélé à celui des gouttelettes lipidiques qu'elles contiennent, celles-ci diminuant au cours de la germination. Les peroxysones joueraient ainsi un rôle dans l'utilisation des réserves lipidiques au cours de la germination. Dans une moindre mesure, la β -oxydation mitochondriale semble également impliquée dans la germination. En effet, la délétion de l'Enoyl-CoA hydratase (Ech1), une enzyme impliquée dans le processus de β -oxydation mitochondriale, induit une réduction significative de la germination des conidies chez *M. oryzae* (Patkar et al., 2012).

Ainsi la germination des conidies a été largement décrite et étudiée sur le plan génétique et moléculaire. A l'inverse et malgré l'importance des spores sexuelles dans le cycle de vie des champignons filamenteux, les connaissances sur leur germination sont plus parcimonieuses.

b. Les spores sexuelles

Contrairement aux mitospores, les spores sexuelles permettent d'augmenter la diversité génétique d'une espèce, tout en promouvant la survie au sein d'environnements changeants (Hoekstra, 2005). Aussi appelées méiospores, celles-ci sont formées à l'issue d'une méiose. On en distingue 3 grands types : les ascospores, formées par les champignons ascomycètes, les basidiospores formées par les basidiomycètes, ainsi que les zygosporos formées par les zygomycètes (un ancien groupe paraphylétique regroupant entre autre les *Mucoromycotina* et

les *Glomeromycota*) (Wyatt et al., 2013). Leur nom provient de la structure dont elles sont issues : les asques, les basides et les zygosporanges respectivement. Ces méiospores présentent une grande diversité de morphologies. A l’instar des spores asexuelles, ces spores présentent une capacité de résistance à différents stress : UV, chaleur, froid, radiations, pression, et stress oxydant. Par exemple, les ascospores de *Talaromyces macrosporus* et de *Neosartorya spinosa* peuvent survivre plus d’une heure à 85 °C et survivre à une pression de 600 MPa, faisant d’elles les cellules eucaryotes les plus résistantes aux stress décrites (Wyatt et al., 2013). La résistance est variable selon l’espèce, mais les spores sexuelles résistent globalement mieux aux stress oxydant que les conidies (Wyatt et al., 2013). Toutefois la germination de ces méiospores a été bien moins étudiée que celles des mitospores. Très peu de choses sont connues notamment sur la germination des zygosporanges, que nous n’aborderons pas dans ce manuscrit.

➤ Les basidiospores

Les études menées sur la germination des basidiospores concernent essentiellement les stimuli responsables de leur germination. Feofilova *et al.* (2004) ont montré que la germination des basidiospores du champignon de Paris *Agaricus bisporus* requiert la présence d’une source de carbone et d’azote. Ils ont aussi montré que ces basidiospores contiennent d’importantes quantités de mannitol et de tréhalose. Le stockage de ces spores pendant 5 mois à 20 °C, entraînant une perte de la capacité de germination des spores, associée à une chute drastique de leur contenu en tréhalose, suggère que ce sucre joue un rôle important dans la germination des basidiospores, rappelant celui qu’il occupe dans la germination des conidies (Feofilova et al., 2004). De plus, l’importance du tréhalose dans la germination des basidiospores s’est récemment confirmée chez *Coprinopsis cinerea*. En effet, une analyse transcriptomique menée sur les basidiospores germantes de ce champignon a permis d’identifier les gènes surexprimés après 12h et 24h de germination (Lau et al., 2020). Durant la germination précoce, les gènes impliqués dans le métabolisme du glucose (glycolyse et néoglucogenèse), le métabolisme carboné, la phosphorylation oxydative, le cycle de Krebs, et le métabolisme du pyruvate étaient surexprimés. Ce n’est que dans la phase tardive de la germination et qu’une fois que les gènes du métabolisme du glucose et du métabolisme carboné sont réprimés que les gènes du métabolisme protéique (biosynthèse et dégradation) deviennent surexprimés (Lau et al., 2020). Mais de manière intéressante, c’est tout au long de la germination et de la croissance du tube

germinatif que la tréhalase impliquée dans la dégradation du tréhalose en D-Glucose est surexprimée. Ceci souligne l'importance du métabolisme de ce sucre dans la germination.

Ainsi les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la germination des basidiospores serait très similaire à celle observée pour les conidies : seul le timing d'activation de la synthèse protéique semble différent (Lau et al., 2020). Il est important de noter que les auteurs de cet article ont montré l'importance de la régulation post-transcriptionnelle par les micro-ARN-like (miRNA) dans le contrôle de la germination. Parmi eux, on peut donner l'exemple du cci-milR-37 qui réprime la production de tréhalose-6-phosphate durant la germination. L'ensemble de ces données ont permis aux auteurs d'établir un schéma de la régulation de la germination des basidiospores de *C. cinerea* avec les éléments connus (**Figure 25**).

➤ Les ascospores

Chez les ascomycètes, les données concernant la germination des ascospores restent parcellaires. Toutefois, l'étude de certaines espèces modèles ascomycètes a tout de même permis d'apporter un éclairage sur les mécanismes moléculaires de germination de ces spores. C'est notamment le cas de *P. anserina*, une espèce modèle pour l'étude de la reproduction sexuée chez les ascomycètes.

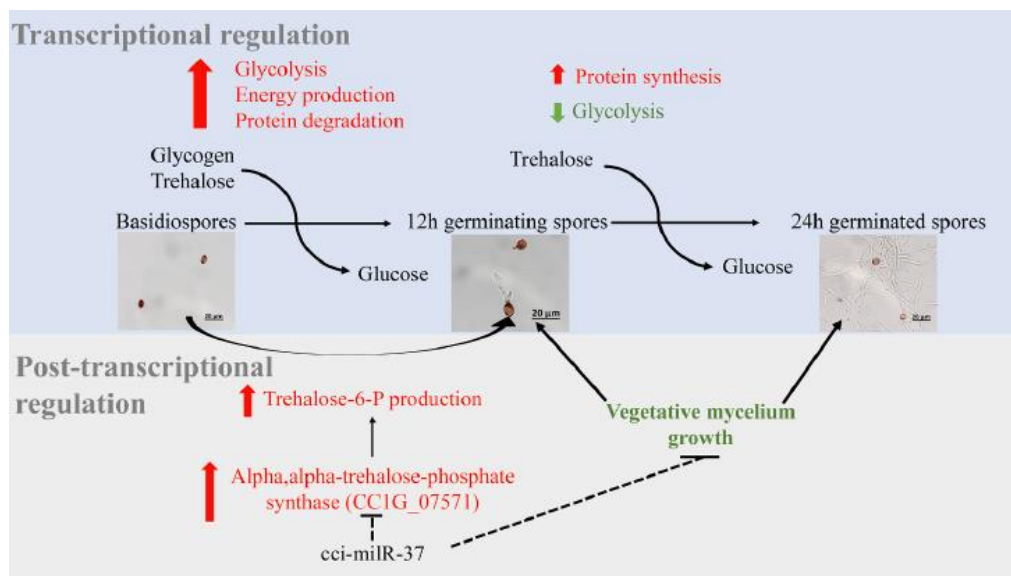


Figure 25 : Schéma récapitulatif de la régulation de la germination des basidiospores et de la croissance du tube germinatif. Les processus cellulaires régulés positivement sont indiqués en rouge tandis que ceux qui sont réprimés sont indiqués en vert.

D'après Lau *et al.* (2020).

Chez *P. anserina*, la formation des ascospores survient après l'émergence de l'hyphe ascogène issu de la fécondation de l'ascogone. Les cellules composant cet hyphe se divisent alors et finissent par former un crochet. Après une division coordonnée des deux noyaux, deux septa se forment et individualisent deux cellules dicaryotiques (Silar, 2020). Alors que l'asque continue sa croissance, les noyaux de la cellule au sommet du crochet subissent alors une caryogamie puis immédiatement après une méiose et une mitose post-méiotique. Les noyaux s'associent pour former des paires de noyaux non-frères qui seront délimitées par deux membranes pour former des ascospores immatures (**Figure 26**).

La maturation de ces spores débute alors très vite par une mitose, pour donner une spore à quatre noyaux. Trois de ces noyaux restent à la tête de la spore, tandis que le quatrième migre au pied de celle-ci (**Figure 27**) (Silar, 2020). Un septum se forme alors entre le haut de la spore et son pied, et le noyau de la cellule du pied commence à dégénérer jusqu'à l'apoptose de cette cellule, qui devient ainsi l'appendice primaire. Pendant ce temps, les trois noyaux de la tête subissent plusieurs cycles de mitoses, entraînant un gonflement de la spore, et de la mélanine commence à s'y déposer. Ce pigment est synthétisé par une cascade enzymatique faisant notamment intervenir une enzyme clé : la polykétide synthase PaPks1 (Coppin & Silar, 2007). Cette enzyme est la première à agir dans la cascade de biosynthèse. La présence de la mélanine dans la paroi contribue à sa rigidité (Gómez & Nosanchuk, 2003). A la fin de sa maturation, l'ascospore est ainsi hautement mélanisée, atteint une taille d'environ 19 x 35 μm , et dispose d'une trentaine de noyaux (Silar, 2020). Une fois mûres, les quatre ascospores d'un asque sont expulsées ensemble du périthèce dont elles proviennent.

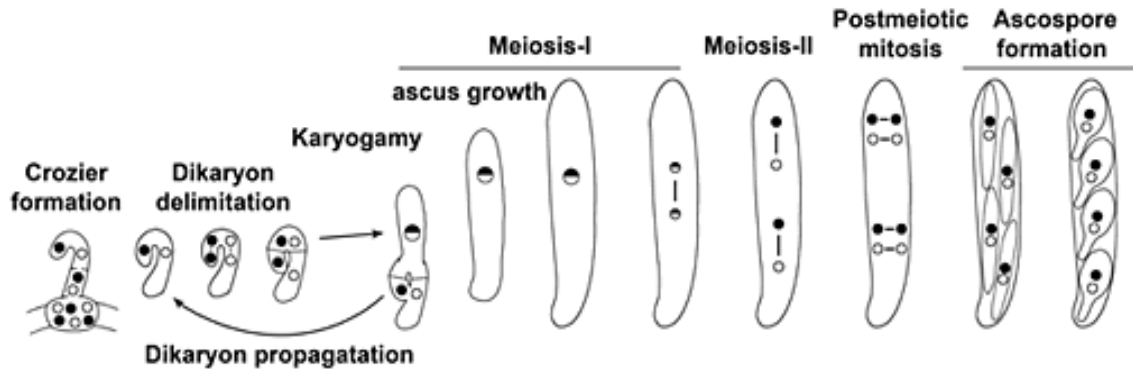


Figure 26 : La formation des ascospores chez *Podospora anserina*.

D'après Peraza Reyes & Berteaux-Lecellier, (2013).

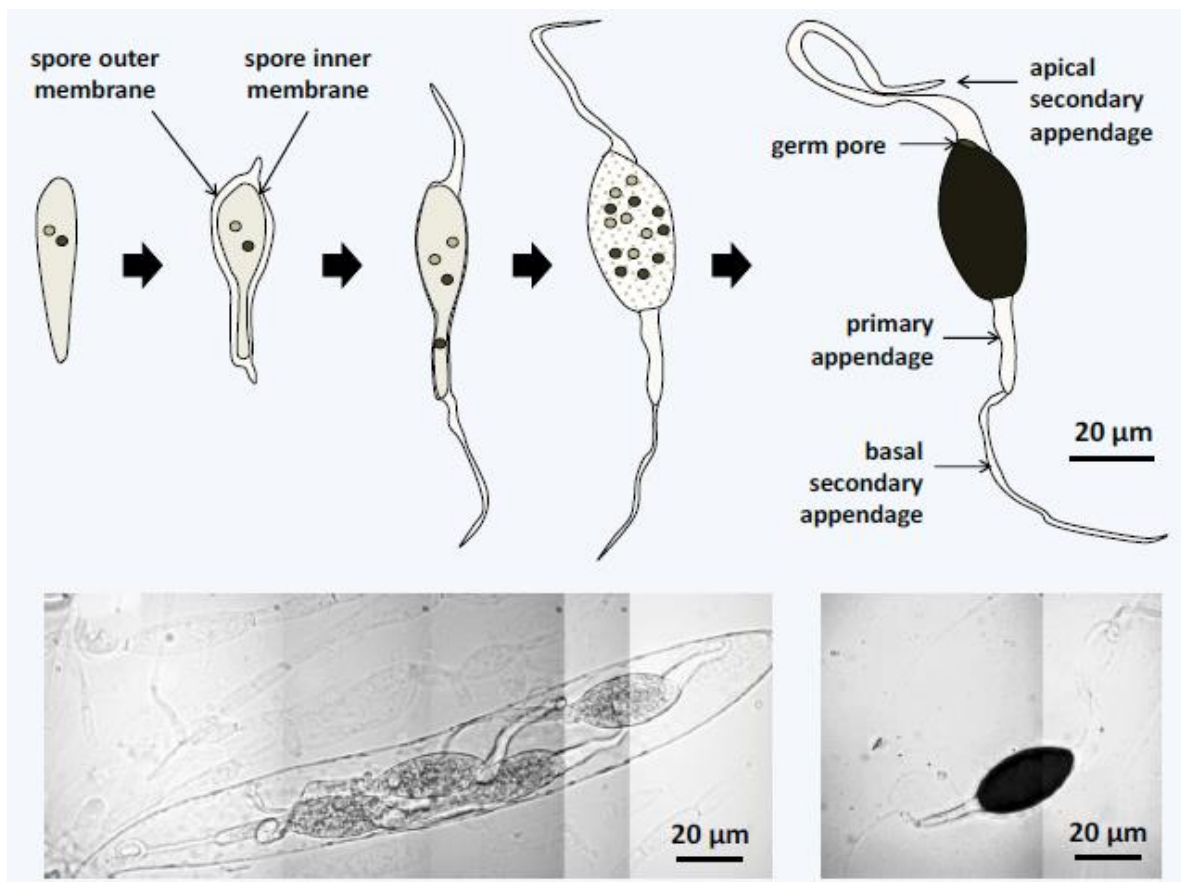


Figure 27 : La maturation des ascospores chez *Podospora anserina*.

Au cours de sa maturation, l'ascospore gonfle et se mélanise pour atteindre sa forme finale (cliché en bas à gauche). En plus de l'appendice primaire, l'ascospore dispose de deux appendices secondaires acellulaires de fonction inconnue : un apical et un basal. Le pore de germination, à l'apex de l'ascospore est l'endroit par lequel s'effectue la germination.

D'après Silar, 2020.

Cependant, la germination de ces spores ne s’opère pas forcément immédiatement après leur atterrissage sur une surface. De fait, ces spores se trouvent dans un état de dormance, et ne peuvent germer qu’une fois avoir été exposées à un stimulus de germination (Durrens et al., 1979). Dans la nature, ce stimulus de germination se produit durant trajet de l’ascospore par le tractus digestif de l’herbivore, au cours duquel la spore va être soumise à différents traitements par des protéases, des acides biliaries, des hydrolases, etc. (Silar, 2020). Au laboratoire, ce stimulus de germination est reproduit à l’aide d’un milieu de germination (milieu G) supplémenté en acétate d’ammonium et en bactopeptone, permettant d’atteindre un taux de germination proche de 100%. Ce signal de germination peut varier selon les espèces. En effet, chez certaines espèces de *Sordariaceae*, dont *P. anserina*, la germination des ascospores dormantes peut être activée par des composés phénoliques tels que l’hydroquinone, ou même par l’acide acétique (Furuya & Naito, 1980). Quant aux espèces du genre *Neurospora*, la germination des ascospores dormantes est fortement induite par certains solvants organiques, les furanes ainsi que par des chocs thermiques (Lingappa & Sussman, 1959; Sussman *et al.*, 1959).

Une fois la germination initiée, celle-ci débute par la formation du pore de germination, à l’apex de l’ascospore, d’une bulle de germination de laquelle émergeront les premiers hyphes qui formeront le mycélium du nouvel individu (**Figure 28**) (Silar, 2020).

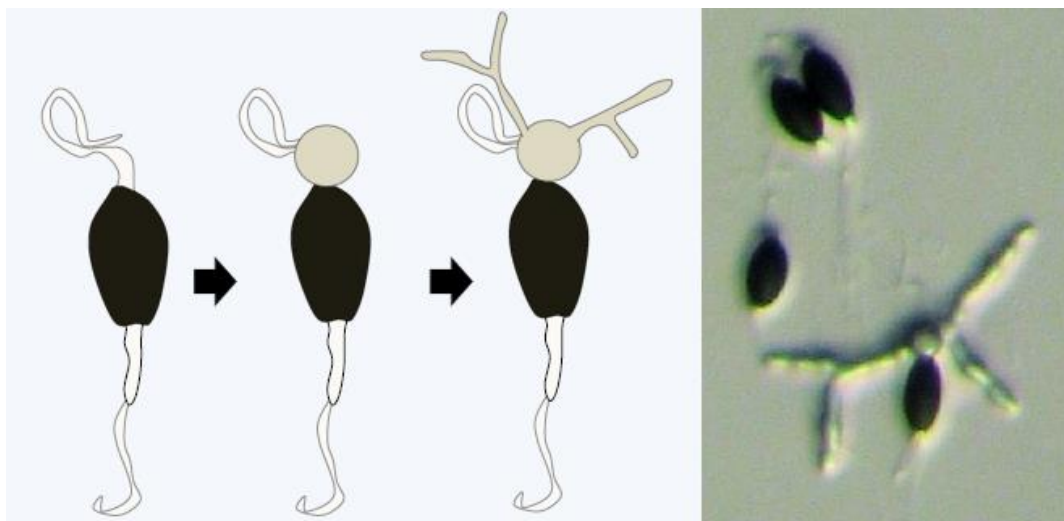


Figure 28 : La germination des ascospores de *Podospira anserina*.

D’après Silar, 2020.

Chez *P. anserina*, comme pour de nombreuses autres espèces ascomycètes, la germination est donc un processus régulé, associé à la levée de la dormance de l'ascospore (Lowry & Sussman, 1968; Thevelein *et al.*, 1984). Cette régulation se fait à plusieurs échelles. Au niveau cellulaire tout d'abord, un des composants clés régulant la germination de l'ascospore est la mélanine. Comme évoqué précédemment, ce pigment confère une grande rigidité à la paroi de la spore. Et cette rigidité permet de prévenir une germination anarchique qui s'opérerait en l'absence de conditions favorables à la croissance du champignon, par n'importe quel « côté » de la spore plutôt que par son pore de germination. C'est notamment le cas d'un des mutants ponctuels de *PaPks1* : le mutant nul *PaPks1*¹⁹³. Ce dernier est inactivé pour la PKS1 par une mutation non-sens, ce qui a pour effet de bloquer complètement la synthèse de mélanine. Les ascospores produites par ce mutant sont ainsi totalement transparentes et germent spontanément par les « côtés » plutôt que par le pore de germination (Coppin & Silar, 2007). La fragilité de ces ascospores non mélanisées est attestée par l'impossibilité de les manipuler comme on manipule usuellement les ascospores (mélanisées) de *P. anserina*, avec une minutie, pour les transférer sur milieu de germination par exemple.

La mélanine semble ainsi jouer un rôle majeur dans le contrôle de la germination des ascospores. Soit son absence induit la germination, soit elle empêche son inhibition. L'utilisation de tricyclazole, un inhibiteur de la synthèse de mélanine, lorsque l'on procède à des croisements, donc durant l'ascosporogénèse, confirme ce résultat. Les spores issues de ces croisements ne sont pas ou peu mélanisées, germent spontanément et ne sont pas manipulables. (Coppin & Silar, 2007; Lalucque *et al.*, 2012). Les voies impliquées dans la voie de biosynthèse de la mélanine sont donc de fait également importantes pour le contrôle de la germination. Parmi les précurseurs de la mélanine, on retrouve l'acétyl-CoA, un des produits de la β -oxydation (Coppin & Silar, 2007).

En effet, les mutants impactés pour la β -oxydation peroxysomale chez *P. anserina* produisent des ascospores avec des défauts de mélanisation (spores vertes), un phénotype souvent retrouvé chez les mutants des peroxysomes (Berteaux-Lecellier *et al.*, 1995; Bonnet *et al.*, 2006). La différence de phénotype observée entre ces mutants peroxysomaux et le mutant *PaPks1*¹⁹³ s'explique par le fait que la β -oxydation n'est pas la seule voie métabolique fournisseuse de précurseurs pour la biosynthèse de mélanine (Peraza Reyes & Berteaux-Lecellier, 2013). Ces mutants de peroxysomes présentent un défaut de germination plus ou moins important selon le gène muté (Berteaux-Lecellier *et al.*, 1995; Bonnet *et al.*, 2006;

Peraza-Reyes et al., 2008). Chez ces mutants peroxysomaux, ce défaut de germination serait lié à la fragilité engendrée par le défaut de mélanisation des spores (Boisnard et al., 2009). En effet, ce taux est calculé après transfert des ascospores sur milieu de germination, une étape susceptible d'endommager et de « tuer » les ascospores fragiles. Il est important de noter que si la démélanisation totale des ascospores comme chez le mutant *PaPks1¹⁹³* induit une germination spontanée, la manipulation des ascospores peu ou pas mélanisées ainsi que des ascospores qui auraient commencé à germer sans que le manipulateur l'ait constaté (cas rencontré lors de la manipulation ascospores des mutants de germination spontanée étudiés au cours de ma thèse), conduit à une baisse du taux de germination observé après transfert sur milieu de germination. Néanmoins, on ne peut pas exclure que chez les mutants peroxysomaux ou plus spécifiquement chez les mutants de la β -oxydation, la perturbation du métabolisme primaire contribuerait à la baisse du taux de germination. Enfin, lorsque la β -oxydation mitochondriale est impactée, les spores présentent également un défaut de germination, mais pas de pigmentation, suggérant que la β -oxydation mitochondriale, de par sa fonction dans le métabolisme primaire, est impliquée plus directement dans la germination des ascospores (Boisnard et al., 2009).

Mais la régulation de la germination fait également intervenir plusieurs voies de signalisation. L'une d'entre elles est la signalisation impliquant les ERO et les Nox. En effet, il a été montré que la NADPH oxydase PaNox2, son adaptateur supposé, la tétraspanine PaPls1 et la sous-unité régulatrice PaNoxR jouent un rôle crucial dans la germination des ascospores de *P. anserina* (Brun et al., 2009; Lambou et al., 2008; Malagnac et al., 2004). Les délétions de *PaNox2*, *PaPls1* et *PaNoxR* entraînent en effet un blocage de la germination des ascospores. Toutefois, PaNox1 semble quant à lui impliqué dans la reproduction sexuée puisque sa délétion entraîne une incapacité de la souche à produire des fructifications (Malagnac et al., 2004).

Il est important de souligner que chez le mutant $\Delta PaNox2$, la mélanisation des ascospores n'est pas affectée et que cette délétion inhibe de ce fait la germination d'ascospores mélanisées. En effet, le double mutant *PaPks1¹⁹³ PaNox2* est capable de germer à nouveau, suggérant que l'absence de mélanine permet de supprimer le défaut de germination d'autres mutants (Lambou et al., 2008). Le rôle des ERO dans la germination des ascospores n'est pas établi chez *P. anserina*. En effet, le rôle de PaNox2 dans la germination ne semble pas être lié directement au burst oxydatif qu'elle produit, puisque la délétion des deux isoformes *PaNox1* et *PaNox2* induit une augmentation de la production d'ERO sans pour autant restaurer le défaut de germination (Malagnac et al., 2004). Cependant, il a été montré chez *S. macrospora* que les

ERO sont essentielles à la germination, puisque la germination des ascospores sur un milieu contenant de l'ascorbate, un antioxydant, est inhibée (Dirschnabel et al., 2014). Néanmoins, l'action précise des ERO sur la germination des ascospores demeure inconnue. L'importance de *Nox2* dans la germination des ascospores est retrouvée chez *N. crassa* et *S. macrospora* pour lesquels la délétion de cette enzyme produit les mêmes effets que chez *P. anserina* : une absence de germination des ascospores mélanisées (Cano-Domínguez et al., 2008; Dirchnabel et al., 2014).

A côté des *Nox*, il a été montré que trois autres gènes sont importants pour la germination des ascospores chez *S. macrospora* : *Sac1*, *Gsa3* et *Ste12*. Ces trois gènes codent respectivement une adénylate cyclase impliquée dans la formation d'AMPc, la sous-unité α d'une protéine G hétérotrimérique, et un facteur de transcription à homéodomaine identifié chez *S. cerevisiae* connu pour agir en aval de la voie MAPK *Fus3/Kss1* au cours de la reproduction sexuée, la croissance pseudohyphale et la synthèse de la paroi (Nolting & Pöggeler, 2006). La délétion de chacun de ces gènes entraîne une chute du taux de germination des ascospores de 70%, 95 et 99% respectivement pour Δ *Sac1*, Δ *Gsa3* et Δ *Ste12* (Kamerewerd et al., 2008; Nolting & Pöggeler, 2006). Les croisements de ces différents mutants entre eux ainsi qu'avec la souche mutante *fus* produisant des ascospores non mélanisées, ont permis d'apporter des éclairages complémentaires sur le positionnement de ces gènes dans la voie de régulation de la germination des ascospores. D'une part, les auteurs ont montré que Δ *Ste12* et Δ *Nox2* coségrègent de manière stricte avec *fus*, dans les ascospores capables de germer mais pas Δ *Sac1* ni Δ *Gsa3*. L'absence de mélanine restaure donc la germination des mutants Δ *Nox2*, et Δ *Ste12* chez *S. macrospora*. En revanche, l'absence de mélanine ne permet pas aux mutants Δ *Sac1* ni Δ *Gsa3* de germer. Ceci indiquerait que *Ste12* et *Nox2* agissent dans la même voie de régulation de la germination des ascospores (Dirchnabel et al., 2014). Cependant, il n'y a pas eu de relation clairement établie par les auteurs entre *Ste12* et *Mpk2*. *Gsa3* et *Sac1* semblent quant à eux agir dans une voie en parallèle de la voie *Nox2/Ste12*, et les niveaux d'AMPc générés par l'adénylate cyclase *Sac1* semblent inhiber l'activité de *Nox2* (Dirchnabel et al., 2014).

Enfin, une des voies essentielles pour la germination implique les MAPK. Contrairement à la signalisation de la germination des conidies, et bien que la voie de la MAPK *PaMpk1* ne semble pas impliquée dans le processus de germination (Malagnac et al., 2004), la voie *PaMpk2/Fus3* (orthologue de *Pmk1* chez *M. oryzae*) est quant à elle essentielle à la germination

des ascospores chez *P. anserina* (Lalucque et al., 2012). En effet, la délétion d'une seule des trois kinases de la cascade, *PaTlk2*, *PaMkk2* ou *PaMpk2*, produit des souches générant des ascospores pigmentées, mais incapables de germer. Ici encore, l'absence de mélanine, lorsque ces mutations se retrouvent en contexte mutant *PaPks1*¹⁹³, restaure la germination des ascospores. De même, l'activation constitutive de la MAPKK *PaMkk2* (*PaMKK2^c*) dans les ascospores mélanisées provoque leur germination spontanée (Lalucque et al., 2012). Par ailleurs, des études d'épistasies menées par les auteurs montrent que les mutations $\Delta Nox2$ et $\Delta Pls1$ n'empêchent pas la phosphorylation de la MAPK *PaMkk2* par la mutation constitutive *PaMKK2^c* mais bloquent la germination spontanée induite par cette dernière, ce qui positionne clairement la voie *PaMpk2* en amont de *Nox2* et *Pls1* dans la voie de régulation de la germination.

Malgré les données présentées, la régulation de la germination des ascospores demeure peu décrite par rapport à celle des conidies. C'est dans ce contexte que s'inscrit mon sujet de thèse.

IV - Mon projet de thèse

Ma thèse s'articule autour des deux processus cellulaires évoqués au-dessus : la formation de l'appressorium et la germination des ascospores chez le champignon modèle *P. anserina*. Ces deux phénomènes, bien que d'apparence très différents, partagent pourtant des points communs. En effet, comme présenté précédemment, certains gènes tels que ceux codant pour la NADPH Oxydase *Nox2*, la tétraspanine *Pls1*, ou encore la MAPK *Mpk2/Pmk1* sont impliqués dans la germination des ascospores de *P. anserina* et dans la formation de l'appressorium aussi bien chez *M. oryzae* que chez *P. anserina*. Ces deux mécanismes partagent donc des déterminants moléculaires communs. Cela a conduit à postuler que ces deux processus développementaux sont régis par le recrutement de ces machineries spécialisées (*Nox2/Pls1*) par convergence évolutive (Malagnac et al., 2008).

Dans le but de déchiffrer les voies de régulation de ces deux mécanismes, l'équipe Génétique et Epigénétique des Champignons a mené des approches de génétique directe, permises par son modèle d'étude, *P. anserina*. Concernant la régulation génétique du développement de l'appressorium, les cribles de mutagenèse visant à isoler des suppresseurs du défaut de formation de l'appressorium des mutants $\Delta PaNox2$, $\Delta PaPls1$ et $\Delta PaNoxR$, menés

auparavant par S. Brun se sont avérés infructueux. D'autre part, un crible de mutagenèse mené par P. Silar et visant à isoler des mutants de germination a permis d'isoler une cinquantaine de mutants montrant des ascospores germant spontanément. Le crible a permis d'isoler des mutants de la souche sauvage montrant une germination spontanée, ainsi que des suppresseurs de *ΔNox2* et *ΔPls1* montrant une restauration de la germination des ascospores.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé aux six mutants de la souche sauvage qui ont la particularité de germer à travers le pore de germination, contrairement à tous les autres mutants et suppresseurs isolés qui germent autrement, soit par le pied, soit par le « côté » de la spore. Notre postulat est que chez ces six mutants, seule la levée de la dormance, c'est-à-dire l'activation de la germination était affectée (défaut de germination spontanée) mais pas le processus cellulaire consistant en la formation du pore de germination et de la bulle de germination (germination par le pore de germination). A partir de ces mutants, et en se basant sur la convergence évolutive des deux processus, j'ai développé une nouvelle approche basée sur l'étude de ces mutants de germination, afin d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans le contrôle de la germination des ascospores, mais aussi dans la formation de l'appressorium chez *P. anserina*.

Chapitre I : Etude de la formation de l'appressorium chez les eumycètes

Comme énoncé précédemment, l'appressorium a longtemps été considéré comme une structure purement pathogène différenciée uniquement par les espèces phytopathogènes ou entomopathogènes. Avec la découverte récente de la capacité de *P. anserina*, une espèce saprotrophe, à différencier une structure similaire (Brun et al., 2009), s'est posée la question de savoir si cette structure pouvait être différenciée par une plus large gamme d'espèces encore. Pour répondre à cette question, nous avons criblé 38 souches d'Eumycètes appartenant à des larges gammes de taxa et étudié leur capacité à transpercer mécaniquement la cellophane. L'étude de la formation de l'appressorium chez ces espèces Eumycètes a fait l'objet d'un article paru le 3 août 2019 dans *Journal of Fungi* sous le titre « Appressorium: The breakthrough in *Dikarya* » et présenté ci-dessous. Les figures supplémentaires associées à cet article ont été rajoutées à sa suite.

Article

Appressorium: The Breakthrough in *Dikarya*

Alexander Demoor, Philippe Silar  and Sylvain Brun * 

Laboratoire Interdisciplinaire des Energies de Demain, LIED-UMR 8236, Université de Paris,
 5 rue Marie-Andrée Lagroua, 75205 Paris, France

* Correspondence: sylvain.brun@univ-paris-diderot.fr

Received: 28 May 2019; Accepted: 30 July 2019; Published: 3 August 2019



Abstract: Phytopathogenic and mycorrhizal fungi often penetrate living hosts by using appressoria and related structures. The differentiation of similar structures in saprotrophic fungi to penetrate dead plant biomass has seldom been investigated and has been reported only in the model fungus *Podospora anserina*. Here, we report on the ability of many saprotrophs from a large range of taxa to produce appressoria on cellophane. Most *Ascomycota* and *Basidiomycota* were able to form appressoria. In contrast, none of the three investigated *Mucoromycotina* was able to differentiate such structures. The ability of filamentous fungi to differentiate appressoria no longer belongs solely to pathogenic or mutualistic fungi, and this raises the question of the evolutionary origin of the appressorium in *Eumycetes*.

Keywords: appressorium; infection cushion; penetration; biomass degradation; saprotrophic fungi; *Eumycetes*; cellophane

1. Introduction

Accessing and degrading biomass are crucial processes for heterotrophic organisms such as fungi. Nowadays, fungi are famous biodegraders that are able to produce an exhaustive set of biomass-degrading enzymes, the Carbohydrate Active enzymes (CAZymes) allowing the potent degradation of complex sugars such as cellulose, hemicellulose, and the more recalcitrant lignin polymer [1]. Because of their importance for industry and biofuel production in particular, many scientific programs worldwide aim at mining this collection of enzymes in fungal genomes and at understanding fungal lignocellulosic plant biomass degradation. *Podospora anserina*, a saprotrophic coprophilous *Ascomycota* from the *Sordariales* order, emerged as a perfectly well-suited genetic model system to study plant biomass degradation. This potent cellulose degrader is also likely able to degrade lignin [2–4].

In contrast to saprotrophic fungi, most mutualistic or pathogenic fungi must penetrate their host to access nutrients, which explains why these fungi have developed sophisticated tools allowing the attachment, lysis and mechanical breaching of the host surface—three mandatory steps determining host invasion. The best characterized penetration structure is the “unicellular” appressorium, first described in 1883 by Frank in the plant pathogen *Colletotrichum lindemuthianum* as the “adhesion organ” [5,6]. For the sake of simplicity, and in keeping with Emmett and Parbery’s definition of the appressorium which was synonymous with “the infection structure” regardless of its morphology [7], we will also use appressorium to refer to the “appressorium-like” structures described in species such as *Botrytis cinerea* or *Podospora anserina* [8,9]. The appressorium has been thoroughly studied in plant pathogen species such as *Magnaporthe oryzae* or *Ustilago maydis* [10] and it has also been described in entomopathogenic fungi like *Beauveria bassiana*, in mutualistic arbuscular mycorrhizal fungi of the *Glomeromycota* phylum, and in phylogenetically distant *Oomycetes* including *Phytophthora infestans* [11–13]. It is noteworthy that species like *Rhizoctonia sp.*, *Sclerotium sp.* (*Basidiomycota*), *Sclerotinia sp.* and *B. cinerea* (*Ascomycota*) can develop multicellular penetration structures called infection cushions to penetrate their host [7,14].

Whether saprobes develop penetration structures or not has long been ignored, probably because, at first glance, their saprotrophic lifestyle does not require any host penetration step in order to access nutrients. Recently, we have discovered that the saprotrophic fungus *P. anserina* is able to differentiate appressoria when grown on cellophane [8]. Moreover, we have shown that the genetic program controlling appressorium development in this model fungus shares common components with the one of the phytopathogenic fungi *M. oryzae* and *B. cinerea*. In these three species, the superoxide (O_2^-)-producing enzymes Nicotinamide-Adenine-Dinucleotide-Phosphate (NADPH) oxidases Nox1 and Nox2, together with their regulatory subunits NoxR, NoxD, the Pls1 tetraspanin as well as the Mitogen-Activated-Protein-Kinase (MAPK) pathway Fus3/Mpk2/Pmk1, are major components of appressorium development [15–17]. This leads to the conclusion that appressoria in saprotrophic and phytopathogenic fungi may be homologous structures. This hypothesis prompted us to investigate appressorium development in various saprotrophic *Eumycetes*. For this purpose, we assessed appressorium development in a fungal collection containing 38 strains grown on cellophane. The studied filamentous fungi included *Pezizomycotina*, *Agaricomycotina* and *Mucoromycotina*. In *Pezizomycotina* especially, this collection allowed us to test every main subphylum except the *Lecanoromycetes*, which are exclusively found in lichens and the *Laboulbeniomycetes*, which are obligate insects parasites, neither of them being easy to culture in the lab. When available in our collection, we investigated different isolates from the same species and different species from the same genus, in order to determine the versatility of the appressorium development capacity at the species level and at the genus level respectively. Finally, since *Sordariomycetes* include a majority of species of particular interest (i.e., *Trichoderma* spp., *Podospora* spp., *Neurospora crassa* and *Sordaria macrospora*), we investigated this class more thoroughly.

2. Materials and Methods

2.1. Strains and Culture Conditions

The strains used in this study are all listed in Table S1. Each species was cultured on standard M2 medium topped with a single cellophane layer (Bio-Rad n°cat 1650963, Hercules, CA, USA) at 27 °C. The composition of the M2 medium is available on the website (<http://podospora.i2bc.paris-saclay.fr/methods.php#cultivate>). Depending on the mycelial growth rate of each fungal strain, microscopic observations were carried out between 3 and 15 days after inoculation.

2.2. Spores Harvesting and Inoculation

Fungi were grown on M2-standard-medium petri plates till confluence. The plates were flooded with 0.05% tween-water to obtain a spore suspension. Spores were filtered through Miracloth (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) and counted. A volume of 100 μ L of a 10^4 – 10^5 spore.mL⁻¹ suspension was deposited on a cellophane layer (on top of M2 medium). Post-germination mycelial growth was checked for appressorium development from 16 to 30 h post-inoculation.

2.3. Microscopic Observations

Small pieces (1 cm²) of cellophane covered with spores or mycelium were cut with a scalpel and mounted in water in between standard microscopic slides and coverslips. For every fungus tested, removal of the distal part of the thallus was performed in order to image the intra-cellophane mycelial growth in the absence of the above thallus, which obstructs microscopic observations. This corresponds to the last column in Figures 1 and 2. Due to the significant thickness of *Xylaria polymorpha* mycelium, the penetration pegs, the haustorium-like growth and the intra-cellophane growth were observed only after removal of the mycelium growing on the top of the cellophane layer (Figure 2). Images were taken with an inverted microscope, Leica DMI6000 (Wetzlar, Germany); sCMOS camera; DIC filter; LED EL6000; ImagoSeine Imaging Facility: <https://imagoSeine.ijm.fr/676/accueil.htm>. The images were analyzed with Fiji (1.52p version) [16].

3. Results

3.1. Cellophane for In Vitro Penetration Assays

Cellophane is a transparent film made of cellulose, the main component, along with hemicellulose of plant cell walls. It presents a hard and hydrophilic surface and is well known to induce appressorium development in some filamentous phytopathogenic fungi when they grow on it [17]. We have shown that the saprotrophic fungus *P. anserina* was surprisingly capable of differentiating appressoria when grown on cellophane, but we also observed that the presence of glucose in the medium beneath the cellophane layer had an inhibitory effect on appressorium development [8]. We decided to standardize the growth conditions for all the fungi tested and avoided media containing glucose, by choosing the M2 standard medium routinely used in the lab for *P. anserina* cultures. This medium includes dextrin as the carbon source and urea as the nitrogen source (see Mat. and Met.). Because of the high diversity of the spores produced by all the fungi tested, and in order to standardize the inoculation conditions, cellophane was inoculated with mycelial implants of each fungus instead of spore suspensions. Indeed, among all the fungi tested, not all the spores produced, whether they be sexual or asexual, were able to germinate on cellophane on top of the M2 medium. For instance, *P. anserina* produces asexual spermatia that are unable to germinate, and sexual ascospores that require a specific medium for germination. However, attempts were made to investigate appressorium formation from germinated spores for some of the species (see Section 3.3).

We assessed these conditions for appressorium development on both phytopathogen models *Fusarium graminearum* and *Rhizoctonia solani*, known to penetrate their host in nature and in the lab [7,18]. It is worth noting that *F. graminearum* appressorium allows host penetration through stomatal apertures in plants [19]. As observed in Figure 1, both the ascomycete *F. graminearum* and the basidiomycete *Rhizoctonia solani* were able to differentiate unicellular appressoria on cellophane on top of M2 medium. In both fungi, we observed similar stages of appressorium development on cellophane as in *P. anserina*: (i) growth reorientation of hyphae growing horizontally on cellophane, (ii) contact points made by the hyphae growing towards the cellophane surface and slight swelling of these contact points, (iii) emission of a penetration peg allowing in depth cellophane penetration, (iv) haustorium-like growth, and (v) intra-cellophane mycelial invasion. Significantly, the penetration peg and haustorium-like growth were previously described in *P. anserina* as a needle-like hyphae and a palm-like structure, respectively ([8], Figure 2). More details on appressorium differentiation are given below, in Section 3.2.

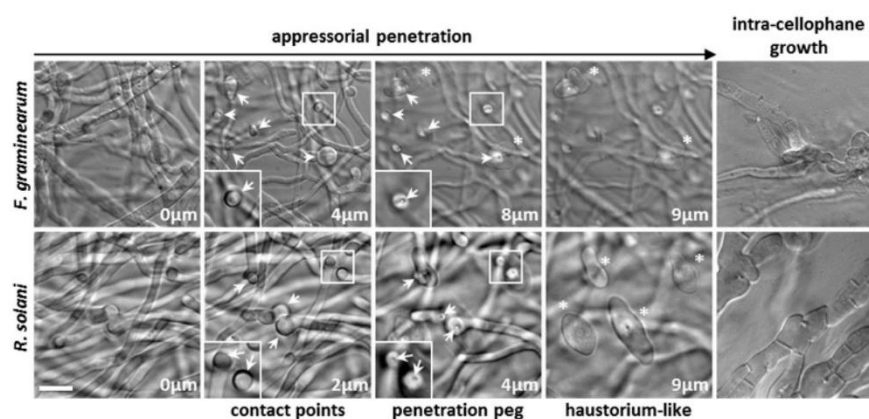


Figure 1. *Fusarium graminearum* and *Rhizoctonia solani* penetrate cellophane through appressoria. For both *F. graminearum* (upper panel) and *R. solani* (bottom panel), the main steps of appressorium-based cellophane penetration have been represented. From left to right, the four first columns represent successive z-planes of the same field of view. The distances from the initial z-plane are indicated. Arrows indicate contact points and the penetration peg they emit to penetrate cellophane. (*) Haustorium-like growth. Last column (right) shows in-depth intra-cellophane mycelial development. Scale bar = 10 μm . Magnification in the bottom insets is 1.7 \times .

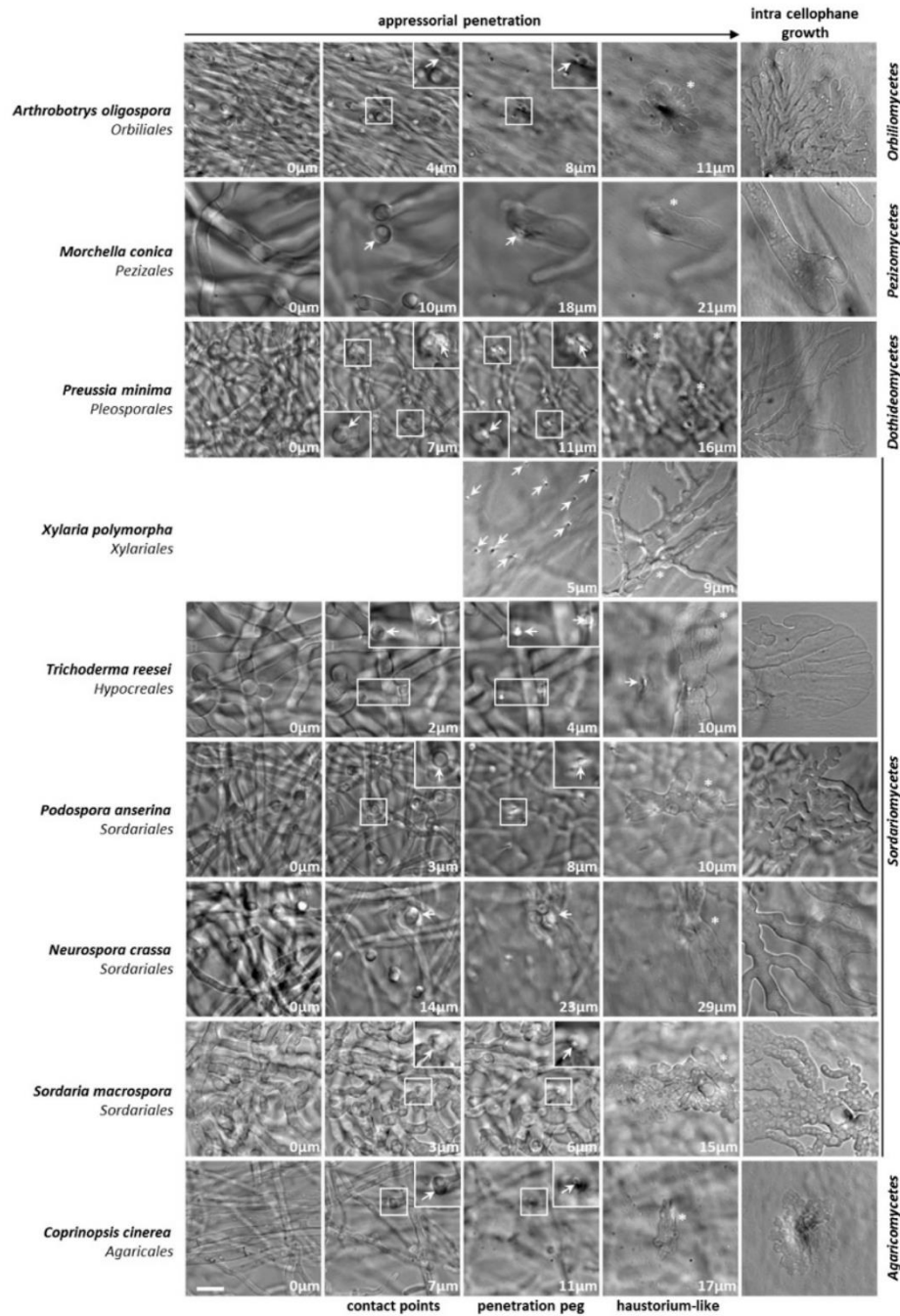


Figure 2. Appressoria in *Dikarya*. For a selection of the representative species of the main groups of fungi endowed with an appressorium to penetrate cellophane, the main steps of appressorium-based cellophane penetration have been represented. From left to right, the first four columns represent successive z-planes of the same field of view. The distances from the initial z-plane are indicated. For *Xylaria polymorpha*, the mycelium was too dense to allow imaging of the first steps of appressorial development. To image the “penetration peg” and the “haustorium-like growth” stages in *X. polymorpha*, pictures were taken after on-top-growing mycelium removal. For each appressorium imaged, arrows indicate the contact points and the penetration peg corresponding to the haustorium-like growth (*) in the third column; for *X. polymorpha*, arrows point to every observable penetration peg. Last column (right) shows in-depth intra-cellophane mycelial development. For *X. polymorpha*, this step is already represented in the previous “haustorium-like growth” column. Scale bar = 10 μm. Magnification in the upper insets is 1.7×.

This first result validated the conditions to test thirty-nine additional *Eumycetes* strains and demonstrated that *F. graminearum* appressorium is able to penetrate cellophane. However, these conditions did not allow much growth of saprotrophic *Basidiomycota* (i.e., *Laetiporus sulfureus*, *Phallus impudicus*, *Chlathrus archeri*), minimizing their representation in our study.

3.2. Appressorium Development is Widespread in Saprotrophic Dikarya

To address the question of whether saprotrophic *Eumycetes* were in a large part capable of differentiating appressoria when grown on cellophane, we investigated a collection of filamentous fungi available in our lab (Table S1 and Figure 3). Except for the few phytopathogens included in our survey (*B. cinerea*, *R. solani* and *F. graminearum*), all the other examined fungi were either exclusive saprobes, or had a well-defined saprotrophic lifestyle outside their host, like the human pathogen *Aspergillus fumigatus* (*Eurotiomycetes*) [20]. Nevertheless, the *Orbiliomycetes* *Arthrobotrys oligospora* is both a saprobe and a nematophagous fungus [21]. As reported in Figure 3, most of the tested saprotrophic *Dikarya* were able to differentiate appressoria (“YES” in Figure 3). Figure 2 shows the appressorium differentiation and the intra-cellophane mycelial invasion in a panel of fungi belonging to the main *Dikarya* studied classes: the *Orbiliomycetes*, the *Pezizomycetes*, the *Dothideomycetes*, the *Sordariomycetes* and the *Agaricomycetes*.

Since the most central part of thalli was where cellophane penetration and digestion were more advanced and where the penetration process was hardly discernible, we imaged distal parts of thalli to identify appressoria in their early stage of development. Appressorium development followed the pattern previously described above and shown in Figures 1, 2 and 4: (i) hyphal reorientation, (ii) contact point, (iii) penetration peg, (iv) haustorium-like growth, (v) intra-cellophane growth. Appressoria were numerous and easily found in the first centimeter from the edge of thalli. Given the heterogeneous distribution of appressoria on thalli, precise quantification of their number was not possible. However, as shown in Figures 1 and 2, we could often observe several contact points giving rise to a penetration peg and then eventually to haustorium-like growth per $2.5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ image (column 2; $50 \times 50 \mu\text{m}^2$). And in Figure 1, for instance, two appressoria for *F. graminearum* and four appressoria for *R. solani* were observed in the 2.5×10^3 - μm^2 image column 4. Although the morphologies of the haustorium-like growth and of the mycelium invading the cellophane were different between species, appressorium development in each species was really stereotyped: the size of the penetration peg, the shape of the haustorium-like growth as well as the shape of the invading mycelium being quite similar from one appressorium to the other. The size of the penetration peg, estimated as the distance between the contact point and the haustorium-like growth, ranged from $5 \mu\text{m}$ (*F. graminearum*) to $15 \mu\text{m}$ (*N. crassa*), with most species showing a penetration peg approximately $10 \mu\text{m}$ length. The haustorium-like growth was defined as the initial stage, from which the intra-cellophane growth begins, but both stages are part of a continuous process and the haustorium-like enlarged with time.

In the same way, we observed appressoria in industrial or research-relevant species such as *Trichoderma reesei*, *Neurospora crassa*, *Sordaria macrospora* and *Coprinopsis cinerea*. Indeed, along with *P. anserina*, these filamentous fungi are all famous model organisms grown worldwide in laboratories and *T. reesei* is widely used in industry.

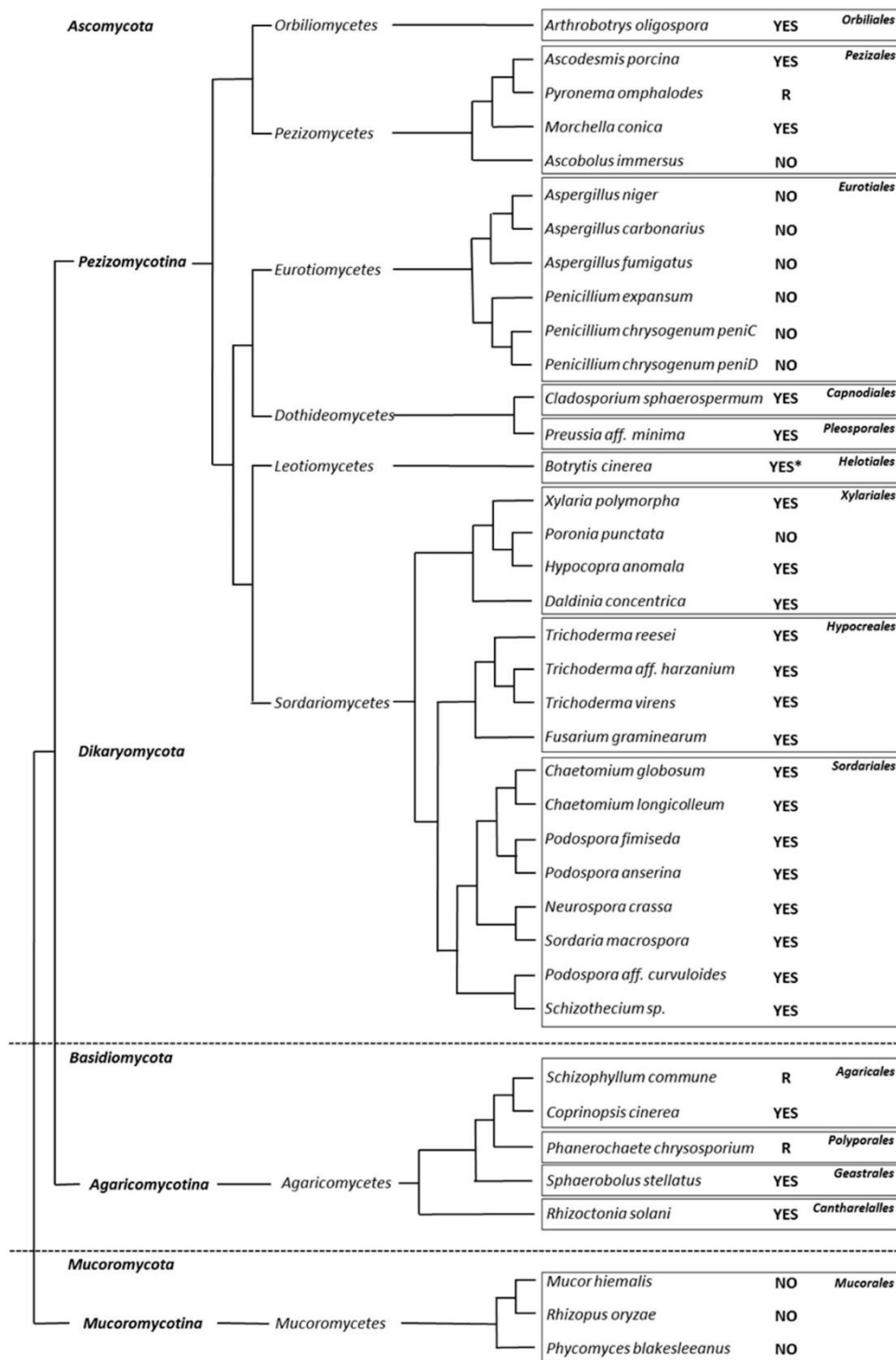


Figure 3. Phylogenetic tree of the 38 *Eumycetes* strains analyzed. “YES”, presence of appressoria; “R”, reorientation of hyphal growth towards cellophane; “NO”, no hyphal growth reorientation and no appressorium developed. This tree was built according to the “Mycocosm Fungal Tree of Life” of the JGI [22].

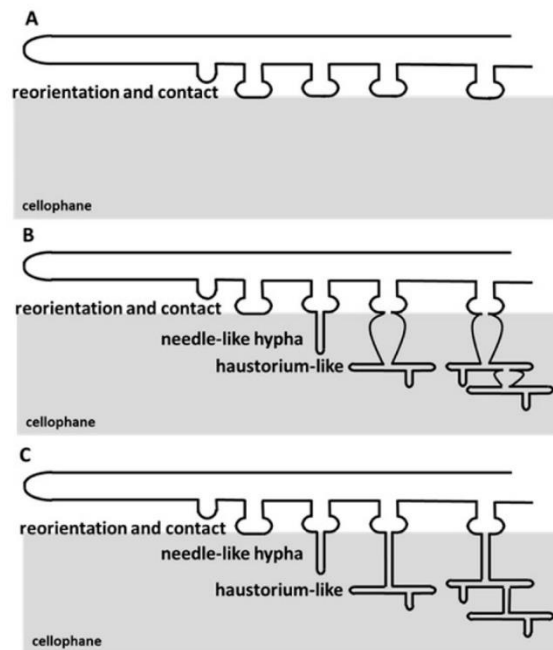


Figure 4. Schematic of appressorial development. (A) The fungi, showing clear tropism towards cellophane, reorient hyphal growth towards cellophane and establish contact points at the cellophane surface. (B,C) The fungi, able to penetrate cellophane, develop appressoria in five steps. (i) They reorient hyphal growth, (ii) establish contact points, (iii) emit a penetration peg in order to breach cellophane, and (iv) starthaustorium-like growth inside the cellophane layer. The haustorium-like enlarges with time and it becomes the base for the emission of more penetration pegs. This process allows invasion (v) and eventual breaching of the cellophane layer. In some species, concurrently to their intra-cellophane development, the penetration peg enlarges and becomes hardly distinguishable from other fungal structures inside the cellophane (B).

3.3. Mucorales and Eurotiales Do Not Penetrate Cellophane

Some species were not able to differentiate appressoria, but we could observe the clear tropism of hyphal growth towards the cellophane surface. This was the case for the *Pezizomyces Pyronema omphalodes* and the basidiomycetes white rots *Schizophyllum commune* and *Phanerochaete chrysosporium* (Figure 5). For these three species, we could observe hyphae growing towards the cellophane surface and establishing contacts with the surface, but we did not observe any cellophane penetration nor intra-cellophane growth (see also schematic drawing Figure 4A). On the contrary, several species did not show any tropism towards cellophane nor appressorium differentiation. The three *Mucoromycotina* tested, *Mucor hiemalis*, *Rhizopus oryzae* and *Phycomyces blakesleeana*, were able to efficiently grow on cellophane but not to penetrate it. Similarly, none of the *Eurotiomycetes* grown on cellophane effectively penetrated it. To investigate this latter clade, we examined two different isolates of *Penicillium chrysogenum*, two further species of the *Penicillium* genus as well as three species of *Aspergilli*. Among them, the human pathogen *A. fumigatus* was included—which, when found in nature, is exclusively saprotrophic [20]. We then assayed whether these latter species lacking appressorial development when mycelium was inoculated on top of cellophane, actually develop appressoria directly following spore germination as most pathogenic fungi do (e.g., *B. cinerea*, *M. oryzae*, *F. graminearum*, *B. bassiana*) [23]. We therefore investigated appressorial development on germlings in two species able to develop appressoria, *N. crassa* and *C. cinerea*, and five species lacking appressorial development, *P. expansum*, *A. carbonarius*, *A. niger* (*Eurotiales*), *M. hiemalis* and *R. oryzae* (*Mucorales*). In all the species tested, the spores did germinate but no appressorium developed from germlings (data not shown).

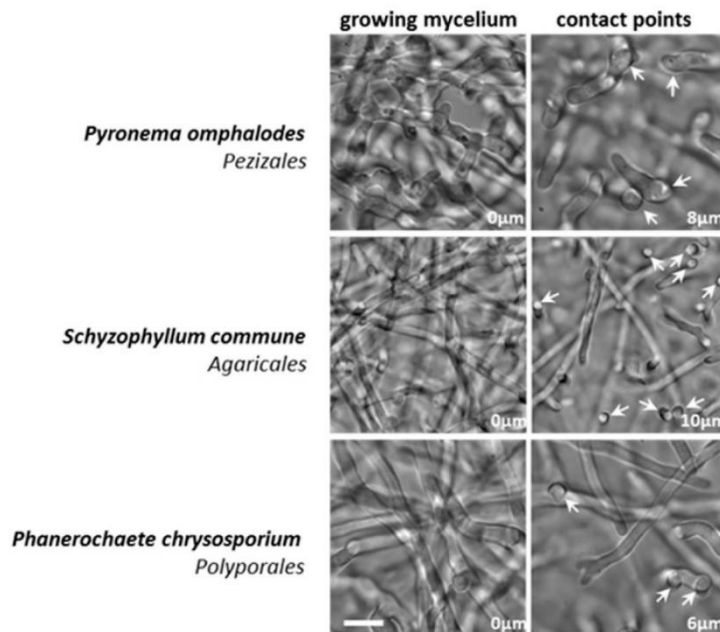


Figure 5. Reorientation and contact points without cellophane penetration. The *Peizomycetes* *Pyronema omphalodes*, as well as the *Agaricomycetes* *Schizophyllum commune* and *Phanerochaete chrysosporium* exert clear tropism towards cellophane. Both columns represent different z-planes of the same field of view. The distances from the initial z-plane are indicated. **Left** column: mycelium growing on top of the cellophane layer. **Right** column: contact points (arrows) observed following hyphal growth reorientation. Scale bar = 10 μm.

3.4. *A. oligospora* Differentiates Unicellular Appressoria and Pluricellular Infection Cushions

The unicellular appressorium is not the only penetration structure found in phytopathogenic fungi. Species like *Rhizoctonia* sp., *Sclerotium* sp. (*Basidiomycota*), *Sclerotinia* sp. and *B. cinerea* (*Ascomycota*) can differentiate multicellular structures devoted to plant penetration, called infection cushions (see *B. cinerea* in Figure 6). One characteristic of the infection cushion is the formation of a bundle of hyphae growing transversally towards the host cuticle or the cell wall allowing penetration of the host [14]. In our assay conditions, we could observe the formation of infection cushions but no unicellular appressorium in *B. cinerea*. This was likely due to our inoculation method, using a mycelial implant rather than a conidial suspension (Figure 6). Indeed, in *B. cinerea*, the type of infection structure observed depends on the inoculation method [24]. Noteworthy, intra-cellophane invasion by *B. cinerea* mycelium was not observed. Strikingly, in addition to the unicellular appressorium differentiated by *A. oligospora* (Figure 2), multicellular infection cushions were observed when this fungus was grown on cellophane (Figure 6). The infection cushions in *A. oligospora* were composed of bundles of two to approximately twenty hyphae. This number was smaller than the one in *B. cinerea* that formed bundles of approximately hundred hyphae (Figure 6). The depth of penetration was greater in *B. cinerea* (more than 40 μm, Figure 6) than in *A. oligospora* (smaller than 20 μm, Figure 6). This was due to the fact that in the case of *B. cinerea*, hyphae composing the infection cushion did not invade cellophane, while those of *A. oligospora* infection cushions eventually invaded cellophane a few micrometers away from the penetration point. Contrary to *B. cinerea* infection cushions, thin and short tips ahead of the hyphae composing the infection cushion were observed in *A. oligospora* (arrow heads Figure 6). This showed that the hyphae of the infection cushion in *A. oligospora* differentiated a penetration peg, likely to facilitate cellophane penetration.

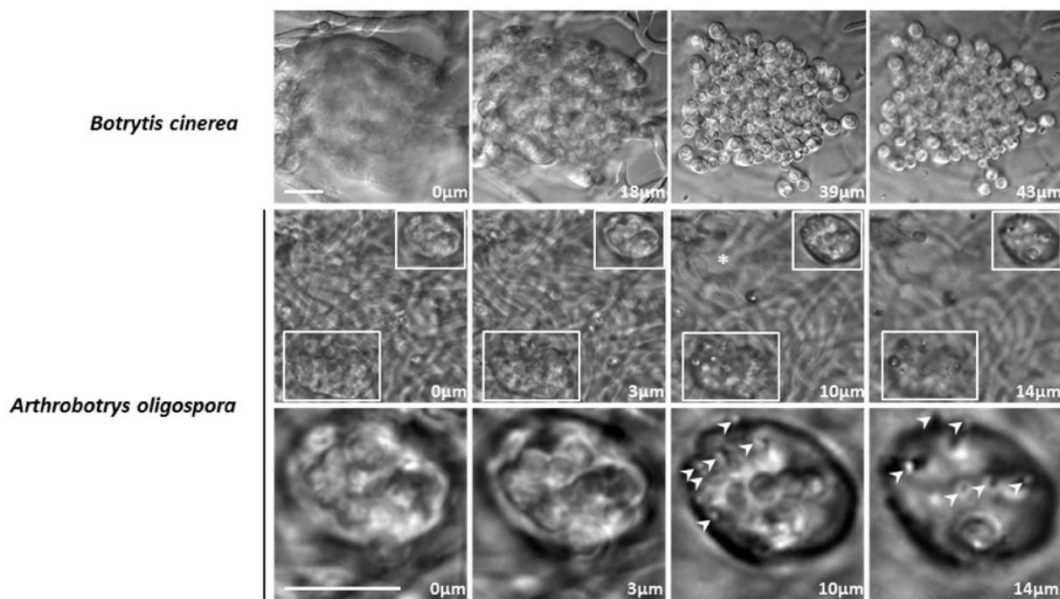


Figure 6. *Botrytis Cinerea* and *Orbiliomyces Arthrobotrys oligospora* develop infection cushions. From left to right, the four columns represent successive z-planes of the same field of view. The distances from the initial z-plane are indicated. **Upper row:** when grown on cellophane, *B. cinerea* develops penetration cushions composed of a bundle of hyphae growing together transversally to the cellophane layer. **Second row:** comparably to *B. cinerea*, in *A. oligospora*, bundles of hyphae (from 2 to 20) can grow transversally to the cellophane layer, creating an infection cushion (**upper and bottom frames**). **The last row** corresponds to the 3× magnification of the infection cushion in the upper frame. Penetration pegs (arrow heads) at the tip of the hyphae compose the infection cushions. (*) Haustorium-like growth. In contrast to *B. cinerea*, hyphae of *A. oligospora* can be observed inside the cellophane layer. Scale bar = 10 μm .

4. Discussion

Host penetration by fungi has long been an important field of research. Due to its central role in the penetration process, the appressorium, the dedicated structure in fungal pathogens as well as in mutualistic fungi, has been thoroughly studied and reviewed [5,7,24–27]. Recently, we have discovered that the coprophilous fungus *P. anserina* is able to differentiate penetration structures that we previously named appressorium-like [8]. Here, we demonstrate that the capacity to penetrate a solid surface is widely observed in saprotrophic filamentous fungi. Despite the diversity in the morphology of penetration structures, we can define penetration stages shared by all the filamentous fungi that differentiate penetration structures: (i) hyphae or germ tube (when a contaminating spore germinates) growth reorientation, (ii) setting up of a contact point with the surface (regardless of how this contact adheres to the surface and whether this contact swells, is reinforced by melanin, chitin, or if it involves pressure), (iii) differentiation of a penetration peg, (iv) differentiation of a structure similar to the haustorium and enabling nutrient uptake, and (v) development inside the host/the biomass once penetration has occurred. With respect to the broad definition of the appressorium given by Emmett and Parbery [7], we have named these penetration structures in saprotrophic fungi “appressoria”.

As other saprotrophic fungi, *P. anserina* is a potent plant biomass degrader and the sequencing of its genome highlighted the impressive set of dedicated enzymes it possesses [3]. Contrary to many *Ascomycota*, *P. anserina* harbors an impressive set of genes required for lignin degradation, and it efficiently utilizes lignocellulose as a carbon source [4]. *P. anserina* is thus endowed with a complete arsenal allowing efficient plant biomass penetration and degradation. We have shown that the complete lack of cellophane penetration in *PaNox2* mutants correlates with diminished cellulose degradation efficiency in *P. anserina*, supporting the idea that both cellulose (cellophane) penetration and cellulose

lysis are intimately linked [8]. Hence, efficient biomass deconstruction by saprotrophic fungi may not only rely on enzymatic capacities, but it may also require morphogenetic programs, such as the development of an appressorium. This latter assumption should be further considered while studying plant biomass degradation by fungi.

We have previously shown that all the isolates examined in the *P. anserina* species complex differentiate appressoria [27]. In the present paper, we show that in fact many saprotrophic *Dikarya* differentiate appressoria: 64% of the investigated species growing on cellophane (21 out of 33 saprotrophic species). These include species present in every main *Pezizomycotina* clade comprising saprotrophic species and in both *Agaricomycetes* (*Basidiomycota*) orders that we tested, *Agaricales* and *Geastrales*. Moreover, we do not exclude that the species not able to grow or not able to develop appressoria in our specific assay conditions, may actually develop appressoria in other lab conditions or in their natural habitat. For some of these fungi failing to produce penetration structures (*Eurotiales* and *Mucorales*), we further investigated their capacity to develop appressoria from germlings, but the results were similar to the one observed with a mycelial inoculum: none of them developed an appressorium. It is worth noting that in both fungi *C. cinerea* and *N. crassa*, appressorium development did not occur right after germination of their respective asexual spores, the oïdia and the macroconidia. Hence, to answer the question of whether saprotrophic fungi develop appressoria from “contaminating” spores (sexual or asexual) in the same manner as plant pathogens, will require a thorough investigation of each specific species in germination condition on cellophane or any other surface.

P. anserina potently grows and develops appressoria on cellophane which presents a hydrophilic surface. In contrast to many plant pathogens, this fungus hardly grows and does not develop appressoria on hydrophobic surfaces [8]. Hence, cellophane was chosen as the standard surface for our penetration tests, and except for three basidiomycetes strains, most of the fungal saprotrophs assayed in this paper grew well on cellophane and eventually penetrated it. Our paper represents the pioneer survey for appressorium development in saprotrophic *Eumycetes*. This work is a stepping stone, and from now on, experimental conditions specifically designed for every single saprotrophic fungus of interest will be required to fully investigate their capacity to develop penetration structures and to understand how this developmental program is regulated. In particular, the nature of the surface to penetrate (hydrophilic vs. hydrophobic), the nutritive medium as well as the inoculation methods will be paramount.

Further studies examining a broader number of saprotrophic *Basidiomycota* may answer the question whether appressorium development is as widespread in this clade as it is in *Ascomycota*. Several *Basidiomycota* plant pathogens are known to develop appressoria. This is the case of the maize pathogen *Ustilago maydis*, and several rusts in the *Pucciniomycetes* class as well as in the *Agaricomycetes* *R. solani* [25,28]. Nowadays, appressoria in these different clades are not considered as homologous structures, but this paradigm is now challenged by our discovery of appressoria all along the phylogenetic tree of *Dikarya*. We previously demonstrated that the conserved set of genes controlling appressorium development in plant pathogens belonging to *Sordariomycetes* (*M. oryzae*) and *Leotiomycetes* (*B. cinerea*), also controls appressorium development in the saprobe *P. anserina* (*Sordariomycetes*). This includes the genes encoding the Fus3/PaMpk2/Pmk1 MAPK pathway components, both Nox complexes Nox1 and Nox2, as well as their regulatory subunits NoxD, NoxR and the tetraspanin Pls1 [9,15,29]. Hence, appressoria in saprotrophic fungi and in pathogenic fungi may be homologous structures. In particular, we want to highlight the fact that Nox2, with its role in the polymerization of the appressorium basal septin ring as well as the remodeling of the actin cytoskeleton (in *M. oryzae*) together with its partner Pls1, which is required for cell polarity re-establishment at onset of appressorium development (in *M. oryzae*) [10,15,30,31], may both be pivotal components of appressorium development in filamentous fungi. Intriguingly, despite the ability of *Aspergillus fumigatus* to efficiently invade tissues and organs in human patients [20], no specialized penetration structure in this opportunistic pathogen that lacks both Pls1 and Nox2 has been described yet.

Although *Saccharomycotina* and *Taphrinomycotina* include several plant pathogens, such as *Taphrina* sp. (*Taphrinomycotina*), *Eremothecium* sp. (*Saccharomycotina*) as well as human pathogens, such as

Pneumocystis jirovecii (Taphrinomycotina), *Candida albicans* and *Candida glabrata* (Saccharomycotina), appressoria have never been described in any of these phyla. However, mycoparasitic yeasts such as *Arthroascus javanensis* or *Saccharomycopsis javanensis* (Saccharomycotina) are able to penetrate yeast cells and establish an haustorium inside the host cell [32]. Whether the appressorium of Pezizomycotina and this penetration structure in Saccharomycotina are homologous structures remains an open question.

In contrast to *Dikarya*, none of the saprotrophic *Mucoromycota* tested in this study differentiates appressoria. Nevertheless, symbiotic *Mucoromycota*, such as *Rhizophagus* sp. as well as entomopathogenic *Entomophthorales* develop appressoria [33,34]. Whether appressoria in *Mucoromycota* are homologous to those of *Dikarya* remains to be addressed.

5. Conclusions

Our paper showing that appressorium development is widespread in *Dikarya* opens a new area in the functional study of appressorium development. While in the most studied plant pathogens, the forward genetics approach, the most powerful strategy to uncover new genes, is rarely an option, genetic dissection of appressorium development in filamentous fungi can now be undertaken in saprotrophic model species such as *N. crassa*, *S. macrospora* and *P. anserina*, all of them being powerful genetics model organisms. On a broader scale, the discovery of appressorium development in a wide array of fungi reshuffles the cards of the origin of the appressorium during the evolution of *Eumycetes*. Hence, functional studies of appressorium development in a wide array of *Dikarya* as well as in *Mucoromycota* will be required to answer the question of the homology of penetration structures in *Eumycetes*.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2309-608X/5/3/72/s1>, Table S1. Strains list.

Author Contributions: All the authors have contributed substantially to the work. A.D.: investigation (microscopic analysis) and writing; P.S.: original draft preparation and writing; S.B.: investigation (microscopic analysis), writing, supervision, and project leader.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: We want to thank Sylvie Cangemi for her technical help and the ImagoSeine facility, member of the France BioImaging infrastructure supported by the French National Research Agency (ANR-10-INSB-04, « Investments fit the future »).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Chundawat, S.P.S.; Beckham, G.T.; Himmel, M.E.; Dale, B.E. Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **2011**, *2*, 121–145. [CrossRef] [PubMed]
2. Couturier, M.; Tangthirasunun, N.; Ning, X.; Brun, S.; Gautier, V.; Bennati-Granier, C.; Silar, P.; Berrin, J.-G. Plant biomass degrading ability of the coprophilic ascomycete fungus *Podospora anserina*. *Biotechnol. Adv.* **2016**, *34*, 976–983. [CrossRef] [PubMed]
3. Espagne, E.; Lespinet, O.; Malagnac, F.; Da Silva, C.; Jaillon, O.; Porcel, B.M.; Couloux, A.; Aury, J.-M.; Ségurens, B.; Poulain, J.; et al. The genome sequence of the model ascomycete fungus *Podospora anserina*. *Genome Biol.* **2008**, *9*, R77. [CrossRef] [PubMed]
4. Xie, N.; Chapeland-Leclerc, F.; Silar, P.; Ruprich-Robert, G. Systematic gene deletions evidences that laccases are involved in several stages of wood degradation in the filamentous fungus *Podospora anserina*: Wood degradation by laccases in *Podospora anserina*. *Environ. Microbiol.* **2014**, *16*, 141–161. [CrossRef] [PubMed]
5. Deising, H.B.; Werner, S.; Wernitz, M. The role of fungal appressoria in plant infection. *Microbes Infect.* **2000**, *2*, 1631–1641. [CrossRef]
6. Frank, B. Ueber einige neue und weniger bekannte Pflanzenkrankheiten. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **1883**, 29–34.
7. Emmett, R.W.; Parbery, D.G. Appressoria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **1975**, *13*, 147–165. [CrossRef]

8. Brun, S.; Malagnac, F.; Bidard, F.; Lalucque, H.; Silar, P. Functions and regulation of the Nox family in the filamentous fungus *Podospora anserina*: a new role in cellulose degradation. *Mol. Microbiol.* **2009**, *74*, 480–496. [[CrossRef](#)]
9. Marschall, R.; Tudzynski, P. Reactive oxygen species in development and infection processes. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2016**, *57*, 138–146. [[CrossRef](#)]
10. Ryder, L.S.; Talbot, N.J. Regulation of appressorium development in pathogenic fungi. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2015**, *26*, 8–13. [[CrossRef](#)]
11. Hardham, A.R. The cell biology behind Phytophthora pathogenicity. *Australas. Plant Pathol.* **2001**, *30*, 91–98. [[CrossRef](#)]
12. Harrison, M.J. MOLECULAR AND CELLULAR ASPECTS OF THE ARBUSCULAR MYCORRHIZAL SYMBIOSIS. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1999**, *50*, 361–389. [[CrossRef](#)]
13. Ortiz-Urquiza, A.; Keyhani, N.O. Action on the Surface: Entomopathogenic Fungi versus the Insect Cuticle. *Insects* **2013**, *4*, 357–374. [[CrossRef](#)]
14. Backhouse, D.; Willetts, H.J. Development and structure of infection cushions of *Botrytis cinerea*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **1987**, *89*, 89–95. [[CrossRef](#)]
15. Lambou, K.; Malagnac, F.; Barbisan, C.; Tharreau, D.; Lebrun, M.-H.; Silar, P. The crucial role of the Pls1 tetraspanin during ascospore germination in *Podospora anserina* provides an example of the convergent evolution of morphogenetic processes in fungal plant pathogens and saprobes. *Eukaryot. Cell* **2008**, *7*, 1809–1818. [[CrossRef](#)]
16. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682. [[CrossRef](#)]
17. Bourett, T.M.; Howard, R.J. In vitro development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Can. J. Bot.* **1990**, *68*, 329–342. [[CrossRef](#)]
18. Boenisch, M.J.; Schäfer, W. *Fusarium graminearum* forms mycotoxin producing infection structures on wheat. *BMC Plant Biol.* **2011**, *11*, 110. [[CrossRef](#)]
19. Rittenour, W.R.; Harris, S.D. An in vitro method for the analysis of infection-related morphogenesis in *Fusarium graminearum*. *Mol. Plant Pathol.* **2010**, *11*, 361–369. [[CrossRef](#)]
20. Fang, W.; Latgé, J.-P. Microbe Profile: *Aspergillus fumigatus*: a saprotrophic and opportunistic fungal pathogen. *Microbiology* **2018**, *164*, 1009–1011. [[CrossRef](#)]
21. Niu, X.-M.; Zhang, K.-Q. *Arthrobotrys oligospora*: a model organism for understanding the interaction between fungi and nematodes. *Mycology* **2011**, *2*, 59–78. [[CrossRef](#)]
22. Grigoriev, I.V.; Nikitin, R.; Haridas, S.; Kuo, A.; Ohm, R.; Otilar, R.; Riley, R.; Salamov, A.; Zhao, X.; Korzeniewski, F.; et al. MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D699–D704. [[CrossRef](#)]
23. Hardham, A.R. Cell Biology of Fungal Infection of Plants. In *Biology of the Fungal Cell; The Mycota*; Springer: Heidelberg, Germany, 2001; pp. 91–123. ISBN 978-3-662-06103-9.
24. Van Den Heuvel, J.; Waterreus, L.P. Conidial concentration as an important factor determining the type of prepenetration structures formed by *Botrytis cinerea* on leaves of French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Pathol.* **1983**, *32*, 263–272. [[CrossRef](#)]
25. Mendgen, K.; Hahn, M.; Deising, H. Morphogenesis and Mechanisms of Penetration by Plant Pathogenic Fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* **1996**, *34*, 367–386. [[CrossRef](#)]
26. Wilson, R.A.; Talbot, N.J. Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *7*, 185–195. [[CrossRef](#)]
27. Boucher, C.; Nguyen, T.-S.; Silar, P. Species Delimitation in the *Podospora anserina*/p. pauciseta/p. comata Species Complex (Sordariales). *Cryptogam. Mycol.* **2017**, *38*, 485–506. [[CrossRef](#)]
28. Armentrout, V.N.; Downer, A.J. Infection cushion development by *Rhizoctonia solani* on cotton. *Phytopathology* **1987**, *77*, 619–623. [[CrossRef](#)]
29. Galhano, R.; Illana, A.; Ryder, L.S.; Rodríguez-Romero, J.; Demuez, M.; Badaruddin, M.; Martínez-Rocha, A.L.; Soanes, D.M.; Studholme, D.J.; Talbot, N.J.; et al. Tpc1 is an important Zn(II)2Cys6 transcriptional regulator required for polarized growth and virulence in the rice blast fungus. *PLOS Pathog.* **2017**, *13*, e1006516. [[CrossRef](#)]

30. Dagdas, Y.F.; Yoshino, K.; Dagdas, G.; Ryder, L.S.; Bielska, E.; Steinberg, G.; Talbot, N.J. Septin-Mediated Plant Cell Invasion by the Rice Blast Fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Science* **2012**, *336*, 1590–1595. [[CrossRef](#)]
31. Veneault-Fourrey, C.; Lambou, K.; Lebrun, M.-H. Fungal Pls1 tetraspanins as key factors of penetration into host plants: a role in re-establishing polarized growth in the appressorium? *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**, *256*, 179–184. [[CrossRef](#)]
32. Lachance, M.-A.; Pang, W.-M. Predacious Yeasts. *Yeast* **1997**, *13*, 225–232. [[CrossRef](#)]
33. Garriock, M.L.; Peterson, R.L.; Ackerley, C.A. Early stages in colonization of *Allium porrw*n (leek) roots by the vesicular—arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus versiforme*. *New Phytol.* **1989**, *112*, 85–92. [[CrossRef](#)]
34. Hajek, A.E.; Filotas, M.J.; Ewing, D.C. Formation of appressoria by two species of lepidopteran-pathogenic Entomophthorales. *Can. J. Bot.* **2002**, *80*, 220–225. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

class	order	species	Strain ref.	trophic mode	particularity
<i>Orbiliomycetes</i>	<i>Orbiliales</i>	<i>Arthrobotrys oligospora</i>	CBS 115.81	saprotroph	nematophagous
<i>Pezizomycetes</i>	<i>Pezizales</i>	<i>Ascodesmis porcina</i>	PSN5	saprotroph	coprophilous
		<i>Pyronema omphalooides</i>	CBS 283.31	saprotroph	soil-borne
		<i>Marcellia conica</i>	PSN22	saprotroph	soil-borne
		<i>Ascobolus immersus</i>	FB17 (mat-)	saprotroph	coprophilous
<i>Eurotiomycetes</i>	<i>Eurotiales</i>	<i>Aspergillus niger</i>	AN26	saprotroph	ubiquitous
		<i>Aspergillus carbonarius</i>	AC19	saprotroph	ubiquitous
		<i>Aspergillus fumigatus</i>	PSN184	saprotroph	human pathogen
		<i>Penicillium expansum</i>	PSN81	saprotroph	ubiquitous
		<i>Penicillium chrysogenum</i>	peni C	saprotroph	ubiquitous
		<i>Penicillium chrysogenum</i>	peni D	saprotroph	ubiquitous
<i>Dothideomycetes</i>	<i>Capnodiales</i>	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	BCCM-IHEM 3169	saprotroph	habitats
	<i>Pleosporales</i>	<i>Preussia aff. minima</i>	PSN296	saprotroph	coprophilous
<i>Leotiomycetes</i>	<i>Helotiales</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	B05.10	phytopathogen	necrotrophic
<i>Sordariomycetes</i>	<i>Xylariales</i>	<i>Xylaria polymorpha</i>	PSN28	saprotroph	wood degrader
		<i>Poronia punctata</i>	CBS 656,78	saprotroph	wood degrader
		<i>Hypocopra anomala</i>	CBS 124649	saprotroph	wood degrader
		<i>Daldinia concentrica</i>	PSN218	saprotroph	wood degrader
	<i>Hypocreales</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	CBS 383.78	saprotroph	ubiquitous
		<i>Trichoderma aff. harzanium</i>	PSN262	saprotroph	mycoparasite
		<i>Trichoderma virens</i>	CBS 430.54	saprotroph	mycoparasite
		<i>Fusarium graminearum</i>	PH1	phytopathogen	hemibiotrophic
	<i>Sordariales</i>	<i>Chaetomium globosum</i>	DSMZ 62,110	saprotroph	coprophilous
		<i>Chaetomium longicolleum</i>	CBS 119.57	saprotroph	coprophilous
		<i>Podospora fimiseda</i>	CBS 990.96	saprotroph	coprophilous
		<i>Podospora anserina</i>	"Big S" strain	saprotroph	coprophilous
		<i>Neurospora crassa</i>	OR74A	saprotroph	ubiquitous
		<i>Sordaria macrospora</i>	000	saprotroph	coprophilous
		<i>Podospora aff. curvuloides</i>	PSN258	saprotroph	coprophilous
		<i>Schizothecium sp.</i>	PSN244	saprotroph	coprophilous
<i>Agaricomycetes</i>	<i>Agaricales</i>	<i>Schizophyllum commune</i>	PSN11	saprotroph	wood degrader
		<i>Coprinopsis cinerea</i>	H5	saprotroph	soil-borne
	<i>Polyporales</i>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	RP78	saprotroph	wood degrader
	<i>Geastrales</i>	<i>Sphaerobolus stellatus</i>	DSM1028	saprotroph	wood degrader
	<i>Cantharelalles</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	SB1	phytopathogen	necrotrophic
<i>Mucoromycetes</i>	<i>Mucorales</i>	<i>Mucor hiemalis</i>	PSN56	saprotroph	ubiquitous
		<i>Rhizopus oryzae</i>	RA 99880	saprotroph	ubiquitous
		<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	NRRL1555 (mat-)	saprotroph	ubiquitous

Table S1 : strains list

Chapitre II : Etude du mutant de germination spontanée *GUNI^{SG}*

La caractérisation du mutant *GUNI^{SG}* a fait l'objet d'un article sous le titre « The *GUN* mutants: new weapons to understand the ascospore germination process » et présenté ci-dessous. Cette future publication présente le détail du crible de mutagenèse ayant permis l'identification des 6 mutants de germination spontanée *GUN* mené par Philippe Silar. L'étude de ces mutants a été débutée par Isabelle Lacaze au laboratoire, qui a notamment isogénisé chacun de ces mutants, et réalisé le Western Blot montrant que *GUNI^{SG}* montre hyperphosphorylation de la voie *PaMpk2*, connue pour son implication dans la germination des ascospores chez *P. anserina* (Lalucque et al., 2012). Roselyne Ferrari m'a aidé à adapter le protocole du test d'activité enzymatique de la Carnitine Acetyl Transférase à *P. anserina* ainsi qu'à sa réalisation. Enfin j'ai été encadré par Sylvain Brun pour l'ensemble des travaux présentés dans cet article. Les tableaux et figures supplémentaires ont été rajoutées à la fin de l'article.

The *GUN* mutants: new weapons to understand the ascospore germination process

Alexander Demoor, Isabelle Lacaze, Roselyne Ferrari, Philippe Silar and Sylvain Brun*

Université de Paris, LIED-Laboratoire Interdisciplinaire des Energies de Demain-UMR 8236, 5 rue Marie-Andree Lagroua-Weill-Hall, 75205 Paris cedex, France

*: Correspondance to Dr. Sylvain Brun: sylvain.brun@univ-paris-diderot.fr ; tel: 00 33 1 57 27 84 73

Key words:

Running title:

Abstract

In *Podospora anserina* as in many other ascomycete species, ascospore germination is a regulated process that requires breaking of dormancy. Despite its importance in survival and dispersal, ascospore germination in filamentous fungi has been poorly investigated and little is known about its regulation and genetic control. We have designed a positive genetic screen that led to the isolation of mutants showing uncontrolled germination, the GUN mutants. In this paper, we report on the characterization of *GUN1^{SG}*. We show that *GUN1^{SG}* is mutated in *Pa_6_1340*, the ortholog of *Magnaporthe oryzae Pth2*, which encodes a Carnitine-acetyltransferase (CAT) involved in the shuttling of acetyl-CoA between peroxisomes and mitochondria and which is required for appressorium-mediated plant penetration. Bioinformatic analysis revealed that the mutated residue (I441N) is highly conserved among the *Fungi*, and that the mutation has a deleterious impact on the protein function. We show that GUN1 is essential for ascospores germination and that the protein localizes both in mitochondria and in peroxisomes. Finally, epistasis studies allowed us to place *GUN1* upstream of the *PaMpk2* MAPK pathway and the *PaNox2/PaPls1* complex in the regulation of ascospore germination. The identification of *GUN1*, the ortholog of *Pth2*, in ascospores germination strengthens the link between the genetic regulations governing both appressorium development and ascospore germination.

Introduction

Fungi are eukaryotic microorganisms able to resist adverse environments and disseminate through the formation of asexual or sexual spores. Representing the final product of sexual reproduction, sexual spores ensure survival, dissemination and create genetic diversity, promoting adaptation in changing environments (Hoekstra, 2005). Spore germination is a crucial step in fungal life cycle, and its successful completion is thus essential for survival and spread. Conidial germination represents the starting point of infection for important pathogenic species such as *Aspergillus fumigatus* or *Magnaporthe oryzae*, and its regulation has therefore been widely studied (Baltussen et al., 2020; Osheroov and May, 2001). By contrast, little is known about the regulation of ascospore germination, although ascospores are the unique dispersal propagule for many other important pathogenic species such as *Leptosphaeria maculans*, the main pathogen for oilseed rape cultures (Daverdin et al., 2012; Howlett et al., 2001). Although conidial germination and ascospore germination share some morphological similarities, several studies demonstrated that their regulation is different (Trapero-Casas and Kaiser, 2007). *Podospora anserina*, a saprotrophic coprophilous *ascomycete* from the *Sordariales* order, emerges as an excellent genetic model system to study ascospore germination. *P. anserina* produces asexual spermatia that are unable to germinate, as well as ascospores that represent the only germinating spores this fungus can differentiate. This species forms after fertilization, pear-shaped fruiting bodies called perithecia, each harbouring a few hundred to a thousand ascospores, generally embedded in groups of four inside asci (Silar, 2020). The melanized ascospores are in a dormant state and require a stimulus in order to germinate. *P. anserina* is a fungus reported to grow preferentially on herbivores' dung. Indeed, in the wild, the breaking of dormancy of *P. anserina*'s ascospores is usually induced by the passage through herbivores' digestive tract, leading to germination on dung. This stimulus is reproduced in laboratory conditions, by placing the ascospores on a germination medium (Silar, 2020). In *P. anserina*, ascospore germination takes place in several steps: i) the activation by the stimulus (dormancy breaking), ii) formation of the germination pore at the apex of the spore (opposite to the primary appendage), iii) extrusion of a germination peg (bubble) from which one or several (often two) germinating hyphae emerge.

It was shown that both H_2O_2 and O_2^- Reactive Oxygen Species (ROS) were produced during ascospore germination in *P. anserina*, suggesting that ROS may play an important role at this stage (Malagnac et al., 2004). A series of studies of pleiotropic mutants in this model species has unraveled different actors of ascospore germination. Knock-out of the superoxide (O_2^-) producing enzyme Nicotinamide-Adenine-Dinucleotide-Phosphate (NADPH) oxidase *PaNox2* encoding gene, of the *PaPls1* tetraspanin encoding gene as well as the regulatory subunit *PaNoxR*, lead to an almost complete abolishment of

ascospore germination (Brun et al., 2009; Lambou et al., 2008; Malagnac et al., 2004). Remarkably, mutations (or deletions) of the orthologs of *PaNox2* and *PaNoxR* genes lead to loss of ascospore germination ability, in both model species *Sordaria macrospora* and *Neurospora crassa*, highlighting the conservation of Nox2 and NoxR functions in the regulation of ascospores germination (Cano-Domínguez et al., 2008; Dirschnabel et al., 2014). We have proposed that, in a process similar to that of the melanized-appressorium of the plant pathogen *M. oryzae*, the Nox2-Pls1-NoxR NADPH oxidase complex may participate to the proper formation of the germination peg emerging from melanized ascospores (Brun and Silar, 2010; Malagnac et al., 2008).

Another important pathway involved in appressorium development in *M. oryzae*, as well as in ascospore germination in *P. anserina*, is the Mitogen-Activated-Protein-Kinase (MAPK) pathway *PaMpk2/MoPmk1/Fus3* (Lalucque et al., 2012; Widmann et al., 1999; Xu et al., 1998). We have shown that loss-of-function of each of the three kinases of the cascade in *P. anserina*, i.e. *PaTlk2*, *PaMkk2* and *PaMpk2*, produces strains whose ascospores are unable to germinate. By contrast, the constitutive activation of the pathway in the *PaMkk2^c* mutant harboring a constitutively activated allele of *PaMkk2*, leads to spontaneous germination of ascospores (Lalucque et al., 2012). In *N. crassa*, mutants of MAK-2, the orthologue of Fus3/PaMpk2 and also mutants of pp-1/Ste12, the transcription factor downstream of the MAK-2/Fus3 MAPK cascade, show almost complete lack of ascospore germination (Li et al., 2005; Pandey et al., 2004). Furthermore, Knock-Out of the *Ste12* orthologue in *S. macrospora* also impairs ascospore germination, suggesting a role for the Fus3-Ste12 pathway in this ascomycete species as well (Nolting and Pöggeler, 2006). It is worth noting that these three species harbour melanized ascospores that require a stimulus to germinate. Hence, the convergent evolution between the *M. oryzae* melanized appressorium and the melanized *P. anserina* ascospores may be common to the fungal species producing melanized spores, and this raises questions as to the role of this pigment during spore germination.

As in other fungi, melanin in *P. anserina* is synthesized through an enzymatic cascade, starting with the PaPks1 Polyketide Synthase (Coppin and Silar, 2007; Langfelder et al., 2003). Inactivation of this key enzyme results in total inability to produce melanin in hyphae, perithecia and ascospores, as observed in the *PaPks1¹⁹³* null mutant. Remarkably, non-melanized ascospores in the *PaPks1¹⁹³* mutant escape from dormancy and germinate spontaneously. Since the presence of melanin in cell wall contributes to its rigidity (Gómez and Nosanchuk, 2003), it is assumed that lack of melanin weakens the ascospore cell wall, leading to “accidental”, uncontrolled germination. In line with this, culturing and crossing *P. anserina* on medium containing the fungicide tricyclazole, an inhibitor of melanin production in fungi allows germination of ascospores bearing mutations in genes essential for

germination (Coppin and Silar, 2007). Accordingly, we have shown that lack of melanin production during ascospore germination allows ascospores bearing *PaNox2*, *PaNoxR*, *PaPls1* or *PaMpk2* mutations to spontaneously germinate (Brun et al., 2009; Lalucque et al., 2012; Lambou et al., 2008; Malagnac et al., 2004). Remarkably, these non-melanized ascospores totally lose viability if manipulated (when moved with a needle for harvesting for instance), confirming that lack of melanin leads to ascospore fragility. A defect in ascospore melanization is also observed in mutants of peroxisome biogenesis, peroxisomal β -oxidation and mitochondrial β -oxidation. However, these mutants show a decrease in their germination rate, indicating that primary metabolism together with acetyl-Coenzyme A (acetyl-CoA) production by β -oxidation, the main precursor in melanin biosynthesis, play key roles in the activation and in the control of ascospore germination in *P. anserina* (Berteaux-Lecellier et al., 1995; Boisnard et al., 2009; Bonnet et al., 2006; Peraza-Reyes et al., 2008). Peroxisomes are organelles of fundamental importance in particular for fungal pathogenesis (Asakura et al., 2006; Imazaki et al., 2010; Peraza-Reyes et al., 2011). In *M. oryzae*, mutants affected in peroxisomal β -oxidation and acetyl-CoA metabolism show: defects in appressorium development, appressorium demelanization and lack of pathogenicity (Chen et al., 2016; Kretschmer et al., 2012; Wang et al., 2007). Besides, the Carnitine-acetyl transferase (CAT) *Pth2* mutant was isolated in a forward genetic screen designed to uncover pathogenicity mutants in *M. oryzae*, underlining the central role of acetyl-CoA metabolism during *M. oryzae* infection (Bhambra et al., 2006; Ramos-Pamplona and Naqvi, 2006; Sweigard et al., 1998).

Despite the lack of knowledge on ascospore germination, this process has never been subjected to any dedicated genetic screening. In this paper, we describe the first genetic screening of ascospore germination mutants. Previous observations have shown that a negative genetic screening of mutants defective for ascospore germination i) is time-consuming compared to positive screening, ii) may lead to the isolation of mutants unspecifically affected for any kind of cellular processes eventually leading to lack of viability/germination of ascospores and iii) is hard to carry out since non-germinating mutants cannot complete their sexual cycle. With that in mind, we have designed a direct genetic screen aiming at isolating spontaneous germination mutants in the wild-type *P. anserina* strain normally showing controlled germination. Moreover, with the aim to specifically isolate mutants of the *PaNox2-PaPls1* pathway, we have also screened for suppressors of $\Delta PaNox2$ and $\Delta PaPls1$ mutations, for which germination was restored. In this paper, we characterize one of the screened genes affected in the “*Germination UNcontrolled 1 (GUN1^{SG})*” mutant, as well as its paralogue the “*GUN1 Paralogue 1*” gene (*GUP1*). *GUN1* codes for the orthologue of the *M. oryzae Pth2/crat1* CAT (*CAT2* in *Saccharomyces cerevisiae*; *AcuJ* in *Aspergillus nidulans*) and *GUP1* codes for the orthologue of the *FacC* CAT in *A. nidulans* and *crat2* in *M. oryzae* (Bhambra et al., 2006; Hynes et al., 2011; Ramos-Pamplona and Naqvi, 2006; van Roermund et al., 1999). In addition to the spontaneous germination

phenotype of the *GUN1^{SG}* mutant, we show that Knock-Out of *GUN1* abolishes germination, affects melanization in ascospores and delays appressorium-mediated cellophane breaching in *P. anserina*.

Materials and Methods

Strains and culture conditions

The strains used in this study are all listed in Table 1. All of these *P. anserina* strains derive from the wild-type *S* strain, ensuring a homogenous genetic background (Rizet, 1952). The *PaPks1¹⁹³* mutant for the polyketide synthase encoding gene acting at the first step of melanin synthesis is described in Coppin and Silar (2007). Standard culture conditions, media and genetic methods for *P. anserina* were described (Rizet and Engelmann, 1949, Silar 2020). The composition of the M0 and M3 media is similar to that of the M2 medium, except that dextrin is replaced by glucose in the M3 medium (5,5 g.L⁻¹), while no carbon source is added in the M0 medium. This M0 medium was used as a basis for the development of media in which the only carbon source was sodium acetate (60 mM) or oleic acid (6 mM) dissolved in Tween 40 (0.5 %). A control medium with only Tween 40 (0.5%) was also used. The germination medium used in this study was supplemented with Yeast extract (G+YE) 5 g.L⁻¹. In order to permit germination in strains producing ascospores unable to germinate, crosses were set up on M2 medium supplemented with tricyclazole (1 µg.mL⁻¹), a fungicide impairing melanin synthesis in *P. anserina* ascospores (Coppin and Silar, 2007).

Genetic screening of constitutively germinating mutants

It has been shown that wild-type *P. anserina* ascospores do not germinate on standard M2 medium and that the $\Delta PaNox2$ and $\Delta Pls1$ mutant strains produce ascospores unable to germinate on all tested media (Lambou et al., 2008; Malagnac et al., 2004). With the aim to isolate mutants producing spontaneously-germinating ascospores, a UV mutagenesis was performed on auto-fertile *mat-/mat+*, wild-type *S* (*WT*), $\Delta PaNox2$ and $\Delta Pls1$ strains. The selection process of the germination mutants is summarized in Figure S1. Shortly after UV exposure, followed by a one-day culture in the dark, the mutated strains were grown on standard M2 medium for one week, until they developed mature ascospores-producing perithecia. In order to recover spontaneously germinating ascospores, M2 medium plates were put on top of the plates bearing perithecia, which allowed ascospores to be harvested in bulk. In *P. anserina*, most of the progeny is composed of dikaryotic *mat+/mat-* ascospores leading to auto-fertile mycelium upon germination (Silar, 2013). The mycelium produced by the spontaneously germinating ascospores was incubated until they formed mature perithecia. Ascospores produced by these perithecia were individually collected with a needle and transplanted onto M2 medium. To ensure their independence, a single mutant (*i.e.*, a single spontaneously

germinating homokaryotic ascospore) per initial plate was selected for further analyses. For each mutant, progeny analyses of mutant X Wild-Type crosses showed that a single mutated locus was responsible for the mutant phenotype (*i.e.*, spontaneous germination of ascospores). For mutants recovered with the $\Delta PaNox2$ and $\Delta Pls1$ strains, genetic analyses showed that the mutations enabling germination were unlinked to the $\Delta PaNox2$ and $\Delta Pls1$ mutations, respectively. Homokaryotic *mat*- and *mat*+ mutant strains were isolated from the progenies and homozygous mutant crosses were performed to check for the fertility/sterility of the mutants. For every isolated strain, microscopic observations were also performed to determine whether the ascospores germinated through the germination pore or through any other part of the ascospore.

Tetrad analysis in the *GUN1^{SG}* and in $\Delta GUN1$ strains

P. anserina produces mainly asci containing four dikaryotic ascospores, allowing non-ordered tetrad analysis of first division segregation (FDS) asci and second division segregation (SDS) asci. To determine dominance/recessivity of the *GUN1^{SG}* allele, we crossed the *GUN1^{SG}* mutant with the *WT*. In the progeny, we found that 16/30 asci contained four ascospores unable to germinate on M2 medium ([*WT*] phenotype) and 14/30 asci contained 1 or 2 ascospores germinating on M2 medium ([*GUN*] Germination Uncontrolled phenotype) and 2 or 3 ascospores unable to germinate on M2 medium. Importantly, we never observed asci containing more than 2 ascospores germinating on M2 medium. Assuming some ascospore germination failure, we concluded that i) asci of the first type were SDS asci containing 4 *GUN1^{SG}/GUN⁺* genotype [*GUN*] ascospores, ii) asci of the second type were FDS asci containing 2 *GUN1^{SG}/GUN1^{SG}* [*GUN*] and 2 *GUN⁺/GUN⁺* [*WT*] ascospores and thus iii) the *GUN1^{SG}* allele was recessive against the wild-type *GUN1* allele (*i.e.*, only *GUN1^{SG}/GUN1^{SG}* ascospores germinated on M2 medium).

Tetrad analysis was also performed to test functional complementation of the $\Delta GUN1$ null allele by the *GUN1* wild-type allele. Surprisingly, $\Delta GUN1$ homokaryotic ascospores were not melanized and were unable to germinate, thus defining the [$\Delta GUN1$] phenotype. Moreover, in the progeny of a $\Delta GUN1$ X *GUN1^{SG}* cross, two types of asci were obtained. Asci of the first type contained 4 melanized ascospores. Up to 4 of these ascospores germinated on M2 medium. Asci of the second type contained 2 [$\Delta GUN1$] ascospores and 2 melanized ascospores able to germinate on M2 medium (*n.b* as seen previously, only one of the two melanized ascospores germinated). We concluded that asci of the first type were “non-complementing” SDS asci containing 4 $\Delta GUN1/GUN1^{SG}$ [*GUN*] ascospores. Asci of the second type were FDS asci containing 2 $\Delta GUN1/\Delta GUN1$ and 2 *GUN1^{SG}/GUN1^{SG}* [2 $\Delta GUN1$:2 *GUN*] ascospores. Altogether, this demonstrated genetically that $\Delta GUN1$ and *GUN1^{SG}* were allelic.

Identification of the *GUN1* gene

In a first step towards identifying the gene mutated in *GUN1*^{SG} through whole genome sequencing, we backcrossed the mutant for five generations with the parental wild-type *S* strain as to eliminate any mutation unrelated to the mutant phenotype and genetically unlinked to the *GUN1* locus. The *GUN1*^{SG} mutant genomic DNA was then extracted by Lecellier and Silar (1994). The genomic DNA was then subjected to complete sequencing with the Illumina technology (CNRS, I2BC Sequencing Facility, <https://www.i2bc.paris-saclay.fr/spip.php?article1184&lang=en>). Custom-made libraries had 300 bp inserts and sequencing was 76-bp paired-end. Coverage was 80-fold. The sequence reads were then mapped onto the latest version of the reference genome of the *S* strain as described (Grognet et al., 2014). Potential mutations were detected using Samtools and bcftools on the Galaxy web server (<https://usegalaxy.org/>).

Deletion of *GUN1* and *GUP1*

The deletion of *Pa_6_1340/GUN1* and its paralog *Pa_3_7660/GUP1* were performed using a deletion cassette made of two overlapping PCR fragments (Lalucque et al., 2012). This method is based on the generation of two DNA PCR fragments carrying a resistance marker flanked by either 5' or 3' non-coding sequence of the targeted gene. For *Pa_6_1340/GUN1*, we first generated a 803 bp-long 5'-non-coding region and a 486 bp-long 3' region through PCR-amplification of the *S* strain DNA with primers pairs: 1340_1/1340_2 and 1340_3/1340_4 (Table S1). At the same time, the hygromycin B resistance marker was amplified with 1340_MkF and 1340_MkR (Table S1) from the pBC-hygR vector (Silar, 1995). In a second PCR round, using primers 1340_1 and 1340-MkR, and 1340-MkF and 1340_4 enabled to merge the resistance marker with either the 5' or the 3' region. The two PCR products were used to transform a $\Delta mus51::genR$ strain, in which the *mus51* gene involved in the NHEJ repair system is replaced by a geneticin resistance gene [*genR*], allowing high rate of homologous recombination (El-Khoury et al., 2008). Two hygromycin B-resistant [*hygR*] transformants were obtained. Each one was crossed with the wild-type *S* strain. We observed that homokaryotic [*hygR*] ascospores did not germinate. Consequently, crosses were performed on M2 supplemented with tricyclazole, leading to spontaneous germination of ascospores. Ascospores were collected on M2 medium supplemented with hygromycin B, the germlings were fragmented and [*hygR*, *phleoS*] $\Delta GUN1::hygR$ homokaryotic mycelia of each mating type were isolated. Deletion of *Pa_6_1340* was verified by Southern blot analysis (Figure S2). The same protocol was performed for the deletion of *Pa_3_7660/GUP1*. Using the primers pairs: 7660_F1/7660_R2 and 7660_R3/7660_R4 (Table S1), a 1104 bp-long 5'-non-coding

region and a 1011 bp-long 3' region were PCR-amplified, while the phleomycin resistance marker was amplified with 7660_MkF and 7660_MkR (Table S1) from a pBC-phleoR plasmid (Silar, 1995). In a second PCR round, using primers 7660_F1 and 7660_MkR, and 7660_MkF and 7660_R4 enabled to merge the resistance marker with either the 5' or the 3' region. Two PCR products were used to transform a $\Delta mus51::genR$ strain. 26 phleomycin-resistant transformants [phleoR] were obtained and two independent [phleoR, genS] $\Delta GUP1::phleoR$ strains were selected from the progeny of a cross with the wild-type S strain (germination of $\Delta GUP1::phleoR$ ascospores was as wild-type). Deletion in these two independent strains was verified by Southern blot analysis (Figure S3).

Plasmid constructions for the complementation of $GUN1^{SG}$, $\Delta GUN1$ and $\Delta GUP1$

Construction of pGUN1: The *Pa_6_1340/GUN1* CDS PCR and its 803 bp (5' UTR region) and 486 bp (3' UTR region) regulating sequences were amplified by PCR from *P. anserina* genomic DNA using 1340_1 and 1340_4 primers (Table S1). The PCR product obtained was cloned blunt-end into pBC-genR plasmid carrying a geneticin resistance marker digested by *EcoRV* to produce the pBC-GUN1-genR (renamed pGUN1). The insert was verified by sequencing. This plasmid was used to transform the $\Delta GUN1::hygR$ deletion strain. 3 [genR] transformants were obtained and checked for the restoration of wild-type phenotypes in ascospores. To that end, both independent transformants were crossed with the $\Delta GUN1::hygR$ strain. In the progeny of both crosses, [hygR, genR] melanized ascospores germinated (on G+YE germination medium) allowing us to purify $\Delta GUN1$, pGUN1 strains and to show that the wild-type *GUN1* copy complemented the $\Delta GUN1$ mutation. [hygS, genR] +, pGUN1 were also isolated. These ascospores germinated as the wild type. The pGUN1 was also used to transform the $GUN1^{SG}$ mutant. 3 [genR] transformants were obtained and crossed with $GUN1^{SG}$ to assess restoration of wild-type germination in the progeny. For only one transformant, we observed that $GUN1^{SG}$, pGUN1 progeny showed wild type ascospore germination, *i.e.* $GUN1^{SG}$, pGUN1 spores did not germinate spontaneously on M2 medium but germinated on G+YE germination medium.

Construction of pGUP1: the *Pa_3_7660/GUP1* CDS and its 1104 bp (5' UTR region) and 1011 bp (3' UTR region) regulating sequences were amplified by PCR from genomic DNA using 7660_F1 and 7660_R4 primers (Table S1). The PCR product obtained was cloned blunt-end into pBC-nouR digested by *EcoRV* (carrying a nourseothricin resistance marker) to produce the pBC-GUP1-nouR plasmid (renamed pGUP1). The pGUP1 plasmid was used to transform the $\Delta GUP1::phleoR$ deletion strain. 17 [nouR] transformants were obtained and checked for the restoration of growth on acetate [ace+]. 14 of them were [ace+], showing that a wild-type copy of *GUP1* complemented $\Delta GUP1$ phenotype; 2 were crossed with the wild-type S strain and [phleoR, nouR] $\Delta GUP1$, pGUP1 as well as [phleoS, nouR] +, pGUP1 homokaryotic strains were purified.

Plasmid construction for GUN1- and GUN1^{SG}-mCherry tagging

Two kinds of tagging were undertaken: One with mCherry-AKI carrying the AKI PTS1 peroxisome targeting signal present in C-terminus of GUN1, added at in C-terminus of the mCherry, and mCherry without the AKI PTS1 signal. We constructed two plasmids that allowed integration of the *mCherry-AKI* CDS or the *mCherry* CDS in 3' of the *GUN1* allele and the *GUN1*^{SG} allele at the endogenous *GUN1* locus by homologous recombination (Figure S4). To achieve this, the 621 bp region upstream of the stop codon and downstream of the mutation present in the *GUN1*^{SG} allele was PCR-amplified with primers 1340GFP_F2 and 1340GFP_R1 (Table S1), designed to incorporate the *Apal* and *XhoI* restriction sites in the sequence respectively. Firstly, the PCR product was cloned blunt-end at the multiple cloning site (MCS) of the pBC-genR plasmid, previously digested with the restriction enzyme *EcoRV*. The insert was sequenced, digested with the restriction enzymes *Apal* and *XhoI* and gel purified to be finally cloned upstream to the mCherry CDS into the pmCherry-hygR plasmid digested by *Apal* and *XhoI* (Table S1). The pGUN1-mCherry-hygR plasmid was sequenced and transformed into *Δmus52::genR* and *GUN1*^{SG} *Δmus52::genR* strains to promote homologous recombination. We obtained 1 *Δmus52::genR*, pGUN1-mCherry-hygR transformant, and 2 *GUN1*^{SG} *Δmus52::genR*, pGUN1-mCherry-hygR transformants. Each one of these was backcrossed with the *S* strain, to remove the *Δmus52::genR* mutation, and sequenced to ensure that recombination occurred at the *GUN1* locus. Moreover, the germination phenotype was checked by sowing homokaryotic on M2 and G+YE media. Eventually, red fluorescence was checked directly using mCherry filters at the microscope. For the pGUN1-mCherry-AKI plasmid, we amplified by PCR the insert present in pGUN1-mCherry-hygR with primers 1340GFP_F2 and mCH_AKIR1, the latter allowing addition of the AKI coding sequence at the end of the mCherry (Figure S4). This 1341 bp PCR fragment was cloned blunt-end into pBC-nouR digested with *EcoRV*. The construction was sequenced and transformed into the *Δmus52::genR*. Once purified of the *Δmus52::genR* mutation, and the correct insertion verified by sequencing, the selected *GUN1*-mCherry-AKI transformant was crossed with the *GUN1*^{SG} mutant. Perithecia produced by this cross expelled their asci on M2 medium supplemented with Nourseothricin, and 13 spontaneously germinating ascospores (*GUN1*^{SG}-mCherry-AKI) were selected and transplanted on M2 + Nourseothricin to confirm antibiotic resistance. Every spontaneously germinated ascospore was dikaryotic and cultured for one week, to produce auto-fertile thalli. Spontaneous germination of the projected ascospores was analyzed for each candidate, and one spontaneously germinating [*GUN1*^{SG}; NouR] mutant was selected. 42 monokaryotic ascospores projected by perithecia produced by the auto-fertile mycelium of this mutant, were sown. After phenotypic analysis of the germinated

offspring, two monokaryotic [*GUN1^{SG}*; *NouR*] candidates were selected and verified through sequencing.

Mycelium fragmentation and purification

Since Δ *GUN1* offspring were unable to germinate, homozygous crosses of this strain were performed on M2 medium supplemented with tricyclazole (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Δ *GUN1* ascospores thus produced were unpigmented and germinated spontaneously on agar plates. 16 hours after projections were stopped, ascospores had germinated and started to produce small thalli. A small implant of the thallus of interest (0.5 cm^2) was set in 2 mL tube containing 500 μL H_2O and ground using a FastPrep (TeSeE - Biorad, Hercules, California, United States) (20s, 5000 rpm). 100 μL of the fragmented mycelium were then spread on an agar plate, and small hyphal fragments were isolated, using a binocular magnifying glass (magnification x40). These fragments were then placed on M2 medium and cultured for 2 days at 27 ° C. Homokaryotic state was determined through a cross with the *S* strain, using either a *mat+* or *mat-* implant for testing.

Glucose impact assay

It has been shown in *M. oryzae Pth2* mutants that the addition of a 2.5% glucose solution partially restores wild-type phenotypes (Bhambra et al., 2006). To investigate the potential impact of glucose on the *GUN1* mutants, homozygous crosses of Δ *GUN1* and *GUN1^{SG}* were carried out, and the ascospores were projected onto an M3 medium rich in glucose. This assay was completed with a second one, which consisted in sowing ascospores resulting from these same homozygous crosses on G+YE (for Δ *GUN1* ascospores) or M2 medium (for *GUN1^{SG}* ascospores), both in the presence and in the absence of a 20 μL droplet of a 2.5%, 5% or 10% solution of glucose at the location of the sown ascospores.

Fertility assay

Homozygous crosses were performed: two implants (0.5 cm^2) each coming from the complementary mating type of the strain of interest were placed in 2 mL tubes containing 500 μL H_2O and ground using a FastPrep (TeSeE - Biorad, Hercules, California, United States) (20s, 5000 rpm). 10 μL were then dropped onto M2 medium and cultured for one week at 27 °C exposed to light. This method allowed cross standardization between replicates. To evaluate the ascospore production rate of each mutant strain, these crosses, once mature, expelled their progeny for 4 days on the plate lids. Pictures of lids were then taken to compare the densities of expelled ascospores for each cross.

Cellophane penetration assay

An implant of each tested strain was placed on a cellophane layer (Biorad, Hercules, California, United States). After 2-, 3-, 4-, and 5-days growth at 27 ° C, the cellophane layer was removed, and the presence of small mycelium was checked and measured to determine if the strain had mechanically passed through the cellophane layer. Beyond that time frame, the cellophane layer was enzymatically degraded by the growing fungus.

Microscopic observations

Ascospore observation: Ascospores observations were performed on Ibidi 8-wells chamber microslides (Gräfelfing, Germany). Each well was filled with 200 µL of either M2 or modified G liquid medium with half the quantity of Bacto peptone compared to normal G medium, to reduce the fluorescing background noise as much as possible, while keeping the germinating properties of this medium. Crosses were performed on standard M2 medium. When perithecia were mature, medium segments containing perithecia were cut and placed above the microscopic chambers upside-down. Perithecia were left to project ascospores for 5 hours.

Mycelium observations: small squares of medium (1 cm²) with grown mycelium on it were cut at the edge of the thallus and placed upside down on a coverslip of a microscopic chamber. Images were taken with an inverted microscope Zeiss spinning disk CSU-X1 (Oberkochen, Germany), with 4 lasers (405nm, 488nm, 561nm, 640nm) for fluorescence observations and their associated filters and a sCMOS PRIME95 (Photometrics) camera at the Imagoseine Imaging Facility: <https://imagoseine.ijm.fr/676/accueil.htm>. The images were analysed with Fiji (Schindelin et al., 2012).

Phylogenetic analysis

Fungal genes homologous to *GUN1* were searched by BLAST in GenBank and MycoCosm (Grigoriev et al., 2014) in *Ascomycota*, *Basidiomycota* and *Mucoromycota* species, using the default parameters with the GUN1 protein sequence as query. Hits with an e-value lower than 10⁻⁵ were selected. Research for other homologs was carried out for each species on OrthoDB (Kriventseva et al., 2019). The alignment was performed with MAFFT (Katoh et al., 2005) and manually refined using Jalview (Waterhouse et al., 2009). The phylogenetic tree was built using the maximum likelihood method (PhyML software using the default parameters) (Guindon and Gascuel, 2003). The tree was visualized on the iTOL server (Letunic and Bork, 2007). Bootstrap values are expressed as percentages of 100 replicates (Figure S5). The GUN1 I441 residue conservation was assessed by visualizing the alignment on Jalview (Figure S6) (Waterhouse et al., 2009).

Bioinformatic analysis of the GUN1 protein

The analysis of the protein sequence was carried out using multiple tools: CD-search: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> (Marchler-Bauer and Bryant, 2004), Interproscan: <https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/> (Quevillon et al., 2005), and Prosite: <https://prosite.expasy.org/> (Sigrist et al., 2010). Prediction of its localization was realized using wolfPSORT: <https://wolfpsort.hgc.jp/> (Horton et al., 2007). For research of a Mitochondrial Targeting Signal (MTS), we used MitoFates: <http://mitf.cbrc.jp/MitoFates/cgi-bin/top.cgi> (Fukasawa et al., 2015). 3D homology modelling was performed using Swiss model: <https://swissmodel.expasy.org/> (Waterhouse et al., 2018), and a 3D structure prediction of the GUN1 protein was achieved using the I-TASSER platform available at: <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/> (Roy et al., 2010). The impact of the missense I447N mutation in *GUN1*^{SG} on protein structure and stability was assessed using the STRUM server (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/STRUM/>) and the PROVEAN online tool (<http://provean.jcvi.org/index.php>) respectively (Choi and Chan, 2015; Quan et al., 2016).

Measure of CAT activity

Protein extraction

Mycelia growing on M2 medium (2 confluent plates per strain) were harvested after 2 days, and placed in 2 mL tubes each one containing a tungsten bead (diameter 3 mm), 1 mL of potassium phosphate buffer (pH=7.4) supplemented with EDTA 2 mM and ground in a TissueLyser II apparatus (Qiagen, Hilden, Germany) at 30rpm/s for 4 min at 4 °C. The lysate was centrifugated at 4 °C for 20 min at 17000 g and the pellet (cell debris) was discarded. The protein concentration in the supernatant was estimated by the spectrophotometric Bradford method (Sigma Chemical Co., St Louis).

For ascospore protein extraction, each strain was crossed (in homozygous crossing) on at least 5 M2 medium plates. When perithecia were mature, ejected ascospores were collected on agar plates topped with a cellophane layer, to facilitate the harvesting process, and pulled together in a 2 mL tube for each strain, each one containing a tungsten bead (diameter 3 mm). Immediately after harvesting, each tube was flash frozen in liquid nitrogen. Ascospores were dry-crushed in a TissueLyser II apparatus (Qiagen, Hilden, Germany) at 30 rpm/s for 4 min. Ascospores were maintained at -80°C in precooled TissueLyser blocks. The crushed ascospores were resuspended in 200 µL of potassium phosphate buffer (pH=7.4) supplemented with EDTA 2 mM. The lysate was centrifugated at 4 °C for 20 min at 17000 g and the pellet (cell debris) was discarded. The protein concentration in the

supernatant was estimated by the spectrophotometric Bradford method (Sigma Chemical Co., St Louis).

Carnitine-acetyltransferase assay

Carnitine-acetyltransferase (CAT) activity was assayed as described by Kawamoto et al. (1978). The reaction was monitored spectrophotometrically at room temperature by following the release of CoA-SH from acetyl-CoA using the thiol reagent 5,5'-dithiobis-nitrobenzoic acid (DTNB). The reaction mixture contained 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) 0.05 mM acetyl-CoA (Sigma Chemical Co., St Louis), 0.1 mM DTNB (Sigma Chemical Co., St Louis), 22 mM DL-carnitine chloride (Sigma Chemical Co., St Louis) and protein extract in final vol. 1.0 mL. The reaction was initiated by adding a volume of the protein extract and the increase in absorbance was followed at 412 nm. CAT activities were determined by measuring initial velocity of the CoA-SH production reaction, and then reported as the activity ratio of the wild-type (*WT*) *S* strain. Standard deviations and statistical analyses were calculated on 4 to 7 biological replicates. Eventually, CAT activities were compared using a Fisher-Pitman Permutation Test.

Western Blot analysis

PaMpk2 phosphorylation was assessed as described in Lalucque et al., (2012). Ascospores produced by homozygous crosses of the *S* strain, the *PaMkk2^c* mutant and the *GUN1^{SG}* mutant were harvested on agar plates topped with a cellophane layer to facilitate the harvesting process. For germination induction, a cellophane layer containing wild type ascospores was transferred on G+YE medium for 2 hours. Once collected, ascospores were flash frozen in liquid nitrogen, then dry-disrupted in a Micro-Dismembrator (Sartorius) at 2600 rpm for 1 min. Crushed ascospores were resuspended in Laemli buffer, placed 5 minutes at 100 °C, then centrifuged for 15 min at 14000 rpm. The supernatant was stored at -20 °C before analysis. Samples were placed on a 15% SDS-PAGE gel 1 mm thick, and migrated for 3 h at 130V, 25mA / gel and 25W. The gel was then transferred onto a PVDF membrane. Hybridization with the anti p44/p42, or anti phospho p44/42 (Cell Signaling Technology) antibodies, diluted to 1/1000, was carried out overnight at 4°C. Hybridization with the second antibody coupled to peroxidase (GEHealthcare), diluted to 1/1000, was carried out for 1 h at room temperature. For the revelation, the Immobilon® chemiluminescence kit (Millipore) was used according to the supplier's recommendations.

Results

Isolation of *Germination Uncontrolled-GUN* mutants

In *P. anserina*, wild-type ascospores are dormant and do not germinate on standard M2 medium. They require a stimulus to germinate, provided in laboratory conditions in the specific germination G+YE medium (Silar, 2013). Rather than screening for mutants unable to germinate, we set up a positive genetic screen allowing isolation of mutants producing spontaneously germinating ascospores on M2 medium. In parallel, we screened for suppressors of the germination defect of the $\Delta PaNox2$ and $\Delta PaPls1$ mutant strains (Lambou et al., 2008; Malagnac et al., 2004) using the same screen. Auto-fertile (*mat+/mat-*) mycelia of the *S*, $\Delta PaNox2$ and $\Delta PaPls1$ strains were exposed to UV mutagenesis and mutants producing spontaneously germinating ascospores on standard M2 medium were isolated (see Figure S1 and Mat. & Met.). Mutants screens allowed recovery of 22 suppressors of $\Delta PaNox2$, 16 suppressors of $\Delta PaPls1$, and 19 mutants from the *S* strain, all of them producing ascospores spontaneously germinating on standard M2 medium. Genetic analysis of these mutants revealed that for all of them, the mutant phenotype was controlled by a single locus. We then checked the germination process in these 57 mutants by microscopic analysis. For all the suppressors of $\Delta PaNox2$ and $\Delta PaPls1$, and 13 mutants of the *S* strain, ascospores germination was morphologically abnormal. In these mutants, we could observe germination through the primary appendage instead of the germination pore in 40 mutants or ascospores germinating through the sides in 11 mutants. Only 6 of the mutants isolated from the wild-type *S* strain showed morphologically normal germination proceeding through the germination pore and extruding canonical germination bubble at the tip of the ascospore (Figure 1). These 6 mutants were named *GUN* (*Germination UNcontrolled*). At first glance, these 6 *UNcontrolled Germination-GUN* mutants might represent mutants of genes involved in the signalling pathway that controls germination, while the other mutants and suppressors isolated might be structural mutants in which the cell wall or the primary appendage of the ascospores were modified, leading to accidental ascospore germination, or mutants in which the precursor of the primary appendage failed to undergo cell death. We started the study of the *Germination UNcontrolled 1-allele SG (Spontaneous Germination) GUN1^{SG}* mutant. This mutant differentiated ascospores with normal shape, visually normal melanization and spontaneous germination through the germination pore. We determined the germination rate of this mutant on M2 medium, as well as on G+YE medium, and compared it to the Wild-Type (WT). Throughout our experiments, we never observed germination of *WT* ascospores when sown onto M2 medium. In contrast, when *GUN1^{SG}/GUN1^{SG}* dikaryotic ascospores were transferred onto M2 medium, 54/100 germinated. In the

same experiment, 94/100 germinated on G+YE, a comparable rate to *WT* ascospores (92/100). Once germination was initiated, development of the mycelium produced by the *GUN1^{SG}* mutant was identical to *the WT*: the *GUN1^{SG}* mutant showed wild-type vegetative phenotype, growth rate, fertility, ascospore production volume, appressorium development and cellophane breaching, suggesting that the mutation impacted only the initiation of the ascospores germination (Figure 1).

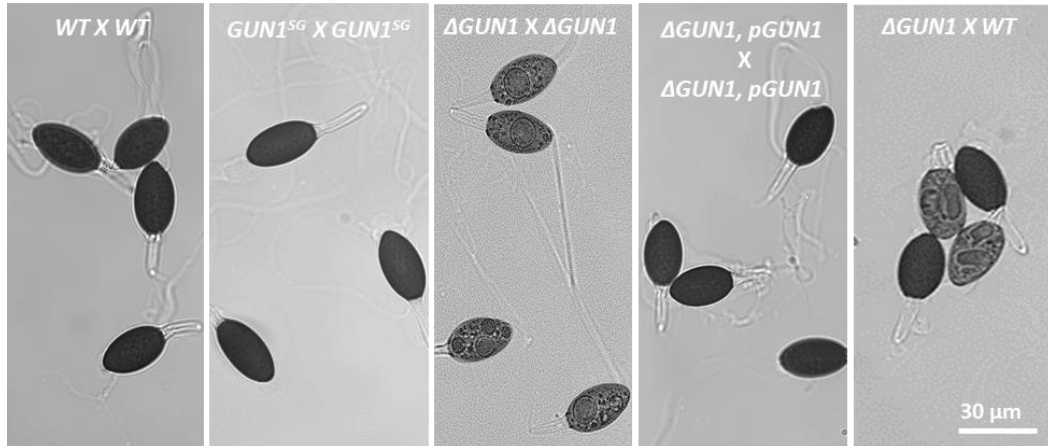


Fig. 1: Ascospores morphology. Wild-Type (*WT*), *GUN1^{SG}/GUN1^{SG}* and *ΔGUN1/ΔGUN1 pGUN1/pGUN1* ascospores are fully melanized compared to *ΔGUN1/ΔGUN1* ascospores which are partially demelanized. Scale bar 30 μm .

***GUN1* encodes a Carnitin-acetyltransferase (CAT)**

The gene mutated in *GUN1^{SG}* was identified through whole-genome sequencing. To this purpose, this mutant was backcrossed 5 times with the wild-type strain S beforehand, in order to eliminate mutations generated during UV mutagenesis but not genetically linked to the mutation responsible for the spontaneous germination phenotype. The analysis of *GUN1^{SG}* whole-genome sequence revealed the presence of 6 silent mutations, and 3 missense mutations, one in *Pa_1_13700*, which encodes a putative protein of unknown function, another in *Pa_5_7800*, encoding a putative phosphoketolase and the last one in the *Pa_6_1340* CDS. Among the mutated genes, the *Pa_6_1340* gene caught our attention. This gene encodes a peroxisomal/mitochondrial Carnitine-acetyltransferase (CAT), a 643 amino acids enzyme (Masterson and Wood, 2000; Seccombe and Hahn, 1980; Strijbis and Distel, 2010; Strijbis et al., 2010). The missense mutation in the *GUN1^{SG}* mutant changed an isoleucine to an asparagine (I441N). Homologs of this gene have previously been studied in *S. cerevisiae*, *A. nidulans*, *Giberella zaeae*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *M. oryzae* where they are involved in acetate/acetyl-CoA metabolism and pathogenicity for the phytopathogens (Bhambra et al., 2006; Hynes et al., 2011; Liberti et al., 2013; Son et al., 2012). For instance, loss-of-function of *Pth2*, the *Pa_6_1340* ortholog in *M. oryzae*, causes a defect in the formation of the penetration structure,

the appressorium, and *Pth2*⁻ mutants (and $\Delta Pth2$) are no longer pathogenic (Bhambra et al., 2006; Ramos-Pamplona and Naqvi, 2006). Remarkably, it has been shown that the formation of the appressorium and the germination of ascospores are two processes sharing common regulatory elements (Lambou et al., 2008; Malagnac et al., 2008). Regarding the role of acetate and peroxisomes in the control of germination in *P. anserina*, *Pa_6_1340* represented a particularly good candidate to further study. Finally, transcriptomics data on ascospores germination indicated that *Pa_6_1340* was induced, (F.C= 56,35) emphasizing the involvement of this gene during ascospores germination (Demoor, unpublished data). To explore the role of *Pa_6_1340* in the ascospores germination process, a targeted gene replacement was performed, in which the *Pa_6_1340* CDS was substituted by a hygromycin B resistance marker. The gene disruption construct was introduced into a $\Delta mus51::phleoR$ strain impaired for non-homologous recombination (El-Khoury et al., 2008). Two independent hygromycin B-resistant [hygR] transformants were obtained. In order to purify ΔPa_6_1340 from the $\Delta mus51$ mutation, we crossed both primary transformants with the *S* strain. Strikingly, we observed partially demelanized ascospores in the progeny of both crosses. Furthermore, when homokaryotic ascospores were sown on G+YE, only half of the progeny germinated, and those were only [hygS] melanized ascospores. This clearly indicated that the [hygR] ΔPa_6_1340 ascospores were the partially demelanized ones and that they were not able to germinate. These crosses were reproduced on M2 medium supplemented with tricyclazole, a fungicide impairing melanin synthesis and provoking spontaneous germination of ascospores in *P. anserina* (Coppin and Silar, 2007). We collected ascospores on M2 medium supplemented with hygromycin B and we isolated [hygR] germinating thalli. These thalli were fragmented and homokaryotic [hygR, phleoS] ΔPa_6_1340 strains of each mating type were purified. Then, deletion of the *Pa_6_1340* CDS was verified by Southern Blot analysis (Figure S2). In a homozygous $\Delta Pa_6_1340 \times \Delta Pa_6_1340$ cross the whole ascospores exhibited partial demelanization and completely lost their ability to germinate, even on G+YE medium, a phenotype opposite to that of *GUN1*^{SG} (Figure 1). This data indicated that the *Pa_6_1340* gene played a key role in both melanization and germination in ascospores. Recessivity of ΔPa_6_1340 phenotype was confirmed by the genetic analysis of dikaryotic ascospores from $\Delta Pa_6_1340 \times S$ cross. In the progeny we obtained 11 SDS asci containing 4 [hygR] $\Delta Pa_6_1340/+$ dikaryotic melanized ascospores germinating on G+YE medium and 9 first division segregation (FDS) asci containing 2 $\Delta Pa_6_1340/\Delta Pa_6_1340$ demelanized non-germinating dikaryotic ascospores and 2 [hygS] $+/+$ wild-type dikaryotic ascospores germinating on G+YE medium. These data demonstrated that the phenotypes of the ΔPa_6_1340 strain were recessive and that the SDS rate of the ΔPa_6_1340 locus was 55 %. ΔPa_6_1340 exhibited additional phenotypes: although perithecium production of ΔPa_6_1340 was similar to that of the wild-type strain, ascospore production was reduced (Figure S7).

In addition, we found that in the ΔPa_6_1340 mutant, breaching of cellophane was delayed compared to the wild-type (Table 2). However, microscopic observations did not detect any defect of appressorium development. Significantly, introduction of the wild-type allele of Pa_6_1340 carried on the $pGUN1$ plasmid into the ΔPa_6_1340 genome restored wild-type phenotypes (Figure 1, 2 & 4). This indicated that ΔPa_6_1340 phenotypes were all recessive. To determine whether Pa_6_1340 was the gene mutated in the $GUN1^{SG}$ mutant, we assayed functional complementation of the $GUN1^{SG}$ mutant. We determined that spontaneous germination in $GUN1^{SG}$ was a recessive trait in dikaryotic ascospores. In the progeny of $GUN1^{SG} \times S$ cross only $GUN1^{SG}/GUN1^{SG}$ dikaryotic ascospores contained in FDS asci germinated on M2 standard medium while $GUN1^{SG}/+$ ascospores in SDS asci germinated only on G+YE medium but not on M2 medium with a SDS rate of 54%, a value similar to the SDS rate of the Pa_6_1340 locus, suggesting that Pa_6_1340 and $GUN1^{SG}$ could be allelic (see Mat. & Met.). Once the recessivity of the $GUN1^{SG}$ mutation was demonstrated, we crossed $GUN1^{SG}$ with ΔPa_6_1340 expecting functional complementation (*i.e.*, restoration of wild-type phenotype in SDS dikaryotic ascospores) in case $GUN1^{SG}$ and ΔPa_6_1340 were not allelic and if not, expecting spontaneous germination on M2 medium of SDS dikaryotic ascospores (non-complementation) if $GUN1^{SG}$ and ΔPa_6_1340 are allelic (see Mat. & Met.). The SDS asci were easily recognized, since they contained 4 [hygR] melanized ascospores, compared to the FDS asci, containing 2 [hygS] melanized ascospores and 2 partially demelanized ascospores. Significantly, the SDS rate of 54% was comparable to the SDS rates calculated previously. What is more, dikaryotic ascospores in SDS asci germinated spontaneously on M2 medium showing that $GUN1^{SG}$ and ΔPa_6_1340 were allelic (genotype $GUN1^{SG}/\Delta Pa_6_1340$). This demonstrated that Pa_6_1340 was the gene mutated in the $GUN1^{SG}$ mutant responsible for the spontaneous germination phenotype. We therefore named Pa_6_1340 , $GUN1$. These data also showed that $GUN1^{SG}$ exhibited melanization and germination profiles radically opposed to the null $\Delta GUN1$ mutant. We also assayed whether the $GUN1^{SG}$ mutant could be complemented by ectopic integration of a wild-type copy of $GUN1$ by transforming $GUN1^{SG}$ with the $pGUN1$ plasmid carrying a geneticin resistance marker. 3 [genR] transformants were obtained, crossed with the $GUN1^{SG}$ strain and monokaryotic ascospores were sown onto M2 medium and onto G+YE germination medium. In 1 out of 3 [genR] transformants, we observed that $GUN1^{SG}$, $pGUN1$ progeny did not germinate spontaneously on M2 medium but germinated on G+YE germination medium showing that ectopic wild-type $GUN1$ complemented the $GUN1^{SG}$ mutant (Table 3). To further assess the effects of the addition of a wild-type copy of $GUN1$ into the genome, the wild-type S strain was also transformed with $pGUN1$. The 42 [genR] primary transformants obtained were crossed with the S strain and spontaneous ascospores germination in the progeny was observed in bulk. We never observed any spontaneous ascospore germination in the progeny when ascospores were projected on M2 medium,

suggesting that additional copy of *GUN1* in the genome did not induce spontaneous germination. In line with this, we found that (+, *pGUN1*) homokaryotic ascospores (obtained from $\Delta GUN1$ *pGUN1* X *S* cross) were germinating on G+YE medium only, like the wild-type strain.

***P. anserina* possess two CATs**

A BLASTP search on the *P. anserina* predicted CDS database identified a second CAT encoded by the *Pa_3_7660* putative CDS. Compared to *GUN1*, this enzyme did not harbour any localization signal. Similarly to other fungi, *P. anserina* may be endowed with two types of CAT, one located in peroxisomes and in mitochondria (*GUN1*) and one remaining in the cytoplasm (*Pa_3_7660*). We undertook a phylogenetical analysis of CATs in *Eumycetes* and searched the homologs of *GUN1* in the genome sequence of representative fungal species. In every species, 2 CATs were identified, except for *S. cerevisiae*, for which our BLAST parameters allowed us to identify only one CAT, despite the fact that 3 CATs have been identified in its genome (Swiegers et al., 2001). Nevertheless, the protein sequences of the two other *S. cerevisiae* CAT (*YAT1* & *YAT2*) were manually added to the sequence list to build the phylogenetic tree. The protein sequences were aligned, and the corresponding phylogenetic tree was built using the maximum likelihood method (phyML) (see Mat. & Met.) (Figure S5). The phylogeny of CATs in *Eumycetes* clearly indicated that there are 2 main types of CATs in fungi: the peroxisomal/mitochondrial CAT including *GUN1*, *A. nidulans* *AcuJ* and *M. oryzae* *Pth2/CrAT1* and cytoplasmic CATs such as *P. anserina* *Pa_3_7760*, *A. nidulans* *FacC* and *M. oryzae* *CrAT2*. Careful analysis of protein sequences indicated that proteins of the former type all contained the appropriate sequence signals. In parallel, orthologs search through OrthoDB (Kriventseva et al., 2019) did not identify orthologs for either *GUN1* or *GUP1* in plants nor in bacteria.

Pa_3_7760 putative CDS was renamed *GUP1* for *GUN1* *Paralog 1*. With the aim of determining the function of this other CAT and to assess its role in ascospore germination, we undertook a targeted gene disruption of *GUP1*. The *Pa_3_7660* CDS was replaced by a phleomycin resistance marker through homologous recombination in a $\Delta mus51::genR$ strain (see Mat. & Met. and Figure S3). The $\Delta GUP1$ strain was purified from the $\Delta mus51$ mutation by crossing primary transformants with the wild-type *S* strain followed by the selection of [pheloR, *genS*] homokaryotic ascospores of the $\Delta GUP1$ genotype in the progeny. $\Delta GUP1$ ascospores had no melanization defect and germinated on G+YE medium as the Wild-Type. Importantly, when $\Delta GUP1$ homokaryotic ascospores, were sown on M2 medium, no spontaneous germination was observed, leading us to conclude that *GUP1* deletion had no effect on ascospores melanization and germination in *P. anserina*. In addition, the $\Delta GUP1$ strain differentiated wild-type mycelium, and exhibited wild-type fertility, ascospore production, appressorium development and cellophane breaching (data not shown). In order to assess the

relationship between *GUN1* and *GUP1*, we constructed the $\Delta GUN1 \Delta GUP1$ double mutant strain. To this purpose, we crossed $\Delta GUN1$ with $\Delta GUP1$ on M2 supplemented with tricyclazole, we selected [hygR, phleoR] mycelia from spontaneously germinating ascospores on M2 medium supplemented with hygromycin and phleomycin. These mycelia were fragmented and homokaryotic [hygR, phleoR] $\Delta GUN1 \Delta GUP1$ mycelia of each mating type were isolated. Importantly, we observed that homokaryotic ascospores $\Delta GUN1 \Delta GUP1$ exhibited the same phenotypes as the $\Delta GUN1$ ascospores (*i.e* impaired melanization and no germination), showing that $\Delta GUN1$ was epistatic on $\Delta GUP1$.

GUN1 and GUP1 functions are conserved in fungi

Previous studies in fungi have shown that CATs play an important role in primary metabolism and carbon source utilisation. In particular, it has been shown that K.O strains of the cytoplasmic CAT are no longer able to grow on acetate while mutant strains of the peroxisomal/mitochondrial CAT are no longer able to grow on acetate and on media containing fatty acids such as oleic acid (Bhambra et al., 2006; Hynes et al., 2011; Liberti et al., 2013; Son et al., 2012; Swiegers et al., 2001). To assess the role of *GUN1* and *GUP1* in carbon source utilization, we have tested the growth of the different mutant strains on acetate and oleic acid. As shown in Figure 2, the wild-type *S* strain was able to grow on all the tested media, including the Tween 40 control, indicating that *P. anserina* was able to use this detergent as a carbon source. Remarkably, *GUN1*^{SG} as well as the *GUN1*^{SG} *pGUN1* complemented strain grew as the wild-type on every media demonstrating that the *GUN1*^{SG} mutation had no effect when *P. anserina* was grown on the different carbon sources. The $\Delta GUN1$, $\Delta GUP1$ and the double $\Delta GUN1 \Delta GUP1$ mutants grew as wild-type on dextrin (M2 medium), $\Delta GUN1$ and $\Delta GUN1 \Delta GUP1$ exhibited slightly reduced growth on Tween 40, almost no growth on oleic acid and no growth on acetate whereas $\Delta GUP1$ growth was impaired only on acetate. $\Delta GUP1 pGUP1$ had restored wild-type growth on acetate indicating that *GUP1* function was required in *P. anserina* on acetate and wild-type growth was restored on Tween 40 and oleic acid in both $\Delta GUN1 pGUN1$ and $\Delta GUN1 \Delta GUP1 pGUN1$ complemented strains indicating that *GUN1* function was required for Tween 40 and oleic acid utilization. These data also showed that $\Delta GUN1$ was epistatic on $\Delta GUP1$ when *P. anserina* was grown on Tween 40 and on oleic acid. Strikingly, both the $\Delta GUN1$ and the $\Delta GUN1 \Delta GUP1$ strains could grow on Tween 40 but not on oleic acid medium although this latter contained the same amount of Tween 40 (0,5%) (see Mat. & Met.). This suggested that impaired growth on oleic acid for $\Delta GUN1$ and $\Delta GUN1 \Delta GUP1$ strains was due to a toxic effect of oleic acid in these mutant strains devoid of *GUN1* CAT activity. Overall, these data showed that the roles of both main types of CATs in fungi were conserved: CATs of the *AcuJ/Pth2/CrAT1/GUN1* type are required for growth on acetate as well as on fatty acids whereas CATs of the *FacC/CrAT2/GUP1* type are required for growth on acetate only.

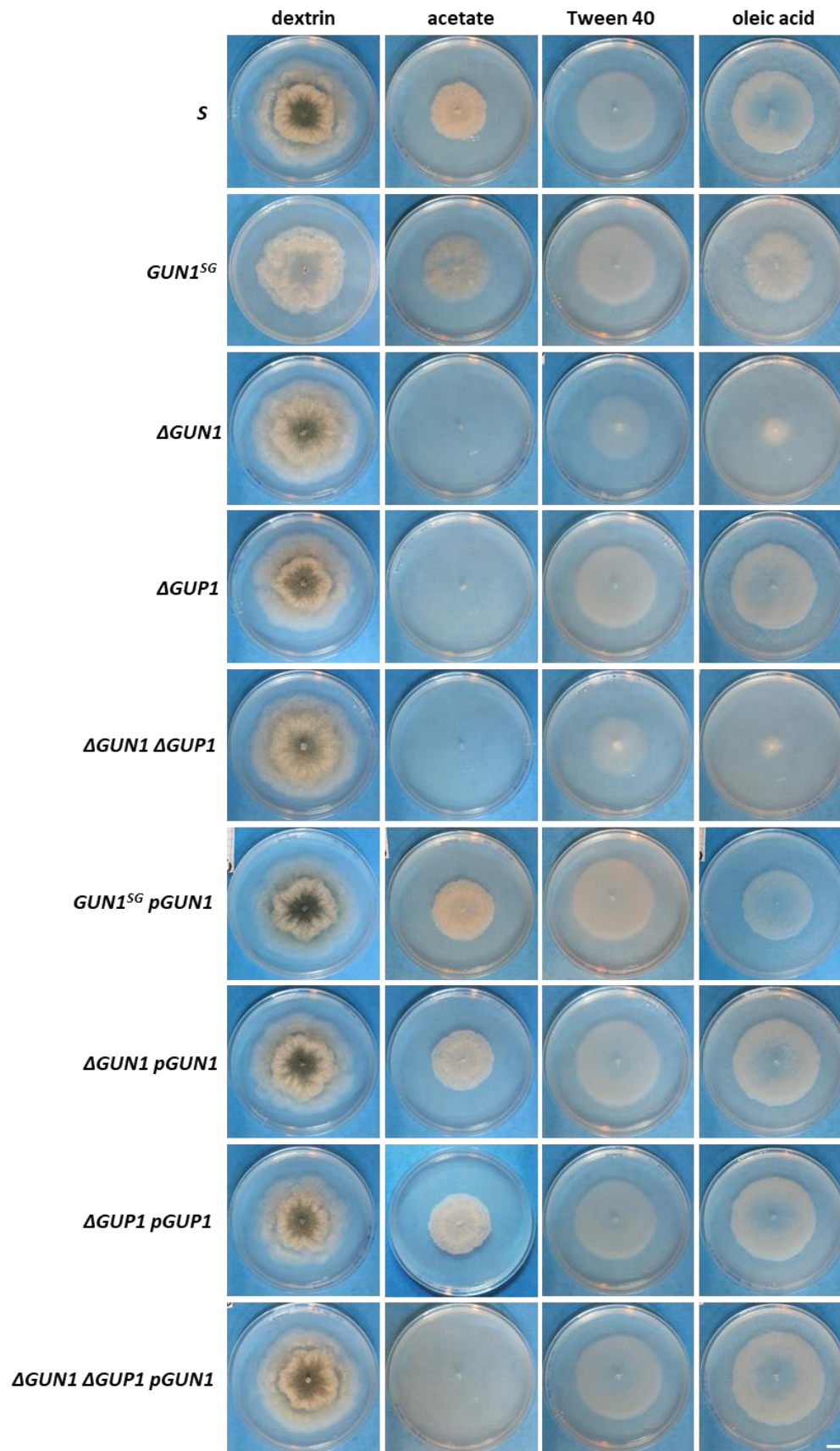


Fig. 2: Growth on different carbon sources. Pictures were taken after 4 days of culture. Every media have the same composition except for the carbon source. The Tween 40 control medium and the oleic acid medium contain 0,5% Tween 40. Scale bar 1 cm.

In silico analysis predicts loss of function of GUN1^{SG}

MAFFT alignment with the protein sequences encoded by the fungal orthologs of *GUN1*, including the ortholog from *Homo sapiens* revealed that the isoleucine 441 mutated in the *GUN1*^{SG} mutant (I441N) was highly conserved in *Eumyceta*: it is conserved in *Pezizomycotina*, *Saccharomycotina*, *Mucoromycotina* and in *Basidiomycota* (Figure S6). Using I-TASSER, we realized 3D structure prediction of GUN1, and we compared it to the 3D structure of the murine CAT (34% identity). As can be seen in Figure 3C, the overall structure of both enzymes was well conserved, showing that the 3D-modelling of GUN1 was congruent. Based on this GUN1 3D-model, we could localize the Isoleucine 441 near the extremity of an α -helix. Hydrophobicity of amino acids is paramount in the α -helix formation, and we wondered whether the substitution of aliphatic isoleucine 441 by polar asparagine could destabilize the α -helix and/or the whole protein. We determined the Gibbs free-energy Gap ($\Delta\Delta G$) provoked by the I441N substitution in GUN1^{SG} with STRUM (Funahashi et al., 2003). The calculated $\Delta\Delta G$ of 2.11 kcal.mol⁻¹ was indeed indicative of a destabilization of the GUN1^{SG} mutant protein. This low $\Delta\Delta G$ value (<6 kcal.mol⁻¹) was rather indicative of a local destabilization of the protein rather than a complete destabilization (Faure and Koonin, 2015). In line with this, we did not notice any obvious stability problem of both chimera reporters GUN1^{SG}-mCherry and GUN1^{SG}-mCherryAKI in our microscopic observations (see later). Nevertheless, we used the PROVEAN analysis tool to quantify the impact of the I441N substitution on GUN1 function. The calculated PROVEAN score of -6.63, far below the predefined cutoff (-2.5), was predictive of a "deleterious" effect of the I441N substitution on GUN1 function (Choi and Chan, 2015; Choi et al., 2012).

CAT activity

To determine whether the Carnitine-acetyltransferase (CAT) activity in the *GUN1*^{SG} mutant was affected, we measured CAT activity in protein extracts from mycelium grown on M2 medium as described by Kawamoto et al., (1978) (Figure 4) (see Mat. & Met.). Compared to the wild type, CAT activity in mycelium was greatly reduced in $\Delta GUN1$, $\Delta GUN1 \Delta GUP1$ as well as the in *GUN1*^{SG} mutants. Furthermore, CAT activity in *GUN1*^{SG} mycelium was similar to the single $\Delta GUN1$ and to the double $\Delta GUN1 \Delta GUP1$ mutants. This result was congruent with the recessivity of the *GUN1*^{SG} phenotype and the modeled deleterious effect of the I441N mutation in GUN1^{SG}, both observations pointing to a loss-of-function of *GUN1*^{SG} gene product, which was surprising given its phenotypes radically different from the null allele. Significantly, CAT activity was restored to the wild-type level in the $\Delta GUN1 pGUN1$ and $\Delta GUN1 \Delta GUP1 pGUN1$ complemented strains confirming that lack of *GUN1* in the mutant strains was responsible for reduced CAT activity.

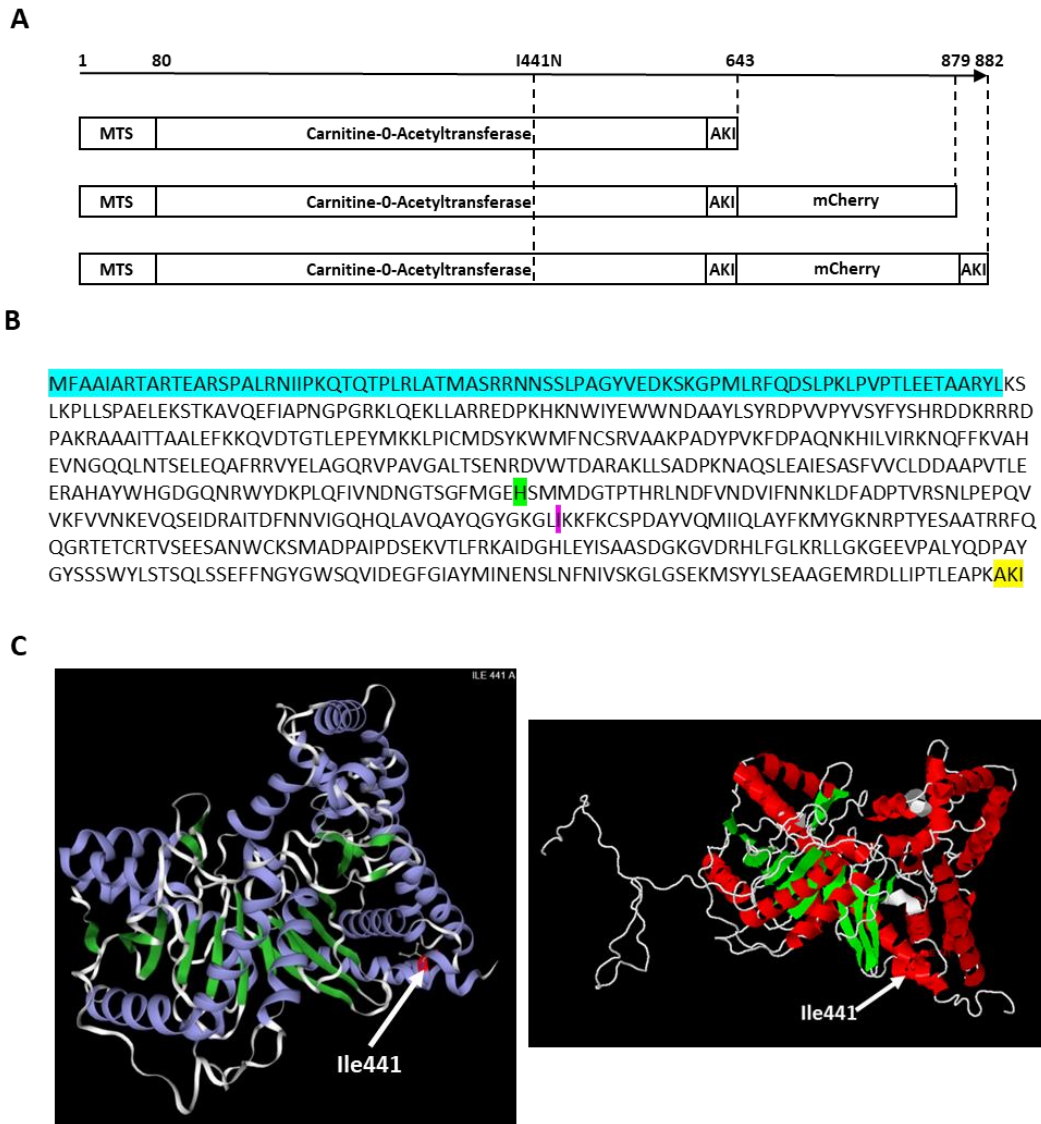


Fig. 3: GUN1 protein structure. A) Schematic representation of GUN1, GUN1-mCherry and GUN1-mCherry-AKI. MTS, Mitochondrial Targeting Signal. AKI is GUN1 PTS1 Peroxisome Targeting Sequence. The I441N mutation present in GUN1^{SG} is indicated. B) GUN1 amino acid sequence. The MTS is highlighted in blue, the histidine of the catalytic site in green, the I441 in magenta and the AKI PTS1 in yellow. C) 3D structure of murine CAT and 3D modelisation of GUN1 using I-TASSER modelling tool. The I441 is indicated by an arrow.

In the complemented *GUN1*^{SG} *pGUN1* strain, the CAT activity was even higher than in the wild type pointing to a role of CAT activity increase in the restoration of wild-type germination in *GUN1*^{SG} ascospores. Although we attempted to directly address the question of the CAT activity during ascospores germination, we were not able to measure CAT activity in ascospores. Interestingly, CAT activity in $\Delta GUP1$ was similar to wild-type CAT activity, a result in agreement with previous observations in *M. oryzae* showing that CAT activity in $\Delta Crat2$ (ortholog of *GUP1*) mutants was not altered (Ramos-Pamplona and Naqvi, 2006).

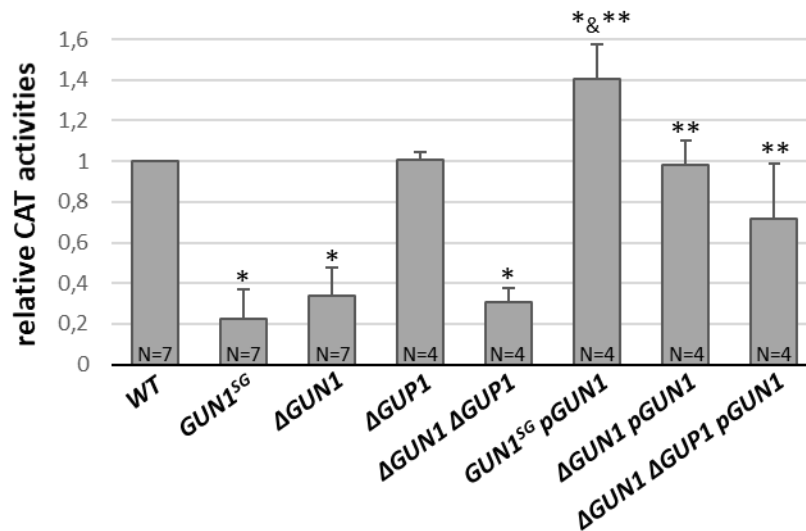


Fig. 4: Relative Carnitine-acetyltransferase (CAT) enzymatic activity in mycelial extracts. CAT activity was assayed through the spectrophotometric measure of CoA-SH produced per minute per milligram of protein in cell extracts in presence of carnitine as described by Kawamoto et al., (1978). Activities are reported as the activity ratio of the wild-type *S* strain. The CAT activity means and standard deviations have been calculated on 4 to 7 biological replicates (N is indicated for each genotype). Exact Two-Sample Fisher-Pitman Permutation Test has been realized to compare CAT activities. (*) CAT activities significantly different from the *WT* ($P < 0,05$); (**) CAT activities in complemented strains significantly different from the activity in the respective mutant strains ($P < 0,05$).

Mitochondrial localization of the GUN1 protein is important for ascospore germination

Previous studies carried out on CATs of the same type as GUN1 in other fungal species have revealed that these enzymes could be localized in peroxisomes and in mitochondria (Hynes et al., 2011; Zhou and Lorenz, 2008). In keeping with this, analysis of GUN1 protein sequence using wolfPSORT indicated that GUN1 probably located in both peroxisomes and mitochondria. Accordingly, scanning GUN1 protein sequence with MitoFates allowed us to identify a Mitochondrial Targeting Sequence (MTS) (Figure 3) and we manually identified the “AKI” tripeptide at the C-terminal end of the protein sequence as a type 1 Peroxisomal Targeting Sequence (PTS1) (Brocard and Hartig, 2006). In order to investigate GUN1 subcellular localization as well as the impact of the *GUN1^{SG}* mutation on this subcellular localization, we tagged both *GUN1* and *GUN1^{SG}* with the mCherry and with mCherry-AKI, a modified mCherry version bearing the PTS1 peroxisome targeting signal of GUN1 in C-terminus (Figure 3). As previously mentioned, *GUN1* is specifically induced in ascospores during germination (Demoor, unpublished data). To ensure expression of the fusion proteins similarly as *GUN1* during the whole *P. anserina* life cycle, we tagged the endogenous *GUN1* alleles (at the *GUN1* locus) through insertion of the mCherry and mCherry-AKI coding sequences in 3' of *GUN1* and *GUN1^{SG}* CDS by

homologous recombination (see Mat. & Met.). Hence, expression of the fusion proteins was under the control of the native *GUN1* regulatory sequence. Four tagged strains were obtained: *GUN1-mCherry*, *GUN1^{SG}-mCherry*, *GUN1-mCherry-AKI* and *GUN1^{SG}-mCherry-AKI*. Importantly, *GUN1-mCherry* and *GUN1-mCherry-AKI* tagged strains germinated like the wild-type while *GUN1^{SG}-mCherry* and *GUN1^{SG}-mCherry-AKI* tagged strains germinated spontaneously like the *GUN1^{SG}* mutant. Every strain were crossed with strains expressing GFP markers tagging either mitochondria (mito-GFP) or peroxisomes (GFP-SKL) to obtain double tagged strains in the progeny (Ruprich-Robert et al., 2002; Sellem et al., 2007). These double tagged strains allowed us to observe subcellular localization of GUN1 and GUN1^{SG} in mycelium but not in melanized ascospores (Figure 5). To this purpose, each strain was crossed with the *PaPks1¹³⁶* mutant producing partially demelanized ascospores in order to obtain all the double tagged strains bearing the *PaPks1¹³⁶* mutation in the progeny.

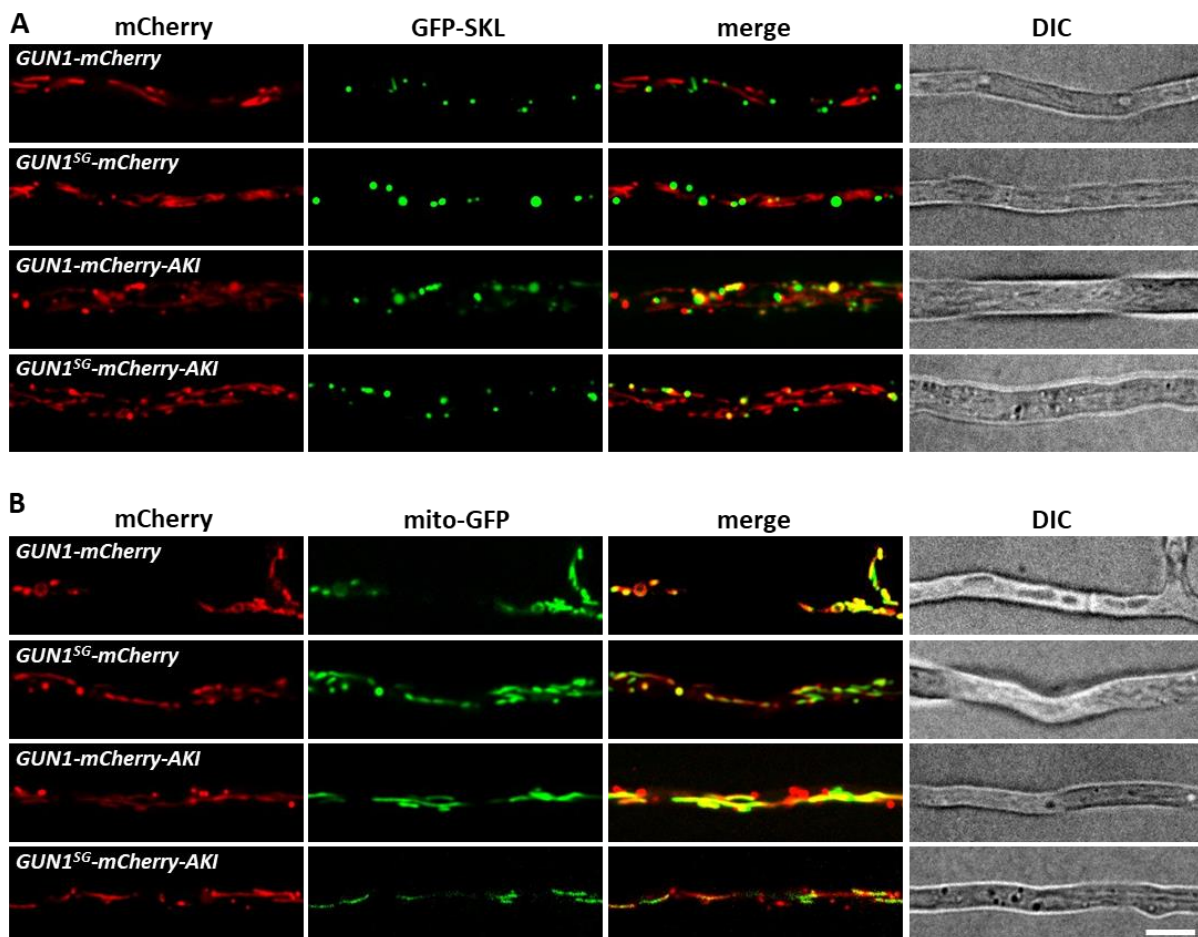


Fig. 5: Spinning disk imaging of GUN1 and GUN1^{SG} subcellular localization in mycelium. GUN1 and GUN1^{SG} have been tagged with the mCherry or the mCherry-AKI (bearing GUN1 PTS1 AKI triad) fused in C-terminus. A) Every strain analyzed carry the GFP-SKL marker tagging the peroxisomes. B) All the strains carry the mito-GFP reporter tagging mitochondria. Scale bar 5 μm.

These *PaPks1*¹³⁶ double tagged strains produced partially demelanized ascospores allowing fluorescence microscopic observations within ascospores (Figure 6 & S8). Importantly, the *PaPks1*¹³⁶ mutation did not modify the germination of ascospores. These strains were isolated in both mating types (*mat+* and *mat-*) in order to proceed to homozygous crosses for ascospore production and observation. Importantly, ascospores were observed either in liquid M2 medium or in G medium inducing germination (see Mat. & Met.). Strikingly, we observed that GUN1-mCherry and GUN1^{SG}-mCherry co-localized only with the mito-GFP reporter in ascospores as well as in mycelium. The diffuse nature of the mCherry pattern, indicated that GUN1 and GUN1^{SG} also localized in cytoplasm in both mycelium and in ascospores. This observation was consistent with previous studies on the localization of *Giberrella zae* CAT1-GFP (the ortholog of GUN1 in *G. zae*) showing that adding the GFP in C-terminus of the protein masked the PTS1 signal of CAT1 (Son et al., 2012). More generally, it has been shown that adding a tag after a C-terminal PTS1 signal abolishes import into peroxisomes, suggesting that GUN1-mCherry and GUN1^{SG}-mCherry were mislocalized (Ast et al., 2013; Hooks et al., 2012). Importantly, the mislocalization of GUN1-mCherry and of GUN1^{SG}-mCherry did not compromise either wild-type ascospore germination nor spontaneous ascospore germination in *GUN1*^{SG}-mCherry tagged strains. In sharp contrast, we observed in ascospores and in mycelium that GUN1-mCherry-AKI and GUN1^{SG}-mCherry-AKI could co-localize with both mito-GFP and GFP-SKL, showing that both reporter proteins could be found in mitochondria and in peroxisomes. However, GFP tagging pattern did not always co-localize with mCherry tagging pattern, showing that GUN1-mCherry-AKI and GUN1^{SG}-mCherry-AKI were absent of some mitochondria and some peroxisomes. This was especially striking in GUN1-mCherry-AKI mito-GFP ascospores where almost no GUN1-mCherry-AKI co-localized with mitochondria in liquid M2. Interestingly, this corresponded to the only condition where no germination was observed. This data suggested that the distribution of GUN1-mCherry-AKI between mitochondria and peroxisomes might change upon germination induction, GUN1-mCherry-AKI localizing more frequently in mitochondria in condition of ascospore germination induction. GUN1^{SG}-mCherry-AKI co-localization with mito-GFP was always important, in mycelium and in ascospores (in both M2 and G liquid medium). It is worth noting that GUN1^{SG}-mCherry-AKI tagged strains germinated spontaneously again, suggesting that important mitochondrial localization of GUN1 and GUN1^{SG} was correlated to germination.

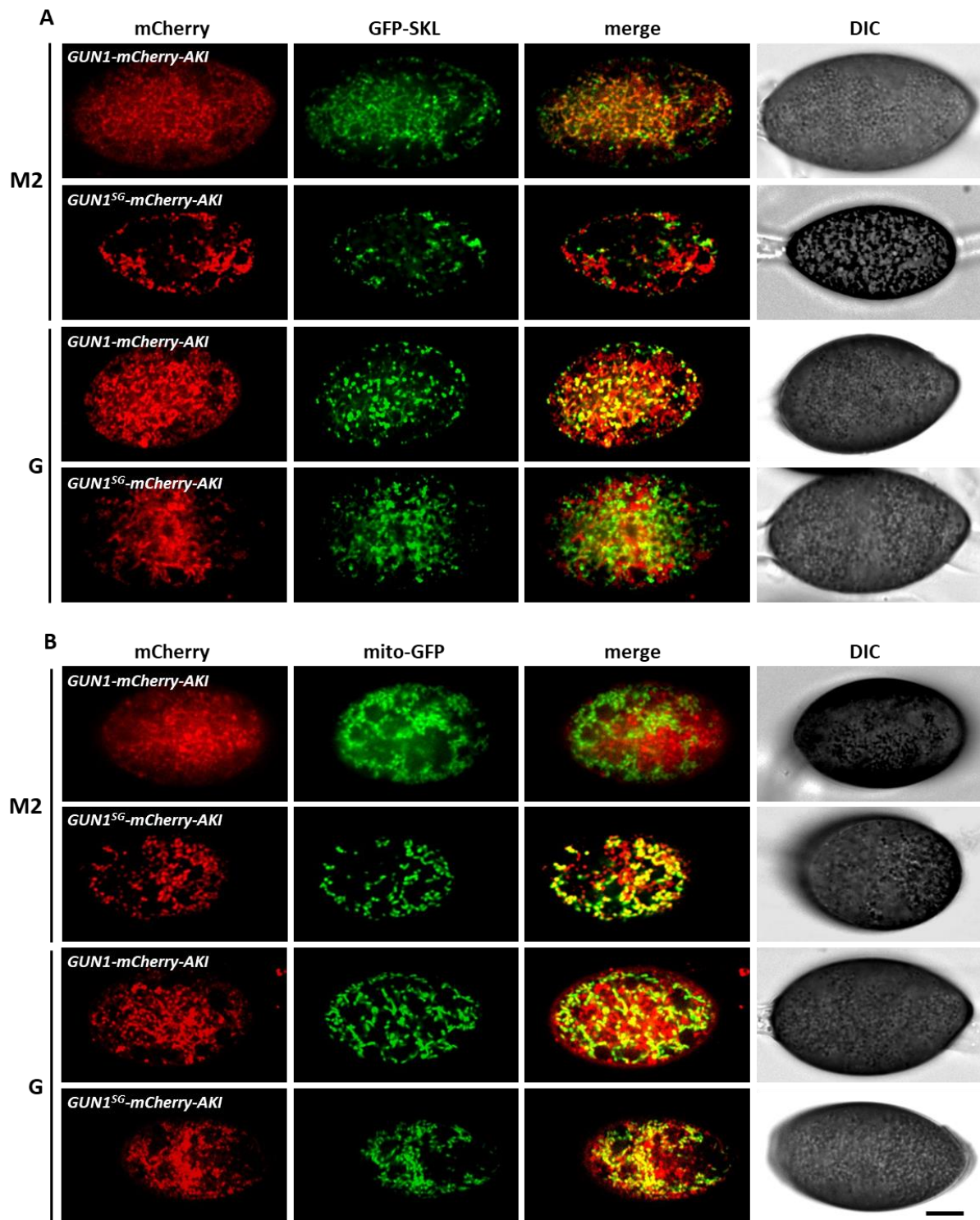


Fig 6: Spinning disk imaging of *GUN1*-mCherry-AKI and *GUN1^{SG}*-mCherry-AKI in ascospores. All the ascospores imaged carry the *PaPks1*¹³⁶ mutation partially impairing ascospores melanisation and making ascospores transparent for fluorescence imaging. A) Every strains carry the GFP-SKL reporter tagging peroxisomes. B) Every strains carry the mito-GFP reporter tagging mitochondria. M2 liquid medium: no induction of ascospores germination. G liquid medium: ascospores germination induction. Scale bar 5 μ m

GUN1 acts upstream of the MAPK PaMpk2 pathway

We have shown in previous studies that the MAPK *PaMpk2* pathway, *PaNox2*, its regulatory subunit *PaNoxR* and *PaPls1* are essential for ascospore germination in *P. anserina* (Lalucque et al., 2012; Lambou et al., 2008; Malagnac et al., 2004). We took advantage of the spontaneous germination phenotype of the *GUN1^{SG}* mutant (opposite to the mutants of the genes mentioned above: spontaneous germination vs. no germination) to conduct epistasis studies, in order to place *GUN1* in the regulatory cascade triggering ascospore germination. Epistasis studies were carried out by crossing *GUN1^{SG}* with the 3 separate strains, respectively $\Delta PaMpk2$, $\Delta PaPls1$ and $\Delta PaNox2$. 48 homokaryotic spores were sown on M2 medium for each cross, but none of the germinated spores presented the corresponding deletion (Table 4). This clearly showed that PaMpk2, PaPls1 and PaNox2 are required for germination in *GUN1^{SG}* ascospores and suggested that GUN1 acts upstream of PaMpk2 PaNox2 and PaPls1 in the cascade controlling ascospore germination. To confirm that GUN1 was upstream of the PaMpk2 MAPK pathway, we crossed the $\Delta GUN1$ strain with the *PaMkk2^c* mutant carrying a constitutively active allele of *PaMkk2*. It has been shown previously that the *PaMkk2^c* mutation induces phosphorylation of PaMpk2 and spontaneous ascospores germination (Lalucque et al., 2012) (Figure 7). In the progeny of this cross, 40 thalli from ascospores that germinated spontaneously were isolated and genotyped (see Mat. & Met.) (Table 5). Every thalli isolated carried the *PaMkk2^c* allele, which proved that spontaneous germination was due to *PaMkk2^c*: no germinated thallus possessed the [hygR] marker, while all possessed the [phleoR] one. In 26/40 thalli, the presence of thalli of the $\Delta GUN1$ *Mkk2^c* genotype, indicated that the *PaMkk2^c* mutation was epistatic to the $\Delta GUN1$ deletion. This confirmed that *GUN1* acts upstream of the MAPK *PaMpk2* pathway in ascospore germination regulation. In line with this, we found that PaMpk2 was phosphorylated in *GUN1^{SG}* ascospores at a comparable level as in *PaMkk2^c* ascospores and as in wild-type ascospores induced for germination (Figure 7). Altogether, these data clearly indicated that *GUN1^{SG}* triggered spontaneous ascospore germination through the activation of the PaMpk2 MAPK pathway.

***GUN1^{SG}* induces spontaneous ascospores germination independently of Pex7**

Peroxisomes are key organelles for germination. It has been shown that mutants of peroxisomal importomers such as $\Delta Pex5$, $\Delta Pex7$ and $\Delta Pex13$ produce partially demelanized ascospores impaired for germination (Peraza Reyes and Berteaux-Lecellier, 2013; Peraza-Reyes et al., 2011). We crossed *GUN1^{SG}* with the $\Delta Pex5$ $\Delta Pex7$ double mutant and with the $\Delta Pex13$ mutant and we analyzed germination in the $\Delta Pex5$ *GUN1^{SG}*, $\Delta Pex7$ *GUN1^{SG}* and $\Delta Pex13$ *GUN1^{SG}* double mutants (Table 6&7). Presence of the different deletions in the progeny was easily assessed by testing the antibiotic resistance markers they carry (see table 1, 6&7).

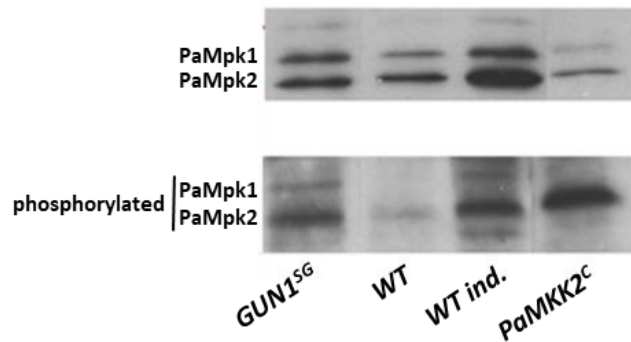


Fig. 7. Western blot analysis of PaMpk2 phosphorylation in ascospores. Proteins were extracted from genetically homogenous ascospores. Anti-p44 and anti-phospho-p44 antibodies recognizing both PaMpk1, PaMpk2 and p-PaMpk1 and p-PaMpk2 respectively were used. For ascospore germination (*WT ind.*) induction, ascospores were placed on G+YE medium for two hours before protein extraction (see mat&met). *PaMKK2^c* constitutive mutation induces PaMpk2 phosphorylation and spontaneous ascospore germination.

Meanwhile, *GUN1^{SG}* spontaneous ascospores germination phenotype was assessed by crossing every F1 germinated homokaryotic ascospores with the *WT* (the standard method to test the mating type of the ascospores in *P. anserina*) and by checking spontaneous germination in bulk in the F2 progeny. This test allowed us to ascertain presence of *GUN1^{SG}* mutation in the F1 progeny. As seen table 6 & 7, $\Delta Pex5$, $\Delta Pex13$, $\Delta Pex5 GUN1^{SG}$ and $\Delta Pex13 GUN1^{SG}$ ascospores did not germinate showing that $\Delta Pex5$ and $\Delta Pex13$ were epistatic over *GUN1^{SG}*. This data clearly indicated that the function of both genes was required for *GUN1^{SG}* induced spontaneous ascospores germination. Very interestingly, we found that 15 $\Delta Pex7 GUN1^{SG}$ ascospores germinated on G+YE germination medium and that they displayed spontaneous ascospores germination in F2 (see above) showing that *GUN1^{SG}* was epistatic over $\Delta Pex7$. This data indicated that the function of *Pex7* was not required for *GUN1^{SG}*-induced spontaneous ascospores germination.

Discussion

Despite its importance in the fungal life cycle, the regulation of ascospore germination in filamentous fungi has been poorly investigated so far. In this study, we aimed at uncovering new actors of this regulation pathway in *P. anserina*. To that end, we conducted a direct genetic screen, a particularly powerful approach to identify new genes. A majority of the mutants isolated, including every suppressor of $\Delta PaNox2$ and $\Delta PaPls1$, showed spontaneous but abnormal ascospore germination. However, for six mutants, germination proceeded as in the wild-type through the germination pore at the tip of the ascospore. We hypothesized that in these mutants, ascospores dormancy was broken

and that these were mutants specifically impaired in the control of ascospore germination. In this paper, we characterized the first of these six *Germination UNcontrolled-GUN* mutants, *GUN1^{SG}*. This mutant germinated on medium lacking carbon and nitrate sources indicating that in this mutant, control of dormancy escaped possible nutrient stimuli. By whole genome sequencing and genetic analyses, we showed that the gene mutated in *GUN1^{SG}* is the *Pa_6_1340* putative CDS. This gene encodes a peroxisomal/mitochondrial Carnitine-acetyltransferase (CAT), a key metabolic enzyme involved in acetyl-CoA shuttling between peroxisomes and mitochondria. (Elgersma et al., 1995; Strijbis and Distel, 2010). Gene expression of this CAT is significantly induced during ascospore germination, highlighting the pivotal role of this enzyme during this process. The mutation in *GUN1^{SG}* CDS is a substitution of the conserved isoleucine 441 by an asparagin. 3-D modelisation of GUN1 and of mutated *GUN1^{SG}* proteins combined to *in silico* analyses of the stability of *GUN1^{SG}* predict a moderate effect of the I441N substitution on the overall stability of the protein but a deleterious effect on its activity. This prediction correlates with the recessive nature of the *GUN1^{SG}* mutation as well as the reduced CAT activity measured in *GUN1^{SG}*, both pointing to a loss-of-function of the *GUN1^{SG}* allele. Hence, GUN1 may act as an ascospore germination inhibitor. However, we also show that deletion of GUN1 leads to complete lack of germination and defect in melanin synthesis. Impairment of both germination and melanization are frequently observed in mutants of peroxisomal import machinery as well as in mutants of peroxisomal/mitochondrial β -oxidation (Boisnard et al., 2009; Peraza Reyes and Berteaux-Lecellier, 2013; Ruprich-Robert et al., 2002). Indeed, ascospores in the $\Delta Echa$ mutant impaired for mitochondrial β -oxidation and in the $\Delta Fox2$ mutant, impaired for peroxisomal β -oxidation, show reduced rate of germination. Interestingly, $\Delta GUN1$ exhibits complete lack of germination, suggesting that GUN1 and acetyl-CoA shuttling between peroxisomes and mitochondria is central during activation of ascospores germination. As in many other fungi, a second CAT is present in *P. anserina* genome. Deletion of this second CAT, *GUP1* (*GUN1 Paralog 1*), does not show any ascospore germination defect nor melanization defect, demonstrating that this CAT has no role in both processes. Accordingly, while CAT activity in $\Delta GUN1$ and in *GUN1^{SG}* are reduced in mycelium, CAT activity in $\Delta GUP1$ resembles that of wild-type, suggesting that this CAT plays a minor role in *P. anserina*, a situation similar to *M. oryzae*. In this plant pathogen, while the *GUN1* ortholog *Pth2* mutants show reduced CAT activity and reduced pathogenicity, $\Delta Crat2$ K.O strain (the *GUP1* ortholog) exhibits wild-type CAT activity and pathogenicity (Ramos-Pamplona and Naqvi, 2006).

As previously found in fungi (*M. oryzae*, *A. nidulans*, *G. zeae* and *S. cerevisiae*), we show that in *P. anserina*, the peroxisomal/mitochondrial CAT GUN1 is required for growth on acetate and oleic acid while the cytosolic CAT GUP1 is required for growth on acetate only, showing strong conservation of the function of both enzymes in acetate/acetyl-CoA metabolism in fungi (Bhambra et al., 2006; Hynes

et al., 2011; Liberti et al., 2013; Son et al., 2012; Swiegers et al., 2001). Nonetheless, GUN1 is required for growth on fatty acids, but we also showed that oleic acid is toxic for $\Delta GUN1$ mutants, as previously demonstrated for *Pex2⁻* mutants impaired for peroxisomal import (Ruprich-Robert et al., 2002). Indeed, both $\Delta GUN1$ and $\Delta GUN1 \Delta GUP1$ strains grow better on Tween 40 control medium than on oleic acid medium containing similar amount of Tween 40 (Tween 40 is necessary to solubilize oleic acid). Nevertheless, while peroxisomal import mutants such as *Pex2⁻* are sterile in homozygous cross, $GUN1^{SG}$, $\Delta GUN1$, $\Delta GUP1$ and $\Delta GUN1 \Delta GUP1$ strains were all fertile. In conclusion, the function of neither of the CAT, GUN1 and GUP1, is essential for fertility in *P. anserina*.

With the aim to understand how the mutation in $GUN1^{SG}$ triggers breaking of dormancy, we explored both $GUN1^{SG}$ CAT activity and $GUN1^{SG}$ subcellular localization. $GUN1^{SG}$ shows a similar loss of CAT activity in mycelium to that of $\Delta GUN1$. However, $\Delta GUN1$ and $GUN1^{SG}$ mutant strains exhibit noticeable phenotype discrepancies: $\Delta GUN1$ produces non-germinating demelanized ascospores while $GUN1^{SG}$ produces spontaneously-germinating melanized ascospores and $GUN1^{SG}$ grows as the wild-type on both oleic acid and acetate but not $\Delta GUN1$. Although measure of CAT activity in mycelium allowed us to emphasize the loss-of-function of the $GUN1^{SG}$ allele, we were not able to measure CAT activity in ascospores and therefore properly address the question of CAT activity during germination. To explore how $GUN1^{SG}$ causes spontaneous germination, both the wild-type GUN1 protein and the mutant $GUN1^{SG}$ protein were tagged with mCherry and co-localization studies with peroxisomes and mitochondria GFP markers were performed. In this instance, we showed that GUN1 is located both in peroxisomes and in mitochondria, in mycelium as well as in ascospores. This dual localization is in agreement i) with the predicted localization of this CAT bearing both a MTS Mitochondrial Targeting Sequence (MTS) in N-terminus and the Peroxisomal Targeting Sequence (PTS1) AK1 in C-terminus and ii) with studies of GUN1 orthologs in other fungi such as *A. nidulans* and *G. zeae* (Hynes et al., 2011; Son et al., 2012). In contrast *M. oryzae* Pth2 was shown to only localize in peroxisomes (Bhambra et al., 2006). Attention must be drawn to the fact that there are no differences between GUN1 and $GUN1^{SG}$ subcellular localization observed in mycelium as well as in ascospores subjected to germination induction, both proteins being more or less equally distributed between mitochondria and peroxisomes. Nevertheless, GUN1 seems to be almost exclusively located in peroxisomes in dormant ascospores not subjected to germination trigger. These data suggest that the breaking of dormancy in $GUN1^{SG}$ ascospores might be provoked by precocious shuttling of $GUN1^{SG}$ from peroxisomes to mitochondria. Accordingly, with this role of mitochondria in ascospores germination, we showed that mislocalization of GUN1-mCherry (and $GUN1^{SG}$ -mCherry) solely in mitochondria does not impair germination. We wish to underline the fact that mislocalization of GUN1 (and $GUN1^{SG}$) chimera proteins did not alter ascospore germination but that neither strain did grow on oleic acid, in

the same way as $\Delta GUN1$ while they did grow on acetate similarly as $\Delta GUP1$. A comparable effect has been reported in *A. nidulans* where mislocalized AcuJ in cytoplasm avoids growth on oleic acid but not on acetate (Hynes et al., 2011). These data point to a central role of peroxisomal localization of GUN1 in oleic acid utilization independent of ascospores germination. However, it has been shown that peroxisomes are essential for germination in *P. anserina* and we confirm that $\Delta Pex5$ and $\Delta Pex13$ strains lacking PTS1-dependent peroxisomal import as well as $\Delta pex7$ strains lacking PTS2-dependent peroxisomal import cannot germinate (Peraza Reyes and Berteaux-Lecellier, 2013; Peraza-Reyes et al., 2011). How ascospores carrying mislocalized GUN1 germinate is an open question. Given that GUN1 bears a PTS1-AKI in C-terminus (and no internal PTS2) and that $\Delta Pex5$ is epistatic over $GUN1^{SG}$, it is highly likely that GUN1 (and $GUN1^{SG}$) peroxisomal import is dependent on the PTS1 and not on the PTS2 import pathway. Very interestingly, we show that $GUN1^{SG}$ can induce ascospores spontaneous germination independently of Pex7 and the PTS2-dependent peroxisomal import. This data suggests that ascospores spontaneous germination in $GUN1^{SG}$ occurs in cells carrying partially functional peroxisomes.

Through the characterization of the *GUN* mutants, we aimed at uncovering new genes that control dormancy and ascospore germination. Genetic approaches in *P. anserina* and in particular the accessibility of epistasis studies makes this model fungus a powerful system to decipher regulation pathways such as the one controlling ascospore germination. In this paper, we investigated the relationships between GUN1 and already known actors of ascospore germination: the *PaMpk2* MAPK pathway and the NADPH oxidase Nox2 complex (Lalucque et al., 2012; Lambou et al., 2008; Malagnac et al., 2004). We show that $GUN1^{SG}$ requires *PaMpk2*, *PaNox2* and *PaPls1* functions to induce spontaneous germination of ascospores. Conversely, the MAPKK constitutive *PaMkk2^c* allele inducing *PaMpk2* phosphorylation and spontaneous ascospore germination does not require GUN1 function. Furthermore, we showed that $GUN1^{SG}$ controls the *PaMpk2* pathway by activating *PaMpk2* phosphorylation. Altogether, these data demonstrate that GUN1 acts upstream of the *PaMpk2* pathway and the Nox2/Pls1 complex in the regulatory cascade controlling ascospore germination (Figure 8).

Melanin is a major component of appressorium cell wall in *M. oryzae* where it is involved in turgor pressure maintenance (Gómez and Nosanchuk, 2003). Many *M. oryzae* mutants such as *Pth2* showing impairment of melanin synthesis cannot build up the turgor pressure necessary for penetration of the host by the penetration peg and are therefore non-pathogenic. As observed in the *PaPks1¹⁹³* mutant devoid of melanin biosynthesis, melanin in ascospores is important to avoid uncontrolled “accidental” germination (Coppin and Silar, 2007).

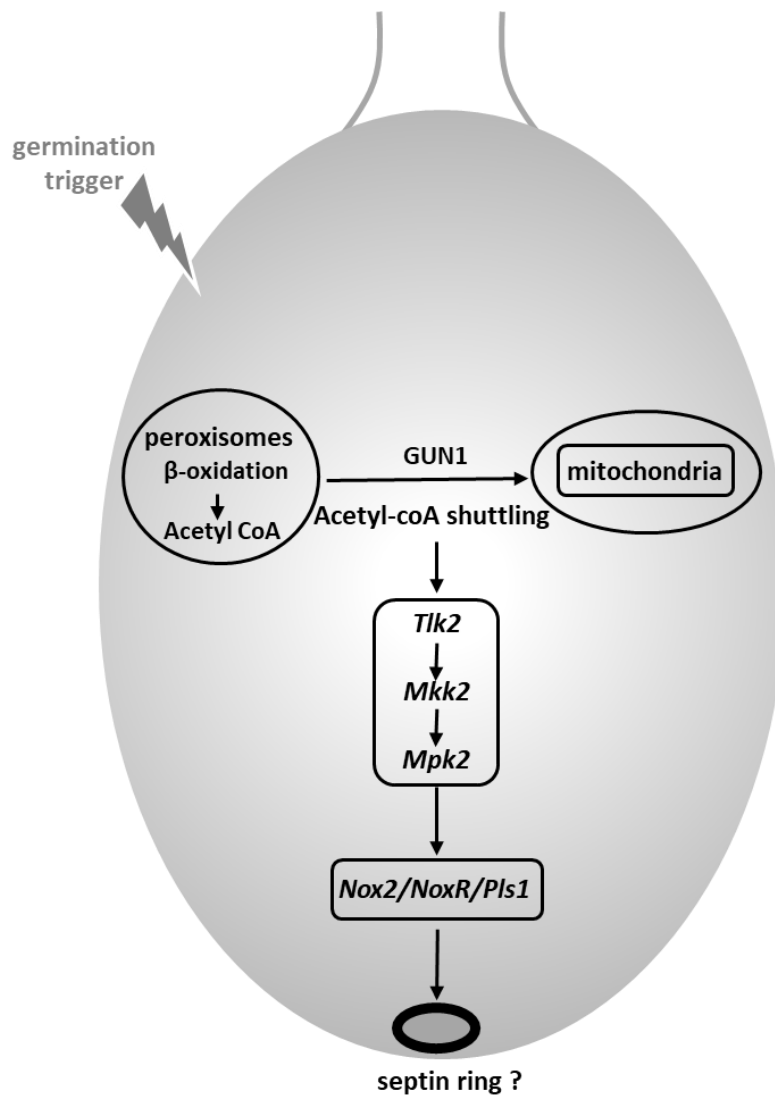


Fig.8. Regulation of ascospore germination. Breaking of dormancy is triggered by ammonium acetate, which initiates metabolic activities, including peroxisomal β -oxidation. The Acetyl-CoA produced is directed to other subcellular compartments such as mitochondria. The GUN1 CAT is one of the major actors involved in the shuttling of Acetyl-CoA in the cell. $GUN1^{SG}$ mutation leads to the activation of the *PaMpk2* pathway which in turn activates the PaNox2 NADPH oxidase complex. Whether activation of the PaNox2 complex set up a septin ring and actin cytoskeleton rearrangement at the germination pore in a similar manner as in *M. oryzae* appressorium remains to be addressed.

The melanization defect exhibited by the $\Delta GUN1$ ascospores (and possibly other mutants of peroxisomal/mitochondrial β -oxidation) is likely due to lack of acetate supply to the dihydroxynaphthalene pathway involved in melanin biosynthesis (Coppin and Silar, 2007; FUJII et al., 1999). Tricyclazole exposure, a fungicide inhibiting melanin biosynthesis (Coppin and Silar, 2007), of $\Delta GUN1$ during ascosporeogenesis leads to the production of spontaneously germinating ascospores, indicating that in absence of tricyclazole, melanin biosynthesis in $\Delta GUN1$ is sufficient to avoid

spontaneous “accidental” germination of ascospores. The melanized appressorium of *M. oryzae* and the melanized ascospores exhibit several similarities. First of all, a pore has to be created in both structures for penetration peg emission in the case of *M. oryzae* appressorium and for the germination bubble to form in the case of *P. anserina* ascospores. In depth studies in *M. oryzae* have deciphered the intricate genetic signaling culminating in the setting up of a septin ring at the base of the appressorium (Dagdaz et al., 2012; Ryder et al., 2019). This septin ring seems central in cytoskeleton reorganization and appressorial pore solidity at onset of penetration peg emission. Among other regulatory components the Fus3/Pmk1 pathway and the NoxB/Pls1 complex play a key role in septin ring assembly (Dagdaz et al., 2012; Ryder et al., 2019). The fact that both pathways are also essential for ascospore germination in *P. anserina* but also in *S. macrospora* lead us to hypothesize that a similar process involving septin ring assembly and cytoskeleton remodeling may take place for ascospore germination. Given the apparent convergent evolution governing appressorium functioning and melanized ascospores germination (Brun and Silar, 2010), we speculate that studying and discovering new genes controlling ascospores germination in *P. anserina* may lead to the discovery of new pathogenesis factors controlling appressorium development in pathogenic fungi. Obviously, the first of the *GUN* genes characterized, *GUN1*, is the ortholog of Pth2, a pathogenesis factor of *M. oryzae*. We are therefore confident that the characterization of the other *GUN* mutants and in the future, the isolation of new *GUN* mutants will definitely be fruitful to understand ascospore germination but also to discover new pathogenic factors, killing two birds with the same stone.

Acknowledgments

We want to thank the ImagoSeine facility, member of the France BioImaging infrastructure supported by the French National Research Agency (ANR-10-INSB-04, « Investments for the future »). We also thank Sylvie Cangemi for her precious help in preparing the various media used in this study, Christophe Lalanne for statistical analysis, and Elizabeth Guinot Bordini for English proofreading.

Authors contribution

Funding

This work was funded by Université de Paris intramural funding.

Conflict of interest:

The authors declare that there are no conflicts of interest neither commercial affiliations.

Bibliography

Asakura, M., Okuno, T., and Takano, Y. (2006). Multiple Contributions of Peroxisomal Metabolic Function to Fungal Pathogenicity in *Colletotrichum lagenarium*. *Appl. Environ. Microbiol.* *72*, 6345–6354.

Ast, J., Stiebler, A.C., Freitag, J., and Bölker, M. (2013). Dual targeting of peroxisomal proteins. *Front. Physiol.* *4*.

Baltussen, T.J.H., Zoll, J., Verweij, P.E., and Melchers, W.J.G. (2020). Molecular Mechanisms of Conidial Germination in *Aspergillus* spp. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *84*.

Berteaux-Lecellier, V., Picard, M., Thompson-Coffe, C., Zickler, D., Panvier-Adoutte, A., and Simonet, J.M. (1995). A nonmammalian homolog of the PAF1 gene (Zellweger syndrome) discovered as a gene involved in caryogamy in the fungus *Podospora anserina*. *Cell* *81*, 1043–1051.

Bhambra, G.K., Wang, Z.-Y., Soanes, D.M., Wakley, G.E., and Talbot, N.J. (2006). Peroxisomal carnitine acetyl transferase is required for elaboration of penetration hyphae during plant infection by *Magnaporthe grisea*: Carnitine metabolism in *Magnaporthe*. *Mol. Microbiol.* *61*, 46–60.

Boisnard, S., Espagne, E., Zickler, D., Bourdais, A., Riquet, A.-L., and Berteaux-Lecellier, V. (2009). Peroxisomal ABC transporters and β -oxidation during the life cycle of the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal Genet. Biol.* *46*, 55–66.

Bonnet, C., Espagne, E., Zickler, D., Boisnard, S., Bourdais, A., and Berteaux-Lecellier, V. (2006). The peroxisomal import proteins PEX2, PEX5 and PEX7 are differently involved in *Podospora anserina* sexual cycle. *Mol. Microbiol.* *62*, 157–169.

Brocard, C., and Hartig, A. (2006). Peroxisome targeting signal 1: Is it really a simple tripeptide? *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1763*, 1565–1573.

Brun, S., and Silar, P. (2010). Convergent Evolution of Morphogenetic Processes in Fungi. In *Evolutionary Biology – Concepts, Molecular and Morphological Evolution*, P. Pontarotti, ed. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 317–328.

Brun, S., Malagnac, F., Bidard, F., Lalucque, H., and Silar, P. (2009). Functions and regulation of the Nox family in the filamentous fungus *Podospora anserina*: a new role in cellulose degradation. *Mol. Microbiol.* *74*, 480–496.

Cano-Domínguez, N., Álvarez-Delfín, K., Hansberg, W., and Aguirre, J. (2008). NADPH Oxidases NOX-1 and NOX-2 Require the Regulatory Subunit NOR-1 To Control Cell Differentiation and Growth in *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell* *7*, 1352–1361.

Chen, X.-L., Wang, Z., and Liu, C. (2016). Roles of Peroxisomes in the Rice Blast Fungus.

- Choi, Y., and Chan, A.P. (2015). PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *31*, 2745–2747.
- Choi, Y., Sims, G., Murphy, S., Miller, J., and Chan, A. (2012). Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. *PLoS One* *7*, e46688.
- Coppin, E., and Silar, P. (2007). Identification of PaPKS1, a polyketide synthase involved in melanin formation and its use as a genetic tool in *Podospora anserina*. *Mycol. Res.* *111*, 901–908.
- Dagdas, Y.F., Yoshino, K., Dagdas, G., Ryder, L.S., Bielska, E., Steinberg, G., and Talbot, N.J. (2012). Septin-mediated plant cell invasion by the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Science* *336*, 1590–1595.
- Daverdin, G., Rouxel, T., Gout, L., Aubertot, J.-N., Fudal, I., Meyer, M., Parlange, F., Carpezat, J., and Balesdent, M.-H. (2012). Genome Structure and Reproductive Behaviour Influence the Evolutionary Potential of a Fungal Phytopathogen. *PLoS Pathog.* *8*.
- Dirschnabel, D.E., Nowrousian, M., Cano-Domínguez, N., Aguirre, J., Teichert, I., and Kück, U. (2014). New Insights Into the Roles of NADPH Oxidases in Sexual Development and Ascospore Germination in *Sordaria macrospora*. *Genetics* *196*, 729–744.
- Elgersma, Y., van Roermund, C.W., Wanders, R.J., and Tabak, H.F. (1995). Peroxisomal and mitochondrial carnitine acetyltransferases of *Saccharomyces cerevisiae* are encoded by a single gene. *EMBO J.* *14*, 3472–3479.
- El-Khoury, R., Sellem, C.H., Coppin, E., Boivin, A., Maas, M.F.P.M., Debuchy, R., and Sainsard-Chanet, A. (2008). Gene deletion and allelic replacement in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Curr. Genet.* *53*, 249–258.
- Faure, G., and Koonin, E.V. (2015). Universal distribution of mutational effects on protein stability, uncoupling of protein robustness from sequence evolution and distinct evolutionary modes of prokaryotic and eukaryotic proteins. *Phys. Biol.* *12*, 035001.
- FUJII, I., MORI, Y., WATANABE, A., KUBO, Y., TSUJI, G., and EBIZUKA, Y. (1999). Heterologous Expression and Product Identification of *Colletotrichum lagenarium* Polyketide Synthase Encoded by the PKS1 Gene Involved in Melanin Biosynthesis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *63*, 1445–1452.
- Fukasawa, Y., Tsuji, J., Fu, S.-C., Tomii, K., Horton, P., and Imai, K. (2015). MitoFates: improved prediction of mitochondrial targeting sequences and their cleavage sites. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *14*, 1113–1126.
- Funahashi, J., Sugita, Y., Kitao, A., and Yutani, K. (2003). How can free energy component analysis explain the difference in protein stability caused by amino acid substitutions? Effect of three hydrophobic mutations at the 56th residue on the stability of human lysozyme. *Protein Eng. Des. Sel.* *16*, 665–671.
- Gómez, B.L., and Nosanchuk, J.D. (2003). Melanin and fungi. *Curr. Opin. Infect. Dis.* *16*, 91–96.
- Grigoriev, I.V., Nikitin, R., Haridas, S., Kuo, A., Ohm, R., Otilar, R., Riley, R., Salamov, A., Zhao, X., Korzeniewski, F., et al. (2014). MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Res.* *42*, D699-704.

Grognet, P., Bidard, F., Kuchly, C., Tong, L.C.H., 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 *Podospira anserina*. *Genetics* 197, 421–432.

Guindon, S., and Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696–704.

Hoekstra, R.F. (2005). Why sex is good. *Nature* 434, 571–573.

Hooks, K.B., Turner, J.E., Graham, I.A., Runions, J., and Hooks, M.A. (2012). GFP-tagging of Arabidopsis acyl-activating enzymes raises the issue of peroxisome-chloroplast import competition versus dual localization. *J. Plant Physiol.* 169, 1631–1638.

Horton, P., Park, K.-J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C.J., and Nakai, K. (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res.* 35, W585–W587.

Howlett, B.J., Idnurm, A., and Pedras, M.S.C. (2001). *Leptosphaeria maculans*, the Causal Agent of Blackleg Disease of Brassicas. *Fungal Genet. Biol.* 33, 1–14.

Hynes, M.J., Murray, S.L., Andrianopoulos, A., and Davis, M.A. (2011). Role of Carnitine Acetyltransferases in Acetyl Coenzyme A Metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* 10, 547–555.

Imazaki, A., Tanaka, A., Harimoto, Y., Yamamoto, M., Akimitsu, K., Park, P., and Tsuge, T. (2010). Contribution of Peroxisomes to Secondary Metabolism and Pathogenicity in the Fungal Plant Pathogen *Alternaria alternata*. *Eukaryot. Cell* 9, 682–694.

Katoh, K., Kuma, K., Toh, H., and Miyata, T. (2005). MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res.* 33, 511–518.

Kawamoto, S., Ueda, M., Nozaki, C., Yamamura, M., Tanaka, A., and Fukui, S. (1978). Localization of carnitine acetyltransferase in peroxisomes and in mitochondria of n-alkane-grown *Candida tropicalis*. *FEBS Lett.* 96, 37–40.

Kretschmer, M., Wang, J., and Kronstad, J.W. (2012). Peroxisomal and Mitochondrial β -Oxidation Pathways Influence the Virulence of the Pathogenic Fungus *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* 11, 1042–1054.

Kriventseva, E.V., Kuznetsov, D., Tegenfeldt, F., Manni, M., Dias, R., Simão, F.A., and Zdobnov, E.M. (2019). OrthoDB v10: sampling the diversity of animal, plant, fungal, protist, bacterial and viral genomes for evolutionary and functional annotations of orthologs. *Nucleic Acids Res.* 47, D807–D811.

Lalucque, H., Malagnac, F., Brun, S., Kicka, S., and Silar, P. (2012). A non-Mendelian MAPK-generated hereditary unit controlled by a second MAPK pathway in *Podospira anserina*. *Genetics* 191, 419–433.

Lambou, K., Malagnac, F., Barbisan, C., Tharreau, D., Lebrun, M.-H., and Silar, P. (2008). The crucial role of the Pls1 tetraspanin during ascospore germination in *Podospira anserina* provides an example of the convergent evolution of morphogenetic processes in fungal plant pathogens and saprobes. *Eukaryot. Cell* 7, 1809–1818.

Langfelder, K., Streibel, M., Jahn, B., Haase, G., and Brakhage, A.A. (2003). Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet. Biol.* 38, 143–158.

Lecellier, G., and Silar, P. (1994). Rapid methods for nucleic acids extraction from Petri dish-grown mycelia. *Curr. Genet.* **25**, 122–123.

Letunic, I., and Bork, P. (2007). Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **23**, 127–128.

Li, D., Bobrowicz, P., Wilkinson, H.H., and Ebbole, D.J. (2005). A Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Essential for Mating and Contributing to Vegetative Growth in *Neurospora crassa*. *Genetics* **170**, 1091–1104.

Liberti, D., Rollins, J.A., and Dobinson, K.F. (2013). Peroxisomal Carnitine Acetyl Transferase Influences Host Colonization Capacity in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mol. Plant-Microbe Interactions®* **26**, 768–780.

Malagnac, F., Lalucque, H., Lepère, G., and Silar, P. (2004). Two NADPH oxidase isoforms are required for sexual reproduction and ascospore germination in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal Genet. Biol.* **41**, 982–997.

Malagnac, F., Bidard, F., Lalucque, H., Brun, S., Lambou, K., Lebrun, M.-H., and Silar, P. (2008). Convergent evolution of morphogenetic processes in fungi. *Commun. Integr. Biol.* **1**, 180–181.

Marchler-Bauer, A., and Bryant, S.H. (2004). CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res.* **32**, W327-331.

Masterson, C., and Wood, C. (2000). Pea chloroplast carnitine acetyltransferase. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **267**, 1–6.

Nolting, N., and Pöggeler, S. (2006). A STE12 homologue of the homothallic ascomycete *Sordaria macrospora* interacts with the MADS box protein MCM1 and is required for ascospore germination. *Mol. Microbiol.* **62**, 853–868.

Oshero, N., and May, G.S. (2001). The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiol. Lett.* **199**, 153–160.

Pandey, A., Roca, M.G., Read, N.D., and Glass, N.L. (2004). Role of a Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway during Conidial Germination and Hyphal Fusion in *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell* **3**, 348–358.

Peraza Reyes, L., and Berteaux-Lecellier, V. (2013). Peroxisomes and sexual development in fungi. *Front. Physiol.* **4**.

Peraza-Reyes, L., Zickler, D., and Berteaux-Lecellier, V. (2008). The Peroxisome RING-Finger Complex is Required for Meicyte Formation in the Fungus *Podospora anserina*. *Traffic* **9**, 1998–2009.

Peraza-Reyes, L., Arnaise, S., Zickler, D., Coppin, E., Debuchy, R., and Berteaux-Lecellier, V. (2011). The importomer peroxins are differentially required for peroxisome assembly and meiotic development in *Podospora anserina*: insights into a new peroxisome import pathway. *Mol. Microbiol.* **82**, 365–377.

Quan, L., Lv, Q., and Zhang, Y. (2016). STRUM: structure-based prediction of protein stability changes upon single-point mutation. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **32**, 2936–2946.

Quevillon, E., Silventoinen, V., Pillai, S., Harte, N., Mulder, N., Apweiler, R., and Lopez, R. (2005). InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Res.* **33**, W116–W120.

- Ramos-Pamplona, M., and Naqvi, N.I. (2006). Host invasion during rice-blast disease requires carnitine-dependent transport of peroxisomal acetyl-CoA: Carnitine metabolism and rice-blast. *Mol. Microbiol.* *61*, 61–75.
- Rizet, G. (1952). Les phénomènes de barrage chez *Podospira anserina*. I. Analyse génétique des barrages entre souches S et s. *Rev Cytol Biol Veg* *13* 51–92.
- Rizet, G., and Engelmann, C. (1949). Contribution à l'étude génétique d'un Ascomycète tétrasporé: *Podospira anserina*. (Ces.) Rehm. *Rev Cytol Biol Veg* *11*: 201–304.
- van Roermund, C.W.T., Hetteema, E.H., van den Berg, M., Tabak, H.F., and Wanders, R.J.A. (1999). Molecular characterization of carnitine-dependent transport of acetyl-CoA from peroxisomes to mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of a plasma membrane carnitine transporter, Agp2p. *EMBO J.* *18*, 5843–5852.
- Roy, A., Kucukural, A., and Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* *5*, 725–738.
- Ruprich-Robert, G., Berteaux-Lecellier, V., Zickler, D., Panvier-Adoutte, A., and Picard, M. (2002). Identification of six loci in which mutations partially restore peroxisome biogenesis and/or alleviate the metabolic defect of *pex2* mutants in *podospira*. *Genetics* *161*, 1089–1099.
- Ryder, L.S., Dagdas, Y.F., Kershaw, M.J., Venkataraman, C., Madzvamuse, A., Yan, X., Cruz-Mireles, N., Soanes, D.M., Osés-Ruiz, M., Styles, V., et al. (2019). A sensor kinase controls turgor-driven plant infection by the rice blast fungus. *Nature* *574*, 423–427.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* *9*, 676–682.
- Secombe, D.W., and Hahn, P. (1980). Carnitine Acetyltransferase in Developing Mammals. *Neonatology* *38*, 90–95.
- Sellem, C.H., Marsy, S., Boivin, A., Lemaire, C., and Sainsard-Chanet, A. (2007). A mutation in the gene encoding cytochrome c1 leads to a decreased ROS content and to a long-lived phenotype in the filamentous fungus *Podospira anserina*. *Fungal Genet. Biol.* *44*, 648–658.
- Sigrist, C.J.A., Cerutti, L., de Castro, E., Langendijk-Genevaux, P.S., Bulliard, V., Bairoch, A., and Hulo, N. (2010). PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation. *Nucleic Acids Res.* *38*, D161–D166.
- Silar, P. (1995). Two new easy to use vectors for transformations.
- Silar, P. (2013). *Podospira anserina*: From Laboratory to Biotechnology. In *Genomics of Soil- and Plant-Associated Fungi*, B.A. Horwitz, P.K. Mukherjee, M. Mukherjee, and C.P. Kubicek, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 283–309.
- Silar, P. (2020). *Podospira anserina*.
- Son, H., Min, K., Lee, J., Choi, G.J., Kim, J.-C., and Lee, Y.-W. (2012). Mitochondrial Carnitine-Dependent Acetyl Coenzyme A Transport Is Required for Normal Sexual and Asexual Development of the Ascomycete *Gibberella zeae*. *Eukaryot. Cell* *11*, 1143–1153.

Strijbis, K., and Distel, B. (2010). Intracellular acetyl unit transport in fungal carbon metabolism. *Eukaryot. Cell* *9*, 1809–1815.

Strijbis, K., Vaz, F.M., and Distel, B. (2010). Enzymology of the carnitine biosynthesis pathway. *IUBMB Life* *62*, 357–362.

Sweigard, J.A., Carroll, A.M., Farrall, L., Chumley, F.G., and Valent, B. (1998). Magnaporthe grisea Pathogenicity Genes Obtained Through Insertional Mutagenesis. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *11*, 404–412.

Swiegers, J.H., Dippenaar, N., Pretorius, I.S., and Bauer, F.F. (2001). Carnitine-dependent metabolic activities in *Saccharomyces cerevisiae*: three carnitine acetyltransferases are essential in a carnitine-dependent strain. *Yeast* *18*, 585–595.

Trapero-Casas, A., and Kaiser, W.J. (2007). Differences Between Ascospores and Conidia of *Didymella rabiei* in Spore Germination and Infection of Chickpea. *Phytopathology*® *97*, 1600–1607.

Wang, Z.-Y., Soanes, D.M., Kershaw, M.J., and Talbot, N.J. (2007). Functional Analysis of Lipid Metabolism in *Magnaporthe grisea* Reveals a Requirement for Peroxisomal Fatty Acid β -Oxidation During Appressorium-Mediated Plant Infection. *Mol. Plant-Microbe Interactions*® *20*, 475–491.

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., et al. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* *46*, W296–W303.

Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., and Barton, G.J. (2009). Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *25*, 1189–1191.

Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., and Johnson, G.L. (1999). Mitogen-Activated Protein Kinase: Conservation of a Three-Kinase Module From Yeast to Human. *Physiol. Rev.* *79*, 143–180.

Xu, J.-R., Staiger, C.J., and Hamer, J.E. (1998). Inactivation of the mitogen-activated protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 12713–12718.

Zhou, H., and Lorenz, M.C. (2008). Carnitine acetyltransferases are required for growth on non-fermentable carbon sources but not for pathogenesis in *Candida albicans*. *Microbiol. Read. Engl.* *154*, 500–509.

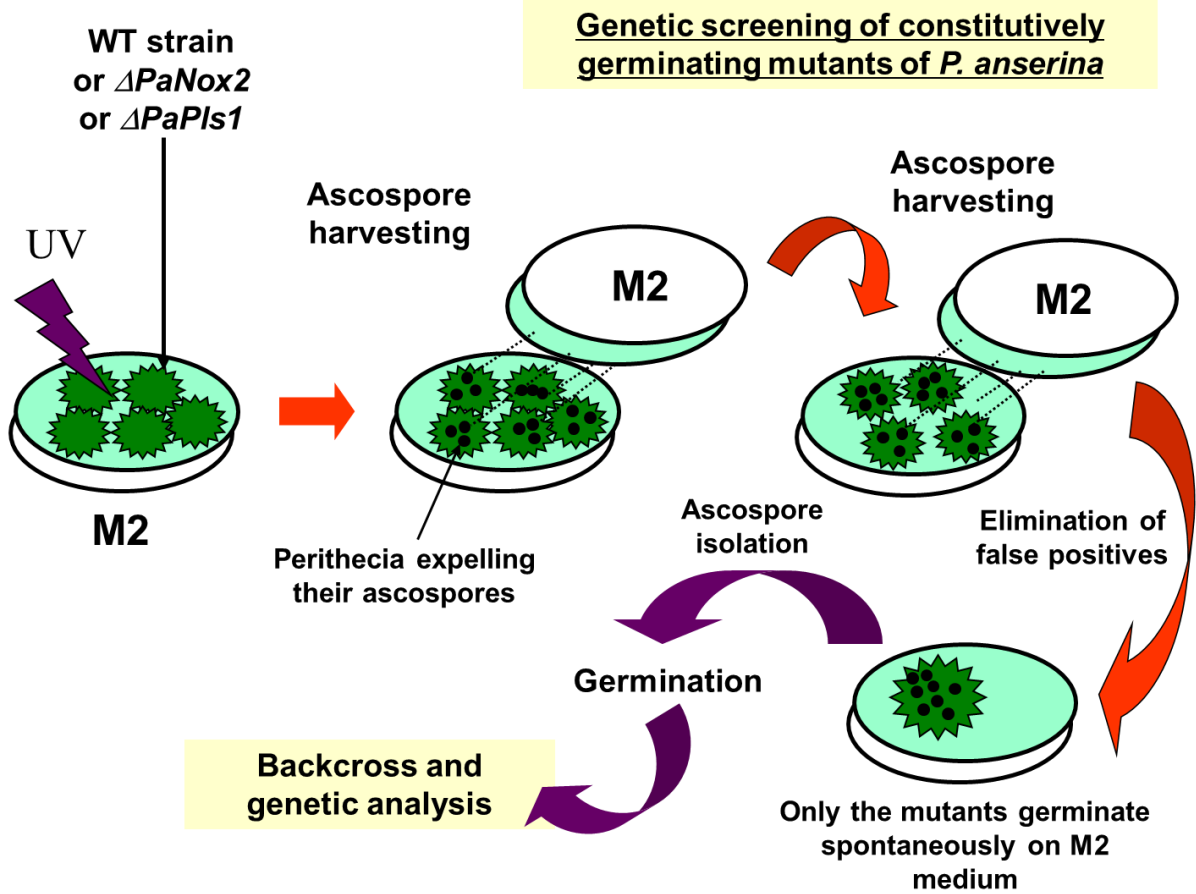


Fig. S1. Schematic representation of the mutagenesis screening to isolate spontaneously germinating mutants

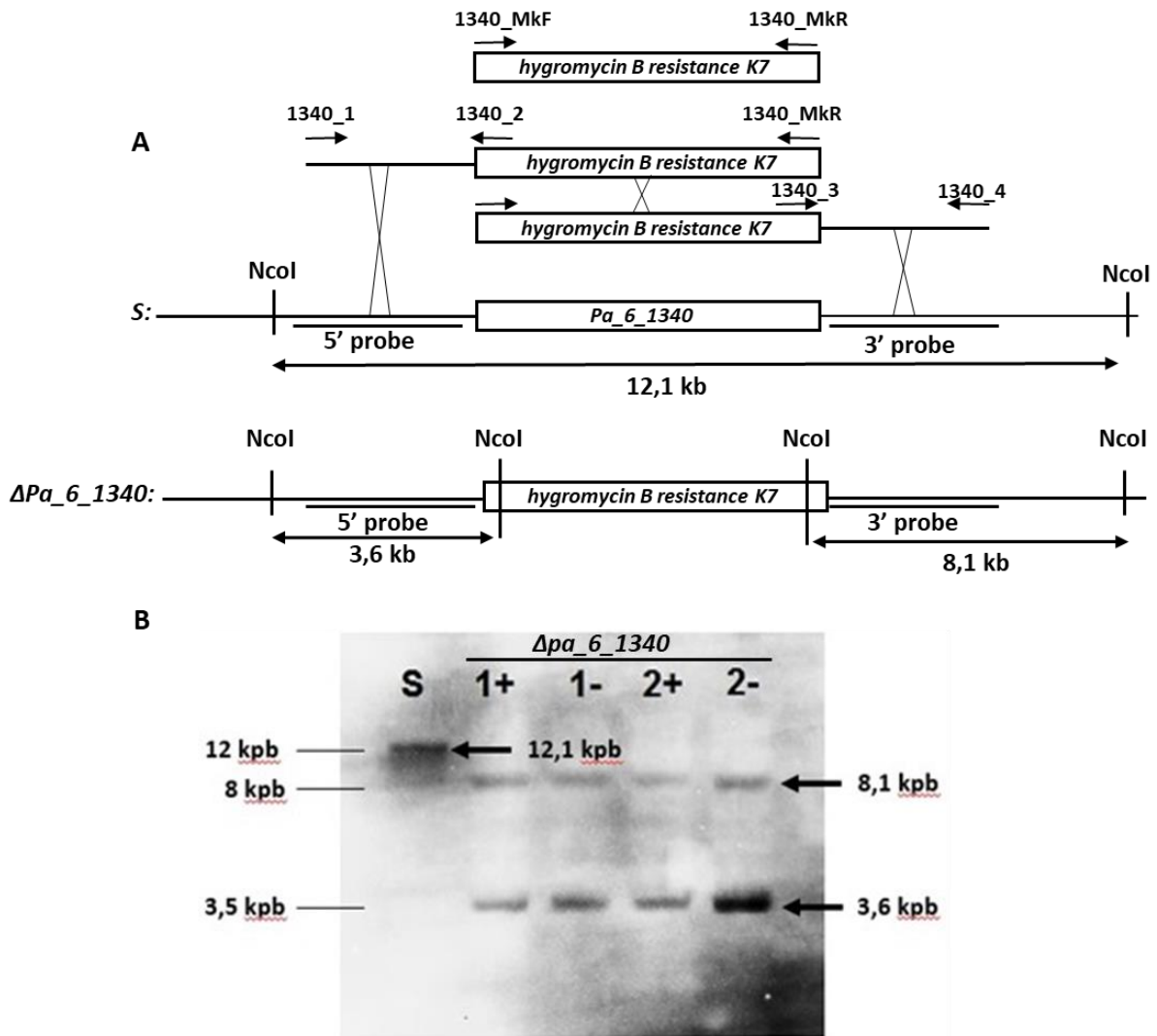


Fig. S2. *Pa_6_1340* (*ΔGUNI*) deletion and Southern blot analysis. A, schematic representation of the PCR-based deletion K7 and the recombination events for homologous replacement of *Pa_6_1340* by the hygromycin B deletion K7. Enzymes and positions of the probes used for Southern blotting are indicated. B, Southern blot analysis of the wild-type *S* strain (S) and transformants 1 and 2 in both mating types (+) *mat*+, (-) *mat*-. The sizes of the expected restriction fragments for the *S* strain and the deleted strains are indicated by an arrow.

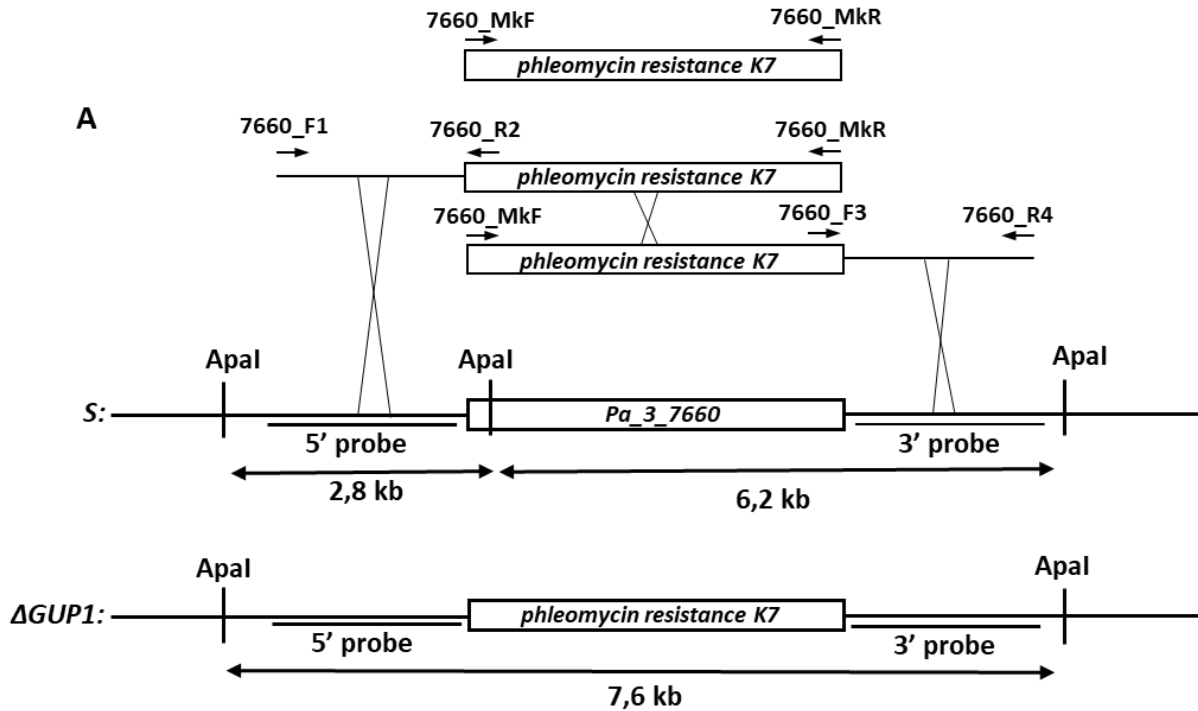
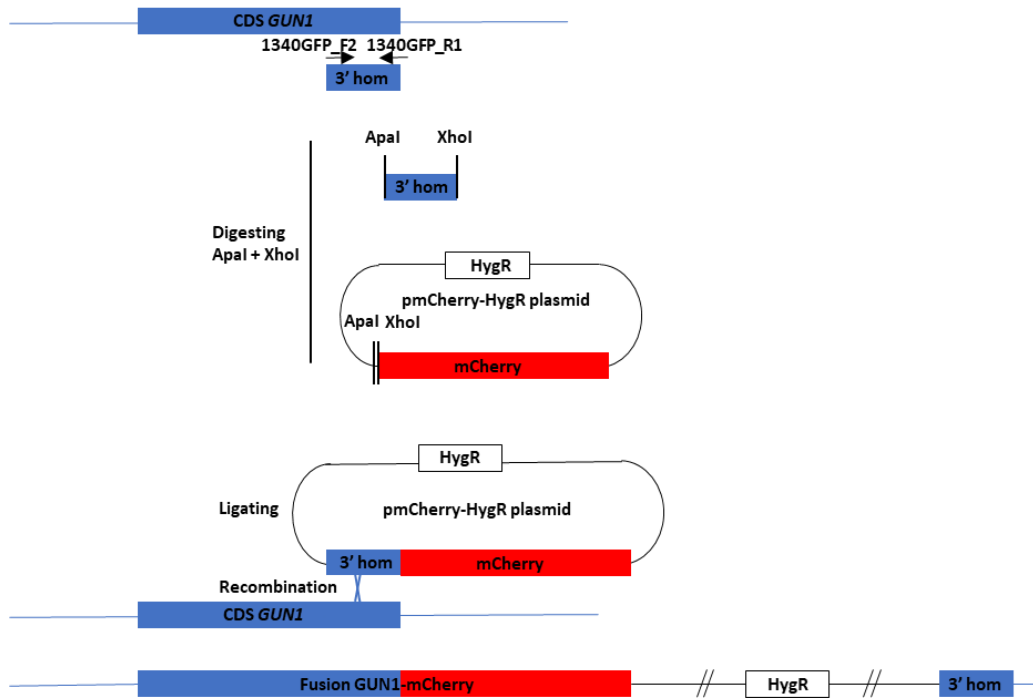


Fig. S3. *Pa_3_7660* ($\Delta GUP1$) deletion and Southern blot analysis. A, schematic representation of the PCR-based deletion K7 and the recombination events for homologous replacement of *Pa_3_7660* by the phleomycin deletion K7. Enzymes and positions of the probes used for Southern blotting are indicated. B, Southern blot analysis of the wild-type *S* strain (S) and transformants 1, 2 and 3. The sizes of the expected restriction fragments for the *S* strain and the deleted strains are indicated by an arrow.

pGUN1-mCherry :



pGUN1-mCherry-AKI :

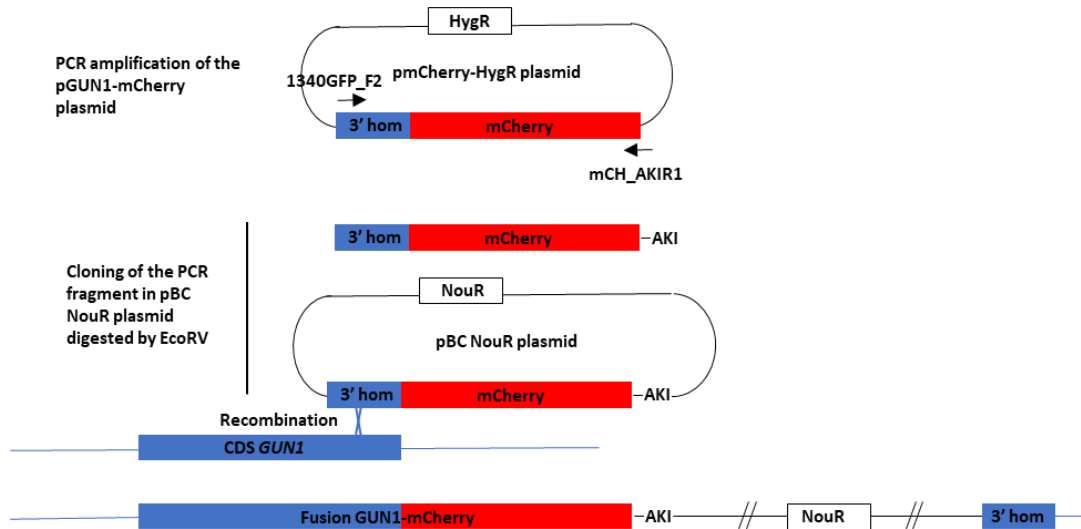


Fig. S4. Schematic representation of the construction of the pGUN1-mCherry and pGUN1-mCherry-AKI plasmids

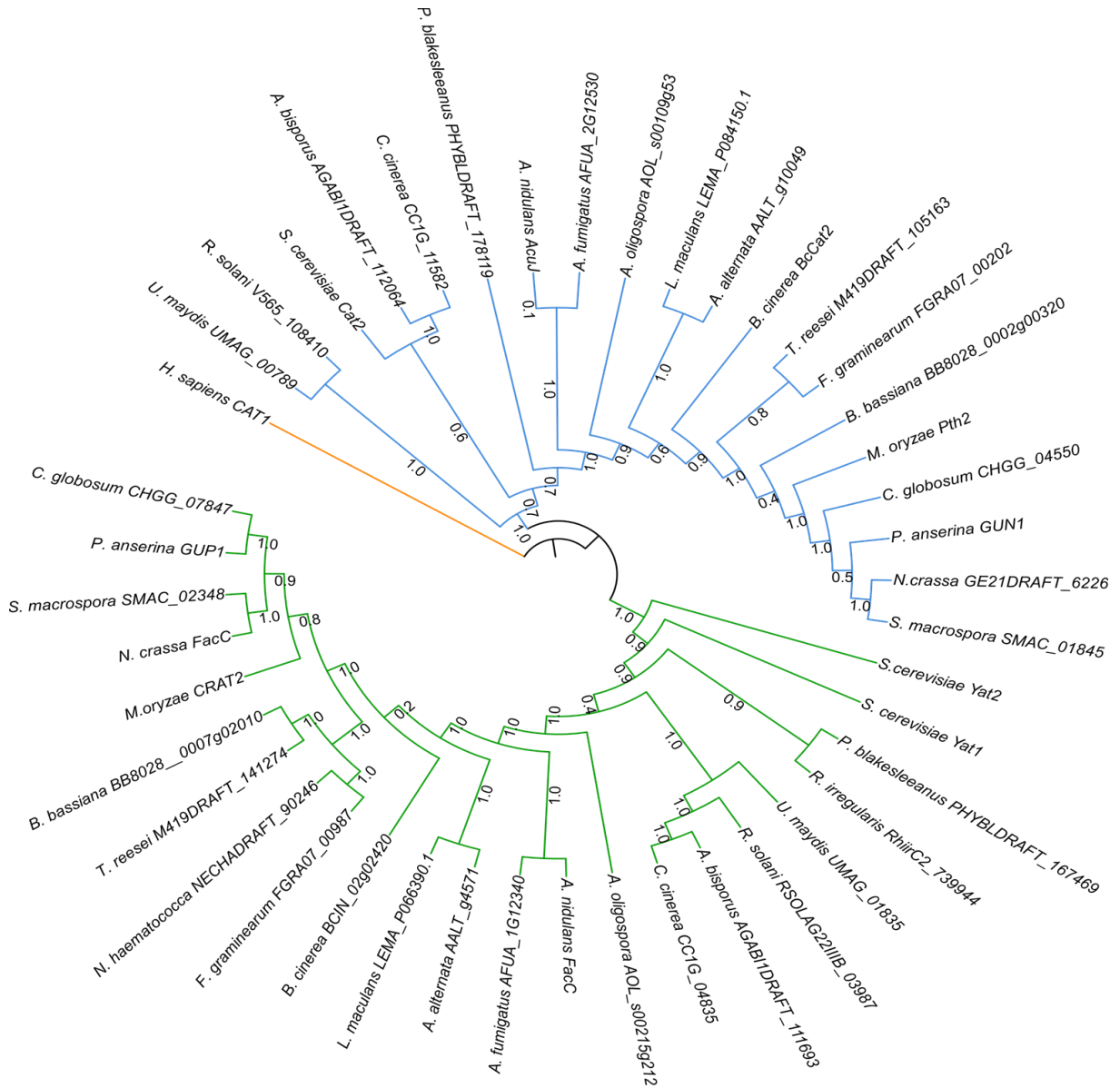


Fig S5. PhyML phylogenetic tree of GUN1 homologs in a selection of fungi. The human homolog has been included to root the tree. Bootstrap values are indicated.

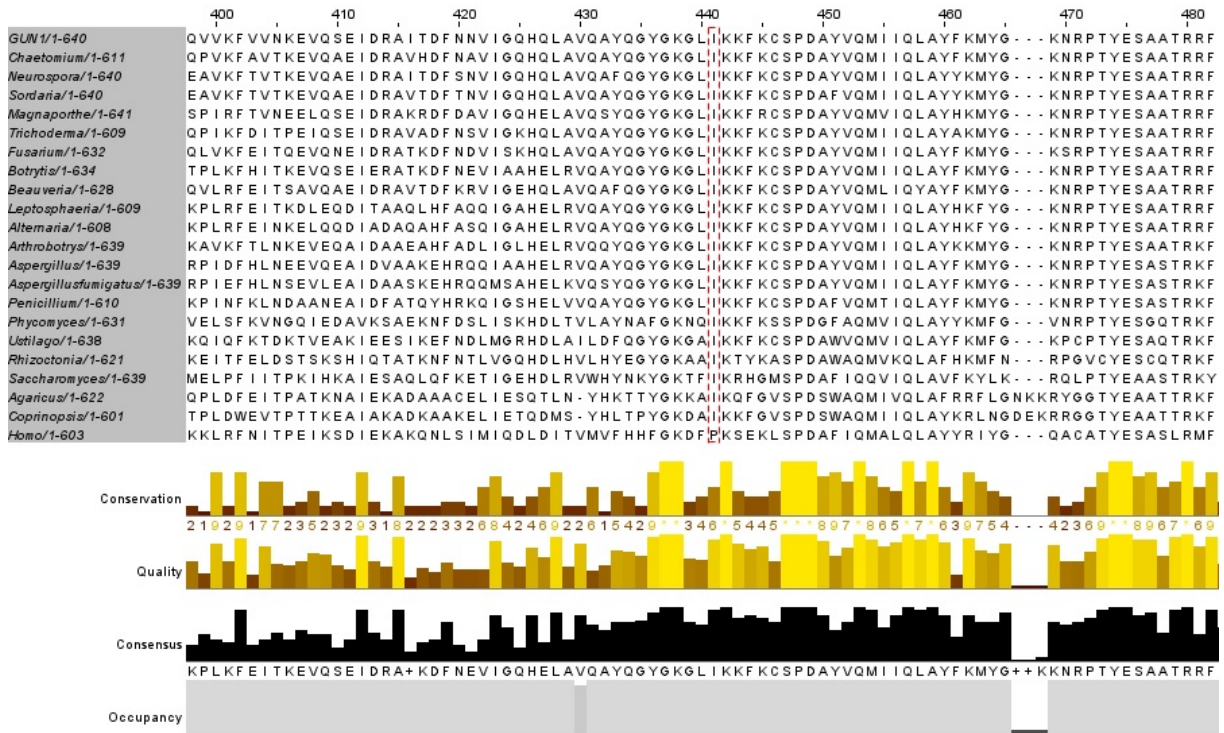


Fig. S6. Alignment of selected ortholog proteins of GUN1 from various *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* and *Mucoromycetes*. The alignment was made with MAFFT (Katoh et al., 2005) and visualized with Jalview (Waterhouse et al., 2009). The conserved residues are boxed in red. The sequence of the *H. sapiens* was used as non-fungal CAT sequence.

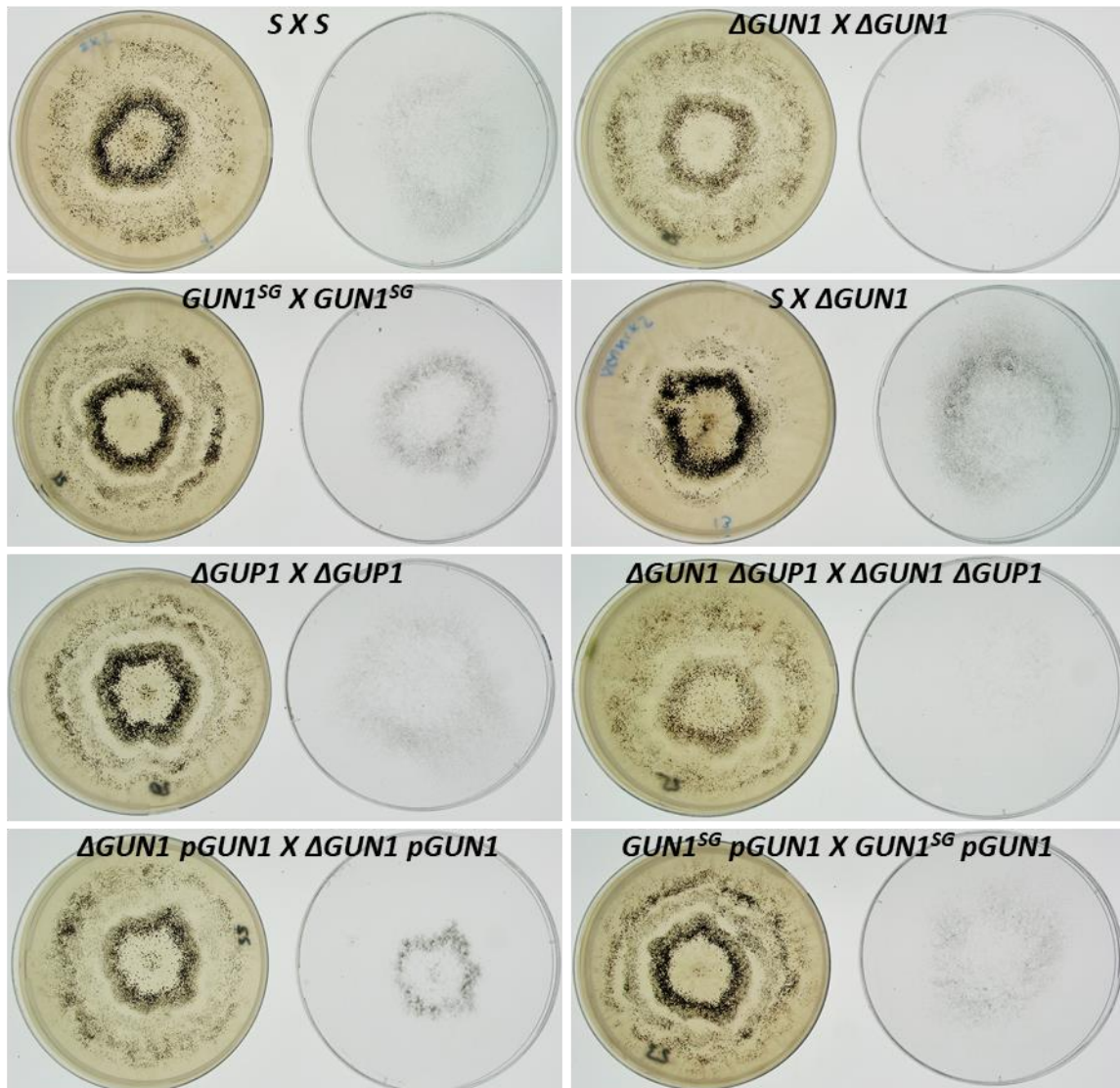


Figure S7: Fertility assays in heterokaryon crosses. A mix of *mat+* and *mat-* mating type of each genotype crossed is inoculated at the center of the petri plate and incubated 10 days at 27°C. Fertile perithecia project their ascospores from day 7 to day 10 directly on the lid of the petri plate. Very similar amount of perithecia are produced in the different crosses performed and the amounts of ascospores projected correspond indicate that these crosses are perfectly fertile. Note that $\Delta GUN1$ and $\Delta GUN1 \Delta GUP1$ ascospores are partially demelanized and are less visible on the picture.

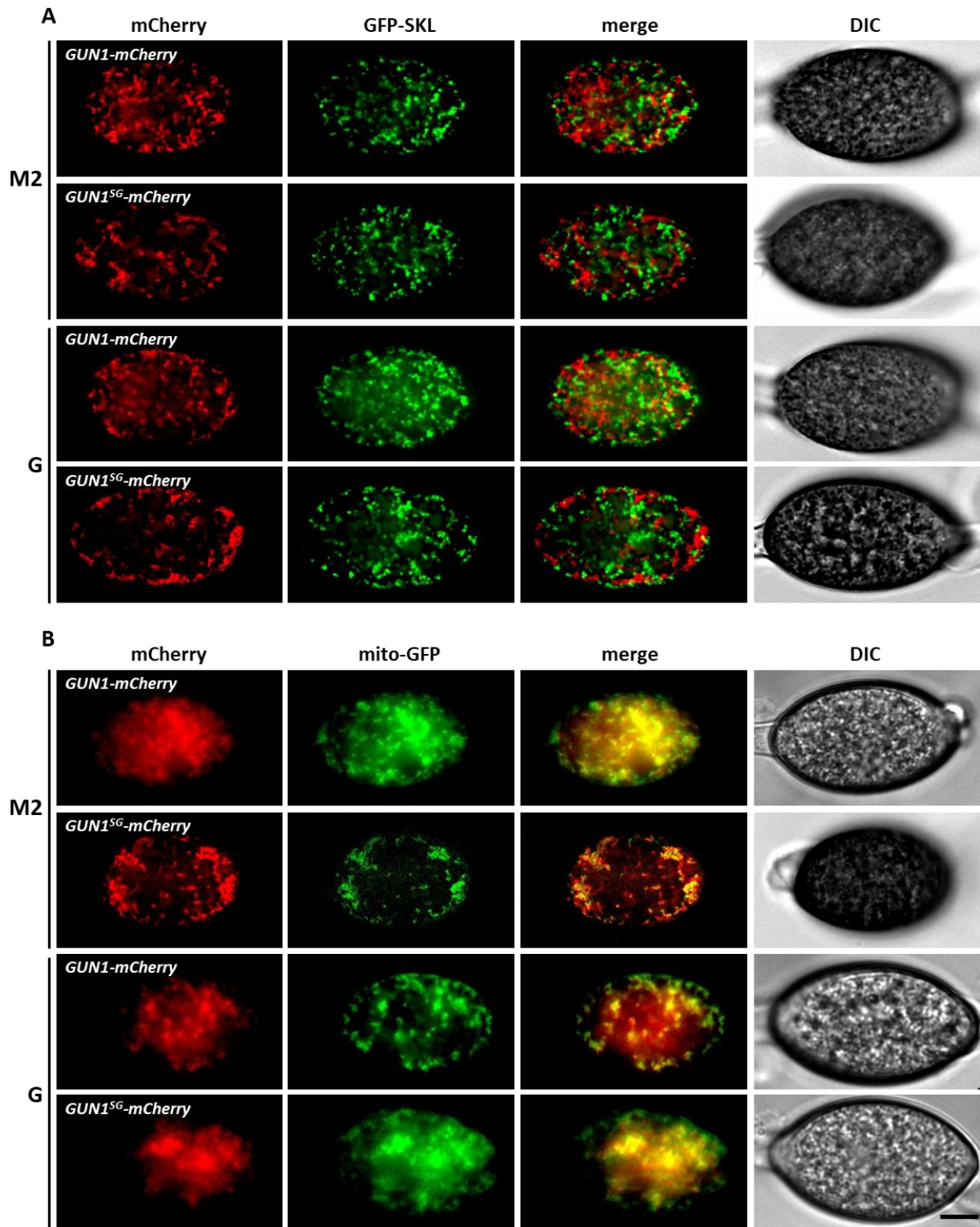


Fig S8: Spinning disk imaging of GUN1-mCherry and GUN1^{SG}-mCherry in ascospores. All the ascospores imaged carry the *PaPks1*¹³⁶ mutation partially impairing ascospores melanisation making ascospores transparent for fluorescence imaging. A) Every strains carry the GFP-SKL reporter tagging peroxisomes. B) Every strain carry the mito-GFP reporter tagging mitochondria. M2 liquid medium: no induction of ascospores germination. G liquid medium: ascospores germination induction. Scale bar, 5 μm .

STRAIN	GENOTYPE	MARKER	REFERENCE
<i>Wild-Type</i>	<i>big "S"</i>	none	Rizet, 1953
<i>Δmus51</i>	<i>Δmus51::phleoR</i>	phleoR	El-Khoury <i>et al.</i> , 2008
<i>Δmus51</i>	<i>Δmus51::genR</i>	genR	
<i>Δmus52</i>	<i>Δmus52::genR</i>	genR	El-Khoury <i>et al.</i> , 2008
<i>PaMKK2^c</i>	<i>PaMKK2^c::phleoR</i>	phleoR	Lalucque <i>et al.</i> , 2012
<i>PaMpk2</i>	<i>PaMpk2::hygR</i>	hygR	Lalucque <i>et al.</i> , 2012
<i>PaNox2</i>	<i>PaNox2::phleoR</i>	phleoR	Malagnac <i>et al.</i> , 2004
<i>PaPls1</i>	<i>PaPls1::hygR</i>	hygR	Lambou <i>et al.</i> , 2008
<i>PaPks1¹³⁶</i>	<i>PaPks1¹³⁶</i>	none	Coppin & Silar, 2007
<i>mito-GFP</i>	<i>mito-GFP::hygR</i>	hygR	Sellem <i>et al.</i> , 2007
<i>GFP-SKL</i>	<i>GFP-SKL::phleoR</i>	phleoR	Ruprich-Robert <i>et al.</i> , 2002
<i>ΔPex5</i>	<i>ΔPex5::hygR</i>	hygR	Bonnet <i>et al.</i> , 2006
<i>ΔPex7</i>	<i>ΔPex7::phleoR</i>	phleoR	Bonnet <i>et al.</i> , 2006
<i>ΔPex13</i>	<i>ΔPex13::hygR</i>	hygR	Peraza-Reyes <i>et al.</i> , 2011
<i>GUN1^{5G}</i>	<i>GUN1^{I441N}</i>	none	
<i>GUN1^{5G} pGUN1</i>	<i>GUN1^{I441N} pBC-GUN1-genR</i>	genR	
<i>ΔGUN1</i>	<i>ΔPa_6_1340::hygR</i>	hygR	
<i>ΔGUN1 pGUN1</i>	<i>ΔPa_6_1340::hygR pBC-GUN1-genR</i>	hygR, phleoR	
<i>ΔGUP1</i>	<i>ΔPa_3_7660::phleoR</i>	phleoR	
<i>ΔGUP1 pGUP1</i>	<i>ΔPa_3_7660::phleoR pBC-GUP1-nouR</i>	phleoR, nouR	
<i>ΔGUN1 ΔGUP1</i>	<i>ΔPa_6_1340::hygR ΔPa_3_7660::phleoR</i>	hygR, phleoR	
<i>ΔGUN1 ΔGUP1 pGUN1</i>	<i>ΔPa_6_1340::hygR ΔPa_3_7660::phleoR pBC-GUN1-genR</i>	hygR, phleoR, genR	This study
<i>GUN1-mCherry</i>	<i>GUN1-mCherry::hygR</i>	hygR	
<i>GUN1-mCherry GFP-SKL</i>	<i>GUN1-mCherry::hygR GFP-SKL::phleoR</i>	hygR, phleoR	
<i>GUN1-mCherry mito-GFP</i>	<i>GUN1-mCherry::hygR mito-GFP::hygR</i>	hygR	
<i>GUN1-mCherry-AKI</i>	<i>GUN1-mCherry-AKI::nouR</i>	nouR	
<i>GUN1-mCherry-AKI GFP-SKL</i>	<i>GUN1-mCherry-AKI::nouR GFP-SKL::phleoR</i>	phleoR, nouR	
<i>GUN1-mCherry-AKI mito-GFP</i>	<i>GUN1-mCherry-AKI::nouR mito-GFP::hygR</i>	hygR, nouR	
<i>GUN1^{5G}-mCherry</i>	<i>GUN1^{I441N}-mCherry::hygR</i>	hygR	

<i>GUN1^{5G}-mCherry GFP-SKL</i>	<i>GUN1^{I441N}-mCherry::hygR GFP-SKL::phleoR</i>	hygR, phleoR
<i>GUN1^{5G}-mCherry mito-GFP</i>	<i>GUN1^{I441N}-mCherry::hygR mito-GFP::hygR</i>	hygR
<i>GUN1^{5G}-mCherry-AKI</i>	<i>GUN1^{I441N}-mCherry-AKI::nouR</i>	nouR
<i>GUN1^{5G}-mCherry-AKI GFP-SKL</i>	<i>GUN1^{I441N}-mCherry-AKI::nouR</i> <i>GFP-SKL::phleoR</i>	phleoR, nouR
<i>GUN1^{5G}-mCherry-AKI mito-GFP</i>	<i>GUN1^{5G}-mCherry-AKI::nouR mitoGFP::hygR</i>	hygR, nouR
<i>PaPks1¹³⁶ GUN1-mCherry</i> <i>mito-GFP</i>	<i>PaPks1¹³⁶GUN1-mCherry::hygR</i> <i>mito-GFP::hygR</i>	hygR
<i>PaPks1¹³⁶ GUN1-mCherry-AKI GFP-SKL</i>	<i>PaPks1¹³⁶GUN1-mCherry-AKI::nouR</i> <i>GFP-SKL::phleoR</i>	phleoR, nouR
<i>PaPks1¹³⁶ GUN1-mCherry-AKI mito-GFP</i>	<i>PaPks1¹³⁶ GUN1-mCherry-AKI::nouR</i> <i>mito-GFP::hygR</i>	hygR, nouR
<i>PaPks1¹³⁶ GUN1-mCherry</i> <i>GFP-SKL</i>	<i>PaPks1¹³⁶GUN1-mCherry::hygR</i> <i>GFP-SKL::phleoR</i>	hygR, phleoR
<i>PaPks1¹³⁶ GUN1^{5G}-mCherry GFP-SKL</i>	<i>PaPks1¹³⁶ GUN1^{I441N}-mCherry::hygR</i> <i>GFP-SKL::phleoR</i>	hygR, phleoR
<i>PaPks1¹³⁶ GUN1^{5G}-mCherry mito-GFP</i>	<i>PaPks1¹³⁶ GUN1^{I441N}-mCherry::hygR</i> <i>mito-GFP::hygR</i>	hygR
<i>PaPks1¹³⁶ GUN1^{5G}-mCherry-AKI GFP-SKL</i>	<i>PaPks1¹³⁶ GUN1^{I441N}-mCherry-AKI::nouR</i> <i>GFP-SKL::PhleoR</i>	phleoR, nouR
<i>PaPks1¹³⁶ GUN1^{5G}-mCherry-AKI mito-GFP</i>	<i>PaPks1¹³⁶ GUN1^{I441N}-mCherry-AKI::nouR</i> <i>mito-GFP::hygR</i>	hygR, nouR
<i>GUN1^{5G} ΔPex7</i>	<i>GUN1^{I441N} ΔPex7::phleoR</i>	phleoR
<i>PaMkk2^c ΔGUN1</i>	<i>PaMkk2^c::phleoR ΔGUN1::hygR</i>	hygR phleoR

Table 1. Strain list.

Strains	day
<i>WT</i>	2
<i>GUN1^{SG}</i>	3
<i>ΔGUN1</i>	4
<i>ΔGUP1</i>	2
<i>ΔGUN1ΔGUP1</i>	4

Table 2: Cellophane penetration assay. The listed strains were cultured for 5 days on M2 medium topped with a cellophane layer at 27 °C. After 2-, 3-, 4- and 5-days of culture, the cellophane layer was removed to check fungal growth in the medium underneath. The day the cellophane was breached is indicated. 3 replicates were made for each day of culture. This experiment was repeated twice.

M2			G+YE		
[genR]	[genS]	Total	[genR]	[genS]	Total:
∅	11	42	18	13	42

Table 3: *GUN1^{SG} X GUN1^{SG} pGUN1 (pBC-GUN1-genR)*. 42 homokaryotic ascospores were sown on both M2 and G+YE media. The numbers correspond to the amount of germinated spores.

<i>GUN1^{SG} X ΔPaPls1::hygR</i>			<i>GUN1^{SG} X ΔPaNox2::phleoR</i>			<i>GUN1^{SG} X ΔPaMpk2::hygR</i>		
[hygR]	[hygS]	Total:	[phleoR]	[phleoS]	Total:	[hygR]	[hygS]	Total:
∅	20	48	∅	13	48	∅	26	48

Table 4: Results of the crosses between *GUN1^{SG}* and *ΔPaPls1*, *ΔPaNox2*, *ΔPaMpk2*. 48 homokaryotic ascospores were sown on G+YE medium for each cross. The numbers correspond to the amount of germinated spores.

<i>ΔGUN1</i>	<i>PaMKK2^C ΔGUN1</i>	<i>PaMKK2^C [hygS, phleoR]</i>	+ [hygS, phleoS]	Total:
[hygR, phleoS]	[hygR, phleoR]			
0	26	14	0	40

Table 5: *PaMKK2^C::phleoR X ΔGUN1::hygR*. 40 thalli generated by ascospores produced by this cross, and which germinated spontaneously on M2 medium were transplanted on M2 medium for growth and then tested for both antibiotic resistances.

<i>Δpex7 GUN1^{SG}</i> [hygS, phleoR]	<i>GUN1^{SG}</i> [hygS, phleoS]	+	<i>Δpex5 GUN1^{SG}</i> [hygR, phleoS]	<i>Δpex5</i> [hygR, phleoS]	<i>Δpex5 Δpex7</i> [hygR, phleoR]	<i>Δpex7</i> [hygS, phleoR]	<i>Δpex5 Δpex7 GUN1^{SG}</i> [hygR, phleoR]	Total
15*	7*	4	0	0	0	0	0	75

Table 6: *Δpex5 Δpex7 (Δpex5::hygR Δpex7::phleoR) X GUN1^{SG}*. 75 homokaryotic ascospores were sown on G+YE medium. *, ascospores of this genotype show spontaneous germination on standard M2 medium.

<i>GUN1^{SG}</i> [HygS]	+	<i>Δpex13</i> [hygS]	<i>Δpex13 GUN1^{SG}</i> [hygR]	Total
14*	5	0	0	64

Table 7: *Δpex13 (Δpex13::hygR) X GUN1^{SG}*. 64 homokaryotic ascospores were sown on G+YE medium. *, ascospores of this genotype show spontaneous germination on standard M2 medium.

PRIMER	SEQUENCE
<i>pBC-For</i>	5'-CGCGCGTAATACGACTCA-3'
<i>pBC-Rev</i>	5'-CGCGCAATTAACCCTCAC-3'
<i>Fluo-MCS_For</i>	5'-GGTTCCTGGCCTTTTGCT-3'
<i>Fluo-MCS_Rev</i>	5'-TCCTCGCCCTTGCTCAC-3'
<i>1340_1</i>	5'- CAAGAGGTGCGATTGGAGGAGGAGAGGG-3'
<i>1340_2</i>	5'-CTATTTAACGACCCTGCCCTGAACCGCCCAACTTCTCCTAGGCAAGTGGAGC-3'
<i>1340_3</i>	5'-CTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGGCTCACGGTTGAGGGATCTAACGGGGGG-3'
<i>1340_4</i>	5'-GGGGGTAGGAAGAGAGGAGAGAAGTGGAG -3'
<i>1340_MkF</i>	5'-GCTCCACTTGCCTAGGAGAAGTTGGGCGGTTTCAGGGCAGGGTCGTAAATAG-3'
<i>1340_MkR</i>	5'-CCGTTAGATCCCTCAACCGTGAGCCATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAG-3'
<i>7660_F1</i>	5'-GGCTGCCAATTGGTGGGGATCTAAACGTCA-3'
<i>7660_R2</i>	5'-CTATTTAACGACCCTGTGAACCGTTCTTGTCAGCTGGGGTGATCTGGATTCAA-3'
<i>7660_F3</i>	5'-CTTACCGCTGTTGAGATCATGGCTTGGCTATTGTGATGGGAGGGGGGGAGG-3'
<i>7660_R4</i>	5'-TATTTCTCAGGAAAGGTGGGGAGGCGGCCA-3'
<i>7660_MkF</i>	5'-TTGAATCCAGATCCAGCTGACAAGAACGGTTCAGGGCAGGGTCGTAAATAG-3'
<i>7660_MkR</i>	5'-CCTCCCCCTCCCATCACAGCCAAGCCATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAG-3'
<i>Vérif 5'_1340</i>	5'-GTCTGTCCGTTGCCTCCTTA-3'
<i>Vérif 3'_1340</i>	5'-TCCACCTTTTGCAGCCCCC-3'
<i>Vérif 5'_7660</i>	5'-CGTCTTCGTTTTGGTCTTTGTC-3'
<i>Vérif 3'_7660</i>	5'-ATGGGATTGGTGGTGGTTTG-3'
<i>1340GFP_F2</i>	5'-CTCGAGTACGTGCAGATGATCATCCAGCT-3'
<i>1340GFP_R1</i>	5'-GGGCCCGGATCTTGGCCTTGGGCGCCTCAA-3'
<i>mCH_AKIR1</i>	5'- TTAGATCTTGGCCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGCCGG-3'
<i>Valid_Mk_5'</i>	5'- TGAGAAGCACACGGTCAC -3'
<i>Valid_Mk_3'</i>	5'- TCGGGGCGAAACTCTC -3'
<i>1340F3</i>	5'- GCGTGGACAGGCATTTGT -3'
<i>1340R2</i>	5'-ACGCCGGATCCTGATACA-3'
<i>7660_R5</i>	5'-TGGATTAGAACACCTGGTGGAGGAATCGC-3'

Table S1: primers list

Strain	dextrin	acetate	Tween 40	oleic acid
<i>GUNI-mCherry</i>	+	+	+	-
<i>GUNI^{SG}-mCherry</i>	+	+	+	-
<i>GUNI-mCherry-AKI</i>	+	+	+	+
<i>GUNI^{SG}-mCherry-AKI</i>	+	+	+	+

Table S2: Growth on different carbon sources. Every media has the same composition, except for the carbon source. The Tween 40 control medium and the oleic acid medium contain 0,5% Tween 40. +, wild-type growth; -, altered growth

Chapitre III : Etude du mutant de germination spontanée *GUN2^{SG}*

En parallèle de l'analyse du mutant *GUNI^{SG}*, nous avons débuté celle du 2^{ème} des 6 mutants GUN : *GUN2^{SG}*. Bien que toujours en cours, l'étude de ce mutant a permis d'identifier un régulateur transcriptionnel de la germination des ascospores encore jamais étudié chez les champignons filamenteux auparavant. L'étude de ce mutant permet d'apporter un nouvel élément à la voie de régulation de la germination des ascospores chez *P. anserina*.

I – Identification de *GUN2*, le gène muté dans *GUN2^{SG}*

1. Caractéristiques phénotypiques et séquençage de *GUN2^{SG}*

A l'instar du mutant *GUNI^{SG}*, le mutant *GUN2^{SG}* est dérégulé pour la germination de ses ascospores : le processus se déroule normalement sur le plan morphologique en passant par la formation d'une bulle de germination issue du pore de germination formé à l'opposé de son appendice primaire (**Figure 27**), mais ne requiert plus la présence d'un signal inducteur permettant la levée de la dormance. De même, les ascospores différenciées par ce mutant sont pleinement mélanisées, et son mycélium présente une morphologie similaire à celui de la souche sauvage *S*. Mais contrairement à *GUNI^{SG}* qui a la capacité de germer spontanément sur tous les milieux, y compris un simple couvercle d'agar, *GUN2^{SG}* ne germe spontanément que sur un milieu disposant d'une source de carbone : M2 (Dextrine), M3 (Glucose) et les milieux de germination G et G+YE. De plus, le Western Blot réalisé par Isabelle Lacaze sur ce mutant lors de son stage de M2 (2012) révèle que la mutation n'induit pas d'activation constitutive de la voie *PaMpk2*, suggérant que le gène impliqué chez ce mutant agit soit en aval de la voie *PaMpk2*, ou alors participe à une autre voie parallèle à la voie *PaMpk2* de régulation de la germination des ascospores (**Figure 29**). De la même façon que pour *GUNI^{SG}*, ce mutant a été croisé avec la souche sauvage, et l'analyse de la descendance de ce croisement révèle que la mutation responsable du phénotype de ce mutant est portée par un seul gène.

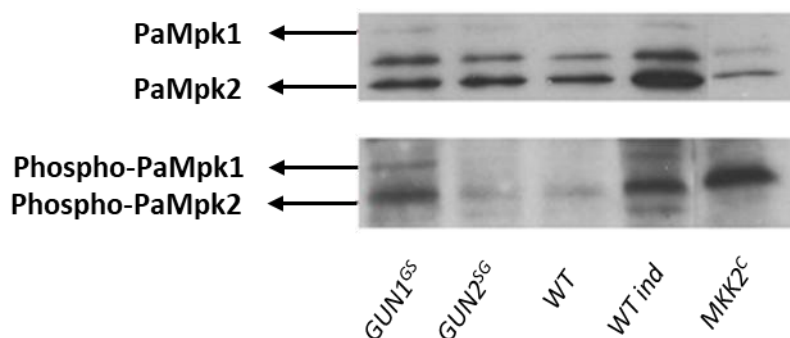


Figure 29 : Western Blot réalisés sur les mutants *GUN1^{SG}* et *GUN2^{SG}*. Trois témoins ont été utilisés : la souche sauvage *S* en condition induite pour la germination (exposition de 2 heures sur milieu G+YE) et non induite, ainsi que la souche portant l'allèle constitutivement actif de la MAPKK de la voie *PaMpk2* : *PaMkk2^c* (Lalucque *et al.*, 2012). Des anticorps spécifiques anti-PaMpk1/PaMpk2 et anti-PhosphoPaMpk1/PaMpk2 ont révélé une hyperphosphorylation de PaMpk2 chez *GUN1^{SG}* traduisant une activation constitutive de cette voie chez ce mutant, mais pas chez *GUN2^{SG}*. Modifié à partir du rapport de M2 d'Isabelle Lacaze (2012).

Ce mutant a ensuite été isogénisé par cinq back-cross avec la souche *S*, afin de le purifier de toutes les mutations qui ne sont pas liées génétiquement à la mutation responsable du phénotype de germination spontanée, puis son génome a été entièrement séquencé. L'analyse du génome de *GUN2^{SG}* a ainsi révélé la présence de 3 mutations : une substitution d'un C en T, au niveau du promoteur du gène *Pa_3_4130*, codant une protéine de fonction inconnue ; une mutation silencieuse au niveau du gène *Pa_5_6660* qui code pour une vanillyl alcool oxydase, et enfin la délétion d'un G au niveau de la CDS du gène *Pa_4_9410*, qui code pour une protéine de fonction inconnue. Parmi les gènes mutés, nous nous sommes concentrés sur *Pa_4_9410*. Bien que ce gène soit de fonction inconnue, la délétion du G au niveau du triplet codant l'acide glutamique en position 823 entraîne un décalage du cadre ouvert de lecture qui provoque l'apparition prématurée d'un codon stop, aboutissant à la génération d'une protéine tronquée de 832 acides aminés (AA) au lieu de 1008 (**Annexe 1**).

2. Délétion de *GUN2*, et complémentation génétique

Afin d'évaluer son impact dans la germination des ascospores, j'ai entrepris la délétion du gène candidat *Pa_4_9410*. Pour cela, j'ai remplacé sa CDS par un marqueur de résistance à la nouséothricine en utilisant la technique de la délétion par cassette PCR (méthode décrite dans l'**Annexe 2**) (Silar, 2013).

Les parties 5' et 3' du gène ont été amplifiées avec les couples d'amorces 9410F1/9410R2 et 9410F3/9410R4 respectivement, tandis que le gène de résistance à la nouséothricine a été amplifié avec les amorces 9410MkF et 9410MkR. L'ensemble des amorces employées pour les PCR ainsi que leur séquence est répertorié dans l'**Annexe 3**. Chacun des fragments 5' et 3' ont été ensuite respectivement fusionnés par PCR au marqueur de résistance. Les cassettes 5' et 3' ainsi générées ont été transformées dans une souche *Δmus51::hygR* pour laquelle l'occurrence des phénomènes de recombinaison non-homologue sont grandement réduits. Dix transformants ont été obtenus. L'intégration de la cassette de délétion a été vérifiée par PCR et trois transformants montrant une intégration correcte de la cassette de délétion ont été croisés par la souche S pour purifier la délétion *Δ9410* de la délétion *Δmus51::hygR*. Lors des semis de spores, deux phénotypes spécifiques à *Δ9410* sont alors apparus : les ascospores monocaryotiques contenant la mutation *Δ9410* germent spontanément (quand on les sème sur milieu M2) et ont un retard de germination par rapport à la souche sauvage (quand on les sème sur milieu G⁺ YE). Mais avant de passer à l'étude de ces deux phénotypes, il convient de vérifier la délétion du gène *Pa_4_9410*. Pour cela, j'ai sélectionné les 3 des transformants ainsi purifiés, et j'en ai vérifié la correcte délétion par Southern Blot (**Figure 30**).

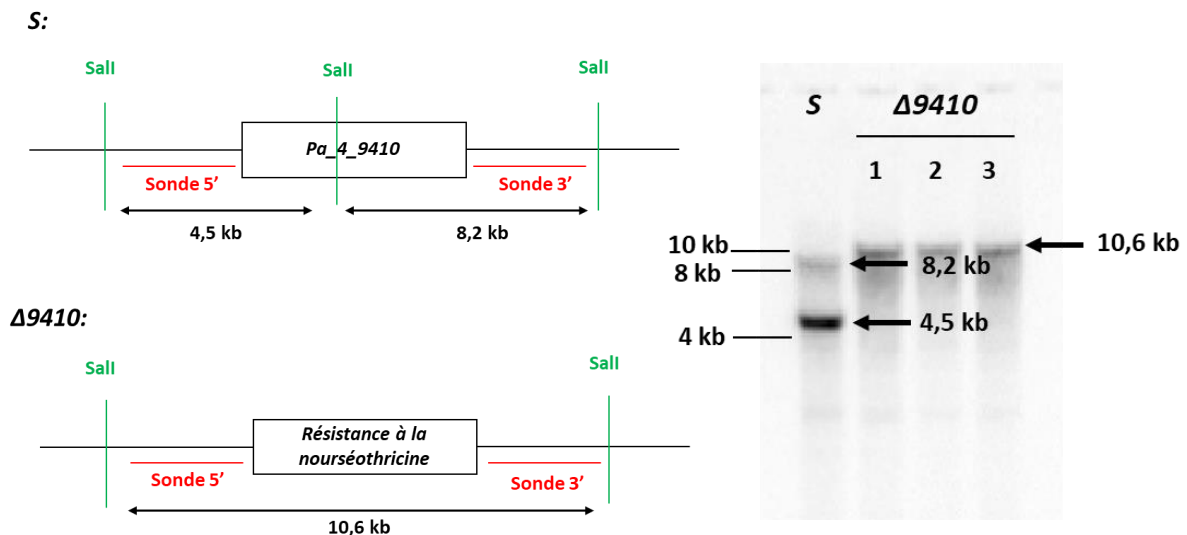


Figure 30 : Validation par Southern Blot de la délétion du gène *Pa_4_9410*.

A gauche : Représentation schématique du découpage enzymatique utilisé pour le Southern Blot ; A droite : l'autoradiogramme correspondant. Le gène a été correctement remplacé par le marqueur de résistance à la nouséothricine dans tous les transformants testés.

Une fois la délétion confirmée, j'ai alors cherché à déterminer si $GUN2^{SG}$ est allélique de Pa_4_9410 . Pour cela, j'ai entrepris un test de complémentation fonctionnel. Dans un premier temps, la récessivité de la mutation $GUN2^{SG}$ a été évaluée à l'aide d'un croisement de ce mutant par la souche sauvage, et j'ai étudié la germination des tétrades constituées d'ascospores hétérocaryotiques semées sur M2. Pour bien comprendre ce test de récessivité, il est important de distinguer les tétrades pré-réduites des tétrades post-réduites (**Figure 5**). Génétiquement, les tétrades pré-réduites sont composées de 2 spores $GUN2^{SG}/GUN2^{SG}$ et 2 spores sauvages $GUN2^+/GUN2^+$, tandis que les tétrades post-réduites de 4 spores $GUN2^{SG}/GUN2^+$.

Ainsi, la dominance/récessivité d'un trait ne peut s'observer qu'au sein des tétrades post-réduites. Il est cependant impossible de les distinguer visuellement : seul leur phénotype de germination permet de les différencier. Enfin, il est important de prendre en considération pour l'analyse que, d'une manière similaire à ce qui a pu être observé pour le mutant $GUN1^{SG}$, la manipulation des ascospores $GUN2^{SG}$ lors des semis tend à diminuer leur taux de germination. Une hypothèse proposée pour expliquer ce phénomène est qu'une spore ayant entamé son processus de germination est plus fragile, et qu'en fonction de son avancement dans la germination, sa manipulation peut être délétère. 100 tétrades issues du croisement $GUN2^{SG} \times S$ ont donc été semées sur M2 pour déterminer l'état de germination spontanée des 4 ascospores hétérocaryotiques [G] de chaque asque. Les résultats de ces semis sont présentés dans le **Tableau 1**.

Phénotype Caractéristique	[4G]	[3G]	[2G]	[1G]	[0G]
Effectifs	0	0	52	13	35

Tableau 1 : Résultats des semis sur M2 des tétrades issues du croisement $GUN2^{SG} \times S$.

Les effectifs correspondent au nombre de tétrades pour chaque catégorie de phénotype de tétrade.

Cinq cas de figures sont alors observables : 1) aucune ascospore ne germe spontanément [0G] ; 2) 1 ascospore qui germe spontanément [1G] ; 3) 2 ascospores qui germent spontanément [2G] ; 4) 3 ascospores qui germent spontanément [3G] et 5) 4 ascospores qui germent spontanément [4G]. Bien que les tétrades [2G] et [1G] pourraient inclure aussi bien des tétrades pré-réduites que post-réduites dont respectivement 2 et 3 des ascospores auraient été altérées par le semis, l'absence totale de tétrades [3G] et [4G] suggère que ce sont des tétrades post-réduites composées de 4 ascospores $GUN2^{SG}/+$ qui ne germent pas spontanément et que par

conséquent les tétrades [2G] et [1G] sont essentiellement des tétrades pré-réduites. Ces résultats m'ont mené à conclure que la mutation $GUN2^{SG}$ est récessive. J'ai par ailleurs pu estimer le pourcentage de post-réduction de 35% pour ce gène.

Un croisement du mutant $\Delta 9410$ par la souche sauvage a aussi été entrepris dans le même but ($\Delta 9410 \times S$). 30 tétrades issues de ce croisement ont été semées sur G+YE. Dans le cas de ce croisement, c'est le retard de germination des spores $\Delta 9410$ qui a été suivi ainsi que la résistance à la nouséothricine. Les tétrades issues de ce croisement arboraient les phénotypes suivants : i) 2 ascospores [nouS] avec une croissance normale et 2 ascospores [nouR] avec une croissance retardée ; ii) 4 ascospores [nouR] avec une croissance normale. J'en ai conclu que les premiers phénotypes sont associés à des tétrades pré-réduites de génotype 2 : +/+ ; 2 : $\Delta 9410/\Delta 9410$; tandis que le dernier à des tétrades post-réduites de génotype 4 : $\Delta 9410/+$. Ce dernier atteste de la récessivité du phénotype de croissance dû à la délétion $\Delta 9410$. Par la suite, j'ai établi la récessivité du phénotype de germination spontanée de la délétion $\Delta 9410$ (données non montrées). 12 tétrades post-réduites ont ainsi été mises en évidence contre 18 pré-réduites. D'après ces résultats, on a pu estimer le taux de post-réduction à 40% pour ce locus.

Une fois la récessivité des allèles $\Delta 9410$ et $GUN2^{SG}$ établie, j'ai alors pu réaliser le test de complémentation fonctionnel qui consiste en l'analyse de la descendance d'un croisement entre le mutant $\Delta 9410$ et $GUN2^{SG}$. De la même manière que précédemment, 100 tétrades ont été semées sur M2, et leur profil de germination a été analysé (**Tableau 2**).

Phénotype Caractéristique	[4G]	[3G]	[2G]	[1G]	[0G]
Effectifs	45	24	18	8	5

Tableau 2 : Résultats des semis sur M2 des tétrades issues du croisement $GUN2^{SG} \times \Delta 9410$.

Les effectifs correspondent au nombre de tétrades pour chaque catégorie de phénotype de tétrade.

Dans le cas présent, si on observe une disparition du phénotype de germination spontanée à l'issue de ce croisement (dans des asques post-réduits pour les deux gènes analysés), cela signifie que les deux souches sont mutées dans deux gènes différents (génotype théorique des spores hétérocaryotiques post-réduites : $\Delta 9410/+ GUN2^{SG}/+$). Au contraire, si on observe de la germination spontanée de spores hétérocaryotiques post-réduites, cela

démontre que ces deux mutants sont mutés dans le même gène (génotype théorique $\Delta 9410/GUN2^{SG}$).

Les résultats des semis révèlent un grand nombre de tétrades germant entièrement spontanément ainsi que quelques tétrades pour lesquelles une ou plusieurs spores de la tétrade n'ont pas germé. En considérant d'une part l'existence en quantités importante de tétrades avec plus de 2 spores qui germent spontanément, et les faibles proportions de tétrades [0G] et [1G] par rapport au [3G] et [4G] d'autre part, j'en ai conclu que les tétrades à [3G] et [4G] étaient soit des tétrades post-réduites de génotype 4 : $\Delta 9410/GUN2^{SG}$ soit des tétrades pré-réduites de génotype 2 : $\Delta 9410/\Delta 9410$; $2 GUN2^{SG}/GUN2^{SG}$, ces trois génotypes induisant la germination spontanée sur M2, et que l'absence de germination de certaines spores peut s'expliquer par le biais lié à la manipulation de celles-ci, qui peut les avoir endommagées. Ainsi, le phénotype de germination spontanée du mutant $\Delta 9410$ combiné à la non-complémentation génétique du défaut de germination spontanée des spores $\Delta 9410/GUN2^{SG}$ ainsi que le taux de post-réduction similaire entre les 2 mutants constituent trois arguments forts nous permettant de conclure que $GUN2^{SG}$ est muté dans le gène Pa_4_9410 , qui a donc été renommé $GUN2$ pour la suite de l'étude.

Afin de compléter ce test, j'ai réalisé une complémentation de la souche $\Delta GUN2$ par un plasmide portant l'allèle sauvage de $GUN2$. Pour cela j'ai amplifié le gène $GUN2$ à l'aide des amorces 9410F1 et 9410R4 et j'ai introduit le produit d'amplification dans un plasmide pBC-phleoR (Silar, 1995) (renommé $pGUN2$) digéré au préalable par EcoRV. Une fois vérifié par séquençage, ce plasmide a été transformé dans la souche $\Delta GUN2$, et 6 transformants $\Delta GUN2$, $pGUN2$ ont ainsi pu être obtenus. Ces transformants sont en cours d'analyse.

3. Analyse phylogénétique de $GUN2$

Une fois l'implication de ce gène dans le phénotype du mutant $GUN2^{SG}$ validée, j'ai débuté sa caractérisation. La protéine codée par $GUN2$ étant de fonction inconnue suite à l'annotation du génome (Espagne et al., 2008), j'ai commencé par réaliser une recherche BLASTP avec les paramètres par défaut sur le site du NCBI afin de rechercher des homologues dont la fonction aurait été caractérisée. Cette recherche a montré une grande correspondance de la protéine codée par $GUN2$ avec des facteurs de transcription. En effet, une rapide analyse à l'aide du logiciel InterProScan (Quevillon et al., 2005) a permis d'apporter un argument supplémentaire

indiquant que la protéine codée par *GUN2* est un régulateur transcriptionnel, en identifiant un domaine en doigt de zinc caractéristique des facteurs de transcription fongiques de la famille du facteur de transcription GAL4 de la levure *S. cerevisiae*: Zn(II)₂Cys₆ (MacPherson et al., 2006) (**Figure 31**). Cette famille de facteurs de transcription se caractérise par leur domaine de liaison à l'ADN en doigt de zinc localisé dans la portion N-terminale de la protéine, ainsi que par la présence d'un domaine de transactivation (TAD) dans leur portion C-terminale (Ding and Johnston, 1997; Melcher and Johnston, 1995). Il est donc possible que la partie C-terminale délétée chez le mutant *GUN2*^{SG} contienne son TAD, ce qui serait cohérent avec son phénotype (similaire à Δ *GUN2*, voir plus bas).

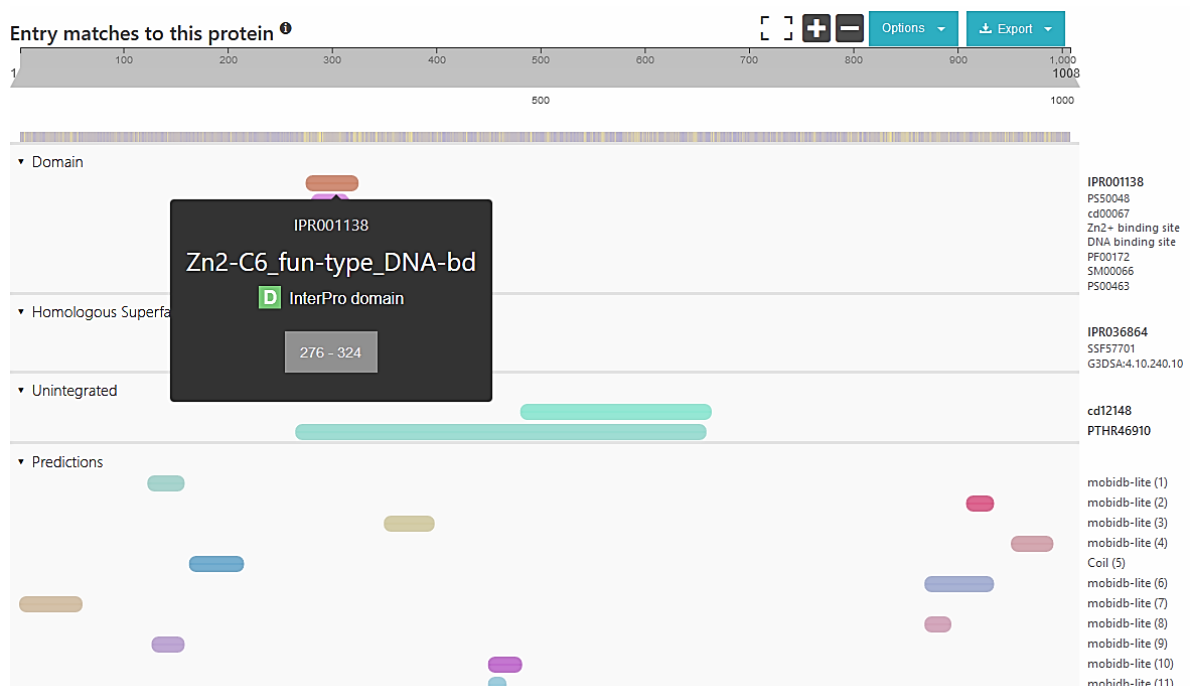


Figure 31 : Sortie InterProScan pour la protéine codée par le gène *GUN2*.

En continuant d'analyser les sorties BLASTP, j'ai pu identifier un homologue chez *Madurella mycetomatis* (82% d'identité) ainsi que chez *Colletotrichum gloeosporioides* (57% d'identité) annotés comme orthologues de Rgt1 de la levure *S. cerevisiae*. Rgt1 est un facteur de transcription qui a été caractérisé chez *S. cerevisiae* pour son rôle dans la régulation du transport du glucose (Palomino et al., 2005; Polish et al., 2005). De plus, d'autres facteurs de transcription putatifs identifiés grâce à cette première recherche sont annotés comme étant impliqués dans la réponse au glucose, tels que celui de *Neopestalotiopsis clavispora* (83% d'identité). En effet, Rgt1 est un facteur de transcription qui agit dans la réponse au glucose chez la levure, notamment comme régulateur transcriptionnel des transporteurs d'hexoses

(HXT) dont l'action dépend de la concentration extracellulaire en glucose. En l'absence de glucose, Rgt1 est associé à un complexe répresseur comprenant Ssn6, Tup1, Mth1 et Std1 qui, une fois Rgt1 lié à l'ADN, inhibe l'expression des gènes *HXT*, tandis qu'en présence de fortes concentrations en glucose, Rgt1 est hyperphosphorylé ce qui provoque sa dissociation du complexe répresseur, permettant ainsi à Rgt1 d'induire l'expression d'un facteur de transcription qui va à son tour activer l'expression des gènes *HXT* (Mosley et al., 2003; Palomino et al., 2005; Polish et al., 2005). Rgt1 peut ainsi jouer un rôle d'activateur et de répresseur transcriptionnel selon les conditions. De cette façon, Rgt1 joue un rôle crucial de régulateur : il évite les dépenses énergétiques cellulaires inutiles en réprimant l'expression des *HXT* lorsqu'ils ne sont pas nécessaires, mais induit leur expression lorsqu'il y a du glucose à incorporer dans la cellule.

Cependant, la recherche par BLASTP n'a pas permis d'identifier la protéine Rgt1 de *S. cerevisiae* comme homologue avec les paramètres standard de recherche utilisés. Pourtant, l'analyse InterPro menée sur la protéine Rgt1 révèle également la présence du même domaine Zn(II)₂Cys₆, bien que sa séquence soit divergente de celle de GUN2. Ce n'est qu'en augmentant à 1000 au lieu de 100 le nombre de séquences maximales cibles que l'on parvient à retrouver Rgt1 de *S. cerevisiae* (52,7 % d'identité). Une recherche approfondie des orthologues de la protéine GUN2 a alors été menée sur FUNGIpath et orthoDB (Grossetête et al., 2010; Zdobnov et al., 2017). De la même manière que le BLASTP, la recherche sur FUNGIpath n'a également pas fait ressortir Rgt1 de *S. cerevisiae* en tant qu'orthologue. Mais de manière surprenante, une recherche avec la protéine entière Rgt1 sur FUNGIpath nous permet d'identifier GUN2 comme orthologue. Il en va de même lorsque la recherche est réalisée avec uniquement le domaine Zn(II)₂Cys₆ : lorsque la recherche est lancée avec le domaine de la protéine GUN2, elle ne permet pas d'identifier Rgt1 en tant qu'orthologue ni sur orthoDB, ni sur FUNGIpath, alors que la recherche avec le domaine de la protéine Rgt1 permet de retrouver GUN2 en tant qu'orthologue. Pour déterminer si GUN2 est l'orthologue de Rgt1 de *S. cerevisiae*, j'ai réalisé un arbre phylogénétique en étudiant les séquences d'homologues d'espèces de référence chez les ascomycètes, les basidiomycètes et les *Mucoromycotina* ressortant lors des recherches BLASTP avec un nombre maximum de séquences fixé à 1000.

Une fois l'ensemble des séquences récupérées, j'ai réalisé un alignement MAFFT (Kato et al., 2005) que j'ai affiné manuellement en utilisant Jalview (Waterhouse et al., 2009). Puis j'ai construit un arbre phylogénétique par la méthode du maximum de vraisemblance en

utilisant le logiciel PhyML (paramètres par défaut) (Guindon & Gascuel, 2003). L'arbre ainsi obtenu a été visualisé sur le serveur iTOL (**Figure 32**) (Letunic & Bork, 2007). On remarque tout d'abord que, sauf pour *S. commune*, *R. solani* et *P. graminis*, il n'y a un homologue par espèce. D'autre part, cette phylogénie suit bien celle des champignons, suggérant que GUN2 de *S. cerevisiae* est bien l'orthologue de Rgt1.

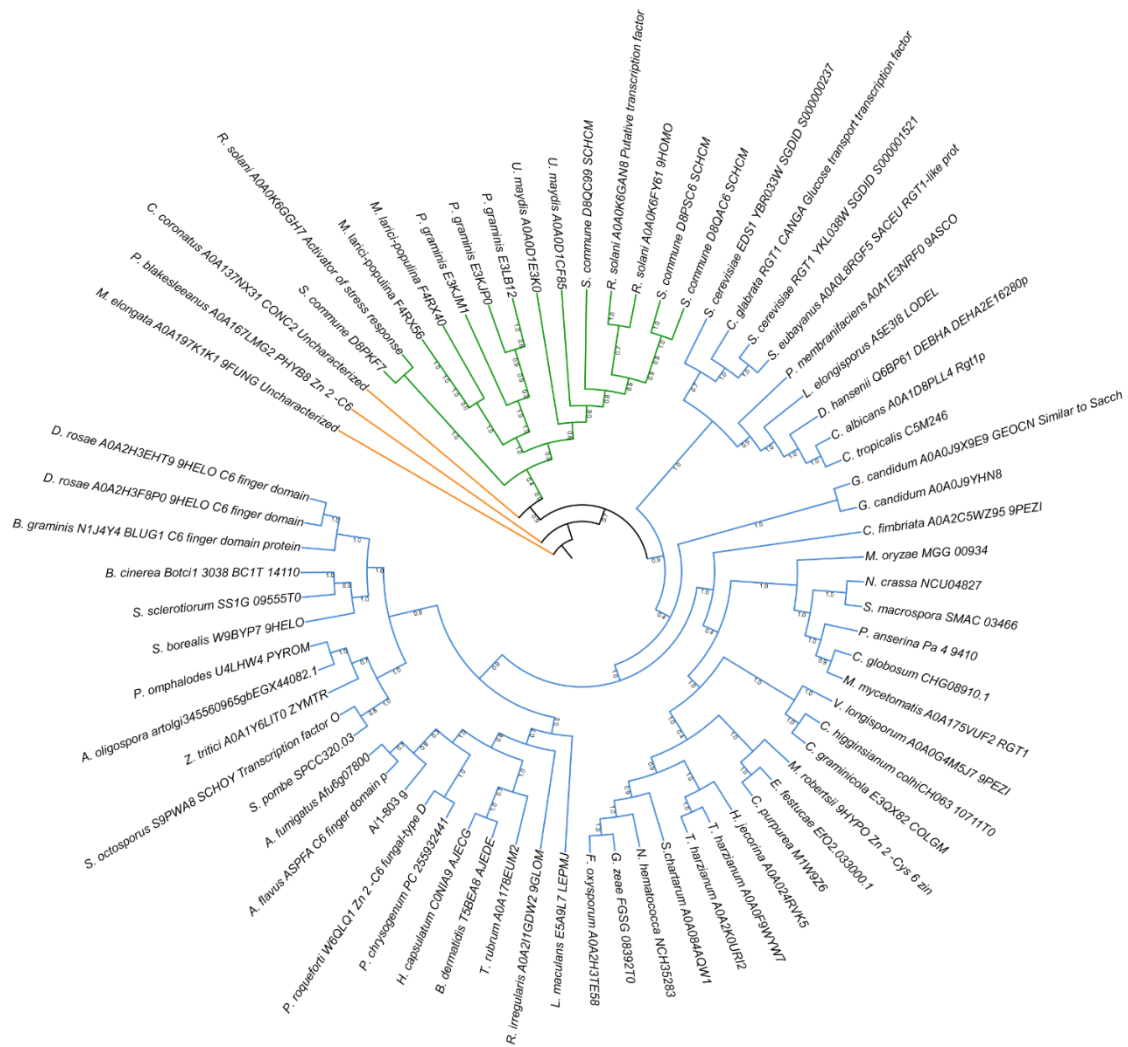


Figure 32 : Arbre phylogénétique PhyML des orthologues de GUN2 chez les ascomycètes, basidiomycètes, *Mucoromycotina* ainsi qu'une espèce d'*Entomophthorales*. Les paralogues y figurent également chez les espèces pour lesquelles ceux-ci ont pu être identifiés.

II- Analyse du mutant $\Delta GUN2$

1. Croissance du mutant $\Delta GUN2$

Comme évoqué précédemment, deux phénotypes ont rapidement pu être mis en évidence : la germination spontanée des ascospores $\Delta GUN2$, ainsi qu'un retard de croissance mycélienne. Je n'avais pas établi si ce retard de croissance observé était un véritable retard dans l'induction de la germination sur milieu G+YE ou si ce retard observé était dû à un ralentissement de la vitesse de croissance que j'ai pu mettre en évidence. Ce retard de croissance a été mesuré sur différents milieux en triplicats : les milieux classiques M2, M3, et les milieux M0+acétate (M0 supplémenté en acétate de sodium, 60 mM) et M0+Acide oléique (M0 supplémenté en acide oléique 6 mM). La composition des milieux M2 et M3 est disponible sur le site : <http://podospora.i2bc.paris-saclay.fr/methods.php#cultivate>. Le milieu M3, enrichi en glucose, a été testé étant donné le lien d'orthologie établi entre *GUN2* et *Rgt1*, tandis que les milieux M0+acétate et M0+Acide oléique ont été testés pour évaluer un éventuel impact de *GUN2* dans la métabolisation de l'acétate et des acides gras, comme *GUN1* (**Figure 33**).

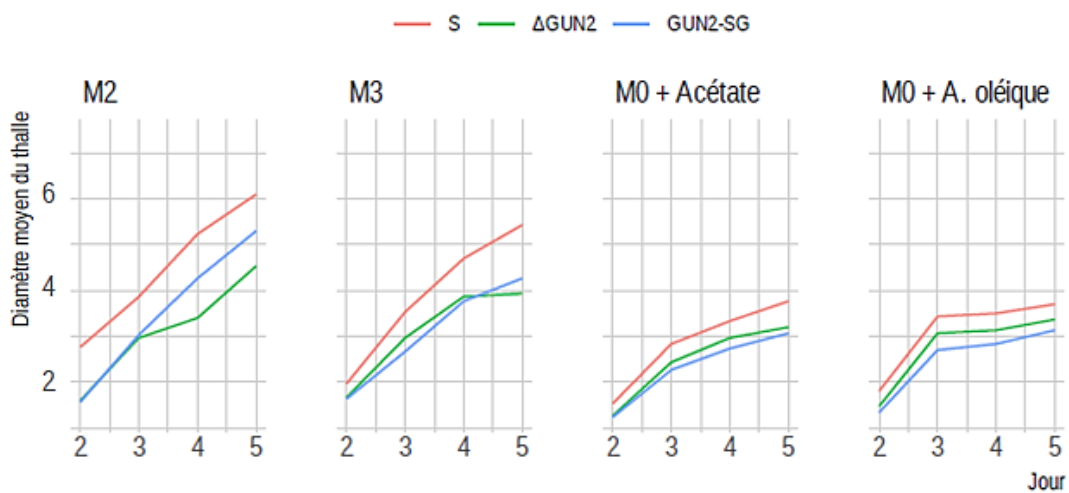


Figure 33 : Courbes de croissance des souches *S*, $\Delta GUN2$ et $GUN2^{SG}$ °C sur milieux M2, M3, M0+Acétate et M0+Acide oléique. Les diamètres des thalles ont été mesurés à partir du 2^{ème} jour de croissance jusqu'au 5^{ème} jour. Le temps est en abscisse (jour) et le diamètre moyen du thalle en ordonnée (cm). Les réplicats biologiques ont été agrégés sous forme de moyenne.

Des statistiques comparatives 2 à 2 des souches pour chaque milieu ont été réalisées et sont disponibles en **Annexe 4**. On constate tout d’abord une chute significative ($p < 0.05$) de la croissance des souches $\Delta GUN2$ et $GUN2^{SG}$ par rapport à la souche *S* sur milieu standard M2. Cette diminution est également visible sur l’ensemble des autres milieux testés mais de manière moins prononcée et non significative statistiquement (**Annexe 4**). Ces tests de croissance montrent aussi que le mutant $GUN2^{SG}$ montre aussi un défaut de croissance similaire à $\Delta GUN2$. Il est important de noter que ces tests de croissance ne permettent pas de mettre en évidence un défaut d’utilisation du glucose par ces deux souches mutantes. De plus, les tests réalisés sur les milieux acétate et acide oléique ne montre pas d’impact de $GUN2$ sur l’utilisation de ces sources de carbone. Par ailleurs, on remarque que la croissance des souches $\Delta GUN2$ et $GUN2^{SG}$ est très similaire sur l’ensemble des milieux.

Cette similarité dans le phénotype de croissance vient s’ajouter à celle du phénotype de germination des ascospores. $GUN2^{SG}$ serait donc un allèle nul de $GUN2$ comme la délétion $\Delta GUN2$. En d’autres termes, les 185 AA absents de $GUN2^{SG}$ sont essentiels à la fonction du facteur de transcription $GUN2$.

2. Etude de l’effet du glucose sur les mutants $\Delta GUN2$ et $GUN2^{SG}$

Le lien d’orthologie entre $GUN2$ et *Rgt1* étant établi, j’ai étudié l’impact du glucose sur les mutants de $GUN2$ dans différents processus cellulaires chez *P. anserina* pour déterminer si les gènes *Rgt1* et $GUN2$ avaient conservé un même rôle dans la réponse au glucose. Dans un premier temps, j’ai évalué l’impact du glucose sur le phénotype de germination spontanée des mutants $\Delta GUN2$ et $GUN2^{SG}$. Pour cela, des croisements homozygotes de ces souches ont été réalisés et les ascospores ont été projetés sur un milieu M3 riche en glucose. Dans les deux cas, les projections ont germé spontanément, démontrant que le glucose ne permet pas de restaurer un phénotype de germination sauvage. Par la suite, un deuxième test a été élaboré consistant à semer des spores issues de ces mêmes croisements homozygotes sur milieu M2 en présence de 20 μ L d’une solution à 2,5%, 5% ou 10% de glucose déposée directement sur les spores semées avec en témoin des spores sauvages issues de la souche *S*. Dans chaque cas, 32 ascospores hétérocaryotiques ont été semées. Les résultats de ces semis sont présentés dans le **Tableau 3**.

Germination Souche	Projections		Sémis (32 spores semées/boîte)			
	M2	M3	M2	M2+20 μ L glucose à 2,5%	M2+20 μ L glucose à 5%	M2+20 μ L glucose à 10%
S	\emptyset	\emptyset	0/32	0/32	0/32	0/32
Δ GUN2	G. S	G. S	11/32	12/32	10/32	10/32
GUN2 ^{SG}	G. S	G. S	14/32	13/32	12/32	13/32

Tableau 3 : Résultat de germination des projections et des semis d'ascospores hétérocaryotiques issues de croisements homozygotes des souches S, Δ GUN2 et GUN2^{SG}. Sur milieux M2 et M3 pour les projections, et M2 sur lequel on a rajouté ou non 20 μ L d'une solution de glucose. Les chiffres correspondent au nombre de spores germées/nombre de spores semées.

G.S : Germination Spontanée

Quelle que soit la concentration de la solution de glucose utilisée, celle-ci n'a pas d'impact sur le taux de germination spontanée, confirmant les résultats observés pour les projections. De plus cette expérience a permis d'estimer le taux de germination spontanée pour le mutant GUN2^{SG} à environ 43%.

D'autre part j'ai voulu évaluer l'effet du glucose sur la formation d'appressoria par *P. anserina*. Un test de pénétration de la cellophane a été réalisé avec les souches S, Δ GUN2 et GUN2^{SG}. Pour ce faire, un implant de chaque souche à tester a été déposé sur une couche de cellophane (BIORAD) disposée sur différents milieux : M0, M2 et M3. Après 2, 3, 4 et 5 jours de croissance à 27°C, la couche de cellophane est retirée pour déterminer si la souche a traversé et poussé sur le milieu situé au-dessous. Ces tests ont été répétés 3 fois en triplicats. Les résultats de ces tests sont résumés dans le **Tableau 4**.

Milieu Nom de la souche	M0	M2	M3
	S	J3	J2
Δ GUN2	\emptyset	J4	J5
GUN2 ^{SG}	J5	J4	J5

Tableau 4 : Résultats des tests de pénétration de la cellophane par les souches S, Δ GUN2 et GUN2^{SG} sur milieux M0, M2 et M3. Les données indiquées dans le tableau correspondent au jour à partir duquel un thalle a pu être observé en-dessous du centre de la feuille de cellophane en la soulevant après lancement de la culture à 27°C. Le symbole \emptyset indique qu'il n'y a pas eu de pénétration même après le 5^{ème} jour.

On remarque tout d'abord une nette différence sur la durée de pénétration requise sur M3 par rapport au M2 et au M0 pour l'ensemble des souches. Ceci suggère un effet inhibiteur du glucose sur la formation de l'appressorium par *P. anserina*. Cet effet inhibiteur avait déjà été observé dans des études précédentes (Brun et al., 2009). D'autre part, on constate un retard de pénétration reproductible des mutants $\Delta GUN2$ et $GUN2^{SG}$ sur M2 par rapport à la souche sauvage. De plus, ce retard est accentué sur M0 pour la souche $\Delta GUN2$ qui ne parvient pas à pénétrer la cellophane en 5 jours. Néanmoins, compte tenu du phénotype de défaut de croissance de ces mutants, il est vraisemblable que le retard de pénétration observé chez les mutants $GUN2$ soit dû à ce retard de croissance et non un défaut de développement de l'appressorium. D'ailleurs, les observations microscopiques réalisées sur ces mutants au cours de leur croissance sur cellophane montrent que ces souches différencient un appressorium, quel que soit le milieu, d'une manière semblable à la souche *S* sauvage (données non montrées). Néanmoins, toutes les souches étudiées percent la cellophane à J5. Ceci suggère que les souches mutantes pour $GUN2$ ne subissent pas l'effet inhibiteur du glucose de la même manière que la souche sauvage. Mais d'une manière générale, ces études ne montrent pas un rôle majeur de $GUN2$ dans la formation de l'appressorium chez *P. anserina*.

Enfin, la fertilité du mutant $\Delta GUN2$ a été comparée à celle de la souche sauvage sur milieux M2 et M3. Pour cela des croisements en hétérocaryon (méthode décrite dans l'introduction, I – 3.) ont été réalisés et la production de périthèces a été évaluée visuellement (**Figure 34**). Après 7 jours d'incubation à la lumière à 27 °C (durée normale pour générer des périthèces pour un croisement de *P. anserina* sur M2) des périthèces sont apparus sur M2 pour la souche sauvage et la souche $\Delta GUN2$, mais pas sur M3 pour la souche $\Delta GUN2$. Ce n'est qu'après 13 jours d'incubation dans ces mêmes conditions que des périthèces sont apparus sur M3 pour le mutant $\Delta GUN2$. Il y a donc un retard net dans la production de périthèces chez le mutant $\Delta GUN2$ spécifiquement sur M3 et ceci n'est pas directement lié au léger défaut de croissance de $\Delta GUN2$ vu que ce retard dans le développement des périthèces n'existe pas sur M2. A noter que pour la souche sauvage comme pour la souche $\Delta GUN2$, la projection d'ascospores par les périthèces matures est comparable (résultats non montrés).

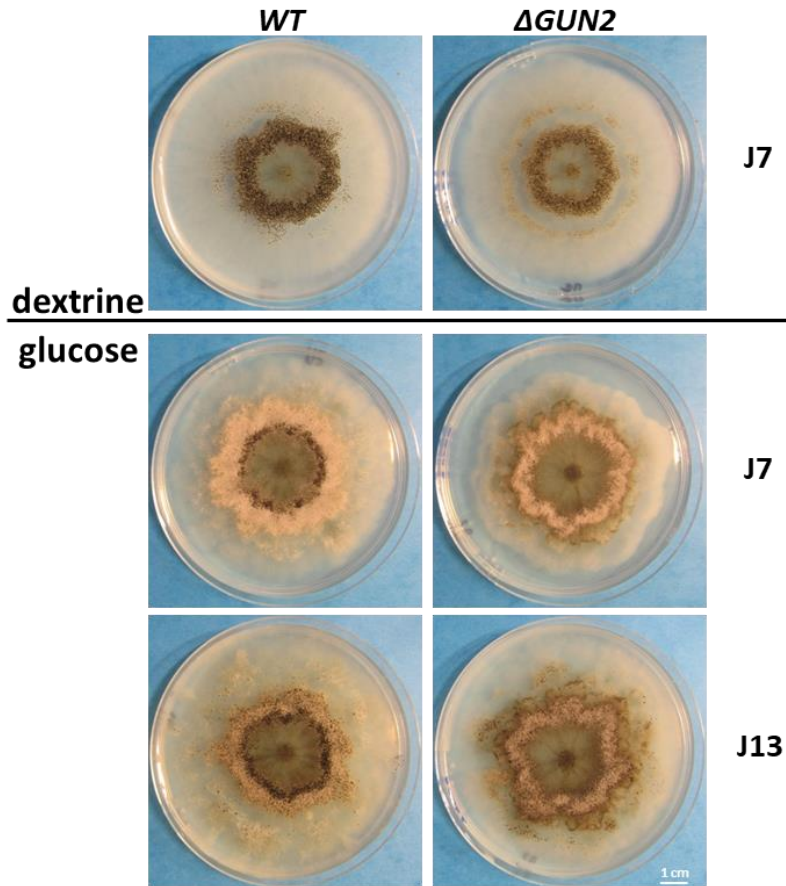


Figure 34 : Fertilité des souches *S* et $\Delta GUN2$ sur milieu M2 (dextrine) et M3 (glucose). Des clichés ont été pris après 7 jours d'incubation à 27 °C pour M2, et après 7 puis 13 jours d'incubation pour M3. Des périthèces sont observés pour le mutant $\Delta GUN2$ à J7 sur M2 et J13 sur M3.

Ces différentes études montrent que la présence de glucose a un effet sur les mutants de *GUN2* différent de son effet sur la souche sauvage ce qui suggère que chez *P. anserina*, *GUN2* a un rôle dans la réponse au glucose. Concernant la formation de l'appressorium, les souches mutantes pour *GUN2* seraient moins sensibles à l'inhibition par le glucose mais concernant la fertilité, le glucose inhiberait (ralentirait) clairement la formation des périthèces.

3. Etudes d'épistasie avec *GUN1*

Il a été précédemment montré que les voies *PaMpk2*, ainsi que celle impliquant *PaNox2* et *PaPls1* jouent un rôle majeur dans le processus de germination des ascospores chez *P. anserina* (Lalucque et al., 2012; Lambou et al., 2008; Malagnac et al., 2004). Or, comme montré dans la **Figure 29**, le mutant $GUN2^{SG}$ ne passerait pas par la phosphorylation de *PaMpk2* pour induire la germination des ascospores, puisque celui-ci montre des niveaux de *PaMpk2* phosphorylés comparables à ceux de la souche sauvage non-induite pour la germination (**Figure 29**). Des études d'épistasie entre le mutant $GUN2^{SG}$ et les mutants

$\Delta PaMpk2$, $\Delta PaPls1$ et $\Delta PaNox2$ seront nécessaires pour établir de manière claire comment ces différents gènes se situent dans la cascade de régulation de la germination des ascospores. Afin d'étudier les liens potentiels entre *GUN2* et *GUN1* dans la régulation de la germination des ascospores, j'ai réalisé une étude d'épistasie entre les différents mutants de *GUN2* et $\Delta GUN1$. Deux croisements ont été effectués à cet effet : $\Delta GUN1 \times GUN2^{SG}$; $\Delta GUN1 \times \Delta GUN2$.

Pour chacun de ces croisements, 42 spores monocaryotiques ont été semées sur milieu M2 et G+YE. Pour chacun de ces deux croisements, aucune spore résistante à l'hygromycine B, et donc porteuse de la mutation $\Delta GUN1$ n'a germé, et ce quel que soit le milieu de semis. J'en ai donc conclu que $\Delta GUN1$ est épistatique sur $\Delta GUN2$ et $GUN2^{SG}$. Ces études établissent que la fonction de *GUN1* est requise pour la germination des ascospores mutants pour *GUN2* ; *GUN1* serait donc en aval de *GUN2* dans la régulation de la germination. Or, au cours de ma thèse, j'ai montré que *GUN1* agit en amont de la voie PaMpk2 et que le mutant $GUN1^{SG}$ induirait la germination spontanée des ascospores en activant la phosphorylation de PaMpk2. Ces deux données étant contradictoires, les études d'épistasie mentionnées plus haut (avec $\Delta PaMpk2$, $\Delta PaPls1$ et $\Delta PaNox2$) apparaissent essentielles pour ordonner l'ensemble de ces acteurs dans la cascade de régulation des ascospores.

III - Analyse du transcriptome de la souche sauvage *S* et de la souche $\Delta GUN2$ au cours de la germination des ascospores

Dans le but de mieux caractériser l'action du facteur de transcription codé par *GUN2* dans la régulation de la germination des ascospores chez *P. anserina*, j'ai réalisé une étude transcriptomique par RNAseq au cours de ce processus. Pour cette étude j'ai comparé l'expression différentielle des gènes dans les ascospores des souches *S* et $\Delta GUN2$ en condition de germination induite ou non. Il est important de préciser que les résultats présentés dans cette partie sont préliminaires. Dans cette partie de ma thèse, j'expose les méthodes qui nous ont permis d'obtenir les expressions différentielles des gènes dans les différentes conditions étudiées, j'expose les méthodes bio-informatiques mises en place pour l'analyse des transcriptomes dans les différentes conditions mais l'analyse détaillée de ce transcriptome, les interprétations biologiques de ces transcriptomes en ce qui concerne la germination chez la

souche sauvage et la souche mutante $\Delta GUN2$ sont en cours, ce qui explique que je ne rentre pas en détails dans l'interprétation de ces premiers résultats.

1. Protocole d'extraction des ARN

Pour ce faire, des croisements homozygotes de la souche sauvage et de la souche $\Delta GUN2$ ont été lancés en hétérocaryon (méthode décrite dans l'introduction, I – 3.) (12 boîtes/souche). Une fois arrivée à maturité, chaque boîte de croisement a été mise à projeter face à un couvercle d'agar recouvert d'une feuille de cellophane lissée pour faciliter la récolte des ascospores à la spatule par la suite. Lorsque les croisements commencent à expulser leurs spores, les couvercles d'agar sont déposés pour la nuit sur les croisements de sorte à avoir une durée d'expulsion de spores de 14 heures pour chaque. Au bout de ces 14 heures, les couvercles sont retirés, et pour la moitié de ces couvercles (6 couvercles/souche), la feuille de cellophane est transférée pendant 6 heures sur milieu G+YE à 27°C pour induire la germination des ascospores. Pendant ce temps, les 6 couvercles « non induits » sont laissés à 27°C pour rester dans des conditions physiologiques similaires. Au terme de ces 6 heures, les ascospores de chaque couvercle sont récoltées et réparties selon leur génotype et leur état d'induction dans 4 tubes : S , S_i , $\Delta GUN2$, et $\Delta GUN2_i$, contenant respectivement les ascospores sauvages non induites, les ascospores sauvages induites, les ascospores $\Delta GUN2$ non-induites, et les ascospores $\Delta GUN2$ induites (**Figure 35**). Chaque tube renferme ainsi à cet instant, l'équivalent de 6 couvercles d'ascospores. Une fois les spores récoltées dans les tubes, ceux-ci sont placés immédiatement dans de l'azote liquide puis conservés à -80 °C.

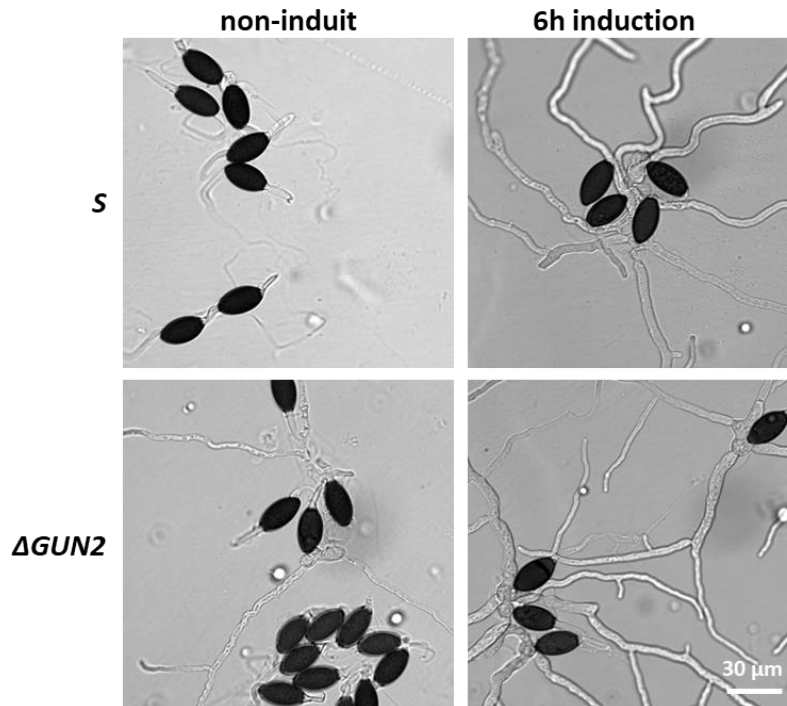


Figure 35 : Morphologie des ascospores *S* et $\Delta GUN2$ après 6 heures d'induction de germination sur milieu G+YE ou non. Les ascospores non induites ont quant à elles été laissées pendant la même période de temps sur couvercle d'agar. Barre d'échelle 30 μm .

Les croisements expulsant de grandes quantités d'ascospores pendant 4 jours, cette opération a été répétée 4 fois. Les spores ainsi récoltées chaque jour sont placées dans le même tube correspondant, initialement stocké à -80°C , et qui est conservé dans la carbo-glace pendant la récolte. Après chaque rajout de spores dans ces tubes, ceux-ci sont immédiatement recongelés dans de l'azote liquide puis restockés à -80°C . A la fin de la semaine, ces 4 tubes contiennent ainsi l'équivalent de 4 X 6 couvercles d'ascospores du génotype correspondant. Cette opération de récolte d'ascospores a été répliquée 3 fois afin d'obtenir 4 réplicats biologiques. Une fois les spores récoltées, celles-ci ont été broyées à froid (-80°C) par une bille de tungstène à l'aide du Tissue Lyser II (QIAGEN). Leurs ARN ont ensuite été extraits en suivant le protocole du kit RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) avec l'étape à la DNase pour éliminer l'ADN contaminant des extraits.

La qualité des extraits a été évaluée par mesure des rapports 260/230 et 260/280 par dosage au Nanodrop (ThermoFischer), ainsi que par dépôt de 3 μL d'extrait sur un gel d'Agarose 1%. Ces ARN extraits ont aussi été évalués par la plateforme de l'I2BC (CNRS, Université Paris-Saclay) qui a réalisé le séquençage des extraits et l'analyse différentielle entre les différentes conditions (**Annexe 5**).

2. Description de l'échantillon

Avec l'aide de Christophe Lalanne, ingénieur bio-statisticien et bio-informaticien de notre laboratoire, j'ai débuté l'analyse des résultats de l'expression différentielle des gènes au cours de la germination chez la souche sauvage et la souche $\Delta GUN2$. La base d'analyse est constituée des statistiques d'expression des 11196 gènes, de fonction connue ou non. La version du génome de *P. anserina* qui a été utilisée est celle issue du séquençage initial de *P. anserina* (Espagne et al., 2008) et régulièrement ré-annotée de manière experte par P. Silar au laboratoire. La version utilisée datait de la fin de l'année 2019. A ces données d'expression s'ajoutent les données d'annotation obtenues pour ces gènes à l'aide du logiciel Blast2Go. Au total, 2810 gènes ne possèdent pas d'annotation par termes GO. On distingue 4 conditions expérimentales au total : *S* induit vs. *S* non-induit (condition 1) ; $\Delta GUN2$ non induit vs. *S* non induit (condition 2) ; $\Delta GUN2$ induit vs. $\Delta GUN2$ non induit (condition 3) ; $\Delta GUN2$ induit vs. *S* induit (condition 4) (**Figure 36**). Pour l'analyse différentielle de l'expression des gènes, nous avons fixé le seuil de sur-expression des gènes à partir d'un Fold Change (FC) ≥ 2 , et celui de répression des gènes à partir d'un FC ≤ 0.5 . Nos analyses différentielles nous permettent de comparer deux conditions permettant l'induction de la germination : par le milieu d'induction G+YE (condition 1) et par l'absence de *GUN2* (condition 2).

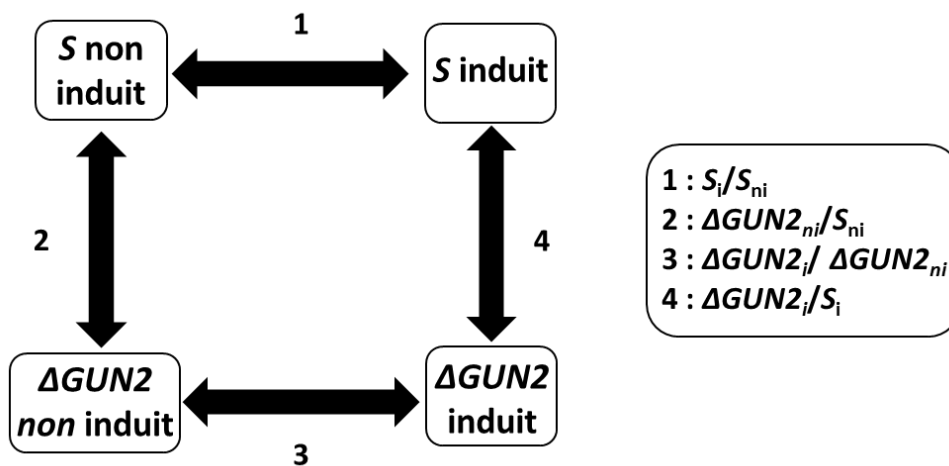


Figure 36 : Schéma représentatif des conditions d'intérêt étudiées dans l'analyse des résultats du RNAseq. Les numéros correspondent à ceux attribués aux conditions décrites plus haut. Le cadre à droite résume comment les conditions ont été comparées pour déterminer le FC.

La condition 1 met en évidence les gènes différentiellement exprimés par la méthode classique d'induction de la germination au laboratoire sur milieu G+ YE.

La condition 2 nous permet de connaître les gènes dont la dérégulation due à l'absence de GUN2 entraîne la germination.

La condition 3 révèle les gènes dérégulés au cours de l'incubation des ascospores sur milieu G+ YE mais pas forcément les gènes dont la dérégulation est liée directement à la germination puisque la germination a déjà commencé en l'absence de *GUN2*. Ceci a été vérifié en observant des germinations spontanées sur les projections des croisement $\Delta GUN2$ (**Figure 35**).

La condition 4 nous indique quant à elle, sur milieu G+YE, les gènes régulés (de manière directe ou indirecte) par *GUN2*, que l'on peut comparer avec les cibles de *GUN2* en conditions non-induites.

La distribution des gènes sur- ($FC \geq 2$) et sous-exprimés ($FC \leq 0.5$), pour chaque condition et en considérant un seuil de significativité de 1 % est présenté dans la **Figure 37**. Une première observation rapide des résultats nous permet de relever plusieurs points. Tout d'abord, l'induction de la germination par le milieu G+YE (condition 1) entraîne plus de surexpressions de gènes (2008 gènes) que de répression (1594 gènes). Ceci montre que la mise en route des activités métaboliques de l'ascospore provoquée par la levée de la dormance passe globalement plus par la surexpression des gènes que par leur inhibition.

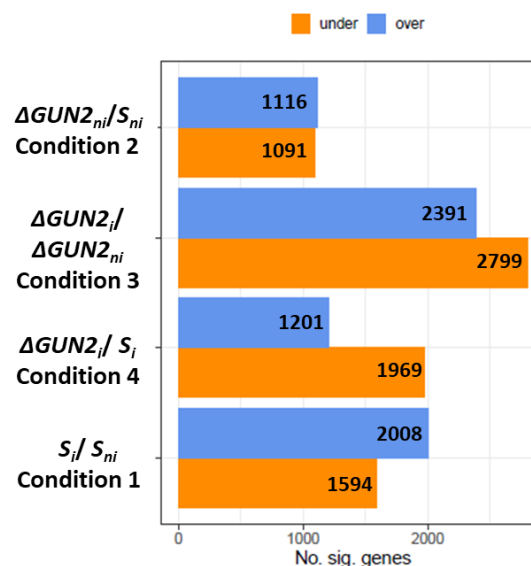


Figure 37 : Statistiques d'expression des gènes issus de l'analyse RNAseq. Le nombre de gènes sur- (over) et sous- (under) exprimés sont représentés par les histogrammes bleus et orange, respectivement pour chaque condition.

Cette différence n'est pas aussi marquée lorsque l'on compare l'effet de l'absence de *GUN2* en condition non induite (condition 2). Pour rappel, il y a induction de la germination dans ces conditions pour la souche Δ *GUN2*. On constate qu'il y a presque autant de gènes réprimés dans la souche Δ *GUN2* que de gènes sur-exprimés par rapport à la souche *S* (~1100 gènes). Autrement dit, l'absence de *GUN2* provoque aussi bien la répression de l'expression des gènes que son activation lors de la levée de la dormance. Ceci souligne que l'absence de *GUN2* induit une fine dérégulation transcriptionnelle conduisant à la germination spontanée des ascospores. En revanche, après induction de la germination par le milieu G+YE, l'absence de *GUN2* entraîne l'activation de certains gènes (1201) mais surtout, la répression d'un nombre nettement plus important par rapport à la souche sauvage (1969 gènes), suggérant que globalement, *GUN2* joue un rôle d'activateur pour l'expression de ces gènes lorsque *P. anserina* pousse sur milieu G+YE (condition 4). Ce rôle « d'activateur » est aussi souligné par le fait qu'on retrouve plus de gènes sous-exprimés chez Δ *GUN2* induit (2799) que de sur-exprimés (2391) par rapport à Δ *GUN2* non-induit (condition 3).

Dans un premier temps, mon objectif principal est de distinguer les gènes induits dans les ascospores sauvages et ceux induits grâce à l'absence de *GUN2* et observés lors des deux types de germination (gènes communs aux conditions 1 et 2 avec un FC ≥ 2), et ceux dont la répression est observée, au cours des deux types de germination (gènes communs avec un FC ≤ 0.5). Toutefois, l'analyse des gènes situés à l'intersection d'autres conditions peut nous fournir la réponse à d'autres questions. Par exemple, l'analyse des gènes à l'intersection entre les conditions 2 et 4 nous permet de distinguer les gènes pour lesquels *GUN2* est un inhibiteur (FC ≥ 2 dans les deux cas), de ceux pour lesquels *GUN2* est un activateur (FC ≤ 0.5 dans les deux cas) quel que soit le milieu de culture. A ce stade de l'analyse du transcriptome, je vais présenter nos premiers résultats d'analyses d'enrichissement.

3. Analyses d'enrichissement

Afin de déterminer si parmi les gènes différentiellement exprimés, certaines catégories fonctionnelles sont sur-représentées, nous avons réalisé une analyse d'enrichissement pour les différentes conditions de 1 à 4. Pour l'analyse d'enrichissement, on considère la catégorie Biological Process (BP) et les critères d'inclusion suivants pour les gènes : FC ≥ 2 (en valeur absolue) et $p < 0.01$. Cette analyse d'enrichissement identifie donc les gènes sur- et sous-

exprimés. L'analyse statistique a été réalisée avec le package topGO, à l'aide de deux méthodes : une simple et une dite pondérée (Alexa et al., 2006). La première méthode appelée « elim » est une méthode simple qui consiste à retirer de manière itérative les gènes mappés aux termes GO significatifs des termes GO plus généraux (d'ordre supérieur) et une pondérée pour traiter la structure de graphique des termes GO. Dans la deuxième méthode, les gènes annotés à un terme GO se voient attribués une pondération basée sur les scores des termes GO avoisinants (Alexa et al., 2006). Le test utilisé pour l'enrichissement est un test de Kolomogorv-Smirnov pour données continues. Dans notre cas, ces données correspondent aux scores des gènes basés sur les p-valeurs de l'expression différentielle, estimées lors de l'analyse des transcrits. Les résultats bruts obtenus pour les 30 premiers termes GO les plus significatifs sont représentés dans les **Tableaux 5-8** (classés selon l'analyse pondérée, colonne « weight »). Les colonnes « Annotated » et « Significant » désignent, respectivement, le nombre de gènes annotés et le nombre de gènes significatifs pris individuellement.

Condition 1 : S_i / S_{ni}

GO.ID	Term	Annotated	Significant	Expected	classic	weight
GO:0042254	ribosome biogenesis	104	104	94.46	1.8e-06	1.8e-06
GO:0016070	RNA metabolic process	330	313	299.72	0.0169	4.1e-06
GO:0006520	cellular amino acid metabolic process	108	103	98.09	1.9e-05	1.9e-05
GO:0006412	translation	155	153	140.78	6.1e-05	6.1e-05
GO:0042221	response to chemical	37	35	33.61	0.0030	0.0030
GO:0006996	organelle organization	113	109	102.63	0.0017	0.0091
GO:0006950	response to stress	68	66	61.76	0.0200	0.0121
GO:0007049	cell cycle	43	41	39.06	0.0142	0.0193
GO:0050789	regulation of biological process	144	132	130.79	0.8444	0.0473
GO:0032502	developmental process	20	18	18.17	0.0488	0.0488
GO:0007010	cytoskeleton organization	19	19	17.26	0.0511	0.0511
GO:0006457	protein folding	12	12	10.90	0.0575	0.0575
GO:0006629	lipid metabolic process	119	111	108.08	0.0585	0.0585
GO:0045333	cellular respiration	24	24	21.80	0.0905	0.0905
GO:0016192	vesicle-mediated transport	27	27	24.52	0.0905	0.0905
GO:0009404	toxin metabolic process	8	7	7.27	0.0974	0.0974
GO:0000910	cytokinesis	5	5	4.54	0.1014	0.1014
GO:0006796	phosphate-containing compound metabolic ...	26	19	23.61	0.9995	0.1394
GO:0006464	cellular protein modification process	102	94	92.64	0.6345	0.2026
GO:0009058	biosynthetic process	324	304	294.28	0.2295	0.2080
GO:0019752	carboxylic acid metabolic process	109	104	99.00	1.1e-05	0.2181
GO:0006810	transport	346	311	314.26	0.4042	0.2188
GO:1901575	organic substance catabolic process	20	19	18.17	0.7734	0.2246
GO:0043412	macromolecule modification	103	95	93.55	0.6218	0.2516
GO:0044260	cellular macromolecule metabolic process	448	421	406.90	0.1481	0.2583
GO:0051641	cellular localization	5	5	4.54	0.3375	0.3375
GO:0032774	RNA biosynthetic process	161	147	146.23	0.9635	0.3571
GO:0034654	nucleobase-containing compound biosynthe...	162	148	147.14	0.9627	0.3580
GO:0019748	secondary metabolic process	14	12	12.72	0.1651	0.4631
GO:0019725	cellular homeostasis	24	23	21.80	0.4829	0.4829

Tableau 5 : Enrichissement pour les 30 premiers termes GO dans la condition 1.**Condition 2 : $\Delta GUN2_{ni} / S_{ni}$**

GO.ID	Term	Annotated	Significant	Expected	classic	weight
GO:0019725	cellular homeostasis	5	5	4.56	0.0068	0.0068
GO:0042254	ribosome biogenesis	9	9	8.21	0.0123	0.0123
GO:0006412	translation	7	7	6.38	0.0297	0.0297
GO:0042221	response to chemical	9	9	8.21	0.0414	0.0414
GO:0050789	regulation of biological process	14	12	12.77	0.3626	0.0428
GO:0006520	cellular amino acid metabolic process	17	17	15.50	0.0962	0.0962
GO:0016070	RNA metabolic process	35	31	31.92	0.9396	0.1550
GO:0006996	organelle organization	14	14	12.77	0.2217	0.2217
GO:0005975	carbohydrate metabolic process	21	20	19.15	0.2248	0.2248
GO:0006950	response to stress	12	12	10.94	0.2342	0.2342
GO:0019752	carboxylic acid metabolic process	18	18	16.41	0.0727	0.2680
GO:0019538	protein metabolic process	22	19	20.06	0.7915	0.3252
GO:0006091	generation of precursor metabolites and ...	6	5	5.47	0.5455	0.4345
GO:0007049	cell cycle	5	5	4.56	0.4549	0.4549
GO:0006629	lipid metabolic process	17	15	15.50	0.6618	0.6618
GO:0044267	cellular protein metabolic process	21	18	19.15	0.8436	0.7126
GO:0006810	transport	59	55	53.80	0.7285	0.7285
GO:0009987	cellular process	102	91	93.01	0.4914	0.7563
GO:0090304	nucleic acid metabolic process	37	33	33.74	0.9771	0.7685
GO:0045333	cellular respiration	5	4	4.56	0.7820	0.7820
GO:0006351	transcription, DNA-templated	16	12	14.59	0.8138	0.8138
GO:0044281	small molecule metabolic process	21	20	19.15	0.0917	0.8320
GO:0044260	cellular macromolecule metabolic process	39	32	35.56	0.9697	0.8434
GO:0044085	cellular component biogenesis	10	10	9.12	0.0453	0.8674
GO:0008152	metabolic process	128	114	116.72	0.9581	0.8901
GO:0044237	cellular metabolic process	79	70	72.04	0.7929	0.9680
GO:0050896	response to stimulus	17	16	15.50	0.2077	0.9741
GO:0050794	regulation of cellular process	7	5	6.38	0.9775	0.9775
GO:1901564	organonitrogen compound metabolic proces...	38	34	34.65	0.4374	0.9842
GO:0043170	macromolecule metabolic process	56	49	51.07	0.9885	0.9886

Tableau 6 : Enrichissement pour les 30 premiers termes GO dans la condition 2.

Condition 3 : $\Delta GUN2_i / \Delta GUN2_{ni}$

GO.ID	Term	Annotated	Significant	Expected	classic	weight
GO:0006520	cellular amino acid metabolic process	50	50	47.01	0.0005	0.0005
GO:0006629	lipid metabolic process	53	50	49.84	0.0025	0.0025
GO:0042221	response to chemical	20	20	18.81	0.0129	0.0129
GO:0030163	protein catabolic process	11	11	10.34	0.0447	0.0447
GO:0006996	organelle organization	34	33	31.97	0.2792	0.0509
GO:0050789	regulation of biological process	44	40	41.37	0.6429	0.0935
GO:0006464	cellular protein modification process	41	39	38.55	0.5185	0.1008
GO:0006950	response to stress	34	34	31.97	0.1076	0.1076
GO:0016192	vesicle-mediated transport	12	12	11.28	0.1220	0.1220
GO:1901575	organic substance catabolic process	12	12	11.28	0.0219	0.1442
GO:0019752	carboxylic acid metabolic process	51	51	47.96	0.0003	0.1459
GO:0019538	protein metabolic process	76	73	71.46	0.2340	0.1542
GO:0016070	RNA metabolic process	97	89	91.21	0.7105	0.1642
GO:0006796	phosphate-containing compound metabolic ...	12	10	11.28	0.7815	0.1741
GO:0044249	cellular biosynthetic process	80	71	75.22	0.9129	0.1771
GO:1901576	organic substance biosynthetic process	80	71	75.22	0.9129	0.1771
GO:0019725	cellular homeostasis	12	12	11.28	0.1783	0.1783
GO:0006259	DNA metabolic process	18	18	16.93	0.1854	0.1854
GO:0007049	cell cycle	17	17	15.99	0.2468	0.2468
GO:0006412	translation	28	27	26.33	0.2479	0.2479
GO:0006457	protein folding	5	5	4.70	0.3083	0.3083
GO:1901566	organonitrogen compound biosynthetic pro...	29	28	27.27	0.2245	0.3177
GO:0018130	heterocycle biosynthetic process	51	43	47.96	0.9806	0.3183
GO:0019438	aromatic compound biosynthetic process	51	43	47.96	0.9806	0.3183
GO:1901362	organic cyclic compound biosynthetic pro...	51	43	47.96	0.9806	0.3183
GO:0044271	cellular nitrogen compound biosynthetic ...	79	70	74.28	0.9319	0.3235
GO:0005975	carbohydrate metabolic process	64	60	60.18	0.3380	0.3380
GO:0042254	ribosome biogenesis	16	16	15.04	0.3552	0.3552
GO:0006766	vitamin metabolic process	5	5	4.70	0.3753	0.3753
GO:0009404	toxin metabolic process	5	5	4.70	0.4597	0.4597

Tableau 7 : Enrichissement pour les 30 premiers termes GO dans la condition 3.**Condition 4 : $\Delta GUN2_i / S_i$**

GO.ID	Term	Annotated	Significant	Expected	classic	weight
GO:0006520	cellular amino acid metabolic process	53	52	48.04	0.00082	0.00082
GO:0016070	RNA metabolic process	108	101	97.89	0.59350	0.00564
GO:0016192	vesicle-mediated transport	12	12	10.88	0.01691	0.01691
GO:0030163	protein catabolic process	11	11	9.97	0.01873	0.01873
GO:0006457	protein folding	5	5	4.53	0.02698	0.02698
GO:0006629	lipid metabolic process	58	55	52.57	0.02986	0.02986
GO:0006412	translation	33	33	29.91	0.03151	0.03151
GO:0042221	response to chemical	21	21	19.03	0.05602	0.05602
GO:0006950	response to stress	34	34	30.82	0.06084	0.06084
GO:0007165	signal transduction	13	12	11.78	0.09028	0.09028
GO:0042254	ribosome biogenesis	17	17	15.41	0.10134	0.10134
GO:0050789	regulation of biological process	49	45	44.41	0.52364	0.10354
GO:0006810	transport	155	138	140.49	0.10587	0.11186
GO:1901575	organic substance catabolic process	12	12	10.88	0.00897	0.13574
GO:0019752	carboxylic acid metabolic process	54	53	48.95	0.00066	0.13577
GO:0006091	generation of precursor metabolites and ...	11	8	9.97	0.33770	0.15648
GO:0006796	phosphate-containing compound metabolic ...	13	9	11.78	0.72866	0.16023
GO:0044249	cellular biosynthetic process	95	88	86.11	0.66472	0.16187
GO:1901576	organic substance biosynthetic process	95	88	86.11	0.66472	0.16187
GO:0006766	vitamin metabolic process	7	7	6.34	0.20572	0.20572
GO:0006996	organelle organization	39	36	35.35	0.26375	0.21197
GO:1901566	organonitrogen compound biosynthetic pro...	34	34	30.82	0.02665	0.22051
GO:0018130	heterocycle biosynthetic process	61	54	55.29	0.83140	0.22242
GO:0019438	aromatic compound biosynthetic process	61	54	55.29	0.83140	0.22242
GO:1901362	organic cyclic compound biosynthetic pro...	61	54	55.29	0.83140	0.22242
GO:0044271	cellular nitrogen compound biosynthetic ...	94	87	85.20	0.66945	0.22562
GO:0051716	cellular response to stimulus	16	15	14.50	0.07385	0.24246
GO:0007049	cell cycle	18	17	16.32	0.24390	0.24390
GO:0006464	cellular protein modification process	44	40	39.88	0.47367	0.25397
GO:0009404	toxin metabolic process	5	4	4.53	0.26657	0.26657

Tableau 8 : Enrichissement pour les 30 premiers termes GO dans la condition 4.

La condition 1 réunit 131 termes GO, le graphique des termes GO associés inclut 528 termes GO et 1048 relations entre ces termes. La condition 2 réunit 49 termes GO, le graphique des termes GO associés inclut 222 termes GO et 435 relations entre ces termes. La condition 3 réunit 68 termes GO, le graphique des termes GO associés inclut 290 termes GO et 562 relations entre ces termes, et finalement un total de 603 gènes est annoté. La condition 4 réunit 72 termes GO, le graphique des termes GO associés inclut 315 termes GO et 609 relations entre ces termes.

Pour interpréter ces résultats préliminaires, nous nous sommes concentrés sur deux axes principaux d'analyse : i) Quels sont les gènes différentiellement régulés au cours de la germination induite par le milieu G+YE ? ; ii) Quels sont les gènes régulés (directement et indirectement) par *GUN2* ? La réponse à ces deux questions nous permettra, en comparant les conditions entre elles de connaître les gènes impliqués dans la régulation de la germination des ascospores. Pour y répondre, nous avons donc scindé l'analyse des conditions pour répondre spécifiquement à ces questions. Il est important de noter que l'analyse d'enrichissement apporte une vue « grossière », puisqu'elle nous fournit des catégories fonctionnelles de gènes. Des analyses ultérieures plus détaillées permettront d'apporter des réponses à l'échelle du gène.

a. Les gènes différentiellement régulés au cours de la germination induite par le milieu G+YE

La réponse à cette question nous est fournie principalement par l'analyse des résultats de la condition 1 : S_i/S_{ni} . Afin de mieux visualiser les résultats de l'analyse d'enrichissement, nous les avons représentés sous forme graphique en indiquant le nombre de gènes associés aux différents termes GO mis en évidence dans l'analyse d'enrichissement de deux façons différentes : soit de manière lexicographique, en incluant tous les termes GO afin de faciliter la comparaison entre les conditions), soit par fréquence décroissante (en supprimant les termes GO de poids nuls). Cette analyse a aussi été réitérée, mais en restreignant cette fois la base de données aux 100 gènes les plus sur-exprimés ou sous-exprimés de l'analyse RNAseq. Pour mieux interpréter les résultats de cette condition en juxtaposant les graphiques triés pour l'ensemble des gènes et pour les 100 gènes les plus significatifs (**Figure 38**).

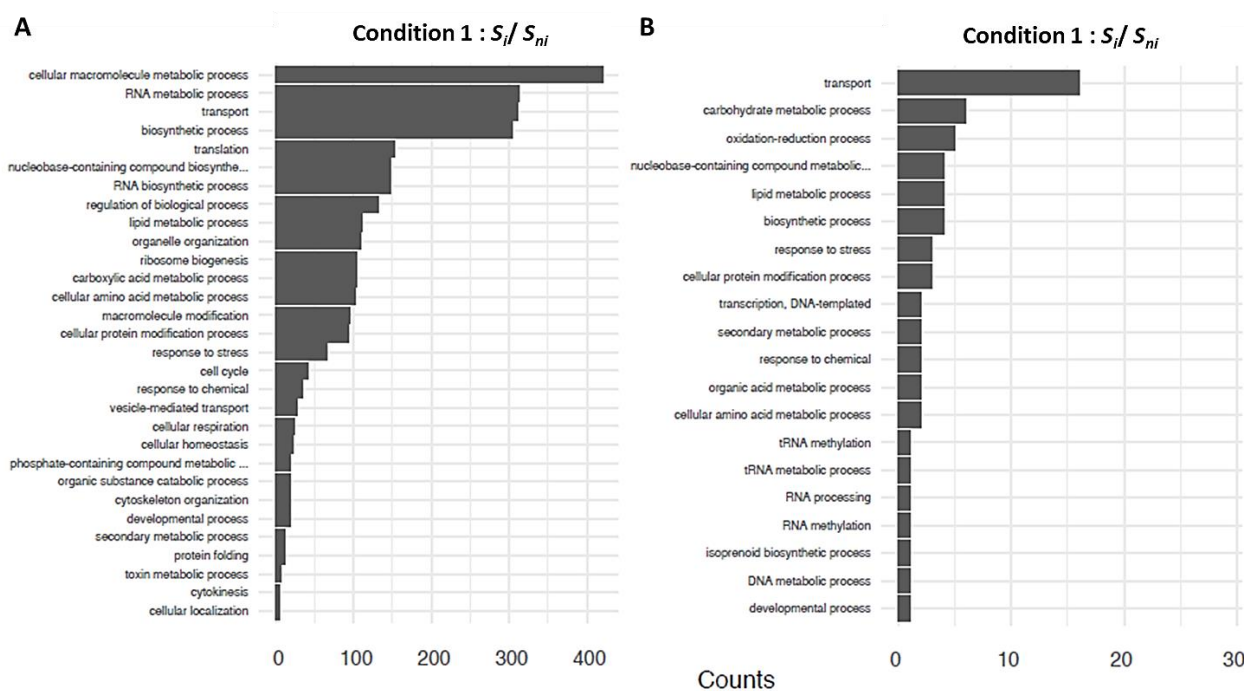


Figure 38 : GO termes enrichis triés par fréquence décroissante pour la condition 1 S_i/S_{ni} .

A : Enrichissement pour l'ensemble des gènes significatifs ($|FC| \geq 2$).

B : Enrichissement pour les 100 gènes les plus significatifs.

L'enrichissement sur l'ensemble des gènes montre une régulation globale de nombreux processus métaboliques (biosynthèse protéique, métabolisme des ARN, des acides aminés, etc.), de la biosynthèse de ribosomes, des mécanismes de transport cellulaires, de la respiration cellulaire ainsi que de gènes impliqués dans le cycle cellulaire. Ces catégories fonctionnelles sont cohérentes avec la reprise des activités métaboliques de la spore engendrée par la levée de la dormance induite par l'exposition au milieu G+YE. On note également la régulation de gènes impliqués dans la réponse au stress. En effet, la germination marque la transition de l'ascospore, une forme de résistance, vers le mycélium végétatif.

L'étude des gènes les plus significatifs montre une forte régulation des gènes impliqués dans le transport intracellulaire. En effet, bien qu'aucun papier ne montre clairement l'état inerte des ascospores dormantes, on peut supposer que celles-ci se trouvent dans un état « figé » à l'instar des spores bactériennes, indiquant de ce fait une absence peut être totale de communications entre les compartiments subcellulaires. En deuxième lieu, on note une forte régulation du métabolisme des glucides. On peut faire ici le parallèle avec l'utilisation des sucres de réserves tels que le tréhalose, observée immédiatement après l'induction de la germination des ascospores de *N. crassa* (Sussman, 1961).

Dans le cas de *P. anserina*, il serait intéressant d'étudier la composition des éventuelles réserves glucidiques de ses ascospores pour confirmer le parallèle. On remarque ensuite une régulation des processus d'oxydo-réduction. Ici, on peut faire le lien avec l'action de *PaNox2* dans la germination (Malagnac et al., 2004a). Cela confirme ainsi l'importance de la balance redox dans la germination. Enfin, d'une manière intéressante, on note une forte régulation des gènes du métabolisme des lipides, faisant écho aux résultats observés concernant *GUN1* dans le chapitre précédent.

b. Les gènes différentiellement régulés au cours de la germination induite par l'absence de *GUN2*

Pour identifier les gènes dérégulés au cours de la germination induite par l'absence de *GUN2*, il nous faut étudier la condition 2. Ces gènes qui pourraient être régulés directement ou indirectement par *GUN2*, subissent une régulation transcriptionnelle au cours de la germination des ascospores de manière indépendante à l'induction par le milieu G+YE. De la même façon que pour la condition 1, par soucis de clarté, je vais présenter les résultats juxtaposant les graphiques triés pour l'ensemble des gènes et pour les 100 gènes les plus significatifs de cette condition (**Figure 39**). En analysant le graphique de l'ensemble des gènes, on retrouve tout d'abord les observations faites pour la **Figure 37**, montrant que *GUN2* régule un plus faible nombre de gènes (~2200) que l'induction de la germination par G+YE (~3600). Néanmoins, on retrouve des catégories fonctionnelles assez similaires à celles observées pour la condition 1, bien qu'en moindre proportion : régulation de divers processus métaboliques, du transport cellulaire.

En revanche, l'analyse des gènes les plus significatifs révèle des catégories différentes par rapport à la condition 1. En effet on constate que les deux premières catégories sont les processus biologiques et métaboliques. Ceci atteste du fait que l'induction de la germination spontanée des ascospores est causée par la dérégulation de ces différents processus liée à l'absence de *GUN2*. Ce facteur de transcription régulerait ainsi des processus biologiques et métaboliques clés dans le processus de germination des ascospores de *P. anserina*.

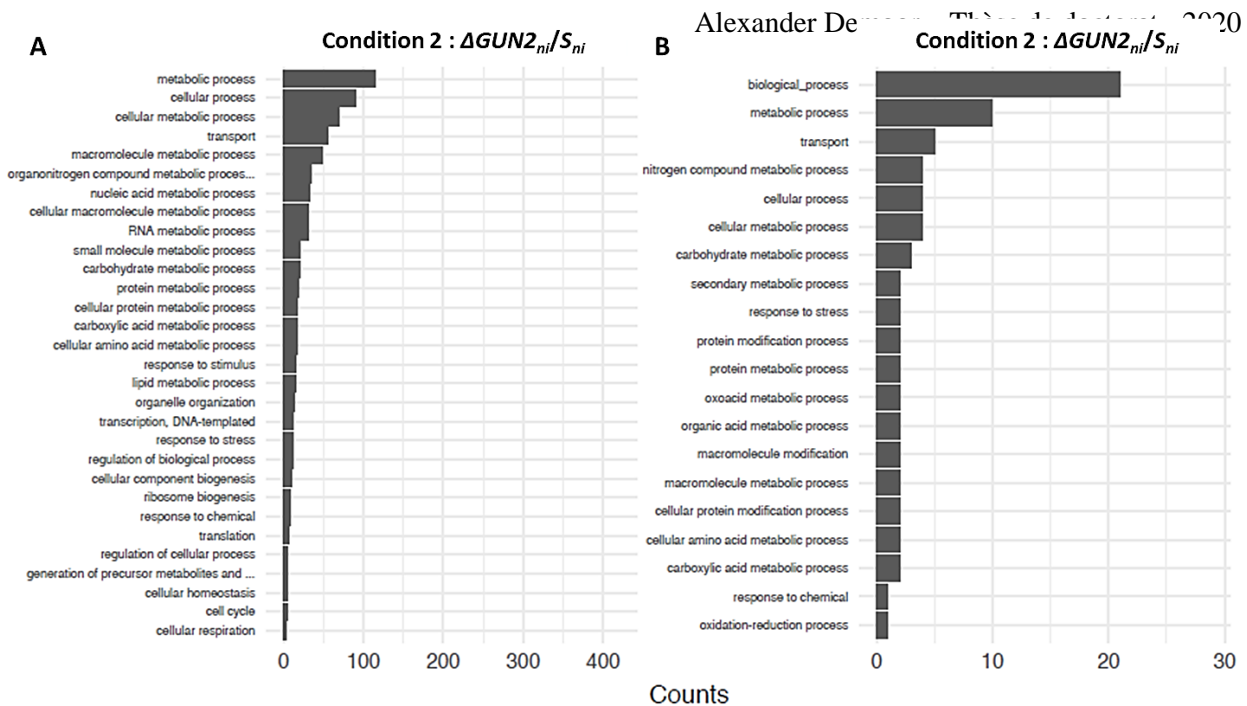


Figure 39 : GO termes enrichis triés par fréquence décroissante pour la condition 2 $\Delta GUN2_{ni}/S_{ni}$.

A : Enrichissement pour l'ensemble des gènes significatifs ($FC \geq 2$).

B : Enrichissement pour les 100 gènes les plus significatifs.

Parmi les catégories les plus fortement régulées, on retrouve encore le transport cellulaire, attestant de son importance dans la germination des ascospores. On retrouve aussi le métabolisme des glucides parmi les catégories fortement régulées, suggérant que *GUN2* régule peut-être à l'utilisation des sucres de réserve marquant l'initiation de la germination. L'étude des conditions 3 et 4 va de pair, et permet de compléter l'étude des gènes régulés par *GUN2* et de comparer ceux régulés par *GUN2* à ceux régulés par le milieu G+YE (**Figures 40 et 41**). En effet, la condition 3 traduit l'impact de l'exposition d'une souche $\Delta GUN2$ au milieu G+YE, qui dans le cas du mutant $\Delta GUN2$, a essentiellement un rôle nutritif mais plus véritablement de rôle inducteur de la germination. En comparant cette condition à la condition 2, on constate que l'exposition au G+YE induit une forte régulation des processus biologiques ainsi que des transports cellulaires ainsi que de certains métabolismes tels que celui des glucides ou des composés azotés. Des résultats similaires sont observés dans la condition 4, à l'exception des résultats sur l'ensemble des gènes, où l'on constate que la différence majeure entre la souche $\Delta GUN2_i$ et S_i réside dans les transports cellulaires. Afin de distinguer les gènes sur-exprimés des gènes réprimés au cours de la germination, régulés de manière commune par l'absence de *GUN2* et par l'induction de la germination par le milieu G+YE, nous avons trié les gènes avec un $FC \geq 2$ retrouvés à l'intersection des conditions 1 et 2 d'une part, et les gènes avec un $FC \leq 0,5$ à l'intersection ces deux mêmes conditions d'autre part (**Figures 42 et 43**).

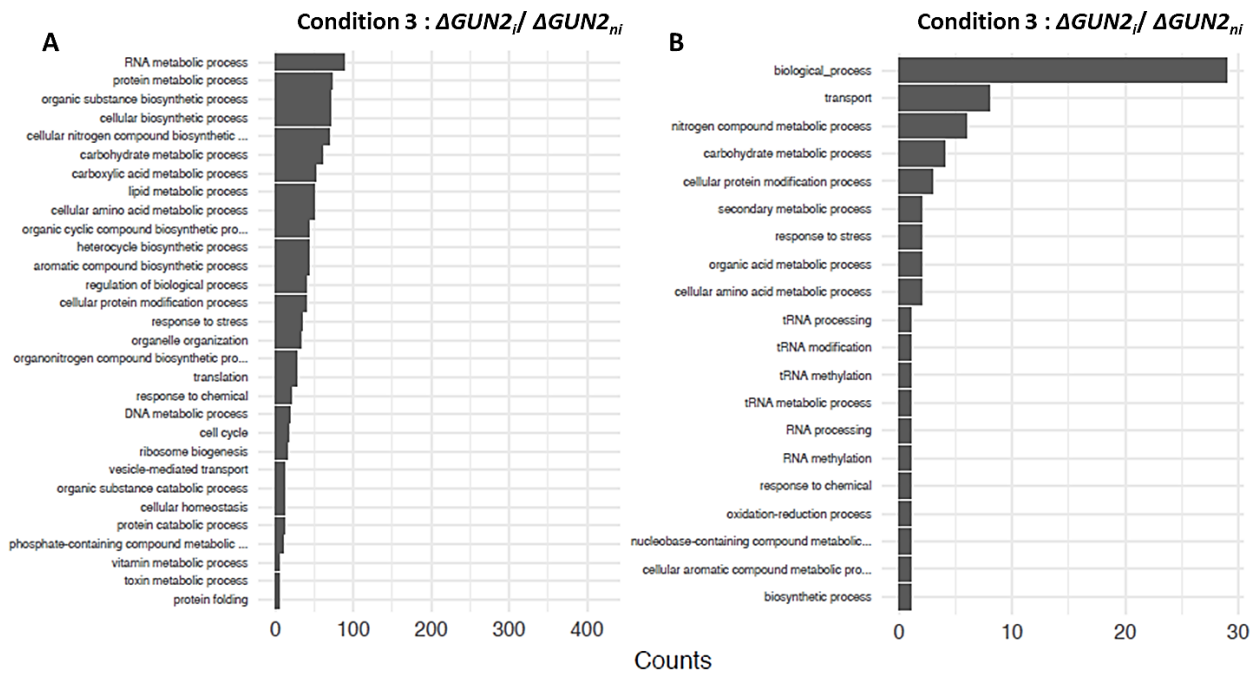


Figure 40 : GO termes enrichis triés par fréquence décroissante pour la condition 3 $\Delta GUN2_i / \Delta GUN2_{ni}$.

A : Enrichissement pour l'ensemble des gènes significatifs ($|FC| \geq 2$).

B : Enrichissement pour les 100 gènes les plus significatifs.

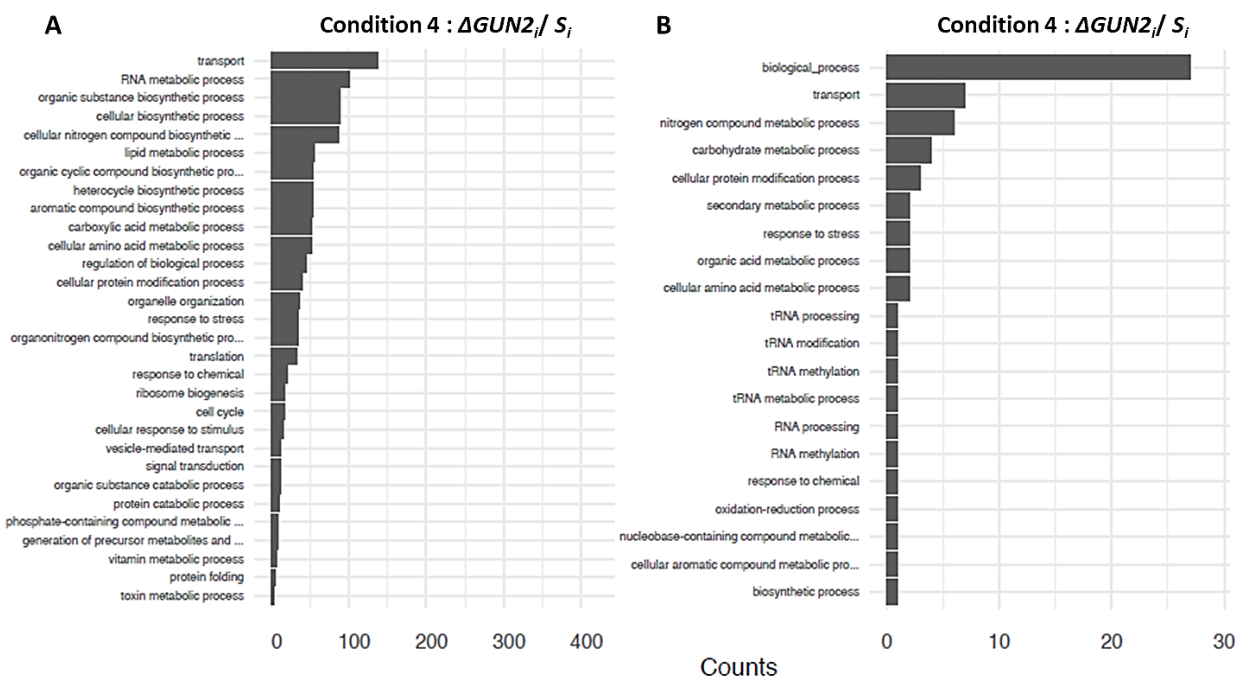


Figure 41 : GO termes enrichis triés par fréquence décroissante pour la condition 4 $\Delta GUN2_i / S_i$.

A : Enrichissement pour l'ensemble des gènes significatifs ($|FC| \geq 2$).

B : Enrichissement pour les 100 gènes les plus significatifs.

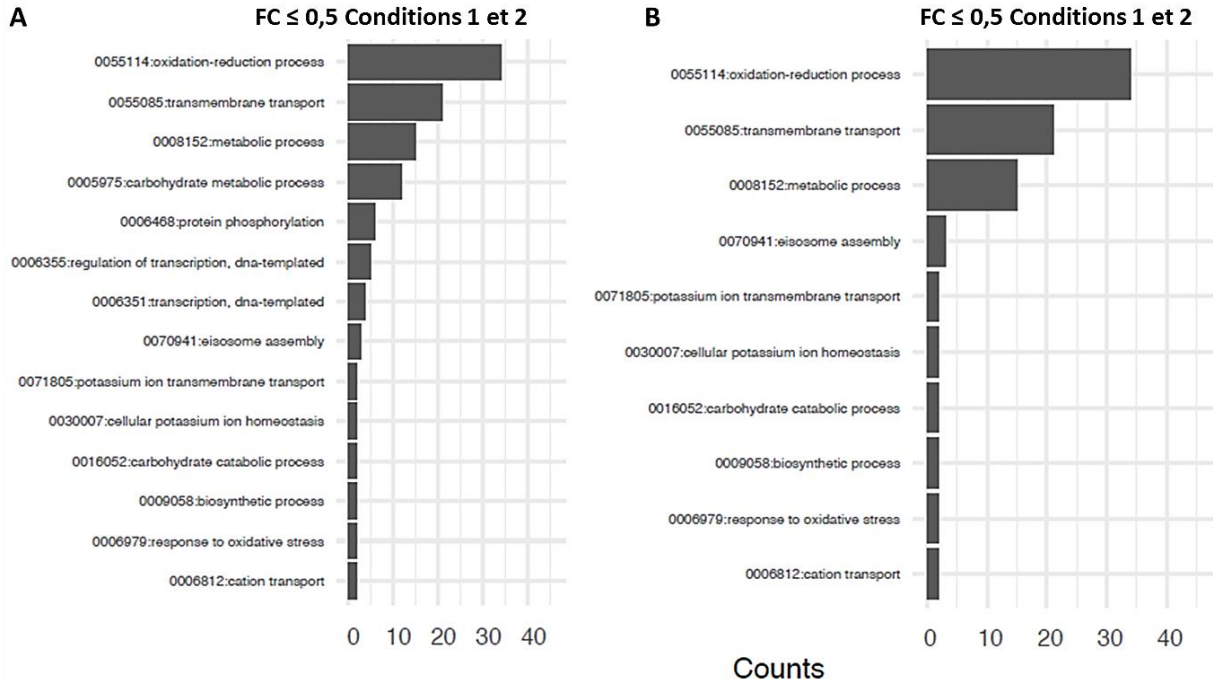


Figure 42 : GO termes enrichis triés par fréquence décroissante pour les gènes réprimés à la fois pour les conditions 1 et 2.

A : Enrichissement pour l'ensemble des gènes significatifs.

B : Enrichissement pour les 100 gènes les plus significatifs.

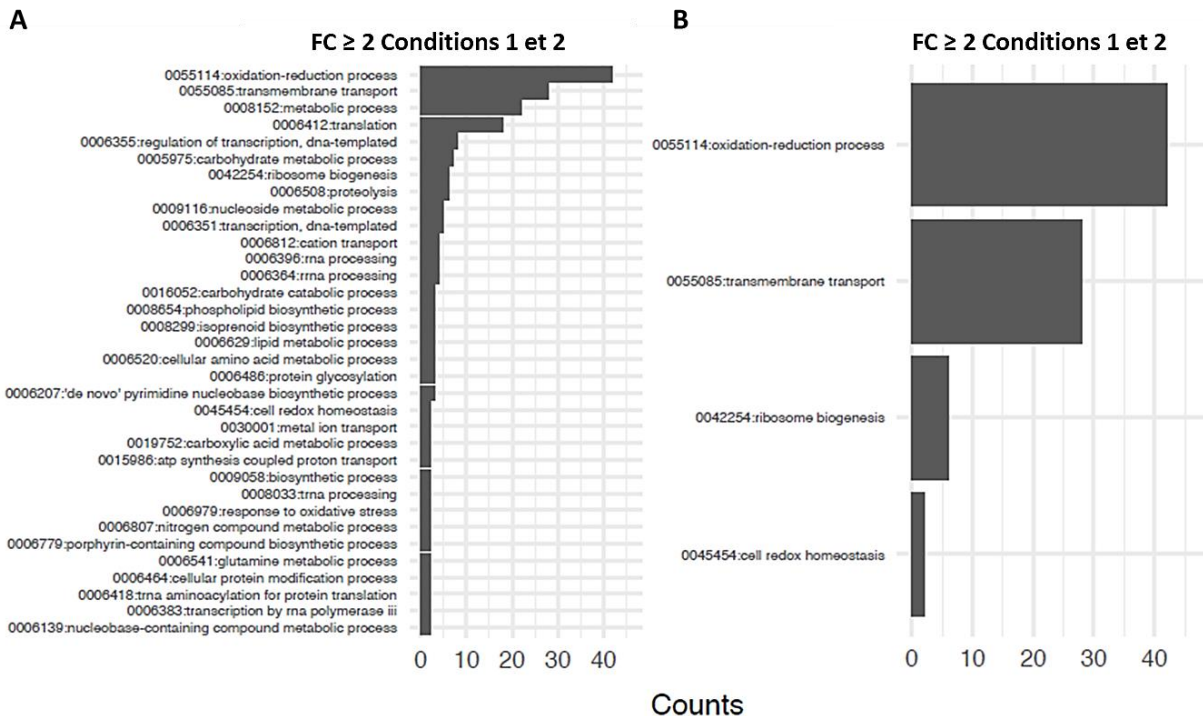


Figure 43 : GO termes enrichis triés par fréquence décroissante pour les gènes sur-exprimés à la fois pour les conditions 1 et 2.

A : Enrichissement pour l'ensemble des gènes significatifs.

B : Enrichissement pour les 100 gènes les plus significatifs.

Il est d'abord intéressant de noter que l'on retrouve aussi bien sur-exprimés que sous-exprimés des processus d'oxydo-réduction, des systèmes de transport transmembranaires ainsi que des processus métaboliques tels que le métabolisme des glucides. Ces résultats attestent que la germination des ascospores requiert une régulation métabolique fine pour s'opérer correctement et mettent en lumière la nécessité de pousser nos analyses au niveau des gènes pris individuellement pour tenter de comprendre cette régulation fine. La **Figure 44** permet de mieux représenter le contraste entre les GO termes ressortant pour les gènes sur-exprimés et ceux réprimés dans les conditions 1 et 2.

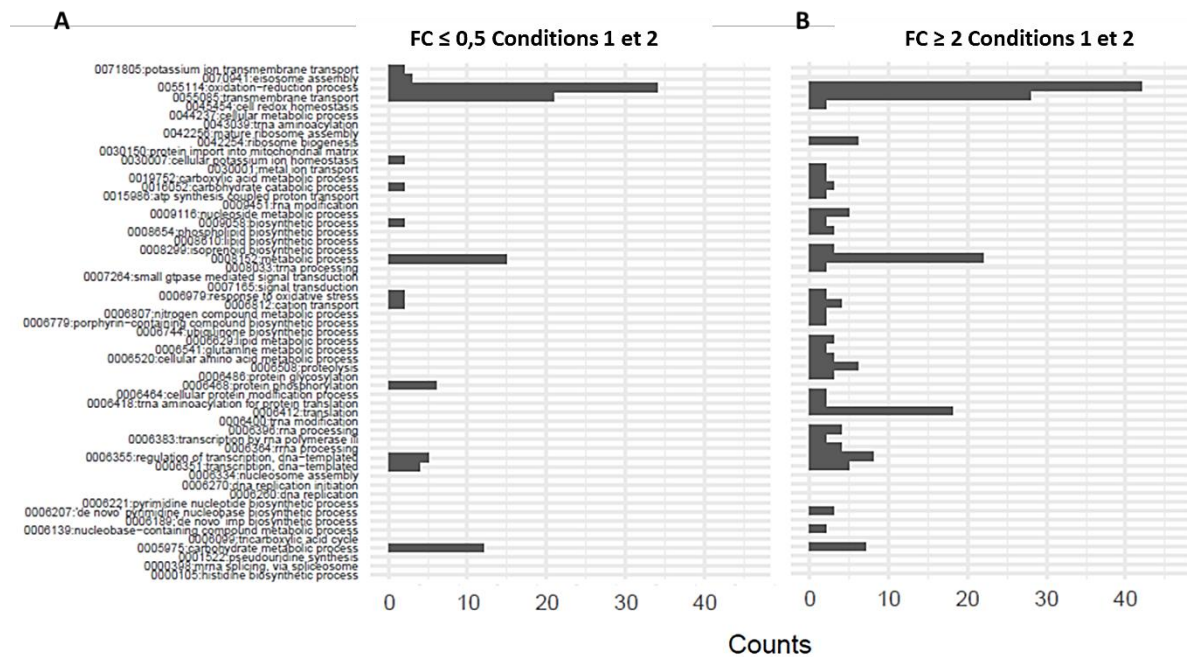


Figure 44 : Comparaison des GO termes des gènes sur-exprimés à la fois pour les conditions 1 et 2 et des gènes réprimés à la fois pour les conditions 1 et 2

A : GO termes des gènes réprimés à la fois dans la condition 1 et 2.

B : GO termes des gènes sur-exprimés à la fois dans la condition 1 et 2.

Sans faire la liste exhaustive des processus biologiques enrichis dans les conditions analysées, grâce à cette représentation, on se rend compte que l'absence de *GUN2* d'une part, et l'exposition au milieu G+YE d'autre part induisent tous deux la germination des ascospores en réprimant le transport d'ions potassium et son homéostasie, et la phosphorylation de protéines, tandis qu'ils activent la biosynthèse des ribosomes, certains processus métaboliques tels que celui de l'acide carboxylique.

Ainsi l'étude des premières données dégagées de ce transcriptome apporte des pistes prometteuses qui pourront permettre à terme d'élucider le mode de fonctionnement de *GUN2* dans la germination. Néanmoins je rappelle ici que l'ensemble des résultats présentés ci-dessus demeurent préliminaires, et ne permettent pas d'établir de modèle pour l'instant. Dans la suite de ces analyses, il conviendra de poursuivre l'étude de ce transcriptome à l'échelle du gène et plus seulement des catégories fonctionnelles.

c. Analyse experte de l'expression des gènes impliqués ou potentiellement impliqués dans la germination des ascospores

En plus de ces analyses du transcriptome qui devraient permettre à terme d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la régulation de la germination des ascospores de *P. anserina*, j'ai voulu connaître la régulation de l'expression d'un certain nombre de gènes présentant un lien avec la régulation de la germination (**Annexe 6**). Pour cela nous avons établi une liste de gènes « candidats » à étudier qui comprend : des gènes déjà connus comme impliqués dans la régulation de la germination des ascospores chez *P. anserina* : *PaNox2*, *PaNoxR*, *PaPls1*, *PaMpk2*, etc. ; les gènes en relation avec cette première catégorie : *PaNox1*, *PaMpk1*, *PaMpk3*, etc. ; les orthologues de gènes connus chez d'autres espèces comme liés à ces premiers gènes ; et les orthologues des régulateurs du développement de l'appressorium de *M. oryzae*. Pour ces orthologues, la méthode rapide que j'ai utilisée est celle du BLASTP (comparaisons des séquences protéiques) « best-best hit ».

L'analyse de l'expression de ces gènes candidats dans les différentes conditions, mais principalement dans les conditions 1 et 2, nous permettra de déterminer lesquels subissent une régulation transcriptionnelle au cours de la germination. Cette analyse permettra d'avoir une vision, au niveau transcriptionnel, de l'implication de grandes voies de régulation conservées (comme la voie Nox1, Nox2, Mpk2/Pmk1/Fus3, la voie RAS/AMPc/PKA, la voie des GPCR, la voie de la PKC, les septines, etc) dans le contrôle de la germination des ascospores chez *P. anserina*.

4. Recherche des séquences de fixation de GUN2 à l'ADN

Les séquences de fixation de Rgt1, l'orthologue de GUN2 chez *S. cerevisiae* sont connues. Le motif qui peut se retrouver répété dans le promoteur des gènes régulés par Rgt1 est CGGANNA. Dans le but d'identifier les séquences consensus de fixation en amont des gènes régulés par GUN2, nous avons eu deux approches : i) nous avons identifié la présence des séquences connues de fixation de Rgt1 CGGANNA en amont des gènes (de -300 à -2000 pb) et ii) nous avons cherché quelles séquences consensus d'une taille comparable (10 pb) se retrouvent en amont d'un nombre de gènes potentiellement cibles de GUN2 toujours entre -300 et -2000pb en amont de ces gènes. Nous avons réalisé des analyses bio-informatiques sur les gènes dont l'expression varie selon les critères les seuils fixés dans les différentes conditions. Dans un premier temps, nous avons recherché la séquence consensus CGGANNA identifiée chez *S. cerevisiae* (MacIsaac et al., 2006) en amont des gènes dérégulés dans chaque condition. Afin de trouver cette séquence sur les deux brins, nous avons aussi recherché la séquence complémentaire TNNTCCG par c-REDUCE (Kechris and Li, 2008) Les résultats de cette recherche ont été synthétisés dans le **Tableau 9**.

count	CGGANNA (+)	TNNTCCG (+)	CGGANNA (-)	TNNTCCG (-)
0	4868	4767	5988	5860
1	1274	1278	1658	1577
2	952	963	1004	1168
3-11	649	735	759	804

Tableau 9 : Nombre de gènes sur (+) ou sous (-) (mêmes seuils de FC que précédemment) exprimés en fonction du nombre de sites de fixation présents en amont des gènes (en lignes).

Nous n'avons pas observé une abondance supérieure de ces séquences consensus en amont en condition 1 comme en condition 2. Ceci n'est pas surprenant puisqu'il est très probable que la plupart des gènes dérégulés dans ces deux conditions ne sont pas des cibles directes de GUN2.

Par ailleurs, une recherche conduite en utilisant le logiciel MEME (Bailey et al., 2015) a été réalisée afin de trouver des motifs sur-représentés en amont d'une liste de gènes restreinte, des gènes potentiellement cibles de GUN2. Nous avons choisi arbitrairement les gènes réprimés au cours de la germination et qui seraient inhibés par GUN2. Pour cela, nous avons

sélectionné les gènes sur-exprimés dans les conditions 2 et 4 (*ΔGUN2* induit et non-induit), mais réprimés dans la condition 1 ($FC \geq 2$ dans les conditions 2 et 4 et $FC \leq 0.5$ dans la condition 1) (**Figure 45**). Nous aurions tout autant pu sélectionner les gènes « activés par *GUN2* au cours de la germination » et sélectionner les gènes sous-exprimés dans les conditions 2 et 4 et surexprimés dans la condition 1.

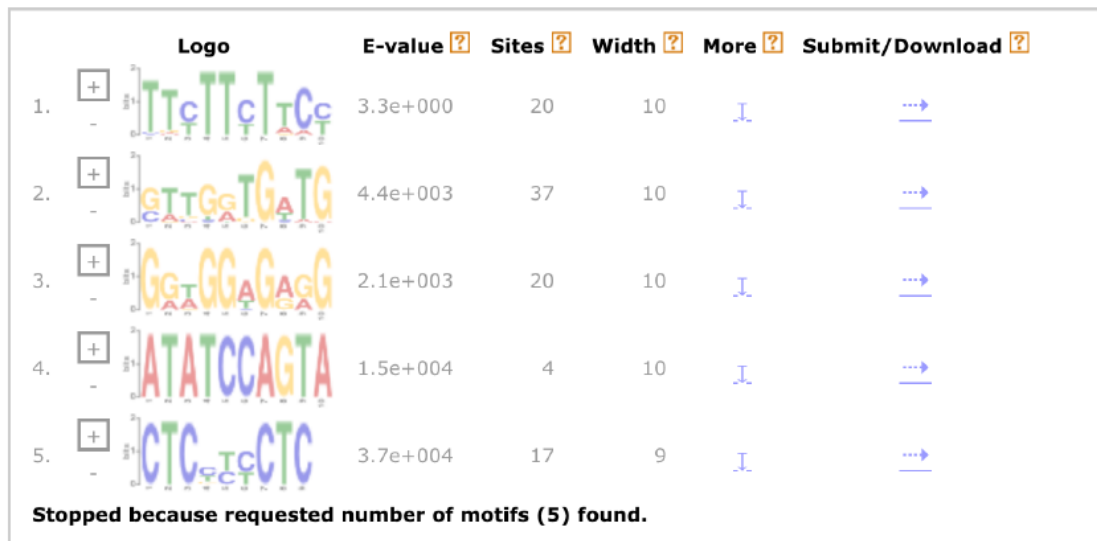


Figure 45 : Sorties du logiciel MEME des 5 motifs les plus retrouvés parmi les gènes sélectionnés.

17 gènes correspondent à ces critères de recherche. Parmi eux, seuls *Pa_5_2930*, *Pa_7_11250* disposent d'une annotation fonctionnelle : *Pa_5_2930* code un transporteur du glucose de haute affinité, et *Pa_7_11250* code une maltose perméase. Il est intéressant de noter que ces deux gènes ont un rapport avec le transport du glucose ou de son dimère le maltose et pourraient être des cibles directes de *GUN2*.

De plus, une recherche conduite sur ces 17 gènes en utilisant le logiciel Fimo (<http://meme-suite.org/doc/fimo.html>) a permis de montrer l'ensemble de ces gènes possède la séquence consensus CGGANNA au sein de leur promoteur sur le brin sens ou antisens au moins en 3 exemplaires (**Tableau 10**). Ces résultats suggèrent fortement que ces 17 gènes sont des cibles directement régulées par *GUN2*, et que la séquence CGGANNA est vraisemblablement une des séquences cibles de fixation de *GUN2*. Conduire une recherche avec ces motifs nous permettra ainsi d'identifier des potentielles cibles directes de *GUN2*.

Nom du gène	Fréquence de la séquence
<i>Pa_1_11180</i>	7
<i>Pa_1_12610</i>	7
<i>Pa_1_18290</i>	6
<i>Pa_1_19000</i>	10
<i>Pa_1_7285</i>	4
<i>Pa_1_7580</i>	8
<i>Pa_2_11600</i>	4
<i>Pa_2_11850</i>	10
<i>Pa_4_5300</i>	4
<i>Pa_5_11390</i>	4
<i>Pa_5_11880</i>	12
<i>Pa_5_12500</i>	8
<i>Pa_5_1990</i>	9
<i>Pa_5_2930</i>	3
<i>Pa_7_11250</i>	5
<i>Pa_7_1580</i>	7
<i>Pa_7_932</i>	7

Tableau 10 : Occurrences des séquences CGGANNA (sur le brin sens et antisens) parmi les promoteurs des 17 gènes sur-exprimés dans les conditions 2 et 4 mais réprimés dans la condition 1.

Chapitre IV : Etudes physiologiques et cytologiques de la germination des ascospores chez *P. anserina*

Un des objectifs de ma thèse a été de caractériser la cytologie du processus de germination et de la mise en place de l'appressorium. Pour la germination en particulier, nous cherchons à connaître à terme la localisation, les mouvements des protéines d'intérêt et des organelles, les changements d'organisation de la cellule qui conduisent à la formation du pore et de la bulle de germination ainsi que les conditions physiologiques précises conduisant à la levée de la dormance de ces ascospores. Ainsi au niveau physiologique, nous avons exploré les différents stimuli permettant d'induire la germination des ascospores sauvages de *P. anserina* en conditions de laboratoire, afin de mieux cerner toutes les composantes du stimulus permettant la levée de la dormance. Sur le plan cytologique, nous voulons déterminer si la formation du pore de germination qui se met en place à travers la paroi mélanisée de l'ascospore de *P. anserina* se fait d'une manière similaire à la mise en place du pore de pénétration de l'appressorium de *M. oryzae* lui aussi mélanisé. En effet, comme évoqué dans l'introduction, suite à une cascade de régulation (**Figure 16**), il y a polymérisation d'un anneau de septines autour de ce qui sera le futur pore de pénétration de l'appressorium de *M. oryzae*, indispensable à la polymérisation d'un réseau d'actine. Cette restructuration du cytosquelette serait nécessaire à la solidification du pourtour du pore afin que ce dernier résiste physiquement à la pression de turgescence qui s'applique sur ce pore à l'extrusion du peg de pénétration (Dagdas et al., 2012; Ryder et al., 2013, 2019). Sans revenir sur le détail des éléments de régulation et autres éléments du cytosquelette qui sont impliqués dans la formation de l'anneau de septines, les études chez *M. oryzae* ont montré le rôle fondamental de la signalisation Nox (et les ERO qu'ils produisent) par les protéines NoxA et NoxB dans la formation de l'anneau de septines et d'actine au niveau du pore de pénétration. Afin d'établir un éventuel parallèle entre la formation du pore de l'appressorium et du pore de germination, j'ai entrepris le marquage des septines PaSpn2 et PaCdc3, ainsi que de l'actine à travers le reporter LifeAct et de la protéine PaNox2 (NoxB), centrale dans cette signalisation. L'ensemble des observations microscopiques présentées a été réalisé à l'aide un microscope inversé plein champ Leica DMI6000; sCMOS camera; LED EL6000 ; à la plateforme d'imagerie de l'université Paris Diderot, ImagoSeine : <https://imagoSeine.ijm.fr/676/accueil.html>. Les photos sont analysées

avec le logiciel gratuit Fiji (Schindelin et al., 2012). Au cours de ma thèse, je n'ai pas pu mener à terme le marquage de PaNox2. Je ne mentionnerai donc dans ce manuscrit que la stratégie de marquage que nous avons adopté et débuté.

I - Etudes physiologiques de la germination des ascospores

Pour mieux caractériser le processus de germination des ascospores, il convient aussi d'étudier les modalités de sa réalisation. Je me suis en particulier intéressé à différents stimuli induisant la germination ainsi qu'au rôle de la pression osmotique dans la germination.

1. Rôle du Bacto peptone et de l'acétate d'ammonium

Afin d'induire la germination des ascospores en condition de laboratoire, nous utilisons des milieux composés notamment de Bacto peptoneTM (Thermo Fisher scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis) un produit de digestion enzymatique d'origine animale de protéines bovines et porcines qui constitue une source importante d'azote, d'acides aminés et de composants complexes non déterminés par le fabricant et d'acétate d'ammonium ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) (6 g.L^{-1}). Pour mieux comprendre l'impact de ces constituants dans l'induction de la germination des ascospores, nous avons réalisé des tests de germination d'ascospores sauvages sur différents milieux.

Dans un premier temps, j'ai testé l'impact de l'acétate d'ammonium sur la germination, et plus spécifiquement vérifier si c'est la combinaison de l'ion acétate CH_3COO^- et de l'ion ammonium NH_4^+ qui est nécessaire à la germination ou si c'est l'un ou l'autre de ces deux ions qui est nécessaire, indépendamment de la présence de l'autre. Pour cela, j'ai élaboré différents milieux de germination avec l'aide de Sylvie Cangemi, assistante technicienne au laboratoire créant ainsi 8 conditions : avec ou sans acétate d'ammonium ; en remplaçant l'acétate CH_3COO^- par l'ion chlorure Cl^- ; en remplaçant l'ammonium NH_4^+ par l'ion sodium Na^+ , et pour chacune des conditions précédentes, en supplémentant ou non le milieu avec de l'extrait de levure (YE). J'ai ainsi semé 2 fois 40 ascospores hétérocaryotiques issues d'un croisement

homozygote de la souche *S* sur chacun de ces milieux. Les résultats de ces semis sont résumés dans le **Tableau 11**.

Eau Milli-Q	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacto peptone TM	+	+	+	+	+	+	+	+
Extrait de levure (YE)					+	+	+	+
CH ₃ COONH ₄		+				+		
NH ₄ Cl			+				+	
CH ₃ COONa				+				+
Résultats	0/80	0/80	0/80	0/80	0/80	79/80	64/80	53/80

Tableau 11 : Résultats des semis d'ascospores hétérocaryotiques issues de croisements homozygotes de la souche *S* sur les différents milieux G.

La composition des milieux est reportée au-dessus, « + » indiquant la présence du composant, tel que l'acétate d'ammonium (CH₃COONH₄) et son éventuel substituant (chlorure d'ammonium : NH₄Cl ou acétate de sodium : CH₃COONa).

Les chiffres correspondent au nombre de spores germées/nombre total de spores semées.

On remarque tout d'abord que dans cette expérience (répétée deux fois), l'absence d'extrait de levure empêche totalement la germination, un résultat qui contraste avec le fait que le milieu G sans extrait de levure est sensé induire la germination des ascospores au laboratoire. Au cours de ma thèse, certains éléments que je qualifierais « de l'environnement » sont venus modifier les conditions de germination des ascospores de *P. anserina* telles que définies depuis des décennies. Cette expérience en est le témoin. Un élément de l'environnement qui a été relativement bien identifié est la qualité de l'eau. En effet, dans l'expérience ci-dessus, les milieux ont été réalisés avec de l'eau ultra pure Milli-Q (Milli-Q® Direct, Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, États-Unis). Cette même expérience a été réalisée avec de l'eau du robinet (6^{ème} étage du bâtiment Lamarck B) et les résultats sont radicalement différents (**Tableau 12**).

Cette expérience a été réalisée 2 fois, et 24 ascospores hétérocaryotiques issues d'un croisement homozygote de la souche *S* ont été semées à chaque fois. On note qu'en présence d'eau du robinet, la présence d'extrait de levure n'est plus obligatoire pour induire la germination des ascospores. Néanmoins, la seule présence de cette eau ne parvient pas à compenser le besoin d'acétate d'ammonium pour l'induction. De plus, les résultats avec le chlorure d'ammonium et l'acétate de sodium montrent également une baisse dans l'efficacité d'induction de la germination dans ces conditions.

Eau du robinet	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacto peptone™	+	+	+	+	+	+	+	+
Extrait de levure (YE)					+	+	+	+
CH ₃ COONH ₄		+				+		
NH ₄ Cl			+				+	
CH ₃ COONa				+				+
Résultats	0/48	42/48	33/48	26/48	0/48	42/48	26/48	23/48

Tableau 12 : Résultats des semis d'ascospores hétérocaryotiques issues de croisements homozygotes de la souche S sur les différents milieux G faits avec de l'eau du robinet.

La composition des milieux est reportée au-dessus, « + » indiquant la présence du composant, tel que l'acétate d'ammonium (CH₃COONH₄) et son éventuel substituant (chlorure d'ammonium : NH₄Cl ou acétate de sodium : CH₃COONa).

Les chiffres correspondent au nombre de spores germées/nombre total de spores semées.

Cette expérience nous permet de conclure qu'un élément inconnu (nommé « X ») est présent dans l'eau du robinet et absente de l'eau ultra pure Milli-Q et qu'il permet d'induire, conjointement à l'acétate d'ammonium, la germination des ascospores de *P. anserina*. En absence de l'élément « X », on constate que l'acétate d'ammonium est obligatoire pour la germination. A noter que la présence d'extrait de levure compense l'absence de l'élément X présent dans l'eau du robinet. Le résultat intéressant est que la substitution d'un des deux ions (acétate ou ammonium) entraîne une diminution du taux de germination sans pour autant l'abolir. Ceci suggère que l'acétate et l'ammonium induisent chacun la germination avec un effet additif lorsqu'ils sont combinés.

Ainsi, l'ensemble des équipes travaillant sur *P. anserina* dans nos locaux (6^{ème} étage du bâtiment Lamarck) et moi-même avons constaté que le milieu G ne fonctionne pour induire la germination des ascospores que lorsqu'il a été réalisé avec l'eau du robinet. D'ailleurs, les variations d'efficacité de ce milieu G, dues au type d'eau utilisée, m'ont poussé à très vite privilégier le milieu G+ YE lorsque que je devais semer des ascospores lors des croisements.

2. Test de la concentration du Bacto peptone

Nous avons testé l'impact du Bacto peptoneTM sur l'induction de la germination. Pour cela j'ai réalisé avec l'aide de Sylvie Cangemi une gamme de milieux G avec des concentrations décroissantes de Bacto peptoneTM: deux milieux témoins avec la concentration classique de Bacto peptoneTM (1X=15 g.L⁻¹) et sans Bacto peptoneTM (0X), puis des milieux à 0,5X (7,5 g.L⁻¹); 0,25X (3,75 g.L⁻¹) et 0,125X (1,875 g.L⁻¹) de Bacto peptoneTM. Il est important de mentionner que ces milieux ont été réalisés avec l'eau du robinet et sans extrait de levure. La germination des ascospores issues d'un croisement homozygote de la souche S a été testée par projection directe sur ces différents milieux d'une part et par semis de 28 ascospores hétérocaryotiques sur ces mêmes milieux d'autre part. Le résultat des projections et des semis sont présentés dans le **Tableau 13**.

Milieu Souche	Projections					Semis (28 spores semées/milieu)				
	1X	0,5X	0,25X	0,125X	0X	1X	0,5X	0,25X	0,125X	0X
S	++++	+++	+	∅	∅	28/28	22/28	5/28	0/28	0/28

Tableau 13 : Résultats des projections et des semis d'ascospores hétérocaryotiques issues de croisements homozygotes de la souche S sur milieu G à différentes concentrations en Bacto peptoneTM. Les signes + représentent une estimation du nombre de germinations sur les boîtes de projections. Les chiffres correspondent quant à eux au nombre de spores germées/nombre de spores semées. ∅ : aucune germination

On constate que réduire de moitié la concentration de Bacto peptoneTM provoque une légère diminution du taux de germination, indiquant que cette concentration demeure efficace pour induire la germination des ascospores. Cependant au-delà de cette concentration, le taux de germination chute drastiquement pour tomber à 0 à la dilution 0,125X de Bacto peptoneTM. Il est important de noter que ces milieux ont été réalisés avec de l'eau du robinet, ce qui explique la germination des spores malgré l'absence d'extrait de levure. Néanmoins, ces observations démontrent tout de même que le Bacto peptoneTM est nécessaire pour la germination des ascospores de *P. anserina*. Elles nous ont aussi permis de mettre au point un milieu G 0,5X Bacto peptoneTM liquide pour les observations microscopiques afin de diminuer l'autofluorescence due au Bacto peptoneTM.

3. Test du choc thermique sur la germination des ascospores

La spore (d'origine sexuelle comme asexuelle) constitue une forme de résistance adoptée par les champignons pour survivre à des conditions environnementales difficiles (Wyatt et al., 2013). Il a été montré chez de nombreuses espèces que la germination pouvait être induite suite à l'exposition à un stress physico-chimique tels qu'un choc thermique, un stress chimique ou un stress hydrique (Dijksterhuis and Teunissen, 2004; Eicher and Ludwig, 2002; Emerson, 1948; Goddard, 1935; Katan, 1985). Chez *P. anserina*, il a été montré récemment qu'un choc thermique induit la germination des ascospores (Silar, 2020). Au cours de ma thèse, j'ai pu affiner les conditions de l'induction de la germination des ascospores de *P. anserina* par choc thermique. Pour cela, j'ai semé des ascospores hétérocaryotiques issues de croisements homozygotes de la souche *S* sur M2 et j'ai soumis ces boîtes à des températures d'induction de soit 45 °C, soit 55 °C soit 65 °C, pendant soit 10, 20, 30, 40 ou 50 minutes (**Figure 46**). Après induction, les boîtes ont été placées à 27 °C et la germination a été observée entre 24h et 48h suivant le choc thermique.

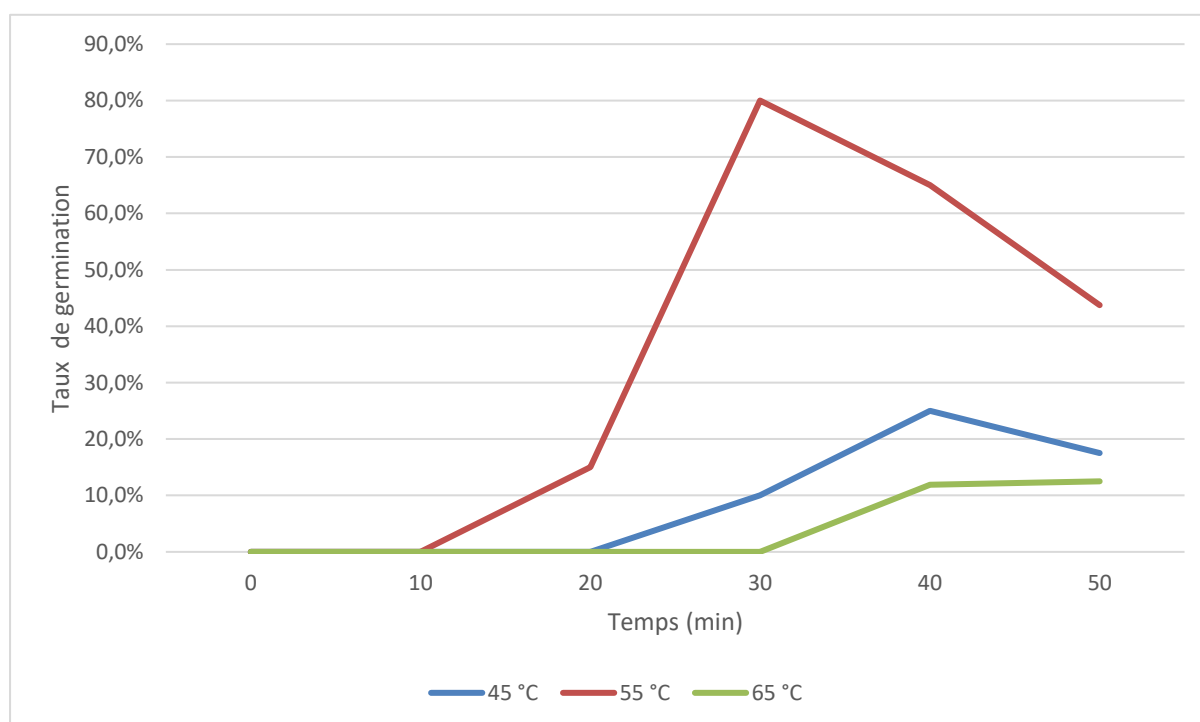


Figure 46 : Efficacité du choc thermique selon la température en fonction du temps.

3X5 conditions ont été testées : 3 températures d'induction à 5 temps différents. 28 ascospores ont été semées pour chaque condition. L'expérience a été répétée 3 fois. Les résultats ont été agrégés en moyenne (établies sur 84 ascospores) et représentés sous forme de courbes. 3 courbes (une par température) représentent ainsi l'évolution du taux de germination en fonction du temps d'induction.

On constate que le taux de germination optimal (de l'ordre de 80%) est atteint pour une exposition des ascospores de 30 minutes à 55°C. Cette fenêtre de température semble fine puisqu'augmenter ou diminuer la température de 10 °C fait drastiquement chuter le taux de germination qui est seulement de 25% au maximum à 45°C (t= 40 min) et 12% au maximum à 65°C (t=50 min). D'une manière remarquable, l'induction de la germination par choc thermique chez *P. anserina* fait ainsi écho à l'activation des spores bactériennes par chauffage sublétal (Moir & Cooper, 2015). Les ascospores de *P. anserina* suivent donc cette même règle.

4. Effet de la pression osmotique sur la germination

L'effet de la pression osmotique sur la germination des ascospores de *P. anserina* a été testée en semant des ascospores hétérocaryotiques issues de croisements homozygotes de la souche *S* sur milieu G+YE supplémenté avec différentes concentrations de sorbitol. En effet, la présence de sorbitol dans le milieu de culture permet d'induire un stress osmotique (Al-Khayri and Al-Bahrany, 2002; Chandler-Brown et al., 2015; Shen et al., 1999). 2 fois 24 ascospores ont ainsi été semées sur des milieux à 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2 M de sorbitol. Les résultats de ces semis sont représentés dans le **Tableau 14**.

Milieu / Souche	G+YE	G+YE 0,5M Sorbitol	G+YE 1M Sorbitol	G+YE 1,5M Sorbitol	G+YE 2M Sorbitol
S	93,75% (45/48)	93,75% (45/48)	6,25% (3/48)	0% (0/48)	0% (0/48)

Tableau 14 : Taux de germination des ascospores sauvages *S* sur milieu G+YE à différentes concentrations de sorbitol.

Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de spores germées/nombre de spores semées.

On constate qu'au-delà d'une concentration de 0,5M de sorbitol, il y a une inhibition majeure de la germination des ascospores sauvages liée à la pression osmotique créée par le sorbitol. Cependant une concentration de 0,5M constitue une fenêtre avec une augmentation de la pression osmotique mais qui ne diminue pas le taux de germination.

II- Marquage des septines PaSpn2 et PaCdc3

Les septines sont des petites GTPases identifiées pour la première fois chez *S. cerevisiae* et formant un anneau au niveau du bourgeon au moment de la division cellulaire (Hartwell, 1971). Ces protéines interagissent avec l'actine, les microtubules et les membranes. Elles sont impliquées dans la régulation et la dynamique du cytosquelette, les remaniements de la membrane plasmique et la sécrétion. Les septines ont une grande importance structurale dans la cellule. Elles forment des filaments oligomériques nécessaires à la formation de l'anneau contractile composé d'actine et de myosine mis en place au niveau du bourgeon à la cytokinèse notamment chez *S. cerevisiae* par exemple (Garcia et al., 2011; Vrabioiu and Mitchison, 2006).

1. Etude phylogénétique des septines

Les études chez *M. oryzae* ont montré que quatre septines, considérées comme des « core septins » forment un anneau autour du pore de l'appressorium. C'est le cas des septines MoSpe3 (orthologue de Cdc3 chez *S. cerevisiae*), MoSep4 (Cdc10 chez *S. cerevisiae*), MoSep5 (Cdc11 de *S. cerevisiae*) et MoSep6 (Cdc12 de *S. cerevisiae*) (Dagdas et al., 2012). Afin d'identifier les orthologues de ces « core » septines chez *P. anserina*, nous avons reconstitué la phylogénie des homologues des septines chez *S. cerevisiae*, *N. crassa*, *M. oryzae* et *P. anserina*. Cette phylogénie est d'autant plus nécessaire que la variété des nomenclatures induit une grande confusion pour déterminer les liens d'orthologie entre les membres de cette famille chez les différentes espèces mentionnées. Pour cette phylogénie, nous avons utilisé les séquences protéiques correspondant à 7 septines chez *S. cerevisiae* et 6 septines chez *M. oryzae*, *N. crassa* et *P. anserina* et la Myosine 2 de *S. cerevisiae* comme « outgroup » pour enraciner l'arbre, conformément à une analyse phylogénétique des septines réalisée précédemment (Pan et al., 2007). Pour *P. anserina*, les séquences de ces différentes protéines ont été identifiées par BLASTP en utilisant la séquence NcCdc3 de *N. crassa* comme séquence de référence. Pour les septines de *P. anserina*, les séquences ont été récupérées dans la base de données du génome (<http://podospora.i2bc.paris-saclay.fr/>). Pour les autres, elles proviennent de la banque UniprotKB (<https://www.uniprot.org/help/uniprotkb>). A noter que chez *P. anserina*, 4 de ces septines avaient été annotées suite au séquençage du génome : *Pa_3_4770#Cdc3*, *Pa_3_5760#Spn2*, *Pa_1_22220#Spn3*, et *Pa_2_11810#septin* ; les deux autres, *Pa_7_10360* et *Pa_1_20240*, avaient gardé une fonction inconnue (Espagne et al., 2008).

Après s'être assurés qu'aucune autre séquence homologue n'était présente dans les génomes des espèces comparées (en utilisant les paramètres par défaut de BLAST), nous avons aligné ces séquences grâce au logiciel MAFFT (Katoh et al., 2005). Ces alignements ont été traités par le logiciel Jalview (Waterhouse et al., 2009) et un arbre phylogénétique a été généré selon le principe du maximum de vraisemblance combiné au bootstrap (100 bootstraps) par le logiciel PhyML (Guindon and Gascuel, 2003) (avec le modèle LG) (**Figure 47**). La valeur du bootstrap nous permet d'estimer la variabilité et la robustesse de l'arbre. Dans notre cas, sa variabilité est faible car les bootstraps sont proches de 100. Toutefois, nous notons que certaines séquences protéiques de septines de *P. anserina*, (*Sordariales*) semblent plus proches de celles de *M. oryzae* (*Hypocreales*) que de *N. crassa* (*Sordariales*). C'est le cas de la septine Pa_2_11810 et MoSep6 de la famille IV et Pa_3_5760_Spn2 et MoSep4 de la famille I.

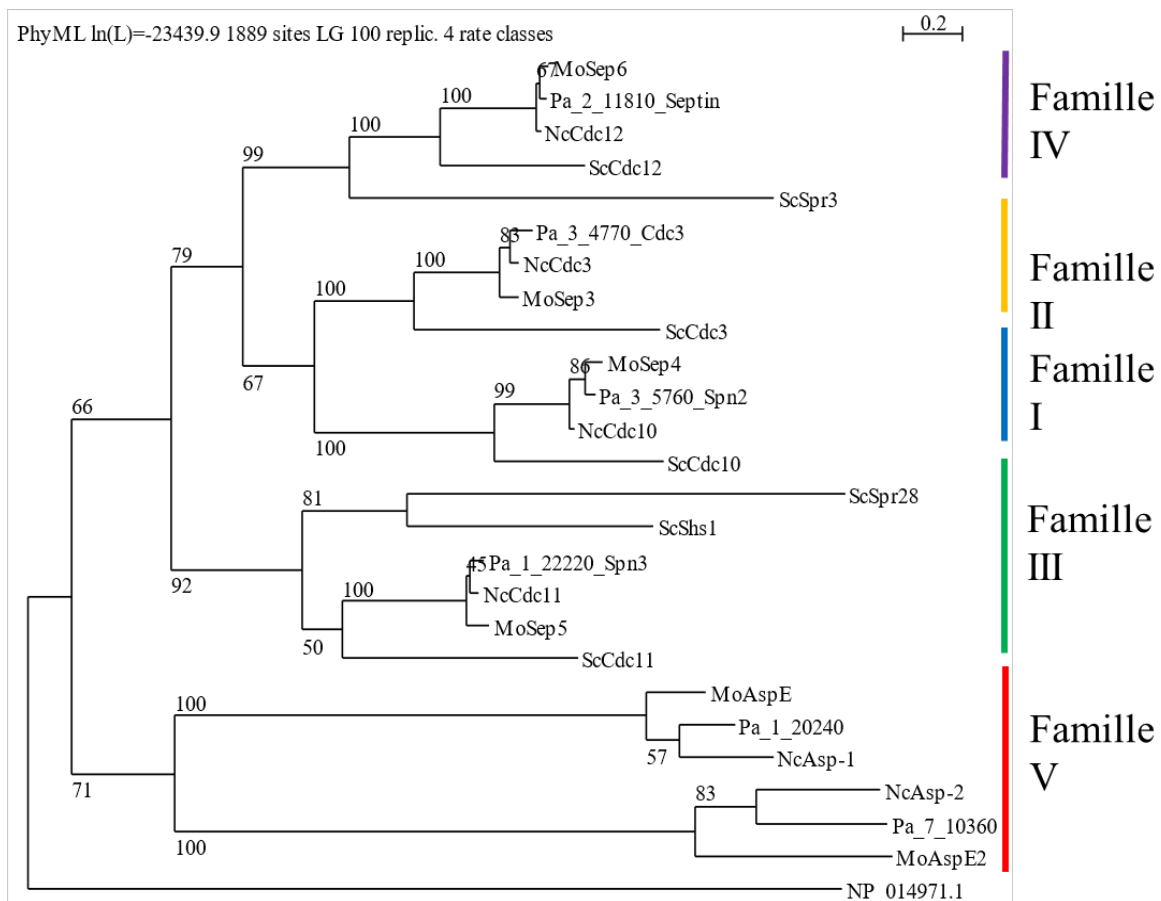


Figure 47 : Phylogénie comparée des septines. Les séquences protéiques des septines de *Magnaporthe oryzae* (noté Mo), *Saccharomyces cerevisiae* (noté Sc), *Neurospora crassa* (noté Nc) et *Podospora anserina* (noté Pa) ont été alignées par MAFFT (Katoh et al., 2005) puis l'arbre a été construit par phyML (Guindon and Gascuel, 2003). Le groupe externe (*NP_014971.1*) correspond à la séquence protéique de la Myosine 2 de *S. cerevisiae*. Les nombres indiqués aux nœuds des branches représentent les pourcentages de bootstrap calculés par le maximum de vraisemblance sur un ensemble de 100 réplicats.

Cette analyse phylogénétique a permis d'établir sans ambiguïté les relations d'orthologie entre les septines et d'identifier pour les différentes espèces, les septines correspondant aux 4 grandes familles définies dans l'article (Pan et al., 2007).

2. Stratégie de marquage de PaSpn2 et PaCdc3

Afin de respecter au mieux les conditions normales d'expression des septines que nous marquons, nous avons décidé de marquer ces septines « au site ». En effet, ce type de marquage est permis par un évènement de recombinaison homologue entre le gène endogène et une construction permettant la fusion en 3' et en phase des gènes codant la mCherry ou la GFP (**Figure 48**). Chez *M. oryzae*, les septines MoSep3, 4, 5 et 6 participent toutes à la formation de l'anneau (Dagdas et al., 2012). Pour déterminer quel orthologue de *P. anserina* nous allons marquer, le critère de choix a été le taux d'expression du gène en ascospores comme en mycélium.

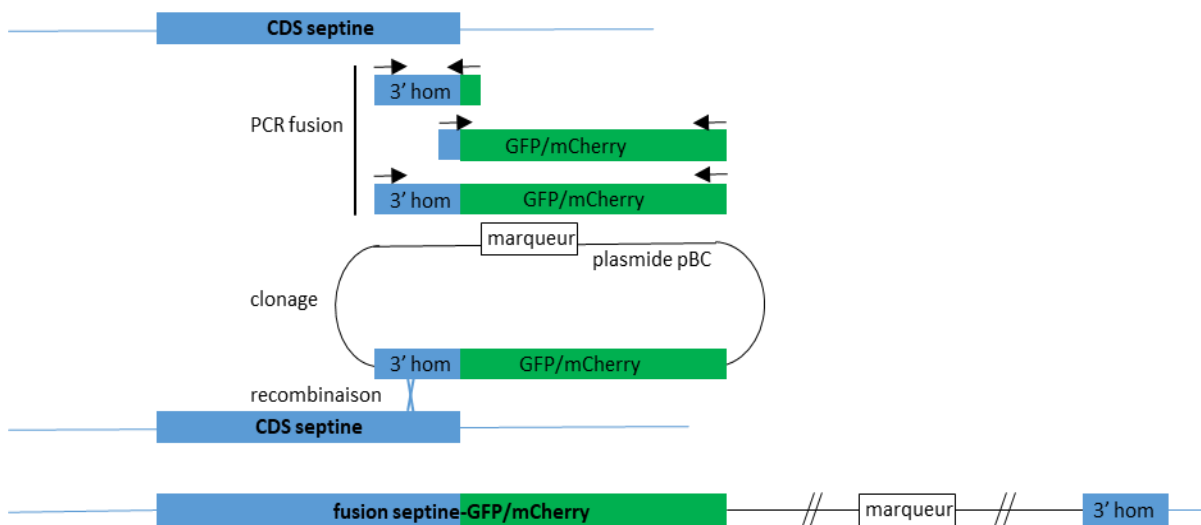


Figure 48 : Stratégie générale de marquage des septines PaCdc3 et PaSpn2 à la GFP et/ou à la mCherry. La région 3' de la CDS de la septine ciblée est amplifiée à l'aide d'amorces spécifiques permettant la fusion par PCR de cette région d'homologie à la septine avec la séquence codant la GFP ou la mCherry. Les 2 fragments ainsi fusionnés sont clonés dans un plasmide pré-digéré par EcoRV. Une fois la présence de l'insert vérifiée par séquençage, ce plasmide est transformé dans une souche *Δmus51* ou *Δmus52*, et une recombinaison homologue entre la CDS de la septine ciblée et la région d'homologie permet l'intégration du plasmide et ainsi le marquage au site de la septine.

En analysant les données d'expression de ces septines (Silar et al., 2019), j'ai choisi les gènes *Pa_3_4770* (*PaCdc3*), orthologue de *MoSep3* et *Pa_3_5760* (*PaSpn2*) orthologue de *MoSep4* qui sont les deux gènes les plus exprimés en ascospores comme en mycélium (données non montrées).

a. Construction de la souche PaCdc3-GFP

Une première étape de PCR fusion est réalisée. Elle permet de fusionner en phase les 771 pbs de la partie 3' de la CDS *Pa_3_4770#Cdc3* (sans le codon stop) au gène codant la GFP ou la mCherry (**Figure 48**). Les amorces utilisées pour les amplifications PCR sont répertoriées dans l'**Annexe 7**. A noter qu'il n'y a aucun linker entre la septine et la protéine fluorescente produite. Ces produits de PCR fusion sont ensuite clonés bout franc dans le plasmide pBC-nouR (qui porte le gène de résistance à la nourséothricine) digéré par EcoRV. Les plasmides obtenus sont ensuite séquencés et transformés dans la souche $\Delta Mus52::phleoR$ déficiente pour le système de réparation NHEJ et dans laquelle la recombinaison hétérologue est fortement réduite (Chan Ho Tong et al., 2014; El-Khoury et al., 2008). A l'issue de cette transformation, nous avons obtenu un transformant pour PaCdc3-GFP::nouR et aucun pour PaCdc3-mCherry::nouR. Pour des questions de temps, je n'ai pas pu poursuivre cette dernière construction. Le transformant positif est ensuite validé selon deux critères : l'insertion/jonction correcte du transgène par PCR et la détection d'un signal fluorescent par microscopie. La vérification de la jonction septine-GFP/mCherry est réalisée par un test PCR avec une amorce qui s'hybride dans la CDS de la septine et en amont de la séquence d'homologie du produit de PCR fusion et une amorce reverse située dans le gène codant la GFP ou la mCherry (**Figure 48**).

Le transformant positif pour ce test PCR est ensuite validé en microscopie avec la détection d'un signal fluorescent vert. Afin de purifier ce transformant (éliminer la délétion $\Delta Mus52::phleoR$) et obtenir la construction *PaCdc3-GFP::nouR* en contexte sauvage et en contexte *PaPks1¹³⁶* permettant la cytologie dans les ascospores (ascospores moins mélanisées que chez la souche sauvage), un croisement avec la souche *PaPks1¹³⁶* a permis d'isoler les descendants [phleoS, nouR] et obtenir les souches *PaPks1¹³⁶ PaCdc3-GFP::nouR* et *PaCdc3-GFP::nouR*. Au cours de mes premières observations du marquage PaCdc-3-GFP, j'ai remarqué un marquage ponctué assez semblable à un marquage du noyau. Au laboratoire, S. Brun a construit des souches fluorescentes dans lesquelles l'histone H1 est fusionné à la mCherry et qui montrent un marquage fort du noyau (Xie et al., 2017). J'ai donc construit les

souches *PaCdc3-GFP::nouR HI-mCherry::hygR* et *PaPks1¹³⁶ PaCdc3-GFP::nouR HI-mCherry::hygR* par croisement des souches précédemment mentionnées et la souche *HI-mCherry::hygR*. Cette souche portant le marqueur *hygR*, j'ai aisément pu isoler dans la descendance des spores [*hygR*, *nouR*] du génotype souhaité. Afin d'alléger la rédaction, les résistances antibiotique *nouR* et *hygR* des transgènes mentionnés n'apparaissent pas dans la suite du manuscrit.

b. Construction des souches PaSpn2-GFP et PaSpn2-mCherry

Une stratégie similaire à la construction de *PaCdc3-GFP* a été menée afin de marquer au site *Pa_3_5760#PaSpn2*. Une étape de PCR fusion a permis de fusionner les 661 dernières paires de bases de la partie 3' de la CDS *Pa_3_5760* (sans le codon stop) aux gènes codant la GFP et la mCherry (**Figure 48**). Les amorces utilisées pour ces PCR sont listées dans l'**Annexe 7**. Les fragments de PCR fusion obtenus pour chaque construction ont ensuite été clonés dans pBC-*nouR* digéré par EcoRV. Les constructions ont été séquencées et transformées dans la souche *ΔMus51::phleoR* qui comme la souche *ΔMus52::phleoR* est déficiente pour le système de réparation NHEJ et la recombinaison hétérologue (El-Khoury et al., 2008). 2 transformants [*nouR*] ont été obtenus après transformation de la construction *PaSpn2-GFP::nouR* et un transformant pour *PaSpn2-mCherry::nouR*. Ces trois transformants ont été validés par PCR (vérification de la jonction/insertion du transgène) et en microscopie. Ils ont été croisés par la souche *PaPks1¹³⁶* et dans la descendance, nous avons sélectionné les souches [*phleoS*, *nouR*] *PaPks1¹³⁶ PaSpn2-GFP::nouR*, *PaPks1¹³⁶ PaSpn2-mCherry::nouR* et *PaSpn2-GFP::nouR*, *PaSpn2-mCherry::nouR*. Dans la suite du manuscrit, le marqueur antibiotique *nouR* ne sera pas indiqué.

3. Etudes phénotypiques et cytologiques des souches PaCdc3-GFP, PaSpn2-GFP et PaSpn2-mCherry

Une question importante lorsque l'on travaille sur des protéines chimères fluorescentes est la fonctionnalité de la construction réalisée. Afin de répondre à cette question la méthode la plus directe consiste à s'assurer que la protéine chimère complémente la/les fonction(s) de la protéine sauvage chez un mutant délété pour le gène cible. Si la souche délétée est viable et montre un phénotype mutant des ascospores, nous pourrions alors tester la complémentation

fonctionnelle de cette délétion par la construction transgénique dans des spores hétérocaryotiques post-réduites (ex : $\Delta PaSpn2/PaSpn2-GFP$). Cependant, par manque de temps, je n'ai pas construit ces mutants délétés durant ma thèse. Néanmoins, nous avons cherché à déterminer si d'éventuels phénotypes mutants pouvaient être observés dans les souches exprimant les septines marquées. Nous n'avons observé aucun défaut visuel du mycélium végétatif, de fertilité (en croisements homozygotes) ni de production d'ascospores (résultats non montrés). Au cours des différents croisements réalisés, je n'ai pas constaté de défaut du taux de germination des ascospores portant les différentes constructions. Cependant, nous avons constaté une légère tendance (quelques pourcents) à la germination spontanée des différentes souches marquées en contexte $PaPks1^{136}$. Nous n'avons pas détecté de défaut de croissance, ni de thermosensibilité des souches exprimant les septines marquées (résultats non montrés). Nous n'avons pas non plus détecté de défaut de percement de la cellophane et de formation de l'appressorium (résultats non montrés).

Les septines n'ont jamais été étudiées chez *P. anserina* et tout reste à découvrir sur leur rôle et leur localisation chez ce champignon. Au cours de ma thèse j'ai pu commencer à étudier leur localisation dans le mycélium, dans les ascospores et dans l'appressorium chez *P. anserina*. Bien que préliminaires, ces observations sont encourageantes quant à l'utilisation des souches marquées $PaCdc3-GFP$, $PaSpn2-GFP$ et $PaSpn2-mCherry$ dans l'étude de ces septines chez *P. anserina*.

a. Localisation des septines PaSpn2 et PaCdc3 dans le mycélium

Nous avons observé que les protéines chimères PaSpn2 et PaCdc3 marquent toutes les deux certains septa. Ce résultat était attendu, compte-tenu de la fonction de ces protéines (Spiliotis & Nelson, 2006). Pour PaCdc3, j'ai pu observer un anneau qui pourrait correspondre à celui du pore septal (**Figure 49**). Mais le fait de voir peu de septums marqués suggère une grande dynamique de la localisation de ces septines aux septums. En ce qui concerne PaSpn2, nous l'avons vu très souvent localisée à la base des hyphes branchés (**Figure 50**). L'analyse fine du marquage montre que PaSpn2 fait le tour de l'hyphe branché à sa base. Nous n'avons pas observé un tel marquage pour PaCdc3. Pour PaCdc3 et PaSpn2, nous avons observé la formation de patchs mais aussi de structures rectilignes et épaisses à l'intérieur de certains articles. Cette observation suggère que les septines PaSpn2 et PaCdc3 se réarrangent en structures oligomériques.

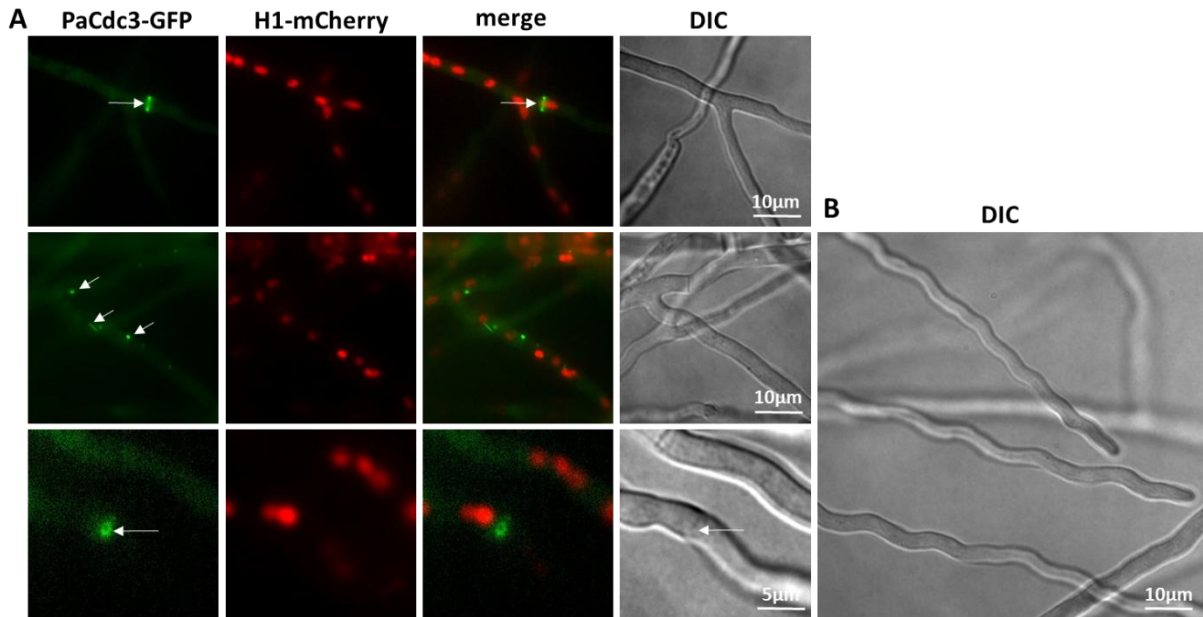


Figure 49 : Co-marquage Cdc3-GFP H1mCherry en mycélium.

A : Fluorescence de la souche. Les noyaux apparaissent marqués en rouge et Cdc3-GFP apparaît marqué en vert. Flèches : un septum; des structures ponctuées ou étirées; une structure en anneau au niveau du septum.

B : Croissance sinusoidale des hyphes *Cdc3-GFP H1mCherry*

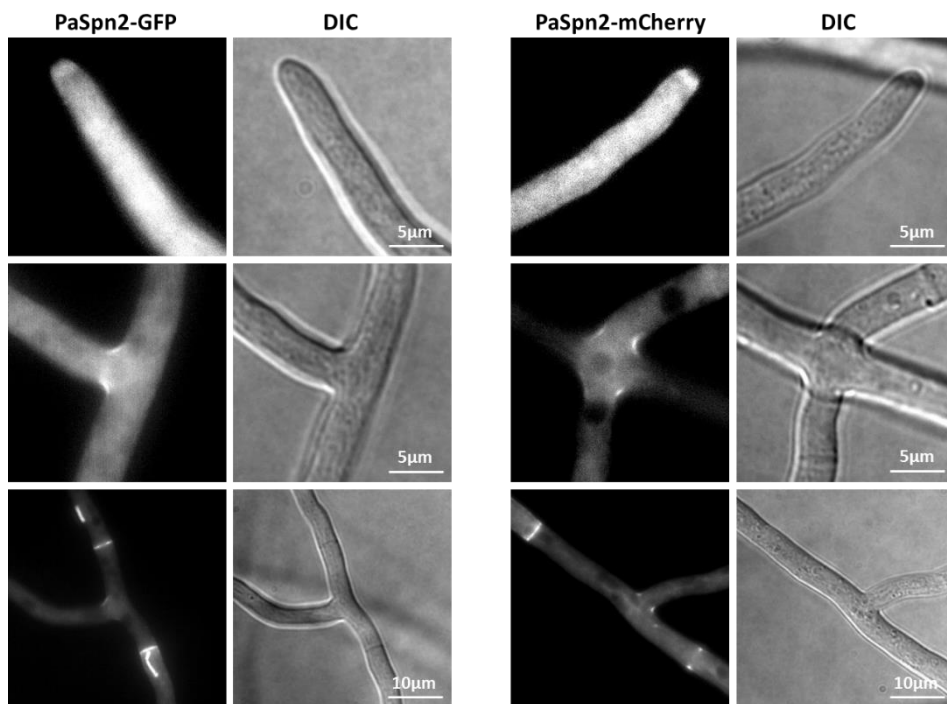


Figure 50 : Marquage PaSpn2-mCherry en mycélium. Différents patterns de marquage sont observés : Accumulation de PaSpn2 à l'apex des hyphes (première ligne) ; marquage de la base des hyphes branchées (deuxième ligne) ; marquage des septums et de structures rectilignes et épaisses (troisième ligne gauche) ; et marquage de deux septums et de la base de l'hyphes branchée (troisième ligne droite).

Ce genre de marquage a déjà été observé chez d'autres champignons (Berepiki and Read, 2013). A ce stade, il n'est pas possible de déterminer le rôle de ces structures ni savoir si elles seraient la conséquence d'une oligomérisation artificielle. Par ailleurs, le co-marquage des noyaux par le reporter H1-mCherry avec la septine PaCdc3-GFP n'a pas confirmé le marquage nucléaire supposé de PaCdc3-GFP. L'observation microscopique du mycelium PaCdc3-GFP a montré une tendance des hyphes apicales à croître non pas de manière rectiligne mais de manière sinusoïdale. Ce défaut de croissance invisible lorsque l'on observe le mycelium à œil nu suggère que PaCdc3 est impliqué dans la croissance hyphale et que la construction PaCdc3-GFP entraîne ce défaut. Enfin, nous avons fréquemment observé une légère mais significative accumulation de PaSpn2 à l'apex des hyphes. A noter la grande similarité de paterne de marquage entre PaSpn2-GFP et Pa-Spn2-mCherry, ce qui est un point positif quant à l'interprétation des patrons de fluorescence de ces deux protéines chimères pour les expériences futures.

b. Localisation de la septine PaSpn2 dans les ascospores

La seule construction que j'ai eu le temps d'observer dans les ascospores est PaSpn2-GFP (**Figure 51**).

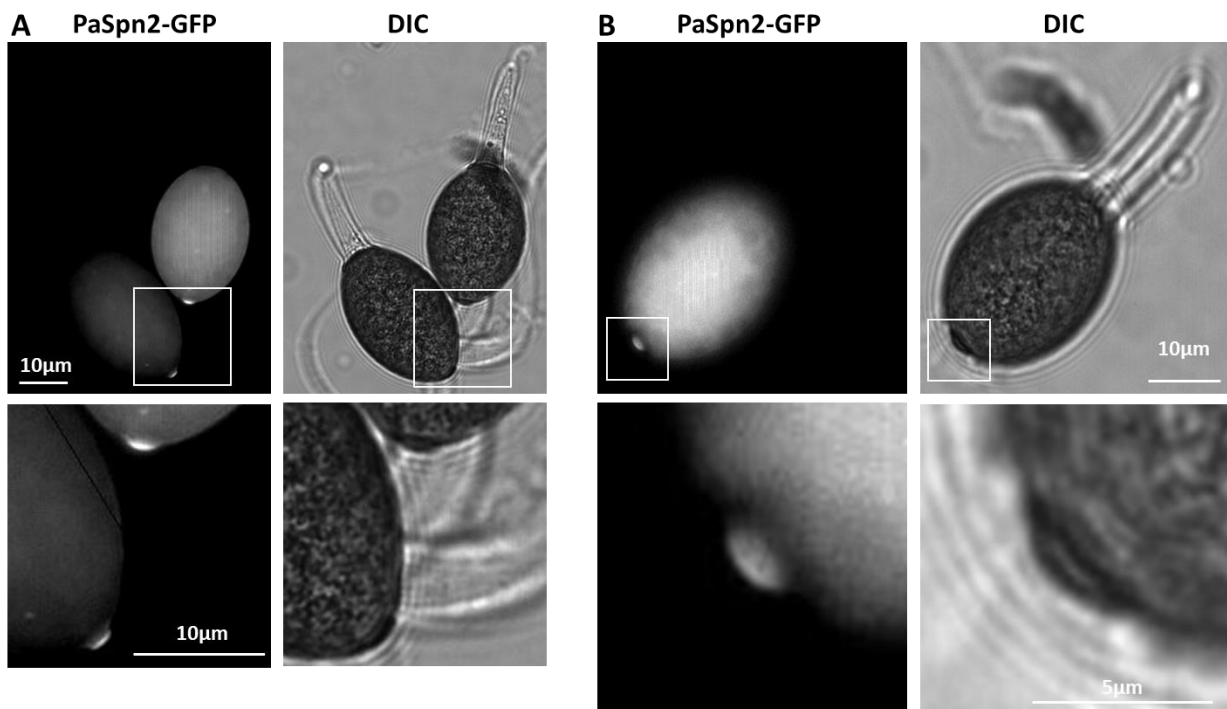


Figure 51 : Marquage PaSpn2-GFP. **A** et **B** : fluorescence verte dans les ascospores hétérocaryotiques *PaPks1¹³⁶ PaSpn2-GFP/ PaPks1¹³⁶ PaSpn2-GFP*. Accumulation de la fluorescence au pore de germination. Microscopie à épifluorescence.

Ces observations préliminaires sont extrêmement prometteuses. En effet, en plus d'un marquage diffus de PaSpn2-GFP, j'ai pu observer la présence de patches situés en périphérie des ascospores mais surtout, j'ai observé à plusieurs reprises l'accumulation du signal fluorescent au pore de germination. Cette observation préliminaire suggère qu'à l'instar de la formation du pore de pénétration de l'appressorium de *M. oryzae* (Dagdas et al., 2012), les septines seraient bien recrutées au cours de la formation du pore de germination de l'ascospore de *P. anserina*.

c. Localisation de PaCdc3 et PaSpn2 au cours de la formation de l'appressorium

➤ Etude de PaCdc3-GFP H1-mCherry

Le marquage PaCdc3-GFP apparaît diffus mais aussi ponctué et à certains endroits dans l'haustorium-like, parfois étiré (**Figure 52**). Nous n'avons en revanche pas détecté de signal significatif dans les pegs de pénétration.

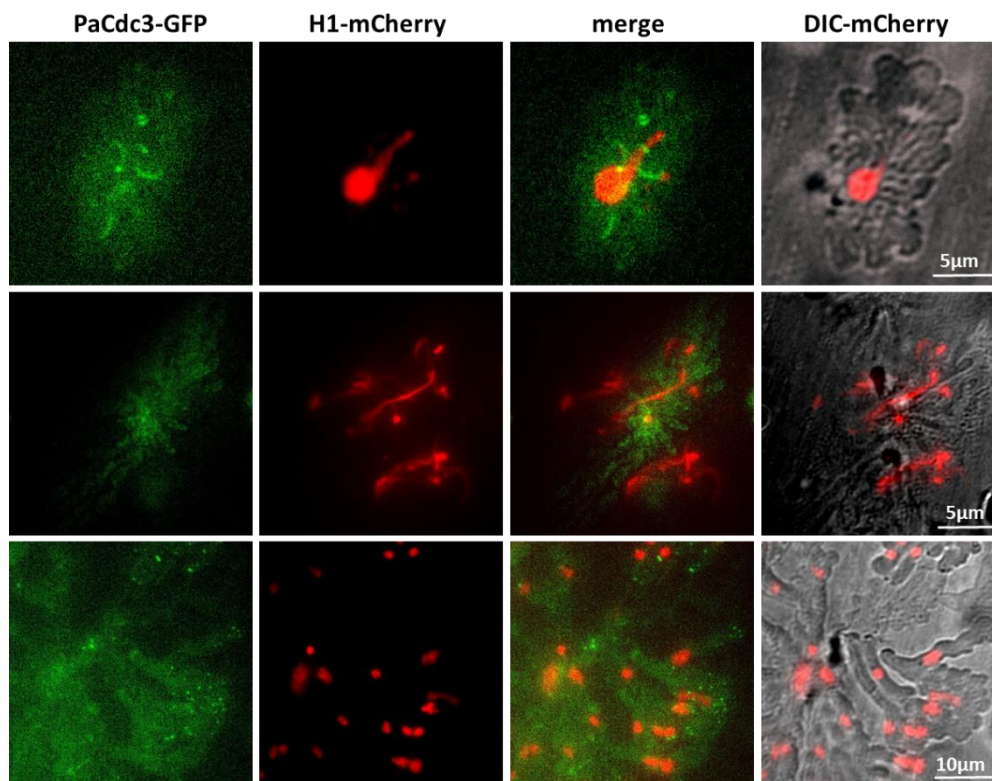


Figure 52 : Co-marquage Cdc3-GFP H1mCherry dans les haustorium-likes. Les noyaux apparaissent marqués en rouge et Cdc3-GFP apparaît marqué en vert. Microscopie à épifluorescence.

Nous n'avons pas non plus observé de formation de disque ou d'anneau au niveau des points de contacts (étape précédent la formation des pegs de pénétration) du mycélium avec la cellophane. Cette absence devra être confirmée par des études plus précises. Comparé au marquage par PaSpn2-GFP/mCherry, le marquage par PaCdc3-GFP semble moins intense. Ceci suggère que PaCdc3 serait moins exprimé dans les haustoria-like comparé à PaSpn2.

Le marqueur H1-mCherry, qui marque la chromatine, marque fidèlement le noyaux et est très efficace pour mettre en évidence les mitoses (ADN condensé) et les changements de forme du noyau, même les plus sévères (S. Brun, résultats non publiés) (Xie et al., 2017). Tout d'abord, ces premières observations ont permis de révéler la présence de noyaux dans les haustoria-like intracellophanes. Ces noyaux sont répartis dans les haustoria-like et on peut constater que leur forme n'est pas homogène. Ils n'apparaissent pas ronds ou légèrement ovales comme dans les hyphes. Mais le plus frappant a été l'observation de noyaux complètement allongés, étirés. Je n'ai pas pu enregistrer de films mais ces noyaux sont en mouvement et bougent de plusieurs micromètres par minute. Sur la figure 48, j'ai pu photographier le premier noyau entrant dans l'haustorium-like depuis le peg de pénétration de l'appressorium. Dans d'autres appressoria, on observe plusieurs noyaux étirés. Cette observation est très intéressante et met en lumière la manière très spectaculaire avec laquelle les noyaux se déforment et migrent au sein des haustoria-like.

➤ Etude de PaSpn2-mCherry et PaSpn2-GFP

Dans les haustoria-like, le pattern de fluorescence pour PaSpn2-GFP et PaSpn2-mCherry est assez similaire même si nous n'avons pas pu collecter plus d'images pour PaSpn2-GFP (**Figures 53 et 54**). Pour des raisons de clarté, je vais interpréter ces marquages comme reflétant la localisation de PaSpn2, indifféremment du marqueur fluorescent. Le marquage PaSpn2 se manifeste par la formation d'un anneau et/ou d'un disque au niveau des points de contact des hyphes se réorientant au contact de la cellophane, étape précédant l'émission du peg de pénétration. Il y a donc recrutement de PaSpn2 à cette étape clé du développement de l'appressorium. PaSpn2 serait recrutée un peu sur l'ensemble du point de contact : sur ses côtés (marquage en anneau) comme sur la face en contact avec la cellophane (marquage en disque).

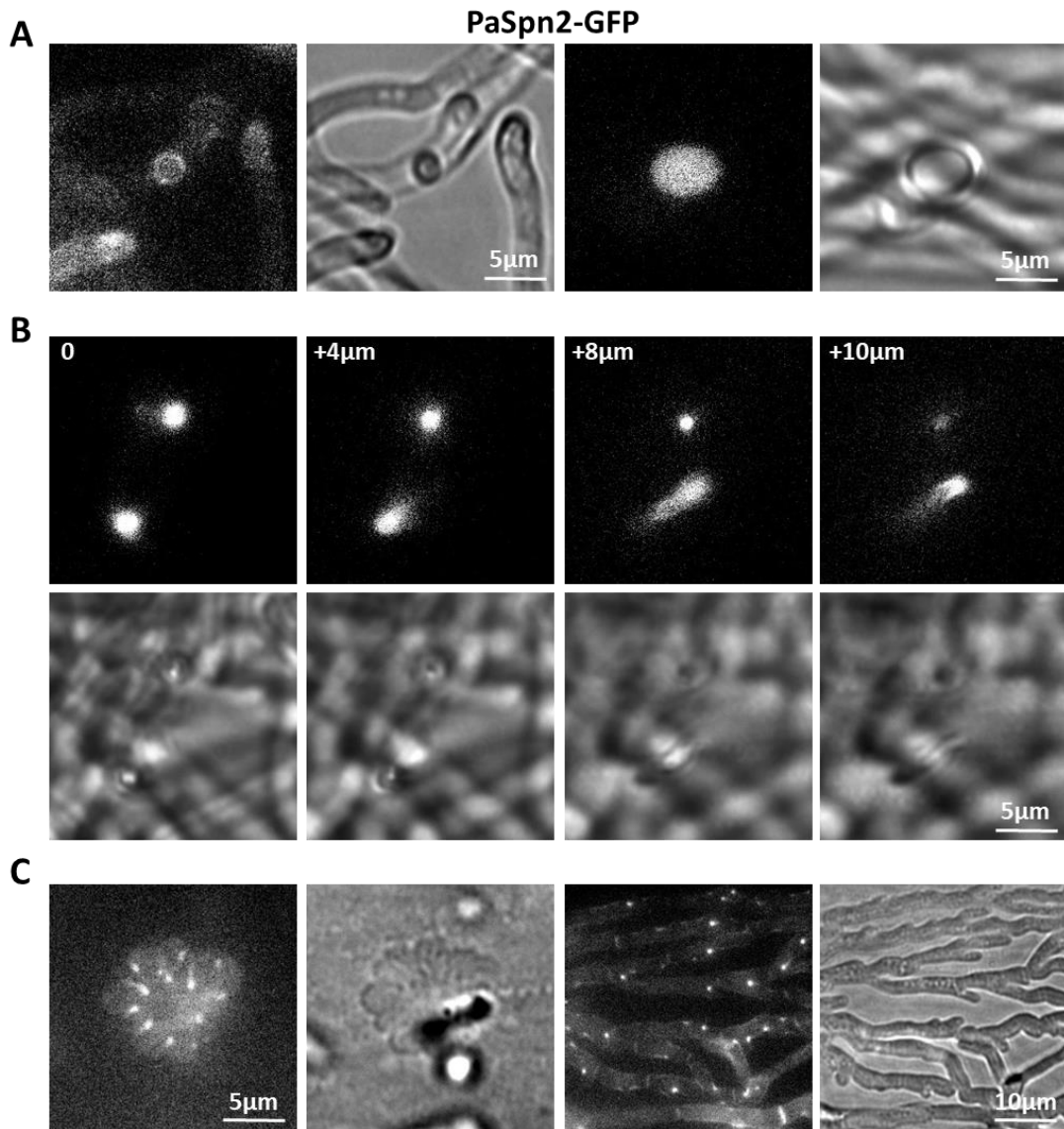


Figure 53 : Marquage PaSpn2-GFP dans les appressoriums sur cellophane.

A, B, C : fluorescence verte et transmission DIC à différentes étapes de la formation des appressoria *PaSpn2-GFP*. **A :** marquage en anneau et en disque au niveau des points de contact avec la cellophane. **B :** marquage des pegs de pénétration. La taille indiquée en μm en haut à gauche correspondent à la distance entre les plans-z du même champ. **C :** marquage ponctué, marquage des septums et marquage membranaire dans les haustorium-like.

Les études précédentes du laboratoire ont montré que la voie MAPK PaMpk2 et les protéines PaNox2, PaPls1 et PaNoxR sont requises pour cette étape spécifique de réorientation des hyphes et de mise en place des points de contacts dans la formation de l'appressorium chez *P. anserina* (Brun et al., 2009; Lalucque et al., 2012). Ensuite, on détecte un signal fort dans les pegs de pénétration. Sur certaines images, on a le sentiment que le marquage est en anneau, signifiant un enrichissement de PaSpn2 aux membranes dans les pegs de pénétration.

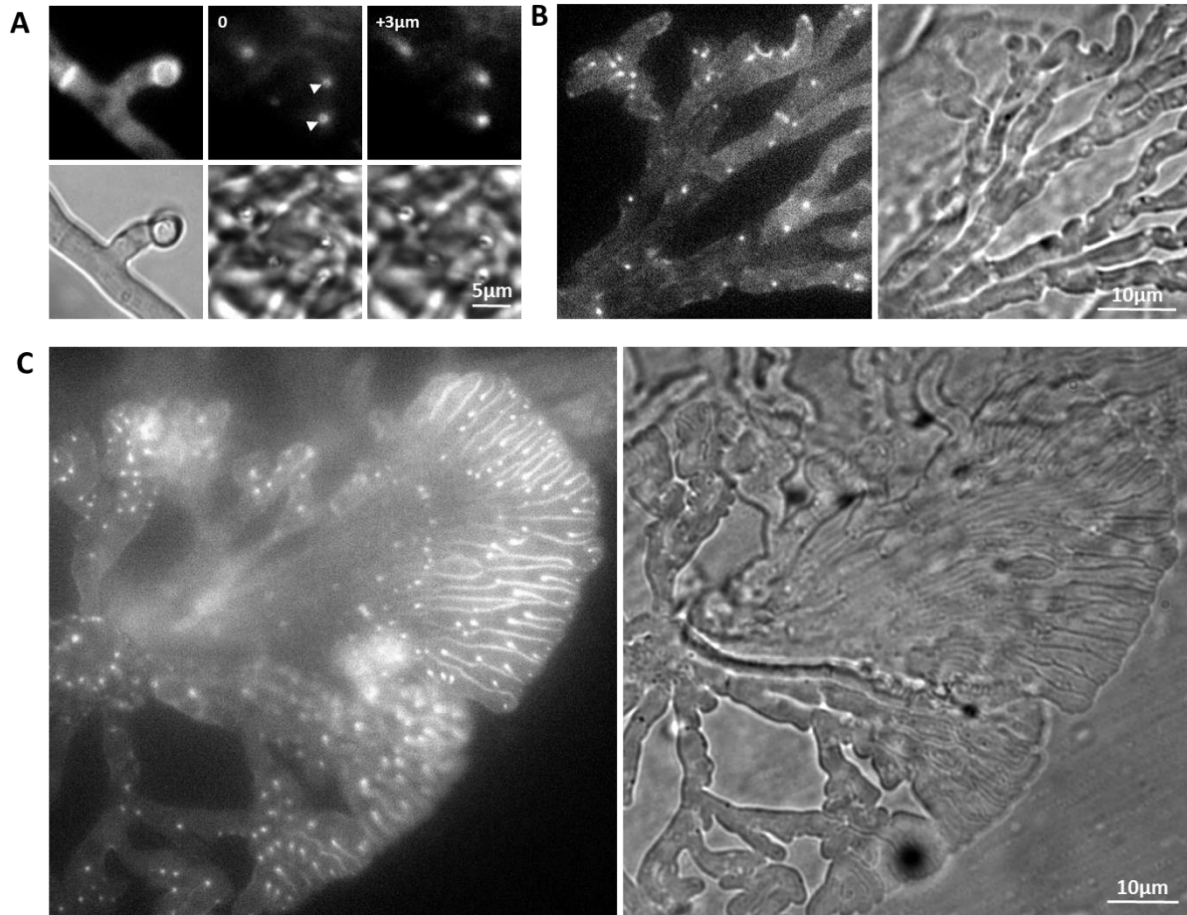


Figure 54: Marquage PaSpn2-mCherry dans les appressoria sur cellophane.

A, B, C: fluorescence rouge et transmission DIC à différentes étapes de la formation des appressoriums *PaSpn2-mCherry*. **A** : marquage en anneau au niveau du point de contact avec la cellophane et dans les pegs de pénétration. Marquage en anneau au niveau des pegs de pénétration (flèches); en μm , distance entre les deux plans-z du même champ. **B et C** : marquage ponctué, marquage des septums et marquage membranaire dans les haustorium-likes. Marquage intense des membranes des « phalanges » des structures palmées (C).

Dans les haustoria-likes, on retrouve différentes localisations de PaSpn2. D'une manière similaire aux hyphes végétatives, PaSpn2 marque certains septums et se retrouve aussi au niveau membranaire. On observe de même du marquage ponctué. Mais le marquage le plus impressionnant est celui qui semble délimiter les « phalanges » des « structures palmées », le premier nom qu'avait été donné aux haustoria-likes à leur découverte chez *P. anserina* (Brun et al., 2009). Ainsi, PaSpn2 semble jouer un rôle important dans les différentes étapes du développement de l'appressorium : la formation des points de contact (étape contrôlée par PaNox2, PaPls1, PaNoxR et PaMpk2), la pénétration via les pegs de pénétration (une étape contrôlée par PaNox1 et PaNoxD chez *P. anserina* et *M. oryzae*) et le développement en

structures palmées de l'haustorium-like. Contrairement aux étapes précédentes de la formation de l'appressorium, nous ne possédons aucune souche mutante au laboratoire chez laquelle la morphologie de ces structures palmées est affectée. PaSpn2 est donc un candidat intéressant impliqué dans la morphogenèse des haustoria-likes.

En conclusion, ces études préliminaires des protéines PaSpn2 et PaCdc3 marquées fluorescentes sont extrêmement prometteuses pour notre étude comparée chez *P. anserina* de la germination des ascospores et de la formation de l'appressorium, deux processus qui partagent de grandes similarités avec le développement de l'appressorium de *M. oryzae*. La création de souches invalidées pour *PaSpn2* et *PaCdc3*, si ces deux gènes ne sont pas essentiels, pourrait s'avérer fructueuse dans l'étude de l'implication des septines, en général au cours du développement chez *P. anserina*, mais plus précisément dans la formation du pore de germination des ascospores et du développement de l'appressorium.

III - Marquage de l'actine et construction du rapporteur LifeAct

L'actine représente avec la tubuline un élément essentiel du cytosquelette. L'actine joue un rôle fondamental dans l'établissement de la morphologie des cellules eucaryotes (Pollard and Cooper, 2009). Elle joue un rôle essentiel dans la croissance polarisée chez les levures et chez les champignons filamenteux (Berepiki et al., 2011). Comme évoqué dans l'introduction, l'actine joue un rôle essentiel dans la formation du pore de pénétration de l'appressorium de *M. oryzae* (Dagdas et al., 2012). Afin de déterminer le rôle de l'actine au cours de la formation du pore de germination des ascospores de *P. anserina* et de la formation de l'appressorium, j'ai décidé de m'intéresser à la localisation de l'actine au cours de ces deux processus. Aucune étude n'a été réalisée sur le rôle de l'actine et de sa localisation chez *P. anserina*, la construction de souches marquées pour l'actine constitue donc une première chez ce champignon. Dans de nombreux systèmes cellulaires et chez différents champignons filamenteux et levures, l'utilisation du rapporteur LifeAct couplé à un fluorochrome s'est avéré très efficace pour marquer l'actine sous forme globulaire (« patches ») comme l'actine filamentaire, polymérisée sous forme de fibres : la F-actine (Berepiki et al., 2010; Lichius and Read, 2010; Riedl et al., 2008). J'ai donc entrepris la construction des souches LifeAct-GFP et LifeAct-mCherry. LifeAct est un petit peptide de 17 acides-aminés qui se fixe à l'actine. Pour ces constructions, les gènes chimères LifeAct-GFP et LifeAct-mCherry sont placés sous le contrôle du promoteur

fort et constitutif du gène *AS4* codant le facteur de traduction EF1a de *P. anserina* (Silar et al., 2001), et la stratégie a été une intégration aléatoire et ectopique du transgène portant le marqueur antibiotique de résistance à l'hygromycine, *hygR*.

1. Construction de LifeAct-GFP et LifeAct-mCherry

Le LifeAct est un petit peptide de 17 acides aminés. Afin de construire les plasmides AS4-LifeAct-GFP et AS4-LifeAct-mCherry, j'ai inséré la séquence codante de ce peptide de 51 paires de bases dans les plasmides déjà construits par S. Brun AS4-GFP::*hygR* et pAS4-mCherry::*hygR* (portant le marqueur de résistance à l'hygromycine) en aval du promoteur fort AS4 et en amont et en phase avec le gène de la GFP ou de la mCherry (Lacaze et al., 2015). Pour ce faire, nous avons demandé la synthèse de deux longs oligonucléotides inverses complémentaires comprenant un site de restriction HindIII en 5', la séquence Kozak consensus GCCACC (permettant une initiation de la traduction optimale), la CDS de LifeAct de *N. crassa* (Lichius & Read, 2010) dans laquelle le 4^{ème} codon GCT (Alanine) a été recodée en GCC (Ala) pour respecter le biais d'usage des codons de *P. anserina* et un site ApaI en 3'. Sans aucune étape PCR, ces oligonucléotides ont été hybridés, digérés par HinIII et ApaI et incorporés aux plasmides AS4-GFP et AS4-mCherry digérés par HindIII et ApaI. Les constructions ont été vérifiées par séquençage et transformées dans la souche *S* de *P. anserina*. Nous avons obtenu 7 transformants [*hygR*] pour AS4-GFP-*hygR* et 28 transformants [*hygR*] pour AS4-mCherry::*hygR* (dans la suite du manuscrit, le marqueur *hygR* n'est plus indiqué pour ces constructions). Ces transformants ont été criblés pour leur fluorescence et pour chaque construction, deux transformants indépendants ont été sélectionnés et croisés par la souche *PaPks1¹³⁶* afin d'obtenir des souches marquées en contexte sauvage et en contexte *PaPks1¹³⁶* pour lequel la mélanisation des ascospores est affectée (Coppin & Silar, 2007).

2. Observations des spores LifeAct-GFP et LifeAct-mCherry

Je n'ai pas eu le temps au cours de cette fin de thèse d'observer le profil de marquage de ces deux constructions en mycélium. J'ai en revanche pu faire des observations préliminaires dans des ascospores *PaPks1¹³⁶ LifeAct-GFP* et *PaPks1¹³⁶ LifeAct-mCherry*.

Les marquages par LifeAct-GFP et LifeAct-mCherry étant assez similaires pour ces premières observations, je vais présenter la synthèse de ces deux marquages sans les différencier. J'ai observé un signal fluorescent LifeAct dans les spores de trois natures (**Figure 55**) : ponctué, filamentaire et polarisé au niveau du pore de germination. Ces observations sont très positives et suggèrent que le rapporteur LifeAct fonctionne chez *P. anserina*, qu'il permet le marquage de l'actine sous forme de patchs et la F-actine filamentaire. Ce rapporteur pourra être utilisé pour étudier la localisation de l'actine au cours des différents stades de développement de *P. anserina*. En ce qui concerne mon projet en particulier, ces premières images montrant de la F-actine au pore de germination ainsi qu'à la base de la bulle de germination observée **Figure 55** sont extrêmement prometteuses.

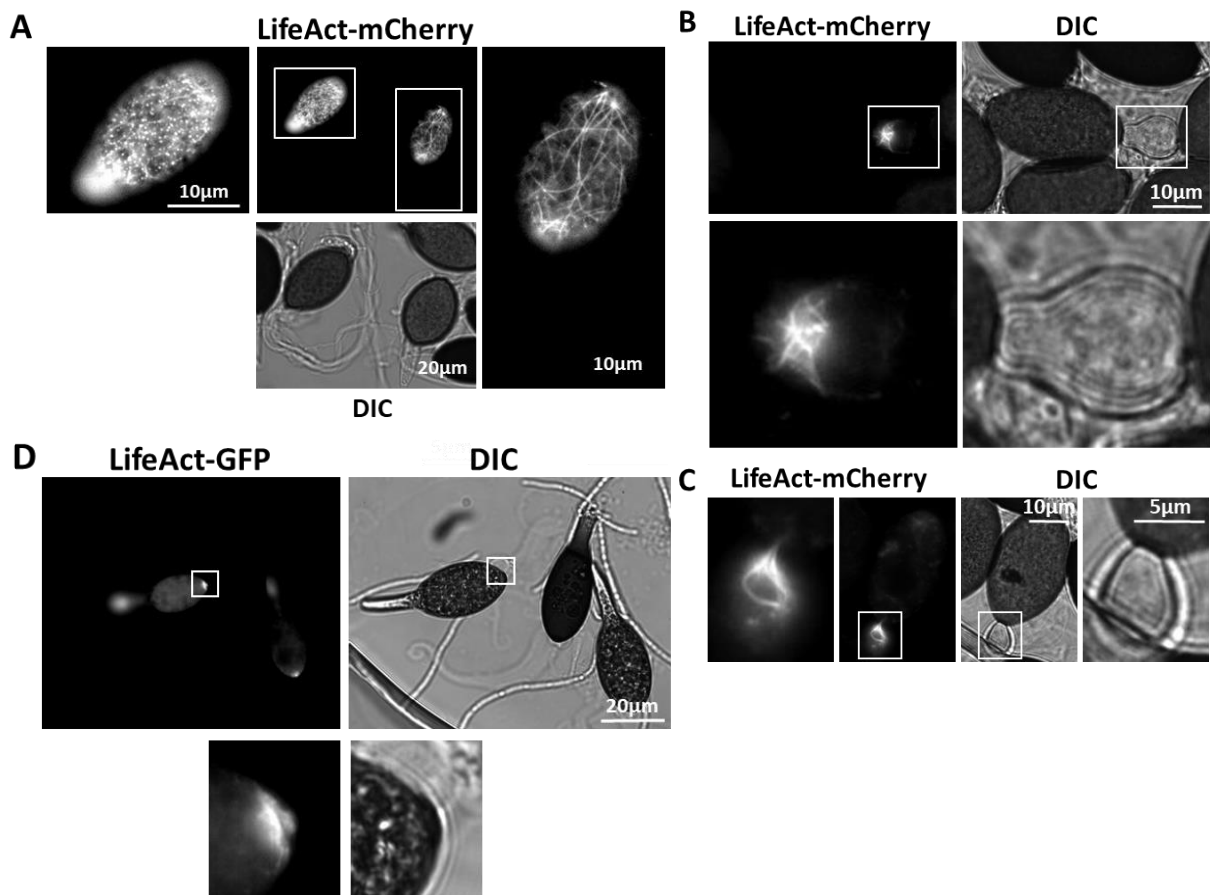


Figure 55: Marquages LifeAct-mCherry et LifeAct-GFP.

A, B et C : fluorescence rouge détectée dans des ascospores *PaPks1¹³⁶ LifeAct-mCherry*;

D : fluorescence verte détectée dans des ascospores *PaPks1¹³⁶ LifeAct-GFP*.

Microscopie à épifluorescence.

IV- Marquage de Nox2 par la GFP

Les Nox (Nox1 et Nox2) sont des protéines pour lesquelles le marquage par une protéine fluorescente a longtemps échoué, dans les cellules de mammifères comme chez les champignons (Lambeth, 2004). Notre équipe et celle du Pr. Paul Tudzynski ont été les premières à obtenir des constructions Nox1/A-GFP fonctionnelles qui ont permis de montrer que Nox1/A est une protéine présente au niveau de la membrane du reticulum endoplasmique et du système vacuolaire chez les champignons (Lacaze et al., 2015; Siegmund et al., 2013). L'équipe de P. Tudzynski a montré en parallèle que la protéine Nox2/B serait plutôt localisée à la membrane plasmique chez le champignon pathogène *B. cinerea*. Les protéines Nox ont un domaine FAD présent en C-terminal de la protéine dont la fonction est fondamentale et les échecs nombreux de marquage en C-terminal résultent sans doute de la perturbation du fonctionnement de ce domaine FAD (Sumimoto, 2008). Pour pallier ce problème, l'équipe de P. Tudzynski a choisi de placer, avec succès, le rapporteur GFP en N-terminal.

Au laboratoire, pour le marquage de PaNox1, S. Brun avait choisi une autre stratégie qui a fonctionné pour PaNox1 et que nous voulons reproduire pour le marquage de PaNox2. Ce marquage en C-terminal de PaNox1 qui s'est avéré fonctionnel (*PaNox1-GFP* complémente les phénotypes du mutant *PaNox1*³⁴³) a été réalisé en insérant comme linker entre PaNox1 et la GFP un peptide codant une hélice α d'une taille théorique de 50 Angström. En effet, Arai *et al.* ont montré que cette hélice α est rigide et permet un réel écartement et un écartement constant des protéines liées en comparaison des linker traditionnels formés d'acides aminés ne prenant aucune structure secondaire particulière et qui ne permettent pas cet écartement constant des deux protéines liées (Arai et al., 2001). Le succès du marquage fonctionnel de PaNox1 suggère que cette hélice α a permis d'écarter la GFP du domaine FAD de manière à assurer sa fonctionnalité. C'est cette stratégie que nous voulons reproduire. En ce qui concerne le contrôle de l'expression du futur transgène PaNox2-GFP, nous adopterons deux stratégies : placer PaNox2 sous ses propres séquences régulatrices (1000 pb en amont de la CDS) ou sous promoteur fort constitutif AS4. Les constructions seront clonées en amont de la GFP dans le plasmide pBC-hygro-GFP conférant la résistance à l'hygromycine. Dans les deux cas, la stratégie consistera à intégrer de manière aléatoire et ectopique le transgène dans une souche $\Delta PaNox2$, ce qui nous permettra de tester directement la fonctionnalité des constructions PaNox2-GFP sur la restauration des phénotypes mutants dont le défaut de germination et la

formation de l'appressorium de $\Delta PaNox2$ (Brun et al., 2009; Malagnac et al., 2004). Les premières étapes de clonage permettant les constructions de PaNox2-GFP sous son propre promoteur et sous promoteur AS4 ont été entreprises mais ont dû être stoppées faute de temps.

Discussion-Conclusion

Le cycle de vie des champignons présente plusieurs étapes cruciales, dont la réalisation conditionne le bon fonctionnement du cycle. Ce cycle varie d'une espèce à l'autre, celui-ci dépendant du biotope dans lequel l'espèce évolue ainsi que de son mode de vie (parasite, saprotrophe ou symbiotique). Néanmoins quel que soit le style de vie de l'espèce, celle-ci se retrouve confrontée aux mêmes besoins : acquérir des nutriments pour croître et se développer, se disperser efficacement et résister aux stress environnementaux. Au cours de ma thèse, je me suis concentré sur l'étude de deux processus développés par le champignon pour répondre à ces besoins : la formation de l'appressorium et la germination des ascospores.

L'appressorium est une structure permettant à l'espèce qui la différencie d'adhérer et de pénétrer mécaniquement la biomasse afin d'atteindre son substrat. Cette structure a été mise en évidence pour la première fois chez des espèces phytopathogènes (Frank, 1883) et a longtemps été considérée comme exclusive à ces espèces. Cependant, face à la diversité morphologique de ces structures au sein même des phytopathogènes, il a été nécessaire de définir clairement cette structure. Emmett et Parbery ont ainsi proposé de définir l'appressorium comme « Toute structure permettant d'adhérer à la surface de l'hôte pour permettre sa pénétration, quelle que soit sa morphologie » (Emmett & Parbery, 1975). De nombreuses structures correspondant à cette définition ont par la suite été découvertes chez d'autres espèces aux modes de vies différents : entomopathogènes, symbiotes mycorhiziens et plus récemment chez le saprotrophe modèle *P. anserina* (Brun et al., 2009). Mais la similarité de ces structures ne se limite pas à leur fonction, puisque chez certaines espèces, leur régulation met en jeu des acteurs communs tels que la voie de la MAPK *PaMpk2/Fus3* (orthologue de *Pmk1* chez *M. oryzae*) ou encore les complexes NADPH oxydases Nox1 et Nox2 (Brun et al., 2009; Gourgues et al., 2004; Ryder et al., 2019). Ces éléments attestent d'une plus large conservation de cette structure au sein du règne fongique que précédemment envisagé. Cependant à mon arrivée au laboratoire, le seul appressorium saprotrophe connu était celui de *P. anserina*. Nous avons alors cherché à étudier dans un premier temps la distribution de cette structure parmi un plus grand panel d'espèces saprotrophes. Nous avons ainsi dressé une liste de 38 espèces d'*Eumycota* parmi les souches que nous possédions dans notre collection, et nous avons testé leur capacité à produire un appressorium sur milieu standard recouvert d'une feuille de cellophane. Nous avons ainsi pu montrer que 24 des 38 espèces testées (soit 63%)

développent un appressorium. Parmi ces 24 espèces, on retrouve des espèces déjà connues pour développer un appressorium telles que *P. anserina* et *B. cinerea*, mais aussi des espèces pour lesquelles la formation d'un appressorium n'avait jamais été montrée telles que *N. crassa*. Par ailleurs, pour chacune de ces espèces, le développement de l'appressorium suit les mêmes étapes, apportant un argument supplémentaire allant dans le sens de la conservation de cette structure chez les champignons. Toutefois, dans ces conditions standard, les espèces de *Mucorales* (telles que *P. blakesleeanus*) et d'*Eurotiales* (telles que *A. niger*) ne forment pas d'appressorium. Il est néanmoins important de noter que dans d'autres conditions de culture ou dans leur habitat naturel, ces espèces pourraient développer un appressorium.

La formation de l'appressorium est donc un processus beaucoup plus répandu parmi les *Dikarya* que ce que l'on pensait auparavant. Bien qu'étudié extensivement chez les espèces phytopathogènes et notamment chez *M. oryzae*, de nombreuses zones d'ombre persistent quant à sa régulation. En effet, chez ces espèces, les approches de génétique directe, qui demeure la stratégie la plus puissante pour découvrir de nouveaux gènes, sont souvent difficiles à mettre en place. L'étude génétique du développement de l'appressorium chez les champignons filamenteux peut maintenant être envisagée chez des espèces modèles saprotrophes telles que *N. crassa*, *S. macrospora* et *P. anserina*, toutes étant de puissants organismes modèles génétiques. C'est dans cette optique que nous avons établi notre étude visant à découvrir de nouveaux gènes impliqués dans la formation de l'appressorium chez *P. anserina*. Pour cela un crible de mutagenèse visant à identifier des supprimeurs du défaut de pénétration causé par l'absence de gènes tels que *PaNox2*, *PaNoxR* et *PaPls1* (**Figure 15**) a été mené au laboratoire. Cependant, ce crible s'est révélé infructueux, et une autre stratégie a dû être envisagée.

Parallèlement à ça, des travaux menés précédemment au laboratoire ont montré que la germination des ascospores, un processus finement régulé et le développement de l'appressorium sont deux processus impliquant des éléments de régulation communs chez *P. anserina* (Brun & Silar, 2010; Lambou et al., 2008; Malagnac et al., 2008). En se basant sur ces résultats, nous avons élaboré une stratégie consistant à étudier la régulation de la germination des ascospores de *P. anserina* pour identifier de nouveaux régulateurs communs aux 2 mécanismes. Cette méthode peut ainsi permettre d'étudier deux mécanismes d'une importance cruciale pour le cycle de vie des champignons, simultanément. Un crible de mutagenèse U.V a ainsi été mené par P. Silar pour isoler des mutants dont les ascospores germent spontanément, témoignant d'une dérégulation de ce processus. Ce crible a permis

d'isoler 6 mutants de germination spontanée nommés *GUN* (*Germination UNcontrolled*). Ces mutants ont tous été séquencés et un gène candidat a pu être identifié pour chaque mutant.

La caractérisation du premier de ces mutants, *GUNI^{SG}*, a permis de montrer que le gène impliqué dans le phénotype de ce dernier (*Pa_6_1340/GUNI*) code une Carnitine-acétyltransférase (CAT) peroxysonale et mitochondriale. Sa délétion n'entraîne pas d'incapacité de la souche à produire un appressorium, mais un retard reproductible dans sa formation. Toutefois, les mutations de son orthologue *Pth2* chez *M. oryzae* entraîne une incapacité totale à former un appressorium, confirmant ainsi la validité de notre approche consistant à rechercher des gènes importants à la fois pour la germination des ascospores et pour la formation de l'appressorium (Bhambra et al., 2006; Ramos-Pamplona & Naqvi, 2006).

Sur le plan de la régulation de la germination des ascospores, l'étude de ce mutant a permis d'ajouter un acteur supplémentaire à cette voie de régulation qui demeure peu connue. La seule délétion de *GUNI* entraînant une incapacité totale des ascospores de *P. anserina* à germer, démontre son importance dans ce processus, et par la même, celui du transport subcellulaire de l'acétyl-CoA. Les Western Blot réalisés sur *GUNI^{SG}* ont montré que celui-ci induit la germination en provoquant l'activation constitutive de la MAPK PaMpk2, connue pour son rôle dans la germination des ascospores (Lalucque et al., 2012). De plus, les études d'épistasies ont permis de positionner *GUNI* en amont des voies *PaMpk2* et *PaNox2/PaPls1*. La démélanisation partielle des ascospores de la souche Δ *GUNI* est le premier phénotype observé associé au défaut de germination. Ce phénotype peut être relié à celui des mutants peroxysonaux qui montrent des défauts de mélanisation et de germination de leurs ascospores (Boisnard et al., 2009; Peraza Reyes and Berteaux-Lecellier, 2013; Ruprich-Robert et al., 2002). Cependant, ce phénotype semble être plus associé que responsable du défaut de germination, puisque la disparition de la mélanine conduit au phénotype opposé : la germination spontanée des ascospores (Coppin & Silar, 2007). L'acétyl-CoA constituant un des précurseurs de la mélanine (Coppin & Silar, 2007), on peut émettre l'hypothèse que la démélanisation partielle des ascospores de la souche Δ *GUNI* est symptomatique du défaut de transport subcellulaire de l'acétyl-CoA causé par l'absence de la CAT. Par ailleurs, les différents marquages réalisés de *GUNI* nous permettent de suggérer que sa localisation mitochondriale serait importante pour sa fonction dans la germination des ascospores. Or l'acétyl-CoA est essentiel au fonctionnement du cycle de Krebs, qui est connu pour fournir l'énergie nécessaire au fonctionnement de divers processus métaboliques et cellulaires (Strijbis

& Distel, 2010). D'une manière intéressante, il a été montré que les gènes associés au cycle de Krebs sont réprimés au début de la germination des ascospores de *S. cerevisiae* puis sur-exprimés au cours de leur germination (Joseph-Strauss et al., 2007). En considérant ces données, on peut émettre l'hypothèse que le processus de germination des ascospores s'accompagne d'un amorçage progressif du cycle de Krebs fournissant ainsi de l'énergie aux processus cellulaires nécessaires à l'initiation de la germination. Dans cette hypothèse, le défaut de germination de la souche $\Delta GUN1$ pourrait s'expliquer par le défaut d'apport à la mitochondrie de l'acétyl-CoA issu de la β -oxydation peroxysomale (**Figure 56**). De même, les défauts de germination et de mélanisation observés chez les mutants de peroxysomes pourraient s'expliquer par la diminution de la production d'acétyl-CoA issu de la β -oxydation peroxysomale, engendrée par le dysfonctionnement des peroxysomes.

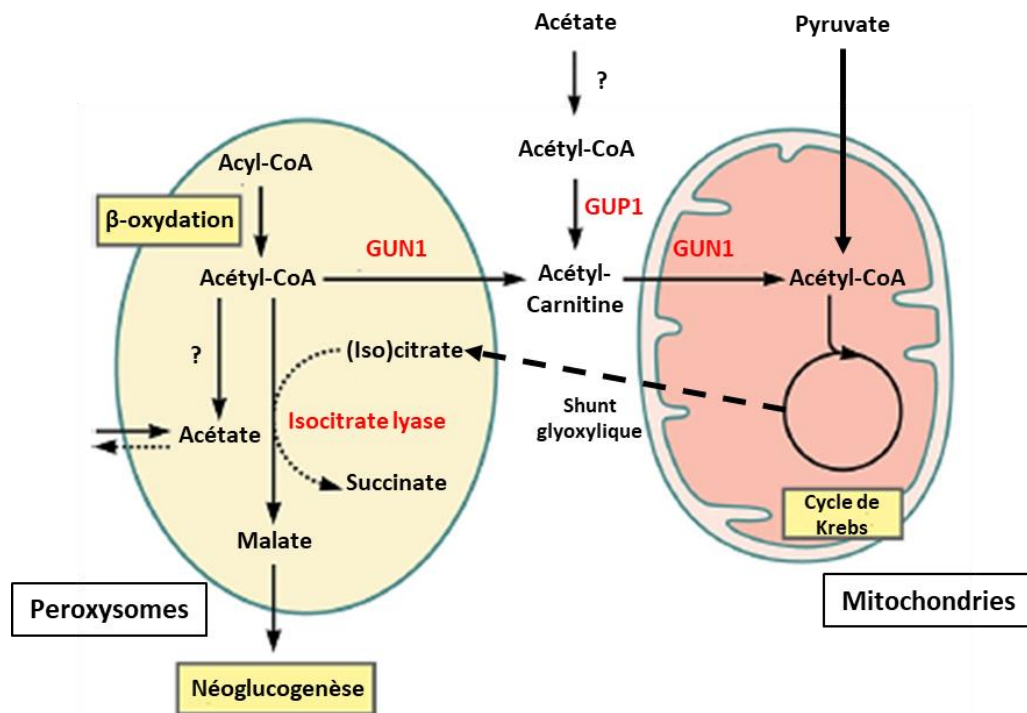


Figure 56 : Modèle simplifié du transport de l'acétyl-CoA entre les peroxysomes et les mitochondries chez *P. anserina*.

L'acétyl-CoA produit par la β -oxydation peroxysomale à l'aide de GUN1. Cet acétyl-CoA participe au fonctionnement du cycle de Krebs qui va produire de l'ATP permettant d'alimenter en énergies différents processus cellulaires conduisant à la germination des ascospores.

Adapté à partir de Strijbis & Distel, 2010.

Il est intéressant de noter que ce modèle est cohérent avec le phénotype observé pour la souche $\Delta GUP1$. En effet, l'absence de GUP1 n'impacte pas le transfert de l'acétyl-CoA vers

la mitochondrie, expliquant ainsi son phénotype de germination sauvage. Cependant, de nombreuses zones d'ombre demeurent quant au mode d'action précis de GUN1. En effet, une expérience complémentaire à mener pour consolider ce modèle consisterait à déléter le signal d'adressage aux mitochondries (MTS) de GUN1 et vérifier le phénotype de germination des ascospores de cette souche. Ceci confirmerait ou infirmerait la nécessité de sa localisation mitochondriale pour induire la germination. D'autre part, l'impossibilité de mener à bien le test d'activité enzymatique CAT sur les ascospores nous empêche de conclure sur une éventuelle corrélation entre cette activité enzymatique et la germination des ascospores. Des mises au point supplémentaires sur les conditions optimales d'analyse de la protéine GUN1 extraite d'ascospores induite ou non-induite pour la germination apporteront de précieuses réponses pour la compréhension de la fonction de GUN1, un gène induit 56 fois (dans l'analyse transcriptomique de *GUN2^{SG}*) au cours de la germination des ascospores d'une part et pour mieux cerner comment la mutation I441N de *GUNI^{SG}* provoque la levée de la dormance.

L'étude du mutant *GUN2^{SG}* a quant à elle permis d'identifier et de commencer à caractériser un nouveau facteur de transcription jamais étudié chez les champignons filamenteux (codé par le gène *Pa_4_9410/GUN2*). Une étude phylogénétique nous a permis de l'identifier en tant qu'orthologue de *Rgt1*, un facteur de transcription identifié chez *S. cerevisiae* et impliqué dans la réponse au glucose (Mosley et al., 2003; Palomino et al., 2005; Polish et al., 2005). La mutation *GUN2^{SG}* consiste en un décalage du cadre de lecture d'une paire de bases manquante entraînant l'apparition d'un codon stop prématuré et le raccourcissant la protéine de 185 AA. Les tests de pénétration de la cellophane ainsi que les observations microscopiques montrent des résultats similaires à ceux observés pour *GUN1* : la délétion de *GUN2* n'empêche pas la formation de l'appressorium, mais provoque un retard reproductible de sa formation. Bien que ce phénotype ne soit pas fort dans le cas de *P. anserina*, l'étude fonctionnelle de l'orthologue de *GUN2* à travers sa délétion chez des espèces pathogènes pourrait permettre d'identifier un nouveau facteur de virulence chez les champignons.

Au niveau de la germination des ascospores, la délétion de *GUN2* entraîne des phénotypes similaires à ceux observés chez le mutant *GUN2^{SG}* : une germination spontanée des ascospores et une croissance ralentie. Cette similarité témoigne du fait qu'à l'instar de la délétion Δ *GUN2*, *GUN2^{SG}* serait un allèle nul de *GUN2*. Les 185 AA absents de *GUN2^{SG}* sont donc essentiels à la fonction de ce facteur de transcription. Il est probable que cette portion de *GUN2* contienne le domaine de transactivation de la transcription lui permettant de réguler ses

cibles. D'une manière intéressante, le Western Blot réalisé sur le mutant *GUN2^{SG}* indique que *GUN2* agit soit en aval de la voie *PaMpk2*, ou alors participe à une autre voie parallèle à la voie *PaMpk2* de régulation de la germination des ascospores (**Figure 29**). Or, les études d'épistasies menées avec Δ *GUN1* révèlent que *GUN2* agit en amont de *GUN1*, qui lui-même a été montré comme agissant en amont de la voie *PaMpk2*. Par conséquent, l'option d'une voie de l'activation de la germination de *GUN2* par une voie de régulation parallèle à *PaMpk2* devient plus probable. Des études d'épistasies supplémentaires avec *PaNox2* et *PaPls1* doivent être menées pour préciser le placement de *GUN2* dans la voie de régulation.

Etant donné le lien d'orthologie existant entre *GUN2* et *Rgt1*, des tests ont été réalisés pour déterminer le rôle de *GUN2* dans la réponse au glucose chez *P. anserina*. D'une manière intéressante, le glucose n'a pas eu d'effet particulier quant au phénotype de croissance végétative ralentie de ces mutants ni sur la germination des ascospores. A l'inverse, il est important de noter aussi que l'absence de *GUN2* n'empêche pas l'utilisation du glucose comme source de carbone par le champignon pour croître. Toutefois on a pu observer un impact sur la fertilité avec un retard significatif dans la production de périthèces chez le mutant Δ *GUN2* spécifiquement sur M3 (glucose). Ceci suggère un rôle de *GUN2* dans la réponse au glucose au cours du développement sexuel de *P. anserina*. Chez *P. anserina*, le glucose ralentit le développement sexuel et l'absence de *GUN2* accentue l'action inhibitrice du glucose. A l'inverse, le mutant Δ *GUN2* ne subit pas l'effet inhibiteur du glucose au même titre que la souche sauvage concernant le développement de l'appressorium. A ce stade, *GUN2* n'apparaît clairement ni comme un activateur ni comme un inhibiteur dans la réponse au glucose (**Figure 57**).

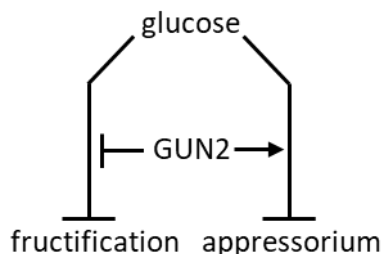


Figure 57 : Régulation de l'impact du glucose par *GUN2* sur le développement sexuel et la pénétration de la biomasse chez *P. anserina*.

D'une manière similaire à *S. cerevisiae*, le rôle de *GUN2* sur la transcription des gènes au cours de la réponse au glucose pourrait dépendre du processus développemental comme de la concentration en glucose dans le milieu.

Il sera important de porter une attention particulière aux gènes impliqués dans le métabolisme du glucose (transporteurs de sucres, glycolyse, cycle de Krebs, néoglucogénèse, tréhalogénèse, *etc.*) au cours des analyses du transcriptome des mutants *ΔGUN2* au cours de la germination. Ces analyses devraient apporter des premières réponses sur le rôle de *GUN2*.

Le transcriptome réalisé sur la souche *S* et *ΔGUN2* au cours de la germination des ascospores représente une mine d'informations sur deux modes de levée de la dormance différents : la voie « classique » d'induction de la germination par le milieu G+YE ou l'absence de l'élément de régulation génétique *GUN2* d'autre part. En d'autres termes, le but principal de l'analyse de ce transcriptome est de déterminer quels sont les gènes régulés par l'induction de la germination sur milieu G+YE, et quels sont les gènes régulés par *GUN2*. Au cours des analyses préliminaires que nous avons réalisées, nous avons pu dégager des informations globales telles que les catégories fonctionnelles différentiellement exprimées pour chaque condition, permettant de visualiser les grands changements métaboliques et physiologiques qui ont lieu au cours de la germination. La prochaine étape de l'analyse consistera à passer au niveau du gène pour identifier des au comportement singulier : fort taux d'expression, gènes dérégulés dans plusieurs des conditions analysées, *etc.* De tels gènes pourraient être des candidats à analyser fonctionnellement chez *P. anserina* (stratégie de génétique inverse), au cours de la germination comme au cours d'autres processus développementaux. L'objectif à terme de cette analyse du transcriptome au cours de la germination est d'établir comment se déroule la régulation de la transcription au niveau transcriptionnel et quel est le rôle de *GUN2* dans cette régulation. Il est évident que seules des approches de type ChIP-seq permettront de déterminer efficacement les des gènes cibles directs de *GUN2*. Dans ce cadre-ci, l'identification des séquences consensus de fixation de *GUN2* que nous avons débutée sera un élément d'information supplémentaire pour trouver ces cibles directes.

En complément de ces analyses moléculaires et génétiques sur les mutants *GUN*, nous avons cherché à mieux caractériser la nature du stimulus de germination induisant la levée de la dormance des ascospores, et quels étaient les changements induits sur le plan cytologique par la germination. L'analyse du stimulus de germination révèle que dans le cas où on utilise de l'eau pure, 3 éléments sont importants pour la germination : le Bacto peptone, l'extrait de levure et la combinaison de l'ion acétate avec l'ion ammonium. Cela fait écho aux « germinants » (nutritionnels, ou non) permettant d'activer la germination des spores bactériennes (Moir & Cooper, 2015). Etant donné la composition riche du Bacto peptone et de

l'extrait de levure, nous pouvons nous demander si leur rôle dans la germination n'est pas nutritionnel, alors que l'acétate d'ammonium constituerait plus un stimulus chimique. La caractérisation de ce stimulus requerra à l'avenir de déterminer précisément les nutriments indispensables à l'induction de la germination ainsi que l'action de l'acétate d'ammonium au sein de la spore pour mieux comprendre le processus de levée de la dormance. Au laboratoire, deux autres inducteurs de la germination des ascospores de *P. anserina* ont été identifiés par P. Silar qui les a utilisés principalement pour faire germer des ascospores d'espèces proches de *P. anserina* : le choc thermique et le peroxyde d'hydrogène. J'ai caractérisé la température optimale et le temps optimal du choc thermique pour la germination des ascospores de *P. anserina*. J'ai aussi montré qu'une certaine pression osmotique présente dans l'ascospore est nécessaire pour sa germination et qu'un milieu hyperosmotique inhibe la germination des ascospores de *P. anserina*.

Sur le plan cytologique, la construction des différentes souches marquées va nous permettre d'étudier la localisation des septines PaSpn2, PaCdc3 et de l'actine au cours de la germination des ascospores notamment chez *P. anserina*. Ces protéines du cytosquelette n'ont jamais été étudiées chez ce champignon et nos constructions permettront leur étude tout au long du cycle de vie de *P. anserina*. Avec le marquage de PaNox2, nous espérons pouvoir étudier l'ensemble de ces acteurs majeurs au cours de la germination des ascospores et de la formation de l'appressorium. Il est important de noter que la localisation de PaNox1 et PaNox2 au cours de la formation du pore de pénétration de *M. oryzae* reste inconnue. En effet, les marquages de NoxA et NoxB qui montrent ces deux protéines à la membrane plasmique chez *M. oryzae* n'ont pas été réalisés avec des protéines fonctionnelles et ne reflètent probablement pas la réalité biologique (Egan et al., 2007). Ainsi, le lieu d'action de Nox1/A et Nox2/B leur permettant le remodelage du cytosquelette au cours du processus de formation du pore et du peg de pénétration chez *M. oryzae* reste inconnu. En étudiant la localisation de PaNox1 et PaNox2 notamment au cours de la germination des ascospores chez *P. anserina*, nous voulons découvrir où agissent ces protéines membranaires productrices de ERO. Un atout majeur de *P. anserina* est la facilité et la rapidité avec lesquelles il est possible de construire des souches par croisement génétique. La construction des souches marquées pour nos protéines d'intérêt dans différents contextes mutants pour les acteurs majeurs de la signalisation de la germination comme *PaMpk2*, *PaNox2* ou *GUN1* nous permettra l'étude fonctionnelle de ces gènes sur la localisation des Nox, la formation de l'anneau de septine et la formation de l'anneau de F-actine, deux structures qui aux vues de nos premières observations pourraient effectivement se

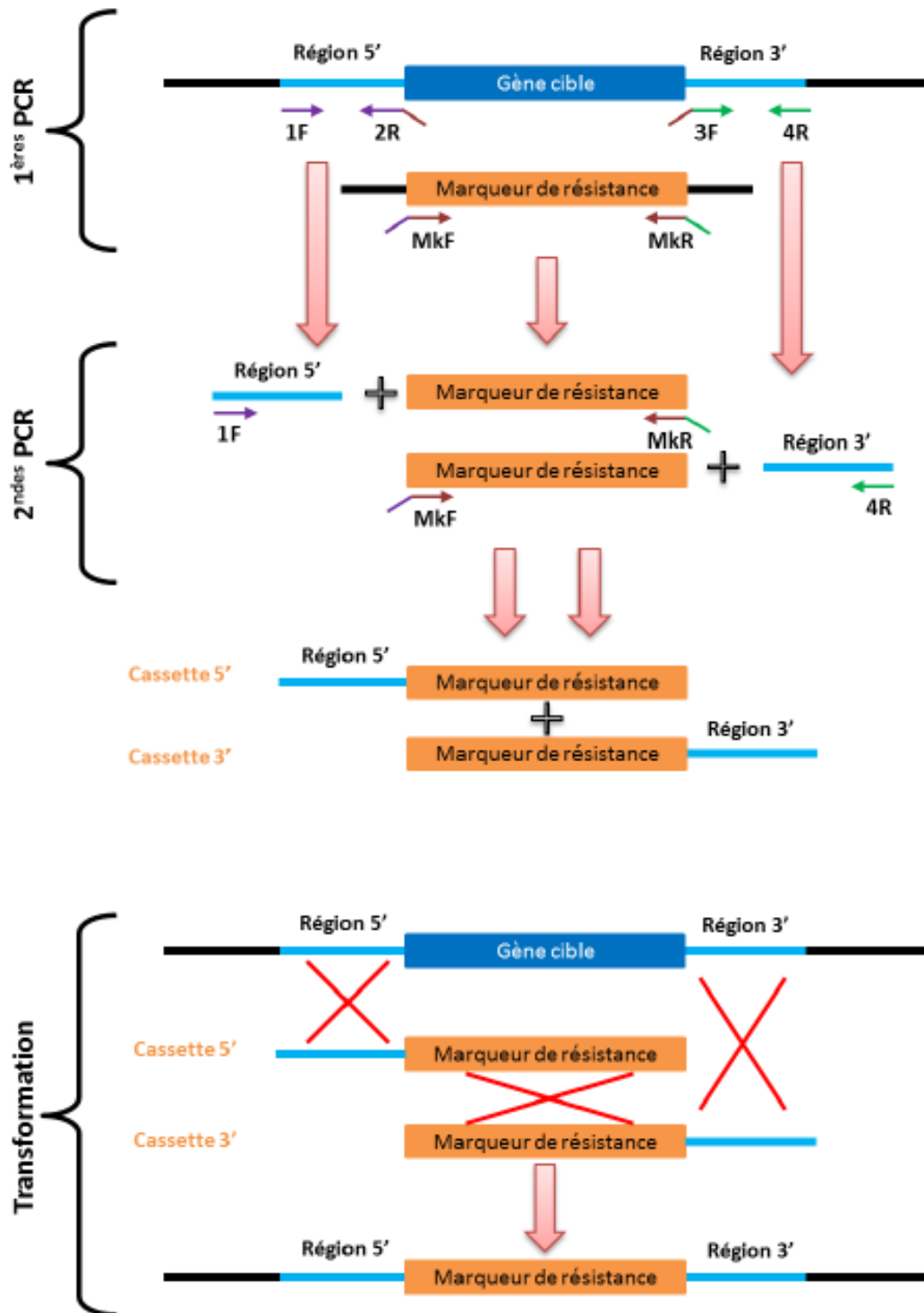
former au pore de germination chez *P. anserina*. D'autre part, l'observation de la déformation spectaculaire des noyaux au cours de leurs déplacements au cœur de l'appressorium pourrait constituer un nouveau système d'étude facile à mettre en œuvre pour étudier l'impact des déformations que subissent les noyaux, une thématique en plein essor, notamment concernant les noyaux des cellules métastatiques qui se déforment pour migrer à travers les tissus (Gollosi et al., 2019). De plus, ce mouvement des noyaux fait écho au mouvement des noyaux observés au cours de l'infection de *M. oryzae*. Chez ce champignon, il a été montré un couplage entre le cycle cellulaire et les différentes étapes de l'infection (Wilson and Talbot, 2009).

En résumé, au cours de ma thèse, j'ai abordé les mécanismes de formation de l'appressorium et de germination des ascospores sous deux angles différents : d'un point de vue génétique et moléculaire en cherchant à identifier de nouveaux acteurs des voies de régulation de ces deux processus, et d'un point de vue physiologique et cytologique pour mieux appréhender ces processus dans leur ensemble. L'étude des deux premiers mutants *GUN* a permis d'identifier deux nouveaux acteurs clés dans la régulation de la germination des ascospores de *P. anserina*. Quatre autres mutants *GUN* sont en cours d'étude au laboratoire. Leur génome a été séquencé et j'ai déterminé pour chacun d'entre eux un gène candidat dont la mutation serait à l'origine de la germination spontanée observée. Bien que l'orthologue de *GUN1*, *Pth2*, avait déjà été étudiée chez *M. oryzae*, son identification chez *P. anserina* par notre méthode rend l'étude des 4 autres mutants *GUN* très prometteuse pour comprendre non seulement la régulation génétique de la germination des ascospores chez *P. anserina*, mais aussi d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans le développement des appressoria. De plus, 3 de ces 4 mutants sont potentiellement affectés dans des gènes impliqués dans le cycle de l'acétyl-CoA, soulignant l'importance de ce métabolisme dans la levée de la dormance chez *P. anserina*. L'utilisation de ce champignon permet ainsi d'identifier rapidement et efficacement des gènes d'intérêt pour ces 2 mécanismes grâce aux approches de génétique directe. Les gènes ainsi identifiés peuvent alors être testés et étudiés chez les espèces d'intérêt, permettant un gain de temps précieux.

Annexes

MDVTKPDPDAEGVVMQQSYSPMVDSADAQYYQLANHREHDGQMAAHQGGQEVDPGLPNLTAHQEHHEHEEH
 HDLHELQELQEPAPQHQDSRPQVSADELQLAAQLTQGLTQGMNQMMAPADMATVESEVQEQQPLPQQLGEEHQ
 QHQQQQAEVQAPSVPNLQEQLEASLQNHRELQNNHNLQNNHEHELQDHNHELQGHHELQAHNHELQNHGL
 QVENVMPHHEQTQTHHHFPQNPPLPHLPTHLSMEHMPSVHPTYQMPDNTPPRKRKSVSRACDECRRKKIKCDAQS
 EASEQACSNCRSSAQCLFSRVPQKRGPSKGRYIKELADRINSIEGKLSNVAAADGLEDTRRSSEAFASPVLGDDGRK
 RPFSSISADPYATAASPNIPTTYGTEHRPILPYVHPDFRPPNPASANDLALKTMPPLPTFSPGNELGLQSQADGLMDSI
 SPNGTTGQSHQPDHHHHHHHQQLPEIDDATFDKYLEAIHPTFPVLASTKARVQSLWQASFLQNAFHQAFFAMIQ
 PFSPEVPGGDLMVASRLLSAELAQQGRSPPEDLLTLQGLVMLIIASDCQGVSAAGTAKWKNVGFQAVGLGWAMGLHT
 RRVPEVEEGFDPNSDDNVGLRAWVVLVTLDRWDAAGRGRPTFMPNDTVVVLPLGKAVVGEVWELIRLSHVLGFLI
 PTISTMRNSLDPFAASASLVMAENYALMAAEMVRLAFPTGAVSTGPVVQMAYWHVQILRQLVGASRVPLRILEACKS
 QVSLANSHEVVCPLTHHFLGLVGVVALVELGRVKETEEEEAGELVGYLLEYRIAASSWNEEVRRGLEGVRRGKGLRRLAEL
 ATGDGQGRGEMGRVLGEGYLSFWERSDEEGRVEEAEGHGQEEQHHGEVQQPEAPLQEAQQGQGEDVVMHDE
 PDPGQAQRAQEDEEKAHAAVAVAVAIAKSAGLSAAGEAETIPAPVGEVGVSKTEEQQLQSHPVVEGGHQGGDIGL
 GLQMALGVAPPPAAV

Annexe 1 : Séquence protéique de la protéine codée par le gène *GUN2* (*Pa_4_9410*). La partie de la séquence surlignée en jaune correspond à la région absente de la protéine $GUN2^{SG}$, en raison du codon stop engendré par la mutation de $GUN2^{SG}$.



Annexe 2 : Principe de la délétion d'un gène par cassette.

L'amplification par PCR des régions 5' et 3' avec des amorces spécifiques permet de fusionner les fragments 5' et 3' respectivement avec le marqueur de résistance désiré pour former deux cassettes 5' et 3'. Lors de la transformation, trois événements de recombinaison sont alors nécessaires pour insérer la cassette de délétion à la place du gène cible. D'après (Silar, 2013).

PRIMER	SEQUENCE
9410F1	GCAGCTGGGAAAGTTTGTAAATGAGGAGGGT
9410R2	GGCTGGTCGTCGTGCCCAAAAGCGC
9410F3	GGTAATGATGCTGGTGGGGCAGAGGTA
9410R4	TGTGTGATAATAGGGTGTGTGGAGATGGTA
9410MkF	GCGCTTTTGGGGCACGACGACCAGCCCAGTTTCAGGGCAGGGTCGTAAATAG
9410MkR	TACCTCTGCCCCACCAGCATCATTACCCATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAG
9410R5	GGTCTGAAGATTATGATTCTGG
9410F4	GAAGGAGGCTCGGATAGGTTT
9410F5	CAGAAGCGTGGTCCGAGTAAA
9410F6	ACACGGTTGTTGTGTTGCCT

Annexe 3 : Tableau des amorces utilisées dans l'étude du gène *GUN2* (Pa_4_9410)

M2	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
$\Delta GUN2 - S == 0$	-0.6912	0.2500	-2.766	0.0156
$GUN2-SG - S == 0$	-1.2877	0.2500	-5.152	<0.001
$GUN2-SG - \Delta GUN2 == 0$	-0.5965	0.2500	-2.386	0.0448

M3	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
$\Delta GUN2 - S == 0$	0.439804	0.283894	1.549	0.268
$GUN2-SG - S == 0$	-0.002026	0.283894	-0.007	1.000
$GUN2-SG - \Delta GUN2 == 0$	-0.441831	0.283894	-1.556	0.265

M0 + Acétate	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
$\Delta GUN2 - S == 0$	-0.10207	0.35543	-0.287	0.956
$GUN2-SG - S == 0$	-0.11769	0.35543	-0.331	0.941
$GUN2-SG - \Delta GUN2 == 0$	-0.01562	0.35543	-0.044	0.999

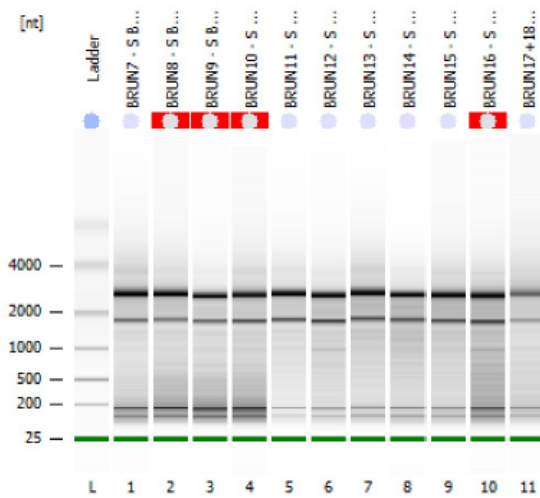
M0 + A. oléique	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
$\Delta GUN2 - S == 0$	-0.3500	0.3362	-1.041	0.551
$GUN2-SG - S == 0$	-0.6083	0.3362	-1.810	0.166
$GUN2-SG - \Delta GUN2 == 0$	-0.2583	0.3362	-0.768	0.722

Annexe 4 : Analyse stratifiée menée sur les données de croissance des souches *S*, $\Delta GUN2$ et $GUN2^{SG}$ sur les milieux M2, M3, M0+Acétate, M0+Acide oléique. La croissance des souches a été comparée 2 à 2 pour chaque milieu. Le seuil de significativité est fixé à $p=0.05$.

Assay Class: Eukaryote Total RNA Pico
 Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Pico_DE72901752_2019-09-11_12-50-39.xad

Created: 9/11/2019 12:50:39 PM
 Modified: 9/11/2019 2:02:58 PM

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

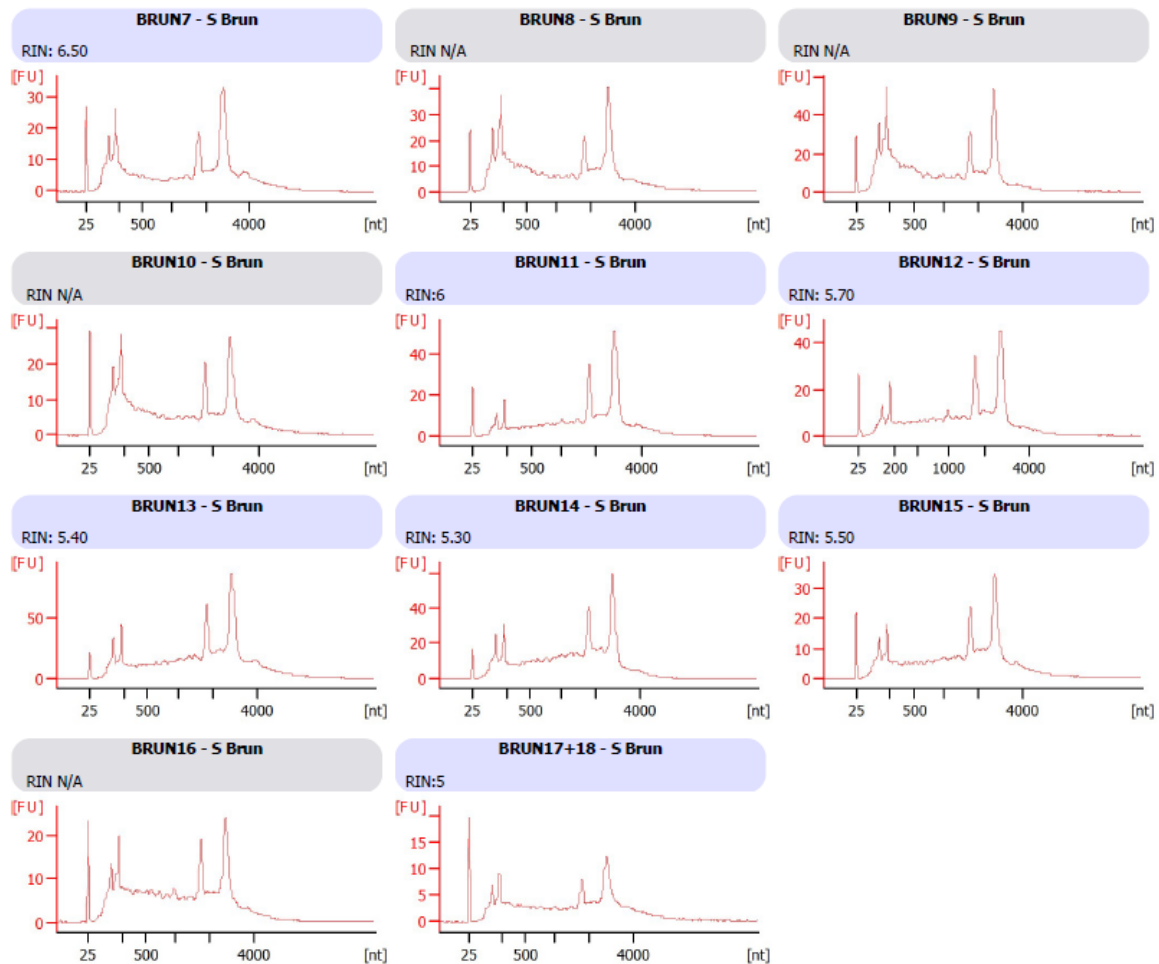
Instrument Name: DE72901752 Firmware: C.01.069
 Serial#: DE72901752 Type: G2939A

Assay Information:

Assay Origin Path: C:\Program Files\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\assays\RNA\Eukaryote Total RNA Pico Series II.xsy
 Assay Class: Eukaryote Total RNA Pico
 Version: 2.6
 Assay Comments: Total RNA Analysis pg sensitivity (Eukaryote)
 © Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Chip Information:

Chip Lot #:
 Reagent Kit Lot #:
 Chip Comments:



Annexe 5 : Résumé de la qualité des échantillons d'ARN envoyés à la plateforme de séquençage.

Identifiant du gène	Annotation	Fonction
Pa_6_7930	paraGpa	GPCR
Pa_7_7970	Gpa1	GPCR
Pa_5_11490	Gpa4	GPCR
Pa_7_9770	Ste18 (Gg)	GPCR
Pa_7_6570	Ste4 (Gb)	GPCR
Pa_1_23950	Gpa3-mod-D	GPCR
Pa_2_10260	Gpa2	GPCR
Pa_6_1060	GPR1	GPCR
Pa_5_10860	paraGpa	GPCR
Pa_6_1340	GUN1	GUN
Pa_2_12610	GUN6	GUN
Pa_1_2550	GUN5	GUN
Pa_4_9410	GUN2	GUN
Pa_4_7290	GUN3/PEX20	GUN
Pa_6_1590	GUN4	GUN
Pa_6_9890	Spod1 (IPK2)	inositol signalling
Pa_7_5180	IPK1	inositol signalling
Pa_1_18990	phospholipase Cpara	inositol signalling
Pa_1_23720	VIP1	inositol signalling
Pa_7_70	phospholipase Cpara	inositol signalling
Pa_6_4660	KCS1	inositol signalling
Pa_7_8960	phospholipase C	inositol signalling
Pa_2_2390	phospholipase Cpara	inositol signalling
Pa_7_8030	Tlk2	MAPK
Pa_7_10270	Mkk1	MAPK
Pa_1_23930	Mpk3	MAPK
Pa_1_15320	Mkk3	MAPK
Pa_2_820	Mkk2	MAPK
Pa_5_9370	Ask1	MAPK
Pa_3_8520	IDC1	MAPK
Pa_5_5680	Mpk2	MAPK
Pa_2_13340	Mpk1	MAPK
Pa_1_7440	So1	MAPK
Pa_1_1280	Hok3	MAPK
Pa_1_19270	Pls1	Nox
Pa_1_2410	Nox1	Nox
Pa_1_7250	NoxD	Nox
Pa_5_9580	Nox2	Nox
Pa_7_11300	NoxR	Nox
Pa_1_5020	Nox3	Nox
Pa_6_570	Bem1	Nox
Pa_5_10060	Cdc24	Nox
Pa_2_510	Pks1	PKS1
Pa_2_11810	Cdc12	SEPTIN
Pa_3_5760	Spn2	SEPTIN

Pa_1_22220	Spn3	SEPTIN
Pa_3_4770	Cdc3	SEPTIN
Pa_7_10360	Asp2	SEPTIN
Pa_1_20240	Asp1	SEPTIN
Pa_2_220	Sln1	signalling
Pa_6_4050	Rho-like	signalling
Pa_3_3110	Rho-like	signalling
Pa_1_2385	Ras	signalling
Pa_6_8430	PkC	signalling
Pa_7_9860	Cdc42	signalling
Pa_6_3340	Rgs1 ?	signalling
Pa_1_19070	Rac	signalling
Pa_2_1010	paraRas	signalling
Pa_5_5910	Skn7	signalling
Pa_3_7060	Rho-like	signalling
Pa_1_17910	Rim15	signalling
Pa_1_21260	SSk1 (mcs4)	signalling
Pa_3_7200	Ypd1	signalling
Pa_1_3040	Cyr1/PaAC	signalling
Pa_1_15380	Rho-like	signalling
Pa_4_9630	Tor1	signalling
Pa_7_8890	PkA	signalling
Pa_7_900	Rho-like	signalling
Pa_2_10130	neutral trehalase	TREHALASE
Pa_1_2050	acidic trehalase	TREHALASE

Annexe 6 : Liste des gènes d'intérêt à étudier dans les différentes conditions du transcriptome.

AMORCE	SEQUENCE
Spn2F1	CGTGAGCGCTACATTCAGGACACGCGCATC
Spn2_GFPF1	AGCTCGCAAAGAATGACCATGAACGGCTACATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCCACC
GFP_Spn2R1	GGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATGTAGCCGTTTCATGGTCATTCTTTGCGAGCT
GFPR3	TTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGT
Spn2F2	GCTCTTGGCCCTCAAGGA
Spn2F3	CAGCACTCGGCCTACCTC
Spn2_mCHF1	AGCTCGCAAAGAATGACCATGAACGGCTACATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATG
mCH_Spn2R1	CATGTTATCCTCCTCGCCCTTGCTCACCATGTAGCCGTTTCATGGTCATTCTTTGCGAGCT
mCHERRYR3	CTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGCCGGT
Cdc3F1	CTCCACACCAAGGTCAACCTGATCCCAGTC
Cdc3_GFPR1	GAACCGAAGAGGAAGGGCTTTTCGCTCCGGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCCACC
GFP_Cdc3R1	GGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATCCGGAGCGAAAAGCCCTTCCTCTTCGGTTC
Cdc3F2	TGAAGCAGAGCGAAGAGGA
Cdc3_mCHF1	GAACCGAAGAGGAAGGGCTTTTCGCTCCGGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATG
mCH_Cdc3R1	CATGTTATCCTCCTCGCCCTTGCTCACCATCCGGAGCGAAAAGCCCTTCCTCTTCGGTTC
Cdc3F3	CACTGGCCACTCCCTCAA

Annexe 7 : Tableau des amorces utilisées pour le marquage des septines Spn2 et Cdc3

Bibliographie

- Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Hewitt, D., and Hansberg, W. (2005). Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol.* *13*, 111–118.
- Al-Bader, N., Vanier, G., Liu, H., Gravelat, F.N., Urb, M., Hoareau, C.M.-Q., Campoli, P., Chabot, J., Filler, S.G., and Sheppard, D.C. (2010). Role of Trehalose Biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* Development, Stress Response, and Virulence. *Infection and Immunity* *78*, 3007–3018.
- Alexa, A., Rahnenführer, J., and Lengauer, T. (2006). Improved scoring of functional groups from gene expression data by decorrelating GO graph structure. *Bioinformatics* *22*, 1600–1607.
- Al-Khayri, J.M., and Al-Bahrany, A.M. (2002). Callus Growth and Proline Accumulation in Response to Sorbitol and Sucrose-Induced Osmotic Stress in Rice. *Biologia Plantarum* *45*, 609–611.
- Andlar, M., Rezić, T., Mardetko, N., Kracher, D., Ludwig, R., and Šantek, B. (2018). Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Eng. Life Sci.* *18*, 768–778.
- Arai, R., Ueda, H., Kitayama, A., Kamiya, N., and Nagamune, T. (2001). Design of the linkers which effectively separate domains of a bifunctional fusion protein. *Protein Eng Des Sel* *14*, 529–532.
- Armentrout, V.N., and Downer, A.J. (1987). Infection cushion development by *Rhizoctonia solani* on cotton. *Phytopathology* *77*, 619–623.
- Backhouse, D., and Willetts, H.J. (1987). Development and structure of infection cushions of *Botrytis cinerea*. *Transactions of the British Mycological Society* *89*, 89–95.
- Bailey, T.L., Johnson, J., Grant, C.E., and Noble, W.S. (2015). The MEME Suite. *Nucleic Acids Research* *43*, W39–W49.
- Baldrian, P., and Valášková, V. (2008). Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* *32*, 501–521.
- Baltussen, T.J.H., Coolen, J.P.M., Zoll, J., Verweij, P.E., and Melchers, W.J.G. (2018). Gene co-expression analysis identifies gene clusters associated with isotropic and polarized growth in *Aspergillus fumigatus* conidia. *Fungal Genet. Biol.* *116*, 62–72.
- Baltussen, T.J.H., Zoll, J., Verweij, P.E., and Melchers, W.J.G. (2020). Molecular Mechanisms of Conidial Germination in *Aspergillus* spp. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *84*.
- Balzerque, C., Puech-Pagès, V., Bécard, G., and Rochange, S.F. (2011). The regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate in pea involves early and systemic signalling events. *J Exp Bot* *62*, 1049–1060.
- Baskin, J.M., and Baskin, C.C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* *14*, 1–16.
- Bastias, D.A., Martínez-Ghersa, M.A., Ballaré, C.L., and Gundel, P.E. (2017). Epichloë Fungal Endophytes and Plant Defenses: Not Just Alkaloids. *Trends in Plant Science* *22*, 939–948.
- Bennett, J.W., and Chung, K.-T. (2001). Alexander Fleming and the discovery of penicillin. In *Advances in Applied Microbiology*, (Academic Press), pp. 163–184.

- Berepiki, A., and Read, N.D. (2013). Septins Are Important for Cell Polarity, Septation and Asexual Spore Formation in *Neurospora crassa* and Show Different Patterns of Localisation at Germ Tube Tips. *PLoS ONE* 8, e63843.
- Berepiki, A., Lichius, A., Shoji, J.Y., Tilsner, J., and Read, N.D. (2010). F-Actin Dynamics in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* 9, 547–557.
- Berepiki, A., Lichius, A., and Read, N.D. (2011). Actin organization and dynamics in filamentous fungi. *Nat Rev Microbiol* 9, 876–887.
- Berteaux-Lecellier, V., Picard, M., Thompson-Coffe, C., Zickler, D., Panvier-Adoutte, A., and Simonet, J.M. (1995). A nonmammalian homolog of the PAF1 gene (Zellweger syndrome) discovered as a gene involved in caryogamy in the fungus *Podospora anserina*. *Cell* 81, 1043–1051.
- Bewley, J. (1997). Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell* 9, 1055–1066.
- Bhambra, G.K., Wang, Z.-Y., Soanes, D.M., Wakley, G.E., and Talbot, N.J. (2006). Peroxisomal carnitine acetyl transferase is required for elaboration of penetration hyphae during plant infection by *Magnaporthe grisea*. *Mol. Microbiol.* 61, 46–60.
- Bhattacharjee, D., McAllister, K.N., and Sorg, J.A. (2016). Germinants and Their Receptors in Clostridia. *J. Bacteriol.* 198, 2767–2775.
- Boisnard, S., Espagne, E., Zickler, D., Bourdais, A., Riquet, A.-L., and Berteaux-Lecellier, V. (2009). Peroxisomal ABC transporters and β -oxidation during the life cycle of the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal Genetics and Biology* 46, 55–66.
- Bonfante, P., and Genre, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nat Commun* 1, 1–11.
- Bonnet, C., Espagne, E., Zickler, D., Boisnard, S., Bourdais, A., and Berteaux-Lecellier, V. (2006). The peroxisomal import proteins PEX2, PEX5 and PEX7 are differently involved in *Podospora anserina* sexual cycle. *Molecular Microbiology* 62, 157–169.
- Brown, G.D., Denning, D.W., Gow, N.A.R., Levitz, S.M., Netea, M.G., and White, T.C. (2012). Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Science Translational Medicine* 4, 165rv13-165rv13.
- Brun, S., and Silar, P. (2010). Convergent Evolution of Morphogenetic Processes in Fungi. In *Evolutionary Biology – Concepts, Molecular and Morphological Evolution: 13th Meeting 2009*, P. Pontarotti, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer), pp. 317–328.
- Brun, S., Malagnac, F., Bidard, F., Lalucque, H., and Silar, P. (2009a). Functions and regulation of the Nox family in the filamentous fungus *Podospora anserina*: a new role in cellulose degradation. *Mol. Microbiol.* 74, 480–496.
- Brun, S., Malagnac, F., Bidard, F., Lalucque, H., and Silar, P. (2009b). Functions and regulation of the Nox family in the filamentous fungus *Podospora anserina*: a new role in cellulose degradation. *Molecular Microbiology* 74, 480–496.
- Burke, V., Sprague, A., and Barnes, L. (1925). Dormancy in Bacteria. *The Journal of Infectious Diseases* 36, 555–560.
- Bushnell, W.R. (1972). Physiology of Fungal Haustoria. *Annual Review of Phytopathology* 10, 151–176.

- Cagas, S.E., Jain, M.R., Li, H., and Perlin, D.S. (2011). The Proteomic Signature of *Aspergillus fumigatus* During Early Development. *Mol Cell Proteomics* 10.
- Cai, X., Yan, J., Liu, C., Xing, J., Ren, Z., Hendy, A., Zheng, L., Huang, J., and Chen, X.-L. (2020). Perilipin LDP1 coordinates lipid droplets formation and utilization for appressorium-mediated infection in *Magnaporthe oryzae*. *Environ. Microbiol.*
- Cano-Domínguez, N., Álvarez-Delfín, K., Hansberg, W., and Aguirre, J. (2008). NADPH Oxidases NOX-1 and NOX-2 Require the Regulatory Subunit NOR-1 To Control Cell Differentiation and Growth in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* 7, 1352–1361.
- Castanheira, S., and Pérez-Martín, J. (2015). Appressorium formation in the corn smut fungus *Ustilago maydis* requires a G2 cell cycle arrest. *Plant Signal Behav* 10, e1001227.
- Chan Ho Tong, L., Silar, P., and Lalucque, H. (2014). Genetic control of anastomosis in *Podospira anserina*. *Fungal Genetics and Biology* 70, 94–103.
- Chandler-Brown, D., Choi, H., Park, S., Ocampo, B.R., Chen, S., Le, A., Sutphin, G.L., Shamieh, L.S., Smith, E.D., and Kaerberlein, M. (2015). Sorbitol treatment extends lifespan and induces the osmotic stress response in *Caenorhabditis elegans*. *Front Genet* 6.
- Chang, M.-H., Chae, K.-S., Han, D.-M., and Jahng, K.-Y. (2004). The GanB Galpha-protein negatively regulates asexual sporulation and plays a positive role in conidial germination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 167, 1305–1315.
- Chen, M., Arato, M., Borghi, L., Nouri, E., and Reinhardt, D. (2018). Beneficial Services of Arbuscular Mycorrhizal Fungi – From Ecology to Application. *Front Plant Sci* 9.
- Chumley, F.G., and Valent, B. (1990). Genetic analysis of melanin-deficient, nonpathogenic mutants of *Magnaporthe grisea*. p.
- Clarkson, J.M., and Charnley, A.K. (1996). New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends Microbiol.* 4, 197–203.
- Clergeot, P.H., Gourgues, M., Cots, J., Laurans, F., Latorse, M.P., Pepin, R., Tharreau, D., Notteghem, J.L., and Lebrun, M.H. (2001). PLS1, a gene encoding a tetraspanin-like protein, is required for penetration of rice leaf by the fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 6963–6968.
- Coppin, E., and Silar, P. (2007a). Identification of PaPKS1, a polyketide synthase involved in melanin formation and its use as a genetic tool in *Podospira anserina*. *Mycol. Res.* 111, 901–908.
- Coppin, E., and Silar, P. (2007b). Identification of PaPKS1, a polyketide synthase involved in melanin formation and its use as a genetic tool in *Podospira anserina*. *Mycological Research* 111, 901–908.
- Couturier, M., Tangthirasunun, N., Ning, X., Brun, S., Gautier, V., Bennati-Granier, C., Silar, P., and Berrin, J.-G. (2016). Plant biomass degrading ability of the coprophilic ascomycete fungus *Podospira anserina*. *Biotechnol. Adv.* 34, 976–983.
- Cox, A.D., and Der, C.J. (2010). Ras history. *Small GTPases* 1, 2–27.
- Cramer, R.A., Perfect, B.Z., Pinchai, N., Park, S., Perlin, D.S., Asfaw, Y.G., Heitman, J., Perfect, J.R., and Steinbach, W.J. (2008). Calcineurin target CrzA regulates conidial germination, hyphal growth, and pathogenesis of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell* 7, 1085–1097.

- Dagdas, Y.F., Yoshino, K., Dagdas, G., Ryder, L.S., Bielska, E., Steinberg, G., and Talbot, N.J. (2012a). Septin-mediated plant cell invasion by the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Science* 336, 1590–1595.
- Dagdas, Y.F., Yoshino, K., Dagdas, G., Ryder, L.S., Bielska, E., Steinberg, G., and Talbot, N.J. (2012b). Septin-Mediated Plant Cell Invasion by the Rice Blast Fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Science* 336, 1590–1595.
- Danquah, A., de Zelicourt, A., Colcombet, J., and Hirt, H. (2014). The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnol. Adv.* 32, 40–52.
- Dara, S.K., Montalva, C., and Barta, M. (2019). Microbial Control of Invasive Forest Pests with Entomopathogenic Fungi: A Review of the Current Situation. *Insects* 10.
- Dean, R., Kan, J. a. L.V., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Pietro, A.D., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., et al. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13, 414–430.
- Deising, H.B. (2009). *Plant Relationships* (Springer Science & Business Media).
- Deising, H.B., Werner, S., and Wernitz, M. (2000). The role of fungal appressoria in plant infection. *Microbes Infect.* 2, 1631–1641.
- Devi, K.U., Padmavathi, J., Rao, C.U.M., Khan, A.A.P., and Mohan, M.C. (2008). A study of host specificity in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Hypocreales, Clavicipitaceae). *Biocontrol Science and Technology* 18, 975–989.
- DeZwaan, T.M., Carroll, A.M., Valent, B., and Sweigard, J.A. (1999). *Magnaporthe grisea* pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues. *Plant Cell* 11, 2013–2030.
- Dijksterhuis, J., and Teunissen, P.G.M. (2004). Dormant ascospores of *Talaromyces macrosporus* are activated to germinate after treatment with ultra high pressure. *Journal of Applied Microbiology* 96, 162–169.
- Ding, W.V., and Johnston, S.A. (1997). The DNA binding and activation domains of Gal4p are sufficient for conveying its regulatory signals. *Mol Cell Biol* 17, 2538–2549.
- Dirschnabel, D.E., Nowrousian, M., Cano-Domínguez, N., Aguirre, J., Teichert, I., and Kück, U. (2014). New Insights Into the Roles of NADPH Oxidases in Sexual Development and Ascospore Germination in *Sordaria macrospora*. *Genetics* 196, 729–744.
- Dixon, K.P., Xu, J.-R., Smirnov, N., and Talbot, N.J. (1999). Independent Signaling Pathways Regulate Cellular Turgor during Hyperosmotic Stress and Appressorium-Mediated Plant Infection by *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell* 11, 2045–2058.
- Doehlemann, G., Ökmen, B., Zhu, W., and Sharon, A. (2017). *Plant Pathogenic Fungi*. *Microbiology Spectrum* 5.
- Driks, A. (2002). Overview: development in bacteria: spore formation in *Bacillus subtilis*. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 59, 389–391.
- Druzhinina, I.S., and Kubicek, C.P. (2017). Genetic engineering of *Trichoderma reesei* cellulases and their production. *Microb. Biotechnol.* 10, 1485–1499.

- Durrens, P., Laigret, F., Labarère, J., and Bernet, J. (1979). *Podospora anserina* mutant defective in protoperithecium formation, ascospore germination, and cell regeneration. *Journal of Bacteriology* *140*, 835–842.
- Egan, M.J., Wang, Z.-Y., Jones, M.A., Smirnov, N., and Talbot, N.J. (2007). Generation of reactive oxygen species by fungal NADPH oxidases is required for rice blast disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *104*, 11772–11777.
- Eicher, R., and Ludwig, H. (2002). Influence of activation and germination on high pressure inactivation of ascospores of the mould *Eurotium repens*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* *131*, 595–604.
- El-Khoury, R., Sellem, C.H., Coppin, E., Boivin, A., Maas, M.F.P.M., Debuchy, R., and Sainsard-Chanet, A. (2008). Gene deletion and allelic replacement in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Curr Genet* *53*, 249–258.
- Emerson, M.R. (1948). Chemical Activation of Ascospore Germination in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* *55*, 327–330.
- Emmett, and Parbery, and D.G. (1975). Appressoria. *Annual Review of Phytopathology* *13*, 147–165.
- d'Enfert, C. (1997). Fungal Spore Germination: Insights from the Molecular Genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* *21*, 163–172.
- d'Enfert, C., and Fontaine, T. (1997). Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* *treA* gene encoding an acid trehalase required for growth on trehalose. *Mol. Microbiol.* *24*, 203–216.
- d'Enfert, C., Bonini, B.M., Zapella, P.D., Fontaine, T., da Silva, A.M., and Terenzi, H.F. (1999). Neutral trehalases catalyse intracellular trehalose breakdown in the filamentous fungi *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.* *32*, 471–483.
- Enoch, D.A., Yang, H., Aliyu, S.H., and Micallef, C. (2017). The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections. In *Human Fungal Pathogen Identification: Methods and Protocols*, T. Lion, ed. (New York, NY: Springer), pp. 17–65.
- Espagne, E., Lespinet, O., Malagnac, F., Da Silva, C., Jaillon, O., Porcel, B.M., Couloux, A., Aury, J.-M., Ségurens, B., Poulain, J., et al. (2008a). The genome sequence of the model ascomycete fungus *Podospora anserina*. *Genome Biol.* *9*, R77.
- Espagne, E., Lespinet, O., Malagnac, F., Da Silva, C., Jaillon, O., Porcel, B.M., Couloux, A., Aury, J.-M., Ségurens, B., Poulain, J., et al. (2008b). The genome sequence of the model ascomycete fungus *Podospora anserina*. *Genome Biol.* *9*, R77.
- Fang, W., Pava-ripoll, M., Wang, S., and St Leger, R. (2009). Protein kinase A regulates production of virulence determinants by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Genet. Biol.* *46*, 277–285.
- Fenner, M. (2000). *Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities* (CABI).
- Feofilova, E.P., Tereshina, V.M., Garibova, L.V., Zav'yalova, L.A., Memorskaya, A.S., and Maryshova, N.S. (2004). Germination of Basidiospores of *Agaricus bisporus*. *Applied Biochemistry and Microbiology* *40*, 186–191.
- Figueiredo, D.D., and Köhler, C. (2018). Auxin: a molecular trigger of seed development. *Genes Dev* *32*, 479–490.

- Fillinger, S., Chaverroche, M.-K., Shimizu, K., Keller, N., and d'Enfert, C. (2002). cAMP and ras signalling independently control spore germination in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* *44*, 1001–1016.
- Finch-Savage, W.E., and Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* *171*, 501–523.
- Fisher, M.C., Henk, D.A., Briggs, C.J., Brownstein, J.S., Madoff, L.C., McCraw, S.L., and Gurr, S.J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* *484*, 186–194.
- Fox, D.S., and Heitman, J. (2002). Good fungi gone bad: the corruption of calcineurin. *Bioessays* *24*, 894–903.
- Frank, B. (1883). Ueber einige neue und weniger bekannte Pflanzenkrankheiten. (Ber. Dtsch. Bot. Ges), pp. 29–34.
- Fujihara, N., Sakaguchi, A., Tanaka, S., Fujii, S., Tsuji, G., Shiraishi, T., O'Connell, R., and Kubo, Y. (2010). Peroxisome Biogenesis Factor PEX13 Is Required for Appressorium-Mediated Plant Infection by the Anthracnose Fungus *Colletotrichum orbiculare*. *MPMI* *23*, 436–445.
- Furuya, K., and Naito, A. (Sankyo C.L. (1980). Stimulation of ascospore germination by phenolic compounds in members of the Sordariaceae. *Transactions of the Mycological Society of Japan (Japan)*.
- Galhano, R., Illana, A., Ryder, L.S., Rodríguez-Romero, J., Demuez, M., Badaruddin, M., Martinez-Rocha, A.L., Soanes, D.M., Studholme, D.J., Talbot, N.J., et al. (2017). Tpc1 is an important Zn(II)2Cys6 transcriptional regulator required for polarized growth and virulence in the rice blast fungus. *PLoS Pathog.* *13*, e1006516.
- Garcia, G., Bertin, A., Li, Z., Song, Y., McMurray, M.A., Thorner, J., and Nogales, E. (2011). Subunit-dependent modulation of septin assembly: budding yeast septin Shs1 promotes ring and gauze formation. *J Cell Biol* *195*, 993–1004.
- Garcia-Arenal, F., and Sagasta, E.M. (1980). Scanning Electron Microscopy of *Botrytis cinerea* Penetration of Bean (*Phaseolus vulgaris*) Hypocotyls. *Journal of Phytopathology* *99*, 37–42.
- Genre, A., Chabaud, M., Timmers, T., Bonfante, P., and Barker, D.G. (2005). Arbuscular Mycorrhizal Fungi Elicit a Novel Intracellular Apparatus in *Medicago truncatula* Root Epidermal Cells before Infection. *The Plant Cell* *17*, 3489–3499.
- Gilbert, L.I., and Gill, S.S. (2010). *Insect Control: Biological and Synthetic Agents* (Academic Press).
- Giovannetti, M., Ayio, L., Sbrana, C., and Citerinesi, A.S. (1993). Factors affecting appressorium development in the vesicular–arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe. *New Phytologist* *123*, 115–122.
- Goddard, D.R. (1935). THE REVERSIBLE HEAT ACTIVATION INDUCING GERMINATION AND INCREASED RESPIRATION IN THE ASCOSPORES OF *NEUROSPORA TETRASPERMA*. *Journal of General Physiology* *19*, 45–60.
- Gollosi, R., Martin, R.S., Das, P., Raines, T.I., Thurston, D., Freeman, T., and McCord, R.P. (2019). Constricted migration contributes to persistent 3D genome structure changes associated with an invasive phenotype in melanoma cells. *BioRxiv* 856583.
- Gómez, B.L., and Nosanchuk, J.D. (2003). Melanin and fungi. *Curr. Opin. Infect. Dis.* *16*, 91–96.

- Goodell, B., Qian, Y., and Jellison, J. (2008). Fungal Decay of Wood: Soft Rot—Brown Rot—White Rot. In *Development of Commercial Wood Preservatives*, (American Chemical Society), pp. 9–31.
- Gourgues, M., Brunet-Simon, A., Lebrun, M.-H., and Levis, C. (2004). The tetraspanin BcPls1 is required for appressorium-mediated penetration of *Botrytis cinerea* into host plant leaves. *Molecular Microbiology* *51*, 619–629.
- Grossetête, S., Labedan, B., and Lespinet, O. (2010). FUNGIpath: a tool to assess fungal metabolic pathways predicted by orthology. *BMC Genomics* *11*, 81.
- Guindon, S., and Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* *52*, 696–704.
- Han, C., and Yang, P. (2015). Studies on the molecular mechanisms of seed germination. *Proteomics* *15*, 1671–1679.
- Harris, S.D. (2006). Cell polarity in filamentous fungi: shaping the mold. *Int. Rev. Cytol.* *251*, 41–77.
- Hartwell, L.H. (1971). Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp Cell Res* *69*, 265–276.
- Hatzipapas, P., Kalosak, K., Dara, A., and Christias, C. (2002). Spore germination and appressorium formation in the entomopathogenic *Alternaria alternata*. *Mycological Research* *106*, 1349–1359.
- Hawksworth, D.L., and Lücking, R. (2017). Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiol Spectr* *5*.
- Hegedus, D.D., and Rimmer, S.R. (2005). *Sclerotinia sclerotiorum*: When “to be or not to be” a pathogen? *FEMS Microbiology Letters* *251*, 177–184.
- Heikinheimo, L., Buchert, J., Miettinen-Oinonen, A., and Suominen, P. (2000). Treating Denim Fabrics with *Trichoderma Reesei* Cellulases. *Textile Research Journal* *70*, 969–973.
- Hemenway, C.S., and Heitman, J. (1999). Calcineurin. Structure, function, and inhibition. *Cell Biochem. Biophys.* *30*, 115–151.
- Higgins, D., and Dworkin, J. (2012). Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiol. Rev.* *36*, 131–148.
- Hoekstra, R.F. (2005). Why sex is good. *Nature* *434*, 571–573.
- Howard, R.J., Ferrari, M.A., Roach, D.H., and Money, N.P. (1991). Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 11281–11284.
- Hoysted, G.A., Kowal, J., Jacob, A., Rimington, W.R., Duckett, J.G., Pressel, S., Orchard, S., Ryan, M.H., Field, K.J., and Bidartondo, M.I. (2018). A mycorrhizal revolution. *Current Opinion in Plant Biology* *44*, 1–6.
- Ibarra, J.R., Orozco, A.D., Rojas, J.A., López, K., Setlow, P., Yasbin, R.E., and Pedraza-Reyes, M. (2008). Role of the Nfo and ExoA apurinic/aprimidinic endonucleases in repair of DNA damage during outgrowth of *Bacillus subtilis* spores. *J. Bacteriol.* *190*, 2031–2038.
- Iida, Y., Kurata, T., Harimoto, Y., and Tsuge, T. (2008). Nitrite Reductase Gene Upregulated During Conidiation Is Involved in Macroconidium Formation in *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* *98*, 1099–1106.

- Jiang, X., Xiang, M., and Liu, X. (2017). Nematode-Trapping Fungi. *Microbiology Spectrum* 5.
- Jong, J.C. de, McCormack, B.J., Smirnov, N., and Talbot, N.J. (1997). Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature*.
- Joseph-Strauss, D., Zenvirth, D., Simchen, G., and Barkai, N. (2007). Spore germination in *Saccharomyces cerevisiae*: global gene expression patterns and cell cycle landmarks. *Genome Biol* 8, R241.
- Jurick, W.M., and Rollins, J.A. (2007). Deletion of the adenylate cyclase (*sac1*) gene affects multiple developmental pathways and pathogenicity in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Genet. Biol.* 44, 521–530.
- Kamerewerd, J., Jansson, M., Nowrousian, M., Pöggeler, S., and Kück, U. (2008). Three alpha-subunits of heterotrimeric G proteins and an adenylyl cyclase have distinct roles in fruiting body development in the homothallic fungus *Sordaria macrospora*. *Genetics* 180, 191–206.
- Katan, T. (1985). Heat activation of dormant ascospores of *Talaromyces flavus*. *Transactions of the British Mycological Society* 84, 748–750.
- Katoh, K., Kuma, K., Toh, H., and Miyata, T. (2005). MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res* 33, 511–518.
- Kechris, K., and Li, H. (2008). c-REDUCE: Incorporating sequence conservation to detect motifs that correlate with expression. *BMC Bioinformatics* 9, 506.
- Köhler, J.R., Hube, B., Puccia, R., Casadevall, A., and Perfect, J.R. (2017). Fungi that Infect Humans. *Microbiology Spectrum* 5.
- Kunz, C., Vandelle, E., Rolland, S., Poinssot, B., Bruel, C., Cimerman, A., Zotti, C., Moreau, E., Vedel, R., Pugin, A., et al. (2006). Characterization of a new, nonpathogenic mutant of *Botrytis cinerea* with impaired plant colonization capacity. *New Phytol.* 170, 537–550.
- Lacaze, I., Lalucque, H., Siegmund, U., Silar, P., and Brun, S. (2015a). Identification of NoxD/Pro41 as the homologue of the p22^{phox} NADPH oxidase subunit in fungi. *Mol. Microbiol.* 95, 1006–1024.
- Lacaze, I., Lalucque, H., Siegmund, U., Silar, P., and Brun, S. (2015b). Identification of NoxD/Pro41 as the homologue of the p22^{phox} NADPH oxidase subunit in fungi: NoxD/Pro41: the fungal p22^{phox} homologue. *Molecular Microbiology* 95, 1006–1024.
- Lafon, A., Seo, J.-A., Han, K.-H., Yu, J.-H., and d'Enfert, C. (2005). The Heterotrimeric G-Protein GanB(α)-SfaD(β)-GpgA(γ) Is a Carbon Source Sensor Involved in Early cAMP-Dependent Germination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 171, 71–80.
- Lafon-Placette, C., and Köhler, C. (2014). Embryo and endosperm, partners in seed development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 17, 64–69.
- Lalucque, H., and Silar, P. (2003). NADPH oxidase: an enzyme for multicellularity? *Trends Microbiol.* 11, 9–12.
- Lalucque, H., Malagnac, F., Brun, S., Kicka, S., and Silar, P. (2012a). A non-Mendelian MAPK-generated hereditary unit controlled by a second MAPK pathway in *Podospira anserina*. *Genetics* 191, 419–433.

- Lalucque, H., Malagnac, F., Brun, S., Kicka, S., and Silar, P. (2012b). A Non-Mendelian MAPK-Generated Hereditary Unit Controlled by a Second MAPK Pathway in *Podospora anserina*. *Genetics* *191*, 419–433.
- Lamarre, C., Sokol, S., Debeaupuis, J.-P., Henry, C., Lacroix, C., Glaser, P., Coppée, J.-Y., François, J.-M., and Latgé, J.-P. (2008). Transcriptomic analysis of the exit from dormancy of *Aspergillus fumigatus* conidia. *BMC Genomics* *9*, 417.
- Lambeth, J.D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology* *4*, 181–189.
- Lambou, K., Malagnac, F., Barbisan, C., Tharreau, D., Lebrun, M.-H., and Silar, P. (2008). The crucial role of the Pls1 tetraspanin during ascospore germination in *Podospora anserina* provides an example of the convergent evolution of morphogenetic processes in fungal plant pathogens and saprobes. *Eukaryotic Cell* *7*, 1809–1818.
- Lamoth, F., Juvvadi, P.R., Fortwendel, J.R., and Steinbach, W.J. (2012). Heat shock protein 90 is required for conidiation and cell wall integrity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell* *11*, 1324–1332.
- Lanfranco, L., Bonfante, P., and Genre, A. (2016). The Mutualistic Interaction between Plants and Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Microbiology Spectrum* *4*.
- Lau, A.Y.T., Xie, Y., Cheung, M.K., Cheung, P.C.K., and Kwan, H.S. (2020). Genome-wide mRNA and miRNA analysis in the early stages of germ tube outgrowth in *Coprinopsis cinerea*. *Fungal Genetics and Biology* *142*, 103416.
- van Leeuwen, M.R., Krijgsheld, P., Bleichrodt, R., Menke, H., Stam, H., Stark, J., Wösten, H. a. B., and Dijksterhuis, J. (2013a). Germination of conidia of *Aspergillus niger* is accompanied by major changes in RNA profiles. *Stud. Mycol.* *74*, 59–70.
- van Leeuwen, M.R., Krijgsheld, P., Wyatt, T.T., Golovina, E.A., Menke, H., Dekker, A., Stark, J., Stam, H., Bleichrodt, R., Wösten, H.A.B., et al. (2013b). The effect of natamycin on the transcriptome of conidia of *Aspergillus niger*. *Studies in Mycology* *74*, 71–85.
- Legras, J.-L., Merdinoglu, D., Cornuet, J.-M., and Karst, F. (2007). Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecular Ecology* *16*, 2091–2102.
- Letunic, I., and Bork, P. (2007). Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics* *23*, 127–128.
- Lev, S., Sharon, A., Hadar, R., Ma, H., and Horwitz, B.A. (1999). A mitogen-activated protein kinase of the corn leaf pathogen *Cochliobolus heterostrophus* is involved in conidiation, appressorium formation, and pathogenicity: diverse roles for mitogen-activated protein kinase homologs in foliar pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 13542–13547.
- Li, L., Wright, S.J., Krystofova, S., Park, G., and Borkovich, K.A. (2007). Heterotrimeric G protein signaling in filamentous fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* *61*, 423–452.
- Lichius, A., and Read, N.D. (2010). A versatile set of Lifeact-RFP expression plasmids for live-cell imaging of F-actin in filamentous fungi. *Fungal Genetics Reports* *57*, 8–14.
- Lingappa, B.T., and Sussman, A.S. (1959). Endogenous Substrates of Dormant, Activated and Germinating Ascospores of *Neurospora Tetrasperma*. *Plant Physiol.* *34*, 466–472.

- Linkies, A., Graeber, K., Knight, C., and Leubner-Metzger, G. (2010). The evolution of seeds. *New Phytol.* *186*, 817–831.
- Liu, Y. (2012a). Calcium-related fungal genes implicated in arbuscular mycorrhiza. phdthesis. Université de Bourgogne.
- Liu, Y. (2012b). Roles of mitogen-activated protein kinase cascades in ABA signaling. *Plant Cell Rep.* *31*, 1–12.
- Lovett, B., Bilgo, E., Diabate, A., and St Leger, R. (2019). A review of progress toward field application of transgenic mosquitocidal entomopathogenic fungi. *Pest Manag. Sci.* *75*, 2316–2324.
- Lowry, R.J., and Sussman, A.S. (1968). Ultrastructural changes during germination of ascospores of *Neurospora tetrasperma*. *J. Gen. Microbiol.* *51*, 403–409.
- Lund, F., Filtenborg, O., and Frisvad, J.C. (1995). Associated mycoflora of cheese. *Food Microbiology* *12*, 173–180.
- Luo, S., He, M., Cao, Y., and Xia, Y. (2013). The tetraspanin gene MaPls1 contributes to virulence by affecting germination, appressorial function and enzymes for cuticle degradation in the entomopathogenic fungus, *Metarhizium acridum*. *Environ. Microbiol.* *15*, 2966–2979.
- MacIsaac, K.D., Wang, T., Gordon, D.B., Gifford, D.K., Stormo, G.D., and Fraenkel, E. (2006). An improved map of conserved regulatory sites for *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Bioinformatics* *7*, 113.
- MacPherson, S., Larochelle, M., and Turcotte, B. (2006). A Fungal Family of Transcriptional Regulators: the Zinc Cluster Proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* *70*, 583–604.
- Malagnac, F., and Silar, P. (2013). Les champignons redécouverts.
- Malagnac, F., Lalucque, H., Lepère, G., and Silar, P. (2004a). Two NADPH oxidase isoforms are required for sexual reproduction and ascospore germination in the filamentous fungus *Podospira anserina*. *Fungal Genetics and Biology* *41*, 982–997.
- Malagnac, F., Lalucque, H., Lepère, G., and Silar, P. (2004b). Two NADPH oxidase isoforms are required for sexual reproduction and ascospore germination in the filamentous fungus *Podospira anserina*. *Fungal Genetics and Biology* *41*, 982–997.
- Malagnac, F., Bidard, F., Lalucque, H., Brun, S., Lambou, K., Lebrun, M.-H., and Silar, P. (2008). Convergent evolution of morphogenetic processes in fungi: Role of tetraspanins and NADPH oxidases 2 in plant pathogens and saprobes. *Commun Integr Biol* *1*, 180–181.
- Mao, X., Zhang, J., Liu, W., Yan, S., Liu, Q., Fu, H., Zhao, J., Huang, W., Dong, J., Zhang, S., et al. (2019). The MKKK62-MKK3-MAPK7/14 module negatively regulates seed dormancy in rice. *Rice (N Y)* *12*, 2.
- Martín, J.F., van den Berg, M.A., Ver Loren van Themaat, E., and Liras, P. (2019). Sensing and transduction of nutritional and chemical signals in filamentous fungi: Impact on cell development and secondary metabolites biosynthesis. *Biotechnology Advances* *37*, 107392.
- McCartney, H.A., and West, J.S. (2007). Dispersal of fungal spores through the air. In *Food Mycology: A Multifaceted Approach to Fungi and Food*, R.A. Samson, and J. Dijksterhuis, eds. (Boca Raton, Florida: CRC Press), pp. 65–81.

- McCauley, V.J.E., Zacharuk, R.Y., and Tinline, R.D. (1968). Histopathology of green muscardine in larvae of four species of elateridae (Coleoptera). *Journal of Invertebrate Pathology* *12*, 444–459.
- Melcher, K., and Johnston, S.A. (1995). GAL4 interacts with TATA-binding protein and coactivators. *Mol Cell Biol* *15*, 2839–2848.
- Mendgen, K., Hahn, M., and Deising, H. (1996). Morphogenesis and Mechanisms of Penetration by Plant Pathogenic Fungi. *Annual Review of Phytopathology* *34*, 367–386.
- Mock, M., and Fouet, A. (2001). Anthrax. *Annu. Rev. Microbiol.* *55*, 647–671.
- Moir, A., and Cooper, G. (2015). Spore Germination. *Microbiology Spectrum* *3*.
- Momany, M. (2002). Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes. *Curr. Opin. Microbiol.* *5*, 580–585.
- Moonjely, S., Barelli, L., and Bidochka, M.J. (2016). Chapter Four - Insect Pathogenic Fungi as Endophytes. In *Advances in Genetics*, B. Lovett, and R.J. St. Leger, eds. (Academic Press), pp. 107–135.
- Mosley, A.L., Lakshmanan, J., Aryal, B.K., and Özcan, S. (2003). Glucose-mediated Phosphorylation Converts the Transcription Factor Rgt1 from a Repressor to an Activator. *J. Biol. Chem.* *278*, 10322–10327.
- Neville, B.A., d’Enfert, C., and Bougnoux, M.-E. (2015). *Candida albicans* commensalism in the gastrointestinal tract. *FEMS Yeast Res.* *15*.
- Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., and Setlow, P. (2000). Resistance of Bacillus Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiol Mol Biol Rev* *64*, 548–572.
- Nolting, N., and Pöggeler, S. (2006). A STE12 homologue of the homothallic ascomycete *Sordaria macrospora* interacts with the MADS box protein MCM1 and is required for ascosporeogenesis. *Molecular Microbiology* *62*, 853–868.
- Nonogaki, H., Bassel, G.W., and Bewley, J.D. (2010). Germination—Still a mystery. *Plant Science* *179*, 574–581.
- Novodvorska, M., Hayer, K., Pullan, S.T., Wilson, R., Blythe, M.J., Stam, H., Stratford, M., and Archer, D.B. (2013). Transcriptional landscape of *Aspergillus niger* at breaking of conidial dormancy revealed by RNA-sequencing. *BMC Genomics* *14*, 246.
- Nowrousian, M., Frank, S., Koers, S., Strauch, P., Weitner, T., Ringelberg, C., Dunlap, J.C., Loros, J.J., and Kück, U. (2007). The novel ER membrane protein PRO41 is essential for sexual development in the filamentous fungus *Sordaria macrospora*. *Mol Microbiol* *64*, 923–937.
- Osherov, N., and May, G. (2000). Conidial germination in *Aspergillus nidulans* requires RAS signaling and protein synthesis. *Genetics* *155*, 647–656.
- Osherov, N., and May, G.S. (2001). The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiol. Lett.* *199*, 153–160.
- Osiewacz, H.D. (2011). Mitochondrial quality control in aging and lifespan control of the fungal aging model *Podospora anserina*. *Biochem. Soc. Trans.* *39*, 1488–1492.

- Osiewacz, H.D., Brust, D., Hamann, A., Kunstmann, B., Luce, K., Müller-Ohldach, M., Scheckhuber, C.Q., Servos, J., and Strobel, I. (2010). Mitochondrial pathways governing stress resistance, life, and death in the fungal aging model *Podospora anserina*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1197, 54–66.
- Padieu, E., and Bernet, J. (1967). [Mode of action of the genes responsible for abortion of certain products of meiosis in the Ascomycete, *Podospora anserina*]. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D, Sci. Nat.* 264, 2300–2303.
- Palomino, A., Herrero, P., and Moreno, F. (2005). Rgt1, a glucose sensing transcription factor, is required for transcriptional repression of the HXK2 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 388, 697–703.
- Pan, F., Malmberg, R.L., and Momany, M. (2007). Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. *BMC Evolutionary Biology* 7, 103.
- Patkar, R.N., Ramos-Pamplona, M., Gupta, A.P., Fan, Y., and Naqvi, N.I. (2012). Mitochondrial β -oxidation regulates organellar integrity and is necessary for conidial germination and invasive growth in *Magnaporthe oryzae*. *Mol. Microbiol.* 86, 1345–1363.
- Peberdy, J.F. (1980). Asexual Reproduction in Fungi. In *Developmental Microbiology*, J.F. Peberdy, ed. (Boston, MA: Springer US), pp. 142–162.
- Penfield, S. (2017). Seed dormancy and germination. *Curr. Biol.* 27, R874–R878.
- van de Peppel, R.J., Visser, L.G., Dekkers, O.M., and de Boer, M.G.J. (2018). The burden of Invasive Aspergillosis in patients with haematological malignancy: A meta-analysis and systematic review. *J. Infect.* 76, 550–562.
- Peraza Reyes, L., and Berteaux-Lecellier, V. (2013). Peroxisomes and sexual development in fungi. *Front. Physiol.* 4.
- Peraza-Reyes, L., Zickler, D., and Berteaux-Lecellier, V. (2008). The Peroxisome RING-Finger Complex is Required for Meicyte Formation in the Fungus *Podospora anserina*. *Traffic* 9, 1998–2009.
- Peraza-Reyes, L., Espagne, E., Arnaise, S., and Berteaux-Lecellier*, V. (2010). Peroxisomes in Filamentous Fungi. *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi* 191–206.
- Pereira, F.C., Saujet, L., Tomé, A.R., Serrano, M., Monot, M., Couture-Tosi, E., Martin-Verstraete, I., Dupuy, B., and Henriques, A.O. (2013). The Spore Differentiation Pathway in the Enteric Pathogen *Clostridium difficile*. *PLOS Genetics* 9, e1003782.
- Polish, J.A., Kim, J.-H., and Johnston, M. (2005). How the Rgt1 Transcription Factor of *Saccharomyces cerevisiae* Is Regulated by Glucose. *Genetics* 169, 583–594.
- Pollard, T.D., and Cooper, J.A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326, 1208–1212.
- Quevillon, E., Silventoinen, V., Pillai, S., Harte, N., Mulder, N., Apweiler, R., and Lopez, R. (2005). InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Res* 33, W116–W120.
- Raad, H., Paclet, M.-H., Boussetta, T., Kroviarski, Y., Morel, F., Quinn, M.T., Gougerot-Pocidalò, M.-A., Dang, P.M.-C., and El-Benna, J. (2009). Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91phox/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox. *FASEB J.* 23, 1011–1022.

- Raghavan, V. (2000). Seed Germination. In *Developmental Biology of Flowering Plants*, V. Raghavan, ed. (New York, NY: Springer), pp. 7–24.
- Ramos-Pamplona, M., and Naqvi, N.I. (2006). Host invasion during rice-blast disease requires carnitine-dependent transport of peroxisomal acetyl-CoA. *Mol. Microbiol.* *61*, 61–75.
- Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T.A., Werb, Z., et al. (2008). Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nature Methods* *5*, 605–607.
- Rizet, G., and Esser, K. (1953). [Phenomena of incompatibility between strains of different origins in *Podospora anserina*]. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* *237*, 760–761.
- Rocheteau, P., Vinet, M., and Chretien, F. (2015). Dormancy and Quiescence of Skeletal Muscle Stem Cells. In *Vertebrate Myogenesis: Stem Cells and Precursors*, B. Brand-Saberi, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer), pp. 215–235.
- Rupnik, M., Wilcox, M.H., and Gerding, D.N. (2009). *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* *7*, 526–536.
- Ruprich-Robert, G., Berteaux-Lecellier, V., Zickler, D., Panvier-Adoutte, A., and Picard, M. (2002). Identification of six loci in which mutations partially restore peroxisome biogenesis and/or alleviate the metabolic defect of *pex2* mutants in *podospora*. *Genetics* *161*, 1089–1099.
- Ryder, L.S., and Talbot, N.J. (2015). Regulation of appressorium development in pathogenic fungi. *Current Opinion in Plant Biology* *26*, 8–13.
- Ryder, L.S., Dagdas, Y.F., Mentlak, T.A., Kershaw, M.J., Thornton, C.R., Schuster, M., Chen, J., Wang, Z., and Talbot, N.J. (2013). NADPH oxidases regulate septin-mediated cytoskeletal remodeling during plant infection by the rice blast fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *110*, 3179–3184.
- Ryder, L.S., Dagdas, Y.F., Kershaw, M.J., Venkataraman, C., Madzvamuse, A., Yan, X., Cruz-Mireles, N., Soanes, D.M., Osés-Ruiz, M., Styles, V., et al. (2019). A sensor kinase controls turgor-driven plant infection by the rice blast fungus. *Nature* *574*, 423–427.
- Sabnam, N., and Roy Barman, S. (2017). WISH, a novel CFEM GPCR is indispensable for surface sensing, asexual and pathogenic differentiation in rice blast fungus. *Fungal Genetics and Biology* *105*, 37–51.
- Saunders, D.G.O., Aves, S.J., and Talbot, N.J. (2010a). Cell Cycle-Mediated Regulation of Plant Infection by the Rice Blast Fungus. *The Plant Cell* *22*, 497–507.
- Saunders, D.G.O., Dagdas, Y.F., and Talbot, N.J. (2010b). Spatial Uncoupling of Mitosis and Cytokinesis during Appressorium-Mediated Plant Infection by the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. *The Plant Cell* *22*, 2417–2428.
- Schardl, C.L. (2001). *Epichloë festucae* and Related Mutualistic Symbionts of Grasses. *Fungal Genetics and Biology* *33*, 69–82.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* *9*, 676–682.
- Schmit, J.C., and Brody, S. (1976). Biochemical genetics of *Neurospora crassa* conidial germination. *Bacteriol Rev* *40*, 1–41.

- Schrank, A., and Vainstein, M.H. (2010). *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon* 56, 1267–1274.
- Schüßler, A., Schwarzott, D., and Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution* *Dedicated to Manfred Kluge (Technische Universität Darmstadt) on the occasion of his retirement. *Mycological Research* 105, 1413–1421.
- Scott, B. (2015). Conservation of fungal and animal nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase complexes. *Mol. Microbiol.* 95, 910–913.
- Seong, K.-Y., Zhao, X., Xu, J.-R., Güldener, U., and Kistler, H.C. (2008). Conidial germination in the filamentous fungus *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology* 45, 389–399.
- Setlow, P. (2014a). Spore Resistance Properties. *Microbiology Spectrum* 2.
- Setlow, P. (2014b). Germination of spores of *Bacillus* species: what we know and do not know. *J. Bacteriol.* 196, 1297–1305.
- Setlow, P., Wang, S., and Li, Y.-Q. (2017). Germination of Spores of the Orders Bacillales and Clostridiales. *Annual Review of Microbiology* 71, 459–477.
- Shang, J., Shang, Y., Tang, G., and Wang, C. (2020). Identification of a key G-protein coupled receptor in mediating appressorium formation and fungal virulence against insects. *Sci. China Life Sci.*
- Shen, B., Hohmann, S., Jensen, R.G., and Bohnert, and H.J. (1999). Roles of Sugar Alcohols in Osmotic Stress Adaptation. Replacement of Glycerol by Mannitol and Sorbitol in Yeast. *Plant Physiology* 121, 45–52.
- Shin, K.-S., Kwon, N.-J., and Yu, J.-H. (2009). G $\beta\gamma$ -mediated growth and developmental control in *Aspergillus fumigatus*. *Curr Genet* 55, 631.
- Shu, K., Liu, X.-D., Xie, Q., and He, Z.-H. (2016). Two Faces of One Seed: Hormonal Regulation of Dormancy and Germination. *Mol Plant* 9, 34–45.
- Siegmund, U., Heller, J., van Kann, J.A.L., and Tudzynski, P. (2013). The NADPH Oxidase Complexes in *Botrytis cinerea*: Evidence for a Close Association with the ER and the Tetraspanin Pls1. *PLoS ONE* 8, e55879.
- Siegmund, U., Marschall, R., and Tudzynski, P. (2015). BcNoxD, a putative ER protein, is a new component of the NADPH oxidase complex in *Botrytis cinerea*. *Mol. Microbiol.* 95, 988–1005.
- Silar, P. (1995). Two new easy to use vectors for transformations.
- Silar, P. (2005). Peroxide accumulation and cell death in filamentous fungi induced by contact with a contestant. *Mycol. Res.* 109, 137–149.
- Silar, P. (2013). *Podospora anserina*: From Laboratory to Biotechnology. In *Genomics of Soil- and Plant-Associated Fungi*, B.A. Horwitz, P.K. Mukherjee, M. Mukherjee, and C.P. Kubicek, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 283–309.
- Silar, P. (2020). *Podospora anserina*.
- Silar, P., Haedens, V., Rossignol, M., and Lalucque, H. (1999). Propagation of a novel cytoplasmic, infectious and deleterious determinant is controlled by translational accuracy in *Podospora anserina*. *Genetics* 151, 87–95.

Silar, P., Lalucque, H., Haedens, V., Zickler, D., and Picard, M. (2001). eEF1A Controls Ascospore Differentiation Through Elevated Accuracy, but Controls Longevity and Fruiting Body Formation Through Another Mechanism in *Podospora anserina*. *Genetics* *158*, 1477–1489.

Silar, P., Dauget, J.-M., Gautier, V., Grognet, P., Chablat, M., Hermann-Le Denmat, S., Couloux, A., Wincker, P., and Debuchy, R. (2019). A gene graveyard in the genome of the fungus *Podospora comata*. *Mol Genet Genomics* *294*, 177–190.

Spiliotis, E.T., and Nelson, W.J. (2006). Here come the septins: novel polymers that coordinate intracellular functions and organization. *J Cell Sci* *119*, 4–10.

St.Leger, R.J., Butt, T.M., Goettel, M.S., Staples, R.C., and Roberts, D.W. (1989). Production in vitro of appressoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experimental Mycology* *13*, 274–288.

Strijbis, K., and Distel, B. (2010). Intracellular acetyl unit transport in fungal carbon metabolism. *Eukaryotic Cell* *9*, 1809–1815.

Strijbis, K., Vaz, F.M., and Distel, B. (2010). Enzymology of the carnitine biosynthesis pathway. *IUBMB Life* *62*, 357–362.

Suh, M.-J., Fedorova, N.D., Cagas, S.E., Hastings, S., Fleischmann, R.D., Peterson, S.N., Perlin, D.S., Nierman, W.C., Pieper, R., and Momany, M. (2012). Development stage-specific proteomic profiling uncovers small, lineage specific proteins most abundant in the *Aspergillus Fumigatus* conidial proteome. *Proteome Sci* *10*, 30.

Sumimoto, H. (2008). Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species: Structure, regulation and evolution of Nox. *FEBS Journal* *275*, 3249–3277.

Sussman, A.S. (1961). The Role of Trehalose in the Activation of Dormant Ascospores of *Neurospora*. *The Quarterly Review of Biology* *36*, 109–116.

Sussman, A.S., Lowry, R.J., and Tyrrell, E. (1959). Activation of *Neurospora* Ascospores by Organic Solvents and Furans. *Mycologia* *51*, 237–247.

Takano, Y., Kikuchi, T., Kubo, Y., Hamer, J.E., Mise, K., and Furusawa, I. (2000). The *Colletotrichum lagenarium* MAP Kinase Gene *CMK1* Regulates Diverse Aspects of Fungal Pathogenesis. *MPMI* *13*, 374–383.

Takemoto, D., Tanaka, A., and Scott, B. (2007). NADPH oxidases in fungi: diverse roles of reactive oxygen species in fungal cellular differentiation. *Fungal Genet. Biol.* *44*, 1065–1076.

Talbot, N.J. (2003). On the trail of a cereal killer: Exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. *Annu. Rev. Microbiol.* *57*, 177–202.

Tao, W., Deschenes, R.J., and Fassler, J.S. (1999). Intracellular Glycerol Levels Modulate the Activity of *Sln1p*, a *Saccharomyces cerevisiae* Two-component Regulator. *J Biol Chem* *274*, 360–367.

Tawarayama, K., Watanabe, S., Vierheilig, H., and Wagatsuma, T. (2007). Formation of appressoria by the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* on roots of *Allium cepa* is linked with root age. *Mycoscience* *48*, 305–308.

Tenberge, K.B. (2007). Morphology and Cellular Organisation in *Botrytis* Interactions with Plants. In *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, and N. Delen, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 67–84.

- Teutschbein, J., Albrecht, D., Pötsch, M., Guthke, R., Amanianda, V., Clavaud, C., Latgé, J.-P., Brakhage, A.A., and Kniemeyer, O. (2010). Proteome Profiling and Functional Classification of Intracellular Proteins from Conidia of the Human-Pathogenic Mold *Aspergillus fumigatus*. *J. Proteome Res.* 9, 3427–3442.
- Thevelein, J.M. (1996). Regulation of Trehalose Metabolism and Its Relevance to cell Growth and Function. In *Biochemistry and Molecular Biology*, R. Brambl, and G.A. Marzluf, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer), pp. 395–420.
- Thevelein, J.M., den Hollander, J.A., and Shulman, R.G. (1984). Trehalase and the control of dormancy and induction of germination in fungal spores. *Trends in Biochemical Sciences* 9, 495–497.
- Thines, E., Weber, R.W., and Talbot, N.J. (2000). MAP kinase and protein kinase A-dependent mobilization of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* 12, 1703–1718.
- Tudzynski, P., Heller, J., and Siegmund, U. (2012). Reactive oxygen species generation in fungal development and pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology* 15, 653–659.
- Van Den Heuvel, J., and Waterreus, L.P. (1983). Conidial concentration as an important factor determining the type of prepenetration structures formed by *Botrytis cinerea* on leaves of French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Pathology* 32, 263–272.
- Van Leeuwen, M.R., Van Doorn, T.M., Golovina, E.A., Stark, J., and Dijksterhuis, J. (2010). Water- and air-distributed conidia differ in sterol content and cytoplasmic microviscosity. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 366–369.
- Varma, A., Prasad, R., and Tuteja, N. (2017). *Mycorrhiza - Eco-Physiology, Secondary Metabolites, Nanomaterials* (Springer).
- Vega, F., Meyling, N., Luangsa-Ard, J., and Blackwell, M. (2012). Fungal Entomopathogens. In *Fungal Entomopathogens*, pp. 171–220.
- Velappan, Y., Signorelli, S., and Considine, M.J. (2017). Cell cycle arrest in plants: what distinguishes quiescence, dormancy and differentiated G1? *Ann. Bot.* 120, 495–509.
- Veneault-Fourrey, C., Barooah, M., Egan, M., Wakley, G., and Talbot, N.J. (2006a). Autophagic Fungal Cell Death Is Necessary for Infection by the Rice Blast Fungus. *Science* 312, 580–583.
- Veneault-Fourrey, C., Lambou, K., and Lebrun, M.-H. (2006b). Fungal Pls1 tetraspanins as key factors of penetration into host plants: a role in re-establishing polarized growth in the appressorium? *FEMS Microbiol. Lett.* 256, 179–184.
- Vrabioiu, A.M., and Mitchison, T.J. (2006). Structural insights into yeast septin organization from polarized fluorescence microscopy. *Nature* 443, 466–469.
- Wang, C., and St Leger, R.J. (2007). The *Metarhizium anisopliae* Perilipin Homolog MPL1 Regulates Lipid Metabolism, Appressorial Turgor Pressure, and Virulence. *J. Biol. Chem.* 282, 21110–21115.
- Wang, Z.-Y., Soanes, D.M., Kershaw, M.J., and Talbot, N.J. (2007). Functional analysis of lipid metabolism in *Magnaporthe grisea* reveals a requirement for peroxisomal fatty acid beta-oxidation during appressorium-mediated plant infection. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20, 475–491.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., and Barton, G.J. (2009). Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189–1191.

- Watkinson, S.C., and Eastwood, D.C. (2012). Chapter 5 - *Serpula lacrymans*, Wood and Buildings. In *Advances in Applied Microbiology*, A.I. Laskin, S. Sariaslani, and G.M. Gadd, eds. (Academic Press), pp. 121–149.
- Wilson, R.A., and Talbot, N.J. (2009). Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 185–195.
- Wilson, A.M., Wilken, P.M., van der Nest, M.A., Steenkamp, E.T., Wingfield, M.J., and Wingfield, B.D. (2015). Homothallism: an umbrella term for describing diverse sexual behaviours. *IMA Fungus* 6, 207–214.
- Wyatt, T.T., Wösten, H.A.B., and Dijksterhuis, J. (2013). Chapter Two - Fungal Spores for Dispersion in Space and Time. In *Advances in Applied Microbiology*, S. Sariaslani, and G.M. Gadd, eds. (Academic Press), pp. 43–91.
- 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* 429, 285–305.
- Xu, J.R., and Hamer, J.E. (1996). MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Genes Dev.* 10, 2696–2706.
- Yin, Z., Tang, W., Wang, J., Liu, X., Yang, L., Gao, C., Zhang, J., Zhang, H., Zheng, X., Wang, P., et al. (2016). Phosphodiesterase MoPdeH targets MoMck1 of the conserved mitogen-activated protein (MAP) kinase signalling pathway to regulate cell wall integrity in rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Mol. Plant Pathol.* 17, 654–668.
- Zanten, M. van, Koini, M.A., Geyer, R., Liu, Y., Brambilla, V., Bartels, D., Koornneef, M., Fransz, P., and Soppe, W.J.J. (2011). Seed maturation in *Arabidopsis thaliana* is characterized by nuclear size reduction and increased chromatin condensation. *PNAS* 108, 20219–20224.
- Zdobnov, E.M., Tegenfeldt, F., Kuznetsov, D., Waterhouse, R.M., Simão, F.A., Ioannidis, P., Seppey, M., Loetscher, A., and Kriventseva, E.V. (2017). OrthoDB v9.1: cataloging evolutionary and functional annotations for animal, fungal, plant, archaeal, bacterial and viral orthologs. *Nucleic Acids Res* 45, D744–D749.
- Zhang, H., Liu, K., Zhang, X., Song, W., Zhao, Q., Dong, Y., Guo, M., Zheng, X., and Zhang, Z. (2010a). A two-component histidine kinase, MoSLN1, is required for cell wall integrity and pathogenicity of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Curr Genet* 56, 517–528.
- Zhang, L., Hu, Y., Yan, S., Li, H., He, S., Huang, M., and Li, L. (2012). ABA-mediated inhibition of seed germination is associated with ribosomal DNA chromatin condensation, decreased transcription, and ribosomal RNA gene hypoacetylation. *Plant Mol Biol* 79, 285–293.
- Zhang, Y., Zhang, J., Jiang, X., Wang, G., Luo, Z., Fan, Y., Wu, Z., and Pei, Y. (2010b). Requirement of a mitogen-activated protein kinase for appressorium formation and penetration of insect cuticle by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2262–2270.
- Zhao, H., Lovett, B., and Fang, W. (2016). Chapter Five - Genetically Engineering Entomopathogenic Fungi. In *Advances in Genetics*, B. Lovett, and R.J. St. Leger, eds. (Academic Press), pp. 137–163.
- Zhao, W., Panepinto, J.C., Fortwendel, J.R., Fox, L., Oliver, B.G., Askew, D.S., and Rhodes, J.C. (2006). Deletion of the regulatory subunit of protein kinase A in *Aspergillus fumigatus* alters morphology, sensitivity to oxidative damage, and virulence. *Infect. Immun.* 74, 4865–4874.

Zhou, X., Zhao, X., Xue, C., Dai, Y., and Xu, J.-R. (2014). Bypassing both surface attachment and surface recognition requirements for appressorium formation by overactive ras signaling in *Magnaporthe oryzae*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 27, 996–1004.