



HAL
open science

Étude de la biosynthèse de la chitine et du β -(1,3)-glucane chez *Botrytis cinerea*: application à de nouvelles stratégies antifongiques

Emmanuelle Galland

► **To cite this version:**

Emmanuelle Galland. Étude de la biosynthèse de la chitine et du β -(1,3)-glucane chez *Botrytis cinerea* : application à de nouvelles stratégies antifongiques. Microbiologie et Parasitologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10075 . tel-04747843

HAL Id: tel-04747843

<https://theses.hal.science/tel-04747843v1>

Submitted on 22 Oct 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.

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

THESE

En vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Emmanuelle GALLAND

Etude de la biosynthèse de la chitine et du β -(1,3)-glucane
chez *Botrytis cinerea* : Application à de nouvelles stratégies
antifongiques.

Directeur de thèse : Roland BEFFA

Responsable Industriel : Valérie Toquin

Soutenue le 17/05/2013 devant la commission d'examen suivante :

Pr. Marc Lemaire	Président du jury
Pr. Antonio Di Pietro	Rapporteur
Mme. Martine Boccara	Rapporteur
Mme. Sabine Fillinger	Rapporteur
Mme. Valérie Toquin	Examineur
Mr. Mathias Choquer	Examineur
Mr. Roland Beffa	Directeur de Thèse

Remerciements :

Ma thèse se termine, il est maintenant temps pour moi de trouver les mots pour remercier tous ceux qui m'ont aidé et soutenu durant ce travail. Après tout ce temps passé avec vous, il est difficile de trouver les mots et je ne voudrais oublier personne.

L'ensemble des travaux présentés dans ce mémoire a été réalisé au sein du laboratoire mixte UMR5240 Bayer CropScience sur le site de la Dargoire de Bayer CropScience. Je tiens donc à remercier Monsieur Marco Busch, responsable du département de biologie, pour m'avoir accueilli au sein de ce département et m'avoir permis de réaliser cette thèse.

Par ailleurs, je souhaite tout particulièrement remercier Madame Nathalie Poussereau, responsable de l'équipe de Génomique fonctionnelle des champignons pathogènes des plantes, pour son soutien sur cette fin de thèse et la relecture du manuscrit.

J'exprime ma gratitude à Roland Beffa, mon directeur de thèse et à Valérie Toquin ma marraine de thèse, pour avoir suivi la progression de mon travail et pour les conseils qu'ils ont su me prodiguer.

Je voudrais remercier Gilles Gay mon tuteur de thèse pour sa patience, son écoute et son aide au cours de cette thèse.

Je tiens tout particulièrement remercier les membres de mon comité de thèse, Mesdames Valérie Toquin et Marie-Christine Soulié ainsi que Monsieur Vincent Bulone pour avoir accepté de discuter de mon travail et m'avoir fourni de précieux conseils.

Je remercie les différents membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail : Monsieur Marc Lemaire, d'avoir accepté de présider mon jury de thèse, Mesdames Sabine Fillinger et Martine Boccara et Monsieur Antonio Di Pietro d'avoir accepté d'être rapporteur de la thèse.

J'exprime toute ma reconnaissance à Catherine Sirven pour son aide sur l'analyse transcriptomique et pour toutes nos discussions que l'on a pu avoir qui m'ont souvent remonté le moral et égayer mes journées.

Je tiens particulièrement à remercier Pierre Genix sans qui l'analyse de la synergie n'aurait pas été possible et pour tous le temps qu'il a pris pour m'expliquer les choses.

Ensuite, je souhaite remercier Christine Rascle pour toute son aide lors des expériences de transcriptomique.

Je voudrais remercier vivement Thomas Milhiet et Simon Gibert mes deux stagiaires qui ont contribués vivement au travail de mutagenèse.

Je voudrais remercier Stéphanie Gamet, pour m'avoir énormément aidé lors de la mise en place des tests de synergie.

Un grand merci également à Patrick Frettinger pour sa bonne humeur, son soutien et nos discussions toujours instructives qui ont énormément contribuées à l'évolution de ma thèse. Je te souhaite bonne chance pour la suite.

Je remercie également Dominique Job, Claudette Job, Vincent Girard et Cindy dieryckx pour toutes nos discussions lors de nos repas et de nos pauses café, que je n'oublierai pas et qui ont contribuées à mettre une bonne ambiance.

Ensuite, Je remercie aussi Jean-Marie Robles, Nicole Bouvet, Stephane Peyrard, Francois Villalba, Benedicte Cirer, Raphael Fournel, Lucile Albinet, Virginie Lempereur, Soumeya Terras, Viviane Brozek et Hermann Yadija, pour tout leurs coneils, leur aide et leur bonne humeur, même lorsque je venais les embêter au G1.

Je remercie Catherine Brahmi, pour son ecoute et son aide pour réaliser de magnifiques bijoux.

Je remercie également toute l'équipe, Geneviève Billon-Grand, Marie-Josephe Gagey, Elisabeth Grund, Yohann Faivre, Elise Loisel, Christophe Bruel, Isabel Goncalves, Mathias Choquer, Sophie Kaiser, Eytham Souibigui, Pavle Smilevski.

Enfin, je souhaite remercier mes parents qui m'ont toujours soutenues et qui ont financé mes études, sans eux je n'aurais jamais pu arriver ici aujourd'hui. Et je remercie Aurélien qui partage ma vie et me permet de tenir le coup quoiqu'il arrive.

En espérant n'avoir oublié personne et si tel est le cas je m'en excuse.

Résumé français :

Botrytis cinerea est un champignon filamenteux ascomycète nécrotrophe responsable de la pourriture grise chez plus de deux cent espèces végétales, conduisant à des pertes considérables. L'apparition de souches résistantes contraint à rechercher des molécules visant de nouvelles cibles. La paroi fongique composée, en particulier, de chitine et de β -(1,3)-glucane formant un réseau polysaccharidique tridimensionnel, diffère des cellules animales et végétales représente une des cibles les plus prometteuses. Dans un premier temps, une approche combinant des inhibiteurs de la synthèse de la chitine du β -(1,3)-glucane a été étudiée. Celle-ci permettrait de contourner les mécanismes de compensation développés par un champignon en présence d'un inhibiteur d'un de ces deux métabolismes. Il a été montré que ces deux inhibiteurs utilisés en combinaison induisent une synergie d'inhibition de la croissance du champignon associée à un nouveau phénotype dénommé « ballon ». Alors qu'un inhibiteur de β -(1,3)-glucane seul induit un hyperbranchement des hyphes et qu'un inhibiteur de chitine seul, induit un gonflement des hyphes. De plus une nouvelle méthode d'évaluation de l'effet de synergie a été définie.

Par la suite, des études transcriptomiques en présence de différents inhibiteurs de la synthèse de la chitine et du β -(1,3)-glucane, seul ou en combinaison, ont été réalisées afin de mieux comprendre l'effet de ces différents traitements sur le champignon. Ainsi, la régulation des gènes impliqués dans la réponse à un stress pariétal a été suivie. Cette étude a montré une compensation transcriptionnelle vers le métabolisme de la chitine. Dans aucun des traitements une compensation transcriptionnelle vers le métabolisme du β -(1,3)-glucane n'a pu être observée. Par ailleurs, une étude des voies de signalisation impliquée dans l'intégrité pariétale montre une réponse globale de toutes les voies mais aucune de manière spécifique. De plus, il semblerait que le traitement combiné induise une surreprésentation en protéine à ancre GPI dans sa réponse transcriptionnelle.

Ces analyses transcriptomiques ont permis l'identification de gènes candidats pour réaliser des mutagenèses. La mutagenèse du gène *bcFKS1* sous unité catalytique de la glucane synthase a été réalisée par RNAi étant donné le caractère essentiel de ce gène chez les champignons filamenteux. Les études phénotypiques confirment son rôle important dans la pathogénicité de *B. cinerea*. Par ailleurs, une diminution de la vitesse de la croissance radiale a aussi été observée chez ces mutants. Enfin la mutagenèse de deux nouveaux gènes de la famille des glycosyltransférases de type II, homologues à la curdlane synthase bactérienne impliqué dans la biosynthèse de β -(1,3)-glucane, révèle un phénotype marqués des mutants pourtant hétérocaryotiques.

Mots Clés : *Botrytis Cinerea*, Paroi fongique, β -(1,3)-glucane, chitine, synergie, Caspofongine, Nikkomycine Z, transcriptome.

English Summary:

Botrytis cinerea is a necrotrophic ascomycete filamentous fungus responsible of the grey mould disease in more than two hundred species of plants, leading to considerable losses. The emergence of resistant strains forced to search for new targets molecules. The fungal cell wall composed in particular of chitin and β -(1,3)-glucan forming a polysaccharides three-dimensional network, differ from animal and plant cells, is one of the most promising targets. In a first step, an approach combining inhibitors of chitin synthesis and of the β -(1,3)-glucan synthesis had been studied. This would circumvent the compensation mechanisms developed by a fungus in the presence of an inhibitor of one of these two metabolisms. It had been shown that these two inhibitors used in combination induce a synergistic inhibition of fungal growth associated with a novel phenotype called "balloon". Then an inhibitor of β -(1,3)-glucan alone induced hyperbranching of hyphae and an inhibitor of chitin alone induced a swelling of hyphae. In addition, a new method for evaluating the synergistic effect was defined.

Subsequently, transcriptomic studies in the presence of inhibitors of the synthesis of chitin and β -(1,3)-glucan, alone or in combination, had been conducted to better understand the effect of these treatments on the fungus. Thus, the regulation of genes involved in the response to wall stress was followed. This study showed a transcriptional compensation to the metabolism of chitin. In none of the treatments a transcriptional compensation to the β -(1,3)-glucan metabolism could be observed. In addition, a study of the signaling pathways involved in cell wall integrity showed an overall response of all pathways but no specific way. In addition, it appeared that the combined treatment induced an overrepresentation in GPI-anchored protein in the transcriptional response. This transcriptomic analysis led to the identification of candidate genes for performing mutagenesis. Mutagenesis of the gene *bcFKS1* the catalytic subunit of glucan synthase was achieved by RNAi, given the essential nature of this gene in filamentous fungi. Phenotypic studies confirmed its important role in the pathogenicity of *B. cinerea*. In addition, a decrease in the rate of radial growth was also observed in these mutants. Finally mutagenesis of two new gene family of type II glycosyltransferases, homologous to the bacterial curdlan synthase involved in the biosynthesis of β -(1,3)-glucan, revealed a marked phenotype of mutants heterokaryotic yet.

Key words: *Botrytis cinerea*, Fungal cell wall, β -(1,3)-glucan, chitin, Synergy, Caspofungin, Nikkomycin Z, Transcriptomic analysis

Sommaire

Liste des abbréviations	p11
Liste des Figures	p13
I- Introduction bibliographique	p17
A. La paroi fongique : un organe essentiel à la vie du champignon	p19
B. La paroi fongique : une composition chimique complexe	p21
a. La chitine	p21
1. Structure	p23
2. Biosynthèse	p23
3. Classification des Chitine synthases	p25
4. Rôles des Chitine synthases	p27
5. Dosage d'activité	p33
b. Les Glucanes	p33
1. Le β -1,3-glucane	p33
a. Structure	p33
b. Biosynthèse	p35
c. Rôle de la glucane synthase	p35
2. Le Curdlane : β -(1,3)-glucane linéaire	p39
a. Structure	p39
b. Biosynthèse	p41
c. Rôle de la curdlane synthase	p41
3. Le β -1,6-glucane	p41
a. Structure	p41
b. Biosynthèse	p43
c. Les gènes impliqués dans la biosynthèse	p43
4. Les α -(1,3)-glucanes	p45
a. Biosynthèse	p45
b. Structure	p45
c. Les Mannanes et mannoprotéines	p47
C. Les Voies de signalisation de la biosynthèse pariétale	p51
a. La voie de l'intégrité pariétale	p51
b. La voie de la calcineurine	p55
c. La voie HOG	p59
d. La voie pH	p61
D. Les inhibiteurs de paroi fongique	p63
a. Inhibiteurs de chitine synthases	p63
b. Inhibiteurs de β -(1,3)-glucan synthase	p65
c. Inhibiteurs de mannanes/mannoprotéines	p67
d. Inhibiteurs de l'assemblage des microfibrilles	p67
e. Inhibiteurs de voie de signalisation	p69
f. Inhibiteurs de GlycosylPhosphatidyInositol	p69
g. Inhibiteurs de glycosylation	p69

	h. Synergie	p71
	E. La Compensation	p71
II-	Le modèle d'étude : <i>Botrytis cinerea</i>	p73
III-	Projet de thèse	p79
IV-	Chapitre 1 : Etude de la synergie entre un inhibiteur de la biosynthèse de la chitine et un inhibiteur de la biosynthèse du β -(1,3)-glucane chez le champignon phytopathogène <i>Botrytis cinerea</i> .	p85
	Article 1: Synergy Activity of Cell Wall Inhibitors on a Phytopathogenic Fungus <i>Botrytis cinerea</i> . Novel Determination Model.	
V-	Chapitre 2: analyse fonctionnelle de la réponse transcriptomique après traitements par des inhibiteurs de paroi.	P109
	Article 2: Transcriptomic analyses of the plant-pathogen fungus <i>B. cinerea</i> responses to cell wall inhibitors.	
	Supplementary data	CD
VI-	Chapitre 3: Etude de la synthèse des β -(1,3)-glucane : rôle de FKS1 et des curdlanes synthésés like fongiques chez le champignon phytopathogène <i>Botrytis cinerea</i> .	p151
VII-	Annexes	p191
VIII-	Discussion générale et perspectives	p193
IX-	Références bibliographiques	p209
X-	Congrès et communications	p261

Abbréviations :

AA : acide aminé

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

BET : Bromure d'ethidium

CDD : conserved domains database

CHS: chitine synthase

CI: Concentration inhibitrice

DMSO: diméthylsulfoxyde

dNTP: Desoxynucléotide triphosphate

GPI: Glycosylphosphatidylinositol

GS: Glucane synthase

GT: Glycosyltransférase.

kb: kilobase

kDa: kiloDalton

MAPK : Mitogen activated protein kinase

MFS : Major Facilitator superfamilly

MM: milieu minimum

mM: millimolaire

nt: nucleotide

ORF: cadre ouvert de lecture

Pb : paire de bases

PCR : Réaction de polymérase en chaine

PEG : polyéthylène glycol

pH : potentiel hydrogène

ppm : partie par million

qPCR : Réaction de polymérase en chaîne quantitative

RNAi : Interférence ARN

Rpm : rotation par minute

SDS : sodium dodecyl sulfate

T_m : Température de fusion des amorces

UDP : uridine diphosphate

UV : ultraviolet

Liste des Figures :

Introduction bibliographique :

Figure 1 : Les différents rôles de la paroi fongique.	p20
Figure 2 : Schéma simplifié de la paroi d'un champignon filamenteux.	p20
Figure 3 : Structure chimique du cœur polysaccharidique de la fraction alcali-insoluble de la paroi d' <i>Aspergillus fumigatus</i> .	p20
Figure 4 : Les différentes conformations de la chitine.	p22
Figure 5 : Synthèse de chitine reliée à la glycolyse.	p22
Figure 6 : représentation schématique de la synthèse du chitosan	p24
Figure 7 : Représentation schématique de la Réaction de polymérisation de la chitine	p24
Figure 8 : Biosynthèse de l'UDP-N-acetylglucosamine chez les procaryotes et chez les eucaryotes.	p26
Figure 9 : Classification des chitine synthases à partir de leurs séquences protéiques.	p26
Figure 10 : Virulence du mutant de classe V de <i>Fusarium oxysporum</i> observé sur tomates.	p28
Figure 11 : Virulence du mutant de classe VI chez <i>Ustilago maydis</i> observé sur maïs.	p28
Figure 12 : Altération des développements <i>in planta</i> et <i>in vitro</i> du mutant <i>chs3a</i> de <i>B. cinerea</i> .	p28
Figure 13 : Biosynthèse du réseau microfibrillaire de β -(1,3)-glucane chez les champignons filamenteux.	p32
Figure 14 : Structure du β -(1,3)-glucane branché en β -(1,6).	p32
Figure 15 : phénotypes observés chez des mutants <i>fks1</i> .	p38
Figure 16 : Structure du β -(1,3)-glucane linéaire (curdlane).	p40
Figure 17 : Représentation d'un polymère de β -(1,6)-glucane.	p42
Figure 18 : attachement d'une GPI protéine.	p44
Figure 19 : Biosynthèse des sucres nucléotidiques intervenant dans la synthèse des mannoprotéines chez la levure <i>S. cerevisiae</i> .	p48
Figure 20 : Représentation schématique des voies de signalisation MAPK chez la levure <i>S. cerevisiae</i> .	p50

Figure 21 : Représentation schématique de la voie de signalisation contrôlant l'intégrité pariétale chez <i>S. cerevisiae</i> .	p54
Figure 22 : Schéma de La transduction du signal de la voie de la Calcineurine chez <i>B. cinerea</i> .	p56
Figure 23 : La voie HOG chez <i>B. cinerea</i> .	p58
Figure 24 : la voie pH.	p60
Figure 25 : Effet d'un stress de pH alcalin sur les voies de signalisation de <i>S. cerevisiae</i>	p62
Figure 26 : Structure chimique d'inhibiteurs de la paroi fongique.	p66
Figure 27 : Compensation vers le métabolisme de la chitine	p70
Figure 28 : Pourriture noble observée sur baie de raisin.	p72
Figure 29 : Pourriture grise observée sur framboise, rose ou bien feuilles de haricot	p72
Figure 30 : Cycle infectieux de <i>Botrytis cinerea</i>	p74
Figure 31 : Structures d'infection de <i>Botrytis cinerea</i>	p76

Chapitre 1:

Figure 1: Inhibition curves, IC50 and Hill number determination for each compounds.	p93
Figure 2: IC50, Hill number and synergy determination between Caspofungin and Nikkomycin Z by a new method.	p95
Figure 3: IC50, Hill number and additivity determination between Caspofungin and Aculeacin A by a new method.	p97
Table 1: Synergistic effect according to Tammes method for 70% of growth inhibition between Caspofungin and Nikkomycin Z.	p97
Table 2: Additivity effect according to Tammes method for 70% of growth inhibition between Caspofungin and Aculeacin A.	p99
Figure 4: Light microscopic changes in growth development of <i>Botrytis cinerea</i> with Caspofungin, Aculeacin A and Nikkomycin Z alone or in combination after 72h of incubation.	p101
Figure 5: Light microscopic changes after cell wall inhibitors treatment with sorbitol as an osmoprotectant.	p103

Chapitre 2:

Figure 1: Venn Diagramms of Responsive genes in the three types of treatment.	p123
--	------

Figure 2: Distribution of Caspofungin responsive genes and comparison to yeasts data.	p125
Figure 3: Distribution of Nikkomycin Z responsive genes.	p127
Figure 4: Distribution of the combining treatment responsive genes.	p131
Figure 5: Expression patterns of genes encoding cell wall metabolism after different cell wall inhibitors treatments at IC80: Caspofungin 1µg/ml, Nikkomycin Z 10µg/ml, combining treatment: Caspofungin 0,3 µg/ml and Nikkomycin Z 1µg/ml, DMSO corresponding to the control (untreated).	p133
Figure 6: Expression patterns of genes encoding new fungal type II glycosyltransferases.	p137
Figure 7: Repartition of GPI proteins after cell wall inhibitors treatments.	p139

Chapitre 3:

Figure 1: Schéma de la construction d'une cassette de délétion par la technique de double-joint PCR.	p158
Figure 2 : Représentation schématique de la construction pSUPER portant la séquence en épingle à cheveux (sshRNA) destiné à réduire l'expression de <i>bcFKS1</i> .	p158
Figure 3 : Aspects morphologiques des souches témoins et retrouvés parmi les mutants RNAi.	p160
Figure 4 : Résultats des trois cribles PCR effectués.	p160
Tableau I : Récapitulatif des caractéristiques des amorces utilisées en PCR quantitative.	p162
Figure 5 : Souche BO5.10, 96 heures après repiquage d'un plug de mycélium sur milieu PDA.	p160
Figure 6 : PCR de vérification de l'insertion au locus des cassettes de délétion des mutants <i>CRD like</i> .	p164
Figure 7 : Morphologie des cultures en milieu liquide, des souches BO5.10 et de six mutants RNAi après 96 heures de croissance en milieu liquide agité.	p164
Figure 8 : Evaluation de l'expression de <i>bcfks1</i> chez les mutants purifiés.	p168
Figure 9 : Cinétique de croissance radiale mycélienne sur milieu solide.	p170
Figure 10 : Mesure de la sporulation après dix jours.	p172
Figure 11 : Pourcentage de germination et de formation d'appressoria unicellulaires.	p172
Figure 12 : Comparaison de la morphologie de spores.	p174
Figure 13 : Coussins d'infection formés par la souche sauvage BO5.10 et TR15 après quarante quatre heures d'incubation sur cellophane.	p174

Figure 14 : Test d'infection des mutants RNAi *bcfks1* et de la souche sauvage à partir d'un plug de mycélium sur cotylédons de cornichon après huit jours. p176

Figure 15 : Test d'infection des mutants RNAi *bcfks1* et de la souche sauvage à partir d'une suspension de spores sur cotylédons de cornichon après huit jours. p176

Figure 16 : Phénotypes observés à quatre jours des mutants RNAi et de la souche sauvage après traitement par la Nikkomycine Z, par la Caspofongine et par la combinaison de ces deux inhibiteurs. p178

Figure 17 : alignement du domaine GT2 entre les 3 séquences retrouvées chez *B. cinerea* et la curdlane synthase de *A. tumefaciens*, selon l'algorithme MAFFT. p180

Tableau 3 : Test d'inhibition des mutants RNAi *bcfks1* et de la souche sauvage par la Caspofongine et par la Nikkomycine Z. p182

Figure 18 : Test d'infection des mutants Δ crd a et de la souche sauvage à partir d'un plug de mycélium sur cotylédons de cornichon après huit jours. p184

Figure 19 : Test d'infection des mutants Δ crd b et de la souche sauvage à partir d'un plug de mycélium sur cotylédons de cornichon après huit jours. p184

Figure 20 : test de corrélation non paramétrique de Spearman entre le niveau d'expression du gène *bcfks1* et le niveau de croissance radiale chez la souche sauvage et chez sept mutants RNAi. p186

Figure 21 : Corrélation entre le niveau d'expression du gène *bcFKS1* et la sporulation à dix jours chez la souche sauvage BO5.10 et 6 mutants RNAi. p186

Tableau 4 : Récapitulatif des phénotypes observés chez les mutants RNAi *bcfks1* en comparaison avec la souche sauvage. p190

Introduction bibliographique

I- Introduction bibliographique

Les champignons filamenteux sont les principaux agents pathogènes des plantes et à l'origine de nombreuses maladies conduisant à des pertes économiques considérables en agriculture. La lutte phytosanitaire, avec l'utilisation de fongicides, reste le meilleur moyen de réduire l'impact de ces maladies au champ (Leroux, 2003). L'apparition de souches résistantes aux fongicides commercialisés d'une part, et l'adaptation à l'évolution des critères d'homologation par les nouvelles directives européennes et par la loi ecophyto 2018 d'autre part, contraignent à rechercher de nouvelles molécules présentant de nouveaux modes d'action plus spécifiques des cellules fongiques. La paroi fongique de part sa composition spécifique par rapport aux cellules animales et végétales représente une cible prometteuse. En effet, les cellules fongiques se caractérisent par la présence d'une paroi constituée en grande partie de polymères polysaccharidiques tels que la chitine, le β -(1,3)-glucane ou l' α -(1,2)-mannane. Le β -(1,3)-glucane et la chitine sont absents chez l'homme et la plupart des animaux, et environ 90 % des composés de la paroi fongique ne sont pas retrouvés ni chez l'homme, ni chez les plantes, ce qui offre la possibilité de développer des molécules antifongiques spécifiques inhibant les processus de biosynthèse de ces composés. De ce fait, on peut penser qu'un inhibiteur ciblant la biosynthèse de ces polysaccharides ne devrait pas avoir d'effets secondaires toxiques chez l'homme. Depuis quelques années, plusieurs produits antimycotiques ciblant la biosynthèse de β -(1,3)-glucane, comprenant la Caspofongine, la Micafongine et l'Anidulafongine, ont été commercialisés ou bien sont en phase de développement. Les Echinocandines ou certains terpenoïdes inhibent spécifiquement la synthèse du β -(1,3)-glucane et la Nikkomycine Z ou la Polyoxine D inhibent spécifiquement la biosynthèse de chitine (McCarthy et al, 1985 ; Mehta et al, 1984 ; Cabib, 1991). Aujourd'hui, seule la Polyoxine D a été commercialisée à usage agricole.

La paroi est une structure essentielle pour la survie de la cellule fongique ; elle est impliquée dans toutes les étapes de différenciation morphologique telles, que la germination des spores, la croissance du mycélium, la différenciation des structures de multiplication végétatives et sexuées. Le séquençage récent des génomes de plusieurs champignons phytopathogènes ainsi que le développement des outils moléculaires appropriés permettent de nouvelles approches afin de mieux connaître les mécanismes de biogénèse de la paroi cellulaire fongique ainsi que leur régulation.

A. La paroi fongique : un organe essentiel à la vie du champignon

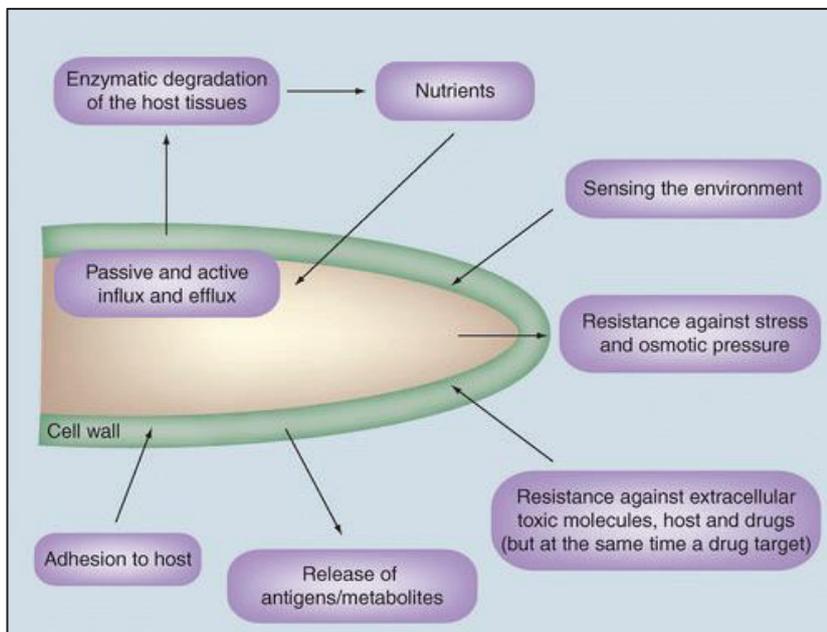


Figure 1 : Les différents rôles de la paroi fongique (Aimanianda et Latgé, 2010)

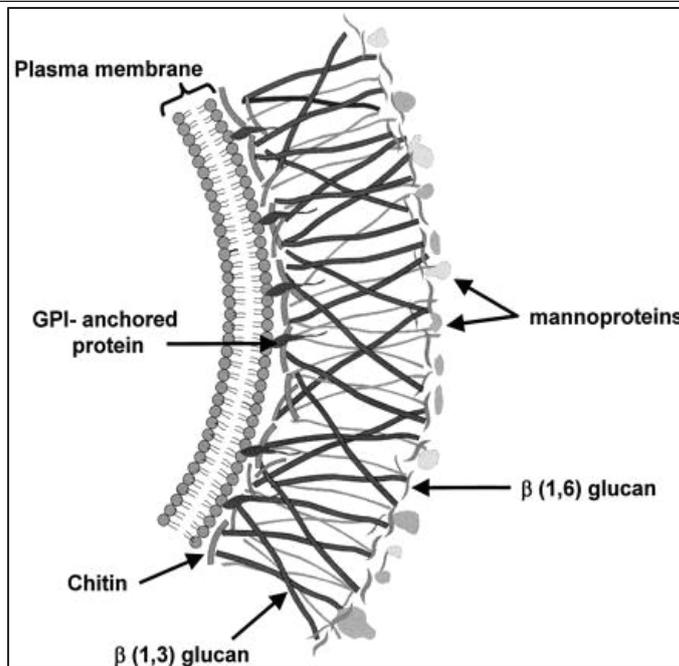


Figure 2 : Schéma simplifié de la paroi d'un champignon filamenteux

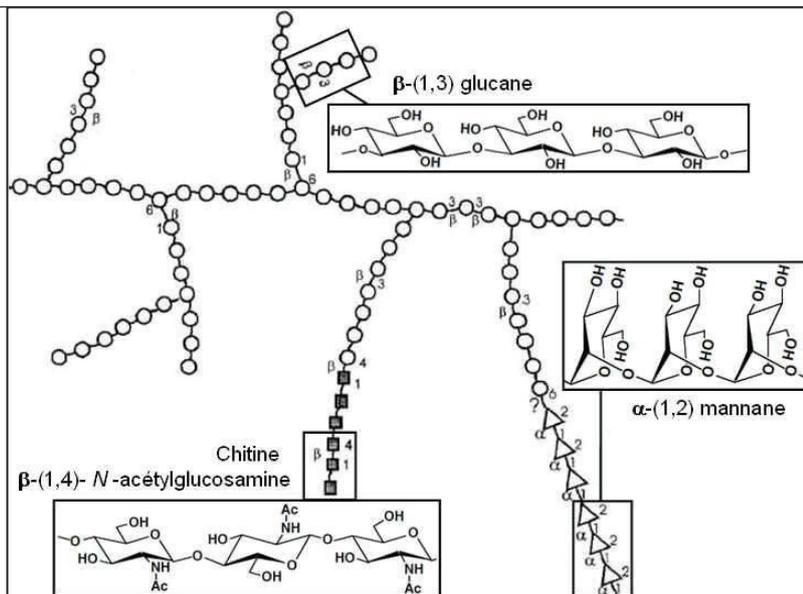


Figure 3 : Structure chimique du cœur polysaccharidique de la fraction alcali insoluble de la paroi d'*A. fumigatus* (Latge, 2007)

La paroi est au cœur de la biologie des champignons puisqu'elle est indispensable à leur survie. Elle est notamment essentielle à leur croissance, leur reproduction mais elle intervient aussi dans leur virulence dans le cas des champignons pathogènes. En effet, en son absence le champignon meurt à moins d'être cultivé en présence d'un osmoprotectant lui permettant de se protéger d'un stress osmotique. La paroi fongique confère à la fois une fonction de protection de part son rôle de barrière avec le milieu extérieur au champignon. En effet, elle permet au champignon de ressentir les différents stress environnementaux (Figure 1). La paroi est alors impliquée dans la résistance aux stress extérieurs comme la résistance aux variations de pression osmotique, la résistance contre les molécules toxiques et les drogues. Par ailleurs, elle joue un rôle primordial dans la nutrition des champignons car elle est impliquée dans le transport d'enzymes hydrolytiques qui dégradent des substrats complexes en nutriments qui sont alors, transportés à l'intérieur de la cellule fongique (Figure 1). Enfin, la paroi possède un rôle dans la virulence fongique dans le cas des champignons pathogènes de part son implication dans l'adhésion à la surface de l'hôte, étape préliminaire à l'invasion et la colonisation de l'hôte. Par ailleurs, la paroi peut également servir de réservoir de molécules d'origine fongique et ayant un rôle actif lors de l'infection : molécules d'adhésion, enzymes hydrolytiques (Latgé, 1999) Ces molécules participent à la dégradation des tissus hôtes permettant au champignon de pénétrer son hôte. (Figure 1).

B. La paroi fongique : une composition chimique complexe

La paroi cellulaire des champignons est constituée d'un réseau tridimensionnel de polysaccharides interconnectés, qui sont la chitine, le glucane ou le mannane (Figure 2, 3). C'est une structure dynamique dont la composition change continuellement et qui dépend des modifications des conditions de culture, du stress environnemental et du stade de développement fongique. Toutefois, quelles que soient les conditions dans lesquelles se trouve le champignon, la proportion des polysaccharides représente plus de 90% des constituants de la paroi fongique. La paroi est une structure insoluble rendant son étude difficile et nécessitant une solubilisation afin de pouvoir l'analyser avec précision. L'étude approfondie de la paroi fongique a surtout été réalisée sur les modèles *Aspergillus fumigatus*, pathogène de l'homme et *Saccharomyces cerevisiae*, levure modèle (Latgé *et al*, 2007). Toutefois, malgré de nombreux travaux, la biosynthèse de la paroi fongique est encore loin d'être élucidée, en particulier chez les champignons filamenteux.

a. La chitine

La chitine est le polysaccharide le plus abondant dans la nature après la cellulose. Il est présent dans l'exosquelette des crustacés, les coquillages, la cuticule des insectes et la paroi des champignons

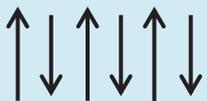
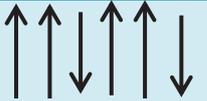
Forme	Arrangements des chaînes
Chitine α	antiparallèles 
Chitine β	parallèles 
Chitine γ	2 parallèles et 1 antiparallèle 

Figure 4 : Les différentes conformations de la chitine

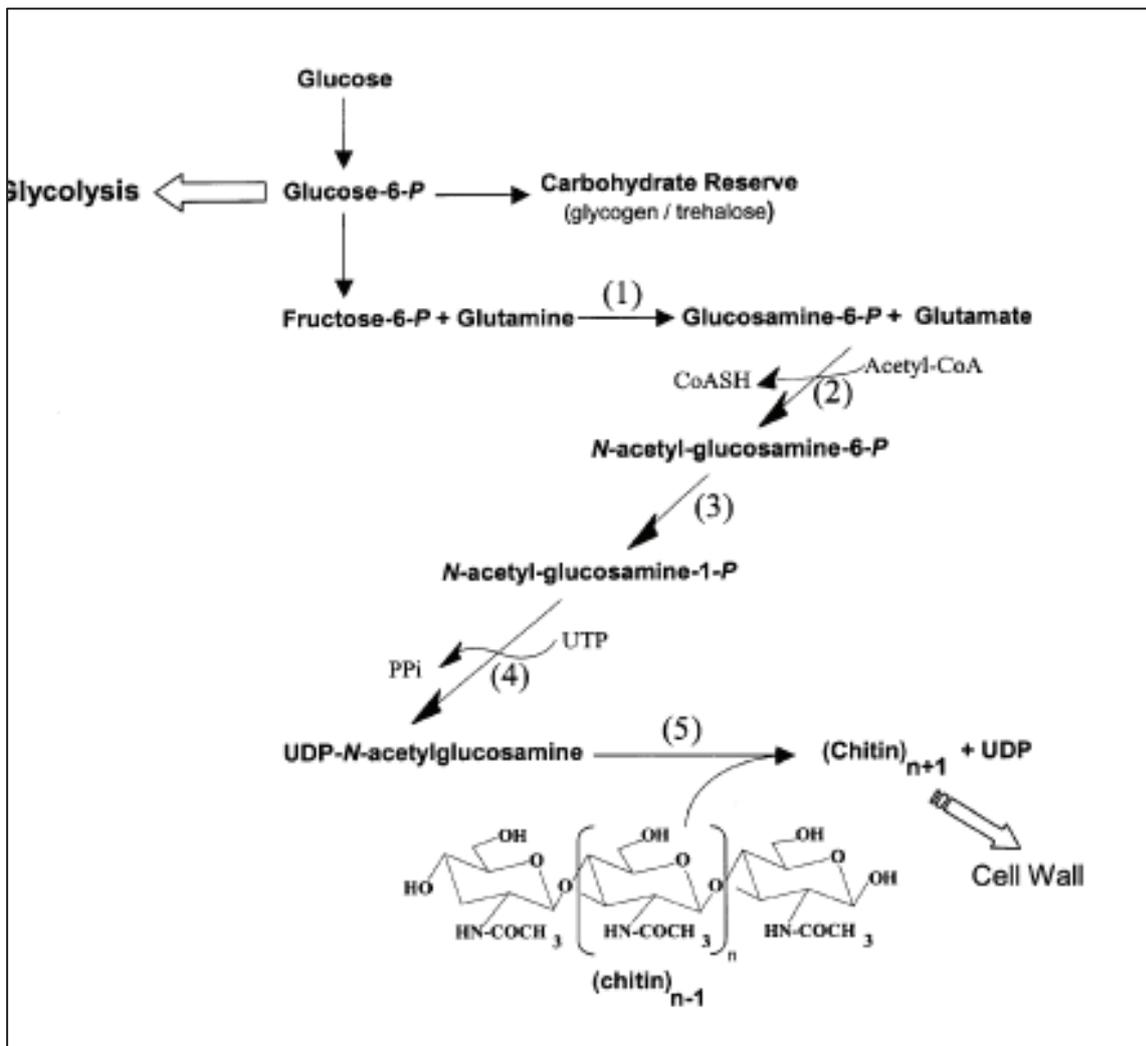


Figure 5 : Synthèse de chitine reliée à la glycolyse (Largorce et al, 2002a)

(1) glutamine±fructose 6-phosphate amidotransferase; (2) glucosamine phosphate N-acetyltransferase; (3) phospho-N-acetylglucosamine; (4)UDP-N-acetylglucosamine (5) chitin synthase.

ainsi que chez certaines éponges et algues marines (Merzendorfer *et al*, 2011). La chitine représente environ 2% du poids sec de la paroi de *S. cerevisiae* (Osmond *et al*, 1999) mais elle peut représenter jusqu'à 60% du contenu pariétal chez les champignons filamenteux (Ruiz-Herrera, 1992). La chitine est un élément essentiel pour la rigidité de la paroi fongique.

1- Structure :

Le polymère de chitine est un polysaccharide formé de longues chaînes linéaires d'environ 120 résidus N-acetylglucosamine liés en β -(1,4). De 20 à 400 chaînes s'associent entre elles par des liaisons hydrogènes pour former des microfibrilles (Ruiz-Herrera et San Blas, 2003). La chitine présente trois types de conformations cristallines différentes : α , β et γ (Figure 4) qui se distinguent par le nombre de chaînes de chitine, leur taille et leur degré d'hydratation (Merzendorfer, 2006 ; Koushab *et al*, 2010). La conformation α présente des chaînes polysaccharidiques disposées de manière antiparallèles permettant ainsi un grand nombre de liaisons hydrogènes ce qui assure une forte rigidité (Figure 4). La forme α de la chitine est la forme la plus abondante. On la retrouve notamment dans les carapaces de crustacés et dans les parois fongiques (Noishiki *et al*, 2005). La configuration β , absente chez les champignons, est beaucoup moins abondante et présente des chaînes polysaccharidiques parallèles entre elles (Figure 4). Dans cette conformation, la chitine possède une plus grande hydrophilie (Noishiki *et al*, 2005). Enfin la conformation γ se caractérise par une alternance entre deux chaînes parallèles avec une chaîne antiparallèle (Figure 4). Cette conformation très rare et mal connue n'a été observée que dans les téguments des nymphes d'un coléoptère (*Ptinus*) (Rudall et Kenchington, 1973). La chitine peut aussi être déacétylée et forme alors le chitosane qui est un copolymère de glucosamine et de N-acetylglucosamine (Figure 6). Le chitosane est un élément important de la paroi des spores (Ruiz-Herrera et Ortiz-Castellanos, 2010). Chez les champignons, la chitine est liée de façon covalente aux β -(1,3) et β -(1,6)-glucanes.

2- La biosynthèse :

La biosynthèse de chitine est réalisée par des enzymes membranaires de la famille des glycosyltransférases de type 2, appelées chitines synthases (Choquer *et al*, 2004). Leur poids moléculaire est compris entre 100 et 150kDa (Roncero, 2002). Chez les champignons, les chitines synthases sont localisées au niveau de la membrane plasmique et des chitosomes (Bulawa *et al*, 1993 ; Leal-Morales *et al*, 1988 ; Bartnicki-Garcia et Bracker, 1984 ; Leal-Morales *et al*, 1994) qui sont des vésicules cytoplasmiques mesurant entre 40 et 70 nm de diamètre. Il s'agit d'un réservoir majeur de chitine synthases. Les chitosomes seraient impliqués dans la délivrance des chitines synthases à la membrane plasmique (Leal-Morales *et al*, 1994 ; Bartnicki-Garcia, 1999). Lors de la croissance

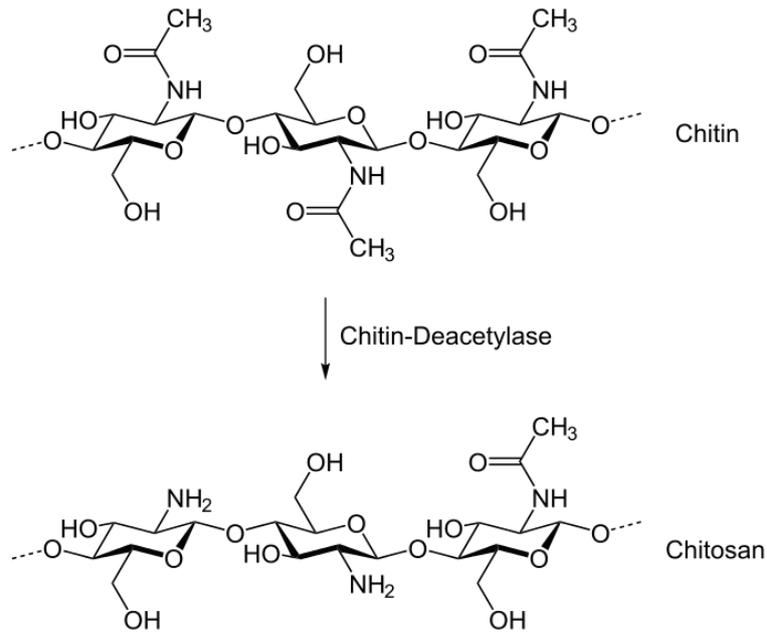


Figure 6 : Représentation schématique de la synthèse du chitosan

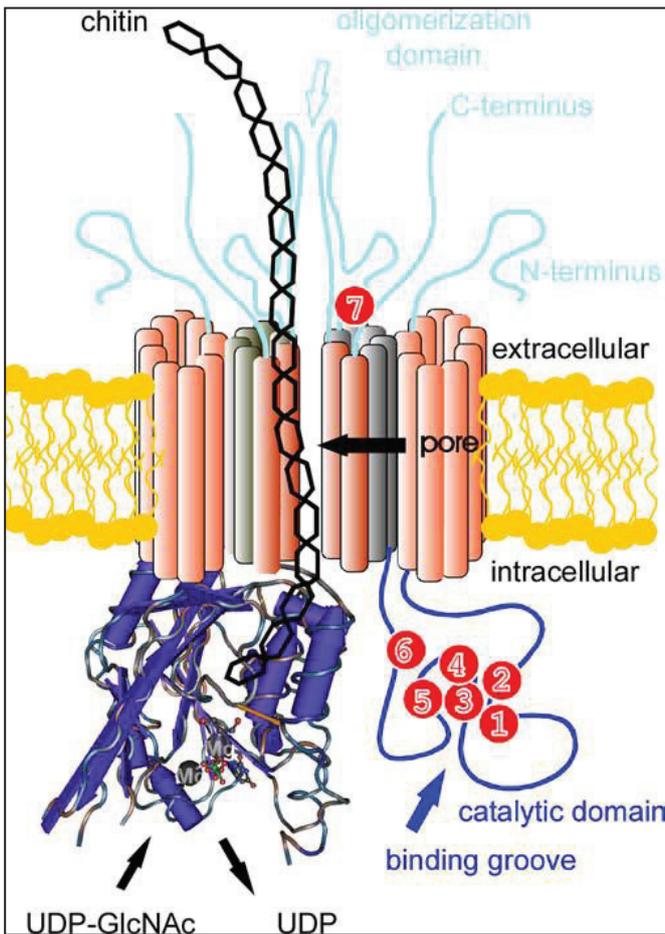


Figure 7 : Représentation schématique hypothétique de la Réaction de polymérisation de la chitine. Modèle structural hypothétique de chitine synthase : un homodimère membranaire est représenté dont les hélices transmembranaires C-terminales forment un pore à travers duquel le polymère en croissance est extrudé. Les domaines protéiques sont indiqués par trois couleurs : orange pour les hélices transmembranaires, bleu foncé pour les domaines cytoplasmiques et bleu clair pour les domaines extracellulaires. Les lipides sont indiqués par la couleur jaune et les cercles numérotés montrent les motifs conservés dans la famille des enzymes de glycosyltransférases de type II. Le domaine catalytique cytoplasmique est schématisé sur le monomère gauche selon le modèle 3D hypothétique du complexe UDP-magnésium transférase de *Bacillus subtilis* (Charnok et Davies, 1999)

hyphale, on retrouve d'ailleurs de nombreux chitosomes localisés au niveau de l'apex. Les chitines synthèses présentes dans les chitosomes sont inactives et subissent une activation protéolytique après fusion de la vésicule avec la membrane plasmique (Cabib et Farkas, 1971). Les chitines synthèses permettent le transfert glucidique de N-acétylglucosamine sur l'extrémité non réductrice d'une chaîne de chitine en croissance, à partir d'UDP-N-acétylglucosamine (Figures 5, 7). L'initiation de la synthèse des chaînes de chitine a lieu au niveau du cytosol. La fin de la réaction et la translocation de la chitine se réalise après rupture de la liaison covalente liant la chitine à la chitine synthase. La biosynthèse de chitine comporte deux parties, une polymérisation par transfert glucidique et un assemblage des chaînes au cours duquel les chaînes de chitine s'associent pour former de la chitine α ou β (Figure 5). Tout d'abord, la synthèse d'UDP-N-acétylglucosamine est réalisée à partir de glucose par quatre enzymes également impliqués dans la glycosylation des protéines : une glutamine fructose-6-phosphate amidotransférase, une glucosamine phosphate-N-acétyltransférase, une N-acétylglucosamine-1P mutase et une UDP-N-acétylglucosamine phosphorylase (Figure 5). La dernière étape de la biosynthèse de la chitine est sous contrôle des chitine synthases, qui vont alors polymériser les chaînes de chitines à partir d'UDP-N-acétylglucosamine.

Il est enfin intéressant de noter que l'UDP-N-acétylglucosamine, substrat des chitine synthases, est une molécule qui est aussi impliquée dans d'autres processus biologiques tels que la N-Glycosylation des chaînes peptidiques, la formation de l'ancre GPI de certaines protéines et dans la synthèse des glycolipides chez les Eucaryotes. Par ailleurs, il intervient dans la production de lipopolysaccharides et du peptidoglycane chez les procaryotes. Les voies de biosynthèse d'UDP-N-acétylglucosamine eucaryote et procaryote subissent quelques inversions (Figure 8). Puisque le N-acétylglucosamine-1-P est synthétisé à partir de glucosamine-1-P chez les procaryotes et à partir de N-acétylglucosamine-6-P chez les eucaryotes.

3- Classification des Chitine synthases :

Les premiers gènes de chitine synthases ont été isolés et séquencés chez les levures et les champignons filamenteux (Bulawa *et al*, 1986 ; Yarden et Yanofsky, 1991). Le nombre d'isoenzymes de chitine synthase varie de une chez l'organisme microsporidien *Encephalitozoon cuniculi* (Ruiz-Herrera et Ortiz-Castellanos, 2010), à 20 chitine synthases chez *Rhizopus oryzae*. Il existe sept classes de chitine synthases réparties en trois divisions en fonctions de similarités protéiques (Choquer *et al*, 2004). Toutes les protéines appartenant à la famille des glycosyltransférases de type 2 et contiennent une signature QXRRW (Saxena *et al*, 1995). Les cinq premières classes possèdent trois motifs conservés : QXXEY, EDRXL et QXRRW, la position de ces motifs varie en fonction des classes de

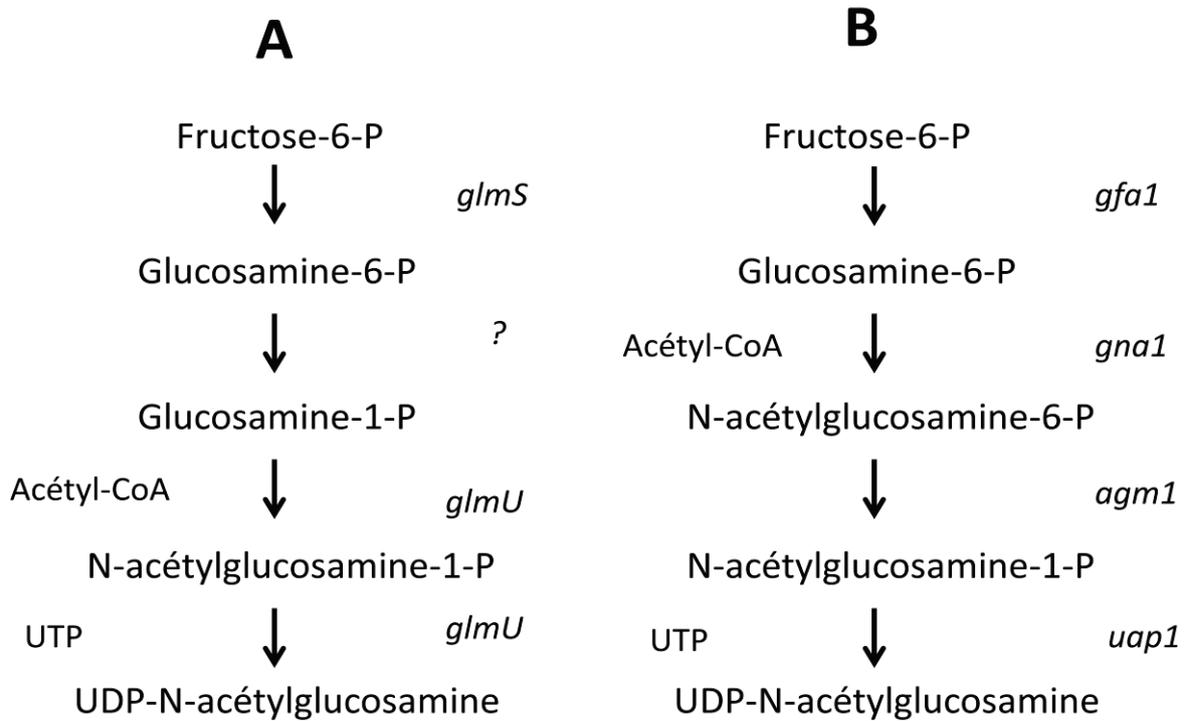


Figure 8: Biosynthèse de l'UDP-N-acetylglucosamine chez les procaryotes (A) et chez les eucaryotes (B) (Mengin-Lecreulx et Heijenoort, 1994 ; Yamada-Okabe et al, 2001).

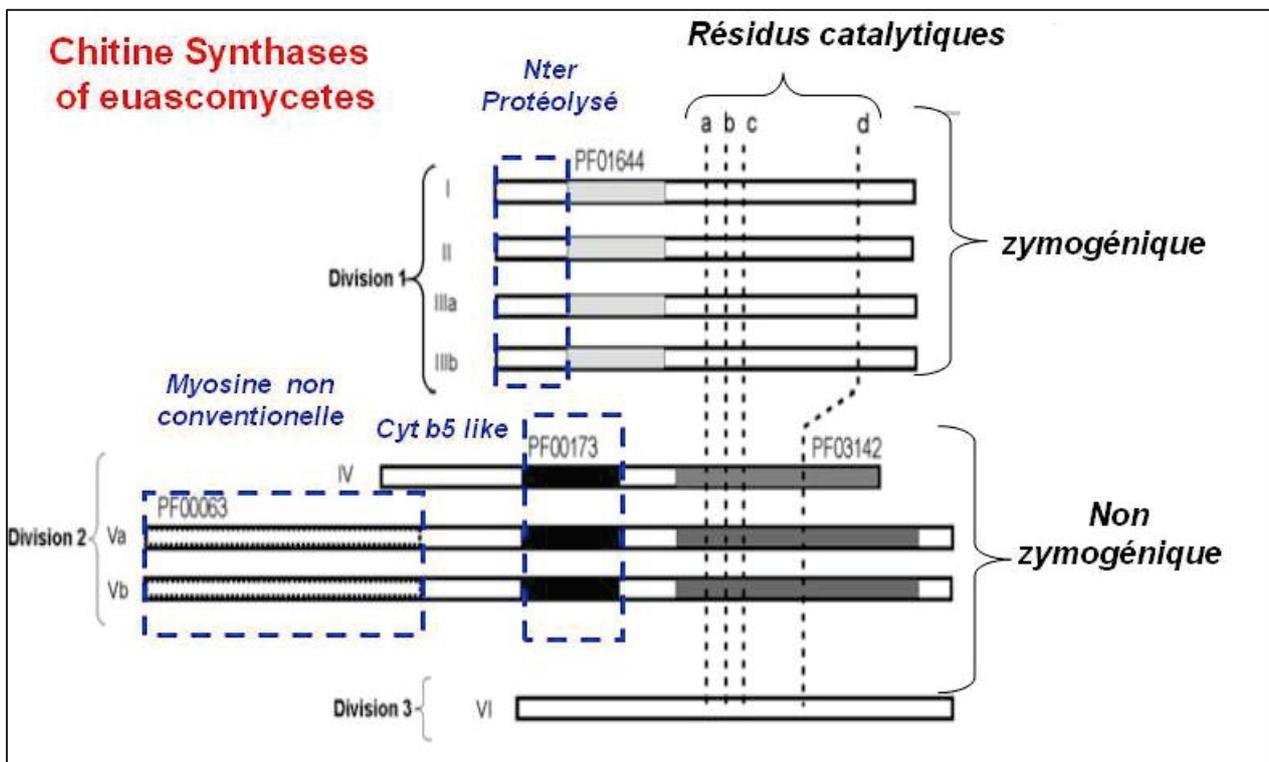


Figure 9: Classification des chitine synthases à partir de leurs séquences protéiques (Choquer *et al*, 2004). Les chitine synthases sont réparties en trois divisions et sept classes en fonction de domaines protéiques conservés. La division est caractérisée par la présence du domaine PF01644 et les chitine synthases de cette division necessite une activation protéolytique. La division 2 elle est caractérisé par la présence du domaine PF00173. Les chitines synthases de cette division ne necessite pas d'activation protéolytique. Cette division est absente chez les levures.

chitine synthase (Choquer *et al*, 2004). Ces motifs se situent au centre de la séquence protéique pour les classes I, II et III, alors que pour les classes IV et V, ils se situent en position C-terminale. Des mutations du motif QXRRW sont responsables de la perte d'activité chitine synthase chez *S. cerevisiae* (Cos *et al*, 1998). La division 1 caractérisée par la présence d'un domaine pfam 01644, comporte les chitines synthases des classes I, II et III qui possèdent une organisation commune se caractérisant par un domaine catalytique entouré de deux régions hydrophobes (Figure 9). La division 2 définie par la présence d'un domaine cytochrome b5 like (pfam 00173) et un domaine pfam 03142 en C-terminal quant à elle regroupe les chitine synthases des classes IV, V et VI (Figure 9). Les chitines synthases de classe V et VI possèdent un domaine moteur de myosine (pfam 00063) (Figure 9) Ce moteur de myosine semble être impliqué dans l'adressage des chitine synthases à la membrane plasmique par coopération avec les filaments d'actine et est requis pour la virulence fongique (Weber *et al*, 2006). En effet, le mutant de la CHS de classe V, délété de ce domaine, chez *Ustilago maydis*, présente une perte de pathogénicité (Treitschke *et al*, 2010 ; Weber *et al*, 2006). Les chitines synthases de classes III, V et VI sont spécifiques des champignons filamenteux (Choquer *et al*, 2004). Par ailleurs, il semble que les chitine synthases de classe III et V soient importantes pour le développement *in vitro* et *in planta* des champignons phytopathogènes (Soulie *et al*, 2006, Madrid *et al*, 2003).

4 - Rôle des Chitine Synthases :

La multiplicité des gènes codant des CHS est fondamentale pour assurer les processus de septation et de croissance des hyphes fongiques (Roncero, 2002). En effet, la plupart des mutants affectés dans un seul gène de CHS n'ont souvent aucun phénotype (Motoyama *et al*, 1994 ; Spetch *et al* 1996) alors que les phénotypes des doubles ou triples mutants sont beaucoup plus marqués voire létaux. (Ichinomiya *et al*, 2005 ; Shaw *et al*, 1991 ; Wang *et al*, 2001). Par ailleurs, la multiplicité des gènes de CHS pourrait aussi avoir un rôle dans l'accomplissement du cycle de vie complexe des champignons filamenteux (Ruiz-Herrera *et al*, 2002). En effet, la régulation transcriptionnelle de certaines CHS au cours du cycle de développement étaye cette hypothèse (Lee *et al*, 2004 ; Robledos-Briones *et al*, 2012). L'étude du phénotype des mutants de CHS chez les levures a permis d'attribuer un ou plusieurs rôles à ces gènes (Munro *et al*, 2001 ; Osmond *et al*, 1999). Néanmoins, cette étude chez les champignons filamenteux n'a pas permis de clarifier leur rôle. Il semble que les CHS de la classe II soient impliqués dans la formation des conidies d'*Aspergillus nidulans*. (Culp *et al*, 2000 ; Motoyama *et al*, 1997). La classe III quant à elle semble sans importance chez *Ustilago maydis* (Gold et Kronstad, 1994) et *Wangiella dermatidis* (Wang *et al*, 2000) mais semble être impliqué dans des fonctions biologiques importantes chez d'autres organismes. En effet, il a été montré chez *Aspergillus oryzae*, *Neurospora Crassa*, *A. nidulans* et *Botrytis cinerea* que les mutants délétés de la chitine synthase de classe III, présentent

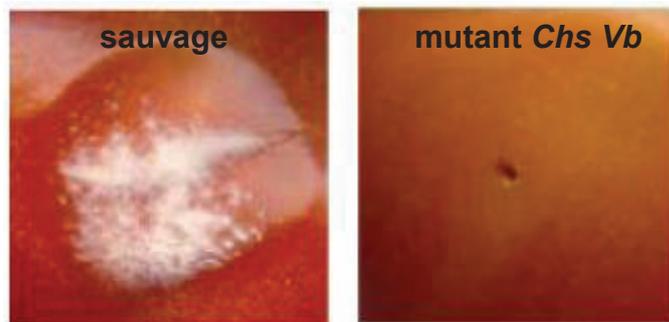


Figure 10 : Virulence du mutant de classe V de *Fusarium oxysporum* observé sur tomates. Résultats observés deux jours après injection d'une suspension de spores et incubation en milieu saturé en humidité (Madrid *et al*, 2003).



Figure 11: Virulence du mutant de classe VI chez *Ustilago maydis* observé sur maïs (Garcera-Teruel *et al*, 2003).

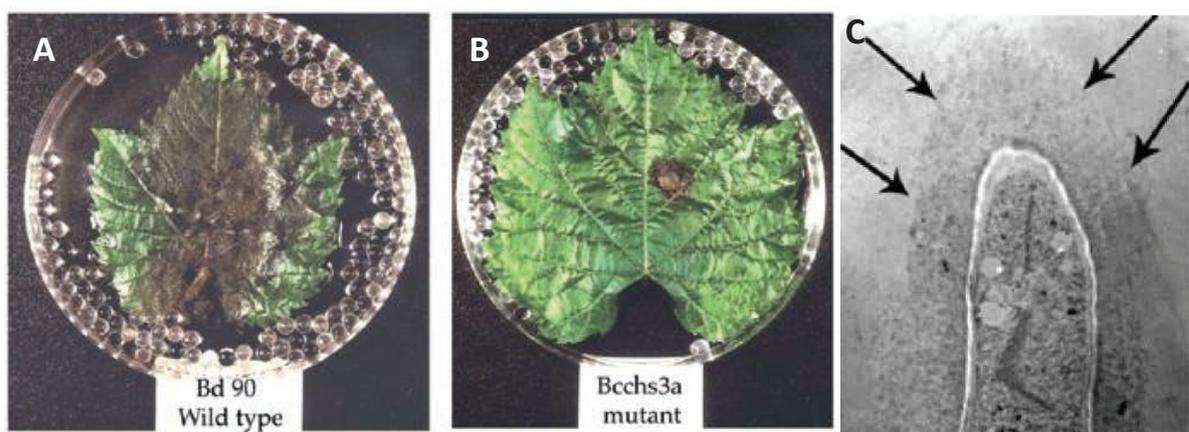


Figure 12 : Altération des développements *in planta* et *in vitro* du mutant Δ chs3a de *B. cinerea* (Soulie *et al*, 2006). Développement de la souche sauvage A, et du mutant B sur feuille de vigne. Matrice extracellulaire aberrante du mutant au niveau de l'apex C.

des aberrations morphologiques, un mycélium hyperbranché, un pouvoir pathogène réduit, voir une absence de conidiation (Figure 12) (Muller *et al*, 2002 ; Yarden et Yanofsky, 1991, Borgia *et al*, 1996). La classe IV semble être essentielle pour la morphogénèse de certains champignons filamenteux (Shaw *et al*, 1991 ; Mio *et al*, 1996). Cependant, cette classe ne montre pas de rôle important chez *N. crassa* (Din *et al*, 1996). Les gènes de la classe V (possédant un domaine myosine) sont présents chez tous les champignons filamenteux pathogènes (Aufauvre-Brown *et al*, 1997 ; Fujiwara *et al*, 1997) *B. cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Ustilago maydis*, pathogènes de plantes et *Paracoccidoides brasiliensis*, *W. dermatidis* pathogène de l'homme (Madrid *et al*, 2003 ; Choquer *et al*, 2004 ; Nino-vega *et al*, 2004 ; Lui *et al*, 2004). Il a été montré que le moteur de myosine semble avoir un rôle dans l'adressage des CHS à la membrane plasmique par l'intermédiaire des filaments d'actine. En effet, le transport des chitine synthases semble être assuré conjointement par les microtubules et par les filaments d'actine. La délétion du moteur de myosine chez la CHS de classe V chez *U. maydis*, montre une absence de transport de la chitine synthase par les filaments d'actine et une réduction de la pathogénicité (weber *et al*, 2006 ; Xoconostle-cazares *et al*, 1997). Cette classe semble avoir un rôle dans la pathogénicité chez les champignons phytopathogènes, puisque plusieurs mutants obtenus chez des champignons phytopathogènes (*F. oxysporum*, *U. maydis*) montrent une altération de leur pathogénicité (Figure 10). Etant donné le nombre de gènes de CHS, la détermination du rôle des CHS par mutagenèse demeure toutefois difficile. L'obtention d'une série de mutants dans chacune des classes de chitine synthase chez plusieurs champignons filamenteux n'a pas permis de souligner un rôle précis de ces enzymes et d'associer une fonction biologique à une classe de chitine synthase. En effet, les phénotypes obtenus pour ces mutants concernent des aspects très différents de la biologie des champignons. Certains mutants présentent une absence de conidiation, d'autres sont affectés dans leur croissance, et d'autres encore montrent une sensibilité accrue au stress osmotique. Ainsi, chez *A. fumigatus*, champignon pathogène de l'homme, les deux chitine synthases appartenant à la classe III auraient des rôles très divergents, car les simples mutants délétés de ces gènes présentent des phénotypes très différents. L'un comporte un phénotype très proche de la souche sauvage, alors que le second est affecté dans la croissance et la conidiation, et forme un réseau mycélien hyperbranché. Cependant, la capacité d'infection de ces deux mutants n'est pas altérée (mellado *et al*, 1996).

Dans le cas des champignons phytopathogènes, de nombreuses études ont été réalisées sur des mutants des chitine synthases de classe V et VI sur plusieurs modèles biologiques et montrent des altérations importantes du développement *in vitro* et *in planta*. (Figure 11). En effet, chez *A. nidulans*, les activités des chitine synthases de classe V et VI auraient toutes deux une fonction essentielle dans la croissance *in vitro* du champignon (Takeshita *et al*, 2006). Dans le cas de *Fusarium*

graminearum et, *F. oxysporum*, ces activités joueraient également un rôle important dans la pathogénie (Figure 10). (Kim *et al*, 2009). En effet, cette activité protégerait le champignon contre les composés toxiques sécrétés par la plante hôte tel que l' H_2O_2 ou bien la tomato phytoanticipine α (Madrid *et al*, 2003 ; Martin-Uridoz *et al*, 2008) (Figure 10). Par ailleurs, le mutant de la CHS de classe V chez *F. oxysporum* provoque une elicitation des réactions de défenses des plantes. En effet, lors d'une infection par le mutant, la plante produit trois fois plus d'endochitinase qu'en présence de la souche sauvage (Pareja-jaime *et al*, 2010). Un mutant de la classe VI a également été obtenu chez *Ustilago maydis*, et révèle un rôle primordial de cette CHS de classe VI dans la virulence (Figure 11). Par ailleurs, cette activité jouerait un rôle dans la structure cellulaire, en particulier au stade mycélien, car le mutant correspondant présente une structure de la paroi différente, ainsi qu'un réseau mycélien hyperbranché (Garcera-Teruel *et al*, 2003).

Afin de dégager les rôles respectifs des différentes chitine synthases de *Botrytis cinerea*, des mutagenèses systématiques des chitine synthases ont été entreprises. Les simples mutants des classes I, III et IV ont été construits par interruption de gène, par M.-C. Soulié (Université Paris VI) et A. Vidal-Cros (CNRS). Le mutant de la classe I présente une diminution de 30% de son contenu en chitine. Sa croissance *in vitro* n'est pas affectée, mais on observe une réduction de la virulence sur feuille de vigne. Il a alors été proposé que l'activité de classe I contribue à l'intégrité de la paroi et que son inactivation provoque un affaiblissement de la paroi conduisant à un ralentissement de la progression du champignon *in planta* (Soulié *et al*, 2003). Le mutant de la classe IIIa présente un phénotype très marqué. Des aberrations morphologiques sont observées, telles qu'un mycélium hyperbranché, et un pouvoir pathogène très réduit sur feuille de vigne (Figure 12). Un dosage des composés pariétaux, indique une diminution de 33% du contenu en chitine chez le mutant, ceci semble montrer un affaiblissement de la paroi. Par ailleurs, ce mutant montre une production aberrante en matrice extracellulaire qui semble compenser les altérations pariétales (Soulié *et al*, 2006) (Figure 12). Par ailleurs, Il a été montré que le mutant de la *CHS3a* chez *B. cinerea* induit une accumulation de phytoalexines sur le site d'infection. Il semblerait donc que la Chs3a ait un rôle non seulement dans la virulence fongique mais aussi dans la mise en place des réactions de défense des plantes (Arbelet *et al*, 2010). Le mutant de la classe IV, quant à lui, ne présente pas de différence de croissance, de sporulation, ou de contenu en chitine. Cependant, il se caractérise par un retard dans les étapes précoces de l'infection, les études ayant été effectuées sur trois hôtes (vigne, arabette et haricot). La chitine produite par l'activité de classe IV contribuerait donc à rigidifier la paroi du champignon et ainsi à faciliter sa pénétration (Choquer *et al*, 2004). Un mutant de la classe VI a également été construit par M.-C. Soulié, (Université Paris VI). Cependant, le mutant obtenu n'a pas pu être purifié par reproduction asexuée ou croisement sexué, et se maintient au stade

hétérocaryotique, c'est-à-dire en mélange de noyaux sauvages et de noyaux mutés. Il est alors possible d'envisager l'hypothèse que le gène encodant la chitine synthase de classe VI soit essentiel chez *B. cinerea*, et que son inactivation soit létale pour ce champignon, ce qui expliquerait la difficulté pour purifier le mutant (Morcx *et al*, 2013).

5-Dosage d'activité enzymatique:

L'activité des CHS est dosée sur des fractions membranaires. Le test enzymatique mis au point chez *S. cerevisiae* permet de doser spécifiquement les 3 activités de la levure en intervenant notamment au niveau du choix de l'ion métallique et du pH (Choi et Cabib, 1994) En effet, l'ion Ni^{2+} inhibe l'activité des chitine synthases Chs1 et Chs2 (CHS de classe I et II) mais n'a aucun effet sur l'activité de la chitine synthase Chs3 (CHS de classe III). L'ion Co^{2+} quant à lui inhibe l'activité de la chitine synthase Chs1 mais pas celle des Chs2 et Chs3. De plus, le pH optimum des trois chitine synthases étant différent, cela permet un dosage spécifique de chacune des trois activités. L'activité de classe I s'est révélée être l'activité majoritairement dosée lors de croissance *in vitro*, correspondant à 90% de l'activité CHS de la levure. La digitonine est actuellement le seul tensioactif capable de solubiliser l'activité CHS. Il semblerait qu'à cet effet de solubilisation s'ajoute un effet d'activation. Il a été montré que l'ajout supplémentaire de trypsine était indispensable ou améliorait grandement les activités dosées (Bulawa, 1993, Choi *et al*, 1994, Uchida *et al*, 1996). Cependant, le site de protéolyse d'une CHS n'a pas encore été décrit et le caractère zymogénique observé *in vitro* est encore mal compris. Contrairement à ce qui est décrit chez les levures, il n'a pas encore été décrit de conditions de dosage permettant de mesurer spécifiquement une activité CHS chez un champignon filamenteux. On parle donc de dosage d'activité chitine synthase globale, sans savoir à quelle activité on se rapporte exactement.

b. les glucanes

1. les β -(1,3)-glucanes

a. Structure

Les β -(1,3)-glucanes sont composés de longs polymères linéaires de β -(1,3)-glucose avec quelques branchements en β -(1,6). Les chaînes de β -(1,3)-glucanes sont constituées d'environ 1500 unités de glucose, avec une structure fibrillaire (Abott *et al*, 2009 ; Krainer *et al*, 1994 ; Manners *et al*, 1973). Les β -(1,3)-glucanes sont les composés conférant l'élasticité de la paroi fongique. Les β -(1,3)-glucanes peuvent être liés de façon covalente aux chaînes de chitine par des liaisons β -(1,4), β -(1,6) et β -(1,3) (Figure 14 ; Lesage et Bussey, 2006). Chez les levures, la paroi, de *Candida albicans* et *S. cerevisiae* est

composée respectivement de 30-39% (Ruiz-Herrera *et al*, 2006) ou de 30-45% de β -(1,3)-glucanes (Aguilar-Uscanga et François, 2003).

b. Biosynthèse

La synthèse des β -(1,3)-glucanes a tout d'abord été caractérisée au niveau enzymatique puis, dans un second temps au niveau génétique. La réaction de synthèse des β -(1,3)-glucane met en jeu le transfert d'une unité glucose sur une chaîne de polymère en formation (Figure 13). Le donneur de glucose est l'UDP-glucose. L'activité β -(1,3)-glucane synthase qui est localisée au niveau membranaire est activée en présence d'EDTA, d'ATP et de GTP (Shematek *et al.*, 1980), (Notario *et al.*, 1982). Le produit de cette réaction s'est bien révélé être des β -(1,3)-glucanes du fait de leur alcali-solubilité, de leur insolubilité dans l'eau, et surtout de leur sensibilité à la β -(1,3)-glucanase. L'activation de la β -(1,3)-glucane synthase par le GTP est indépendante du transfert du γ -phosphate puisque des analogues du GTP incapables de transférer ce groupement agissent comme stimulateurs de l'activité β -(1,3)-glucane synthase (Figure 13). Par la suite, il a été mis en évidence que cette activité enzymatique était séparable en deux fractions, l'une soluble et l'autre membranaire, chacune des deux étant inactive seule. L'activité est restaurée lorsqu'on mélange les deux fractions en présence de GTP ou de l'un de ses analogues. La fraction membranaire insoluble semble contenir la sous unité catalytique de l'enzyme et le site de fixation de l'UDP-glucose, alors que la fraction soluble serait une protéine capable de fixer le GTP, et pourrait avoir un rôle régulateur (Kang et Cabib, 1986). Cette protéine fixant le GTP a été identifiée depuis comme étant le produit du gène *RHO1* (Mazur *et al*, 1996 ; Qadota *et al*, 1996).

Des études réalisées principalement sur *S. cerevisiae* et *A. fumigatus* ont montré que la synthèse des β -(1,3)-glucanes et leur extrusion à travers la membrane plasmique sont effectuées par un complexe protéique membranaire, la glucane synthase utilisant comme substrat l'UDP-glucose présent dans le milieu intracellulaire (Douglas, 2001). Ce complexe protéique contient deux sous-unités, une catalytique et l'autre régulatrice. La sous-unité catalytique putative (Fks) est représentée par une protéine de plus de 200 kDa présentant des domaines transmembranaires (Abott *et al*, 2009 ; Douglas, 2001). Chez *A. fumigatus*, le complexe glucane synthase est constitué d'au moins une sous-unité régulatrice Rho1p activée par le GTP. Dans l'espace périplasmique, les β -(1,3)-glucanes linéaires néosynthétisés sont modifiés et associés aux autres polymères pariétaux, notamment la chitine cristalline, pour la constitution de l'armature rigide de la paroi fongique (Figure 13).

c. Rôle de la glucane synthase

De façon similaire à ce qui est décrit pour les chitine synthases, le nombre de gènes codant les β -(1,3)-glucane synthases varie selon les espèces. La sous unité catalytique de la β -(1,3)-glucane

synthase est codé par le gène *FKS1*. Trois gènes homologues codant pour cette sous unité ont été identifiés dans les génomes de *S. cerevisiae* (*FKS1*, *FKS2*, *FKS3*) et *C. albicans* (*GSC1*, *GSL1* et *GSL3*) (Douglas *et al*, 1997 ; Ishihara *et al.*, 2007 ; Mio *et al*, 1997). Contrairement aux levures, seul un seul orthologue de *FKS1* a été identifiée chez les champignons filamenteux (Tentler *et al*, 1997 ; Kellner *et al*, 2005 ; Ha *et al*, 2006 ; Yang *et al*, 2011 ; Firon *et al*, 2002). Aucune des deux signatures typiques des glycosyltransférases de type 2 , proposées pour les sites de fixation du substrat UDP-glucose (D, D) et de catalyse de l'enzyme (D, QXXRW) n'est présente dans les orthologues de la protéine Fks1, suggérant que les β -(1,3)-glucane synthases constituent une famille différente des glycosyltransférases de type 2 (Ruiz-Herrera *et al*, 2006). La délétion simultanée des gènes *FKS1* et *FKS2* qui codent des protéines identiques à 88% est létale chez les levures. Fks1 et Fks2 sont considérées comme des sous-unités catalytiques de deux formes distinctes de β -(1,3)-glucanes synthases, régulées de façon différente (Ram *et al*, 1995). En ce qui concerne les rôles des β -(1,3)-glucane synthases, il a été montré que chez *S. cerevisiae* les sous-unités catalytiques Fks2 et Fks3 sont requises pour la maturation de la paroi des spores (Ishihara *et al*, 2007). Les mutations des gènes *FKS2* et *FKS3* affectent l'assemblage des couches de β -(1,3)-glucanes et réduisent la résistance à certains stress (Ishihara *et al.*, 2007). Les protéines Fks1 et Fks2 sont deux sous-unités alternatives du complexe β -(1,3)-glucane synthase chez *S. cerevisiae* (Mazure *et al*. 1995). La présence de l'une ou l'autre de ces deux sous-unités est suffisante pour maintenir l'activité glucane synthase essentielle à la viabilité cellulaire. Chez les champignons filamenteux, l'orthologue de *FKS1* est essentiel et les mutants RNAi obtenus présentent des phénotypes très marqués, comme un gonflement des hyphes et une réduction de la sporulation (Figure 15) (Mouyna *et al.*, 2004 ; Thompson *et al*, 1999 ; Tentler *et al*, 1997 ; Kellner *et al*, 2005 ; Ha *et al*, 2006 ; Yang *et al*, 2011).

Les gènes *FKS1* et *FKS2* diffèrent par la régulation de leur expression. Dans des conditions optimales de croissance, *FKS1* est le gène principalement exprimé, et son niveau d'expression fluctue au cours du cycle cellulaire. La transcription de *FKS1* est régulée au cours du cycle cellulaire de la levure, avec un pic maximum au moment de la phase G1/S, lors de la croissance du bourgeon (Ram *et al.*, 1995). *FKS2* est fortement induit au cours de la sporulation (pour laquelle il est essentiel) et lors du traitement par la phéromone, de façon calcineurine-dépendante. Il semble que Fks2 joue également un rôle dans le remodelage de la paroi au cours du processus de conjugaison. La séquence de Fks1 et Fks2 présente 16 domaines transmembranaires, avec un grand domaine hydrophile central localisé dans le cytosol. D'une façon intéressante, ce domaine central est fortement conservé dans les protéines Fks chez les champignons (Douglas, 2001). Il a été montré que Fks1 lie l'UDP-glucose (Shimler O'Rourke *et al*, 2003) Il semble que les protéines Fks1 et Fks2 jouent un rôle d'échafaudage pour d'autres protéines sous forme d'un complexe avec la protéine Rho1. Le rôle de Rho1 dans la régulation de la synthèse des β -(1,3)-glucanes a été démontré chez plusieurs champignons comme

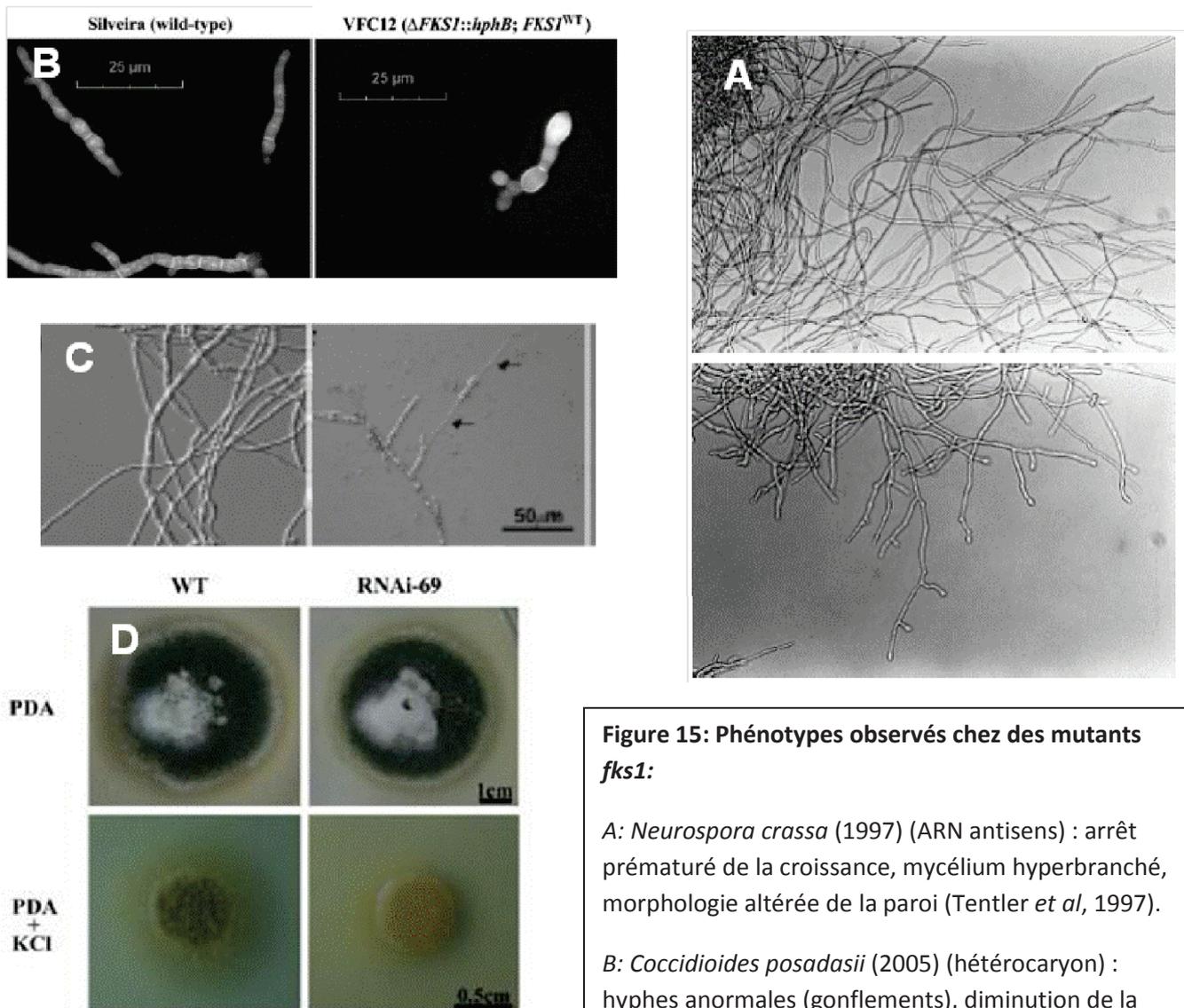


Figure 15: Phénotypes observés chez des mutants *fks1*:

A: Neurospora crassa (1997) (ARN antisens) : arrêt prématuré de la croissance, mycélium hyperbranché, morphologie altérée de la paroi (Tentler *et al*, 1997).

B: Coccidioides posadasii (2005) (hétérocaryon) : hyphes anormales (gonflements), diminution de la production de spores (Kellner *et al*, 2005).

C: Fusarium solani (2006) (interférence ARN) : inhibition de la germination, gonflements, lyse et relargage du contenu intracellulaire des hyphes ; sévérité du phénotype associée avec le taux d'extinction de *FKS1* (Ha *et al*, 2006).

D: Metarhizium acridum (2011) (interférence ARN) : diminution de la sporulation, hypersensibilité à un milieu hyper osmotique (Yang *et al*, 2011).

Schizosaccharomyces pombe et des espèces d'*Aspergillus* (Lesage et Bussey, 2006). Cette GTPase est en fait la sous-unité régulatrice du complexe servant à stimuler la synthèse de β -(1,3)-glucane d'une façon GTP dépendante (Qadota *et al.* 1996). Il a été montré que cette protéine qui lie le GTP (fraction "soluble") est une petite protéine G, codée par le gène *RHO1* (pour Ras Homologous, homologue à l'oncogène mammifère Ras). Les mutants $\Delta rho1$ présentent un phénotype de lyse lors d'une étape spécifique du cycle cellulaire, lors du bourgeonnement des levures. Il est à noter que, la protéine Rho1 présente une localisation cellulaire identique à celles des patches d'actine (Yamochi *et al.*, 1994), et donc se trouve localisée au sommet du bourgeon lorsque celui-ci se forme, puis au niveau du septum entre les cellules mères et filles (Yamochi *et al.*, 1994). L'identification de Rho1 comme la sous-unité régulatrice des β -(1,3)-glucane synthèses liant le GTP a été démontré de façon pratiquement simultanée par trois équipes différentes. Elles ont montré d'une part que des mutants $\Delta rho1$ présentent une activité β -(1,3)-glucane synthase réduite et d'autre part que la protéine Rho1 peut être co-purifiée avec Fks1 (Drgonova *et al.*, 1996; Mazur et Baginsky, 1996; Qadota *et al.*, 1996). L'activation de Rho1 est sous la dépendance des GEP (pour GDP/GTP Exchange Proteins) : Rom1 et Rom2 (pour Rho1 multicopy suppressor) (Delley et Hall, 1999; Ozaki *et al.*, 1996). L'inactivation de Rho1 quant à elle dépend des GAP (GTPase Activating Proteins) : Bem2, Sac7 et Lrg1 qui activent l'hydrolyse du GTP (associé à la forme activée de Rho1) en GDP. La protéine Rho1 apparait donc comme un élément central des mécanismes reliant le développement fongique, la transmission des signaux extérieurs et la régulation et la synthèse des β -(1,3)-glucanes (Wendland et Phippsen, 2001 ; Martinez-Rocha *et al.*, 2008).

Plusieurs travaux biochimiques sur le complexe de β -(1,3)-glucane synthase d'*A. fumigatus* et de *Saprolegnia monoica* ont révélé la présence d'autres sous-unités possibles dans ce complexe, sans pour autant valider leur interaction physique. Chez *S. monoica*, la présence d'une annexine de 34kDa a été montrée dans un des complexes de β -(1,3)-glucane synthase. Les annexines interagissent avec les membranes plasmiques de manière calcium dépendante (Khalaj *et al.*, 2004) et il a été confirmé que cette annexine jouerait un rôle d'activateur de la β -(1,3)-glucane synthase (Bouzenzana *et al.*, 2006).

Par ailleurs, une étude sur *A. fumigatus* a mis en évidence les présences probables d'un ABC transporteur et d'une H⁺ ATPase dans le complexe de glucane synthase (Beauvais *et al.*, 2001). Il a été supposé que cet ABC transporteur pourrait être responsable du relargage du polymère de β -(1,3)-glucane dans l'espace périplasmique et que l'H⁺ ATPase pourrait jouer un rôle dans ce transport actif. Cependant il n'existe pas de données moléculaires confirmant ces hypothèses.

2. Le curdlane : β -(1,3)-glucane linéaire

a. Structure

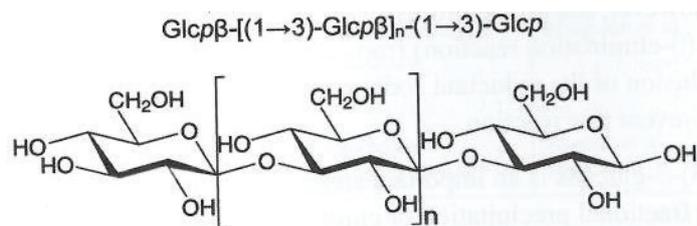


Figure 16 : Structure du β -(1,3)-glucane linéaire (curdlane) (Abott *et al*, 2009).

Les curdlanes sont reconnus comme étant des β -(1,3)-glucane et sont retrouvés dans la capsule polysaccharidique des bactéries allant des bactéries gram négative au rhizobiaceae et chez certaines bactéries gram positive (*Cellulomonas falvigena*) (Buller et Voepel, 1990 ; Kenyon et Buller, 2002 ; Kenyon et al, 2005 ; Gummadi et Kumar, 2005). Les curdlanes sont des chaînes de β -(1,3)-glucane linéaires et donc non branchées (Harada et al, 1968 ; Nakanish et al, 1976) qui peuvent avoir jusqu'à 12000 unités de glucose (Figure 16). Le curdlane est insoluble dans l'eau, l'alcool et la plupart des solvants organiques mais il peut se dissoudre dans le DMSO (Abott *et al*, 2009).

b. Biosynthèse

La production de curdlane a été, dans un premier temps, détectée dans des isolats d'*Agrobacterium tumefaciens* (Harada *et al*, 1968). L'étude de la biosynthèse des curdlanes chez *A. tumefaciens* a permis d'identifier par mutagenèse les gènes qui y sont impliqués. Le cluster CrdASC chez *A. tumefaciens* est responsable de cette biosynthèse et il contient le gène nommé curdlane synthase *CRD S*. Ce gène présente des motifs typiques de la famille des glycosyltransférases de type 2 (Stasinopoulos et al, 1999). Cette famille d'enzymes regroupe les chitine synthases, cellulose synthases, et hyaluronane synthases. Les gènes du cluster sont contigus et localisés à la fin du chromosome linéaire (Stasinopoulos et al, 1999), et ils sont transcrits dans la même direction. La protéine Crd S de 72,9kDa montre une homologie de séquence avec les autres membres de la famille des glycosyltransférase de type 2, mais ne montre aucune ressemblance avec les glycosyltransférases de type 48 comprenant Fks1 et la callose synthase (Coutinho et Henrissat, 1999).

c. La curdlane synthase et son rôle

Les curdlanes semblent jouer le rôle de protecteur contre le stress physique de la bactérie car les mutants du gène *CRD S* présentent une hypersensibilité à la dessiccation (Williams et Cannon, 1989). Cependant, les curdlanes ne semblent pas impliqués dans l'adhésion à l'hôte puisqu'il n'existe aucune différence d'adhésion entre les souches sauvages d'*A. tumefaciens* et les souches mutées dans la production des curdlanes (Abott *et al*, 2009). Par ailleurs, le curdlane semble impliqué dans la formation des biofilms bactériens.

A l'heure actuelle, aucune étude sur ce type de gène n'a été menée chez les champignons même si des gènes homologues ont été retrouvés dans le génome de certains d'entre eux. On ne connaît donc pas le rôle de ces gènes chez les champignons.

3. β -(1,6)-glucanes

a. Structure

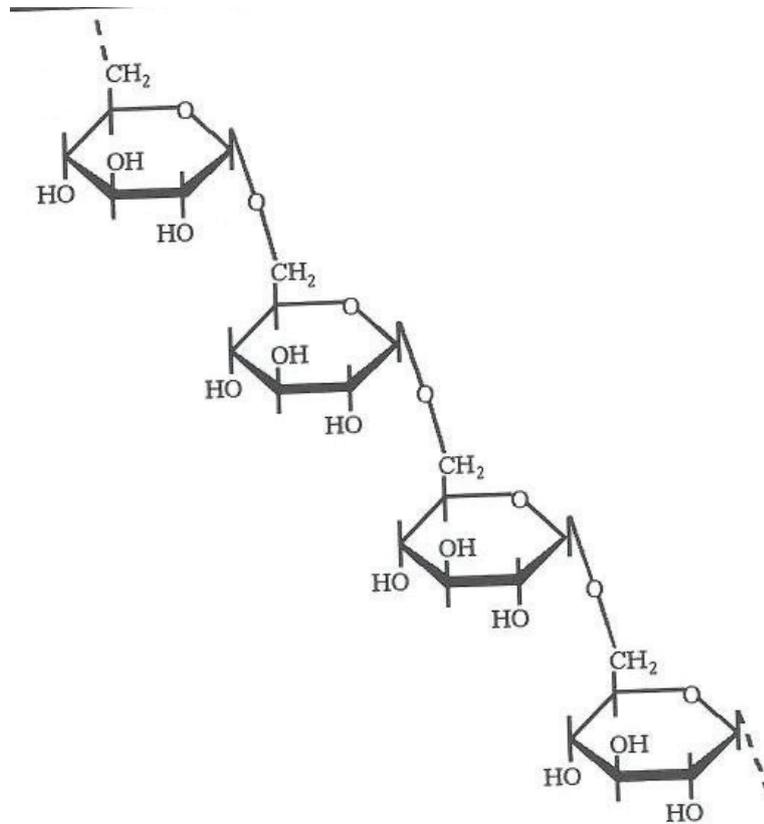


Figure 17 : Représentation d'un polymère de β -(1,6)-glucane. Les polymères de β -(1,6)-glucanes sont composés d'unités de D-glucose liées entre elles par une liaison osidique β -(1,6).

Les β -(1,6)-glucanes sont composés de 140 à 350 résidus de glucose (Figure 17 ; Shahinian et Bussey, 2000). Les chaînes de β -(1,6)-glucose amorphe (Kollar *et al.*, 1997) pourraient agir comme un ciment par la formation de liaisons covalentes avec des β -(1,3)-glucanes, de la chitine et des mannoprotéines des parois fongiques (Kollar *et al.*, 1997). Les β -(1,6)-glucanes avec leur structure plus complexe représentent une faible proportion de la paroi et sont minoritaires par rapport aux β -1,3-glucanes (Magnelli *et al.*, 2002). Ils sont constitués d'un cœur de résidus liés en β -(1,6) branchés par des liaisons β -(1,3) portant des chaînes latérales β -(1,6) (Bostian *et al.*, 1980). Les β -(1,6)-glucanes sont présents chez les champignons filamenteux Ascomycètes et Basidiomycètes, ainsi que chez les levures (Figure 17, Vink *et al.*, 2004).

b. Biosynthèse

Plusieurs études ont postulé que cette synthèse des β -(1,6)-glucanes est initiée dans le réticulum endoplasmique, puis se poursuit dans l'appareil de Golgi et jusqu'à la surface cellulaire (Azuma *et al.*, 2002; Klis, 1994; Orlean, 1997; Shahinian et Bussey, 2000). Cependant, les β -(1,6)-glucanes ont été détectés par immuno-marquage au niveau de la surface cellulaire, mais pas le long de l'appareil sécrétoire, suggérant ainsi que l'assemblage final des β -(1,6)-glucanes soit principalement localisé à la surface cellulaire (Montijn *et al.*, 1999). Cependant, peu de choses sont connues à l'heure actuelle sur le mécanisme de biosynthèse des β -(1,6)-glucanes.

c. Les gènes impliqués dans la biosynthèse

Chez *S. cerevisiae* au moins 10 gènes sont impliqués dans la biosynthèse de β -(1,6)-glucanes: *KRE1*, *KRE5*, *KRE6*, *KRE9*, *KRE11*, *CNE1*, *CWH4/GLS1*, *ROT2/GLS2* et *SKN1* (Aimanianda *et al.*, 2009 ;Shahinian et Bussey 2000). Cependant, le rôle exact de ces protéines n'est pas élucidé à l'heure actuelle (Lesage et Bussey, 2006). Le mutant $\Delta kre5$ chez *S. cerevisiae*, possède une paroi presque entièrement dépourvue de β -(1,6)-glucanes et une croissance extrêmement lente (Meaden *et al.*, 1990; Shahinian *et al.*, 1998). De plus, ces cellules présentent une paroi sans couche externe de mannoprotéines et une importante accumulation dans le cytoplasme de vacuoles issues du réticulum endoplasmique (Simons *et al.*, 1998). Par ailleurs, elles sécrètent dans le milieu extérieur des protéines qui sont normalement fixées à la paroi, comme CWP1 ou l' α -agglutinine (Jiang *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 1995).

Le gène *KRE1* code pour une protéine riche en sérine et thréonine et fortement O-glycosylée, localisée à la surface cellulaire (Roemer et Bussey, 1995). Dans les mutants $\Delta kre1$ la proportion de β -(1,6)-glucanes dans la paroi est réduite de 40%, la structure de ces glucanes est modifiée et la couche externe de mannoprotéines apparaît absente (Boone et al, 1990).

Les gènes *KRE6* et *SKN1* codent pour deux glycoprotéines membranaires homologues ayant 66% d'identité et localisées au niveau de l'appareil Golgi (Roemer *et al.*, 1994). La délétion de *KRE6* entraîne un ralentissement de la croissance cellulaire, une diminution de 50% de la fraction β -

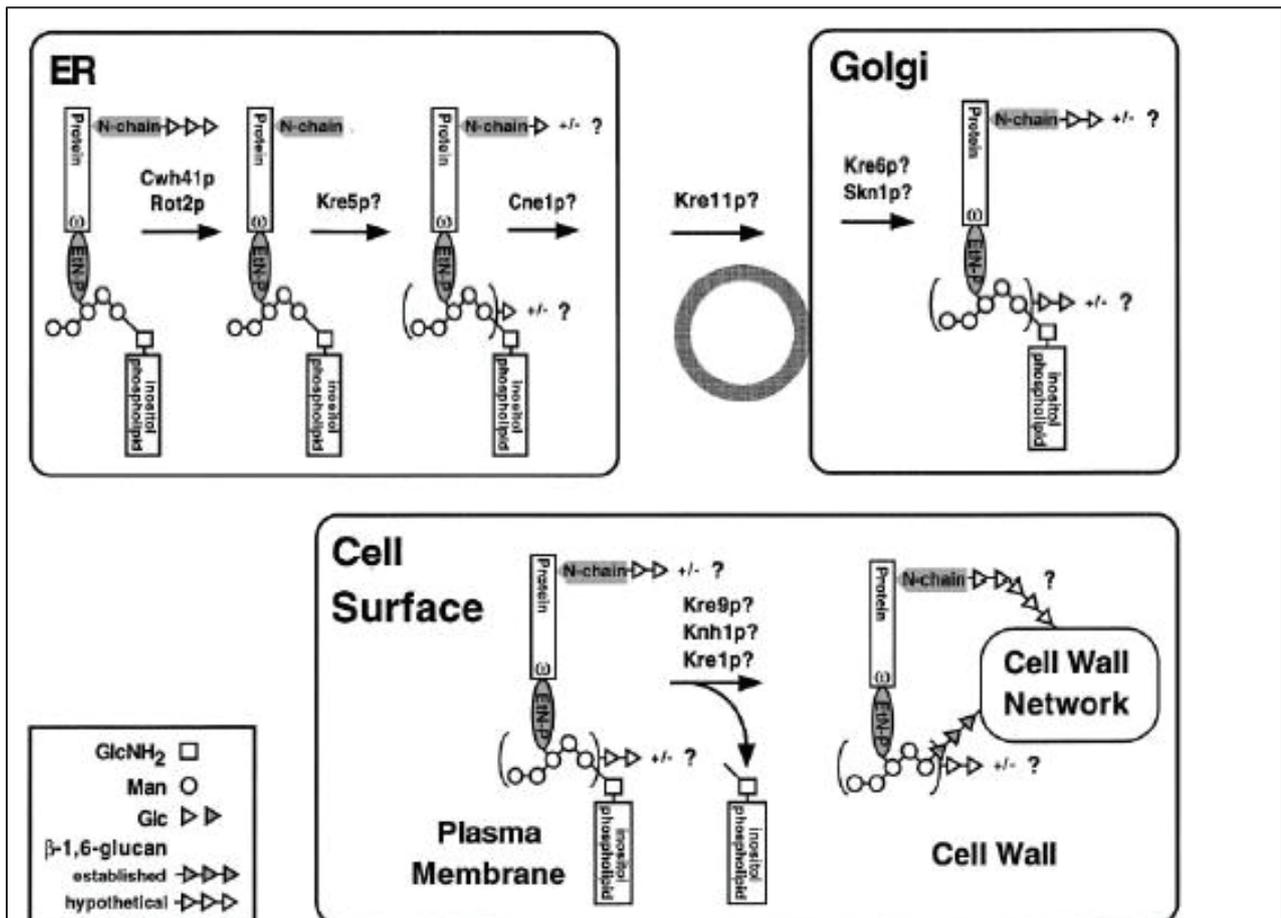


Figure 18 : Attachement d'une GPI proteine aux β -(1,6)-glucanes chez la levure *S. cerevisiae* (Shahinian et bussey, 2000)

glucanes de la paroi, affectant à la fois les β -(1,6)-glucanes et les β -(1,3)-glucanes (Roemer et Bussey, 1991). L'altération de *Skn1* ne cause aucun des phénotypes associés aux mutants $\Delta kre6$, bien que *SKN1* en multicoPIe permette de supprimer les défauts associés à la délétion de *KRE6*. La double délétion de *KRE6* et *SKN1* est létale dans certains fonds génétiques. *KRE9* et *SKN7* codent pour des protéines de la surface cellulaire. *KRE9* code pour une protéine fortement O-glycosylée, nécessaire à la synthèse des β -(1,6)-glucanes et à une croissance normale (Brown et Bussey, 1993). Les mutants $\Delta kre9$ ont une croissance extrêmement lente et une morphologie anormale. Le gène *SKN7* a été identifié comme suppresseur multicoPIe de *Kre9*. La surexpression du gène *SKN7* supprime le phénotype de lyse des mutants $\Delta pkc1$, et restaure l'expression des cyclines de la phase G1 dans les cellules dépourvues des facteurs de transcription *Sbf* et *Mbf* (Brown *et al.*, 1994; Morgan *et al.*, 1995).

Tout récemment, un dosage immunoenzymatique utilisant les anticorps anti- β -(1,6)-glucane a mis en évidence une activité de synthèse de β -(1,6)-glucanes dans des extraits membranaires de *S. cerevisiae*. Cette activité est dépendante de la présence de GTP, au même titre que la β -(1,3)-glucane synthase, et il a été montré que c'est la protéine *RHO1* qui est responsable de cette activation. Cette activité enzymatique est en revanche réduite chez les mutants *kre5* et *kre1* (Vink *et al.*, 2004).

Tous ces gènes ne sont pas directement impliqués dans la synthèse des β -(1,6)-glucanes, et cela a empêché l'identification des gènes codant des β -(1,6)-glucane synthases. Des homologues aux gènes impliqués chez la levure, ont été retrouvés chez les champignons filamenteux, mais la compréhension de la biosynthèse des β -(1,6)-glucane n'est pas encore élucidé.

4. α -(1,3)-glucane

a. Structure :

Il s'agit d'un polysaccharide lié de manière covalente à la paroi fongique. Ce sont des polymères de glucose linéaires composés de deux chaînes de α -(1,3)-glucane (Grun *et al.*, 2005). Ces polymères font partie de la fraction alkali soluble de la paroi fongique et sont donc considérés comme des composants amorphes (Latge *et al.*, 2007). Leur taux varie de 28% chez *Schizosaccharomyces pombe* à 35%-46% du contenu de la paroi d'*A. fumigatus* (Grun *et al.*, 2005 ; Maubon *et al.*, 2006). Il est donc variable en fonction des espèces fongiques.

b. Biosynthèse :

Les α -(1,3)-glucanes sont synthétisés par des α -(1,3)-glucane synthases. Ce sont des enzymes transmembranaires de très haut poids moléculaire (>200kDa). Le nombre de gène codant pour une α -(1,3)-glucane synthase est très variable en fonction des espèces. En effet, seul un gène est retrouvé

chez *Cryptococcus neoformans*, tandis que trois gènes sont présents chez *A. fumigatus* et cinq sont retrouvés chez *S. pombe* (Hochstenbach *et al*, 1998 ; Rappleye *et al*, 2004 ; Reese *et al*, 2003).

Les mutants des trois gènes ont été construits chez *A. fumigatus*. Le mutant Δ ags1 montre une réduction de 50% de son contenu pariétal en α -(1,3)-glucanes tandis que les mutants Δ ags2 et Δ ags3 ne présentent pas de modification de leur contenu en α -(1,3)-glucane (Maubon *et al*, 2006 ; Beauvais *et al*, 2005). Cependant, chez les simples mutants Δ ags une surexpression des deux autres gènes d' α -(1,3)-glucane synthases est observé. Par ailleurs, le triple mutant Δ ags1 Δ ags2 Δ ags3 chez *A. fumigatus*, ne présente plus α -(1,3)-glucane dans sa paroi mais ne montre pas de réduction de viabilité, ni de diminution du taux de croissance. Les α -(1,3)-glucanes ne semblent donc pas jouer un rôle structural dans la paroi d'*A. fumigatus*, ni être nécessaires à la viabilité de celui-ci (Henry *et al*, 2012). Par contre, chez les levures, *C. neoformans* et *S. pombe*, les α -(1,3)-glucanes sont nécessaire à la morphologie cellulaire (Hochstenbach *et al*, 1998 ; Reese *et al*, 2007). Par ailleurs, chez *C. neoformans*, *Blastomyces dermatidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, pathogène des animaux, les α -(1,3)-glucanes sont indispensables à leur virulence (Hogan *et al*, 1994 ; Hochstenbach *et al*, 1998 ; Rappleye *et al*, 2004 ; Reese *et al*, 2003).

Il semble que les α -(1,3)-glucanes aient des fonctions différentes selon les espèces fongiques. A l'heure actuelle on ne retrouve très peu de données sur l'importance de ces polymères de α -(1,3)-glucanes chez les champignons phytopathogènes. Cependant, une étude récente chez *M. oryzae* montre que les α -(1,3)-glucanes seraient impliqués dans la dissimulation de la paroi lors de l'infection. En effet, l'absence d' α -(1,3)-glucanes rend la paroi du champignon plus sensible aux chitinases sécrétées par la plante lors de l'infection. De plus les α -(1,3)-glucanes semblent permettre de masquer la présence du champignon à la plante et ainsi à la réponse de la plante (Fujikawa *et al*, 2012). Des études plus poussées permettront de mieux comprendre le rôle de ces polymères chez les champignons pathogènes de plantes.

c. Les mannanes et mannoprotéines

Les mannoprotéines se trouvent dans la couche externe de la paroi et constituent le deuxième composant majoritaire de la paroi chez *S. cerevisiae* (Kapteyn *et al*, 1999a). Ces mannoprotéines sont des protéines de haut poids moléculaire glycosylées par des polysaccharides très ramifiés d'au moins 150 unités de D-mannose reliées par des liaisons α -(1,2), α -(1,3) et α -(1,6). Elles peuvent être divisées en deux classes : les GPI-Cell Wall Protéines (CWP) ancrées aux β -(1,6)-glucanes pariétaux via une ancre GPI, et les PIR-CWP attachées directement aux β -(1,3)-glucanes (Kapteyn *et*

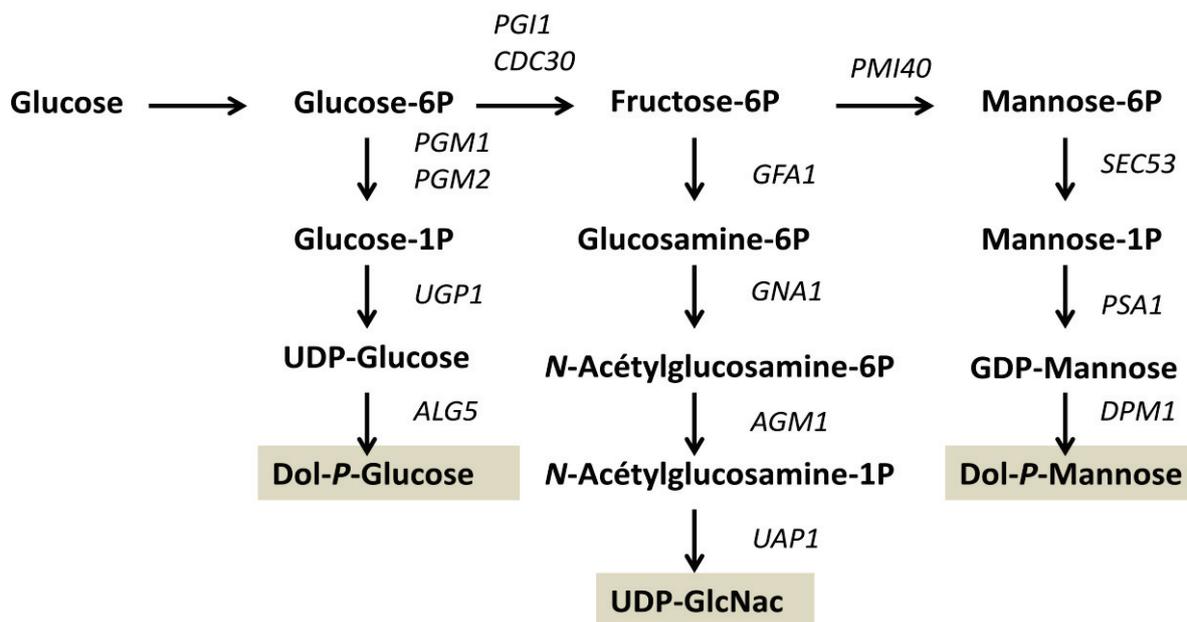


Figure 19 : Biosynthèse des sucres nucléotidiques intervenant dans la synthèse des mannoprotéines chez la levure *S. cerevisiae*.

al., 1999). D'autres mannoprotéines pariétales plus marginales sont attachées aux autres composés pariétaux par des liaisons ioniques ou disulfides. Les mannoprotéines pariétales peuvent être des éléments structuraux participant à l'intégrité de la paroi, des enzymes localisées dans la paroi elle-même, dans l'espace périplasmique ou à la surface cellulaire ou bien des protéines destinées à être libérées dans le milieu. Les unités saccharidiques nécessaires à la synthèse des mannoprotéines sont issues du métabolisme intermédiaire des carbohydrates, sous forme de sucres nucléotidiques: UDP-N-acétylglucosamine, UDP-Glucose et GDP-Mannose (Figure 19).

La maturation des chaînes N-glycosylées, qui a lieu dans l'appareil de Golgi, peut conduire à l'ajout de quelques mannoses supplémentaires ou de chaînes extérieures de plusieurs centaines de résidus (Dean, 1999). Ces chaînes extérieures constituent les mannanes. Les protéines glycosylées par ces chaînes de mannanes sont appelées des mannoprotéines. Les mannoprotéines de la paroi peuvent porter des chaînes extérieures comprenant jusqu'à 150 mannoses reliés par des liaisons alpha-(1,6), elles-mêmes ramifiées par des chaînes latérales d'unités mannose reliées en alpha-(1,2) et alpha-(1,3). La biosynthèse des mannanes, polysaccharide pariétal débute dans le cytoplasme par l'isomérisation du fructose-6P en mannose-6P sous l'action de la mannose-6P phosphate isomérase Pmi40 (Paravicini et al., 1992). Après épimérisation du mannose-6P en mannose-1P par la mannose phosphate mutase codée par *SEC53* (Kepes et Schekman, 1988), le GDP-mannose est formé à partir de GTP et de mannose-1P par la GDP-mannose pyrophosphorylase Psa1 (Figure 19, Hashimoto et al., 1997; Yoda et al., 2000).

Ce complexe saccharidique est fixé sur les mannoprotéines au niveau d'un groupement amide d'une asparagine localisée dans une région conservée de type Asn-X-Thr/Asn-X-Ser, où X correspond à n'importe quel acide aminé excepté la proline (Cutler et al., 2001). Les chaînes de N-glycosylation sont constituées d'un cœur d'oligosaccharide comprenant huit mannoses à treize mannoses et deux unités de N-acétylglucosamine (Herscovics et Orlean, 1993). L'étude des mutants Δ mnn de mannosyl transférase a également facilité la caractérisation de ces gènes (Ballou, 1990; Jigami et Odani, 1999; Lussier et al., 1997). L'étude de l'élaboration de ces chaînes extérieures, grâce aux mutants Δ mnn, a permis d'identifier d'une part le gène *MNN1* qui code pour l'alpha-(1,3)-mannosyltransférase terminale, mais aussi plusieurs autres gènes *MNN* codant pour des mannosyltransférases impliquées dans la maturation des chaînes de N-glycosylation comme *MNN9* (Yip et al., 1994).

La O-glycosylation d'une protéine consiste en une chaîne linéaire de quatre ou cinq mannoses reliés entre eux par des liaisons alpha-(1,2) et alpha-(1,3), qui va être ajouté (Ernst et Prill, 2001). La synthèse de ces chaînes saccharidiques commence dans le réticulum endoplasmique par le transfert d'un mannose sur un résidu sérine ou thréonine de la protéine (Strahl-Bolsinger et al., 1999). Il a été montré chez *S. cerevisiae* que sept gènes regroupés dans la famille PMT (pour Protein O-Mannosyl

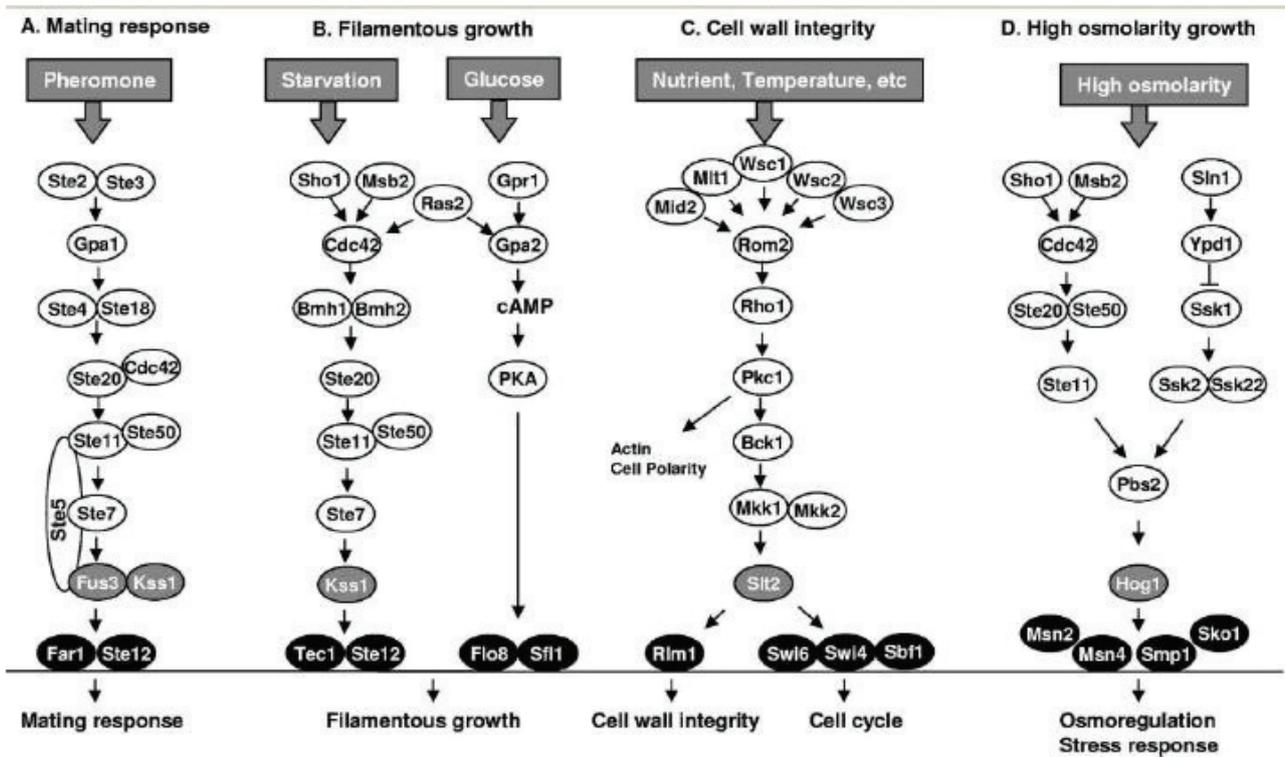


Figure 20 : Représentation schématique des voies de signalisation MAPK chez la levure *S. cerevisiae*.

Transferase) interviennent dans cette première étape (Gentsch et Tanner, 1996; Girrbach et al., 2000; Immervoll et al., 1995; Lussier et al., 1995a; Strahl-Bolsinger et al., 1999; Timpel et al., 2000). Ces gènes codent pour des O-mannosyltransférases ayant entre elles, 50 à 80% d'identité de séquence nucléotidique. Alors que les simples mutants n'ont pas de phénotype marqué, les triples mutants Δ pmt1pmt3pmt4 et Δ pmt2pmt3pmt4 ne sont pas viables (Gentsch et Tanner, 1996). En plus de son rôle de O-mannosyltransférase, Pmt1 pourrait avoir un rôle dans l'ancrage de certaines protéines pariétales (Bourdineaud et al., 1998). La synthèse des chaînes O-glycosylées se poursuit dans l'appareil de Golgi par l'ajout de mannoses supplémentaires à partir de GDP-mannose. Toutes les enzymes impliquées dans l'élongation des chaînes O-glycosylées sont des protéines membranaires dont le domaine catalytique est orienté vers le lumen de l'appareil de Golgi (Hausler et al., 1992; Lussier et al., 1995b; Lussier et al., 1997; Yip et al., 1994). Les protéines Ktr1, Ktr3 et Mnt1 semblent être responsables du transfert du second alpha-(1,2)-mannose (Lussier et al., 1997; Ruiz et al., 1999). L'élongation continue grâce à la protéine Mnt1 responsable de l'ajout du troisième mannose (Hausler et al., 1992). Enfin, le quatrième et cinquième mannose sont transférés par Mnn1, une enzyme qui participe donc à la fois au processus de N- et O-glycosylation.

L'addition d'une ancre GPI à l'extrémité C-terminale des protéines est un mécanisme, chez les cellules eucaryotes, qui vise à attacher ces protéines à la surface cellulaire. Chez *S. cerevisiae*, les ancres GPI sont essentielles à l'ancrage des mannoprotéines de type GPI-CWP aux β -(1,6)-glucanes (Lipke et Ovalle, 1998; Orlean, 1997). Les protéines à ancre GPI sont synthétisées sous forme de précurseurs portant à la fois une séquence signal N-terminal hydrophobe leur permettant d'entrer dans la voie de sécrétion, et un peptide C-terminal hydrophobe qui sera clivé et remplacé par l'ancre. Le site de clivage de la protéine se situe 10 à 12 acides aminés en amont du domaine C-terminal hydrophobe. De plus, des expériences de mutagenèse ont montré que l'acide aminé à chaîne latérale courte (type isoleucine) sur lequel l'ancre est fixée doit être suivi de deux résidus également à chaîne latérale courte (Figure 18) (Nuoffer *et al.*, 1993). Les protéines à ancre GPI sont retrouvées chez les Eucaryotes en général, cependant, il semble que chez les champignons, ces protéines soient largement impliqués dans la biosynthèse pariétale.

Le nombre de mannosyltransférases chez les champignons diffère en fonction des espèces fongiques allant de trois gènes chez *A. fumigatus* à 6 gènes chez *S. cerevisiae* (Mouyna *et al.*, 2010). Cependant, ces gènes semblent avoir un rôle dans la croissance, la morphogenèse et la viabilité des champignons filamenteux.

- C. Voies de signalisation de la biosynthèse pariétale
 - a. La voie de l'intégrité pariétale

Les changements environnementaux provoquent de nombreux mécanismes d'adaptation chez les champignons, par le biais desquels, ils peuvent conserver leur intégrité cellulaire. Des mécanismes complexes sont mis en place pour modifier et synthétiser la paroi fongique en réponse à des modifications ou altérations (Figure 20). La voie de signalisation majeure impliquée dans la réparation de la paroi et le maintien de l'intégrité cellulaire est la voie de l'intégrité pariétale décrite par Levin chez *S. cerevisiae* et contrôlée par la MAP kinase Slt2 (Figure 21 ; Levin, 2005).

Chez *S. cerevisiae*, la MAP kinase Slt2 régule positivement la prolifération cellulaire et les mécanismes de réparation de la paroi. Cette voie coordonne la réponse de la cellule aux différents signaux environnementaux tels qu'une faible osmolarité, une forte température et certaines carences nutritionnelles (Garcia et al, 2004). Une de ces conditions de stress conduit à l'activation de Pkc1, une protéine kinase. L'activation de Pkc1 conduit à l'activation séquentielle des protéines kinases Bck1, Mkk1, et Mkk2, puis Slt2/Mpk1 (Kamada et al, 1995). La GTPase RHO1 qui est connue comme étant la sous-unité régulatrice de la β -(1,3)-glucane synthase joue un rôle important dans l'activation de la protéine Pkc1 de part une interaction directe avec cette kinase (Mazur et Baginsky, 1996; Qadota et al., 1996 ; Drgonova et al., 1996; Kamada et al., 1996; Nonaka et al., 1995). Il semble donc que Rho1 stimule le métabolisme de la paroi cellulaire de deux manières indépendantes, directement en activant les β -(1,3)-glucane synthases et indirectement au travers d'une transmission du signal vers Pkc1 (Delley et Hall, 1999).

L'activation de la MAP kinase Slt2 conduit à la phosphorylation de différents facteurs de transcription dont un facteur de transcription nommé Rlm1 et un complexe protéique nommé SBF (Swi4 et Swi6)(Figure 22) (Dodou et Treisman, 1997; Madden et al., 1997). Une des cibles directes et les mieux connues de la MAP kinase Slt2 est le facteur de transcription Rlm1, qui jouerait un rôle essentiel dans l'activation de nombreux gènes pariétaux tels que *FKS1*, *FKS2*, *MNN1*, *KTR2*, *CHS3* (Jung et Levin, 1999; Watanabe et al., 1995). Rlm1 est membre d'une famille de facteurs de transcription à boîte MADS (MCM1, Agamous, Deficiens et Serum response factor) agissant sous forme de dimères (Dodou et Treisman, 1997). Ces facteurs de transcription sont impliqués dans l'expression des gènes contrôlant la division cellulaire, le maintien de l'intégrité cellulaire et la réparation de la paroi fongique (Gustin et al, 1998 ; Garcia et al, 2004).

La kinase Slt2 a également pour cibles les facteurs de transcription SBF (pour Swi4/6 Binding Factor) et MBF (MluI Binding Factor), ce sont des hétérodimères composés d'une sous unité régulatrice commune codée par le gène *SWI6* (Andrews et Herskowitz, 1989). Swi4, activée par phosphorylation par Slt2 (Madden et al., 1997), peut également activer un sous-groupe de gènes indépendamment de Swi6 (Baetz K. et coll., 2001). Les deux protéines Swi4 et Swi6 sont des substrats *in vitro* de

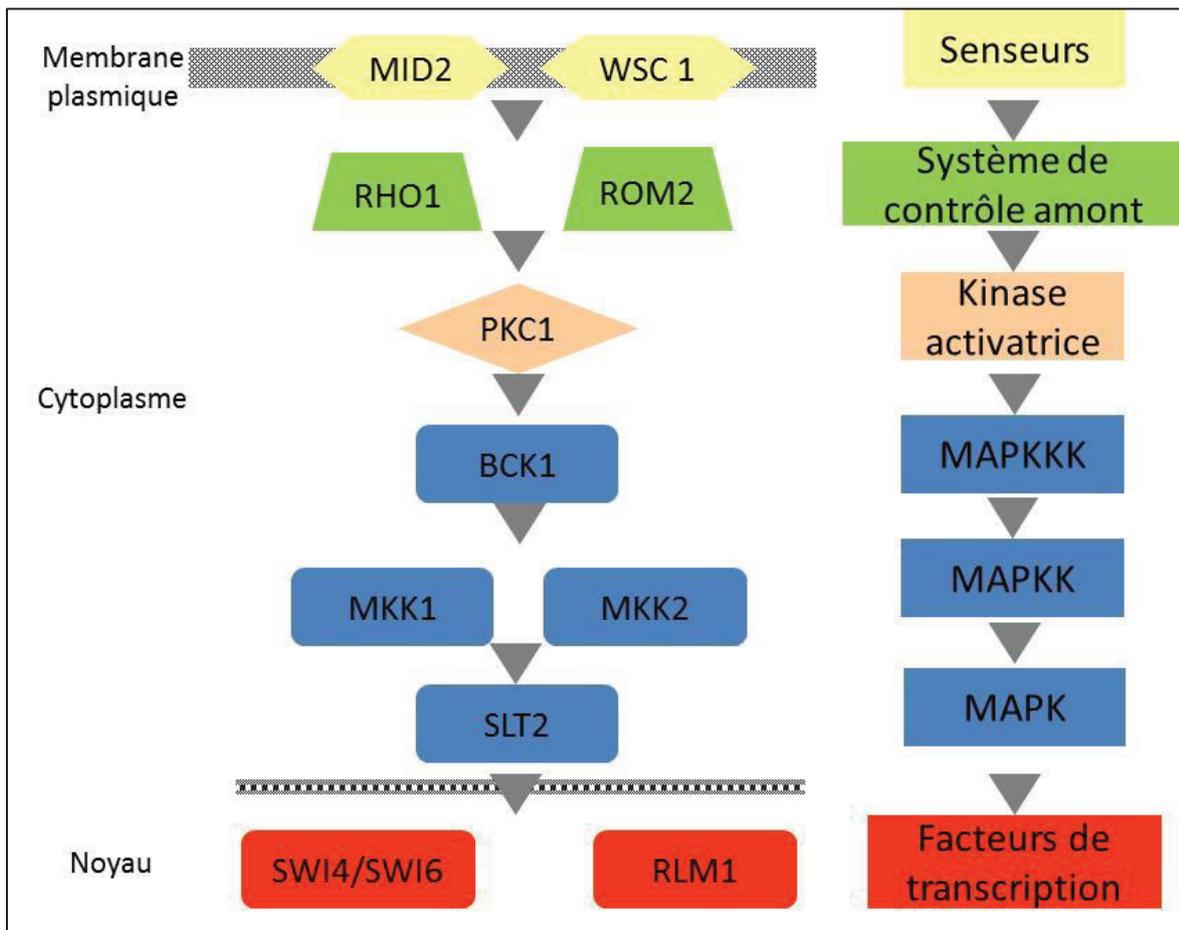


Figure 21 : Représentation schématique de la voie de signalisation contrôlant l'intégrité pariétale chez *S. cerevisiae*

Mpk1/Slt2. Les connaissances accumulées chez la levure sur les voies MAPK ont permis de rechercher des gènes orthologues chez d'autres champignons. Cette voie est entièrement caractérisée chez la levure *S. cerevisiae*, mais beaucoup moins étudié chez les champignons filamenteux. Ainsi, l'étude de la MAP kinase Bmp3 (homologue SLT2) de *B. cinerea* a montré que les mutants Δ bmp3 présentent une réduction de leur croissance, de leur sporulation et de leur capacité à former des sclérotés. Ces mutants montrent également une sensibilité accrue aux fongicides de type phenylpyrrole. Enfin, les spores du mutant Δ bmp3 ont une germination normale, mais leur tube germinatif présente une élongation excessive sur surface rigide hydrophobe et une pénétration réduite. Ces éléments laissent supposer que la délétion de la MAPK *BMP3* entraîne un défaut au niveau des senseurs de surface utiles à la germination des conidies (Rui *et al*, 2008). Les mutants de délétion de la MAP kinase *MPKA* (homologue Slt2) d'*A. fumigatus* (Valiente *et al*, 2007) ne présentent pas d'altération majeure de leur sporulation mais une hypersensibilité à des fongicides inhibant la biosynthèse de la paroi de ce champignon. Cependant la délétion du gène *MPKA* n'a pas d'effet sur la pathogénie d'*A. fumigatus* (Valiente *et al*, 2007).

Par ailleurs les mutants du gène homologue à *SLT2* chez *Mycosphaerella graminicola* présentent une pénétration normale dans les stomates du blé mais une incapacité à coloniser les tissus de la plantes (Mehrabi *et al*, 2006).

Dans le cas de *M. oryzae*, un autre champignon phytopathogène, les mutants de *MPS1* (homologue de *SLT2*) présentent de très nombreux phénotypes, très forte réduction de la sporulation, absence de mycélium aérien, autolyse mycélienne, incapacité à attaquer le riz (Xu *et al*, 1998 ; Xu , 2000 ;Zhao *et al*, 2007 ; Xu *et al*, 2007) Ces mutants sont capables de différencier des appressoria mélanisés mais ceux-ci ne permettent pas la pénétration du champignon dans les cellules de la plante hôte, ni la colonisation des tissus blessés. Mps1 semble donc essentiel à la fois à la formation d'hyphes de pénétration fonctionnels et à la colonisation de la plante hôte. Dans ce dernier cas, il a été suggéré que la voie Mps1 serait vraisemblablement impliquée dans des processus de modifications de la paroi fongique permettant au pathogène de ne plus être reconnu par la plante (Fujikawa *et al*,2009). D'autres MAP kinases homologues de Slt2 sont impliqués dans le pouvoir pathogène des champignons, comme Maf1 de *Colletotrichum lagenarium* (Kojima *et al*, 2002). En effet, les mutants Δ maf1 sont également incapables de différencier un appressorium. Maf1 serait donc impliqué dans les phases précoces de la formation de l'appressorium. Les mutants des gènes orthologues à *SLT2* chez *Claviceps purpurea* et *Fusarium graminearum* présentent eux aussi une altération de pathogénie (Zhao *et al*, 2007).

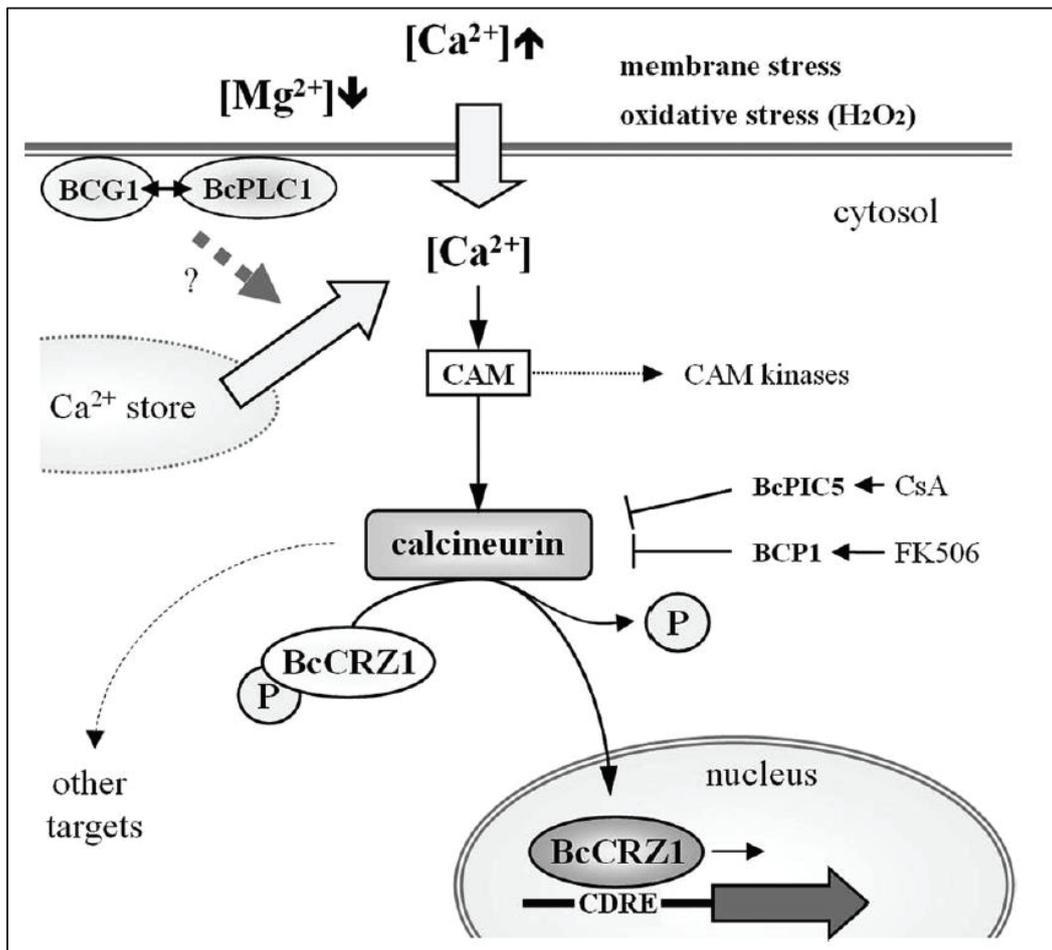


Figure 22 : Schéma de La transduction du signal de la voie de la Calcineurine chez *B. cinerea* Le calcium se lie à la calmoduline (protéine senseur), qui va ensuite activer différentes kinases et la calcineurine (phosphatase) par l'intermédiaire de l'interaction avec l'hétérodimère de calcineurine. La déphosphorylation du facteur de transcription Crz1 par la calcineurine, lui permet d'être transloqué dans le noyau afin de réguler l'expression des gènes cibles. (Schumacher et al, 2008).

b. La voie de la calcineurine

Parrallèlement à la voir de signalisation précédemment décrite il a été également montré que la voie de la calcineurine pouvait être impliquée dans l'intégrité pariétale des levures et des champignons filamenteux. La calcineurine est une phosphatase de type 2B, très conservée entre les espèces, et régulée par les ions Ca^{2+} et la calmoduline ; elle joue un rôle crucial dans la réponse au stress cellulaire. La calmoduline senseur des variations de Ca^{2+} est une petite protéine contenant quatre doigts de liaison au Ca^{2+} . Le complexe calmoduline/ Ca^{2+} va ensuite activer différentes protéines cibles dont des kinases et la phosphatase calcineurine (Figure 22). La calcineurine fonctionnelle possède deux sous unités. Une sous unité catalytique Cna et une sous unité régulatrice Cnb. La calcineurine est activée quand le niveau de Ca^{2+} cytosolique augmente, le Ca^{2+} libre se lie à la calmoduline et à la protéine Cnb. Le Ca^{2+} lié à la calmoduline interagit avec la protéine Cna, libérant le domaine de régulation enzymatique par changement de conformation conduisant à l'activation de la phosphatase et à la déphosphorylation des substrats de la calcineurine (Figure 22) (Rusnak et al, 2000). Un des substrats les plus connu de la calcineurine est le facteur de transcription en doigt de zinc Crz1. Crz1 est transloqué dans le noyau pour réguler l'expression des gènes cibles impliqués dans l'intégrité pariétale et dans l'homéostasie (Statopoulos *et al*, 1997) chez *S. cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* (Cyert, 2003, Bonillia *et al* 2002, Cyert, 2001 ; Kraus *et al*, 2003 ; Kawai *et al*, 2001). L'importance de la calcineurine a déjà été établie en réponse à différents stress : haute température, forte concentration en ions, et exposition à des phéromones sexuelles et le stress pariétal.

Chez les pathogènes humain *C. albicans*, *Candida dubliniensis* et *A. fumigatus*, la voie de la calcineurine contrôle l'intégrité pariétale, la résistance au stress, la morphogénèse, la survie et la virulence. Chez les champignons phytopathogènes comme *A. oryzae*, *M. oryzae*, *U. maydis* et *Ustilago hordei*, la calcineurine semble jouer un rôle non seulement pour la croissance hyphale mais aussi dans l'adaptation aux stress environnementaux, la formation des conidies et des appressoria, le développement sexuée, l'intégrité pariétale et la virulence (Juvvadi *et al*, 2003). Par ailleurs, chez *S. cerevisiae* et *U. maydis*, il a été montré que la calcineurine était un antagoniste putatif de la protéine kinase A marquant ainsi une connexion entre la voie de la calcineurine et la voie de l'AMPc (Egan et al, 2009 ; Kafadar et al, 2004). Chez *B. cinerea*, des études indiquent que la calcineurine serait également probablement impliquée dans la régulation de la morphologie hyphale, la formation de structures d'infection et le métabolisme secondaire (Harren *et al*, 2012). Ces études ont permis l'identification de 18 gènes dépendant de la calcineurine. Parmi ces gènes, on retrouve le gène Bcg1 qui est un activateur de cette voie, via la phospholipase C (Schumacher *et al*, 2008). Le facteur de

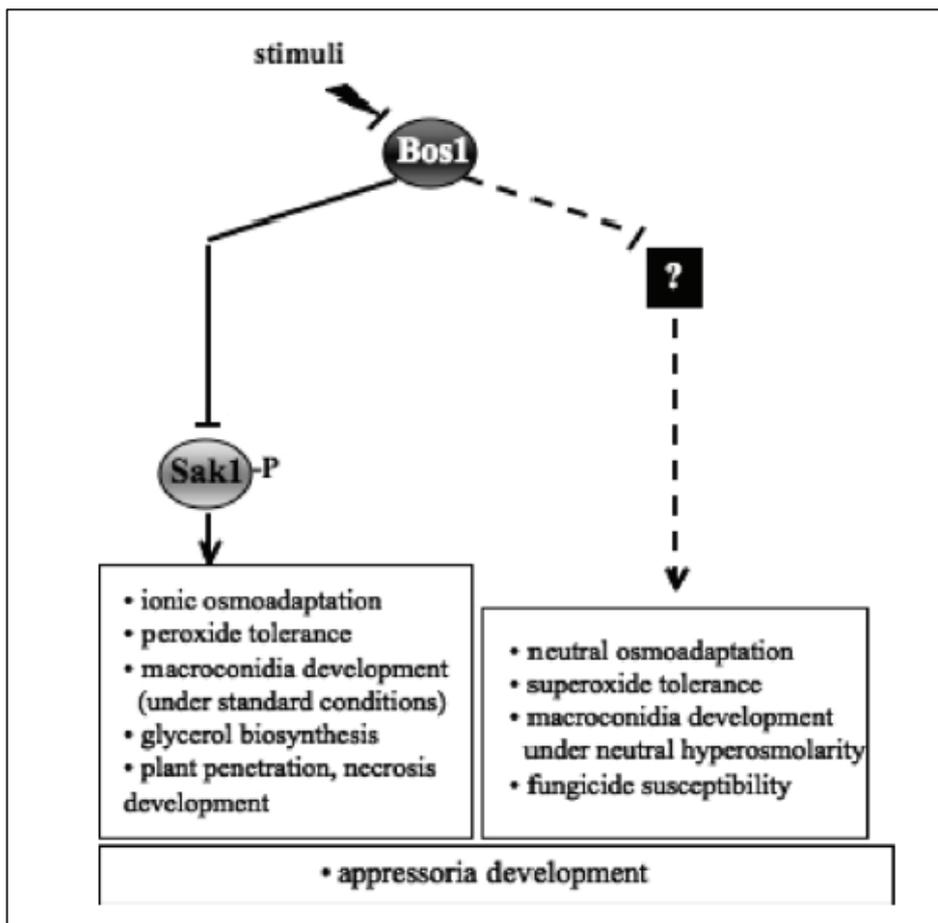


Figure 23 : La voie HOG chez *B. cinerea* (Liu *et al*, 2008).

transcription Crz1 a pu être identifié chez *B. cinerea*. Il est impliqué dans la morphologie hyphale, la conidiation, la formation de sclérotés et la réponse au stress. Les mutants de délétion sont hypersensibles au Ca^{2+} externe et réagissent au stress hypo-osmotique, ceci est peut être induit par un défaut de paroi latéral. Ils possèdent une infection retardée en comparaison de la souche sauvage. La calcineurine semble être un médiateur de la translocation nucléaire de Crz1 par sa déphosphorylation. Les gènes dépendant de la calcineurine ont une expression affectée dans le mutant Δcrz1 chez *B. cinerea*, confirmant le rôle de répresseur de la calcineurine de Crz1 chez *B. cinerea*. Très peu de choses sont connues sur la régulation de l'activité calcineurine chez les champignons filamenteux. Les protéines de régulation de la calcineurine sont appelées calcipressine, elles peuvent réguler de manière positive ou négative la calcineurine (Harren *et al*, 2012). Chez *A. fumigatus*, un mutant de calcipressine possède une meilleure tolérance au Ca^{2+} , une diminution de virulence et l'augmentation de l'expression de la chitine synthase A, d'un transporteur de calcium et de la sous unité catalytique de la calcineurine. Par ailleurs, la calmoduline semble jouer un rôle important *in vivo*, en ce qui concerne l'activation des chitine synthases (Suresh *et al*, 1997). En effet, chez *N. crassa*, le traitement par des inhibiteurs de la calmoduline induit une diminution de l'activité des chitine synthases.

c. La voie HOG

L'adaptation aux changements de conditions environnementales, comme les changements de pression osmotique est généralement régulée par des voies de signalisation cellulaires. La voie de haute osmolarité glycérol (HOG) de *S. cerevisiae* est une des voies les mieux caractérisée chez les champignons, elle est impliquée dans la régulation de la pression osmotique. En effet, il existe des variations de pression osmotique en réponse à un stress oxydatif, un stress cellulaire mais aussi dans le maintien de l'intégrité pariétale (Figure 20 ; Hohmann, 2002). Cette voie est activée par l'hexokinase Sln1 qui joue le rôle de senseur et transmet le signal de modification de pression osmotique via le phosphorelais Ypd1-Ssk1 jusqu'à la cascade de MAPK Hog1. Lorsque Hog1 est phosphorylée, elle est transloquée dans le noyau où elle régule l'activité de plusieurs facteurs de transcription (Smp1, Msn2, Sko1 et Hot1 ; Posas *et al*, 1996 ; Reiser *et al*, 1999). Sln1 permet via Ypd1 la phosphorylation de Skn7. Skn7 agit en tant que facteur de transcription en cas de stress hyper-osmotique ou oxydatif, mais il est aussi impliqué dans le cycle cellulaire et dans l'intégrité pariétale (Bouquin *et al*, 1999 ; Brown *et al*, 1993 ; Li *et al*, 1998 ; Morgan *et al*, 1997, Williams et Cyert, 2001). Contrairement à *S. cerevisiae* où Sln1 est l'unique hexokinase, il existe plusieurs hexokinases impliquées dans la réponse à un stress d'osmolarité chez les champignons filamenteux Ascomycètes,

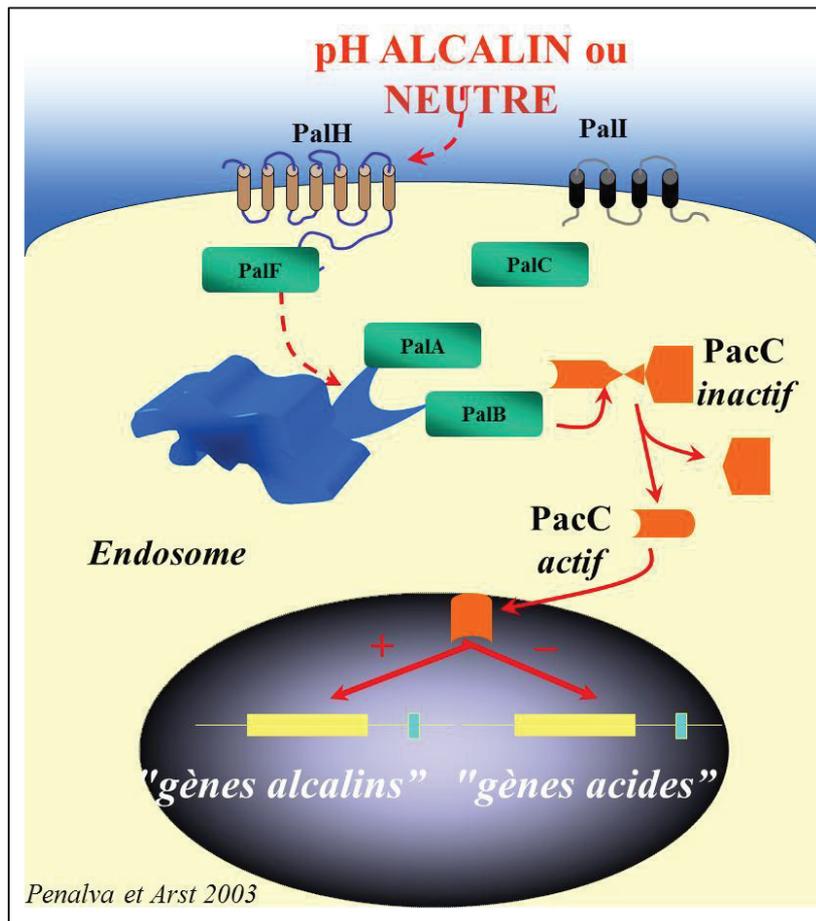


Figure 24: la voie pH chez les champignons filamenteux.

En conditions alcalines PacC va subir une activation protéolytique, lui permettant alors d'activer les gènes alcalins et de réprimer les gènes acides

comme Nik1-Os1 chez *N. crassa*, Daf1/Bos1 chez *B. cinerea*, ou encore Hik1 chez *M. oryzae* (Catlett *et al*, 2003). Elles sont impliqués non seulement dans la réponse au stress osmotique mais aussi dans la résistance aux fongicides de la famille des dicarboximides (iprodione), la morphogénèse hyphale et la virulence (Motoyama *et al*, 2005a ; Ochiai *et al*, 2001 ; Viaud *et al*, 2006 ; Yoshimi *et al*, 2004).

La MAP kinase Sak1 et l'histidine kinase Bos1 de *B. cinerea*, sont impliqués dans l'adaptation à l'hyperosmolarité mais aussi dans la pathogénicité et dans la sporulation (Figure 24). Les mutants Δ bos1 sont résistants au menadione utilisé comme agent oxydatif. Cependant les mutants Δ sak1 ont une sensibilité inchangée au menadione mais sont plus sensibles à l' H_2O_2 . Le défaut de conidiation des mutants Δ bos1 peut être restauré en présence de sorbitol 1M ou lors de croissance *in planta*. Les mutants Δ sak1 ont perdu leur capacité de pénétration dans les tissus hôtes, tandis que les mutants Δ bos1 ont une virulence réduite (Segmuller *et al*, 2007 ; Viaud *et al*, 2006). Il a été observé que Bos1 régule de manière négative la phosphorylation de Sak1 (Figure 23). De plus, Bos1 régule de manière indépendante de Sak1 certains phénotypes comme la sensibilité aux fongicides, l'adaptation et la conidiation en cas d'hyperosmolarité (Liu *et al*, 2008).

La cascade de transduction du signal de stress osmotique est impliquée dans l'intégrité pariétale chez *B. cinerea*. En effet, Les mutants Δ bos1 et Δ sak1 de *B. cinerea*, présentent une tolérance modifiée aux enzymes de dégradation pariétale et aux agents interférant avec la paroi, De plus, ils se caractérisent par une augmentation de la quantité de β -(1,3)-glucane et de chitine en comparaison avec la souche sauvage (Liu *et al*, 2008). Sak1 interfère avec la phosphorylation de Bmp3 (Slr2) chez *B. cinerea* créant un lien entre la voie HOG et la voie de l'intégrité pariétale (Liu *et al*, 2008).

d. La voie pH

La réponse adaptative d'un champignon filamentueux ou levure à une variation du pH externe est contrôlée par la voie Pal/Pac, une des voies de signalisation actuellement décrite chez les Mycètes. En milieu alcalin ou neutre, deux senseurs PalH et Pall perçoivent le pH et transmettent le signal jusqu'à l'endosome via plusieurs protéines Pal. Le facteur de transcription PacC subit alors deux protéolyse conduisant à sa forme mature qui est ensuite transloquée dans le noyau. Sa fixation sur sa cible active l'expression des gènes permettant l'adaptation aux conditions alcalines et réprime ceux impliqués dans l'adaptation aux conditions acides. En milieu acide, l'absence de signal ne permet pas la maturation du facteur PacC. Ceci a pour conséquence, une répression des gènes « alcalins » et une dérépression des gènes « acides » (Figure 24).

Chez *S. cerevisiae*, il a été observé que certains gènes induits en cas de stress alcalin (Viladevall *et al*, 2004) étaient les mêmes que ceux induits en cas d'altération pariétale (Garcia *et al*, 2004, Lagorce *et al*, 2003). Par ailleurs, les mutants, Δ slr2 sont sensibles à des pH alcalins (Giaver *et al*, 2002 ; Serrano

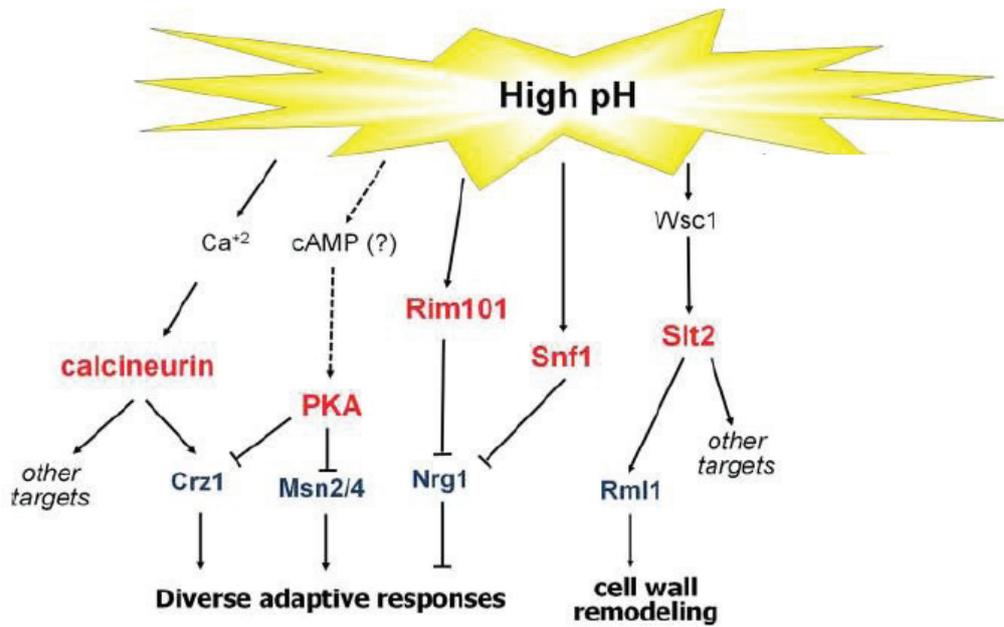


Figure 25 : Effet d'un stress de pH alcalin sur les voies de signalisation de *S. cerevisiae* (Arino, 2010)

et al, 2004) Serrano *et al* ont montré en 2006 qu'une alcalinisation du milieu conduit à une activation rapide et transitoire de Slt2. Cette activation est annulée par l'ajout de sorbitol dans le milieu. De plus, une activation constitutive de Slt2, augmente la tolérance au pH (Figure 25). Les auteurs suggèrent que la protéine Wsc1, senseur membranaire impliqué dans l'activation de la voie de l'intégrité pariétale (Figure 20), pourrait aussi être un senseur du stress de pH alcalin. En effet, les mutants de *WSC1* présentent une plus grande sensibilité au pH alcalin et présentent une diminution de l'activation de Slt2 par stress alcalin (Serrano *et al*, 2006).

L'analyse transcriptomique de mutants Δ slt2 après différents stress de pH a montré que plusieurs gènes codant pour des protéines pariétales comme *FKS2* seraient induites par des pH alcalins de manière dépendante de Slt2. Ceci suggère et qu'un environnement alcalin impose une condition de stress au niveau de la paroi fongique.

Les pH acides affectent fortement l'organisation de la paroi fongique de *S. cerevisiae*, induisant rapidement une résistance à la β -(1,3)-glucanase. En effet, de nombreuses protéines associées à la paroi présentent une nouvelle liaison à la paroi nommée liaison au β -(1,3)-glucane alkali labile, induite à pH acide (Kapteyn *et al*, 2001). Les pH acides induisent chez les levures des altérations de l'architecture pariétale dépendantes du gène *HOG1* tels que la sensibilité à la β -(1,3)-glucanase, et non du gène *SLT2* comme cela a été décrit pour les pH alcalins, car les mutants Δ slt2 ne sont affectés ni dans la croissance, ni dans la sensibilité aux enzymes de dégradation pariétale à pH acide (Kapteyn *et al*, 2001). Actuellement, il existe peu de données sur le rôle de la voie pH sur l'intégrité pariétale chez les champignons filamenteux, même si des données préliminaires laissent penser que la voie pH pourrait avoir le même rôle que chez la levure.

D. Les inhibiteurs de paroi fongique

a. Inhibiteurs de chitine synthase

Les Nikkomycines et Polyoxines sont des inhibiteurs compétitifs des chitine synthases fongiques par analogie structurale avec le N-acetylglucosamine, substrat de l'enzyme (Figure 26) (Becker *et al*, 1983 ; Bormann *et al*, 1996, Behr *et al*, 2011). Cependant, ils n'ont d'effet *in vivo* qu'à des doses très élevées (Cabib, 1991). Ces inhibiteurs ont permis une étude plus approfondie du système de synthèse de la chitine. La Nikkomycine Z fait partie du peu d'inhibiteurs qui possèdent une toxicité sélective contre la chitine des champignons (Tariq et Devlin, 1996). C'est un di-peptide nucléoside. Et son transport est d'ailleurs pris en charge par un transporteur de di-peptides (McCarthy *et al*, 1985) tout comme la Polyoxine D (Mehta *et al*, 1984). Chez *B. cinerea*, le traitement par la Nikkomycine Z induit un gonflement des hyphes (Zhu *et al*, 1992). Des études réalisées chez *S. cerevisiae*, ont montré que la Nikkomycine Z agit spécifiquement sur les chitine synthases Chs1 et Chs3 mais pratiquement

pas sur la Chs2 (Gaughan *et al*, 1994). De même, la Polyoxine D agit spécifiquement sur les Chs1 et Chs2 mais pratiquement pas sur la Chs3. Le fait de ne pas cibler toutes les chitines synthèses pourrait expliquer la résistance des champignons à ces inhibiteurs. Il est à noter que la Polyoxine D est le seul inhibiteur ciblant la paroi commercialisé en agronomie. La Polyoxine D est un inhibiteur utilisé depuis 1997 aux USA, en Chine ou en Corée, sur un très petit marché, essentiellement pour le traitement du gazon des terrains de golf. La Nikkomycine z n'est plus utilisée pour le traitement médical des mycoses à cause de son manque d'efficacité.

b. Inhibiteurs de β -(1,3)-glucane synthase

Les Echinocandines sont un groupe de lipopeptides cycliques semi synthétiques avec une chaîne latérale lipide N-acylé. Cette famille comprend entre autres, la papulacandine B, l'Aculeacine A, la Cilofongine, l'Echinocandine B, la Pneumocandine, la Micafungine, l'Anidulafungine et la Caspofungine (Figure 26). Parmi eux, la Caspofungine, l'Anidulafungine et la Micafungine sont utilisés pour le traitement médical des candidoses et aspergilloses invasives (Bal *et al*, 2010 ; Denning *et al*, 2003 ; Kaneko *et al*, 2010 ; Saliba *et al*, 2010). Ces inhibiteurs ont permis l'étude de la biosynthèse des β -1,3-glucanes et le clonage du gène *FKS1* codant pour la sous unité catalytique de la β -(1,3)-glucane synthase sous le nom de *ETG1* : pour Echinocandin target 1. Ces composés ont de même permis l'identification du gène *PRB1* pour Papulacandin B résistant 1 (Castro *et al* ; 1995) ; ainsi que le gène *GNS1* qui serait impliqué dans la synthèse des β -(1,3)-glucanes (El sherbeini et Clemas 1995b ; Elsherbini et Clemas 1995a). En effet, ces gènes ont pu être identifiés par l'apparition de mutants résistants aux Echinocandines.

En Agronomie, aucune molécule inhibant le métabolisme des glucanes n'est commercialisé à ce jour. De précédentes études ont montré qu'un traitement de *B. cinerea* par une Echinocandine induit un hyperbranchement des hyphes (Zhu *et al*, 1992).

La Caspofungine est un lipopeptide semi synthétique soluble dans l'eau produit à partir de la fermentation d'un métabolite du champignon *Glarea Lozoyensis*, avec une masse moléculaire de 1213kDa. La Caspofungine bloque la synthèse du β -1,3-glucane de la paroi fongique (Onishi *et al*, 2000). Conduisant à une réduction de la croissance fongique. L'altération de l'intégrité de la paroi induite par le traitement, résulte en une perte des propriétés mécaniques de résistance conférant l'effet fongicide à la Caspofungine. En effet, la paroi devient incapable de résister à la pression osmotique intracellulaire, ce qui conduit à une lyse de la cellule fongique (Stone *et al*, 2002 ; Letscher-Bru *et al*, 2002 ; Letscher-Bru *et al*, 2003 ; Deresinski *et al*, 2003 ; Cornelly *et al*, 2002). Si

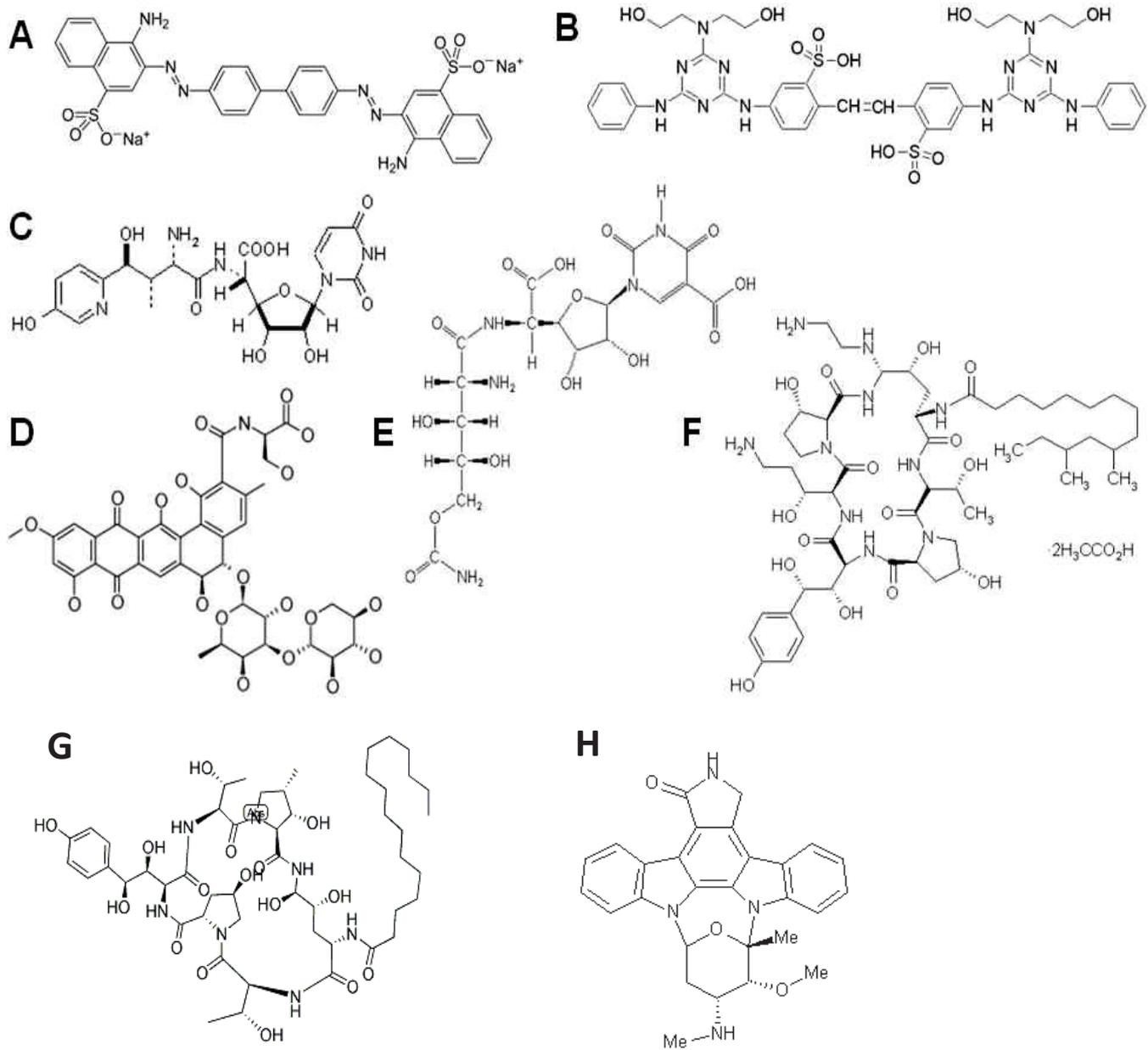


Figure 26 : Structure chimique d'inhibiteurs de la paroi fongique.

A : Rouge congo ; B : Calcofluor blanc ; C: Nikkomycin Z ; D: BMS-181184 ; E: Polyoxorim ; F: Caspofungin ; G: Aculeacin A ; H: Staurosporine.

l'activité fongicide de la Caspofongine est démontrée sur les levures du genre *Candida*, l'activité sur les champignons filamenteux est moins claire. Des études *in vitro*, ont montré que la molécule exerce une activité fongicide non conventionnelle sur *Aspergillus* en agissant sélectivement sur les extrémités des filaments mycéliens au niveau desquels se situe l'activité de synthèse de la paroi nécessaire à la croissance apicale du champignon (Bowman *et al*, 2002). Les cellules mammifères ne possèdent pas de β -(1,3)-glucane ce qui suggère une sélectivité de la molécule pour les cellules fongiques. Cependant des résistances aux Echinocandines commencent à apparaître (Munro *et al*, 2010). Ces résistances semblent en lien avec des mutations du gène *FKS1*. Toutefois, le mode d'action précis des Echinocandines n'a toujours pas été précisé. Enfin, il a été noté qu'un effet paradoxal a été observé chez *C. albicans* et *A. fumigatus*. En effet, à de très fortes concentrations, le champignon semble résister à la Caspofongine. Mais cet effet, n'a pas été observé chez les autres Echinocandines (Stevens *et al*, 2004). L'effet paradoxal de la Caspofongine semble dépendant de la voie de la Calcineurine (Fortwendel *et al*, 2010). En effet, chez des mutants de la voie de la calcineurine, l'effet paradoxal n'est plus observé. L'Aculéacine A contient un cyclopeptide et une longue chaîne lipidique acide et un acide palmitique. Elle est produite par *Aspergillus aculeatus*. L'Aculéacine A inhibe la synthèse de glucane insoluble en milieu alcalin, donc sa cible est la β -(1,3)-glucane synthase (Yamaguchi *et al*, 1982).

c. Inhibiteurs de mannanes/mannoprotéines

Les antibiotiques pradimicine/benanomicine sont également considérés comme des inhibiteurs de paroi de part leur capacité à se lier aux mannanes et aux mannoprotéines, mais leur mode d'action n'est pas clairement défini (Figure 26) (Hiramoto *et al*, 2005). Les Pradimicines sont une famille d'inhibiteurs capables de se lier aux mannanes de manière calcium dépendante (Shahzad-UI_Hussan *et al*, 2012). La benanomicine se lie préférentiellement aux mannanes et mannoprotéines. La benanomicine à forte concentration possède un effet fongicide et altère la perméabilité de la membrane. Cet antibiotique n'a d'effet que sur les cellules fongiques en croissance.

d. Inhibiteurs de l'assemblage des microfibrilles

Le calcofluor blanc et le rouge congo sont des colorants qui interagissent dans l'assemblage des microfibrilles de chitine et de β -1,3-glucane *in vitro* et *in vivo*. Ils inhibent la formation de la paroi et la croissance fongique (Figure 26).

Le calcofluor blanc est un colorant fluorescent chargé négativement capable de se lier par des liaisons hydrogènes et des interactions dipolaires avec les microfibrilles de chitine et de cellulose

(Wood, 1980 ; Maeda et Ishida, 1967 ; Rattee et Greur, 1974). Excité par un rayonnement ultraviolet, il émet une fluorescence bleue. Il a été utilisé pour marquer la paroi des plantes, d'algues et de champignons (Herth et Schnepf, 1980; Nagata et Takebe, 2002). Chez la levure *S. cerevisiae*, le Calcofluor blanc permet de visualiser la chitine présente dans la paroi au niveau des cicatrices de bourgeonnement. Utilisé en tant qu'inhibiteur, le calcofluor blanc se lie aux chaînes de chitine en formation, ce qui empêche leur formation et leur cristallisation (Elzora et al, 1983). De ce fait, l'assemblage de la paroi est perturbé par le colorant ce qui affecte la croissance et la survie des cellules. Chez la levure, cela entraîne la formation d'agrégats multicellulaires résultant d'une séparation incomplète des cellules mère et fille (Roncero et Duran, 1985), et les septa formés sont anormalement épais. Il a été montré que l'effet inhibiteur du Calcofluor blanc chez *S. cerevisiae* était dépendant de la voie HOG puisque des mutants de la voie HOG montrent une résistance au Calcofluor blanc (Garcia-Rodriguez *et al*, 2000)

e. Inhibiteurs de voie de signalisation

Le FK506 et la cyclosporine A (Figure 26) sont des immunosuppresseurs, qui possèdent une activité antifongique. Ils bloquent la voie de la calcineurine, dépendante du calcium (Kunz et Hall, 1993). Le FK506 a ainsi également permis le clonage de *FKS1* pour FK506 sensitive 1. En effet, en présence de ces composés, la transcription du gène *FKS2* de *S. cerevisiae*, qui code pour la seconde sous unité de la β -1,3-glucane synthase est réprimée chez des mutants de la calcineurine. Dans ces conditions, *FKS1* devient essentiel alors qu'il ne l'est pas habituellement chez la levure. La staurosporine est un puissant inhibiteur de la protéine kinase C. Elle a permis d'isoler des mutants hypersensibles (Yoshida *et al.*, 1992), notamment impliqués dans la voie de signalisation de l'intégrité pariétale (Yoshida *S. et al.*, 1994a; Yoshida *et al.*, 1994b).

f. Inhibiteurs de GPI

Les recherches continues sur les nouvelles classes d'inhibiteurs ont permis la découverte de l'inhibiteur E1210 qui inhibe la biosynthèse du glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Figure 26). Cet inhibiteur semble interagir avec la protéine Gwt1 qui catalyse l'acétylation de l'inositol du GPI durant la voie de biosynthèse du GPI. E1210 possède une sélectivité d'inhibition contre Gwt1 de *C. albicans* et GWT1 de *A. fumigatus*, Cette molécule inhibe la germination, l'adhérence au polystyrène et la formation de biofilm chez *C. albicans*. (Watanabe et al, 2012). Ce nouveau groupe d'inhibiteurs semble prometteur car aucune inhibition de la protéine Gwt1 humaine n'a été décrite pour l'instant.

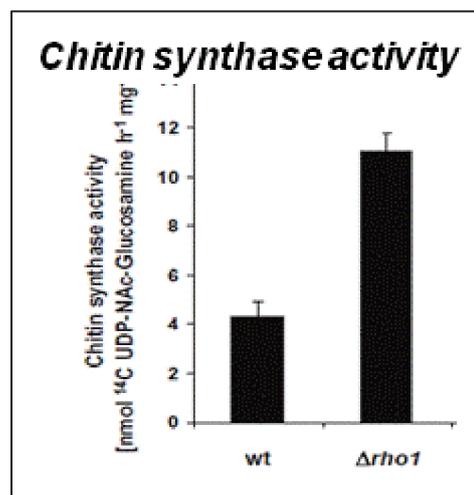


Figure 27 : Compensation vers le métabolisme de la chitine (Martinez-Rocha *et al*, 2008)

Une mutation de *RHO1* impliqué dans la biosynthèse du β -(1,3)-glucane affecte l'activité des chitines synthases.

g. Inhibiteurs de glycosylation

Il existe des inhibiteurs de la glycosylation des protéines. Parmi eux, on retrouve la Tunicamycine qui inhibe la N-acetylglucosylaminyltransferase, protéine permettant le transfert de N-acetylglucosamine sur le lipide transporteur du dolichol phosphate. Cela induit une absence de N-glycosylation des protéines chez *S. cerevisiae* (Orlean *et al*, 1991). Cet inhibiteur est aussi capable d'inhiber la glycosylation des protéines humaines et végétales.

h. Synergie

En Agronomie, tous les composés antifongiques utilisés actuellement, doivent faire face à l'apparition de souches résistantes. La recherche de nouveaux traitements plus efficaces reste donc un challenge permanent. La combinaison synergique de deux antifongiques pourrait augmenter l'activité antifongique, réduire la toxicité et les effets secondaires, prévenir l'apparition de résistance, augmenter le spectre d'action. Une stratégie antifongique combinant deux inhibiteurs de paroi, un inhibiteur de chitine synthases (Nikkomycine Z) et un inhibiteur de β -(1,3)-glucane synthase a déjà été développée en pharmacologie. Cette étude a montré une synergie d'action de ces deux inhibiteurs contre *A. fumigatus* et *C. albicans* (Verwer *et al*, 2012). Par ailleurs, une altération profonde de la paroi a pu être observée après ce traitement combiné chez *A. fumigatus* (Meletiadiis *et al*, 2010). Cette Stratégie n'a par contre jamais été testée sur un champignon phytopathogène.

E. Compensation

Il s'agit d'un concept émergeant en biologie pariétale, qui résulte du fait que la paroi ne peut être considérée comme un exosquelette inerte, mais plutôt comme une organelle vivant. En effet, la composition de la paroi change continuellement en présence d'un stress environnemental, comme le traitement par un fongicide (Kaptyn *et al*, 1999a, Smits *et al*, 2001 ; Smits *et al*, 1999 ; Popolo *et al*, 2001). La principale réponse du champignon à un dommage pariétale est une surexpression des gènes impliqués dans le métabolisme des polysaccharides pariétaux conduisant à une modification de la proportion des polysaccharides pariétaux avec en particulier une augmentation significative de la quantité de chitine dans le cas d'une altération du métabolisme du β -(1,3)-glucane et vice versa, une augmentation de la proportion de glucane dans le cas d'une altération du métabolisme de la chitine (Popolo *et al*, 1997 ; Garcia-Rodriguez *et al*, 2000b, Dallies *et al*, 1998). Ainsi dans le cas d'un mutant $\Delta\rho 1$, altéré dans la biosynthèse du β -(1,3)-glucane, une plus forte activité des chitines synthases est retrouvé chez le mutant. (Figure 27) (walker *et al*, 2008 ; Martinez-Rocha *et al*, 2008 ; Walker *et al*, 2008). Mais il existe d'autres réponses, comme une surexpression de de deux alpha-



Figure 28 : Pourriture noble observée sur baies de raisin



Figure 29: Pourriture grise observée sur framboise, rose ou bien feuilles de haricot

(1,3)-glucane synthase en réponse à un traitement par du calcofluor chez *A. niger* (Damveld *et al*, 2008). Ce mécanisme de compensation induit en réponse à une agression pariétale se traduit par une modification de la proportion des polysaccharides pariétaux,

Ce mécanisme de compensation induit une modification des types de liaison entre les composants. Par exemple, la diminution de β -(1,6)-glucanes associée à la mutation $\Delta kre6$, induit l'augmentation de la proportion des protéines PIR fixées aux β -(1,3)-glucanes et à la chitine (Kapteyn *et al*, 1999b). Ces réponses observées sont principalement sous le contrôle de la voie de l'intégrité pariétale mais aussi sous le contrôle de la voie de la calcineurine. L'existence de ces phénomènes de compensation a permis l'élaboration d'un nouveau concept de traitement antifongique basé sur la combinaison de deux inhibiteurs utilisés simultanément. Cette stratégie s'est montrée efficace dans le cas d'un traitement médical visant à endiguer une infection à *A. fumigatus* ou *C. albicans*. Mais aucun test n'a été réalisé dans le cas de champignons phytopathogènes.

II- Le modèle d'étude *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea est un champignon haploïde filamenteux phytopathogène, découvert en 1729 par Pier Antonio Micheli. Le nom *Botrytis cinerea* correspond à la forme asexuée du champignon. Sa forme sexuée, *Botryotinia fuckeliana* peut être obtenue en laboratoire, mais n'a été que très peu observée dans la nature (Choquer *et al*, 2007).

Le genre « *Botrytis* » signifie « raisin en grappe » en latin, et l'espèce « *cinerea* » signifie « de couleur cendrée ». L'appellation donnée à ce champignon correspond donc à un symptôme de pourriture grise, observé pour la première fois sur une baie de raisin (Figure 29). Cependant, il existe des conditions climatiques particulières dans lesquelles *B. cinerea* provoque des symptômes de pourriture dite « noble », qui permettent l'élaboration de vins liquoreux à haute valeur ajoutée tels que le Sauterne ou encore le Monbazillac (Figure 28).

Appartenant à la classe des Ascomycètes (Berbee, 2001), *B. cinerea* est responsable de la pourriture grise sur plus de deux cent espèces de plantes dicotylédones dont la plupart présentent un intérêt économique conséquent, comme la vigne mais aussi les cultures maraichères et fruitières (Choquer *et al*, 2007 ; Williamson *et al*, 2007 ; Van Kan, 2006). La polyphagie de ce champignon laisse supposer qu'il n'a pas de spécificité d'hôte (Choquer *et al*, 2007 ; Williamson *et al*, 2007). Il peut non seulement léser des plantes hôtes très différentes (tomate sous serre, tournesol, vigne, chrysanthème, haricot, kiwi...), mais aussi des organes très variés de la même plante (tige, pétale, feuille...) (Williamson *et al*, 2007 ; Elad *et al*, 2004) (Figure 29). Les pertes estimées provoquées par la pourriture grise sont de 15-40% des récoltes pour la vigne en France, selon les conditions

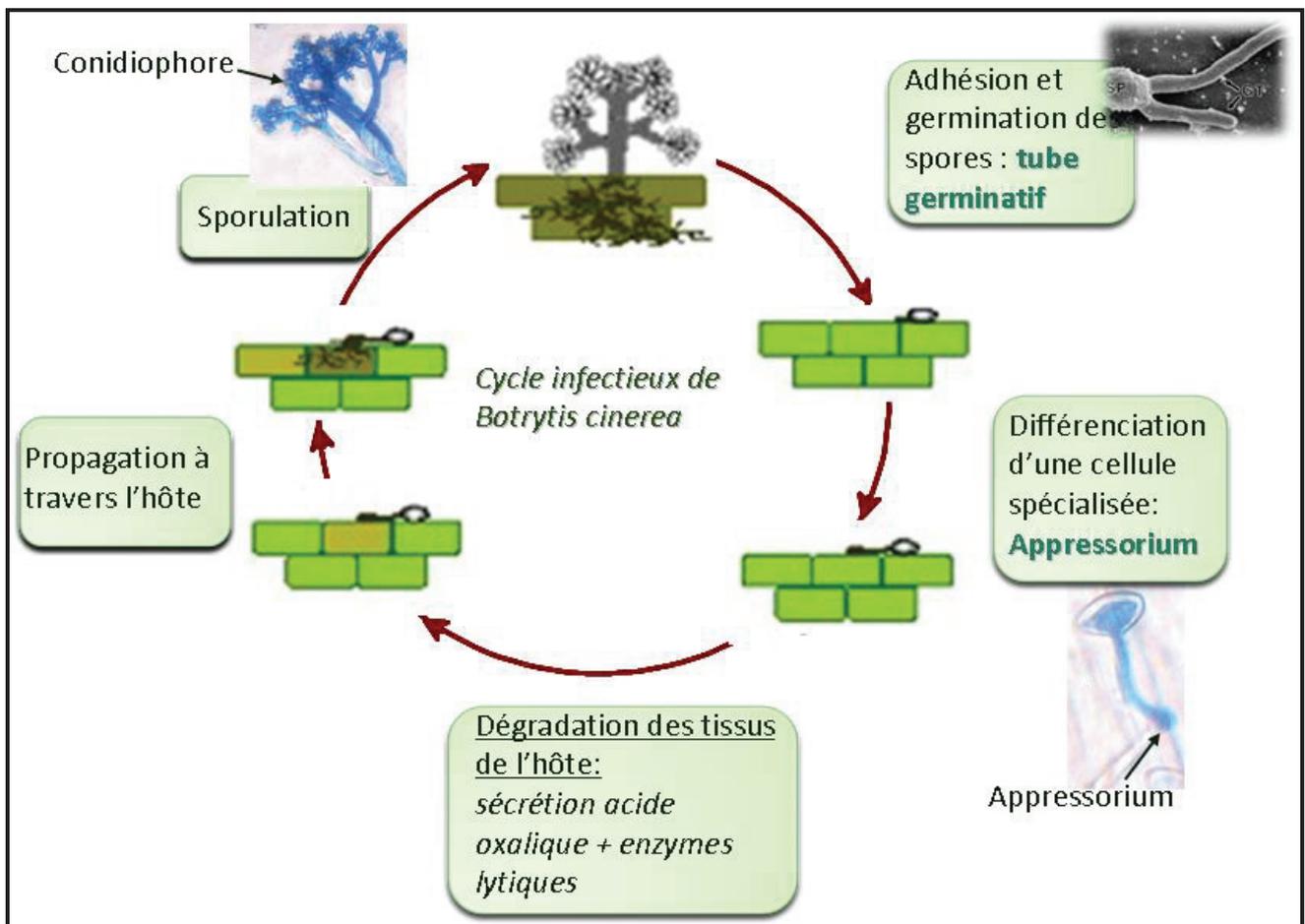


Figure 30 : Cycle infectieux de *Botrytis cinerea*

climatiques. Ces pertes sont de l'ordre de à 20-25% des récoltes de fraises en Espagne et à 20% des fleurs coupées aux Pays-Bas (genoscope). Ces dégâts au niveau des cultures représentent une perte financière de 10 à 100 milliards d'euros par an (genoscope). La lutte contre ce champignon nécessite l'emploi de fongicides et la modification des pratiques de culture. Ainsi, les traitements fongicides contre *B. cinerea* ont coûté environ 540 millions d'euros pour l'année 2001, ce qui représente 10% du marché mondial des fongicides (rapport annuel UIPP, 2002). Malgré l'efficacité des traitements anti-*Botrytis*, l'apparition de souches résistantes contraint à rechercher de nouvelles molécules à visée antifongique. *B. cinerea* est capable de coloniser un tissu sain (nécrotrophie), un tissu déjà infecté (opportunisme), mais aussi un tissu mort (saprophytisme) (Choquer *et al*, 2007, Elad *et al*, 2004). Ce champignon fait donc preuve d'une grande polyvalence. *B. cinerea* survit d'une année à l'autre en passant l'hiver sous forme de mycélium ou de sclérote. Cette dernière structure, constituée de mycélium compact, est mélanisée afin de résister à la dessiccation, aux radiations UV et aux attaques microbiennes durant plusieurs mois (Williamson *et al*, 2007). Au printemps, le mycélium et les sclérotés germent et produisent des spores asexuées appelées conidies. Ces organes sont ensuite disséminés à longue distance par le vent, où à courte distance à l'aide d'éclaboussures de gouttes d'eau, jusqu'à rencontrer une plante hôte (Elad *et al*, 2004).

La spore va adhérer à la surface du tissu hôte en sécrétant une matrice extracellulaire favorisant les interactions hydrophobes, puis germer (Choquer *et al*, 2007). Ces deux étapes sont cruciales dans la réussite du processus infectieux, et il apparaît essentiel de pouvoir percevoir les caractéristiques de la surface de l'hôte (hydrophobicité, sources de sucre) afin que la germination se mette en place (Figure 30, Choquer *et al*, 2007). Le tube germinatif peut différencier deux types de structures unicellulaires spécialisées dans la pénétration, un appressorium non cloisonné et simplifié, appelée protoappressorium, qui consiste en un simple gonflement de l'extrémité hyaline du tube germinatif et un appressorium unicellulaire cloisonné correspondant à la différenciation d'une cellule terminale hyaline gonflée et séparée du tube germinatif par un ou plusieurs cloisonnement (Akutsu *et al*, 1981). Chez certains champignons, tel *M. oryzae*, cette structure est très mélanisée, ce qui permet de générer une forte pression osmotique à l'intérieur de l'appressorium, conduisant à la perforation de l'hôte (Wilson et Talbot, 2009). Dans le cas de *B. cinerea*, la paroi n'est pas assez mélanisée pour atteindre des pressions assez fortes menant à la perforation (Van kan, 2006). *B. cinerea* est aussi capable de créer à partir d'un



Figure 31 : Structures d'infection de *B. cinerea* :

(A) Protoappressorium ou appressorium unicellulaire non cloisonné, (B) appressoria unicellulaires cloisonnés, (C) Appressorium plurilobé, (D) Coussin d'infection.

mycélium épiphyte deux autres types de structures de pénétration pluricellulaires plus complexes, les appressoria polylobé et les coussins d'infections (Akutsu *et al*, 1981) (Figure 31). *B. cinerea*, sécrète une batterie d'enzymes lytiques capables de dissoudre les tissus végétaux (Choquer *et al*, 2007 ; Ten Have *et al*, 2001) ou des radicaux libres détruisant les cellules de l'hôte (Van Kan, 2006). Cette dégradation des tissus végétaux qui est souvent constatée pendant les phases initiale de l'infection, est donc considérée comme le principal moyen de pénétration du champignon.

Après pénétration, le champignon colonise la plante hôte, et dégrade ses tissus en sécrétant à nouveau des enzymes de dégradation. La dégradation des tissus libère les nutriments nécessaires au développement du parasite, et l'acide oxalique déstabilise la structure peptidique des parois végétales, entraînant une mort cellulaire (Kim *et al*, 2008). *B. cinerea* base sa stratégie d'infection sur la nécrotrophie, c'est-à-dire qu'il attaque l'organisme vivant en sécrétant des facteurs de virulence, causant la mort des cellules dont il peut ensuite se nourrir (Choquer *et al*, 2007 ; Elad *et al*, 2004). Par ailleurs, *B. cinerea* est capable de déclencher un stress oxydatif durant la pénétration, par une accumulation de peroxyde d'hydrogène par exemple, ce qui déclencherait une réponse hypersensible de la plante (Van Kan, 2006). Cette réponse de résistance de la plante entraîne une mort cellulaire localisée ayant pour but de limiter l'accès aux nutriments pour le pathogène. Mais dans le cas de l'infection par *B. cinerea*, cette réponse de résistance de l'hôte confère au champignon un avantage puisqu'il est apte à se développer sur des tissus abîmés ou morts (Figure 30).

Des zones de nécrose apparaissent alors à la surface de l'hôte, et le champignon sporule lorsque les conditions nutritionnelles deviennent défavorables. Ce phénomène se traduit par une différenciation de conidiophores, qui produiront par la suite des conidies. Ce cycle se déroule jusqu'à l'hiver suivant (Figure 30).

Deux souches de *B. cinerea* ont été séquencées parallèlement par le Broad Institute (BO5.10 : couverture génome de 4X (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/botrytis_cinerea/MultiHome.html)) et par l'URGI en partenariat avec le génoscope (T4 : couverture génome de 10X (<http://urgi.versailles.inra.fr/Species/Botrytis>)) (Anselem *et al*, 2011). Ces analyses ont mis en évidence un génome de 39,5Mb comprenant 14250 gènes. Ces séquençages ont rendu possible l'utilisation de nombreux outils moléculaires. En effet, *B. cinerea* est facilement transformable et le séquençage du génome a permis l'élaboration de puces à ADN, utiles pour l'analyse de l'expression génique.

Projet de thèse

III- Projet de thèse

Un nombre important de maladies des plantes résulte de l'attaque de champignons phytopathogènes et impose donc une lutte phytosanitaire basée très souvent sur l'utilisation de fongicides. Parmi les différentes cibles antifongiques, la paroi des champignons est plus particulièrement intéressante car, par rapport aux cellules animales et végétales, les polymères qui la composent, de type β -(1,3)-glucane et chitine, sont absents ou modifiés chez ces organismes. De ce fait, plusieurs molécules qui ont pour mode d'action l'inhibition de la biosynthèse de ces polysaccharides pourraient être de bons agents antifongiques. Plusieurs agents anti-mycotiques utilisés en pharmacologie le démontre. Toutefois, il a été noté que l'utilisation de ces molécules peut conduire à l'apparition de mécanismes de compensation entre ces deux types de polysaccharides pariétaux, réduisant parfois leur efficacité. En effet, en cas d'altération du métabolisme du β -(1,3)-glucane, le champignon compense cette altération par une suractivation du métabolisme de la chitine et vice versa.

Les travaux entrepris dans le cadre de cette thèse ont pour objectif de mieux comprendre les mécanismes de biosynthèse de la chitine et du β -(1,3)-glucane chez le champignon phytopathogène *B. cinerea* en vue de développer une stratégie antifongique combinant des inhibiteurs de ces deux voies de biosynthèse afin de peut-être pouvoir contourner les mécanismes de compensation observés. Par ailleurs, ce travail a également pour objectif de mieux caractériser la biosynthèse des β -(1,3)-glucane via l'étude de souches fongiques mutées.

La première partie de cette thèse concerne l'étude des effets d'inhibiteurs de la biosynthèse de la chitine et du β -(1,3)-glucane seul, ou en combinaison, sur la synthèse de la paroi de *Botrytis cinerea*. A l'heure actuelle aucune donnée concernant la combinaison d'inhibiteurs de paroi n'est disponible dans le cas de champignons phytopathogènes.

La seconde partie de la thèse est dédiée à une étude de la réponse transcriptomique du champignon en présence d'inhibiteurs de la biosynthèse de la chitine et du β -(1,3)-glucane, respectivement la Nikkomycine Z et la Caspofongine, appliqués seuls ou en dans des combinaisons définies dans la première partie. Ces transcriptomes permettront de mettre en évidence les gènes dont l'expression est modifiée en fonction des traitements appliqués. L'analyse de ces données devrait permettre de mieux définir les gènes impliqués dans la synthèse des parois fongiques, leur régulation et leurs interactions et ainsi de mieux comprendre à l'échelle moléculaire les phénomènes de compensation développés par les champignons en réponse à de tels inhibiteurs.

Enfin, dans une troisième partie, l'étude de la synthèse des β -(1,3)-glucanes sera abordée via la construction et la caractérisation de mutants de gènes potentiellement impliqués dans la synthèse de β -(1,3)-glucane. Le gène FKS1 en utilisant la technologie de RNAi, et la construction de souches mutantes par délétion de gènes appartenant à la famille des glycosyltransférase de type 2. La caractérisation des mutants obtenus devrait permettre de mettre en évidence des étapes clés de la synthèse des β -(1,3)-glucanes chez *B. cinerea*.

La réalisation de ce projet contribuera à une meilleure caractérisation du métabolisme pariétal chez *B. cinerea* et devrait permettre d'élaborer de nouvelles méthodes de traitements antifongiques afin de lutter de façon plus efficace et spécifique contre les maladies fongiques des cultures.

Chapitre 1 : Etude de la synergie entre un inhibiteur de la biosynthèse de la chitine et un inhibiteur de la biosynthèse du β -(1,3)-glucane chez le champignon phytopathogène *Botrytis cinerea*.

Synergy Activity of Cell Wall Inhibitors on a Phytopathogenic Fungus *Botrytis cinerea*. Novel Determination Model.

Emmanuelle GALLAND^{1, 2}, Pierre GENIX¹, Stephanie GAMET¹, Marie-Pascale LATORSE^{1, 2}, Nathalie POUSSEREAU², Valerie TOQUIN¹, Roland BEFFA³, Mathias CHOQUER²

- 1- BAYER SAS, Bayer CropScience, La Dargoire Research center, 14 impasse Pierre Baizet BP 99163, 69263 LYON Cedex 09
- 2- UMR5240, Joint Laboratory: University Lyon I, CNRS, BAYER SAS, UMR5240, 14 impasse Pierre Baizet BP99163, 69263 LYON Cedex 09.
- 3- BAYER CropScience AG, building H872, industriepark Höchst, D-65926 Frankfurt/Main, Germany

Abstract

Fungi diseases are causing significant crop losses. The ability of fungi to develop resistance to antifungal compounds and the continuously new standards for compound registration request the development of novel solutions. Synergism between compounds having different Modes of Action (MoA) is an attractive approach. The effects cell wall inhibitors acting in combination on different targets is still poorly understood in phytopathogenic fungi. The effects of Caspofungin, Aculeacin A (Echinocandins) - β -1,3-glucan synthesis inhibitors-, and Nikkomycin Z -a chitin synthesis inhibitor-, alone or in combination, were studied on *Botrytis cinerea*. The IC₅₀ of Nikkomycin Z, Caspofungin and Aculeacin A, determined by the Hill equation, were respectively, 0.92 μ g/ml, 0.39 μ g/ml and 0.3 μ g/ml. Light Microscopy analysis, after treatment by the inhibitors alone shows a swelling of hyphae after Nikkomycin Z treatment, and a hyperbranching of hyphae after treatments with an echinocandin. A checkerboard broth macrodilution shows a synergy effect between Caspofungin and Nikkomycin Z, associated to a balloon phenotype and a lack of spore germination. Whereas only an additive effect, associated to an hyperbranching phenotype of hyphae only, was observed with treatments with Caspofungin and Aculeacin A in combination. In addition, two methods were used to determine the interactions between the inhibitors used, the Tammes method and a new method derived from the Hill equation. This novel model give the advantage to better analyse the interactions between compounds with different Hill numbers.

Introduction

Fungi are one of the main causes of plant diseases leading to significant crop losses. The use of fungicides is the main strategy to control fungal infection in crops. Most of the fungicides act on essential functions involved in fungal development such as respiration, sterol biosynthesis or cell division. The ability of fungi to develop resistance to antifungal compounds and the

continuously new standards for compound registration request the continuous development of novel solutions [17, 9]. The fungal cell wall presents an attractive target because it plays essential roles during the life cycle of the fungus like physical protection and maintenance of the osmotic stability of the cell, environmental and chemical stress protection, regulation

of key steps of development [23]. The fungal cell wall has particular structures with the presence of chitin and β -(1,3)-glucan offering the unique opportunity to find antifungal compounds inhibiting specific targets in their respective biosynthesis pathways which are absent in plants and animals [1].

Fungal cell wall inhibitors targeting the β -(1, 3)-glucan synthase (Echinocandins: Caspofungin and Aculeacin A) and the chitin synthases (Nikkomycin Z and polyoxins), key enzymes of these two pathways have been already found, mainly as antimycotic compounds to control human and animal fungal diseases [6, 8, 21]. In pharmacology, Echinocandins, a group of semisynthetic cyclic lipopeptides with an N-linked acyl lipid side chain, represented by e.g Caspofungin, Aculeacin A, Micafungin, or Anidulafungin [14] are used to treat candidiasis and invasive aspergillosis in clinical treatments [2].

Caspofungin (1213kDa), a non competitive inhibitor of β -(1, 3)-glucan synthase, is a semisynthetic water soluble lipopeptide produced from a fermentation product of the fungus *Glarea lozoyensis* [10]. Aculeacin A contains a cyclopeptide moiety and a long chain fatty acid, palmitic acid; is produced by *Aspergillus Aculeatus* and was shown to inhibit the synthesis of alkali-insoluble glucan, product of the β -(1, 3)-glucan synthase activity [28]. Finally, Nikkomycin Z exhibits selective toxicity against chitinous pathogenic fungi, is a nucleoside di-peptide analogous of UDP-N-Acetyl glucosamine and acts as a potent competitive inhibitor of chitin synthases [9, 12, 25]. The development of resistance against antifungal compounds is

a major threat requesting continuous innovation [1]. Mixtures of active ingredients with different modes of action offer good opportunities to delay, or even prevent resistance development in fungi [12]. This can be particularly the case when synergistic interactions occur between compounds, with additional effects like increasing the spectrum of action of a product and/or decreasing its secondary effects [20].

The strategy which combines Nikkomycin Z and an Echinocandin has been shown to be effective in treatments against *Aspergillus fumigatus*.

Discussion of dose-response series are rarely based on single data points (like Colby). Numerous models have been proposed to determine and quantify synergistic effects, all based on comparisons at a single dose rate t or at single ratio [16]. These models are not able to reveal the global interaction for all couples of doses and are empirical and requesting often to perform time consuming experiments by using high number of data points [16].

The aims of this study was 1) to test the ability of cell wall synthesis inhibitors, alone or in combination, to control a phytopathogenic fungus, *B. cinerea*, responsible of the grey mould disease in more than two hundred plant species [26], and 2) to establish an easy approach allowing the quantification of synergistic effects for all mixtures whatever the concentrations used, and thus being independent of the single point interpretations (Colby) or ratio of doses (Tammes) [24].

Materials and methods :

Organism:

The strain BO5.10 of *B. cinerea*, is a derivate from an isolate collected on grape [22]. It is maintained on malt agar medium (glucose: 5g/l, malt: 20g/l, tryptone: 1g/l, casein acid hydrolysate: 1g/l, yeast extract: 1g/l, RNA: 200mg/l and agar: 16g/l) at 21°C in a photoperiod 8 h light and 16 h dark light.

Antifungal cell wall inhibitors:

Caspofungin, Aculeacin A and Nikkomycin Z were purchased as powders (sigma) and dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) to make stock solutions (3000 μ g/ml). The stock solutions were held at -20°C until use. Serial twofold dilutions of each antifungal agent were prepared. Final dilutions

used are from 0.03 µg/ml to 10 µg/ml. These dilution were made in 50µL nitrate minimal medium (glucose: 5.5mM, NaNO₃: 23mM, KH₂PO₄: 14mM, MgSO₄: 7H₂O: 2mM, CaCl₂: 2H₂O: 7mM, FeSO₄: 7H₂O: 15µM) with Thiamine/biotin at 2.96/0.02 mol per litter. The same medium used for the spores suspension to help the homogenisation of inhibitors in the well.

The Hill model

Our work is based on the Hill equation [13]. So, we used the Hill equation to determine the effect of our inhibitors on the mycelium growth of *B. cinerea*.

$$1-E=1/(1+(C/IC_{50})^a)$$

In this equation E is the measured effect or the response, in this case the growth determined by optical density reading. C is the initial drug concentration. IC₅₀ is the drug concentration to obtain 50% of the maximum effect. a is the Hill coefficient of sigmoidicity (slope parameter or Hill number).

New method for determine drug interactions:

A new synergy model was developed derivating from the Hill model. In fact, a second inhibitor was adding in the Hill equation. An interaction term between the two inhibitors permits to determine the relation between the them.

$$Y=1-$$

$$1/(1+(C^a/CI_{50}^a)^{na}+(C^b/CI_{50}^b)^{nb}+d\sqrt{((C^a/CI_{50}^a)^{na}\times(C^b/CI_{50}^b)^{nb})})$$

This effect was determined by the d parameter. In fact, when d is less than 0, the interaction is antagonism, when d=0, the interaction between the two inhibitors is additive. And when d is more than 0, there is a synergy between the two inhibitors.

Inhibitor interaction evaluation by Tammes

methodology:

The efficacy of the treatment was calculated using Abbott formula: efficacy= (untreated-treated) x 100. The concentrations of the fungicides alone or in a mixture giving 100% efficacy for each component were undetermined based on the sigmoid curve dose/response model with their confidence intervals.

The results corresponding to IC 70 (effective doses providing 70% of growth inhibition) for the ratio studied have been calculated on the basis of 20 repeat per combination. The analysis of the results was made according Tammes model [24]. The IC 70 values observed for each compound alone or in mixture were then inserted in a graphic representation as describe by Tammes [24].

Each of the components IC is expressed in an X and Y axes. The line which connects the point is called an isobole. With an isobole, the effect of different proportions of the components can be evaluated. The observed value for the mixture corresponding

to one ratio A/B is compared to the theoretical value calculated via the isobole of additive effect. In that case, the total effect is equal to the sum of the effects of the components taken independently. A synergistic effect or a cooperative action of two inhibitors in mixture means that the total effect is greater or more prolonged than the sum of effects taken independently.

Cell wall inhibitor characterization on the fungal growth:

The final concentrations of all three antifungal agents were ranged from 0.03 µg/ml to 10 µg/ml. Aliquots of 50µL of the drugs at a concentration of four-times the targeted final concentration were dispensed in the wells of 96-well plates (Greiner). Conidial suspensions were prepared in nitrate minimal medium. In order to obtain a final inoculum concentration of 10⁵ conidia/mL and a final DMSO concentration of 1% (at this concentration, DMSO have not a significant effect on the growth of the fungi). 150µL of the inoculum was added to the well. The plates were incubated for 6 days at 21°C at daylight.

After 6 days the optical density at 620 nm was measured with a microtiterplate reader (Beckmann coulter AD340). The percentage of growth was calculated by comparing the OD₆₀₀ of the control wells (drug-free) with those of the treated wells based on the following equation: (OD₆₀₀ of the drug free wells-OD₆₀₀ of the well containing drug) x 100.

Interactions between the cell wall inhibitors on the fungal growth.

Drug interactions were assessed by checkerboard broth macro dilutions. The final concentration of the antifungal agents ranged from 0.03 µg/ml to 10 µg/ml for Caspofungin, Aculeacin A and Nikkomycin Z.

Aliquot of 2 µL of each drug (and in the case of single-drug control, 1 µL of that drug and 1µL of DMSO) at a concentration four-times the targeted final concentration were dispensed in the wells in order to obtain a two dimensional checkerboard. Conidial suspensions were prepared as described above and 150µl of the inoculum was added to the wells. The microtiter plates were incubated for 6 days at 21°C at daylight. After 6 days, the OD₆₀₀ was measured as described above.

Four independent experiments, for each interaction were performed. For each experiment, each design point was replicated in quintuplicate. Thus each stack included five 96-well plates, each with the same set of drug concentration. We analysed 24 combinations of drug concentration (from 0.03 to 10 µg/ml for each drug) for 2 types of combination (Caspofungin + Nikkomycin Z, Caspofungin + Aculeacin A).

Cell wall inhibitor effects on the fungal morphology :

The effect of Nikkomycin Z, Caspofungin and Aculeacin A alone and in combination on the light microscopic morphology of *B. cinerea* was also studied in plate with an inverted microscope (Zeiss, obj X10).

The effect of Sorbitol (0.8M) as an osmoprotectant is analysing after the treatment by the combination of Caspofungin and Nikkomycin Z.

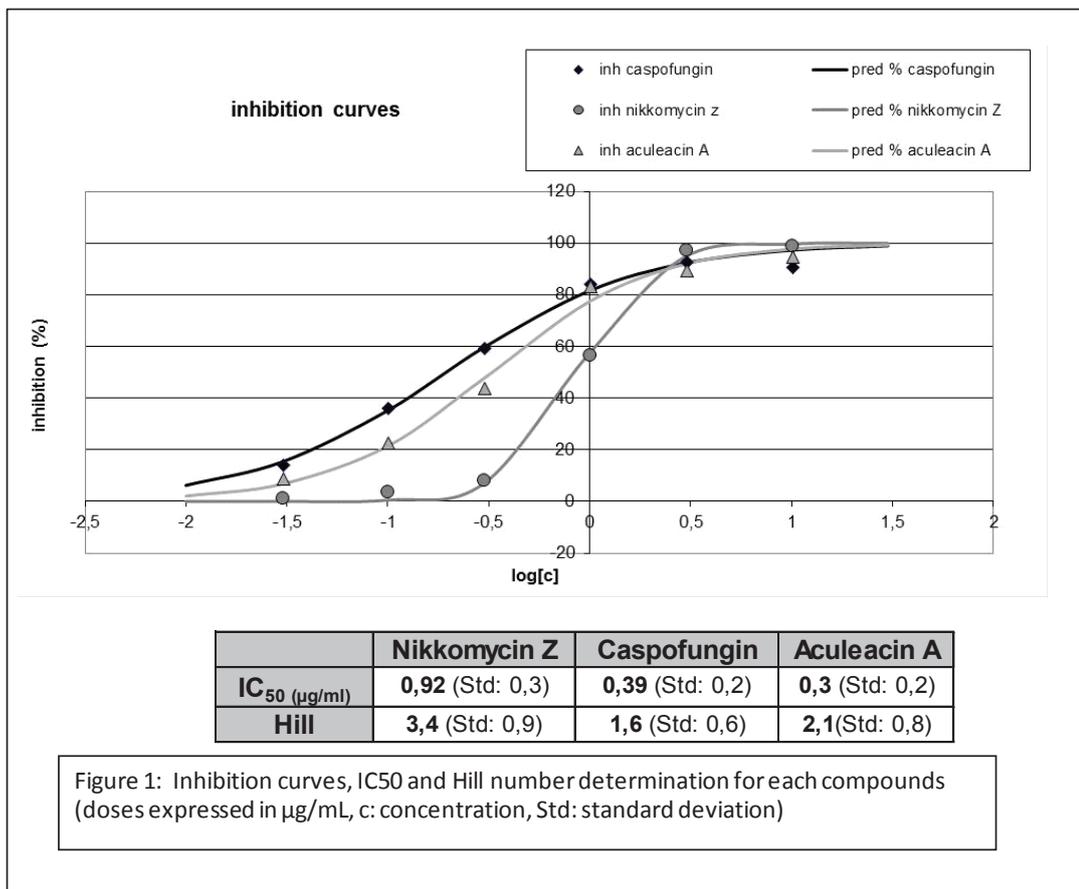
Results

Inhibitor characterization on the fungal growth

In order to quantify the antifungal activity of each cell wall inhibitor against *B. cinerea*, we reported the IC50 determined by the Hill equation fitted to experimental dose response data obtained for each compound tested separately (Figure 1). The Nikkomycin Z, Caspofungin and Aculeacin A IC50 are respectively 0.92 µg/ml, 0.39 µg/ml and 0.3 µg/ml. The Nikkomycin Z, Caspofungin and

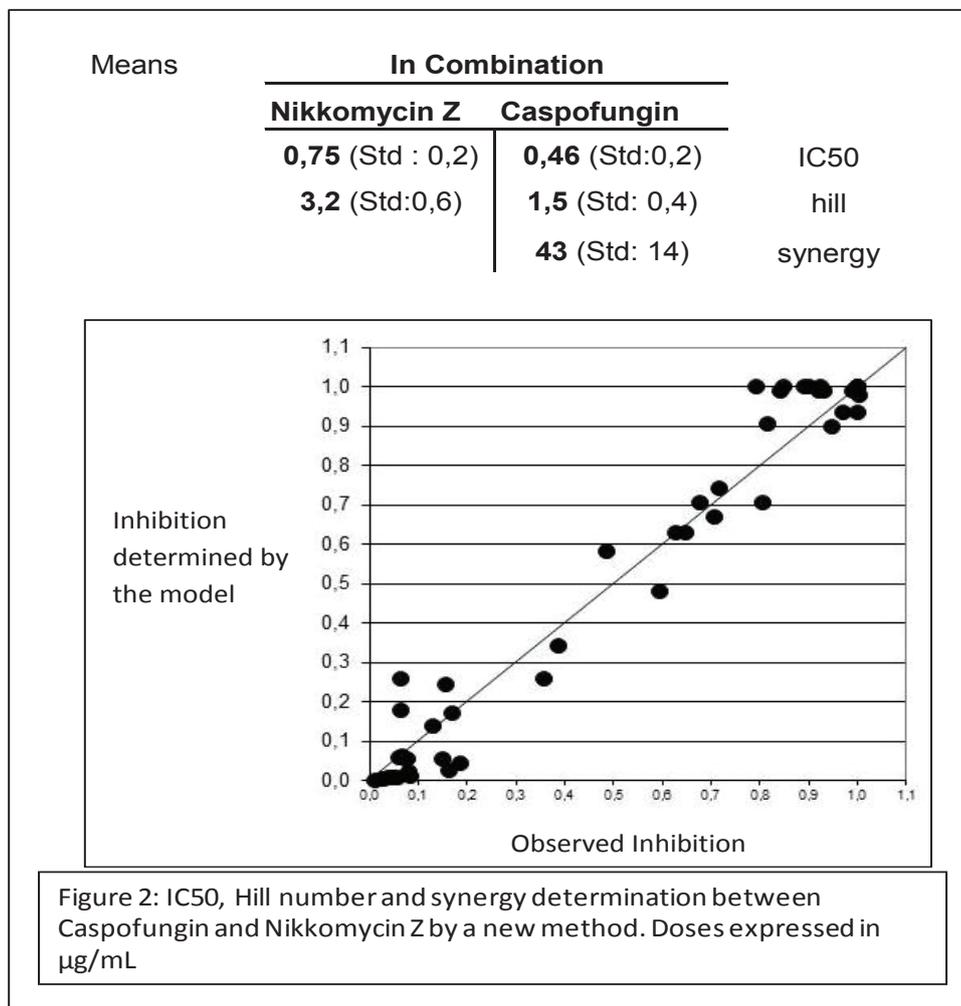
Aculeacin A Hill numbers are respectively 3.4, 1.6 and 2.1. All of the three compounds were active against *B. cinerea*. Both partners alone were characterized by their potency (IC50) and by the slope of the curve (Hill number) using the classical model of Hill (Figure 1).

Interactions between the cell wall inhibitors on the fungal growth.



In a first step a combination between a CHS inhibitor (NikkomyacinZ) and a β -(1,3)-glucan synthase inhibitor (Caspofungin) was studied. Data are reported in Figure 2. In the calculation

enzyme, the β -(1,3)-glucan synthase, was studied. The data presented in Figure 3 and the calculation using the novel equation showed that the value of the d parameter is equal to zero, corresponding to an



using the new developed equation based on the previous Hill model, the d parameter which evaluates the interaction between the two compounds is positive, therefore there is a synergistic effect between Caspofungin and Nikkomycin Z. This effect can be confirmed using the Tamme methodology, which shows that all IC 70 for the different ratios tested are smaller than expected in the prediction of an additive effect (Table 1). Similar results were obtained for the combination of Aculeacin A, an other inhibitor of β -(1,3)-glucan synthase and Nikkomycin Z. (data not shown).

In a second step, the interaction between two inhibitors acting on the same target

additivity effect between the two inhibitors. The Tamme methodology shows that the IC 70 values are the same as the ones defined by the model (Table 2) confirming the additivity of the effects of the two inhibitors and the accuracy of the new equation.

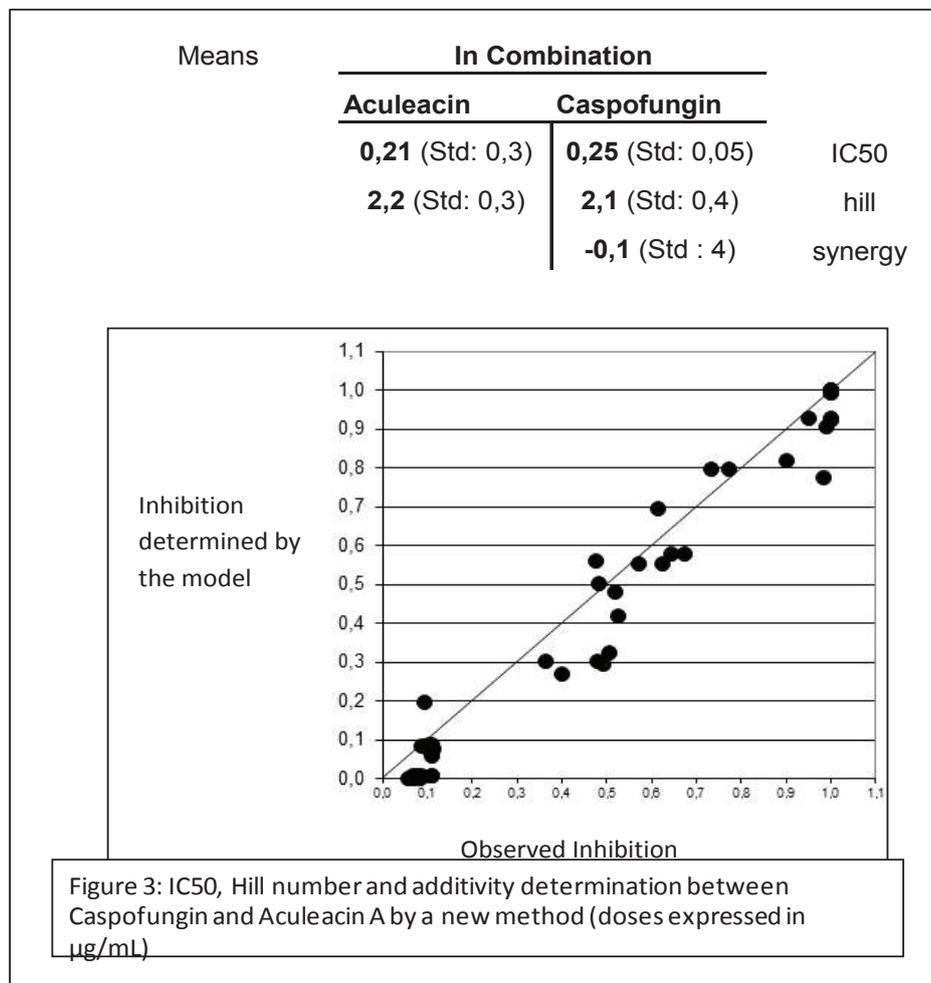
Cell wall inhibitor effects on the fungal morphology

	Practical dose for 70% of efficacy	Theoretical dose for 70% of efficacy
Caspofungin alone	0,89	/
Nikkomycin Z alone	1,06	/
Ratio 1 C/1N	0,19 : 0,19	0,5 : 0,5
Ratio 1C/3N	0,32 : 0,1	0,75 : 0,3
Ratio 3C/1N	0,11 : 0,34	0,25 : 0,7
Ratio 1C/10N	0,38 : 0,04	0,95 : 0,09
Ratio 10C/1N	0,07 : 0,7	0,09 : 0,85

Table 1: Synergistic effect according Tammes method for 70% of growth inhibition between Caspofungin and Nikkomycin Z (Doses expressed in $\mu\text{g}/\text{mL}$)

The effect of Nikkomycin Z, Aculeacin A and Caspofungin on the morphology of *B. cinerea* was studied by light microscopy. After 3 days of treatment, a swelling of the hyphae can be observed in the presence of Nikkomycin Z. Whereas, in the presence of Echinocandins (Caspofungin and Aculeacin A), the hyphae became truncated and hyperbranched (Figure 4). The organisms treated with Nikkomycin Z

and Caspofungin (or Aculeacin A) showed balloon structures, showing a rapid burst when slight stresses, in particular osmotic changes, occurred. These structures can totally replace the normal hyphal morphology (Figure 4). In addition, at high concentrations (from 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ from each inhibitor) this combined treatment completely inhibits the spore of germination (Figure 4). The modification of the hyphae phenotype



can be compensated by the addition of sorbitol (0.8M) but the germination defect

cannot be restored (Figure 5).

	Practical dose for 70% of efficacy	Theoretical dose for 70% of efficacy
Caspofungin alone	0,6	/
Aculeacin A alone	0,68	/
Ratio 1 C/1A	0,43 : 0,43	0,3 : 0,3
Ratio 1C/3A	0,45 : 0,15	0,5 : 0,15
Ratio 3C/1A	0,14 : 0,41	0,15 : 0,45
Ratio 1C/10A	0,55 : 0,06	0,55 : 0,05
Ratio 10C/1A	0,05 : 0,47	0,05 : 0,45

Table 2: additivity effect according Tammes method for 70% of growth inhibition between Caspofungin and Aculeacin A. (Doses expressed in µg/mL)

Discussion

Several models exist to determine the relations between inhibitors but each of them have some drawbacks. [16]. The reference model used is the Loewe additivity, which can determine the three types of interactions, *i.e.* additivity, synergy and antagonism [4]. This model used a straight line isobole for no interaction but can be used only if both compounds have the same Hill number [4]. This model based on the same global effect permit to determine the interaction between the two compounds. Tammes model derives from the Loewe additivity method. However with this model when the compounds have different Hill numbers, the isobole should be curved, no straight line anymore which is difficult to use when the compounds have different Hill number [4]. To overcome these difficulties, a new model was established which can be used in an easy way when the compounds to be analysed have different Hill numbers. This model can be used for any combinations of concentrations and does not request to use a particular single concentration or ratio of concentrations

which is always tedious to determine. This model is based on the introduction in the equation of a second inhibitor and an interaction term between the two inhibitors, quantified by the parameter *d*. This parameter determines the nature of the interaction between two compounds, *i.e.*, additivity, antagonism, or synergism. The new model was validated by comparison with the Tammes method, because the Tammes method is a model validated for agronomic use. With both methods a synergy was determined for combined treatment with an Echinocandin and Nikkomycin Z, whereas an additive effect was observed between two Echinocandins in combination. The new model has the advantages to be easier to use, is more accurate than the previous one and is well adapted to screen and select the best couple of inhibitors among combinations between a high number of compounds.

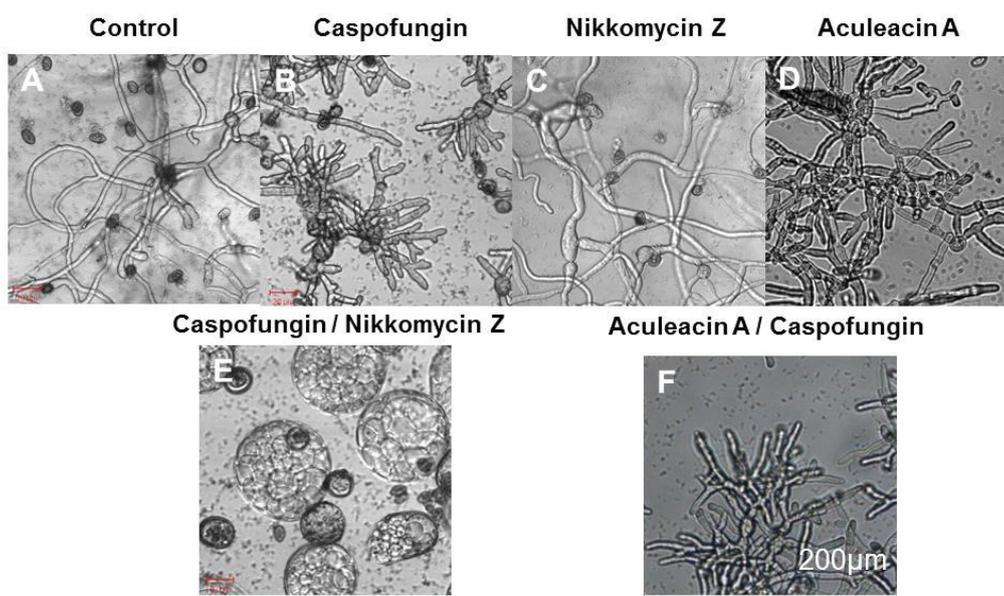


Figure 4: Light microscopic changes in growth development of *B. cinerea* with Caspofungin, Aculeacin and Nikkomycin Z alone and in combination after 72h of incubation. (A) Drug-free control (DMSO 1%); (B) Nikkomycin Z alone (3 µg/mL); (C) Caspofungin alone (1 µg/mL); (D) Aculeacin alone (1 µg/mL); (E) Caspofungin (1 µg/mL) plus Nikkomycin Z (3 µg/mL); (F) Aculeacin (3 µg/mL) plus Aculeacin (1 µg/mL).

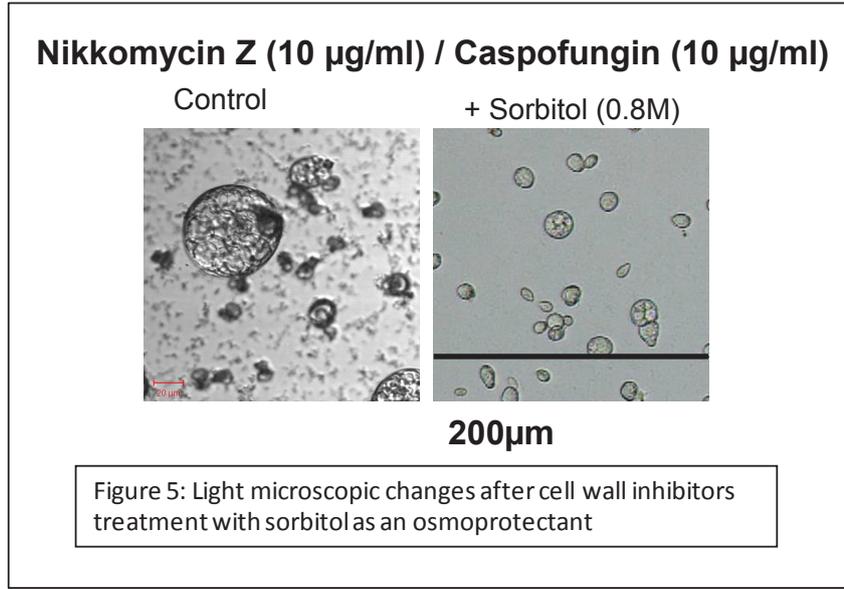
Little is known about the effects of inhibitors of CHS and β -(1,3)-glucan synthase, alone or in combination on filamentous phytopathogenic fungi and *B. cinerea* in particular. Chitin and β -(1, 3)-glucans are the most important components of the fungal cell wall, and play a major role in keeping the cell wall integrity [15] during the life cycle of fungi.

Chitin is a polymer of β -(1, 4)-N-Acetylglucosamine. Nikkomycin Z acts as a competitive inhibitor of chitin synthase in fungi. Nikkomycin Z transport is mediated by dipeptide transporter [19]. Nikkomycin Z demonstrates a moderate activity against *B. cinerea* and induced swelling of hyphae [29]. We can notice that the swelling of hyphae is observed from very low concentration, while no growth inhibition was observed. It seems that Nikkomycin Z was fungistatic against *B. cinerea* because without Nikkomycin Z, there is a growth again of the fungus (data not shown).

β -(1, 3)-glucan the other major component of the fungal cell wall, is formed from

UDP-glucose [3]. A group of inhibitors targeting β -(1, 3)-glucan biosynthesis is known: Echinocandins. Among this group, three molecules are validated for medical treatment. Echinocandins are also active against *B. cinerea* and induce an hyperbranching of the hyphae. Caspofungin seems to be fungicidal against *B. cinerea* because without Caspofungin no new growth was observed (data not shown), as observed in *A. fumigatus* [5].

Some β -(1, 3)-glucan synthase mutants in *Fusarium oxysporum*, show an increase of chitin synthase activity. It is found in *Candida albicans* that Nikkomycin Z inhibition induce a formation of more alkali insoluble glucan in the cell wall [11, 18]. This compensatory effect between cell wall polysaccharides to maintain the cell wall structure can decrease the efficacy of cell wall inhibitors applied alone. The combination between an Echinocandin and Nikkomycin Z should block this cell wall compensation phenomenon and therefore inhibit strongly the hyphal growth than in the each compound applied alone as



observed in the human pathogen *A. fumigatus* [7,27]. The data reported here showed that this can be the same on a phytopathogenic fungus, like *B. cinerea*.

The potentiality of this strategy which combines cell wall inhibitors acting on two different targets, i.e. two modes of action, in that case CHS and β -(1,3)-glucan synthase open a new opportunities to better control the development of fungal diseases in crop systems and might delay or even better prevent the development of resistance [20]. The combined treatments with an Echinocandin and Nikkomycin Z induce a particular phenotype *B. cinerea* hyphae called balloon phenotype. Whereas the combination of the two Echinocandins (Caspofungin and aculeacin A) show only a hyperbranching of hyphae. The balloon phenotype might reflect a synergy effect of the two compounds. The balloon phenotype may results in severe alteration in the cell wall, as observed by in *A. fumigatus* [7]. The suppression of the balloon phenotype by sorbitol as an osmoprotectant suggests that the cell wall can be partly repaired under these conditions. Any attempt to stain the cell wall in these conditions failed because most probably too strong changes in the osmotic conditions of the medium. Further biochemical studies determining the composition of the cell wall before and

after the treatments will be needed to characterize better the morphological changes observed. Using higher concentrations of the inhibitors an absence of spore germination was observed which cannot be restored by the osmoprotectant, suggesting that the cell wall is too altered to be at least partly repaired. Nevertheless we cannot rule out additional secondary effects on other key functions of the spore cells.

In this study we have presented a new model, easier to use and more accurate, to evaluate the additivity, the antagonism, or the synergism between two inhibitors. This model was validated by using two fungal cell wall inhibitors with different modes of action and by the study of their effects for the first time on a phytopathogenic fungus, i.e. *B. cinerea*. The synergy found between an inhibitor of the CHS and an inhibitor of the β -1,3-glucan synthase on the growth of the hyphae was correlated with typical morphology changes. This highly potent activity of the combinations of the two types of inhibitors has to be further validated *in planta*, but it open promising new approaches to develop new strategies to control the development of fungal diseases in crops with long lasting solutions delaying or prevented the rather fast development of resistance.

Acknowledgement:

This work was supported by Bayer CropScience, Lyon, France and a CIFRE grant n°0923/2009.

References

1. **Aimanianda V., Latgé J. P.** 2010. Problems and hopes in the development of drugs targeting the fungal cell wall. *Expert Rev Anti Infect Ther.* **8**: 359-364.
2. **Arikan S., Lozano-Chiu M., Paetznick V., Rex J. H.** 2002. In vitro synergy of Caspofungin and amphotericin B against *Aspergillus* and *Fusarium spp.* *Antimicrob Agents Chemother.* **46**: 245-247.
3. **Bacic A., Fincher G. B., Stone B. A.** 2009. Chemistry, biochemistry and biology of (1-3)- β -glucans and related polysaccharides.
4. **Berenbaum M. C.** 1989. What is synergy? *Pharmacol Rev.* **41**: 93-141.
5. **Bowman J. C., Scott Hicks P., Kurtz M. B., Rosen H., Schmatz D. M., Liberator P. A., Douglas C. M.** 2002. The antifungal echinocandin Caspofungin acetate kills growing cells of *Aspergillus fumigatus* in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**: 3001-3012.
6. **Cabib E.** 1991. Differential inhibition of chitin synthetases 1 and 2 from *Saccharomyces cerevisiae* by polyoxin D and Nikkomycins. *Antimicrob Agents Chemother.* **35**: 170-173.
7. **Chiou C. C., Mavroggiorgos N., Tillem E., Hector R., Walsh T. J.** 2001. Synergy, pharmacodynamics and time-sequenced ultrastructural changes of the interaction between Nikkomycin Z and the Echinocandin FK463 against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**: 3310-3321.
8. **Cornely O. A., Schmitz K., Aisenbrey S.** 2002. The first echinocandin: Caspofungin. *Mycoses.* **45**: 56-60.
9. **Debono M., Gordee R. S.** 1994. Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. *Annu Rev Microbiol.* **48**: 471-497.
10. **Deresinski S. C., Stevens D. A.** 2003. Caspofungin. *Clin Infect Dis.* **36**: 1445-1457.
11. **Elzora M.V., Murgue A., Rico H., Miragall F., Sentandreu R.** 1987. Formation of a new cell wall by protoplasts of *Candida albicans*: effect of papulacandin B, tunicamycin and Nikkomycin. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 2315-2325.
12. **Georgopapadakou N. H., Walsh T. J.** 1996. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrob Agents Chemother.* **40**: 279-291.
13. **Goutelle S., Maurin M., Rougier F., Barbaut X., Bourguignon L., Ducher M., Maire P.** 2008. The Hill equation : a review of its capabilities in pharmacological modelling. *Fund & clin pharmacology.* **22**:633-648.
14. **Grover N. D.** 2010. Echinocandins: A ray of hope in antifungal drug therapy. *Indian J Pharmacol.* **42**: 9-11.
15. **Latge J. P.** 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol.* **66**: 279-290.
16. **Lee S.** 2010. Drug interaction: focusing on response surface models. *Korean J Anesthesiol.* **58**: 421-434.
17. **Leroux P.** 2003. Modes of action of agrochemicals against plant pathogenic organisms. *C R Biol.* **326**:9-21.
18. **Martínez-Rocha A. L., Roncero M. I. G., López-Ramírez A., Mariné M., Guarro J., Martínez-Cadena G., Di Pietro A.** 2008. Rho1 has distinct functions in morphogenesis, cell wall biosynthesis and virulence of *Fusarium oxysporum*. *Cell Microbiol.* **10**: 1339-1351.
19. **McCarthy P. J., Troke P. F., Gull K.** 1985. Mechanism of action of Nikkomycin and the peptide transport system of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol.* **131**: 775-780.
20. **Meletiadis J., Pournaras S., Roilides E., Walsh T. J.** 2010. Defining fractional inhibitory concentration index cutoffs for additive interactions based on self-drug additive combinations, Monte Carlo simulation analysis, and in vitro-in vivo correlation data for antifungal drug combinations against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**: 602-609.
21. **Perea S., Gonzalez G., Fothergill A. W., Kirkpatrick W. R., Rinaldi M. G., Patterson T. F.** 2002. In vitro interaction of Caspofungin acetate with voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus spp.* *Antimicrob Agents Chemother.* **46**: 3039-3041.
22. **Quidde, T., Buttner, P. and Tudzynski, P.** 1999. Evidence for three different specific saponin-detoxifying activities in *Botrytis cinerea* and cloning and functional analysis of a gene coding for a putative avenacinase. *Eur. J. Plant Pathol.* **105**: 273–283.

23. **Stone E. A., Fung H. B., Kirschenbaum H. L.** 2002. Caspofungin: an echinocandin antifungal agent. *Clin Ther.* **24**: 351-77.
24. **Tammes P. M. L.** 1964. Isoboles, a graphic representation of synergism in pesticides. *Netherland journal of plant pathology.* **70**: 73-80.
25. **Tariq V. N., Devlin P. L.** 1995. Sensitivity of fungi to Nikkomycin Z. *Fungal Genet Biol.* **20**: 4-11.
26. **Van Kan J. A. L.** 2006. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in plant science.* **11**: 247-253.
27. **Verwer P. E. B., van Duijn M. L., Tvakol M., Bakker-woudenberg I. A. J M., van de sande W. W. J.** 2012. Reshuffling of *Aspergillus fumigatus* cell wall components chitin and β -glucan under the influence of Caspofungin or Nikkomycin Z alone or in combination. *Antimicrob Agents Chemother.* **56**: 1595-1598.
28. **Yamaguchi H., Hiratani T., Iwata K., Yamamoto Y.** 1982. Studies on the mechanism of antifungal action of aculeacin A. *J Antibiot (Tokyo).* **35**: 210-219.
29. **Zhu W., Gooday G. W.** 1992. Effects of Nikkomycin and echinocandin on differentiated and undifferentiated mycelia of *Botrytis cinerea* and *Mucor rouxii*. *Mycol Res.* **96**: 371-377.

Chapitre 2: analyse fonctionnelle de la réponse transcriptomique après traitements par des inhibiteurs de paroi.

(Supplementary data on CD)

Transcriptomic analyses of the plant-pathogen fungus *B. cinerea* responses to cell wall inhibitors

Emmanuelle GALLAND^{1,2}, Catherine SIRVEN¹, Christine RASCLE², Stephane Peyrard¹, Stephanie GAMET¹, Nathalie POUSSEREAU², Valerie TOQUIN¹, Roland BEFFA³, Mathias CHOQUER².

- 1- BAYER SAS, Bayer CropScience, La Dargoire research center, 14 impasse Pierre Baizet BP 99163, 69263 LYON cedex 09.
- 2- Université Lyon 1, Université de Lyon, CNRS, Bayer, UMR CNRS 5240, 10 rue Raphaël Dubois, 69622 Villeurbanne, France.
- 3- BAYER CropScience AG, Building H872, industriepark Höchst, D-65926 FRANKFURT/MAIN, Germany.β

ABSTRACT:

This study reports the transcriptomic analysis of *Botrytis cinerea* exposed to fungal cell wall inhibitors: Nikkomycin Z, and Caspofungin, alone or in combination, targeting respectively the biosynthesis of chitin and β -(1,3)-glucan. The sublethal drug concentrations allowed *Botrytis cinerea* to adapt to these stress conditions and continue to grow slowly (20% of the non-treated control). By comparing the expression profile between Caspofungin treated and not treated 48hpi mycelium, we identified 356 responsive genes out of the 14250 present on the Nimblegen chips. Among them, 167 were upregulated and 189 were downregulated after Caspofungin treatment, mainly predicted to oxidoreductase/ Dehydrogenase, Carbohydrate metabolism and Transport. Nikkomycin Z regulated the expression of 294 genes. Among them, 233 showed an increase expression and 51 showed a decrease of expression. The combined treatment induces a higher transcriptomic response since the expression of 1150 genes is altered; 853 are upregulated whereas 297 are downregulated. Globally, the results show an upregulated expression of the chitin synthase family and a regulation of two new glycosyltransferase type II genes, homologous to the bacterial curdlan synthase. In addition, several GPI anchored protein transcripts are overrepresented in the genes regulated by the Caspofungin and the combined treatments. All signaling pathways implicated in cell wall maintenance are not significantly altered.

INTRODUCTION:

Botrytis cinerea is a phytopathogenic filamentous fungus belonging to the Ascomycetes (Berbee, 2001; Choquer *et al*, 2007; Anselem *et al*, 2011). It is responsible of the grey mould disease on more than two hundred species of dicotyledonous plants, most of them being economically important, like grape. This fungus causes up to 20% of crop losses worldwide, corresponding to financial losses from 10 to 100 billions euros per year. Control of this fungus requires the use of fungicides and modification of cultural practices. Despite the efficacy of anti-*Botrytis* treatments, the emergence of resistant strains requests to search for new antifungal compounds with novel modes of action (Anselem *et al*, 2011).

The fungal cell wall represents a promising target. This structure is essential during different stages of the development of the fungus like spore germination, mycelial growth and new spore formation (Latgé, 1999). Moreover, it is characterized by a specific composition (Aimanianda and Latgé, 2010). Fungal cell wall is composed by polysaccharide polymers such as chitin, β -(1,3)-glucan, or alpha-(1,2)-mannan (Latgé, 2007). Most of the fungal cell wall components are not found either in humans, animals or in host plants (Aimanianda and Latgé, 2010) and this offers the opportunity to develop specific antifungal compounds inhibiting specifically the fungal cell wall

biosynthesis. One of these components is chitin, a linear homopolymer of β -(1-4)-linked N-acetyl-glucosamine, represents about 2% of the dry weight of the *S. cerevisiae* cell wall and up to 60% of the cell wall content in filamentous fungi (Ruiz-Herrera, 1992). Chitin is an essential element for the rigidity of the cell wall. Chitin biosynthesis is carried out by membrane type II glycosyltransferases called chitin synthases (Choquer *et al*, 2004) and takes place in two steps, a polymerization by transfer of N-acetylglucosamine and the carbohydrate chains assembly to form the chitin polymer. The number of chitin synthases differs in all fungi species. Based on blast analysis of amino acid sequences, seven classes of chitin synthases divided into three groups have been described. The multiplicity of chitin synthase genes is fundamental for the process of septation and growth of fungal hyphae (Roncero, 2002; Ruiz-Herrera *et al*, 2002). The study of the phenotype of chitin synthase mutants in yeast has assigned one or more roles to these genes (Munro *et al*, 2001; Osmond *et al*, 1999). However, in filamentous fungi the role of each chitin synthase is more complex. In *B. cinerea*, mutagenesis of some chitin synthases was developed to unveil their function. Single mutants of classes 1, 3 and 4 genes were generated (Soulie *et al*, 2003; Soulie *et al*, 2006, Choquer *et al*, 2004, Arbelet *et al*, 2010). The class I mutant shows a decrease of 30% of the chitin content and a reduced virulence on *Vitis vinifera* (Soulie *et al*, 2003). The class 3a mutant is characterized

by hyperbranched mycelia counterbalancing a defect of radial growth, and a severely impaired pathogenicity. A measurement of cell wall compounds indicates a decrease of 33% chitin content in the mutant suggesting a weakening of the cell wall. (Soulie *et al*, 2006). It has been also shown that the mutant Δ chs3a in *B. cinerea* induces an accumulation of phytoalexins on the site of infection (Arbelet *et al*, 2010). The class IV mutant shows no difference in growth, sporulation, or chitin content. However, it is characterized by a delay in the early stages of infection on three hosts (grape, *Arabidopsis* and bean). Chitin produced by the activity of class IV therefore should contribute to stiffen the wall of the fungus and thus facilitate its penetration (Choquer *et al*, 2004).

The second important compounds of the cell wall are β -(1,3) glucans, which are linear polymers of β -(1,3)-glucose with some β -(1,6) branching. β -(1,3)-glucans are responsible of the cell wall elasticity (Abott *et al*, 2009). They can be covalently linked to the chitin (Lesage and Bussey, 2006). The synthesis reaction of β -(1,3)-glucan involves the transfer of a glucose unit in a polymer chain and their extrusion through the plasma membrane; it is insured by a plasma membrane complex named β -(1,3)-glucan synthase (Shematek *et al.*, 1980 ; Notario *et al.*, 1982; Douglas, 2001). As described in *Aspergillus* this enzyme contains two subunits, a putative catalytic subunit Fks1, and a regulatory subunit, Rho1

GTPase (qadota *et al*, 1996). Fks1 consists in a transmembrane protein of 200 kDa (Abott *et al*, 2009, Douglas, 2001). In the periplasm, neosynthesized β -(1,3)-glucans can be modified and associated with other cell wall polymers, in particular chitin (Latgé, 2007). Similarly to chitin synthases, the number of genes encoding Fks varies among species. Three homologous genes have been identified in the yeast genomes (Douglas *et al*, 1997; Ishihara *et al.*, 2007; Mio *et al*, 1997). Unlike yeast, only one *FKS1* ortholog has been identified in filamentous fungi (Tentler *et al*, 1997; Kellner *et al*, 2005; Ha *et al*, 2006; Young *et al*, 2011; Firon *et al*, 2002). Yeast Fks1 typical domain GT2 signature is not present in FKSs protein orthologs identified in filamentous fungi. For this reason, the CAZY classification created a new family of glycosyltransferase, the GT48 family which contains the β -(1,3)-glucan synthases in those fungi (Abott *et al*, 2009). So far the regulatory subunit, Rho1 GTPase is encoded by one gene in filamentous fungi and yeast.

Fungi are able to adapt to environmental changes. The main response to cell wall damage observed in several fungi, like *Aspergillus niger*, *Candida albicans* or *Fusarium oxysporum*, is the overexpression of genes involved in the chitin metabolism (Ram *et al*, 2009; Martinez-Rocha *et al*, 2008; Walker *et al*, 2008). But other answers as overexpression of alpha-(1,3)-glucan synthase can occur as described in *A. fumigatus*

(Aimanianda and Latgé, 2010). Three signaling pathway involved in the maintenance and repair of the cell wall and cellular integrity have been described, 1) the cell wall integrity signal pathway (Levin, 2005), 2) the calcineurin (Schumacher *et al*, 2008) and 3) HOG (high osmolarity glycerol) signal pathways (Liu *et al*, 2008). The first signal pathway coordinates the response of the fungal cell to various environmental signals such as low osmolarity, high temperature and certain nutritional deficiencies (Garcia *et al*, 2004). The calcineurin pathway is Ca^{2+} dependant, and is involved in the response to various stress like high temperature, high concentration of ions, cell wall stress and exposure to sex pheromones (Harren *et al*, 2012; Juvvadi *et al*, 2003). In *S. cerevisiae*, the HOG signal pathway is so far the best characterized pathway in fungi, and controls the adaptation to osmotic variations but also the response to oxidative stress, or other cellular stress in regulating cell wall composition (Hohmann, 2002). In *B. cinerea*, the HOG pathway is involved in adaptation to hyperosmolarity but also in pathogenicity and sporulation (Segmuller *et al*, 2007; Liu *et al*, 2008)

Several inhibitors of fungal cell wall synthesis and function have been described, e.g. Congo Red, Calcofluor, pradimicin, echinocandins, Nikkomycin Z, or polyoxin D. Nikkomycin Z or polyoxin D specifically inhibit chitin

biosynthesis and so far only D Polyoxin was marketed for agronomic uses to control *Rhizoctonias*. Nikkomycin Z was found to be a competitive inhibitor of fungal chitin synthases due to its structural similarity with the enzyme substrate N-acetylglucosamine (Becker *et al*, 1983; Bormann *et al*, 1996) with a selective toxicity against fungal chitin synthases (Tariq and Devlin, 1996). In *B. cinerea*, treatment with Nikkomycin Z induces swelling of hyphae (Zhu *et al*, 1992). The echinocandins are a group of semi-synthetic cyclic lipopeptides with a side chain N-acyl lipid which specifically inhibit the synthesis of β -(1,3)-glucan. This family includes, among other compounds, Micafungin, Anidulafungin and Caspofungin (Onishi *et al*, 2000). These three molecules are used for the medical treatment of candidiasis and aspergillosis (Bal *et al*, 2010; Denning *et al*, 2003; Kaneko *et al*, 2010; Saliba *et al*, 2010). Caspofungin is a lipopeptide produced from the fermentation of a metabolite of the fungus *Glarea Lozoyensis*. Caspofungin induces the alteration of the fungal cell wall, resulting in a loss of its mechanical properties (Stone *et al*, 2002; Letscher-Bru *et al*, 2002; Letscher-Bru *et al*, 2003; Deresinski *et al*, 2003; Cornelly *et al*, 2002).

When the synthesis of β -(1,3)-glucans was inhibited it was observed that the chitin synthesis was enhanced and vice versa (Martinez-Rocha *et al*, 2008; Elzora *et al*, 1987). This mechanism(s) of compensation

induced in response to cell wall damage lead to a modification in the cell wall polysaccharides ratio, in particular with a significant increase in the amount of chitin (Popolo et al, 1997; Garcia-Rodriguez et al, 2000b, Dallies et al, 1998). These responses are mainly controlled by the cell wall integrity pathway but also by the calcineurin pathway (Suresh et al, 1997; Aimanianda and Latgé, 2010). These phenomena of compensation has led to the development of a new concept of antifungal treatments based on the combination of two inhibitors acting in synergy with different modes of action on the cell wall synthesis This strategy has proven to be effective as medical treatments (Chiou et al, 2001). Recently, for the first time, a synergistic effect between Caspofungin and Nikkomycin Z against a phytopathogenic fungus, *B. cinerea*, was described (Galland et al, 2013).

This work is aiming to study the modification of gene expression in *B. cinerea* by treatments with Nikkomycin Z and Caspofungin alone or in combination. A transcriptomic analysis has allowed the characterization of an unique set of genes showing modification of expression only with the combined treatment. These data will be discussed related to the compensation mechanism(s) occurring in *B. cinerea* and the potential targets to develop novel antifungal approaches to protect plants against fungal diseases.

MATERIALS AND METHODS

Antifungal agents

Caspofungin and Nikkomycin Z were obtained from SIGMA as powder. Stock solutions of various concentrations (2000µg/ml to 6µg/ml) were made in dimethylsulfoxide (DMSO)

***B. cinerea* strain and media**

The *B. cinerea* strain BO5.10, isolated from grape, was studied. It is maintained on malt agar medium. (glucose 5g/L, malt 20g/L, tryptone 1g/L, Casein acid hydrolysate 1g/L, Yeast extract 1g/L, agar 16g/L) at 21°C black light under a photoperiod of 16 h darkness and 8 h light.

The DNA chips were made using the genome of two strains of *B. cinerea*, the BO5.10 strain and the T4 strain (3 probes per gene) T4 is an isolate from tomato plants grown in a glasshouse (Levis *et al.*, 1997).

The medium used for fungal growth in the presence of antifungal compounds was a nitrate minimal medium (glucose 5.5mM, NaNO₃ 23mM, KH₂PO₄ 14mM, MgSO₄ 7H₂O 2mM, CaCl₂ 2H₂O 7mM, FeSO₄ 7H₂O 15µM) supplemented with thiamine/biotine at 2.96/0.02 mol per liter.

Drug exposure for the microarray experiment

Conidial suspensions were prepared in the nitrate minimal medium. In order to obtain a final inoculum concentration of 10⁵ conidia/ml and a final DMSO concentration of 1% were used (at this concentration, DMSO has a few

effect on the fungal growth), 180µl of inoculum were dispensed in each well of 96-well plates (Greiner). The plates were incubated at 21°C and after 48 hours, the antifungal agents were added (Caspofungin 1µg/ml, Nikkomycin Z 10µg/ml and for the synergy: Caspofungin 0.3µg/ml and Nikkomycin Z 1µg/ml). After additional 3 hours of cultivation, all of the broth culture was quickly harvested with a pipette, and mycelial samples were immediately frozen using liquid nitrogen and then lyophilized. In addition, control plates were incubated for 6 days again to control the inhibition rate.

IC80 determination

To ensure, reproducible results, 80% inhibitory concentrations (IC80s) were determined for the three treatments by inhibitors. To determine the inhibitory effect of the antifungal compounds, the fungal dry weight was measured after each treatment and compared with that of the non-treated control. The doses of inhibitors used, are determined with the experiments described in Galland *et al*, 2013.

RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted with the RNA plant midi kit (from Quiagen) according to the manufacturer's instructions. DNA contaminations were removed with the DNase 1 kit (Quiagen) according to the manufacturer's instructions. The concentration and purity of RNA extracts were determined

by spectrophotometry using a nanodrop. For microarray analysis, the RNA quality was verified using an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent technologies). Total RNA (10µg) was used to synthesize the first strand cDNA using the superscript III reverse transcriptase kit (Invitrogen) with a 1:1 mixture of OligodT and random hexamer primers following the kit's technical notice.

Microarray analysis

The microarray analysis was performed using a Nimblegen *B. cinerea* chip (Roche Nimblegen). This array was based on the 10X *B. cinerea* T4 strain and the BO5.10 strain genome assembly produced by the Broad Institute and the URGI (INRA) and the Genoscope (Anselem *et al*, 2011). A total of 24000 transcripts were analyzed with three probes per transcripts (one replicate per probe). RNA samples for hybridization were extracted from non-treated control or mycelium treated during 48 hours with Caspofungin, Nikkomycin Z alone or together at using IC80 concentrations. Three independent biological replicates were used. cDNA labeled with cyanine 3 (cy3) was produced from total RNA (1µg labeled from 10µg of total RNA) and hybridized as indicated in the Nimblegen array user guide. The array was scanned using the Agilent Microarray scanner and images were analyzed with the Nimblegen software (Roche Nimblegen). The data analysis was made with the

Genedata software (www.genedata.com). Fluorescence data were extracted with the quantile normalization, Student's t test and statistical analysis of microarray method (two class unpaired method) (Tusher et al, 2001) were used to identify differentially expressed genes (fold change >2, p-value < 0.05).

Gene Ontology and Functionnal annotation

B. cinerea predicted proteins sequences (http://www.broadinstitute.org/annotation/nome/botrytis_cinerea/ and <http://urgi-versailles.fr>) were used for blastP searches of the GO database with a cutoff e-value of E10-4. BlastP searches of Uniprot and NCBI databases (blast.ncbi.nlm.nih.gov/) were performed with a cutoff e-value of 10e-30. Identification of functional domains in *B.*

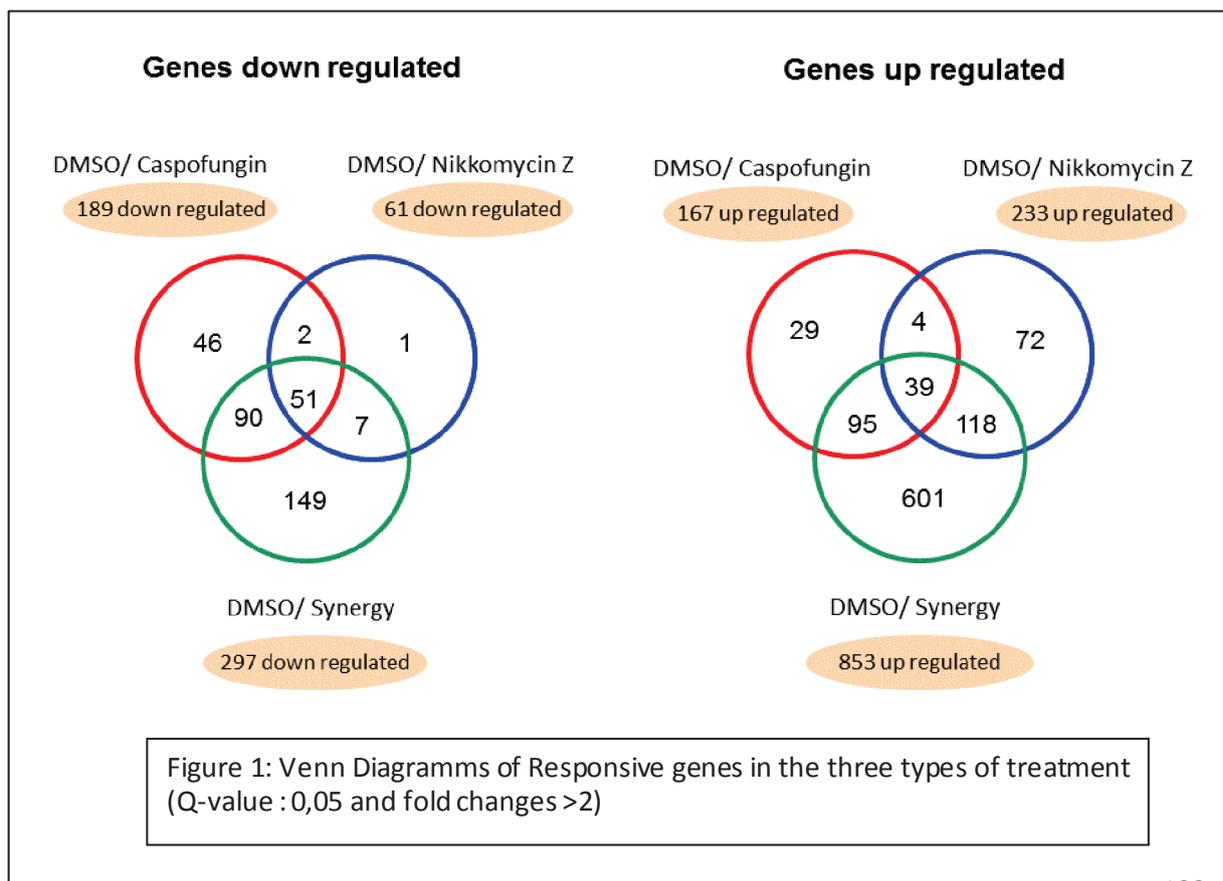
cinerea predicted proteins was performed using pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>), transmembrane helix domain: TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

A manual curation was performed for the final assignment of functional categories. Search of key genes involved in cell wall metabolism was particularly carried out and analyzed.

RESULTS

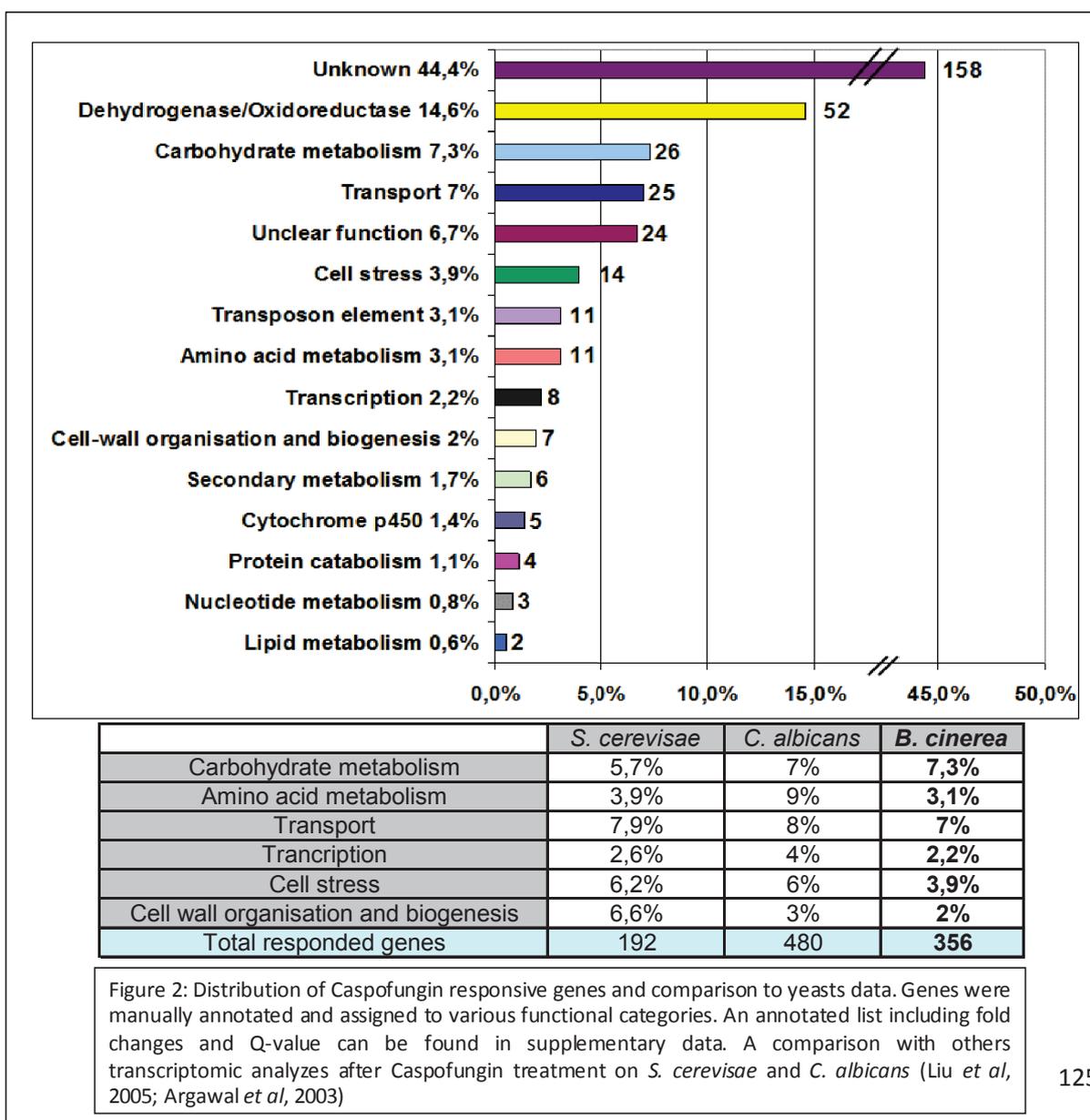
Global gene expression responses to 1µg/ml of Caspofungin (IC80)

A 48 hours mycelium was exposed to Caspofungin at IC80 during 3 hours and then collected to analyze changes in gene expression. Between the non-treated control and the cultures treated 3 hours with 1µg/ml of Caspofungin, a total of 356 genes were



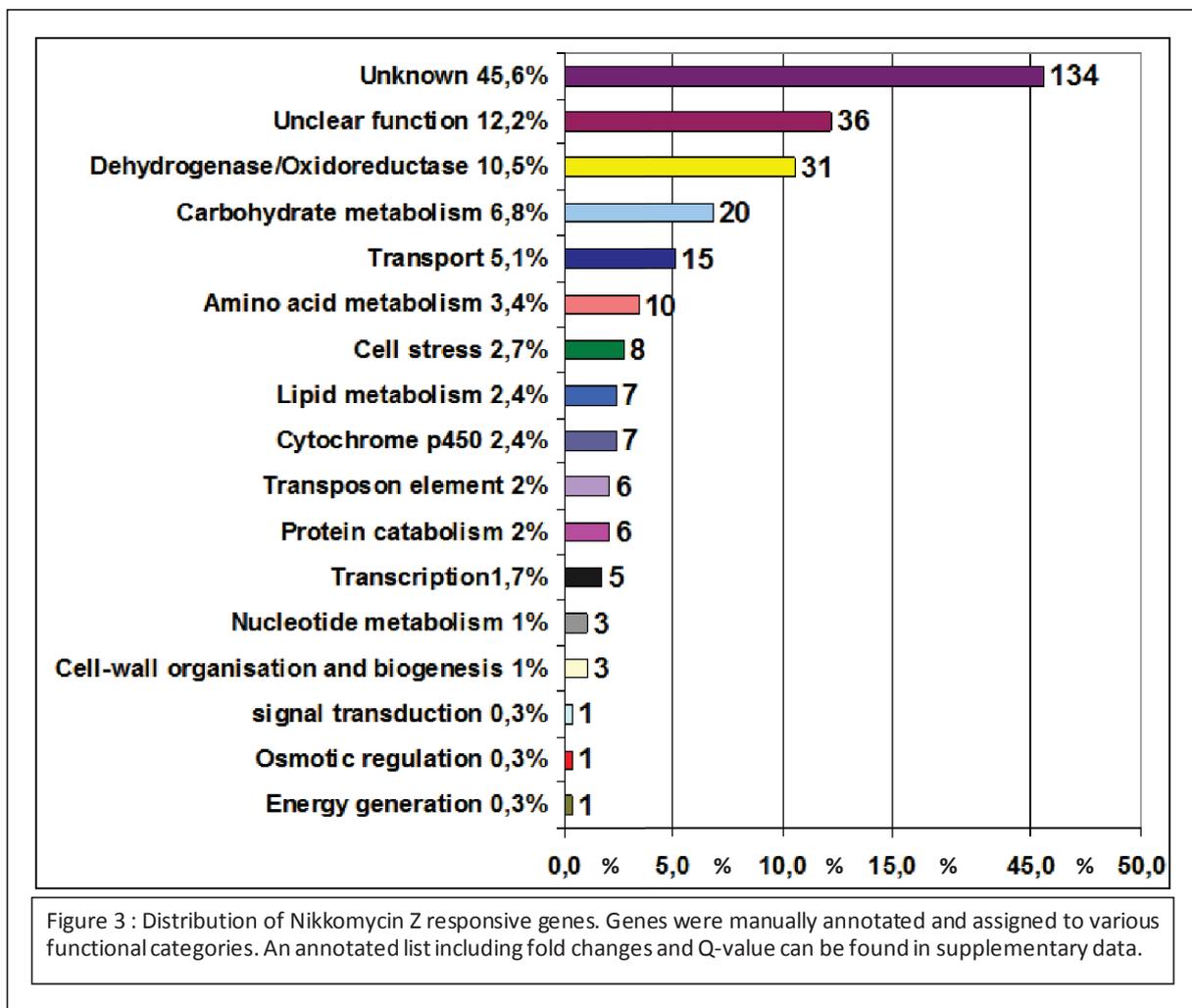
found to be differentially expressed. Of these, 167 genes showed an enhanced expression and 189 showed a decreased expression (Figure 1). These values suggest that 2% of *B. cinerea* genes are differentially expressed under this condition. The distribution and biological role of Caspofungin responsive genes are shown in Table 1 and 2 (supplementary data). The category of genes with the largest number of responses was the unknown function 44.4%. We can also notice that the number of genes classified in the category “dehydrogenase and

oxidoreductase” was also important since approximately 14% of the responsive genes could be classified in this functional category. Considering the mode of action of the Caspofungin, we observed that 7.3% of the responsive genes belongs to the carbohydrate metabolism, 7% to transport and 2% to cell wall organization and biogenesis (Figure 2). In these different categories, genes coding for several glycosylhydrolases (BofuT4_P043000, BofuT4_P078070, BofuT4_P089070, BofuT4_P094200, BofuT4_P109230, BofuT4_P061870, BofuT4_P089000,



BofuT4_P132940, BofuT4_P152970,
 BofuT4_P087400, BofuT4_P064400,
 BofuT4_P128360) chitinase
 (BofuT4_P114960), glucanase
 (BofuT4_P061780), mannosidase
 (BofuT4_P066930) and a chitin synthase
 (BofuT4_P160830) can be found. Among
 them, 7 glycosyl hydrolases (BofuT4_P061870,
 BofuT4_P089000, BofuT4_P132940,
 BofuT4_P152970, BofuT4_P087400,
 BofuT4_P064400, BofuT4_P128360) and the
 chitin synthase (BofuT4_P160830) were
 overexpressed. Moreover, 8 MFS transporters
 (BofuT4_P144220, BC1G_13810,
 BofuT4_P060160, BofuT4_P063830,
 BofuT4_P080700, BofuT4_P117870,

BofuT4_P132000, BofuT4_P156960) and 1
 ABC transporter (BofuT4_P089530) were
 affected in their expression by the
 Caspofungin treatment. Among them, 2 MFS
 transporters (BofuT4_P144220, BC1G_13810)
 and the ABC transporter (BofuT4_P089530)
 were overexpressed. Finally, the functional
 categories of genes identified after
 Caspofungin treatment are similar to those
 observed in other fungi (like *A. niger*, *S.*
cerevisiae, *C. albicans*) treated with the same
 compound (Meyer et al, 2007; Liu et al, 2005;
 Argawal et al, 2003). (i.e. *Aspergillus...*).



Global gene expression responses to 10µg/ml of Nikkomycin Z

The same approach was conducted with an exposure of the fungus to Nikkomycin. A 48 hours mycelium was treated with Nikkomycin Z at IC80, in order to study changes in gene expression. A total of 294 genes were found to be differentially expressed after exposure to 10µg/ml of Nikkomycin Z for 48 hours (IC80). Of these, 233 showed an enhanced expression and 61 showed a decreased expression (Figure 1). The distribution and biological role of Nikkomycin Z responsive genes are showed in Table 3 and 4 (Supplementary data). As previously described with Caspofungin treatment, the category of genes with the largest number of responses was the unknown function 45.6%. Moreover, the particular interesting categories of responsive genes are similar to those observed after the treatment with Caspofungin, *i.e.* carbohydrate metabolism 5.1%, transport 6.1% and cell wall organization and biogenesis 1% (Figure 3). This treatment induced a transcriptomic response in glycosyltransferase genes (BofuT4_P008230, BofuT4_P030230, BofuT4_P041780, BofuT4_P054030) mannosyltransferases (BofuT4_P035360, BofuT4_P041770), glycosylhydrolases (BofuT4_P064400, BofuT4_P089000, BofuT4_P094200) and glucanase (BofuT4_P025430). Among them, the 4 glycosyltransferases (BofuT4_P008230, BofuT4_P030230, BofuT4_P041780,

BofuT4_P054030), the 2 mannosyltransferases (BofuT4_P035360, BofuT4_P041770) and a chitin synthase (BofuT4_P160830) were up regulated.

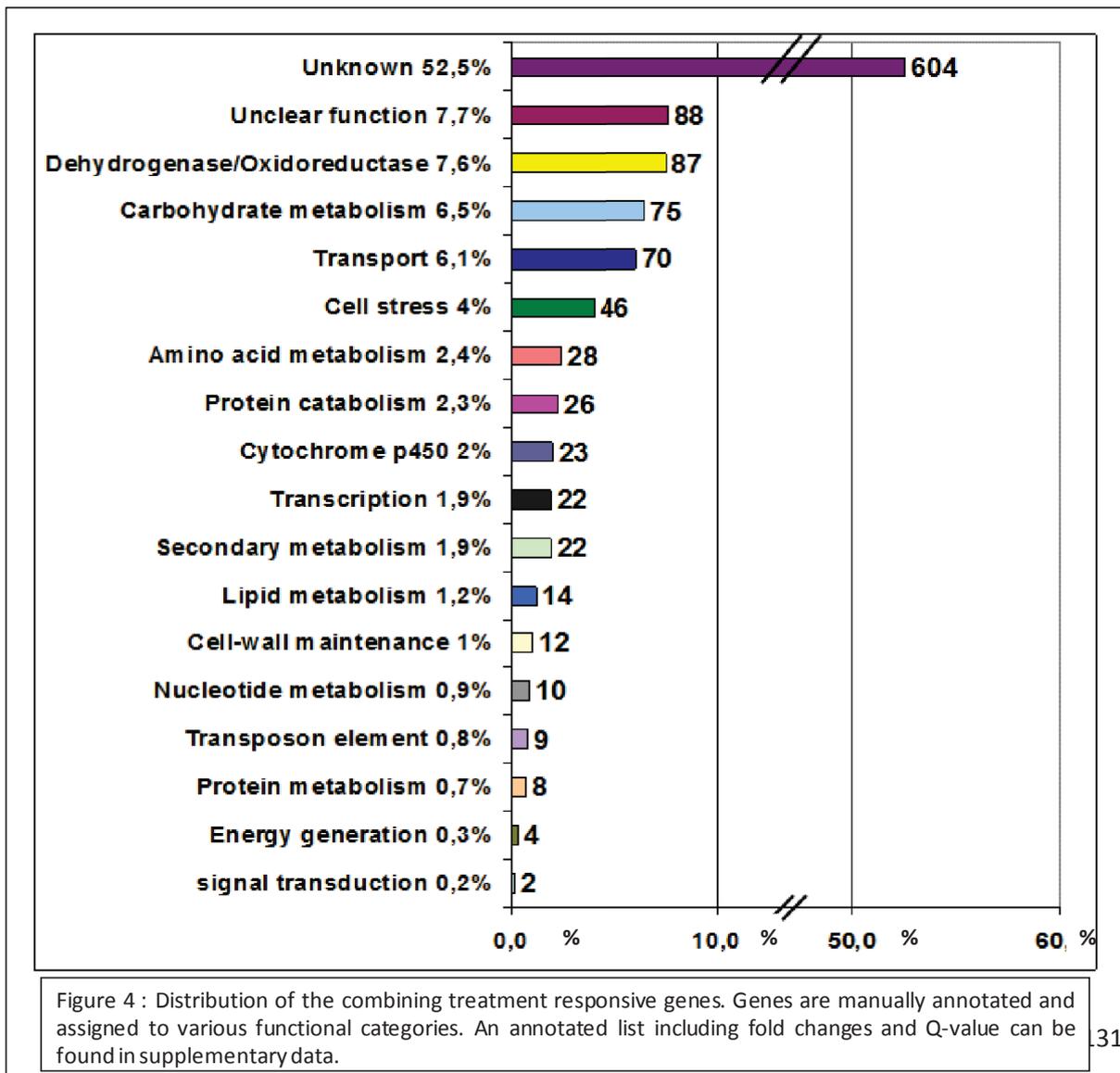
Moreover, after Nikkomycin Z treatment induce a response in 7 MFS transporters (BC1G_13810, BofuT4_P001560, BofuT4_P023870, BofuT4_P036430, BofuT4_P070000, BofuT4_P112860, BofuT4_P156960) and 1 ABC transporter (BC1G_16408). Most of them are different from the transporters responding to the Caspofungin treatment. Among them, 6 MFS transporters (BC1G_13810, BofuT4_P001560, BofuT4_P023870, BofuT4_P036430, BofuT4_P070000, BofuT4_P112860) and the ABC transporter (BC1G_16408) were overexpressed.

Global gene expression responses to 0,3µg/ml of Caspofungin and 1 µg/ml of Nikkomycin Z

In order to analyze the effect of the combination of the two fungicides on *B.cinerea*, a 48 hours mycelium was treated with the combination of Caspofungin and Nikkomycin Z at IC80. A total of 1150 genes were found to be differentially expressed after an exposure to a combination of 0.3 µg/ml of Caspofungin and 1µg/ml of Nikkomycin Z inducing the same growth inhibition (80%), than each compound alone. Of these, 853 showed an enhanced expression and 297 showed a decreased expression (Figure 1). The distribution and biological role of the

responsive genes are shown in Table 5 and 6 (Supplementary data). The category of genes with the largest number of responses was the unknown function 52.5%. However, the particular interesting categories of responsive genes are carbohydrate metabolism 6.5%, Transport 6.1% and cell wall organization and biogenesis 1% (Figure 4). The genes responding to the combined treatment from these important categories are coding for glycosyltransferases (BofuT4_P008230, BofuT4_P016450, BofuT4_P030230, BofuT4_P041780, BofuT4_P105980, BofuT4_P127760)

glucosidases (BofuT4_P156750, BofuT4_P089070, BofuT4_P087400, BofuT4_P128360, glycosylhydrolases (BofuT4_P001890, BofuT4_P043000, BofuT4_P061870, BofuT4_P109230, BofuT4_P064400), glucanases (BofuT4_P000920, BofuT4_P124780, BofuT4_P025430, BofuT4_P061780), chitin deacetylase (BofuT4_P018380), mannosyltransferases (BofuT4_P068140,



BofuT4_P041770, BofuT4_P035360) and 3 chitin synthases (BC1G_15936, BCexp12_CHS1, BofuT4_P160830). Among them, 7 glycosyltransferases, 4 glycosylhydrolases, the 3 mannosyltransferases and the three chitin synthases were up regulated.

Moreover, this type of treatment induces a transcriptomic response in 18 MFS transporters (BofuT4_P002070, BofuT4_P060160, BofuT4_P063830, BofuT4_P080700, BofuT4_P090540, BofuT4_P130020, BofuT4_P132000, BofuT4_P156960, BC1G_13810, BC1G_16118, BofuT4_P016750, BofuT4_P018960, BofuT4_P023870, BofuT4_P024110, BofuT4_P100350, BofuT4_P118310, BofuT4_P144220, BofuT4_P163430) and 2 ABC transporters (BofuT4_P126520, BofuT4_P052940). Among them, 10 MFS

transporters (BC1G_13810, BC1G_16118, BofuT4_P016750, BofuT4_P018960, BofuT4_P023870, BofuT4_P024110, BofuT4_P100350, BofuT4_P118310, BofuT4_P144220, BofuT4_P163430) and 1 ABC transporter (BofuT4_P126520) were upregulated. We can noticed that 11 MFS transporters (BC1G_16118, BofuT4_P016750, BofuT4_P018960, BofuT4_P024110, BofuT4_P100350, BofuT4_P118310, BofuT4_P163430, BofuT4_P002070, BofuT4_P130020) and the 2 ABC transporters (BofuT4_P126520, BofuT4_P052940) are specific altered in this type of treatment.

Comparison of functional categories of Caspofungin responsive genes with other published transcriptomic data, revealed relatively similar distributions. For example, the proportion of genes involved in transcription was the same between the two

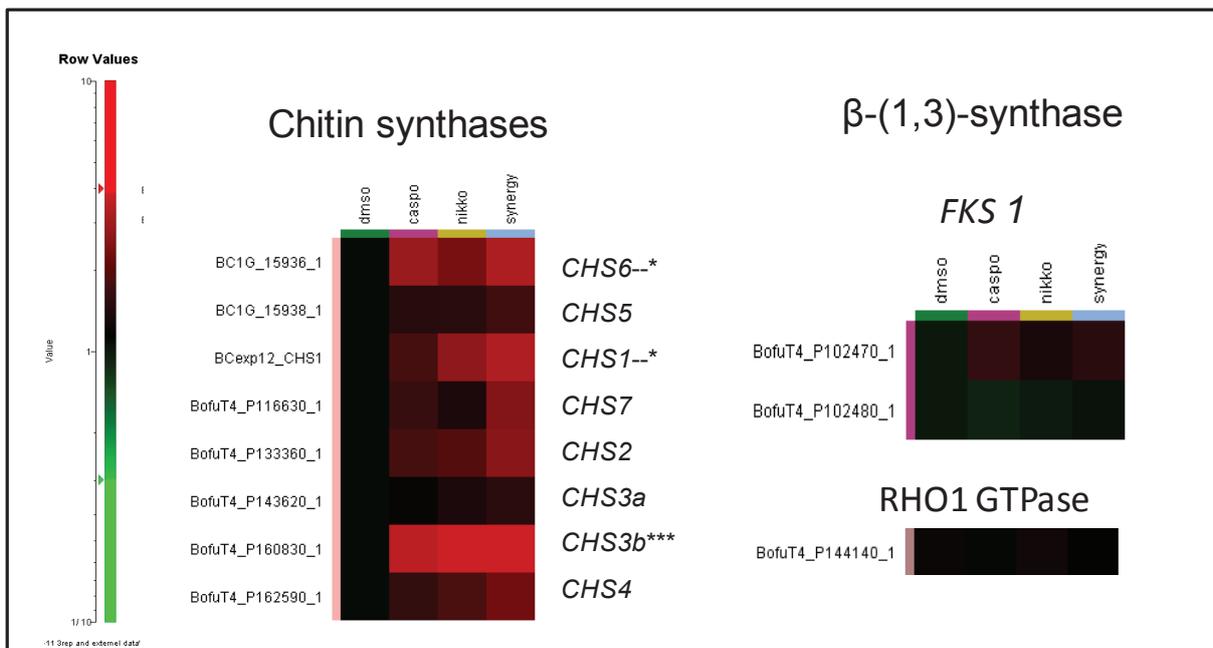


Figure 5 : Expression patterns of genes encoding cell wall metabolism after different cell wall inhibitors treatments at IC80: Caspofungin 1µg/ml, Nikkomycin Z 10µg/ml, combining treatment: Caspofungin 0,3 µg/ml and Nikkomycin Z 1µg/ml, DMSO corresponding to the control untreated). Red boxes corresponding to an overexpression. Black boxes corresponding to no change in gene expression. Green boxes corresponding to a down expression. * corresponding to significant change in gene expression (q-value < 0.05 and ratio > 2)

yeasts *S. cerevisiae*, *C. albicans* and the necrotrophic fungus *B. cinerea*. We can also notice that the proportion of cell wall related genes was about 6.6% in *S. cerevisiae* and 3% in *C. albicans*, compared to 2% in *B. cinerea* (Liu et al, 2005; Argawal et al, 2003; Figure 2).

On the other side, comparison of genes significantly regulated by Caspofungin in *A. niger* (Meyer et al, 2007) with those in *B. cinerea*, exhibited very few genes subjected to the same regulation. In fact, only two mannosyl transferases exhibit the same regulation, the glucan synthase genes are overexpressed in *A. niger*, but an overexpression of the chitin synthase was not found.

Expression profiling of genes involved in cell wall biogenesis and signalling

The analysis of the chitin synthase protein family showed a global overexpression of the related genes. Chitin synthase 3b possessed a significant overexpression (ratio>2, Q-value<0.05) in all three types of treatment (Caspofungin, Nikkomycin Z and the combined treatment of both), while chitin synthases 1 and 6 were significantly overexpressed only during the combined treatment (Figure 5). Surprisingly the study of the expression of FKS1 and RHO1 genes involved in the biosynthesis of β -(1,3)-glucan showed a stable expression under all tested conditions. (Figure 5) Finally, analysis of genes significantly regulated, revealed a new family of genes

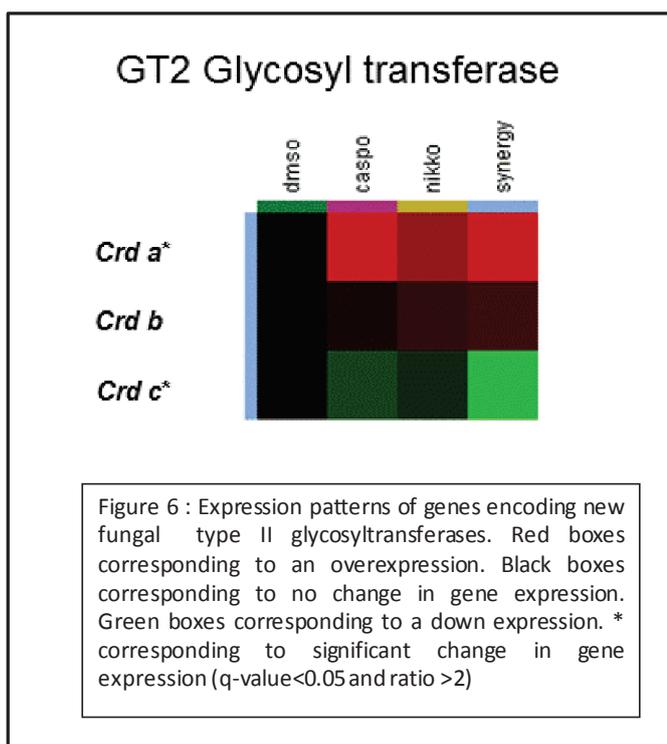
belonging to type 2 glycosyltransferases homologous to the bacterial curdlan synthase. Two of these genes were regulated significantly by cell wall treatments (Figure 6). Indeed, the gene *CRD a* was significantly overexpressed after Caspofungin treatment and combined treatment while the gene *CRD c* was repressed in the presence of the combination of the two inhibitors. The gene *CRD b* didn't seem to be regulated by cell wall treatments (Figure 6).

Analysis of signaling pathways potentially involved in the maintenance and repair of the cell wall was investigated. Indeed, expression of genes belonging the cell wall integrity signal pathway, the calcineurin and HOG pathways was explored. The data we generated revealed that genes of these pathways seemed overexpressed but none is significantly over-expressed.

Finally, we focused on the expression of genes encoding glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins, a diverse class of proteins that are attached to the plasma membrane via a preformed GPI anchor and linked covalently to β -(1,6)-glucan (Plaine *et al*, 2008)

Prediction of GPI-anchored proteins was carried out on the genome of *B. cinerea* using sequence homologies and 138 GPI anchor predicted proteins were found. A Fisher exact test showed an overrepresentation of GPI anchor protein genes after treatment with Caspofungin and more after the combined

treatment (Figure 10). In fact, 24 GPI anchored predicted proteins were found in the response to combining treatment and 10 GPI anchored predicted proteins were found in the response to Caspofungin. These results showed enrichment in GPI anchored proteins, after these two types of treatment (Figure 10). GPI anchor proteins have various functions (glucosidases, proteases, superoxide dismutase ...), but many of them remain unknown. However, the GPI anchor proteins are clearly involved in the structure and in the cell wall remodeling.



DISCUSSION

The aim of this study was to perform a global evaluation of genes that are regulated in response to cell wall damaging compounds using a microarray hybridization approach.

The analysis of global gene expression responding to the three types of cell wall treatments: Caspofungin, Nikkomycin Z and the combination of these two inhibitors, revealed a significant expression of numerous transcripts. The treatment of Caspofungin induced substantially the same number of overexpressed and down-expressed genes, while Nikkomycin Z and combining treatments showed a greater number of genes overexpressed. Considering the same growth inhibition (IC80), the highest number of transcripts with an altered expression (1150) was found after the treatment of inhibitors in combination. In addition, we can notice that the concentration of each compound used in the combined treatment was much lower than when they were applied alone. We can conclude that the synergistic effect observed on the mycelium growth (Galland et al., 2013), can be correlated to the highest number of genes exhibiting an altered expression.

The analyses of the functional classes of the three antifungal treatments responsive genes reveal that, they can be classified into the same functional categories with the same proportions approximately. Moreover, our study shows that

that few responsive genes are cell wall associated genes. The functional categories of genes identified after Caspofungin treatment are similar to those observed in other fungi (like *A. niger*, *S. cerevisiae*, *C. albicans*) treated

with the same compound (Meyer et al, 2007; Liu et al, 2005; Argawal et al, 2003). (i.e. Aspergillus...).

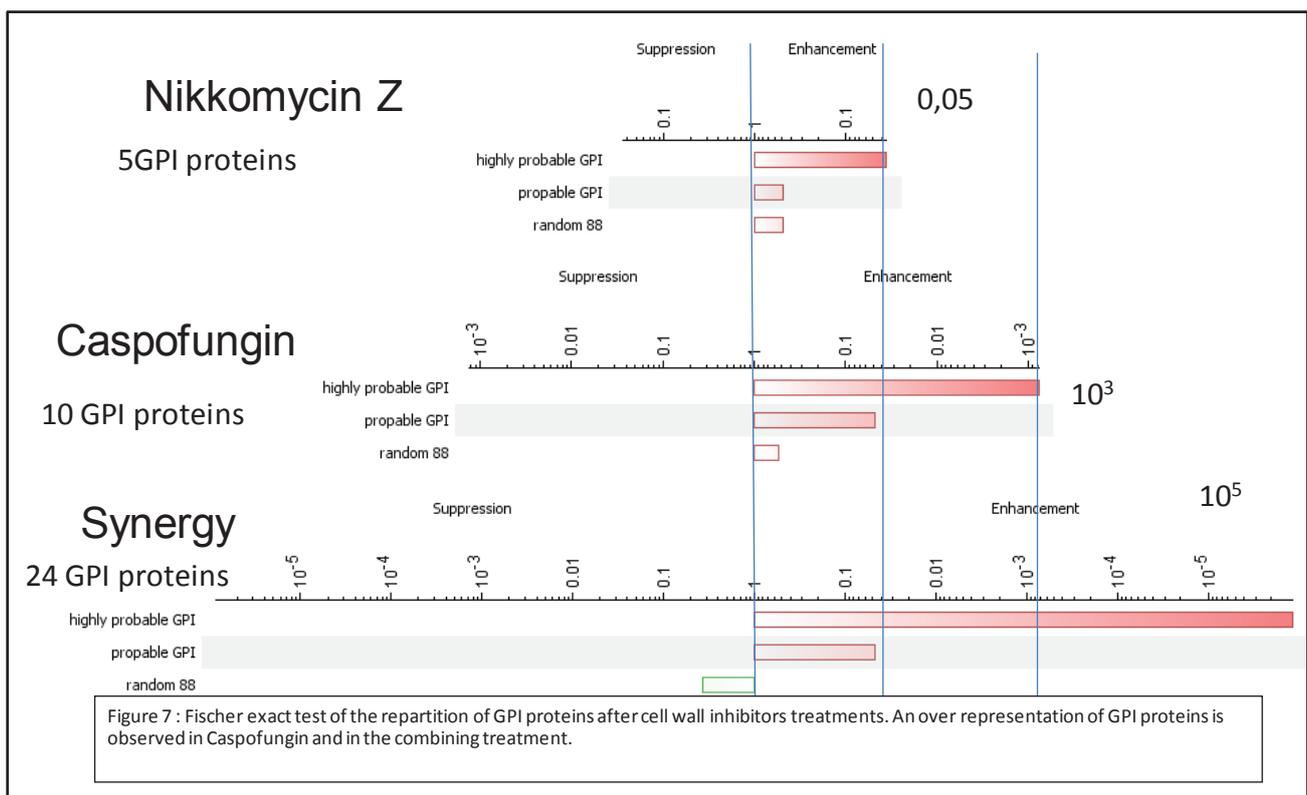
Chitin synthases family genes seem generally overexpressed, suggesting a cell wall compensatory response. Indeed, after Caspofungin treatment, we can suppose that *B. cinerea* presents a compensation to the deficit in β -(1,3)-glucan by an increased synthesis of chitin. Moreover, it has been previously described that Nikkomycin Z does not inhibit all chitin synthases in yeast (Gaughan et al, 1994). Thus, *B. cinerea* tries to compensate the defect in chitin biosynthesis after Nikkomycin Z treatment by increasing the expression, at least at the transcript level of other chitin synthase genes.

On the other hand, the *FKS1* gene encoding the catalytic subunit of β -(1,3)-glucan synthase showed a fairly constant expression

suggesting that it was not regulated by the cell wall inhibitors treatments. This result suggests

that *B. cinerea*, is not able to compensate a deficit of chitin synthesis by an overexpression of β -(1,3)-glucan synthase when a treatment with Nikkomycin Z was applied. However, the analysis of significantly regulated genes induced cell wall treatments highlighted a new family of genes belonging to the type II glycosyltransferase family. These genes (named respectively CRD a, CRDb and CRD c) show homology to the bacterial curdlan synthase, a β -(1,3)-glucan synthase.

The gene CRD a was overexpressed after treatment by Caspofungin and CRD c was repressed during the combined treatment while, the gene CRD b did not seem to be regulated by cell wall inhibitors treatments. The expression of the two genes *CRD a* and *CRD c* was influenced by the cell wall treatments, suggesting a potential role in the



cell wall biogenesis and maintenance in *B. cinerea*. It has been previously described that in *Agrobacterium tumefaciens*, the homologous gene is implicated in the β -(1,3)-glucan biosynthesis (Abott et al, 2009). So, we can suppose that these genes could have the same role in the fungi. This hypothesis has to be validated with new experimentations like gene invalidation and cell wall analysis. At this time, no information has been described.

The study of the signaling pathways involved in cell wall metabolism showed that after different types of treatment, all pathways were not significantly altered. These results suggest that all signaling pathways are involved in maintaining cell wall but no specific way.

The prediction of GPI-anchored proteins and the analysis of their expression revealed that the proportion of these proteins is overrepresented in genes responding to Caspofungin treatment and more in the genes responding to the combined treatment. It has been previously described that they have various functions (glucosidases, proteases, superoxide dismutase ...), but many of them remain unknown (Plaine and Richard, 2007). However, the GPI anchor proteins are clearly involved in the structure and in the cell wall remodeling. We can suggest that the overrepresentation of these proteins may be related to an important alteration of the cell

wall. Indeed, the fungus may seek to compensate for the imbalance induced by the antifungal treatment, increasing the number of GPI anchored proteins or while changing their variety.

In conclusion, an important transcriptomic response is observed in a combining treatment targeting fungal cell wall revealing the impact of these compounds on the viability of the fungal cell and the importance of the cell wall. Some genes specifically induced in the combining treatment have been identified and could be important for fungal cell viability. These genes could be also considered as potential targets for the development of new antifungal molecules. .

Acknowledgement:

This work was supported by Bayer CropScience, Lyon, France and a CIFRE grant n°0923/2009.

References

- Abott D. W., Amanianda V., Bacic A., Boraston A. B., Brown G. D., Brown R. C., Brownfield L., Bulone V., Clarke A. E., Cerenius L., Clavaud C., Doblin M., Epel B. L., Fincher G. B., Gidley M. J., Granum E., Harris P. J., Horst W., Hrmova M., Kawabata S. I., Latge J.-P., Lemmon B. E., Levy A., Myklestad S. M., Newbigin A., Nishinari K., Nogami S., Ohya Y., Read S., Söderhäll K., Somerville S., Stanisich V. A., Stass A., Stone B. A., Voigt C. A., Williams D. L.** 2009. Chemistry, Biochemistry and biology of (1->3)-beta-glucans and related polysaccharides. Academic press.
- Agarwal A. K., Rogers P. D., Baerson S. R., Jacob M. R., Barker K. S., Cleary J. D., Walker L. A., Nagle D. G., Clark A. M.** 2003. Genome-wide expression profiling of the response to polyene, pyrimidine,

azole, and echinocandin antifungal agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 278: 34998-35015.

Aimanianda V., Latgé J.-P. 2010. Problems and hopes in the development of drugs targeting the fungal cell wall. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 8: 359-364.

Arbelet D., Malfatti P., Simond-Côte E., Fontaine T., Desquilbet L., Expert D., Kunz C., Soulié M.-C. 2010. Disruption of the *Bcchs3a* chitin synthase gene in *Botrytis cinerea* is responsible for altered adhesion and overstimulation of host plant immunity. *Mol Plant Microbe Interact*. 23: 1324-1334.

Bal A. M. 2010. The echinocandins: three useful choices or three too many? *Int J Antimicrob Agents*. 35: 13-18.

Becker J. M., Covert N. L., Shenbagamurthi P., Steinfeld A. S., Naider F. 1983. Polyoxin D inhibits growth of zoopathogenic fungi. *Antimicrob Agents Chemother*. 23: 926-929.

Berbee M. L. 2001. The phylogeny of plant and animal pathogens in the Ascomycota. *Physiological and molecular plant pathology*. 59: 165-187.

Bormann C., Möhrle V., Bruntner C. 1996. Cloning and heterologous expression of the entire set of structural genes for nikkomycin synthesis from *Streptomyces tendae* Tü901 in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol*. 178: 1216-1218.

Choquer M., Boccara M., Gonçalves I. R., Soulié M.-C., Vidal-Cros A. 2004. Survey of the *Botrytis cinerea* chitin synthase multigenic family through the analysis of six euascomycetes genomes. *Eur J Biochem*. 271: 2153-2164.

Choquer M., Fournier E., Kunz C., Levis C., Pradier J.-M., Simon A., Viaud M. 2007. *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiol Lett*. 277: 1-10.

Cornely O. A., Schmitz K., Aisenbrey S. 2002. The first echinocandin: caspofungin. *Mycoses*. 45: 56-60.

Dallies N. Francois J., Paquet V. 1998. A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 14: 1297-1306.

Denning D. W. 2003. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet*. 362: 1142-1151.

Deresinski S. C., Stevens D. A. 2003. Caspofungin. *Clin Infect Dis*. 36: 1445-1457.

Douglas C. M. 2001. Fungal beta-1,3-D-glucan synthesis. *Med Mycol*. 39: 55-66.

Douglas C. M., D'Ippolito J. A., Shei G. J., Meinz M., Onishi J., Marrinan J. A., Li W., Abruzzo G. K., Flattery A., Bartizal K., Mitchell A., Kurtz M. B. 1997. Identification of the FKS1 gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3-beta-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*. 41: 2471-2479.

Elzora M. V., Murgue A., Rico H., Miragall F., Sentandreu R. 1987. Formation of a new cell wall by protoplasts of *Candida albicans*: effect of papulacandin B, tunicamycin and nikkomycin. *J. Gen. Microbiol*. 133: 2315-2325.

Firon A., Beauvais A., Latgé J.-P., Couvé E., Grosjean-Cournoyer M.-C., D'Enfert C. 2002. Characterization of essential genes by parasexual genetics in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*: impact of genomic rearrangements associated with electroporation of DNA. *Genetics*. 161: 1077-1087.

Galland E., Genix P., Gamet S., Latorse M.-P., Toquin V., Beffa R., Choquer M. 2013. Synergy Activity of Cell Wall Inhibitors on a Phytopathogenic Fungus *Botrytis cinerea*. Novel Determination Model. Unpublished yet.

Garcia R. Bermejo C., Grau C., Perez R., Rodriguez-Pena J. M., Francois J. et al. 2004. The global transcriptomic response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J Biol Chem*. 279: 15183-15195.

García-Rodríguez L. J., Durán A., Roncero C. 2000. Calcofluor antifungal action depends on chitin and

a functional high-osmolarity glycerol response (HOG) pathway: evidence for a physiological role of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG pathway under noninducing conditions. *J Bacteriol.* 182: 2428-2437.

Gaughran J. P., Lai M. H., Kirsch D. R., Silverman S. J. 1994. Nikkomycin Z is a specific inhibitor of *Saccharomyces cerevisiae* chitin synthase isozyme Chs3 *in vitro* and *in vivo*. *J Bacteriol.* 176: 5857-5860.

Ha Y.-S., Covert S. F., Momany M. 2006. F5FKS1, the 1,3-beta-glucan synthase from the caspofungin-resistant fungus *Fusarium solani*. *Eukaryot Cell.* 5: 1036-1042.

Harren K, Schumacher J., Tudzynski B. 2012. The Ca²⁺/calcineurin-dependent signaling pathway in the gray mold *Botrytis cinerea*: The role of Calcipressin in modulating calcineurin activity. 7: 1-15.

Hohmann S. 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66 : 300-372.

Ishihara S., Hirata A., Nogami S., Beauvais A., Latge J.-P., Ohya Y. 2007. Homologous subunits of 1,3-beta-glucan synthase are important for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell.* 6: 143-156.

Juvvadi P. R., Kuroki Y., Arioka M., Nakajima H., Kitamoto K. 2003. Functionnal analysis of the calcineurin-encoding gene *cnaA* from *Aspergillus oryzae*: Evidencefor its putative role in stress adaptation. *Arch Microbiol.* 179: 416-422.

Kaneko Y., Ohno H., Kohno S., Miyazaki Y. 2010. Micafungin alters the expression of genes related to cell wall integrity in *Candida albicans* biofilms. *Jpn J Infect Dis.* 63: 355-357.

Kellner E. M., Orsborn K. I., Siegel E. M., Mandel M. A., Orbach M. J., Galgiani J. N. 2005. *Coccidioides posadasii* contains a single 1,3-beta-glucan synthase gene that appears to be essential for growth. *Eukaryot Cell.* 4: 111-120.

Latgé J.-P. 1999. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.* 12: 310-350.

Latgé J.-P. 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. 66: 279-290.

Lesage G., Bussey H. 2006. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 70: 317-343.

Letscher-Bru V., Herbrecht R. 2002. La caspofungine, une nouvelle arme dans le traitement des aspergilloses invasives. *journal de mycologie medicale.* 12 : 121-125.

Letscher-Bru V., Herbrecht R. 2003. Caspofungin: the first representative of a new antifungal class. *J Antimicrob Chemother.* 51: 513-521.

Levin D. E. 2005. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 69: 262-91.

Levis C., Giraud T., Dutertre M., Fortini D., Brygoo Y. 1997. Telomeric DNA of *Botrytis cinerea*: a useful tool for strain identification. *FEMS Microbiol Lett.* 157 :267-72.

Liu T. T., Lee R. E. B., Barker K. S., Lee R. E., Wei L., Homayouni R., Rogers P. D. 2005. Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 2226-2236.

Liu W.et al. 2008. The HOG1-like MAPK Sak1 of *Botrytis cinerea* is negatively regulated by the upstream histidine kinase Bos1 and is not involved in dicarboximide and phenylpyrrole resistance. *Fungal Genet Biol.* 45: 1062-1074.

Martínez-Rocha A. L., Roncero M. I. G., López-Ramírez A., Mariné M., Guarro J., Martínez-Cadena G., Di Pietro A. 2008. Rho1 has distinct functions in morphogenesis, cell wall biosynthesis and virulence of *Fusarium oxysporum*. *Cell Microbiol.* 10: 1339-1351.

Meyer V., Damveld R. A., Arentshorst M., Stahl U., van den Hondel C. A. M. J. J., Ram A. F. J. 2007. Survival in the presence of antifungals: genome-wide expression profiling of *Aspergillus niger* in response to sublethal concentrations of

caspofungin and fenpropimorph. *J Biol Chem.* 282: 32935-32948.

Mio T., Adachi-Shimizu M., Tachibana Y., Tabuchi H., Inoue S. B., Yabe T., Yamada-Okabe T., Arisawa M., Watanabe T., Yamada-Okabe H. 1997. Cloning of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* GSC1/FKS1 and its involvement in beta-1,3-glucan synthesis. *J Bacteriol.* 179: 4096-4105.

Munro C. A., Winter K., Buchan A., Henry K., Becker J. M., Brown A. J., Bulawa C. E., Gow N. A. 2001. Chs1 of *Candida albicans* is an essential chitin synthase required for synthesis of the septum and for cell integrity. *Mol Microbiol.* 39: 1414-1426.

Notario V., Kawai H., Cabib E. 1982. Interaction between yeast beta-1,3-glucan synthetase and activating phosphorylated compounds. A kinetic study. *J Biol Chem.* 257: 1902-1905.

Onishi J., Mainz M., Thompson J., Curotto J., Dreikorn S., Rosenbach M., Douglas C., Abruzzo G., Flattery A., Kong L., Cabello A., Vicente F., Pelaez F., Diez M. T., Martin I., Bills G., Giacobbe R., Dombrowski A., Schwartz R., Morris S., Harris G., Tsipouras A., Wilson K., Kurtz M. B. 2000. Discovery of novel antifungal (1,3)-beta-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 44: 368-377.

Osmond B. C., Specht C. A., Robbins P. W. 1999. Chitin synthase III: synthetic lethal mutants and "stress related" chitin synthesis that bypasses the CSD3/CHS6 localization pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 11206-11210.

Plaine A., Walker L., Da Costa G., Mora-Montes H. M., McKinnon A., Gow N. A., Gaillardin C., Munro C. A., Richard M. L. 2008. Functional analysis of *Candida albicans* GPI-anchored proteins: roles in cell wall integrity and caspofungin sensitivity. *Fungal Genet Biol.* 45: 1404-14.

Popolo L., Gilardelli D., Bonfante P., Vai M. 1997. Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the ggp1delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 179: 463-469.

Qadota H., Python C. P., Inoue S. B., Arisawa M., Anraku Y., Zheng Y., Watanabe T., Levin D. E., Ohya Y. 1996. Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science.* 272: 279-281.

Richard M. L., Plaine A. 2007. Comprehensive analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 6: 119-33.

Roncero C. 2002. The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Curr Genet.* 41: 367-378.

Ruiz-Herrera J. 1992. Fungal cell wall: structure, synthesis and assembly. CRC Press, Boca Raton.

Ruiz-Herrera J., Gonzales-Prieto J. M., Ruiz-Medrano R. 2002. Evolution and phylogenetic relationships of chitin synthases from yeasts and fungi. *FEMS Yeast Res.* 1: 247-256.

Saliba F. 2010. L'anidulafugine : etat de la literature. *journal de mycologie medicale.* 20 : 206-211.

Schumacher J., de Larrinoa I. F., Tudzynski B. 2008. Calcineurin-responsive zinc finger transcription factor CRZ1 of *Botrytis cinerea* is required for growth development and full virulence on bean plants. *J Biol Chem.* 283: 584-601.

Segmuller N., Ellendorf U., Tudzynski B., Tudzynski P. 2007. BcSAK1 a stress-activated mitogen-activated protein kinase, is involved in vegetative differentiation and pathogenicity in *Botrytis cinerea*.

Shematek E. M., Braatz J. A., Cabib E. 1980a. Biosynthesis of the Yeast cell wall. I. preparation and properties of beta-1,3-glucan synthetase. *J Biol Chem.* 255: 888-894.

Soulié M-C., Perino C., Piffeteau A., Choquer M., Malfatti P., Cimerman A., Kunz C., Boccara M., Vidal-Cros A. 2006. *Botrytis cinerea* virulence is drastically reduced after disruption of chitin synthase class III gene (Bcchs3a). *Cell Microbiol.* 8: 1310-1321.

- Soulié M.-C., Piffeteau A., Choquer M., Boccara M., Vidal-Cros A.** 2003. Disruption of *Botrytis cinerea* class I chitin synthase gene Bcchs1 results in cell wall weakening and reduced virulence. *Fungal Genet Biol.* 40: 38-46.
- Stone E. A., Fung H. B., Kirschenbaum H. L.** 2002. Caspofungin: an echinocandin antifungal agent. *Clin Ther.* 24: 351-77.
- Suresh K., Subramanyam C.** 1997. A putative role for calmodulin in the activation of *Neurospora crassa* chitin synthase. *FEMS Microbiol Lett.* 150: 95-100.
- Tariq V. N., Devlin P. L.** 1996. Sensitivity of fungi to nikkomycin Z. *Fungal Genet Biol.* 20: 4-11.
- Tentler S., Palas J., Enderlin C., Campbell J., Taft C., Miller T. K., Wood R. L., Selitrennikoff C. P.** 1997. Inhibition of *Neurospora crassa* growth by a glucan synthase-1 antisense construct. *Curr Microbiol.* 34: 303-308.
- Tusher V. G., Tibshirani R., Chu G.** 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci US A.* 98: 5116-21. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 10515.
- Walker L. A., Munro C. A., de Bruijn I., Lenardon M. D., McKinnon A., Gow N. A. R.** 2008. Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. *PLoS Pathog.* 4: e1000040.
- Yang M., Jin K., Xia Y.** 2011. MaFKS, a Beta-1,3-glucan synthase, is involved in cell wall integrity, hyperosmotic pressure tolerance and conidiation in *Metarhizium acridum*. *Curr Genet.* 1: 1-12.
- Zhu W.-Y., Gooday G. W.** 1992. Effects of nikkomycin and echinocandin on differentiated and undifferentiated mycelia of *Botrytis cinerea* and *Mucor rouxii*. *Mycological Research.* 96: 371-377.

Chapitre 3 : Etude de la synthèse des β -(1,3)-glucanes : rôle de Fks1 et des curdlanes synthases like fongiques chez le champignon phytopathogène *Botrytis cinerea*.

I-Introduction

Chez les champignons filamenteux, le polymère de β -(1,3)-glucane est synthétisé par le complexe β -(1,3)-Glucane Synthase(GS) lié à la membrane plasmique et utilisant l'UDP-glucose comme substrat (Douglas et al., 1994). Ce complexe enzymatique relarguerait des chaînes linéaires de β -(1,3)-glucane à travers la membrane plasmique dans l'espace périplasmique. Il se compose d'une sous-unité catalytique (Fks1) et d'une sous-unité régulatrice (Rho1). La sous-unité régulatrice Rho1 est une petite protéine à activité GTPase stimulant la production de β -(1,3)-glucane qui a d'abord été identifiée chez *S. cerevisiae* (Qadota et al., 1996). La délétion d'un gène homologue à *RHO1* chez le champignon filamenteux *Fusarium oxysporum* a démontré son implication dans la composition et l'intégrité de la paroi. En effet, les mutants de ce gène présentent une difficulté à croître, une résistance aux enzymes de dégradation pariétale, une dérégulation des gènes de la biosynthèse pariétale, ainsi qu'une réduction de leur pathogénicité (Martinez-Rocha et al., 2008). Fks1 est une protéine de taille importante appartenant à la famille des glycosyltransférases 48 (GT 48). Elle est intégrée à la membrane plasmique et possède un domaine N-terminal cytoplasmique et 16 domaines transmembranaires (Beauvais et al., 2001). Trois gènes homologues codant pour cette sous-unité ont été identifiés dans le génome de *S. cerevisiae* (*FKS1*, *FKS2*, *FKS3*) (Douglas et al., 1997). Contrairement aux levures, seul un seul orthologue de *FKS1* a été identifié chez les champignons filamenteux (Tentler et al., 1997 ; Kellner et al., 2005 ; Ha et al., 2006 ; Yang et al., 2011 ; Firon et al., 2002). Ce gène semble essentiel à leur survie (Kellner et al., 2005). La délétion de ce gène chez les champignons filamenteux ayant été tentée à plusieurs reprises sans succès, différentes approches ont été utilisées pour mesurer l'impact d'une réduction de son expression. Une construction ARN antisens a été introduite chez *Neurospora crassa* et a révélé un arrêt prématuré de la croissance du champignon, une hyper-ramification mycélienne et une morphologie altérée de la paroi se caractérisant par une diminution en β -(1,3)-glucanes (Tentler et al., 1997). Le mécanisme d'interférence ARN (RNAi) a aussi été utilisé chez *Fusarium solani* révélant une inhibition de la germination des spores, un gonflement des hyphes, et une lyse cellulaire accompagnée d'un relargage du contenu intracellulaire des hyphes. Ces phénotypes ont tous été corrélés avec la diminution du taux d'expression de *FKS1* (Ha et al., 2006). Une réduction de la sporulation et une sensibilité accrue à un milieu hyper-osmotique ont été observées chez des mutants RNAi pour *FKS1* chez le champignon *Metarhizium acridum*, pathogène des insectes (Yang et al., 2011). Enfin, un hétérocaryon portant un allèle sauvage et un allèle muté du gène *FKS1* a été obtenu chez *Coccidioides posadasii* et révèle une réduction du taux de sporulation ainsi qu'une morphologie anormale des hyphes (Kellner et al., 2005).

la glycosyltransférase Fks1 ne présente pas une structure habituelle de glycosyltransférase, c'est pourquoi selon la nomenclature CAZY elle a été placée dans une nouvelle famille appelée glycosyltransférases de type 48. Par ailleurs, Abbott *et al* ont montré que des glycosyltransférases de type 2, appelées curdlane synthase sont responsables de la biosynthèse de β -(1,3)-glucane chez *Agrobacterium tumefaciens* (Abbott *et al*, 2009). L'exploration du génome de *B. cinerea* nous a révélé la présence de trois gènes homologues codant pour des protéines appartenant à la famille GT2. Nous émettons alors l'hypothèse, que ces trois gènes identifiés chez *B. cinerea* pourraient aussi avoir un rôle dans la biosynthèse de β -(1,3)-glucane chez ce champignon. Ainsi, le complexe de la β -(1,3)-glucane synthase pourrait ne pas être seul responsable de la synthèse du β -(1,3)-glucane pariétal chez *B. cinerea*.

Pour mieux comprendre la biosynthèse des β -(1,3)-glucanes chez *B. cinerea*, une double approche de mutagenèse a été réalisée : l'extinction du gène *FKS1* a été entreprise par ARN interférence et par ailleurs, la délétion des trois gènes codant pour des protéines à domaines GT2, de fonction inconnue chez les champignons, a été réalisée.

II-Matériels et méthodes

Matériel fongique

La souche sauvage BO5.10 de *B. cinerea* a été utilisée tout au long de cette étude. Cette souche provient d'un isolat prélevé sur plant de vigne haploïdisée suite à un traitement au benomyl (Quidde, 1998).

La souche sauvage et les souches mutées construites au cours de ce travail sont maintenues sur milieu malt sporulation dans une enceinte climatique contrôlée (à 21°C, éclairage proche UV et 80% d'humidité).

Matériel végétal

Des cotylédons de cornichons de la variété petit vert de Paris sont utilisés pour les tests de pathogénie. Ils sont sensibles à la pourriture grise. Ces plants sont cultivés sous serre, avec une alternance jour/nuit, pendant une semaine et sont infectés au stade de cotylédons.

Recherche de gènes homologues

La recherche de protéines homologues à la curdlane synthase bactérienne d'*Agrobacterium tumefaciens*, chez *B. cinerea* est réalisée en utilisant l'algorithme BLASTp hébergé sur le site du NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). L'alignement protéique mettant en évidence l'appartenance de ces protéines à la famille des glycosyltransférases de type 2 est réalisé via l'algorithme MAFFT.

Construction des cassettes de délétion

Les cassettes de délétion ont été créées en utilisant la stratégie de double-joint PCR (Yu *et al*, 2004) qui consiste en une succession de trois réactions PCR (Figure 1). Ces dernières sont réalisées avec l'enzyme iproof high fidelity DNA polymérase (Biorad) et les amorces ont été désignées via le programme Primer 3 (www.primer3.com) (tableau 1). Environ 1.5kb de séquences nucléiques situées en 5' et en 3' des ORFs BC1G_03864, BC1G_05652 et BC1G_13238 ont été amplifiées avec des amorces hybrides pouvant également s'hybrider sur le gène de l'hygromycine phosphotransférase (Figure 1, Annexe ; amorces 1 et 2 en 5' et 3 et 4 en 3'). Un fragment de 1.8kb contenant le gène de l'hygromycine phosphotransférase sous le contrôle du promoteur OliC d'*A. nidulans* a été amplifié à partir du plasmide pOT en utilisant les amorces 5 et 6 (Figure1, Annexe). Lors d'une seconde PCR, les régions 5' et 3' ainsi que la cassette de résistance à l'hygromycine sont liées entre elles par recombinaison homologue permettant ainsi l'obtention de la cassette de délétion. Une troisième PCR est réalisée avec les amorces 7 et 8 (Annexe) afin d'amplifier en grande quantité la cassette de délétion formée.

Arbitrairement, on nommera ces gènes curdlane synthases like, le gène BC1G_03864 sera nommé dans cette étude *CRD a*, le gène BC1G_05652 sera lui nommé *CRD b* et le gène BC1G_13238 *CRD c*.

Construction et vecteurs utilisés:

Le vecteur pSUPER:

Le vecteur pSUPER est commercialisé par la société Oligoengine (USA). Il contient une cassette qui place l'expression du sshRNA (short and small hairpin RNA) sous le contrôle du promoteur H1 de l'ARN polymérase III humaine et d'un signal de terminaison de 5 thymidines. La séquence matrice du sshRNA utilisé dans ce travail, est composée d'une séquence cible sens de 19 pb identique à celle du transcrit *bcFKS1* (TGACAATGCAAACCTACCGA), d'une séquence courte de neuf nucléotide qui permet

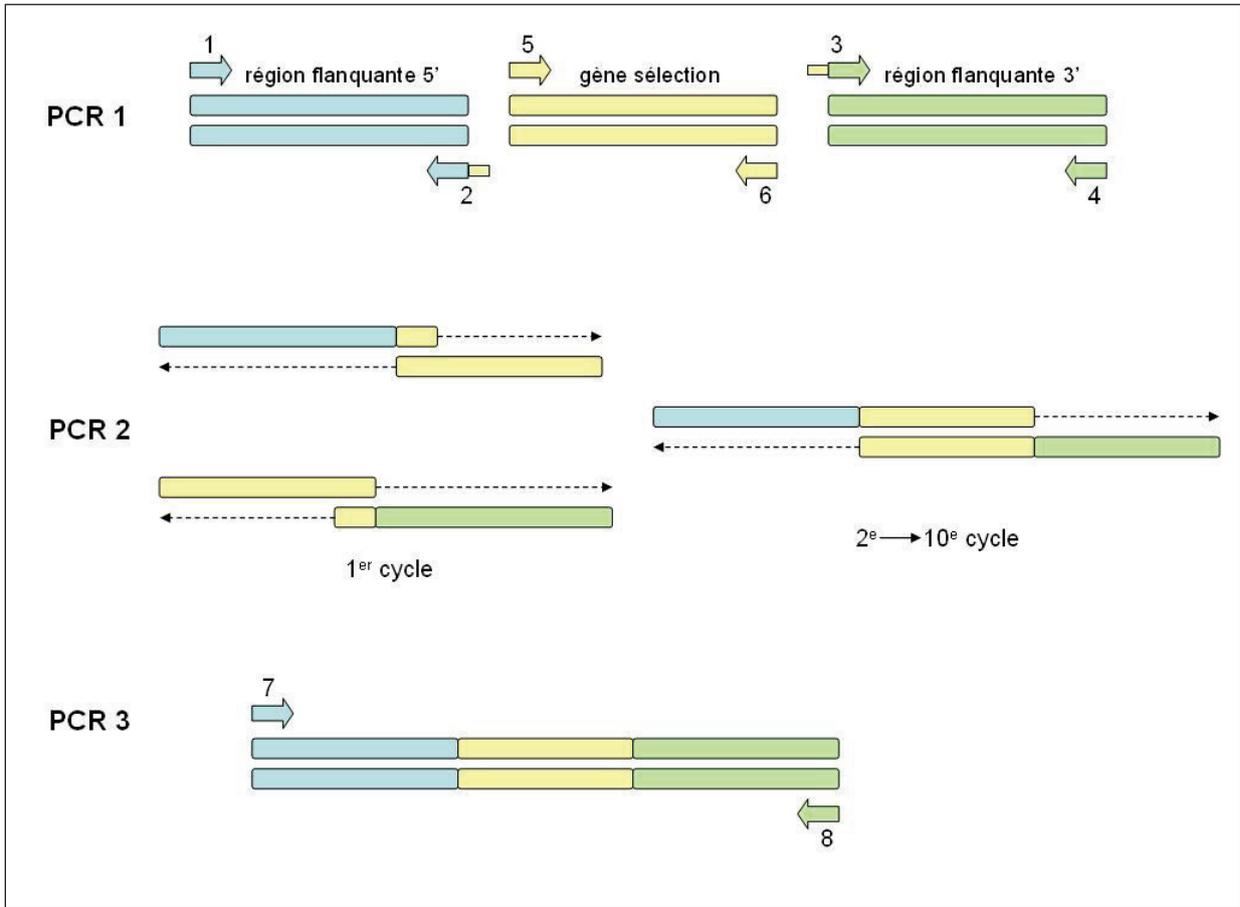


Figure 1 : Schéma de la construction d'une cassette de délétion par la technique de double-joint PCR. La première PCR amplifie le gène de sélection et les régions 5' et 3' encadrant le gène cible. La seconde PCR lie les trois fragments ensemble. La troisième PCR amplifie la cassette de délétion.

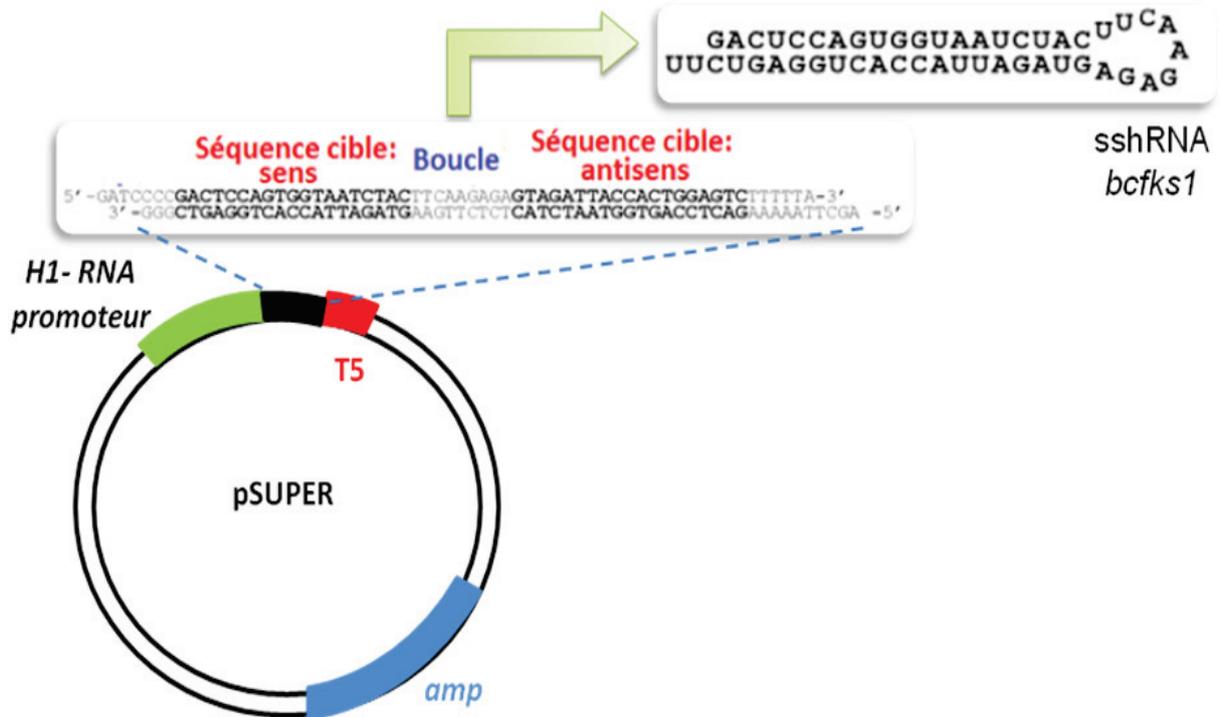


Figure 2 : Représentation schématique de la construction pSUPER portant la séquence en épingle à cheveux (sshRNA) destinée à réduire l'expression du gène *bcfks1*.

de former une boucle (« hairpin »), puis de cette même séquence cible en orientation antisens. Le plasmide contient le gène de résistance à l'ampicilline *AMP R* pour la sélection bactérienne mais pas de gène de sélection fongique (Figure 2).

Le vecteur pOT-HYGRO:

Ce plasmide porte le gène *HPH* conférant la résistance à l'hygromycine, antibiotique toxique pour la souche sauvage BO5.10, sous contrôle du promoteur *OliC* et du terminateur *trpC* de *A. nidulans* (Patel *et al*, 2008). Il permet ainsi la sélection des transformants sur milieu sélectif additionné d'hygromycine à 70 µg.mL⁻¹.

Amplification et purification des vecteurs:

Les deux vecteurs ont été clonés indépendamment dans des bactéries *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) et sélectionnées sur milieu LB additionné d'ampicilline (40µg/mL). L'ADN plasmidique des deux souches contenant chaque vecteur a été extrait avec le QIAGEN Plasmid MIDI Kit (QIAGEN).

Transformation

Un jeune mycélium est récolté par filtration sur une étamine de 100µm à partir d'une culture liquide de 24 heures en milieu NY (extrait de levure 2g/l, extrait de malt 20g/l) à 23°C à 140 rpm. Après lavage par une solution de KCl/NaP (KCl 0,6M, NaP 0,1M (Na₂HPO₄ 1M, NaH₂PO₄ 1M) pH 5,8), le mycélium est suspendu dans le même tampon contenant des enzymes lytiques de sigma (0,02g/ml) et agité durant 3heures à 70rpm à 23°C

Les protoplastes sont ensuite récoltés par filtration sur une étamine de 30µm, lavés et resuspendus dans du tampon TMS froid (Sorbitol 1M, MOPS 10mM, CaCl₂ 40mM, pH 6,3). Puis, 2.10⁷ protoplastes/ 100µl sont incubés sur la glace avec la cassettes de délétion (1-2µg) (ou bien les plasmides : Co-transformation (7µg pSUPER, 3µg pOT-Hygro)) dans 30µl de TE CaCl₂ (Tris 2M, EDTA 0,5M, CaCl₂ 80mM, pH 7,5), plus PEG 6000 (1,2g de PEG 6000 dans 800µl de MS (sorbitol 0,6M, MOPS 10mM, pH 6,3)). Les échantillons sont ensuite incubés 15 minutes à température ambiante. Un lavage est effectué en rajoutant 1ml de TMS froid aux échantillons qui sont ensuite centrifugés (5min, 5000 rpm). Les protoplastes sont resuspendus dans 400µl de TMS froid (sorbitol 1M, MOPS 10mM, pH 6,3), et mélangés dans 3ml de milieu MMV-top (NaNO₃ 2g/l, saccharose 200g/l, glucose 20g/l, agar oxoid 4g/l, solution

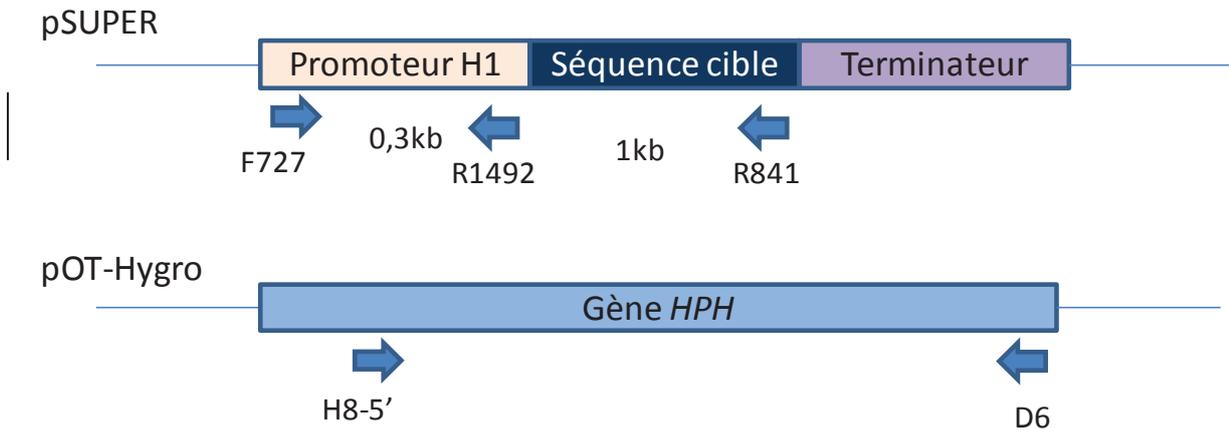


Figure 3. Schéma de position des amorces PCR permettant la vérification de l'insertion des deux plasmides chez les mutants RNAi

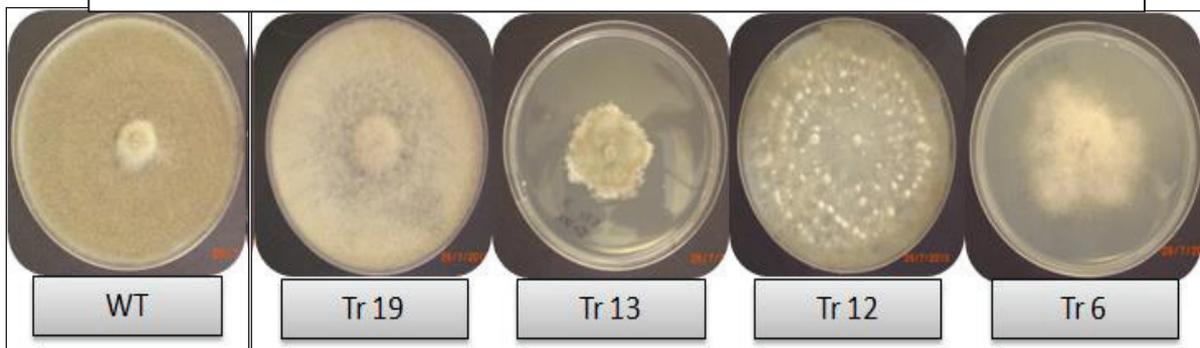


Figure 4: Les souches se développant sur milieu MMII supplémenté d'hygromycine à 70 µg/ml sont sélectionnées et conservées par repiquages successifs sur malt sporulation-hygromycine à 70 µg/ml

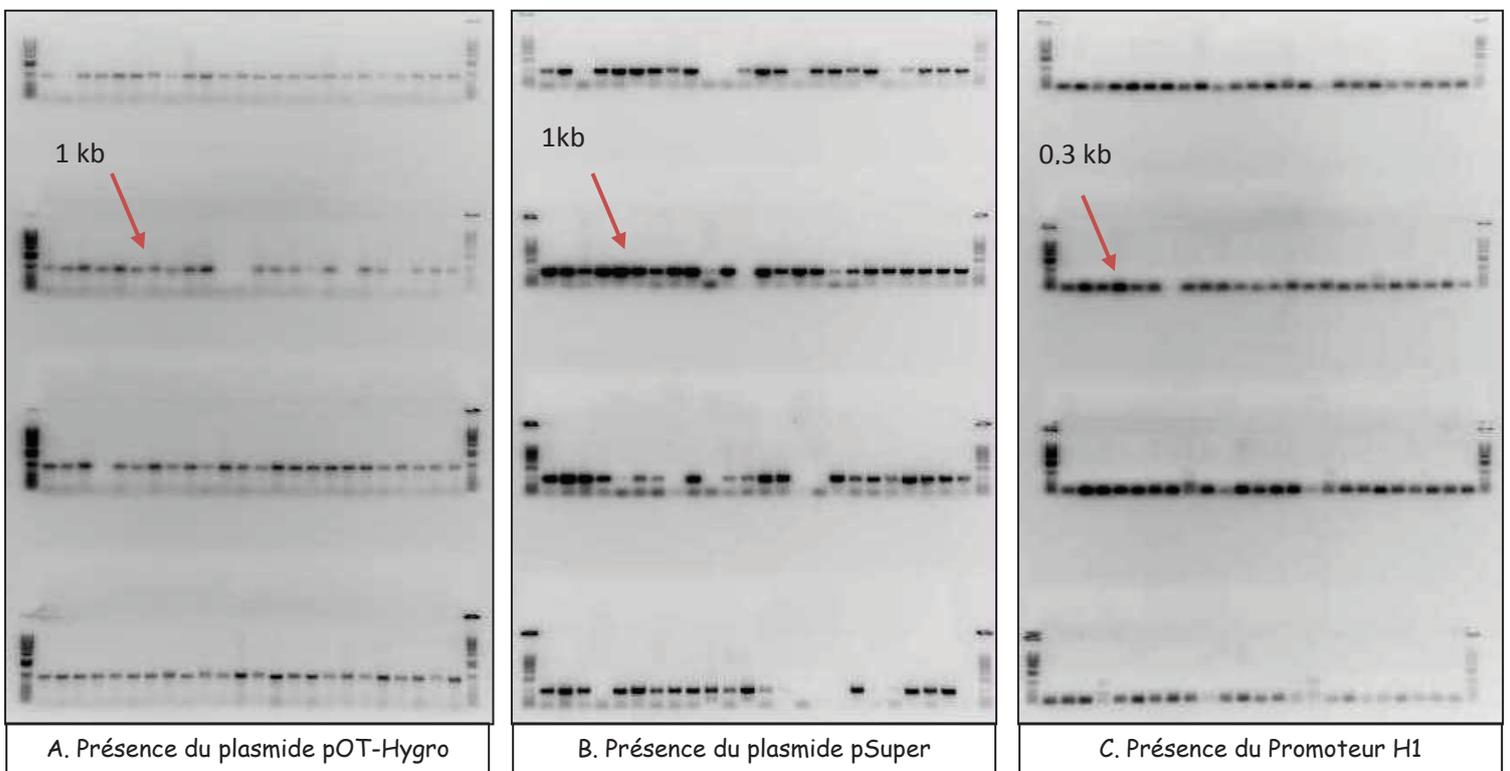


Figure 5: Résultats des 3 analyses PCR vérifiant la présence des deux plasmides, effectués sur les transformants RNAi. Après migration électrophorétique des produits PCRs sur gel d'agarose 1% coloré au BET et révélation aux UVs. (A : amorces D6 et H8 ; B : amorces F727 et R1492. C : amorces F727 et R841)

concentrée 10ml/l (KH_2PO_4 20g, MgSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$ 10g, KCl 10g, FeSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$ 0,2g, H_2O qsp 200ml)). Ce mélange est ensuite placé dans une boîte de pétri préalablement rempli de 10ml de MMV contenant de l'hygromycine à 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (NaNO_3 2g/l, saccharose 200g/l, glucose 20g/l, agar oxoid 15g/l, solution concentrée 10ml/l (KH_2PO_4 20g, MgSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$ 10g, KCl 10g, FeSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$ 0,2g, H_2O qsp 200ml)). Les boîtes de pétri sont finalement incubées à l'obscurité à 21°C.

Sélection des transformants :

Les souches se développant sur milieu MMII (NaNO_3 2g/l, Glucose 20g/l, agar agar 15g/l, solution concentrée 10ml/l (KH_2PO_4 20g, MgSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$ 10g, KCl 10g, FeSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$ 0,2g, H_2O qsp 200ml)) supplémenté d'hygromycine à 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Figure4) sont sélectionnées et conservées par repiquages successifs sur malt sporulation-hygromycine à 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$. L'ADN génomique des souches résistantes obtenues est extrait avec le DNeasy plant Mini KIT (QIAGEN). Pour les transformants obtenus la vérification de la présence des plasmides est observée par un crible PCR effectué sur les ADN. Les amorces H8-5' et D6 permettent l'amplification de 1kb au sein du gène *HPH* porté par le pOT-Hygromycine (Figure 3). Les amorces F727 et R841 permettent l'amplification de 1kb de la construction RNAi porté par le plasmide pSUPER (promoteur, séquence cible sens et antisens et séquence permettant la formation de boucle hairpin) (Figure 3). Les amorces F727 et H1492 quant à elles permettent l'amplification du promoteur H1 (0,3kb) permettant l'expression du RNAi (Figure 3). La séquence des amorces ainsi que les conditions utilisées pour chaque PCR sont référencées en Annexe.

Pour les mutants $\Delta\text{Crd a}$ et $\Delta\text{Crd b}$, on réalise une amplification des régions flanquantes en 5' et en 3' des gènes avec une amorce localisée à l'extérieur de la cassette de délétion et une autre située dans le gène *HPH* (figure 6).

Purification du contexte génétique

On collecte quelques spores en les resuspendant dans 100 μl d'eau stérile déposée sur une boîte de *Botrytis* sporulant. Cette suspension est étalée sur milieu malt sporulation supplémenté d'hygromycine à 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$, puis laissée à germer sur la nuit à 21°C dans l'obscurité. A l'aide d'une loupe binoculaire, des spores germées sont prélevées (cinq par souche) puis remises en culture individuellement sur milieu malt sporulation supplémenté par de l'hygromycine à 21°C dans l'obscurité puis placées trois jours plus tard sous lumière proche UV afin de favoriser la sporulation.

Gène ciblé	Séquences couple d'amorces	Concentrations optimales	Efficacité (E)
<i>FKS1</i>	F 5' GCTCGAGCGCGAACTTGA 3'	900nM	2,04
	R 5' GCATAACGTTGCATGGAAACA 3'	900nM	
<i>ACT A</i> gène de référence	F 5' CGGTGCTCCAGAAGCTTTGT 3'	50nM	1,93
	R 5' GTGGATACCACCGCTCTCAAG 3'	300nM	
<i>TUB α</i> gène de référence	F 5' GCGTTCGTGCATTGGTATGT 3'	300nM	1,84
	R 5' CACGGGCCTCAGAGAATTCA 3'	300nM	
<i>EF1 α</i> gène de référence	F 5' TTCCCGCCCAACTGACA 3'	50nM	2,15
	R 5' CGTTCCAATACCACCAATCTTGT 3'	50nM	

Tableau 1. Récapitulatif des caractéristiques des amorces utilisées en PCR quantitative. Les concentrations optimales sont les concentrations d'amorces pour lesquelles l'amplification est la plus spécifique (Ct le plus bas pour une même quantité d'ADN initiale lors des tests de mise au point). L'efficacité correspond à l'efficacité de la PCR pour doubler la quantité d'ADN en un cycle (cette valeur doit donc être proche de 2)

Cette opération est ainsi répétée quatre fois pour chaque transformant dans le but d'éliminer la présence de tout noyau non transformé grâce au milieu sélectif et aux mitoses successives.

Extraction d'ARN, synthèse des ADNc et PCR quantitative

Du mycélium, repiqué sur cellophane sur milieu PDA, est récolté après 96h d'incubation à l'obscurité à 21°C puis congelé dans l'azote liquide. Les échantillons sont lyophilisés puis l'ARN extrait grâce au kit RNeasy Midi (Quiagen), incluant un traitement à la DNase. La concentration des ARNs a été mesurée grâce au ND-1000 Spectrophotometer NanoDrop (Fisher) puis leur qualité a été évaluée au Bioanalyzeur 2100 (Agilent) L'étape de reverse transcription aboutissant à la synthèse des ADNc a été réalisée grâce au kit ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen) à partir d'1 µg d'ARN totaux. L'amplification en temps réel de la matrice d'ADNc a été effectuée à l'aide du kit Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) sur un ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems). Les gènes de référence choisis sont *ACT A* (actine A), *TUB α* (tubuline α) et *EF1 α* (un facteur d'élongation impliqué dans la traduction). Le taux d'expression relative r est mesuré selon la formule $r = \frac{E_{fks1}^{(Ct_{fks1} \text{ BO5.10} - Ct_{fks1} \text{ mutant})}}{E_{ref}^{(Ct_{ref} \text{ BO5.10} - Ct_{ref} \text{ mutant})}}$ avec E l'efficacité de chaque couple d'amorces utilisé et "ref" faisant allusion aux gènes de référence (Tableau 1).

Test de croissance radiale (milieu solide)

Un inoculum calibré (réalisé à l'emporte-pièce sur milieu TNK-YE) de mycélium jeune prélevé en marge d'une culture de quatre jours est déposé sur milieu PDA. La croissance s'effectue à l'obscurité dans une étuve portée à 21°C. Les mesures sont effectuées 24h, 48h, 72h, 96h après l'ensemencement. La croissance radiale est déterminée en mesurant le mycélium en deux diamètres perpendiculaires et en calculant la valeur moyenne.

Test de croissance pondérale (milieu liquide)

Dix plugs calibrés (réalisés à l'emporte-pièce sur milieu TNK-YE) de mycélium jeune prélevés en marge d'une culture de quatre jours sont plongés dans un erlen contenant 50 ml de milieu PDB. La croissance s'effectue à 21°C sous semi-obscurité en agitation à 110 rpm. Après 24h, 48h, 72h ou 96h, le milieu de culture (Figure 7) est éliminé après une centrifugation de six minutes à 4000 rpm. Le culot est ensuite rincé deux fois dans de l'eau et re-centrifugé six minutes à 4000 rpm. Après ces deux rinçages, le mycélium est plongé dans l'azote liquide (puis conservé à -80°C) avant d'être

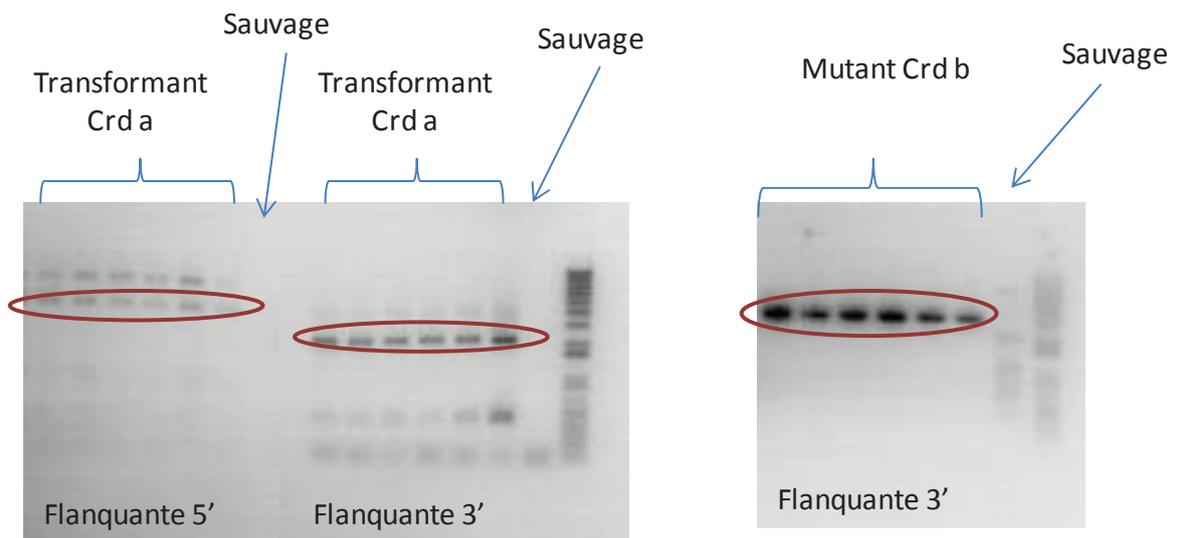


Figure 6. PCR de vérification de l'insertion au locus des cassettes de délétion des mutants CRD like.



Figure 7. Morphologie des cultures en milieu liquide des souches B05.10 et des mutants TR3, TR4, TR6, TR10, TR13 et TR15 après 96heures de croissance en milieu liquide agité.

lyophilisé durant 18 heures puis pesé. Ce test n'a pu se faire à partir d'un inoculum de spores à cause de défauts de sporulation rencontrés chez certains mutants RNAi.

Test de sporulation

Un plug calibré de culture sporulante est déposé sur milieu PDA, entreposé deux jours à l'obscurité dans une étuve portée à 21°C puis transféré en enceinte climatique sous lumière proche UV pour provoquer la sporulation, durant huit jours. Les spores sont collectées dans 10 ml d'eau puis leur concentration est estimée sous microscope optique à l'aide d'une cellule de Thoma. Ce test a été réalisé sur 5 replicas biologiques comprenant chacun 6 replicas techniques.

Test de développement sur membrane de Téflon

Des morceaux de membrane de Téflon, membrane hydrophobe permettant de mimer la surface d'une feuille et ainsi de provoquer la germination puis la formation d'appressoria unicellulaires (structure différenciée permettant la pénétration), sont disposés sur un papier filtre saturé en eau dans des boîtes de Pétri. Une suspension de spores, dont la concentration a été préalablement ramenée à 10^5 spores/ml dans du milieu PDB dilué au quart, sert à inoculer chaque membrane. Des gouttes de 50 μ l sont ainsi déposées sur chaque morceau de membrane et les boîtes sont mises à incuber à l'obscurité. Les spores décantent et se retrouvent au contact du téflon, ceci dans un environnement nutritionnel riche. Au bout de 3h, une observation au microscope photonique permet d'établir un pourcentage de germination. Après 6h, la formation d'appressoria unicellulaires, caractérisée par un arrêt de la croissance apicale et un gonflement de l'apex du tube germinatif, est évaluée. La morphologie des hyphes est enfin observée après 24h et 72h.

Test de développement sur membrane de cellophane

Des spores de dix jours sont récoltées et resuspendues dans du milieu liquide PDB dilué au quart. La concentration de cette suspension est ramenée à $2 \cdot 10^6$ spores/ml. 100 μ l sont étalés sur milieu PDA dilué au quart recouvert d'un film de cellophane, membrane hydrophile permettant après 44h d'incubation à 21°C à l'obscurité la formation de coussins d'infection (seconde structure différenciée de pénétration) observables sur toute la surface de la membrane au microscope photonique.

Test d'infection :

Des spores de la souche sauvage BO5.10 et des mutants sont récoltées et resuspendues en milieu minimum nitrate ((glucose 5.5mM, NaNO₃ 23mM, KH₂PO₄ 14mM, MgSO₄, 7H₂O 2mM, CaCl₂, 2H₂O 7mM, FeSO₄, 7H₂O 15µM supplémenté de Thiamine/biotine à 2.96/0.02 mol/l) à une concentration de 10⁵ spores par ml. Puis les cotylédons de cornichons sont infectés avec une goutte de 20µL de cette solution. Les plantes sont alors placées en miniserres avec une alternance de lumière et d'obscurité à une température de 21°C.

Parallèlement, des inoculum calibrés d'un mycélium de quatre jours de la souche sauvage et des mutants sont prélevés et disposés à la surface d'un cotylédon de cornichon sur une goutte de 10µL de milieu minimum nitrate.

Agents antifongiques :

La Caspofongine et la Nikkomycine Z (Sigma) sont obtenus en poudre et dissout dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) pour réaliser des solutions stock. Ces solutions sont conservées à -20°C jusqu'à l'utilisation. Des cascades de dilutions sont réalisées. Les dilutions finales sont réalisées dans 50µL de milieu minimum nitrate contenant de la thiamine/biotine à 2,96/0,02 mol par litre.

Tests de sensibilité :

La gamme de concentration finale des deux inhibiteurs va de 0,03µg/ml à 10µg/ml. Des aliquotes de 2µl des inhibiteurs à une concentration deux fois supérieure à la concentration finale sont répartis dans une plaque 96 puits. La suspension de spores est préparée dans un milieu minimum nitrate dans le but d'obtenir un inoculum final de 10⁵ spores/ml et une concentration finale de DMSO de 1% (à cette concentration le DMSO a peu d'effet sur la croissance des champignons). Les plaques sont incubées 6 jours à 21°C. Après 6 jours, la densité optique à 620nm est mesurée à partir d'un lecteur de microplaque (Beckmann Coulter AD340). Le pourcentage de croissance est calculé en comparant la densité optique des puits avec celle des puits contrôles ne contenant pas d'inhibiteurs.

Methode de Hill :

Le calcul de la CI50 est basé sur la méthode de Hill dont l'équation est la suivante : $1 - E = 1 / (1 + (C / CI_{50})^a)$

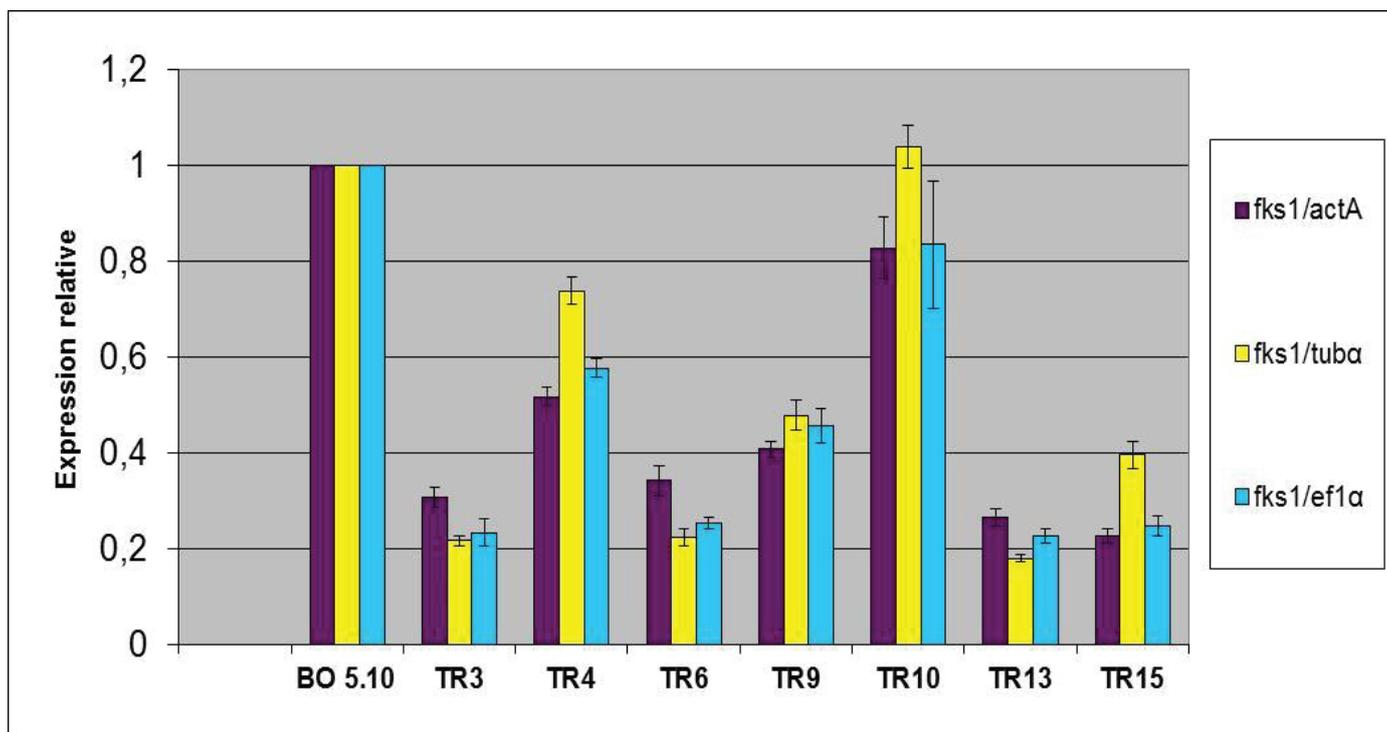


Figure 8 : évaluation de l'expression de *bcFKS1* chez les mutants purifiés en fonction de trois gènes de référence utilisés par rapport à la souche BO5.10 (n=1) (les barres d'erreur correspondent aux écarts-type calculés grâce aux deux répliques biologiques réalisés pour chaque gène) Les gènes de références utilisés correspondent à l'actine α , la tubuline α et le facteur d'élongation $Ef1\alpha$.

Dans cette équation E est la mesure de l'effet ou de la réponse, dans notre cas, il s'agit de la croissance qui est déterminée par une lecture de densité optique. C est la concentration de l'inhibiteur. CI50 est la concentration d'inhibiteur permettant l'obtention de 50% de l'effet maximal. a est le coefficient de sigmoïdité de Hill (pente de la courbe d'inhibition ou nombre de Hill) (Goutelle *et al*, 2008).

RESULTATS

1. EXTINCTION PARTIELLE DU GENE *bcFKS1* PAR ARN INTERFERENCE CHEZ *B. CINEREA* :

D'après la littérature, il a été montré que le gène *FKS1* était essentiel chez les champignons filamenteux. C'est pourquoi, une stratégie de mutagenèse par ARN interférence a été utilisée pour réaliser cette étude chez *B. cinerea*. Une co-transformation a donc été effectuée avec un plasmide contenant la séquence cible de l'ARN interférence et un second plasmide contenant un gène de résistance à l'hygromycine.

Après deux repiquages sur milieu de sélection MMII-Hygromycine, 138 transformants sur les 176 obtenus ont pu être conservés. On observe des phénotypes variés pour certains mutants qui pourraient être liés aux taux d'extinction de *bcFKS1* (Figure 4, 8). Mais une analyse plus poussée des phénotypes est nécessaire.

De ce fait, l'ADN de 95 transformants a été extrait, après croissance sur milieu PDA-Hygromycine recouvert d'une membrane de cellophane. Lors du crible PCR de sélection effectué, 92 souches montrent une amplification pour le gène *HPH* (1kb, Figure 5A). La cassette d'expression entière portée par le vecteur pSUPER a été amplifiée chez 84 transformants (1kb, Figure 5B). On a donc plus de 87% de co-transformation avec les 2 vecteurs utilisés. Afin d'être sûr que l'ARN interférence pourra être transcrit, la présence du promoteur H1 a également été vérifié et ce promoteur est présent chez 86 transformants (0,3kb, Figure 5C). 7 co-transformants choisis aléatoirement et la souche sauvage ont fait l'objet d'analyses plus approfondies après purification par isolement de spores.

Etude du niveau d'extinction de *bcFKS1*

Avant de caractériser les transformants choisis selon le niveau d'expression de *bcFKS1*, nous avons effectué quatre repiquages monospore. Cette technique permet de purifier le contexte génétique

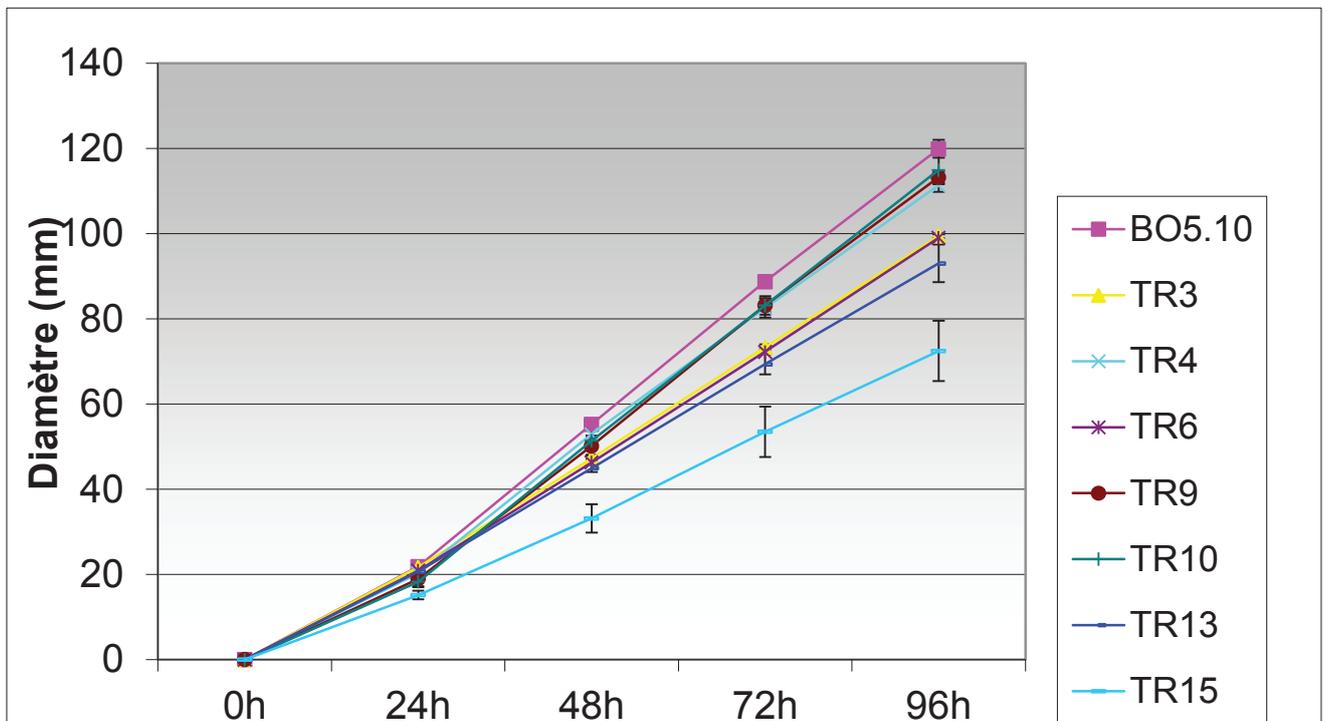


Figure 9. Cinétique de croissance radiale mycélienne sur milieu solide (PDA) ($3 < n < 8$) (les barres d'erreur correspondent aux erreurs standard)

par élimination des noyaux sauvages n'ayant pas reçu les constructions d'intérêt. Il est en effet possible qu'un, deux à trois noyaux cohabitent dans les protoplastes servant à la transformation du champignon. Des spores isolées ayant germé sous pression de sélection ont donc été repiquées sur milieu sélectif. Après plusieurs cycles de reproduction asexuée, les mitoses successives assurent une pureté génétique. Puis, le niveau d'expression de *bcFKS1* a été vérifié par PCR en temps réel après ce processus de purification (Figure 8).

Cette mesure de l'extinction de *bcFKS1*, effectuée en deux répliques biologiques, nous indique en effet qu'il existe différents taux d'expression. TR10 présente un niveau d'expression de 90% par rapport au sauvage. On peut noter la diminution de l'expression de *bcFKS1* chez TR15, TR6, TR3 et TR13 représentant respectivement 30%, 25%, 20% et 20% de l'expression de *bcFKS1* chez BO5.10 dans les mêmes conditions. Tandis que les mutants TR4 et TR9 présentent un niveau d'expression intermédiaire de 60% et 44% respectivement par rapport à la souche sauvage BO5.10.

Tests de croissance mycélienne radiale (milieu solide) et pondérale (milieu liquide):

Ces deux tests permettent de caractériser le développement du mycélium de manière quantitative. La capacité de croissance radiale est évaluée sur milieu nutritionnel riche (PDA), tout comme la croissance pondérale (PDB).

Les courbes de croissance présentent une évolution globalement linéaire pour toutes les souches testées (Figure 9). Les transformants présentent tous des vitesses de croissance statistiquement différentes de BO5.10. TR10 est visiblement peu affecté en croissance radiale (<5% par rapport au sauvage), de même que TR4 et TR9 (~6-8%). Un groupe composé de TR3, TR6 et TR13 accuse ensuite un retard de croissance d'environ 20% par rapport à BO5.10. TR15 transformant le plus affecté, présente un déficit de 40% inférieure à BO5.10 (Figure 9).

Les résultats obtenus lors de l'évaluation de la croissance mycélienne en milieu liquide agité, mesurant la biomasse fongique, ne sont pas exploitables par manque de reproductibilité. En effet, la variabilité des mesures causée par le matériel biologique d'une part (le mycélium pouvait par exemple prendre un aspect et une teinte différents pour une même souche d'une semaine à l'autre) et par l'aspect technique d'autre part (ensemencement du milieu, processus de lyophilisation et méthode de pesée) entraîne des erreurs standard beaucoup trop importantes. L'ensemencement du milieu liquide avec des spores donne en général des résultats reproductibles mais n'a pu être réalisé à cause du défaut de sporulation rencontré chez certains mutants. Aucune conclusion ne peut être tirée de ce test que nous avons abandonné au bout de six répétitions.

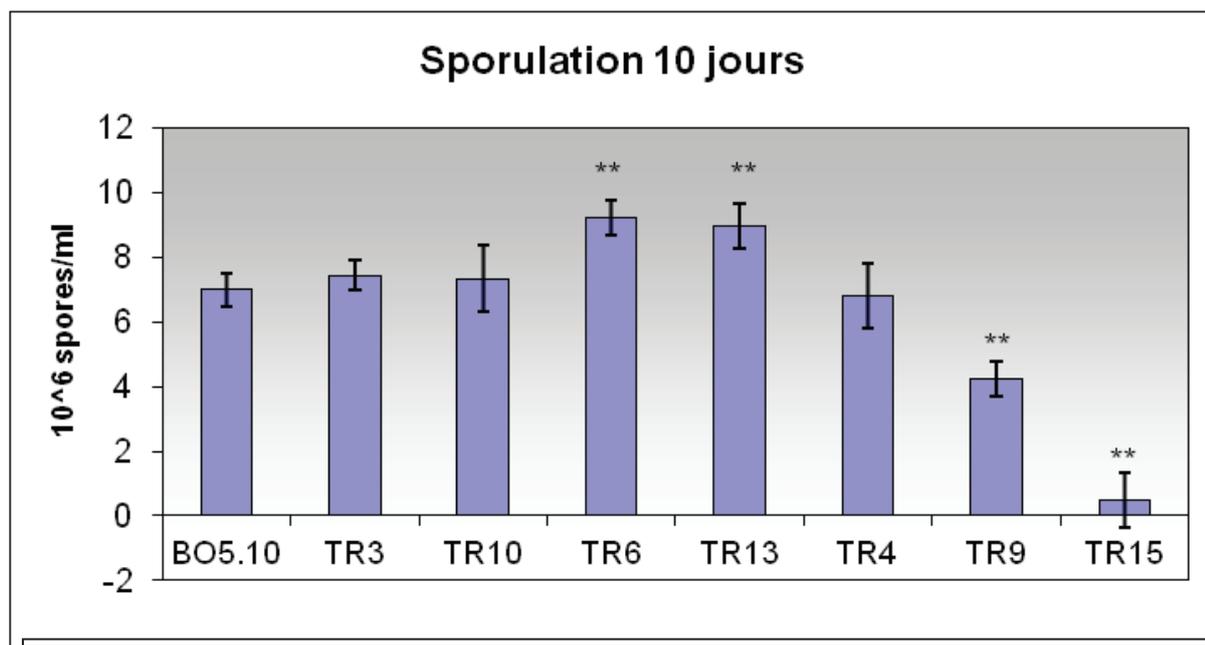


Figure 10. Mesure de la sporulation après 10 jours (les barres d'erreur correspondent aux erreurs standard sur 5 réplicas biologiques comprenant chacun 5 réplicas techniques) (** = différence statistique significative par rapport à BO5.10, test t, $p < 0.01$)

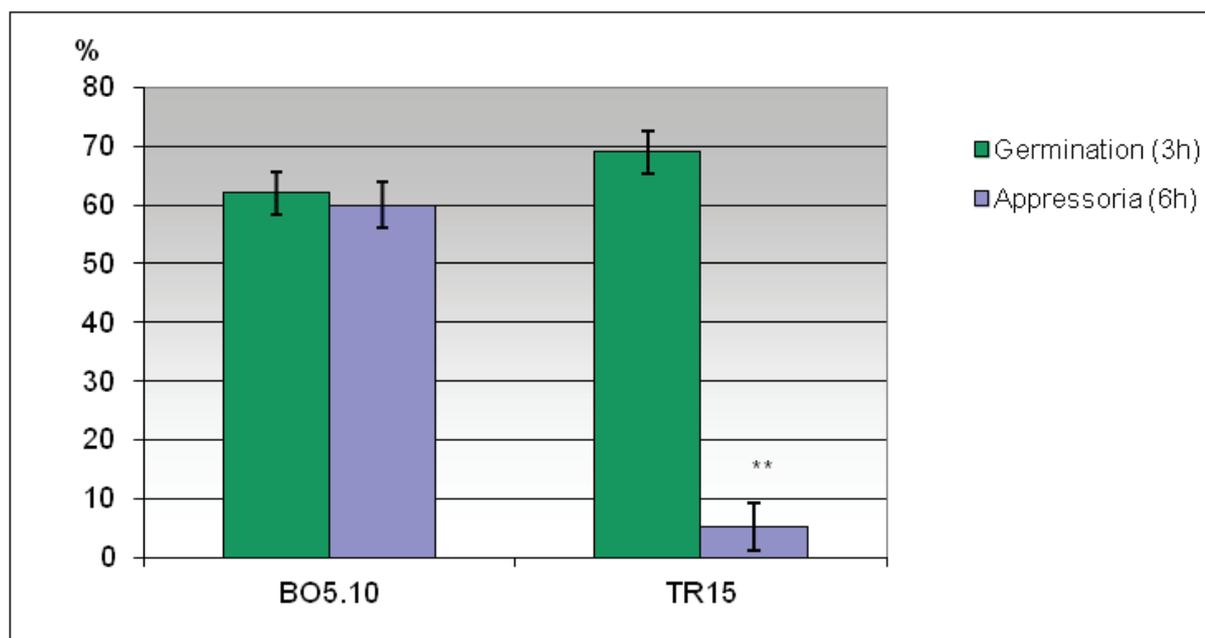


Figure 11. Pourcentage de germination et de formation d'appressoria unicellulaires respectivement 3h et 6h après le dépôt d'une suspension de spores sur membrane de téflon. (n=7 ou 8) (les barres d'erreur correspondent aux erreurs standard) (les astérisques représentent une différence statistique significative par rapport à BO5.10, test t, $* = p < 0.05$, $** = p < 0.01$)

Mesure du taux de sporulation

La sporulation est une étape du cycle infectieux de *Botrytis* importante car elle conduit à la production de spores qui de part leur propagation assureront la dissémination de la maladie. Il s'agit du mode de dissémination majeur car les spores peuvent aussi bien être véhiculées par des courants d'air que par des gouttes de pluie, par des insectes ou d'autres animaux.

Ce test a été effectué sur des cultures âgées de dix jours. La totalité des spores présentes sur le milieu sont récupérées dans 10 ml d'eau, puis la concentration de cette solution est évaluée à l'aide d'une cellule de Thoma.

On relève chez la souche sauvage BO5.10 une concentration moyenne de 7.10^6 spores/ml. Les mutants TR3, TR4 et TR10 ont des concentrations proches de celle de la souche sauvage (Figure 10). Les mutants TR6 et TR13 montrent un niveau de sporulation environ 30% supérieur à BO5.10. Enfin, TR9 et TR15 présentent des valeurs respectivement inférieures de 40 et 93% par rapport à la souche sauvage.

Étude de la germination et de la différenciation d'appressoria unicellulaires sur membrane de téflon

La germination et l'adhésion à la surface de la plante représentent des étapes importantes avant la pénétration de l'hôte et sa colonisation (Choquer *et al*, 2007). Les spores ne présentent pas de dormance et peuvent germer pour développer un nouveau thalle mycélien dès lors qu'elles sont placées dans des conditions favorables. La germination se caractérise par l'émission d'un tube germinatif pouvant se différencier en une structure unicellulaire spécialisée dans la pénétration appelée appressorium. La formation d'un appressorium est provoquée par un arrêt de la croissance apicale et un gonflement de l'apex du tube germinatif. La capacité des spores du seul mutant TR15 à germer puis à former des appressoria a été analysée par ce test, mimant le contact avec la surface d'une feuille grâce à une membrane hydrophobe, le téflon. En effet, au moment d'entreprendre les répétitions de ce test, TR15 était le transformant le plus affecté en terme de croissance radiale de sporulation et d'expression du gène *bcFKS1*.

Après 3 heures, 62 à 64,4% des spores de BO5.10 ont germé contre 69% pour TR15, mais ces différences ne sont pas statistiquement significatives (Figure 11). En revanche, on observe une disparité plus importante en ce qui concerne la formation d'appressoria unicellulaires entre ces deux souches. En effet, TR15 ne forme ces structures qu'en très petite proportion (90% moins que la



Figure 12. Comparaison de la morphologie de spores de BO5.10 (à gauche) et TR15 (à droite) après 6 heures sur membrane de téflon (barres d'échelle = 10µm). Le gonflement du tube germinatif (appressorium unicellulaire) est bien visible chez la souche sauvage tandis que TR15 présente un tube germinatif long et fin.

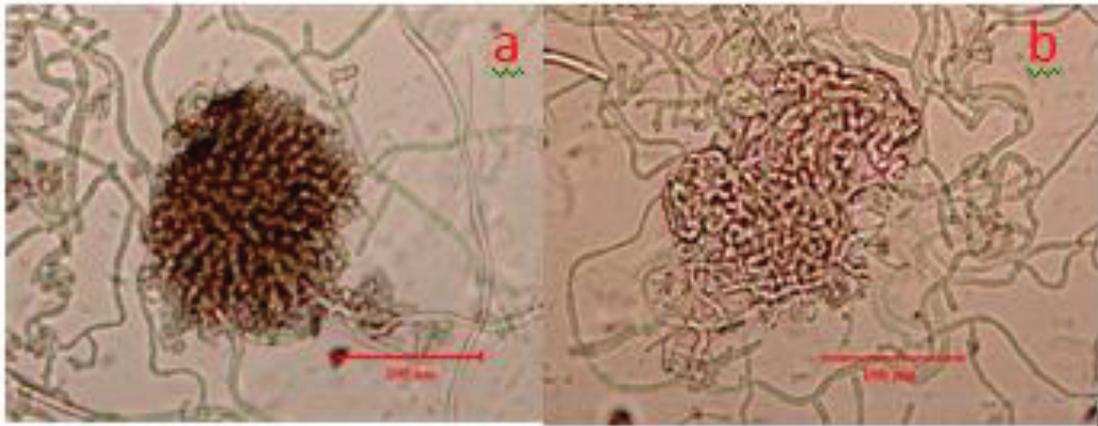


Figure 13. Coussins d'infection formés par la souche sauvage BO5.10 (a) et TR15 (b) après 44h d'incubation sur cellophane. (barres d'échelle = 100µm)

souche sauvage). Chez ce dernier, des tubes germinatifs souvent plus longs sont observés à la place des appressoria, ce qui pourrait être cohérent avec une poursuite de la croissance apicale (Figure 12).

Des observations après 24h et 72h n'ont pas permis de mettre en évidence de différences morphologiques du mycélium (pas de lyse ou gonflement anormal des hyphes, ni d'hyper-ramification), contrairement aux mutants du gène *FKS1* obtenus chez d'autres champignons filamenteux (Tentler et al, 1997 ; Kellner et al, 2005 ; Ha et al, 2006).

Formation de coussins d'infection

Le coussin d'infection est une structure de pénétration multicellulaire formée par l'agrégation de multiples hyphes dirigés vers la plante hôte (Akutsu, 1981). On suppose que cette structure se met en place chez *B. cinerea* lorsque l'appressorium unicellulaire n'est pas suffisant pour pénétrer dans la plante ou lorsque des nutriments sont disponibles à sa surface (prolongeant le développement des hyphes et retardant l'infection). La formation de coussins d'infection peut être provoquée *in vitro* sur une feuille de cellophane (membrane semi-perméable) intercalée entre le champignon et le milieu gélosé.

Comme pour le test de développement sur membrane de téflon, nous nous sommes d'abord intéressés au transformant TR15, qui présentait alors le phénotype le plus marqué et nous sommes rendus compte que celui-ci formait des coussins d'infection à l'aspect relativement similaire à BO5.10 et en proportion globalement identique (Figure 13). Ce test n'a pas pu être réalisé sur les autres mutants par manque de temps, mais pourra être réalisé par la suite.

Test d'infection par les mutants RNAi

Ce test permet d'évaluer la capacité d'infection des mutants RNAi. Cette capacité de colonisation et d'infection est évaluée par des tests sur cotylédons de cornichon.

Les tests d'infection à partir de spores et d'inoculum de mycélium calibrés ont été réalisés. Après 7 jours d'infection, la souche sauvage BO5.10 a totalement envahi le cotylédon, les souches TR10, TR9 et TR4 présentent le même phénotype que la souche sauvage lors d'une infection par des plugs de mycélium. Si une suspension de spores est utilisée lors de l'inoculation des cotylédons, un léger retard d'infection par rapport à la souche sauvage est observé pour ces trois souches. (Figures 14-15). La souche TR15 forme une petite zone de nécrose, puis arrête l'infection quel que soit l'inoculum

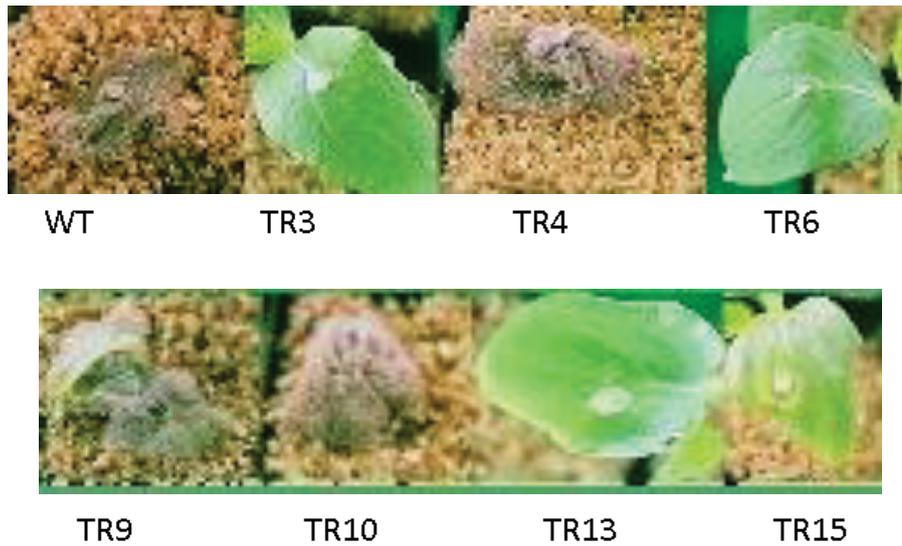


Figure 14 : Test d'infection des mutants RNAi *bcFKS1* et de la souche sauvage à partir d'inoculum mycéliens sur cotylédon de cornichon après 8 jours.

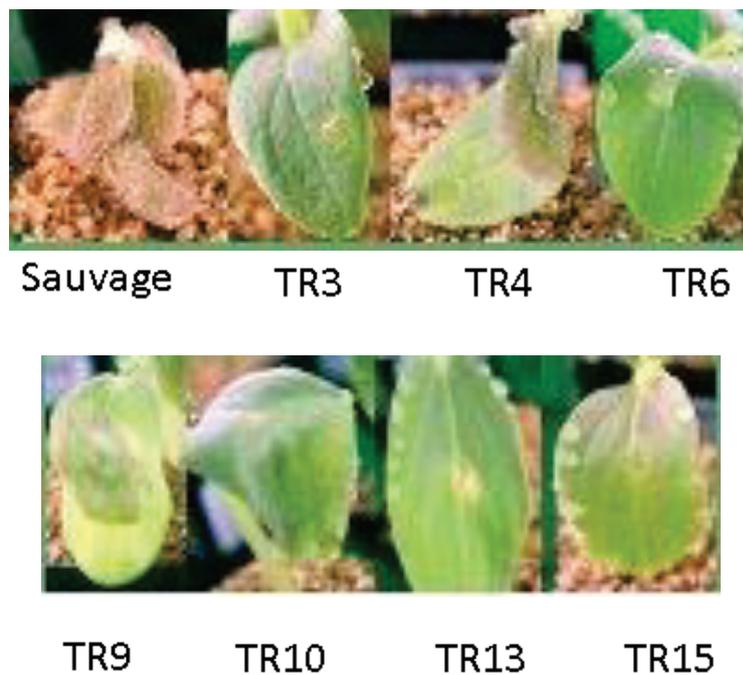


Figure 15 : Test d'infection des mutants RNAi *bcFKS1* et de la souche sauvage à partir d'une suspension de spores sur cotylédon de cornichon après 8 jours.

utilisé. Quant aux souches TR3, TR6 et TR13, elles n'infectent pas les cotylédons quel que soit l'inoculum utilisé (Figures 14-15).

Tests d'inhibition par des inhibiteurs pariétaux :

Ces tests permettent d'évaluer une éventuelle hypersensibilité des mutants aux inhibiteurs de paroi. En effet, ces tests vont permettre dans un premier temps d'évaluer les CI50 de chaque mutant après traitement par la Caspofongine et la Nikkomycine Z, puis d'observer les phénotypes induit par les traitements pariétaux. Ces tests ont montré que les CI50 de la Nikkomycine Z et de la Caspofongine sont les mêmes chez les mutants et chez la souche sauvage (tableau 3). De même, le même effet synergique de ces deux composés est observé chez les mutants et chez la souche sauvage.

L'observation des mycéliums cultivés en présence de 1% de DMSO a permis de montrer des différences entre le phénotype de la souche sauvage et certains mutants (Figure 16). En effet, le mutant TR4 présente des hyphes arrondis et les mutants TR6, TR13 et TR15 présentent des hyphes très fins (Figure 16). Le traitement par la Caspofongine ciblant la biosynthèse du β -(1,3)-glucane, montre chez le sauvage et tous les mutants, un gonflement des hyphes et un hyperbranchement (Figure 16). Tandis qu'un traitement par la Nikkomycine Z, ciblant la biosynthèse de la chitine, montre un gonflement des hyphes du sauvage et des mutants TR3, TR4, TR6, TR9 et TR10. Seuls les mutants TR13 et TR15 présentent un phénotype de ballon, habituellement observé lors d'un traitement combiné entre un inhibiteur de la biosynthèse de la chitine et un inhibiteur de la biosynthèse du β -(1,3)-glucane (Figure 16 ; galland *et al*, 2013). Par ailleurs, le traitement combiné de la Caspofongine et de la Nikkomycine Z induit ce phénotype de ballon chez le sauvage et chez tous les mutants (Figure 16).

Récapitulatif

Les mutants RNAi dont le taux d'expression de *bcFKS1* est le plus réduit (TR3, TR6 , TR13), présentent une diminution de la croissance radiale et une absence d'infection des cotylédons de cornichon (tableau 4). Cependant, aucune différence n'a été observée concernant le taux de germination et la formation des coussins d'infection. Seul le mutant TR15 possède un défaut de formation des appressoria unicellulaires (tableau 4). Par ailleurs, aucune différence n'a été observée concernant la sensibilité des mutants RNAi et de la souche sauvage aux inhibiteurs pariétaux (tableau 4).

2. MUTAGENÈSE DES GÈNES DE CURDLANE SYNTHASE LIKE CHEZ *B. CINEREA*

A partir de la séquence de la curdlane synthase d' *A. Tumefasciens*, une recherche a été entreprise sur le génome de *B. cinerea*. Trois gènes homologues ont ainsi été identifiés, par une recherche sur le

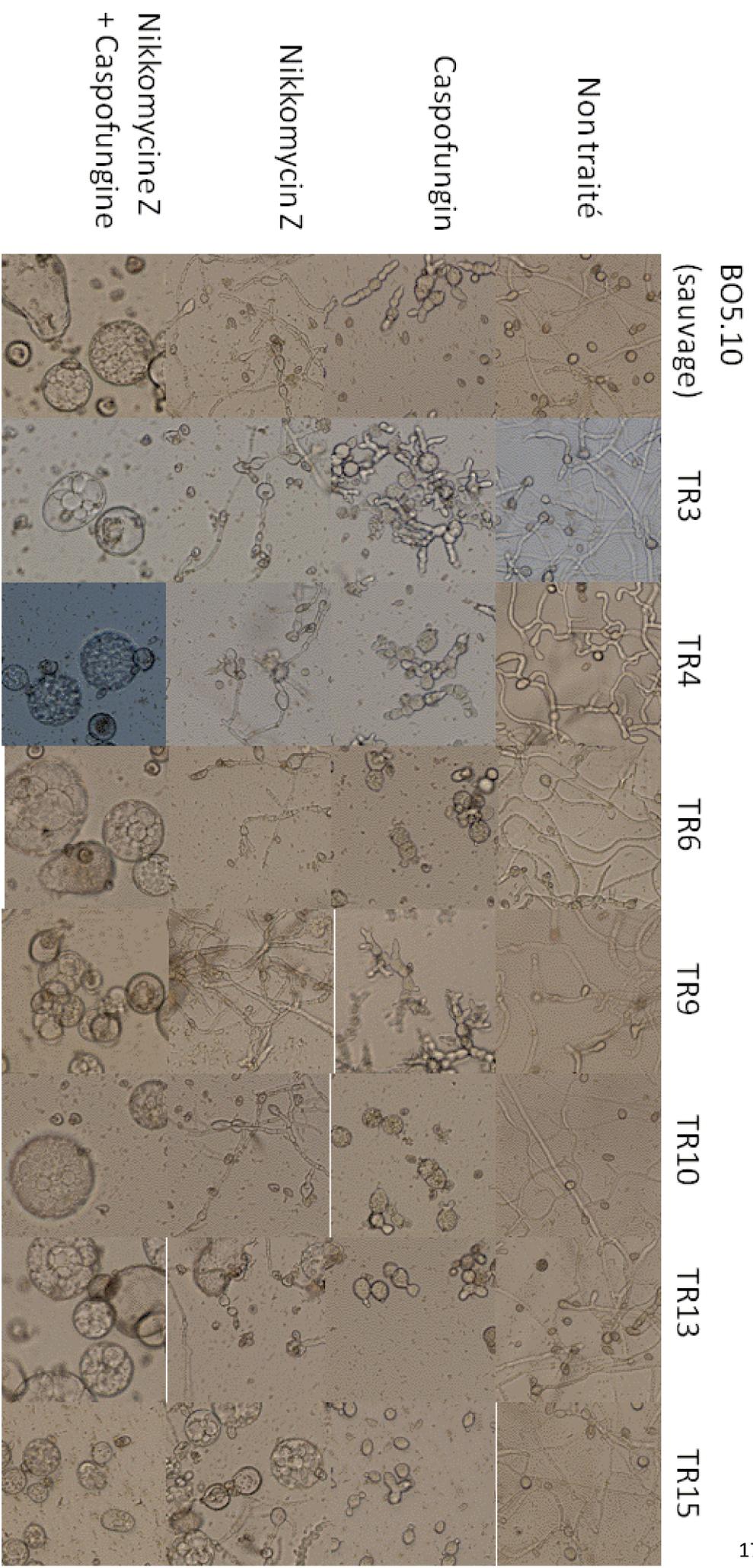


Figure 16 : phénotypes observés à 4 jours des mutants RNAi et de la souche sauvage après traitement par la Nikkomycine Z (inhibiteur de chitine synthase), par la Caspofongine (inhibiteur de la β -(1,3)-glucane synthase) et par la combinaison de ces deux inhibiteurs.

domaine GT2. On retrouve respectivement 34%, 28% et 25% d'identité sur le domaine GT2 (Figure 17). On appellera ces gènes curdlane synthase like (*CRD a, b et c*). Ces gènes n'ont jamais été étudiés chez les champignons, et n'ont donc aucune fonction connue. Afin d'élucider leur fonction chez *B. cinerea*, une mutagenèse par remplacement de gène a été entreprise.

La transformation a permis l'obtention de 6 transformants *CRD a*, 12 transformants *CRD b* et aucun transformants pour le gène *CRD c*. Afin d'identifier les transformants pour lesquels les gènes étudiés, l'ADN génomique de ces transformants ont été extrait après croissance sur milieu malt sporulation recouvert d'une membrane de cellophane. Lors du crible PCR, les 6 transformants *CRD a* et 6 des 12 transformants *CRD b* présentent une intégration au locus tandis que les 6 autres ont une intégration ectopique de la cassette.

Après quatre purifications par isolement de spores, la nouvelle analyse PCR montre que le gène sauvage est toujours présent, les mutants ne sont donc pas purs et présentent toujours des noyaux sauvage.

Tests préliminaires d'infection :

Les tests préliminaires d'infection vont permettre d'évaluer la capacité de colonisation de ces mutants. Ces tests ont été réalisés en deux répliques biologiques. Les mutants du gène *CRD a* ne semblent pas infecter les cotylédons en comparaison avec la souche sauvage qui a totalement envahi le cotylédon (Figure 18).

En ce qui concerne les mutants du gène *CRD b*, la plupart n'infecte pas le cotylédon, mais le mutants Δ crd b4 présente une infection identique au sauvage (Figure 19).

DISCUSSION

1. EXTINCTION PARTIELLE DU GENE *bcfks1* PAR ARN INTERFERENCE CHEZ *B. CINEREA* :

Ce travail de mutagenèse du gène *FKS1* a été entrepris par ARN interférence du fait de la létalité de ce gène chez plusieurs champignons filamenteux (Liu *et al*, 2002 ; Mouyna *et al*, 2004). Cette étude a permis de mettre au point une nouvelle technique d'extinction de gènes chez les champignons

```

BC1G_03864      T--VD-VFVTCGGEDVDVVLDTT-RAAAAGDYPQDRFRVVVLDGKDP--ELEKAVNDLS
AGRO_1848      APLVD-VFICTYNEPLNVLEKSI-IAAQAMDYP--RLRVFVCDTTRG--EVRTYCEAVG
BC1G_05652      ---VDIVIVAYLPNEQDIIMDRINYACQKLEYPTDKIRINIVYNTPFPIQSLEEEMWEAT
BC1G_13238      ---LDLVIVAYLPNEQDIIMDRIHIALDHIIYPQDKIRINVLYNTPKPIEPLESQMNDLA
                :* *::   :   :: .   *   **   ::* : :   :   :.

BC1G_03864      LEYPNVYYHARIKIKGVPHFKAGNLTGGTNFVVDLEGGAEYIAALDADMIPEEDWLRRA
AGRO_1848      VNY-----VTRPDNKHAKAGNLLNALLHTNALEEVSDFIMVLDADFAPQANFLRR
BC1G_05652      AKYPQLR-----IIKVEGSTSKADNLN----YYLSLDTG-SDVTAIYDCDHYIHPHSPRW
BC1G_13238      AKIPRLR-----IIKVPDSTSKAHNLN----YFFTLYTG-AQIIALFDCDHYTHPYGPRW
                :           :           ** ** .   *   ::   * . *   *

BC1G_03864      IIAHMVIDD-KMALVCPQQLFYVNPQNDPLCQSL-----DAFVHVMEPTKDAN-G
AGRO_1848      VTG-LFSDP-KVAVVQTPQFYFN---SDPIQHNLGIDKSFVDDQRVFFDVFQPAKDAV-G
BC1G_05652      AIERFIKEKGVDIVQGRCIVFN---TGASFLTSLISIEF----DKIYAVSHPGRATIWG
BC1G_13238      AIERFLADD-EVDCVQGRCVIQN---SKATFLTGIIAVEF----DKIYATSHPGRAALFG
                :. :   :: *   . *   . .   .           : . . * : : *

BC1G_03864      VAWCTGSGYAIRRAALDDIGGWVPGSLAEDTFTSSLLL GAGWKTAFCHEALQFGTVPDTI
AGRO_1848      CAFCVGTSFVVRRAAVNGIGGFPDALS E DMLLTYRLMERYVTRWLN E KLSVGLSAEGV
BC1G_05652      FGLFTGSNGYWRTSLLRDV-KMDENMLTEDIDSALRTVGRGCNIVHDLNVVSYELAPTTF
BC1G_13238      YGLFTGSNGYWRANLLRDL-KLDASMLTEDIDSALRALSQGAICVHEPNVISYELAPTTF
                . . * : . *   : . :   . * : * *   :   : *   : : . . . .

BC1G_03864      TGHLKQRTRWTLG
AGRO_1848      PEYITQRTRWCLG
BC1G_05652      GAFWKQRLRWAQG
BC1G_13238      PSFLKQRLRWAQG
                . . * * * * *

```

Figure 17 : Alignement du domaine GT2 entre les 3 séquences retrouvées chez *B. cinerea* et la curdlane synthase de *A. tumefaciens*, selon l'algorithme MAFFT.

Ascomycètes. Cette technique, utilise le plasmide commercial pSUPER qui produit sous contrôle du promoteur H1 de la RNA polymérase III humaine, des petits ARN de 19pb, nommés sshRNAs (small and short hairpin RNA). Ce système a été préalablement utilisé chez un Basidiomycète *Coprinopsis cinerea* (Costa *et al*, 2008). Habituellement les techniques d'ARN interférence utilisées chez les champignons sont très longues et coûteuses. Il faut généralement une séquence de minimum 500pb sous contrôle d'un promoteur fongique. Cette technique présente l'avantage d'être rapide, peu coûteuse et ne demande qu'une séquence de 19pb.

Dans cette étude, une co-transformation de *B. cinerea* a été réalisée entre le plasmide pSUPER et le plasmide pOT-Hygro, portant le gène de résistance à l'hygromycine (*HPH*). L'obtention de nombreux mutants suite à la co-transformation des deux plasmides pOT-Hygro et pSUPER constitue une réussite.

Un taux de co-transformation très élevé (supérieur à 85%) est obtenu. Ceci montre l'efficacité de la technique de transformation employée. En comparaison, Costa *et al*, en 2008, avaient obtenu un taux de co-transformation de seulement 25% chez *C. cinerea*.

Par ailleurs, on peut noter qu'un grand nombre de transformants ont été perdus lors des étapes de sélection (sur les 176 transformants obtenus, seuls 138 ont pu être conservés). On peut penser qu'ils étaient trop faiblement résistants à l'hygromycine. Cela peut être dû à une insertion du plasmide pOT-Hygro à un locus conduisant à une faible expression du gène *HPH*. Une autre hypothèse pourrait suggérer une très faible expression de *bcFKS1* conduisant à des phénotypes ne permettant pas la survie des mutants. Ce gène serait donc comme pour les autres champignons filamenteux, essentiel à la survie de *Botrytis cinerea*.

Tous les mutants présentent une diminution significative de leur vitesse de croissance radiale, en comparaison avec la souche sauvage. Il semble donc que le gène *bcFKS1* soit important pour la croissance du champignon sur milieu solide. Un test de corrélation non paramétrique de Spearman a été réalisé afin de vérifier s'il existe un lien entre la vitesse de croissance radiale et le taux d'expression du gène *bcFKS1*. La valeur du coefficient de Spearman ayant une p-value inférieure à 0,05, il existe une corrélation linéaire entre le taux d'expression de *bcFKS1* et la vitesse de croissance radiale (Figure 20). Le mutant TR15 dont le taux d'expression est de 30% en comparaison avec le sauvage, montre la plus forte altération puisque sa vitesse de croissance est réduite de 40%. Les mutants TR3, TR6 et TR13 qui ont le taux d'expression le plus bas de *bcFKS1* ont une vitesse de croissance réduite de 20% par rapport à la souche sauvage. Les mutants TR9 et TR4 ayant une expression intermédiaire de respectivement 44 et 60% et le mutant TR10 ayant une expression

	Caspofongine	Nikkomycine Z
	CI 50	CI50
Sauvage	0,28 (Std: 0,02)	0,97 (Std: 0,2)
TR3	0,29 (Std: 0,03)	1,03 (Std: 0,2)
TR4	0,2 (Std: 0,09)	1,1(Std: 0,07)
TR6	0,3 (Std: 0,08)	0,83 (Std: 0,1)
TR9	0,3 (Std: 0,09)	1,01 (Std: 0,08)
TR10	0,23 (Std: 0,09)	1,2 (Std: 0,15)
TR13	0,17 (Std:0,03)	0,7 (Std: 0,08)
TR15	0,4 (Std : 0,2)	1,92 (0,3)

Tableau 3 : Tests d'inhibition de croissance des mutants RNAi *bcFKS1* et de la souche sauvage par la Caspofongine et la Nikkomycine Z. (CI50 calculée après quatre répliquas biologiques)

proche de la souche sauvage, ont une vitesse de croissance radiale réduite de seulement 5%.

L'étude de la croissance en milieu liquide agité ne nous a pas donné satisfaction car les données récoltées montraient une trop grande variabilité (poids, aspect et couleur du mycélium) malgré de nombreux réplicas. L'incapacité pour certains mutants de produire assez de spores afin d'ensemencer le milieu liquide est un frein à la reproductibilité de ce test. Cette expérience, aurait permis de vérifier le rôle du gène *bcFKS1* lors d'une croissance en milieu liquide. En effet, si une diminution de la vitesse de croissance radiale a été observée, il est possible que la vitesse de croissance pondérale soit la même, puisque la biomasse fongique pourrait être la même.

Les tests de sporulation ont eux aussi révélés des résultats intéressants. En effet, les mutants TR9 et TR15 sporulent 40% et 93% moins que la souche sauvage (Tableau 4). Cette observation chez des mutants RNAi *FKS1* avait déjà été faite chez d'autres champignons tel que *Coccidioides posadasii* (Ha et al., 2006, Yang et al., 2011). Ce travail a permis d'identifier deux mutants, TR6 et TR13, produisant 30% plus de spores que la souche sauvage sur une même durée. La mise en relation de la capacité de sporulation avec le niveau d'expression de *bcFKS1* ne permet toutefois pas d'établir une corrélation puisque les mutants TR13, TR6 et TR3 ayant le même niveau d'extinction de *FKS1* ne présentent pas le même phénotype au niveau de la sporulation (Figure 21).

Un défaut dans la formation d'appressoria unicellulaires a été observé après 6h de croissance sur membrane de téflon uniquement chez le mutant TR15 (Tableau 4). Celui-ci montrait une prolongation de la croissance apicale du tube germinatif contrairement à BO5.10 qui présentait un appressorium court et large. Le test de croissance sur téflon avait toutefois débuté avec tous les transformants et aucun autre transformant n'avait montré cette différence après 6h. Toutefois, cette altération du phénotype n'est pas retrouvée chez les autres mutants, ce phénotype est donc spécifique à TR15 et n'est pas observé chez les trois mutants ayant le même niveau d'expression (TR3, TR6 et TR13). Il est donc possible que ce phénotype soit dû à une insertion d'un des plasmides dans une région codante et non au mécanisme d'ARN interférence.

Pour aller plus loin et avoir une vue plus globale sur la capacité d'infecter de ces mutants, les mutants ont été inoculés sur des cotylédons de cornichon. Les tests d'infection sont intéressants car ils montrent une corrélation entre le niveau d'extinction du gène *bcFKS1* et le taux d'infection des mutants. En effet les mutants TR3, TR6 et TR13 qui présentent les niveaux d'expression les plus bas, n'infectent pas les cotylédons, tandis que les mutants TR4, TR9 et TR10 ont un phénotype proche de la souche sauvage. Cependant le mutant TR15 semble encore une fois à part, puisqu'il démarre son



Sauvage mutant mutant mutant
 Crd a1 Crd a2 Crd a3



mutant mutant mutant
 Crd a4 Crd a5 Crd a6

Figure 18 : Test d'infection des mutants Δ crd a et de la souche sauvage à partir de plugs de mycélium sur cotylédon de cornichon après 8 jours.



Sauvage Mutant Mutant Mutant
 Crd b1 Crd b2 Crd b3



Mutant Mutant Mutant
 Crd b4 Crd b5 Crd b6

Figure 19: Test d'infection des mutants Δ crd b et de la souche sauvage à partir de plugs de mycélium sur cotylédon de cornichon après 8 jours.

infection et ensuite la stoppe. Il semblerait que le champignon ait été sensible aux réactions de défense de la plante. On peut donc penser que dans ce mutant l'un des deux plasmides pourrait s'être insérer dans une région codante et donc que le phénotype observé soit du à cette insertion.

Cette étude montre que l'utilisation du mécanisme d'interférence ARN permet bien de réduire l'expression d'un gène. Toutefois, de nombreuses précautions doivent être prises afin de valider les résultats obtenus. En effet, la détermination du locus d'insertion des deux plasmides pourrait être importante. En effet les mutants sont le fruit d'une co-transformation résultant de l'intégration aléatoire de séquences exogènes dans leur génome. Il se peut que dans certains cas, des intégrations aient eu lieu dans des régions codantes du génome conduisant à des phénotypes non liées à une réduction du niveau d'expression du gène étudié. Ainsi, pour prendre en compte ce facteur, il s'avère important soit de déterminer les sites d'intégration par des approches telles que la Tail PCR, soit de considérer un nombre important de mutants à analyser pour chaque niveau d'expression du gène étudié. Il est évident que cette démarche expérimentale est lourde à mettre en œuvre sur tous les transformants RNAi, mais elle permettrait de valider tous les phénotypes observés.

L'étude du niveau d'expression de *bcFKS1* n'a été entreprise qu'à partir de mycélium épiphyte. Afin de vérifier que la réduction du niveau de l'expression du gène n'est pas lié à un stade physiologique particulier du champignon, il serait opportun de tester l'expression dans différentes conditions de culture et à différents stades de développement du champignon (spore, appressorium...).

Les tests de pathogénie que nous avons effectués montrent que le gène *bcFKS1* est impliqué dans la pathogénicité de *B. cinerea*. Etant donné le caractère polyphage de *B. cinerea* il serait intéressant de reprendre ces tests sur différents organes végétaux (baies de raisin, feuilles de vigne ou de haricots, cotylédons de cornichon) présentant des caractéristiques physico-chimiques différentes afin de valider ou non les phénotypes observés.

Les tests de croissance radiale ont été réalisés sur milieu riche PDA. Cependant, cette étude pourrait être complétée par d'autres tests sur milieu minimum ou bien sur un milieu contenant un osmoprotectant comme du sorbitol. Cela pourrait être riche en enseignements notamment en ce qui concerne la résistance des mutants à la pression osmotique. La moindre proportion en β -1,3-glucane aurait *a priori* tendance à affaiblir la paroi, à moins qu'un phénomène de compensation avec d'autres polysaccharides pariétaux ne se mette en place.

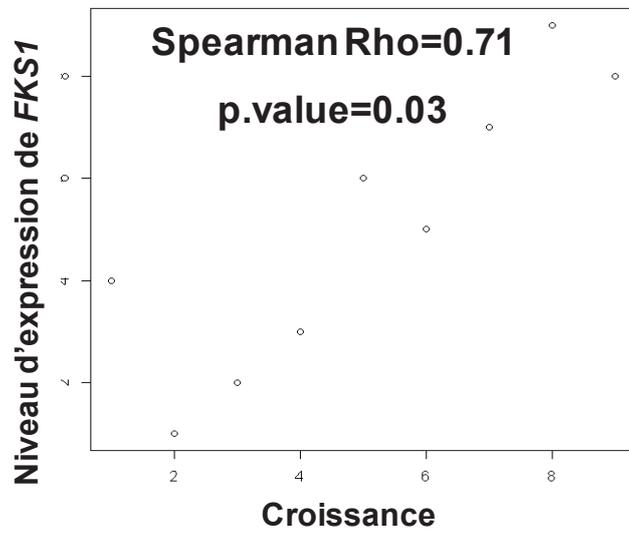


Figure 20. Test de Corrélation non paramétrique de Spearmann entre niveau d'expression du gène *bcFKS1* et le niveau de croissance radiale chez la souche sauvage BO5.10 et 7 transformants.

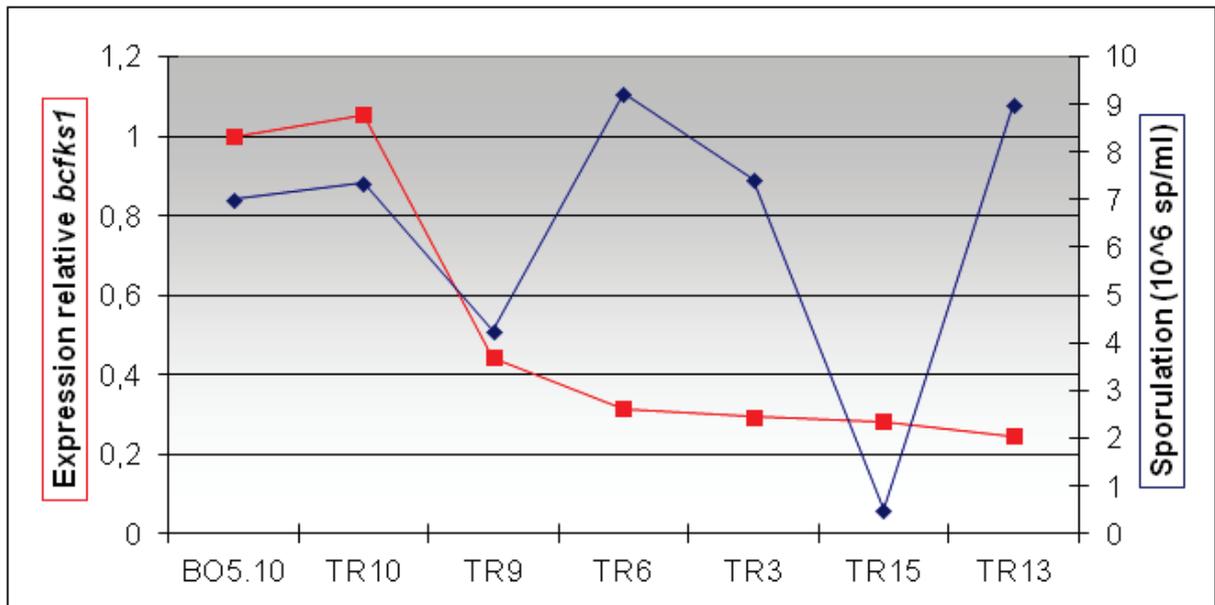


Figure 21. Corrélation entre niveau d'expression du gène *bcFKS1* et sporulation à 10 jours chez la souche sauvage BO5.10 et 6 transformants. (les barres d'erreur correspondent aux écarts-type mesurés lors de l'expérience de qPCR et aux erreurs-standard mesurées lors des tests de sporulation).

Les tests d'inhibition ne montrent pas d'hypersensibilité des mutants à la Caspofongine, inhibiteur de la biosynthèse du β -(1,3)-glucane ; ni à la Nikkomycine Z, inhibiteur de la biosynthèse de la chitine. Mais en observant les DOs, on remarque que les mutants ont une croissance deux fois plus lente que la souche sauvage. Ceci explique sûrement l'absence de différence d'inhibition. Par ailleurs, ce résultat laisse penser que la biosynthèse des β -(1,3)-glucanes n'est pas significativement altérée chez ces mutants, puisque l'effet des inhibiteurs pariétaux reste le même que chez le sauvage. On pourrait penser que la synthèse protéique de la β -(1,3)-glucane synthase ne soit pas significativement altérée chez ces mutants. En effet, certaines études ont montré que des ARN antisens pouvaient augmenter la production de protéines post transcriptionnellement (Carrieri *et al*, 2012). On pourrait donc émettre l'hypothèse que la transcription du gène *FKS1* soit altérée chez ces mutants mais sans altération de production protéique.

De ce fait, une approche biochimique est nécessaire et sera envisagée pour mesurer directement l'activité enzymatique β -(1,3)-Glucane Synthase.

Parallèlement à la mesure de l'expression de *bcFKS1* chez ces mutants, l'expression de gènes connus comme étant impliqués dans la biosynthèse pariétale tels ceux codant pour les chitine synthases, serait complémentaires des premiers résultats et permettrait de voir si des mécanismes de compensation peuvent se mettre en place chez les champignons filamenteux comme cela a été décrit dans le cas de *Candida albicans* (Walker *et al.*, 2008). Cette étude pourrait être réalisée également au niveau biochimique par des tests de dosage de l'activité chitine synthase. La composition pariétale des transformants devra aussi être examinée afin d'avoir une vue globale de la composition pariétale de ces mutants et voir des modifications éventuelles de certains composés non majoritaires de la paroi.

2. MUTAGENÈSE DES GÈNES DE CURDLANE SYNTHASE LIKE CHEZ *B. CINEREA*

L'étude transcriptomique en présence d'inhibiteur de biosynthèse pariétale a révélée la présence de deux gènes significativement régulés par ces traitements. Ces deux gènes appartiennent aux glycosyltransférases de type 2 de fonction inconnu chez les champignons. L'exploration du génome de *B. cinerea* a montré l'existence de trois gènes présentant une homologie avec des gènes de glycosyltransférases de type 2, appelées curdlane synthase décrits chez *Agrobacterium tumefaciens* et responsables de la synthèse de β -(1,3)-glucane. Ces gènes ont une identité sur le domaine de la curdlane synthase d'*A. tumefaciens* de respectivement 34%, 28% et 25% (Figure 17). Nous

émettons alors l'hypothèse, que ces trois gènes identifiés chez *B. cinerea* pourraient aussi avoir un rôle dans la biosynthèse de β -(1,3)-glucane. De ce fait, il est intéressant d'étudier de tels gènes afin de préciser leur fonction dans la synthèse pariétale et leur importance dans la physiologie du champignon et au delà dans sa pathogénie.

Ainsi, dans un premier temps, la construction de mutants délétés de ces gènes a été envisagée chez *B. cinerea*. Les expériences de transformation génétiques que nous avons conduites ont produit peu de transformants et aucun n'a été obtenu pour le gène *CRD c*. Ce problème peut poser la question de l'importance de ce dernier gène chez *B. cinerea*. En effet, ce gène pourrait être essentiel, ce qui expliquerait la raison pour laquelle aucun transformant n'a été obtenu. Pour valider cette hypothèse de nouvelles transformations devront être réitérées, l'utilisation d'un promoteur inductible ou bien une mutagenèse par ARN interférence pourraient être aussi envisagées.

Concernant les deux autres gènes pour lesquels des mutants ont pu être sélectionnés, la purification des mutants pour les deux autres gènes n'a pas pu être obtenue à l'heure actuelle. En effet, les quatre premières tentatives de purification ont échoué. Par la suite, il serait opportun d'essayer de nouvelles purifications par isolement de spores. Un milieu stabilisé osmotiquement pourrait être utilisé afin de faciliter cette purification. Mais si malgré ces nouveaux essais, le gène sauvage est toujours présent, dans ce cas, il faudrait envisager une purification via la reproduction sexuée.

Le défaut d'infection des mutants obtenus, semble indiquer que ces deux gènes pourraient avoir un rôle important dans le processus infectieux de *B. cinerea*. Le phénotype marqué de ces mutants hétérocaryotiques lors du processus infectieux, pourraient laisser penser que ces gènes soient létaux. Dans ce cas, une nouvelle stratégie de mutagenèse devrait être envisagée afin de pouvoir étudier le rôle de ces gènes. Une technique d'ARN interférence permettrait alors de pouvoir obtenir des mutants sous exprimant les gènes. Puis, une analyse plus poussée du phénotype des mutants par des tests de croissance, de sporulation, de germination et de formation des appressoria, ainsi que de pathogénie et d'inhibition, permettraient de mieux comprendre le rôle de ces gènes. Etant donné le caractère novateur de l'existence de ces gènes chez *B. cinerea*, et afin de pouvoir leur attribuer une fonction dans la synthèse pariétale, il s'avère important de mettre en place une analyse biochimique structurale de leur paroi afin d'identifier le composé dont ils sont responsables. Une purification des produits de ces gènes permettra de savoir s'il s'agit de β -(1,3)-glucane.

phénotypes	mutants RNAi					
	Sauvage	TR10	TR4	TR9	TR15	TR6
taux d'expression	100%	90%	60%	44%	30%	25%
taux de germination	100%	100%	100%	100%	100%	100%
formation des appressoria	100%	100%	100%	100%	8%	100%
Sporulation	7 x10 ⁶ sp/ml	7 x10 ⁶ sp/ml	4 x10 ⁶ sp/ml	7 x10 ⁶ sp/ml	1 x10 ⁶ sp/ml	9 x10 ⁶ sp/ml
formation des coussins d'infection	100%				100%	
taux de croissance radiale	100%	92%	92%	92%	60%	83%
infection par un plug de mycélium	normal	normal	normal	réduite	pas d'infection	pas d'infection
infection par une suspension de spores	normal	normal	normal	réduite	pas d'infection	pas d'infection
phénotype en présence de DMSO 1%	normal	normal	hyphes arrondis	normal	hyphes fins	hyphes fins
phénotype induit par la Caspofongine	hyperbranchement	hyperbranchement	hyperbranchement	hyperbranchement	hyperbranchement	hyperbranchement
phénotype induit par la Nikkomycine Z	gonflement des hyphes	gonflement des hyphes	gonflement des hyphes	gonflement des hyphes	ballons	gonflement des hyphes
phénotype induit par la combinaison	ballons	ballons	ballons	ballons	ballons	ballons

Tableau 4. Récapitulatif des phénotypes observés chez les mutants RNAi *bcrFKS1* en comparaison avec la souche sauvage.

ANNEXES : Séquence des Oligonucléotides utilisés

	Séquence cible de la PCR		Nom de l'amorce	Séquence 5' → 3'
Cribles de validation des transformants Bcfks1	pSUPER	Construction entière	F727	TCA-ACC-CGC-TCC-AAG-GAA-TC
			R841	TCG-CCA-CCT-CTG-ACT-TGA-GC
		Promoteur H1	F727	TCA-ACC-CGC-TCC-AAG-GAA-TC
			R1492	AAT-ATT-GCA-GGG-CGC-CAC-TC
	pOT-Hygro	<i>hph</i>	D6	CTA-TTC-CTT-TGC-CCT-CGG
			H8	GAG-TTC-AGC-GAG-AGC-CTG-ACC-TAT-TG

	Séquence cible de la PCR		Nom amorces	Séquence 5'→3'
construction de la cassette de délétion du gène Crd a	PCR1	Flanquante 5'	D1	ACTGCAAGCAACTCCACAA
		Flanquante 5'	D2	CCACAGCTGCAGGTGACGTACATGTCCCTGTCAAAGC
		Flanquante 3'	D3	CCGAGGGCAAAGGAATAGAGGATGAGCAATAGGGCTTGA
		Flanquante 3'	D4	GGCGGACAAATAACAATGC
		Hygromycine	D5	CGACCTGCAGCTGTGG
		Hygromycine	D6	CTATTCCTTTGCCCTCGG
	PCR3	construction entière	D7	GAATGGCTGATCTGCACCA
		construction entière	D8	CGGCGATGGTTGAATTG

	Séquence cible de la PCR		Nom amorces	Séquence 5'→3'
construction de la cassette de délétion du gène Crd b	PCR1	Flanquante 5'	D1	AGCTCCACAACGCATGAA
		Flanquante 5'	D2	CCACAGCTGCAGGTGAGGGACACCACCGAGTAA
		Flanquante 3'	D3	CCGAGGGCAAAGGAATAAGAGATGCATTGGCTTTGATG
		Flanquante 3'	D4	GTTGGACAAGCTGCGAGATA
		Hygromycine	D5	CGACCTGCAGCTGTGG
		Hygromycine	D6	CTATTCCTTTGCCCTCGG
	PCR3	construction entière	D7	TCCAAGGACAGCATCGAGA
		construction entière	D8	GATCTGGCATGATCTCCAATG

	Séquence cible de la PCR		Nom amorces	Séquence 5'→3'
construction de la cassette de délétion du gène Crd c	PCR1	Flanquante 5'	D1	GCGATCTGGACACAATTGA
		Flanquante 5'	D2	CCACAGCTGCAGGTGACACAGAGCAACAGGTTTGGA
		Flanquante 3'	D3	CCGAGGGCAAAGGAATAGAAAACGCTAGATCCCAGCTACC
		Flanquante 3'	D4	GGTTCATGCGACTGGGTAA
		Hygromycine	D5	CGACCTGCAGCTGTGG
		Hygromycine	D6	CTATTCCTTTGCCCTCGG
	PCR3	construction entière	D7	GGGCTGCCATGAATATCAA
		construction entière	D8	GGCCTCTGGTTAGGGAGAA

	Séquence cible de la PCR		Nom amorces	Séquence 5'->3'
vérification de l'intégration au locus	Flanquante 5'	Crd a	D10	GTCGTCACAGCTTAGCACCA
			H5R	AAGAATCTCGTGCTTTCAGC
	Flanquante 3'		D9	GCCGATAGTGTCGGTTCATC
			H7-3'	GGATGCCTCCGCTCGAAGTA

	Séquence cible de la PCR		Nom amorces	Séquence 5'->3'
vérification de l'intégration au locus	Flanquante 5'	Crd b	D10	TGGGTACACGTTCCAAGTCA
			H5R	GGATGCCTCCGCTCGAAGTA
	Flanquante 3'		D9	TGACGTGAGGCTGTGAGTTC
			H7-3'	GGATGCCTCCGCTCGAAGTA

Discussion Générale

La paroi fongique constitue un élément essentiel pour la croissance et pour la résistance aux agressions externes du champignon. En effet, elle a une action de barrière initiale contre les environnements hostiles rencontrés par les champignons, comme les variations de pression osmotique, le contact avec des molécules toxiques ou les réactions de défenses des hôtes (Aimanianda et Latge, 2010 ; Latge 2007). En l'absence de paroi, le champignon meurt à moins d'être cultivé en présence d'un osmoprotectant. Par ailleurs, la paroi fongique participe aussi au processus infectieux du champignon, de part son implication dans l'adhésion sur l'hôte et de part la rigidité de cette structure qui apporte une aide au champignon au moment de la pénétration de substrats insolubles (Kong *et al*, 2012).

Effet de composés inhibiteurs de la paroi fongique : existe-t-il une compensation pariétale chez *B. cinerea* ?

Un stress pariétal induit par un traitement antifongique, une enzyme de dégradation pariétale ou bien une mutation se traduit par un remaniement des composants pariétaux appelé mécanisme de compensation. Pour aborder ce mécanisme, nous avons choisi d'étudier d'une part les effets des inhibiteurs de paroi au niveau transcriptomique et d'autre part un mutant affecté dans la biosynthèse de la β -(1,3)-glucane.

Il a été observé chez plusieurs champignons filamenteux comme *A. fumigatus* ou bien *F. oxysporum* que l'une des conséquences du mécanisme de compensation pariétale est une forte accumulation de chitine dans la paroi de ces mutants suite à un traitement ciblant la biosynthèse des β -(1,3)-glucanes. Chez *B. cinerea*, aucune étude de la compensation pariétale n'a été réalisée. A partir des études transcriptomiques, nous avons montré chez *B. cinerea*, une surexpression des chitines synthases en cas d'altération pariétale induite par des inhibiteurs de GS ou bien de CHS. .

Par ailleurs, la paroi est une structure complexe dont l'élaboration nécessite l'intervention de nombreux gènes (De groot *et al*, 2001). Il est alors fort probable que les mécanismes de compensation induit en réponse à un dommage pariétal engendrent un remaniement transcriptionnel complexe. En effet, il se trouve qu'environ trois cent gènes répondent de manière significative après traitement par un inhibiteur du métabolisme de la chitine (294 gènes) ou du métabolisme du β -(1,3)-glucane (356 gènes) tandis que la combinaison de ces deux types d'inhibiteurs montre une réponse significative (Q-value < 0,05 et ratio > 2) chez mille cent cinquante gènes. Les gènes induits par ces trois types de traitement sont principalement de fonction inconnue

ou peuvent être classés par les gènes codant pour des deshydrogénases /oxidoreductases. Cependant, on remarque aussi qu'un nombre important de gènes impliqués dans le métabolisme des carbohydrates et au niveau de la biogénèse pariétale répondent aux traitements. Il semble donc probable que le champignon après le traitement combiné tente par de nouveaux moyens de maintenir l'intégrité de sa paroi qui lui est vitale. Par ailleurs, si une compensation a été observée au niveau transcriptionnel vers le métabolisme de la chitine, l'expression de la β -(1,3)-glucane synthase reste stable après les différents traitements pariétaux. Ce résultat laisse supposer qu'il pourrait y avoir une voie alternative de la biosynthèse de β -(1,3)-glucane encore jamais élucidée, ou bien une régulation post transcriptionnelle de la β -(1,3)-glucane synthase.

Vers l'utilisation d'une nouvelle méthode d'analyse des interactions entre deux molécules inhibitrices.

Pour déterminer l'interaction existant entre deux inhibiteurs, le modèle mathématique actuellement considéré comme référence a été utilisé : le modèle de Loewe (aussi appelé modèle de Tammes en Agronomie, Tammes, 1964). Ce modèle est basé sur l'utilisation d'isoboles et ne prend en compte que la CI50 de chaque composé. Par ailleurs, ce modèle n'est utilisable que sur des ratios de doses. Il omet donc toute une partie des données expérimentales. De plus, plusieurs articles montrent que le modèle de Loewe n'est utilisable que pour un nombre de Hill des composés d'une valeur de un, mais que pour les inhibiteurs dont ce n'est pas le cas, les isoboles ne doivent plus être droites mais courbes rendant le modèle inutilisable (Berenbaum, 1989). Après application du modèle de Loewe, une synergie a été observée entre la Caspofongine (inhibiteur de la biosynthèse des β -(1,3)-glucanes) et la Nikkomycine Z (inhibiteur de la biosynthèse de la chitine). A l'heure actuelle, il existe des dizaines de modèles mathématiques pour déterminer l'interaction entre deux composés utilisés en combinaison, mais aucun d'entre eux n'est parfait et ils ont tous été élaborés spécifiquement pour un domaine d'utilisation particulier, en majorité pour le domaine médical, par exemple lors de l'utilisation de molécules anesthésiques. Ceci a pour conséquences, des difficultés d'application sur nos données de croissance fongique mesurées telles qu'elles le sont, par une lecture de densité optique. En effet, cette appréciation de la croissance fongique possède une trop grande variabilité pour être intégré à ces modèles. Nous avons donc élaboré un nouveau modèle dérivant de l'équation de Hill et qui prend en compte la CI50 et le nombre de Hill de chaque composé applicable sur des données de croissance fongique mesurée par densité optique. Ce modèle possède un terme

d'interaction entre nos deux composés qui est quantifié par le paramètre d . En effet, lorsque d est égal à 0, il y a une additivité entre les deux inhibiteurs. Quand d est inférieur à 0, un antagonisme entre les deux inhibiteurs est retrouvé. Enfin lorsque d est supérieur à 0, il s'agit d'une synergie entre les deux inhibiteurs.

Afin de valider l'utilisation de ce modèle, nous avons comparé les données obtenues avec celles obtenues après utilisation du modèle de Tammes (Loewe). Avec ce nouveau modèle on observe une valeur de d d'environ 50 dans le cadre de la combinaison entre la Caspofongine et la Nikkomycine Z. On retrouve donc une synergie entre ces deux inhibiteurs puisque les mêmes résultats sont obtenus avec les deux modèles validant ainsi l'utilisation du nouveau modèle. Toutefois, il est intéressant de noter qu'avec notre nouvelle méthode, la synergie peut être quantifiée, ce qui apporte une information supplémentaire par rapport au modèle de Loewe. De plus, le nouveau modèle utilise la totalité de nos données expérimentales. Notre modèle est utilisable pour tout nombre de Hill, et prend en compte ce paramètre pour la détermination de l'interaction, ce qui permet d'apporter de la précision aux résultats obtenus. Cette nouvelle méthode permet de quantifier l'interaction entre deux composés dans les conditions expérimentales que nous utilisons.

Quelle réponse transcriptionnelle existe-t-il après un stress pariétal ?

L'étude transcriptomique après différents traitements ciblant la biosynthèse de la paroi fongique permet d'étudier la réponse de *B. cinerea* en cas de stress pariétal. Cette étude a permis de montrer que *B. cinerea* compenserait transcriptionnellement un défaut du métabolisme pariétal par une surexpression des chitines synthases, alors qu'aucune variation d'expression n'a été observée au niveau de la β -(1,3)-glucane synthase. Cependant, une surexpression de deux gènes de fonction inconnu, ayant environ 30% d'homologies avec la curdlane synthase bactérienne : une β -(1,3)-glucane synthase, présentent une variation significative de leurs niveaux d'expression après les différents traitements pariétaux. En effet, l'un de ces gènes est surexprimé lors de la combinaison de la Nikkomycine Z et de la Caspofongine. Ces résultats laissent supposer à l'existence d'une seconde voie de biosynthèse du β -(1,3)-glucane chez *B. cinerea*.

Par ailleurs, il existe plusieurs voies de signalisation qui sont liées à l'intégrité pariétale. On retrouve trois voies majeures, la voie de l'intégrité pariétale, la voie Hog et la voie de la calcineurine. La voie

de l'intégrité pariétale régule la réponse cellulaire à différents signaux environnementaux comme des dommages pariétaux, une forte température ou bien certaines carences nutritionnelles. La voie de la calcineurine est dépendante du calcium intracellulaire et est impliqué dans la réponse à un stress pariétale, une forte température, une forte concentration en ions et l'exposition à des phéromones. La voie Hog (high osmolarity glycerol) quant à elle est impliquée dans l'adaptation de la cellule à la régulation de la pression osmotique mais aussi dans la réponse à un stress oxydatif et pariétal. Il a été observé que les voies de signalisation liées à l'intégrité pariétale ne sont pas induites de manière significative par les différents traitements pariétaux. Il n'a donc pu être mis en évidence de spécificité d'une des voies de régulation pour chaque type de traitements. Cela semble montrer que toutes ces voies sont essentielles à un maintien de l'intégrité pariétale en cas de stress endommageant la paroi fongique.

Il est important de noter une surreprésentation en protéines à ancre GPI dans les gènes répondant au traitement combiné. Les protéines à ancre GPI sont liées à la paroi fongique. Elles possèdent diverses fonctions (glucosidases, proteases, superoxide dismutase...), mais nombre d'entre elles demeurent de fonction inconnue (Richard et Plaine, 2007). Cependant, les protéines à ancre GPI sont clairement impliquées dans la structure pariétale et dans le remodelage de la paroi. Il est possible que cette surreprésentation puisse être liée à une altération très importante de la paroi fongique que le champignon ne peut compenser. En effet, le champignon pourrait chercher à compenser le déséquilibre induit par le traitement antifongique, en augmentant le nombre de protéines à ancre GPI ou alors en modifiant leur variété. La majorité des protéines à ancre GPI répondant au traitement demeurent de fonction inconnue laissant penser que ces protéines puissent avoir un rôle important au niveau du maintien de la paroi fongique.

La voie Fks1 est-elle la seule voie de biosynthèse du β -(1,3)-glucane ?

L'étude des différents transcriptomes montre que les inhibiteurs de paroi utilisés dans ce travail seul ou en combinaison ne modifient pas significativement l'expression de *FKS1*, sous unité catalytique de la β -(1,3)-glucane synthase. Ce résultat pose des questions concernant le rôle primordial de Fks1 dans la biosynthèse du β -(1,3)-glucane de la paroi fongique. En effet, on peut se demander pourquoi le traitement par la Caspofongine ciblant la biosynthèse du β -(1,3)-glucane, n'induit aucun changement sur l'expression transcriptionnelle de la β -(1,3)-glucane synthase (*FKS1* et *RHO1*).

Un travail de mutagenèse du gène *FKS1* a été entrepris par ARN interférence chez *B. cinerea*. Cette étude a permis de mettre au point une nouvelle technique d'extinction de gènes chez les champignons Ascomycètes. Cette étude montre que l'utilisation de ce mécanisme d'interférence ARN, utilisant un promoteur humain, a permis de réduire l'expression d'un gène chez un champignon Ascomycète. Toutefois, de nombreuses précautions doivent être prises afin de valider les résultats obtenus. En effet, la détermination du locus d'insertion des deux plasmides pourrait être importante afin de valider les phénotypes observés qui sont difficilement interprétables. Les mutants ayant une moindre expression de *FKS1*, se sont révélés non pathogènes et affectés dans leur croissance radiale. Ceci laisse penser à un rôle important de *FKS1* dans la pathogénicité de *B. cinerea*.

Dans le même temps, les études transcriptomiques révèlent aussi la présence de deux gènes différentiellement régulés en présence d'inhibiteurs de paroi. Ces gènes appartiennent aux glycosyltransférases de type 2 et sont homologues à la curdlane synthase bactérienne. La curdlane synthase bactérienne est impliquée dans la biosynthèse du β -(1,3)-glucane linéaire chez les bactéries. Dans le génome de *B. cinerea*, trois gènes homologues ont été identifiés.

Le rôle de ces gènes est inconnu chez les champignons. On peut supposer que ces gènes pourraient aussi avoir un rôle dans la biosynthèse de β -(1,3)-glucane chez les champignons. Ainsi la voie Fks1 pourrait ne pas être la seule voie impliquée dans la biosynthèse de β -(1,3)-glucane.

Par ailleurs, des mutants de deux de ces gènes ont été obtenus chez *B. cinerea*. A ce jour, les mutants n'ont pas pu être purifiés et demeurent à un stade hétérocaryotique. Cependant, ces mutants présentent une diminution voire une absence de pathogénicité. Ce résultat laisse supposer que ces gènes pourraient avoir un rôle important chez *B. cinerea*.

Les perspectives de ce travail seront de purifier le contexte génétique des mutants de curdlane synthase like. Dans un premier temps, un isolement de spores sera réalisé. Puis, si malgré tout les mutants demeurent hétérocaryotiques, des croisements par reproduction sexuée seront envisagés. Par la suite, une étude phénotypique et moléculaire de ces mutants permettra de mieux comprendre le rôle de ces gènes. Par ailleurs, une étude du composé produit par ces gènes pourra être envisagée afin de vérifier l'hypothèse fournie.

En effet, l'étude de ces gènes pourraient conduire de nouvelles cibles antifongiques et donc au développement de nouvelles molécules pour le traitement des cultures.

La paroi fongique est-elle une cible antifongique prometteuse ?

La paroi de part sa composition spécifique par rapport aux cellules animales et végétales représente une cible antifongique prometteuse. En effet, les polymères de type β -(1,3)-glucane et chitine sont absents ou modifiés chez ces organismes. Cette composition spécifique permettrait de réduire les effets secondaires induits par le traitement fongicide, comme la toxicité vers des organismes non ciblés. A l'heure actuelle, en agronomie, il n'y a qu'un seul inhibiteur ciblant la paroi fongique commercialisé : la Polyoxine D. Il s'agit d'un inhibiteur compétitif de la biosynthèse de la chitine. Ce fongicide est utilisé sur un très petit marché, seulement pour le traitement du gazon. Avec la loi Ecophyto 2018, nombres de fongicides commercialisés vont devoir être retirés du marché. En effet, l'objectif de cette loi est de diviser par deux l'usage des pesticides avant 2018. La recherche de nouveaux fongicides plus spécifiques des cellules fongiques est donc indispensable. Les molécules ciblant la paroi fongique semblent prometteuses de part leur spécificité d'action. Par ailleurs, trois molécules ciblant la biosynthèse de β -(1,3)-glucane sont validées pour une utilisation médicale. Il s'agit de la Caspofongine, de l'Anidulafongine et de la Micafongine. Cette cible pourrait donc être une bonne cible aussi dans le cadre d'un traitement agronomique où aucune molécule de ce type n'est commercialisée à l'heure actuelle. Cependant aucune de ces trois molécules ne pourrait être utilisée dans le cadre d'un traitement agronomique de part leurs coûts de synthèse trop important et la grande taille de ces molécules.

Un des objectifs de cette thèse concernait l'étude de l'effet des inhibiteurs pariétaux chez *B. cinerea*. Dans ce cadre, la Nikkomycine Z, inhibiteur de la biosynthèse de la chitine et la Caspofongine, inhibiteur de la biosynthèse de β -(1,3)-glucane, ont été utilisés comme outils en tant qu'inhibiteur pariétaux de référence. Le traitement de *B. cinerea* par la Nikkomycine Z induit un gonflement des hyphes. Ce phénotype semble être le reflet d'un défaut au niveau de la paroi. Cet inhibiteur seul est efficace dans le cadre d'un traitement contre *B. cinerea* mais la CI50 (environ 1 μ g/ml) est encore élevée. La Nikkomycine Z induit seulement un effet fongistatique chez *B. cinerea*. Ensuite, un traitement de *B. cinerea* par la Caspofongine, inhibiteur de la biosynthèse de β -(1,3)-glucane, a été réalisé. Cet inhibiteur semble induire un hyperbranchement des hyphes. Ce phénotype suggère un défaut de paroi latérale. Par ailleurs, la CI50 de ce composé est moins élevée que pour la Nikkomycine Z (environ 0.3 μ g/ml), mais elle reste néanmoins haute pour envisager un traitement aux champs pour ce type de produit. La Caspofongine induit un effet fongicide sur *B. cinerea*. Les valeurs élevées des CI50 peuvent être due aux mécanismes de compensation qui entraînerait une certaine résistance à un inhibiteur pariétal. En effet, il a été montré chez plusieurs champignons

qu'une altération du métabolisme du β -(1,3)-glucane, est compensée par une suractivation du métabolisme de la chitine et vice versa. Pour tester cette hypothèse de compensation pariétale, le champignon a été cultivé en présence d'un inhibiteur du métabolisme de la chitine et d'un inhibiteur du métabolisme du β -(1,3)-glucane (Nikkomycine Z et Caspofongine). Il a été montré que la combinaison de ces deux inhibiteurs induisait un phénotype de ballon. Ces ballons apparaissent dès 0.1 μ g/ml d'inhibiteurs et ne sont pas viables. De plus, ce sont des structures vraiment très fragiles qui éclatent avec le moindre stress, suggérant une altération profonde de la paroi. Ce phénotype qui n'est observé qu'en présence de la combinaison des deux inhibiteurs, est le reflet d'une synergie d'inhibition de ces inhibiteurs. Une vérification de l'interaction entre ces deux composés a été entreprise par deux méthodes différentes, une nouvelle méthode et la méthode de Loewe (aussi appelée méthode de Tammes, Tammes, 1964) et a révélé une synergie entre ces deux inhibiteurs dans les deux cas. Cette approche pourrait permettre de contourner les phénomènes de compensation mis en place par les champignons. Par ailleurs, la combinaison de deux inhibiteurs en synergie permettrait de diminuer les doses utilisées, ce qui pourrait réduire la toxicité et les effets secondaires liés au traitement. En effet, lors de la combinaison de la Caspofongine et de la Nikkomycine Z, les CI50 de ces deux composés ont été diminuées (0,1 μ g/ml pour la Caspofongine et 0,3 μ g/ml pour la Nikkomycine Z). On peut également penser que la combinaison de deux inhibiteurs pourrait permettre de diminuer l'apparition de résistance. Il semble donc que cette approche combinant l'utilisation d'inhibiteurs des deux métabolismes de la paroi fongique soit validée. Ce type de traitement étant fongicide, cette approche est intéressante pour l'élaboration d'un nouveau traitement agronomique. Il semble donc que la paroi fongique soit une bonne cible pour *Botrytis cinerea* à condition de trouver deux inhibiteurs capables d'être utilisés dans le cadre d'un traitement aux champs

Les études de cette thèse posent la question de savoir si finalement la paroi est une bonne cible antifongique car les phénomènes de compensation entre les polysaccharides pariétaux en diminuent l'effet. Cependant, l'étude des trois nouvelles glycosyltransférases mis en évidence lors des analyses transcriptomiques pourrait révéler une nouvelle cible antifongique intéressante.

Enfin, les données obtenues au cours de cette thèse confirment que la paroi n'est pas une structure inerte mais dynamique. Au vu des résultats, l'analyse transcriptomique pourrait être une voie d'exploration intéressante pour comprendre la capacité d'adaptation du champignon aux stress pariétaux. Ces analyses pourront permettre non seulement de mieux comprendre les métabolismes pariétaux en déterminant entre autre le rôle des protéines à ancre GPI dont nombre sont de fonction inconnues, mais elles pourraient aussi participer à l'identification de nouveaux gènes et au delà de nouvelles fonctions non encore identifiées en réponse à un stress pariétal.

Références bibliographiques

A

- Abott D. W., Amanianda V., Bacic A., Boraston A. B., Brown G. D., Brown R. C., Brownfield L., Bulone V., Clarke A. E., Cerenius L., Clavaud C., Doblin M., Epel B. L., Fincher G. B., Gidley M. J., Granum E., Harris P. J., Horst W., Hrmova M., Kawabata S. I., Latge J.-P., Lemmon B. E., Levy A., Myklestad S. M., Newbiggin A., Nishinari K., Nogami S., Ohya Y., Read S., Söderhäll K., Somerville S., Stanisich V. A., Stass A., Stone B. A., Voigt C. A., Williams D. L.** 2009. Chemistry, Biochemistry and biology of (1->3)-beta-glucans and related polysaccharides. Academic press.
- Agarwal A. K., Rogers P. D., Baerson S. R., Jacob M. R., Barker K. S., Cleary J. D., Walker L. A., Nagle D. G., Clark A. M.** 2003. Genome-wide expression profiling of the response to polyene, pyrimidine, azole, and echinocandin antifungal agents in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem. 278: 34998-35015.
- Aguilar-Uscanga B., Francois J. M.** 2003. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. Lett Appl Microbiol. 37: 268-327.
- Amanianda V., Clavaud C., Simenel C., Fontaine T., Delepierre M., Latgé J.-P.** 2009. Cell wall beta-(1,6)-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*: structural characterization and *in situ* synthesis. J Biol Chem. 284: 13401-13412.
- Amanianda V., Latgé J.-P.** 2010. Problems and hopes in the development of drugs targeting the fungal cell wall. Expert Rev Anti Infect Ther. 8: 359-364.
- Akutsu K., Ko K., Misato T.** 1981. Ann Phytopathol Soc Japan. 47: 234-243.
- Andrews B. J., Herskowitz I.** 1989. The Yeast SWI4 protein contains a motif present in developmental regulators and is part of a complex involved in cell-cycle-dependant transcription. Nature. 342: 830-833.
- Arbelet D., Malfatti P., Simond-Côte E., Fontaine T., Desquilbet L., Expert D., Kunz C., Soulié M.-C.** 2010. Disruption of the Bcchs3a chitin synthase gene in *Botrytis cinerea* is responsible for altered adhesion and overstimulation of host plant immunity. Mol Plant Microbe Interact. 23: 1324-1334.
- Arikan S., Lozano-Chiu M., Paetznick V., Rex J. H.** 2002. In vitro synergy of caspofungin and amphotericin B against *Aspergillus* and *Fusarium spp.* Antimicrob Agents Chemother. 46: 245-247.
- Arino J.** 2010. Integrative responses to high pH stress in *S. cerevisiae*. J Integrative biology. 14: 1-7.
- Aufauvre-Brown A., Mellado E., Gow N. A. R., Holden D. W.** 1997. *Aspergillus fumigatus* chsE: A gene related to a CHS3 of *Saccharomyces cerevisiae* and important for hyphal growth and conidiophores development but not pathogenicity. Fungal Genet Biol. 21: 141-152.
- Azuma M., Levinson J. N., Page N., Bussey H.** 2002. *Saccharomyces cerevisiae* Big1p a putative endoplasmic reticulum membrane protein required for normal levels of cell wall beta-1,6-glucan. Yeast. 19: 782-793.

B

- Baetz K., Moffat J., Haynes J., Chang M., Andrews B.** 2001. Transcriptional coregulation by the cell integrity mitogen-activated protein kinase Slt2 and the cell cycle regulator Swi4. *Mol. Cell. Biol.* 21: 6515-6528.
- Bal A. M.** 2010. The echinocandins: three useful choices or three too many? *Int J Antimicrob Agents.* 35: 13-18.
- Ballou C. E.** 1990. Isolation, characterization and properties of *Saccharomyces cerevisiae* mnn mutants with nonconditional protein glycosylation defects. *Methods Enzymol.* 185 : 440-470.
- Bartnicki-Garcia S.** 1966. Chemistry of hyphal walls of *Phytophthora*. *J Gen Microbiol.* 42: 57-69.
- Bartnicki-García S.** 1999. Glucans, walls, and morphogenesis: On the contributions of J. G. H. Wessels to the golden decades of fungal physiology and beyond. *Fungal Genet Biol.* 27: 119-127.
- Bartnicki-Garcia S., Bracker C. E.** 1984. Unique properties of chitosomes. Microbial cell wall synthesis and autolysis. 101-112. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Beauvais A., Bruneau J. M., Mol P. C., Buitrago M. J., Legrand R., Latgé J. P.** 2001. Glucan synthase complex of *Aspergillus fumigatus*. *J Bacteriol.* 183: 2273-2279.
- Beauvais A., et al.** 2007. An extracellular matrix glues together the aerial grown hyphae of *Aspergillus fumigatus*. *Cell. Microbiol.* 9: 1588 –1600.
- Beck M. E., Volker G., Dahmen P.** 2009. A modified Colby-formula as a model for synergistic effects. Theory and application. Unpublished.
- Becker J. M., Covert N. L., Shenbagamurthi P., Steinfeld A. S., Naider F.** 1983. Polyoxin D inhibits growth of zoopathogenic fungi. *Antimicrob Agents Chemother.* 23: 926-929.
- Behr J.-B.** 2011. Chitin synthase, a fungal glycosyltransferase that is a valuable antifungal target. *Chimia (Aarau).* 65: 49-53.
- Berenbaum M. C.** 1989. What is synergy? *Pharmacol Rev.* 41: 93-141
- Bonillia M., Nastase K. K., Cunningham K. W.** 2002. Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress. *EMBO J.* 21: 2343-2353.
- Boone C., Sommer S. S., Hensel A., Bussey H.** 1990. Yeast KRE genes provide evidence for a pathway of cell wall beta-glucan assembly. *J. Cell Biol.* 110: 1833-1843.
- Borgia P. T., Iartchouk N., Riggle P. J., Winter K. R., Koltin Y., Bulawa C. E.** 1996. The *chsB* gene of *Aspergillus nidulans* is necessary for normal growth and development. *Fungal Genet Biol.* 20: 193-203.

- Bormann C., Möhrle V., Bruntner C.** 1996. Cloning and heterologous expression of the entire set of structural genes for nikkomycin synthesis from *Streptomyces tendae* Tü901 in *Streptomyces lividans*. J Bacteriol. 178: 1216-1218.
- Bostian K. A., Hopper J. E., Rogers D. T., Tipper D. J.** 1980. Translational analysis of the killer-associated virus-like particle dsRNA genome of *S. cerevisiae*: M dsRNA encodes toxin. Cell. 19: 403-414.
- Bouquin N., Johnson A. L., Morgan B. A., Johnston L. H.** 1999. Association of the cell cycle transcription factor Mbp1 with the Skn7 response regulator in budding yeast. Mol Biol Cell. 10: 3389-3400.
- Bourdineaud J. P., Van der Vaart J. M., Donzeau M., De Sampaio G., Verrips C. T., Lauquin G. J.** 1998. Pmt1 mannosyl transferase is involved in cell wall incorporation of several proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Microbiol. 27: 85-98.
- Bouzenzana J., Pelosi L., Briolay A., Briolay J., Bulone V.** 2006. Identification of the first Oomycete annexin as a (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucan synthase activator. Mol Microbiol. 62: 552-565.
- Bowman J. C., Hicks P. S., Kurtz M. B., Rosen H., Schmatz D. M., Liberator P. A., Douglas C. M.** 2002. The antifungal echinocandin caspofungin acetate kills growing cells of *Aspergillus fumigatus* *in vitro*. Antimicrob Agents Chemother. 46: 3001-3012.
- Briolay A., Bouzenzana J., Guichardant M., Deshayes C., Sindt N., Bessueille L., Bulone V.** 2009. Cell wall polysaccharide synthases are located in detergent-resistant membrane microdomains in oomycetes. Appl Environ Microbiol. 75: 1938-1949.
- Brown J. L., Bussey H.** 1993. The yeast KRE9 gene encodes an O-glycoprotein involved in cell surface beta-glucan assembly. 13: 6346-6356.
- Brown J. L., Bussey H., Stewart R. C.** 1994. Yeast Skn7p functions in a eukaryotic two-component regulatory pathway. EMBO J. 13: 5186-5194.
- Brown J. L., Kossaczka Z., Jiang B., Bussey H.** 1993a. A mutational analysis of killer toxin resistance in *Saccharomyces cerevisiae* identifies new genes involved in cell wall beta-1,6-glucan synthesis. Genetics. 133: 837-849.
- Bulawa C. E.** 1993. Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. Annu Rev Microbiol. 47: 505-534.
- Bulawa C. E., Slater M., Cabib E., Au-Young J., Sburlati A., Adair W. L., Robbins P. W.** 1986. The *S. cerevisiae* structural gene for chitin synthase is not required for chitin synthesis *in vivo*. Cell. 46: 213-225.
- Buller C. S., Voepel K. C.** 1990. Production and purification of an extracellular polyglucan produced by *Cellulomonas flavigena* strain KU. J Indus Microbiol. 5: 139-145.

C

- Cabib E.** 1991. Differential inhibition of chitin synthetases 1 and 2 from *Saccharomyces cerevisiae* by polyoxin D and nikkomycins. *Antimicrob Agents Chemother.* 35: 170-173.
- Cabib E., Farkas V.** 1971. The control of morphogenesis: an enzymatic mechanism for the initiation of septum formation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 68: 2052-2056.
- Cabib E., Roh D. H., Schmidt M., Crotti L. B., Varma A.** 2001. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J Biol Chem.* 276: 19679-19682.
- Cantu D., Greve L. C., Labavitch J. M., Powell A. L. T.** 2009. Characterization of the cell wall of the ubiquitous plant pathogen *Botrytis cinerea*. *Mycol Res.* 113: 1396-1403.
- Carrieri C., Cimatti L., Biagioli M., Beugnet A., Zucchelli S., Fedele S., Pesce E., Ferrer I., Collavin L., Santoro C., Forrest A. R. R., Carninci P., Biffo S., Stupka E., Gustincich S.** 2012. Long non-coding antisense RNA controls *Uchl1* translation through an embedded SINEB2 repeat. *Nature.* 491: 454-459.
- Castro C., Ribas J. C., Valdivieso M. H., Varona R., Del Rey F., Duran A.** 1995. Papulacandin B resistance in budding and fission yeasts: isolation and characterization of a gene involved in beta-1,3-D-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 177: 5732-5739.
- Catlett N. L., Yoder O. C., Turgeon B. G.** 2003. Whole-genome analysis of two component signal transduction genes in fungal pathogens. *Euk. Cell.* 2: 1151-1161.
- Charnock S. J., Davies G. J.** 1999. Structure of the nucleotide-diphospho-sugar transferase, SpsA from *Bacillus subtilis*, in native and nucleotide-complexed forms. *Biochemistry.* 38: 6380-5.
- Chiou C. C., Mavrogiorgos N., Tillem E., Hector R., Walsh T. J.** 2001. Synergy, pharmacodynamics, and time-sequenced ultrastructural changes of the interaction between nikkomycin Z and the echinocandin FK463 against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 45: 3310-3321.
- Choi W. J., Cabib E.** 1994. The use of divalent cations and pH for the determination of specific yeast chitin synthetases. *Anal. Biochem.* 219 : 368-372.
- Choi W. J., Santos B. A., Duran, Cabib E.** 1994. Are yeast chitin synthases regulated at the transcriptional or the posttranscriptional level. *Mol Cell Biol.* 14: 7685-7694.
- Choquer M., Becker H. F., Vidal-Cros A.** 2007. Identification of two group A chitinase genes in *Botrytis cinerea* which are differentially induced by exogenous chitin. *Mycol Res.* 111: 615-625.
- Choquer M., Boccara M., Gonçalves I. R., Soulié M.-C., Vidal-Cros A.** 2004. Survey of the *Botrytis cinerea* chitin synthase multigenic family through the analysis of six euascomycetes genomes. *Eur J Biochem.* 271: 2153-2164.
- Choquer M., Fournier E., Kunz C., Levis C., Pradier J.-M., Simon A., Viaud M.** 2007. *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiol Lett.* 277: 1-10.
- Cornely O. A., Schmitz K., Aisenbrey S.** 2002. The first echinocandin: caspofungin. *Mycoses.* 45: 56-60.

- Cos T., Ford R. A., Trilla J. A., Duran A., Cabib E., Roncero C.** 1998. Molecular analysis of Chs3p participation in chitin synthase III activity. *Eur J Biochem.* 256: 419-426.
- Costa A. M. S. B., Mills P. R., Bailey A. M., Foster G. D., Challen M. P.** 2008. Oligonucleotide sequences forming short self-complimentary hairpins can expedite the down-regulation of *Coprinopsis cinerea* genes. *J Microbiol Methods.* 75: 205-208.
- Coutinho P.M., Henrissat B.** 1999. Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. Cambridge: The royal society of chemistry. 3-12.
- Culp D. W., Dodge C. L., Miao Y., Li L., Sag-Ozkal D., Borgia P. T.** 2000. The *chsA* gene from *Aspergillus nidulans* is necessary for maximal conidiation. *FEMS Microbiol Lett.* 182: 349-353.
- Culter J. E.** 2001. N-glycosylation of yeast, with emphasis on *Candida albicans*. *Med Mycol.* 39: 75-86.
- Cumming G., Fidler F., Vaux D. L.** 2007. Error bars in experimental biology. *J Cell Biol.* 177: 7-11.
- Cyert M. S.** 2001. Genetic analysis of calmodulin and its targets in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet.* 35: 647-672.
- Cyert M. S.** 2003. Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: how yeast go crazy in response to stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 311: 1143-1150.

D

- Dallies N. Francois J., Paquet V.** 1998. A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 14: 1297-1306.
- Dean N.** 1995. Yeast glycosylation mutants are sensitive to aminoglycosides. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92 : 1287-1291.
- Debono M., Gordee R. S.** 1994. Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. *Annu Rev Microbiol.* 48: 471-497.
- Delley P. A., Hall M. N.** 1999. Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1. *J Cell Biol.* 147: 163-174.
- Denning D. W.** 2003. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet.* 362: 1142-1151.
- Deresinski S. C., Stevens D. A.** 2003. Caspofungin. *Clin Infect Dis.* 36: 1445-1457.
- Din A. B., Specht C. A., Robbins P. W., Yarden O.** 1996. *chs-4*, a class IV chitin synthase gene from *Neurospora crassa*. *Mol Gen Genet.* 250: 214-22.
- Dodou E., Treisman R.** 1997. The *Saccharomyces cerevisiae* MADS-box transcription factor Rlm1 is a target for the Mpk1 mitogen activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol.* 17: 1848-1859.
- Douglas C. M.** 2001. Fungal beta-1,3-D-glucan synthesis. *Med Mycol.* 39: 55-66.

Douglas C. M., D'Ippolito J. A., Shei G. J., Meinz M., Onishi J., Marrinan J. A., Li W., Abruzzo G. K., Flattery A., Bartizal K., Mitchell A., Kurtz M. B. 1997. Identification of the FKS1 gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3-beta-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 41: 2471-2479.

Douglas C. M., Foor F., Marrinan J. A. Morin N., Nielsen J. B., Dahl A. M., Mazur P., Baginsky W., Li W., El Sherbeini M. 1994a. The *Saccharomyces cerevisiae* FKS1 (ETG1) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of beta-1,3-D-glucan synthase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91: 12907-12911.

Drgonova J., Drgon T., Tanaka K., Kollar R., Chen G. C., Ford R. A., Chan C. S. M., Takai Y., Cabib E. 1996. Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. *Science.* 272: 277-279.

E

Egan J. D., Garcia-Pedrajas M. D., Andrews D. L., Gold S. E. 2009. Calcineurin is an antagonist to PKA protein phosphorylation required for postmating filamentation and virulence, while PP2A is required for viability in *Ustilago maydis*. *Mol Plant-Microb interact.* 22: 1293-1301.

El sherbeini M., Clemas J. A. 1995a. Cloning and characterization of GNS1: a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in synthesis of beta-1,3-glucan *in vitro*. *J. Bacteriol.* 177: 3227-3234.

El sherbeini M., Clemas J. A. 1995b. Nikkomycin Z supersensitivity of an echinocandin-resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob agents chemother.* 39: 200-207.

Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. 2004. *Botrytis*: biology, pathology and control. Kluwer Academics Publishers, Dordrecht, Pays-bas. 428p.

Elzora M. V., Rico H., Sentandreu R. 1983. Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells. *J Gen Microbiol.* 129: 1577-1582.

Elzora M. V., Murgue A., Rico H., Miragall F., Sentandreu R. 1987. Formation of a new cell wall by protoplasts of *Candida albicans*: effect of papulacandin B, tunicamycin and nikkomycin. *J. Gen. Microbiol.* 133: 2315-2325.

Ernst J. F., Prill S. K. 2001. O-glycosylation. *Med Mycol.* 39: 67-74.

F

Firon A., Beauvais A., Latgé J.-P., Couvé E., Grosjean-Cournoyer M.-C., D'Enfert C. 2002. Characterization of essential genes by parasexual genetics in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*: impact of genomic rearrangements associated with electroporation of DNA. *Genetics.* 161: 1077-1087.

Fortwendel J. R., Juvvadi P. R., Perfect B. Z., Rogg L. E., Perfect J. R., Steinbach W. J. 2010. Transcriptional regulation of chitin synthases by calcineurin controls paradoxical growth of *Aspergillus fumigatus* in response to caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother.* 54: 1555-1563.

Fujikawa T., Kuga Y., Yano S., Yoshimi A., Tachiki T., Abe K., Nishimura M. 2009. Dynamics of cell wall components of *Magnaporthe grisea* during infectious structure development. *Mol Microbiology.* 73: 553-570.

Fujikawa T., Sakaguchi A., Nishizawa Y., Kouzai Y., Minami E., Yano S., Koga H., Meshi T., Nishimura M. 2012. Surface α -1,3-glucan facilitates fungal stealth infection by interfering with innate immunity in plants. *PLOS pathogen.* 8: 1-16.

Fujiwara M., Horiuchi H., Ohta A., Takagi M. 1997. A novel fungal gene encoding chitin synthase with a myosin motor-like domain. *Biochem Biophys Res Commun.* 236: 75-78.

G

Galland E., Genix P., Gamet S., Latorse M. P., Poussereau N., Toquin V., Beffa R., Choquer M. 2013. New synergy determination in the Combined Activity in vitro of Caspofungin, Aculeacin A and Nikkomycin Z in *Botrytis cinerea*. Unpublished data.

Garcerá-Teruel A., Xoconostle-Cázares B., Rosas-Quijano R., Ortiz L., León-Ramírez C., Specht C. A., Sentandreu R., Ruiz-Herrera J. 2004. Loss of virulence in *Ustilago maydis* by Umchs6 gene disruption. *Res Microbiol.* 155: 87-97.

Garcia R. Bermejo C., Grau C., Perez R., Rodriguez-Pena J. M., Francois J. et al. 2004. The global transcriptomic response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J Biol Chem.* 279: 15183-15195.

García-Rodríguez L. J., Durán A., Roncero C. 2000. Calcofluor antifungal action depends on chitin and a functional high-osmolarity glycerol response (HOG) pathway: evidence for a physiological role of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG pathway under noninducing conditions. *J Bacteriol.* 182: 2428-2437.

Gaughran J. P., Lai M. H., Kirsch D. R., Silverman S. J. 1994. Nikkomycin Z is a specific inhibitor of *Saccharomyces cerevisiae* chitin synthase isozyme Chs3 *in vitro* and *in vivo*. *J Bacteriol.* 176: 5857-5860.

Gentzsch M., Tanner W. 1996. *The PMT gene family: protein O-glycosylation in Saccharomyces cerevisiae* is vital. *EMBO J.* 15: 5752-9.

Georgopapadakou N. H., Walsh T. J. 1996. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrob Agents Chemother.* 40: 279-291.

Giaver G., Chu A. M., Ni L., and 70 other authors. 2002. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature.* 418: 387-391.

Girrbach V., Zeller T., Priesmeier M., Strahl-Bolsinger S. 2000. Structure-function analysis of the dolichyl phosphate-mannose: protein O-mannosyltransferase ScPmt1p. *J Biol Chem.* 275: 19288-19296.

Gold S., Kronstad J. 1994. Disruption of two genes for chitin synthase in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol.* 11: 897-902.

Goutelle S., Maurin M., Rougier F., Barbaut X., Bourguignon L., Ducher M., Maire P. 2008. The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling. *Fundam Clin Pharmacol.* 22: 633-648.

Grover N. D. 2010. Echinocandins: A ray of hope in antifungal drug therapy. *Indian J Pharmacol.* 42: 9-11.

Grun CH, Hochstenbach F., Humbel B. M., Verkleij A. J., Sietsma J. H., Klis F. M., Kamerling J. P., Vliegthart J. F. 2005. The structure of cell wall alpha-glucan from fission yeast. *Glycobiology* 15: 245-257.

Gummadi S. N., Kumar K. 2005. Production of extracellular water insoluble beta-1,3-glucan (curdlan) from *Bacillus* sp SNC07. *Biotechno Biopro Eng.* 10: 546-551.

Gunasekera A., Alvarez F. J., Douglas L. M., Wang H. X., Rosebrock A. P., Konopka J. B. 2010. Identification of GIG1, a GlcNAc-induced gene in *Candida albicans* needed for normal sensitivity to the chitin synthase inhibitor nikkomycin Z. *Eukaryot Cell.* 9: 1476-1483.

Gustin M. C., Albertyn J., Alexander M., Davenport K. 1998. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62: 1264-1300.

H

Ha Y.-S., Covert S. F., Momany M. 2006. FsFKS1, the 1,3-beta-glucan synthase from the caspofungin-resistant fungus *Fusarium solani*. *Eukaryot Cell.* 5: 1036-1042.

Harada T., Masaki A., Saito H. 1968. Curdlan: a bacterial gel-forming beta-D-1,3-glucan. *Archives of Biochem Biophys.* 124: 292-298.

Harren K, Schumacher J., Tudzynski B. 2012. The Ca²⁺/calcineurin-dependent signaling pathway in the gray mold *Botrytis cinerea*: The role of Calcipressin in modulating calcineurin activity. 7: 1-15.

Harris S. D. 2008. Branching of fungal hyphae: regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. *Mycologia.* 100: 823-832.

Hashimoto H., Sakakibara A., Yamasaki M., Yoda K. 1997. *Saccharomyces cerevisiae* VIG9 encodes a GDP-mannose pyrophosphorylase which is essential for glycosylation. *J. Biol. Chem.* 272: 16308-16314.

Hausler A., Ballou L., Ballou C. E., Robbins P. W. 1992. Yeast glycoprotein biosynthesis : MNT1 encodes an alpha-1,2-mannosyltransferase involved in O-glycosylation. Proc Natl Acad Sci USA. 89: 6846-6850.

Henry C., Latge J. P., Beauvais A. 2012. α 1,3 glucans are dispensable in *Aspergillus fumigatus*. Eukaryot Cell. 11: 26-9

Herscovics A., Orlean P. 1993. Glycoprotein biosynthesis in yeast. FASEB J. 7: 540-550.

Herth W., Schnepf S. 1980. The fluorochrome calcofluor white binds oriented to structural polysaccharide fibrils. Protoplasma. 105: 129-133.

Hiramoto F., Nomura N., Furumai T., Igarashi Y., Oki T. 2005. Pradimicin resistance of yeast is caused by a mutation of the putative N-glycosylation sites of osmosensor protein Sln1. Biosci Biotechnol Biochem. 69: 238-241.

Hochstenbach F, Klis F. M., van den Ende H., van Donselaar E., Peters P. J., Klausner R. D. 1998. Identification of a putative alpha-glucan synthase essential for cell wall construction and morphogenesis in fission yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95: 9161–9166.

Hogan LH, Klein BS. 1994. Altered expression of surface alpha-1,3-glucan in genetically related strains of *Blastomyces dermatitidis* that differ in virulence. Infect. Immun. 62: 3543–3546.

Hohmann S. 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. Microbiol Mol Biol Rev. 66 : 300-372.

I

Ichinomiya M., Ohta A., Horiuchi H. 2005. Expression of asexual developmental regulator gene abaA is affected in the double mutants of classes I and II chitin synthase genes, chsC and chsA, of *Aspergillus nidulans*. Curr Genet. 48: 171-183.

Immervoll T., Gentsch M., Tanner W. 1995. PMT3 and PMT4, two new members of the protein-O-mannosyltransferase gene family of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 11: 1345-1351.

Ishihara S., Hirata A., Nogami S., Beauvais A., Latge J.-P., Ohya Y. 2007. Homologous subunits of 1,3-beta-glucan synthase are important for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryot Cell. 6: 143-156.

J

Jiang B., Sheraton J., Ram A. F., Dijkgraaf G. J., Klis F. M., Bussey H. 1996. CWH41 encodes a novel endoplasmic reticulum membrane N-glycoprotein involved in beta-1,6-glucan assembly. J Bacteriol. 178: 1162-1171.

Jigami Y., Odani T. 1999. Mannosylphosphatase transfer to yeast mannan. *Biochim Biophys Acta*.1426: 335-345.

Jung U. S., Levin D. E. 1999. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity pathway. *Mol Microbiol.* 34: 1049-1057.

Juvvadi P. R., Kuroki Y., Arioka M., Nakajima H., Kitamoto K. 2003. Functionnal analysis of the calcineurin-encoding gene *cnaA* from *Aspergillus oryzae*: Evidencefor its putative role in stress adaptation. *Arch Microbiol.* 179: 416-422.

K

Kafadar K. A., Cyert M. S. 2004. Integration of stress responses : modulation of calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae* by protein kinase A. *Eukaryot Cell.* 3: 1147-1153.

Kamada Y., Jung U. S., Piotrowski J., Levin D. E. 1995. The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev.* 9: 1559-1571.

Kamada Y., Qadota H., Python C. P., Anraku Y., Ohya Y., Levin D. E. 1996. Activation of yeast protein kinase C by Rho1 GTPase. *J Biol Chem.* 271: 9193-9196.

Kaneko Y., Ohno H., Kohno S., Miyazaki Y. 2010. Micafungin alters the expression of genes related to cell wall integrity in *Candida albicans* biofilms. *Jpn J Infect Dis.* 63: 355-357.

Kang M. S., Cabib E. 1986. Regulation of fungal cell wall growth: a guanine nucleotide binding, proteinaceous component required for activity of beta-1,6-D-glucan synthase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83: 5808-5812.

Kapteyn J. C., ter Riet B., Vink E., Blad S., De Nobel H., Van den Ende H., Klis F. M. 2001. Low external pH induces HOG1-dependant changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol Microbiol.* 39: 469-479.

Kapteyn J. C., Van den Ende H., Klis F. M. 1999a. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochem Biophys Acta.* 1426: 373-383.

Kapteyn J. C., Van Egmond P., Sievi E., Van den Ende H., Makarow M., Klis F. M. 1999b. The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild type cells and beta-1,6-glucan deficient mutants. *Mol Microbiol.* 31: 1835-1845.

Kawai M., Nakashima A., Ueno M., Ushimaru T., Aiba K. 2001. Fission yeast Tor1 functions in response to various stresses including nitrogen starvation, high osmolarity, and high temperature. *Curr Genet.* 39: 166-174.

Kellner E. M., Orsborn K. I., Siegel E. M., Mandel M. A., Orbach M. J., Galgiani J. N. 2005. *Coccidioides posadasii* contains a single 1,3-beta-glucan synthase gene that appears to be essential for growth. *Eukaryot Cell.* 4: 111-120.

Kenyon W. J., Buller C. S. 2002. Structural analysis of the curdlan-like exopolysaccharide produced by *Cellulomonas flavigena* KU. J Indus Microbiol. 29: 200-203.

Kenyon W. J., Esch S. W., Buller C. S. 2005. The curdlan-type exopolysaccharide produced by *Cellulomonas flavigena* KU form part of an extracellular glycocalyx involved in cellulose degradation. Antonie van Leeuwenhoek. 87: 143-148.

Kepes F., Schekman R. 1988. The yeast SEC53 gene encodes phosphomannomutase. J Biol Chem. 263 : 9155-9161.

Khalaj V., Smith L., Brookman J., Tuckwell D. 2004. Identification of a novel class of annexin genes. FEBS Lett. 562: 79-86.

Khoushab F., Yamabhai M. 2010. Chitin research revisited. Mar Drugs. 8: 1988-2012.

Kim K. S., Min J. Y., Dickman M. B. 2008. Oxalic acid is an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development. Mol Plant Microbe Interact. 21: 605-12.

Klis F. M. 1994. Review : cell wall assembly in yeast. Yeast. 10 : 851-869.

Kojima K., Kikuchi T., Takano Y., Oshiro E., Okuno T. 2002. The mitogen-activated protein kinase gene MAF1 is essential for the early differentiation phase of appressorium formation in *Colletotrichum lagenarium*. Mol Plant Microbe Interact. 15: 1268-76.

Kollár R., Reinhold B. B., Petráková E., Yeh H. J., Ashwell G., Drgonová J., Kapteyn J. C., Klis F. M., Cabib E. 1997. Architecture of the yeast cell wall. Beta(1-->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-->)3-glucan, and chitin. J Biol Chem. 272: 17762-17775.

Krainer E., Stark R. E., Naider F., Alagramam K., Becker J. M. 1994. Direct observation of cell wall glucans in whole cells of *Saccharomyces cerevisiae* by magic-angle spinning ¹³C-NMR. Biopolymers. 34: 1627-1635.

Kraus P. R., Heitman J. 2003. Coping with stress: Calmodulin and Calcineurin in model and pathogenic fungi. Biochem Biophys Res Commun. 311: 1151-1157.

Kunz J., Hall M. N. 1993. Cyclosporin A, FK506 and rapamycin: more than just immunosuppression. Trends Biochem Sci. 18: 334-338.

L

Lagorce A., Hauser N. C., Labourdette D., Rodriguez C., Martin-Yken H., Arroyo J. et al. 2003. Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem. 278: 20345-20357.

Lagorce A., Le Berre-Anton V., Aguilar-Uscanga B., Martin-Yken H., Dagkessamanskaia A., François J. 2002. Involvement of *GFA1*, which encodes glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase, in the activation of the chitin synthesis pathway in response to cell-wall defects in *Saccharomyces cerevisiae*. Eur J Biochem. 269: 1697-707.

- Latgé J.-P.** 1999. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. Clin Microbiol Rev. 12: 310-350.
- Latgé J.-P.** 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. 66: 279-290.
- Latgé J.-P.** 2010. Tasting the fungal cell wall. Cell Microbiol. 12 : 863-872.
- Leal-Morales C. A., Bracker C. E., Bartnicki-Garcia S.** 1988. Localization of chitin synthetase in cell-free homogenates of *Saccharomyces cerevisiae*: chitosomes and plasma membrane. Proc Natl Acad Sci U S A. 85: 8516-8520.
- Leal-Morales C. A., Bracker C. E., Bartnicki-Garcia S.** 1994. Subcellular localization, abundance and stability of chitin synthetase 1 and 2 from *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology. 140: 2207-2216.
- Lee J. I., Choi J. H., Park B. C., Park Y. H., Lee M. Y., Park H.-M., Maeng P. J.** 2004. Differential expression of the chitin synthase genes of *Aspergillus nidulans*, chsA, chsB, and chsC, in response to developmental status and environmental factors. Fungal Genet Biol. 41: 635-646.
- Lee S.-I.** 2010. Drug interaction: focusing on response surface models. Korean J Anesthesiol. 58: 421-434.
- Leroux P.** 2003. Modes of action of agrochemicals against plant pathogenic organisms. C R Biol. 326: 9-21.
- Lesage G., Bussey H.** 2006. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Mol Biol Rev. 70: 317-343.
- Letscher-Bru V., Herbrecht R.** 2002. La caspofungine, une nouvelle arme dans le traitement des aspergilloses invasives. journal de mycologie medicale. 12 : 121-125.
- Letscher-Bru V., Herbrecht R.** 2003. Caspofungin: the first representative of a new antifungal class. J Antimicrob Chemother. 51: 513-521.
- Levin D. E.** 2005. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Mol Biol Rev. 69: 262-91.
- Levis C, Giraud T, Dutertre M, Fortini D, Brygoo Y.** 1997. Telomeric DNA of *Botrytis cinerea*: a useful tool for strain identification. FEMS Microbiol Lett. 157 :267-72.
- Li S., Ault A., Malone C. L., Raitt D., Dean S., Johnston L. H., Deschesnes R. J., Fassler J. S.** 1998. The yeast histidine protein kinase Sln1p mediates phosphotransfer to two response regulators, Ssk1p and Skn7p. EMBO J. 17: 6952-6962.
- Lipke P. N., Ovalle R.** 1998. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. J Bacteriol. 180: 3735-3740.
- Lippman E., Erwin D. C., Bartnicki-Garcia S.** 1974. Isolation and chemical composition of oospore-oogonium walls of *Phytophthora megasperma var. sojae*. J. Gen. Microbiol. 80: 131-141.

Liu T. T., Lee R. E. B., Barker K. S., Lee R. E., Wei L., Homayouni R., Rogers P. D. 2005. Genome-wide expression profiling of the response to azole, polyene, echinocandin, and pyrimidine antifungal agents in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 2226-2236.

Liu W.et al. 2008. The HOG1-like MAPK Sak1 of *Botrytis cinerea* is negatively regulated by the upstream histidine kinase Bos1 and is not involved in dicarboximide and phenylpyrrole resistance. *Fungal Genet Biol.* 45: 1062-1074.

Lu C. F., Montijn R. C., Brown J. L., Klis F., Kurjan J., Bussey H., Lipke P. N. 1995. Glycosylphosphatidylinositol-dependant cross-linking of alpha-agglutinin and beta-1,6-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J Cell Biol.* 128: 333-340.

Lui H., Kauffman S., Becker J. M., Szanislo P. J. 2004. *Wangiella (Exophiala) dermatitidis* WdChs5p, a class V chitin synthase, is essential for sustained cell growth at temperature of infection. *Eukaryot Cell.* 3: 40-51.

Lussier M., Gentsch M., Sdicu A. M., Bussey H., Tanner W. 1995a. Protein O-glycosylation in yeast. The PMT2 gene specifies a second protein O-mannosyltransferase that functions in addition to the PMT1-encoded activity. *J Biol Chem.* 270: 2770-2775.

Lussier M., Sdicu A., Ketela T., Bussey H. 1995b. Localization and targeting of the *Saccharomyces cerevisiae* Kre2p/Mnt1p alpha-1,2-mannosyltransferase to a medial-golgi compartment. *J Cell Biol.* 131 : 913-927.

Lussier M., White A.-M., Sheraton J., di Paolo T., Treadwell J., Southard S. B., Horenstein C. I., Chen-Weiner J., Ram A. F. J., Kapteyn J. C., Roemer T. W., Vo D. H., Bondoc D. C., Hall J., Zhong W. W., Sdicu A.-M., Davies J., Klis F. M., Robbins P. W., Bussey H. 1997b. Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 147: 435-450.

M

Madden K., Sheu Y. J., Baetz K., Andrews B., Snyder M. 1997. SBF cell cycle regulator as a target of the PKC-MAP kinase pathway. *Science .* 275: 1781-1784.

Madrid M. P., Di Pietro A., Roncero M. I. G. 2003. Class V chitin synthase determines pathogenesis in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* and mediates resistance to plant defence compounds. *Mol Microbiol.* 47: 257-266.

Maeda H., Ishida N. 1967. Specificity of binding hexopyranosyl polysaccharides with fluorescent brightener. *J. Biochem (Tokyo).* 62: 276-278.

Magnelli P., Cipollo J. F., Abeijon C. 2002. A refined method for the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall composition and beta-1,6-glucan fine structure. *Anal Biochem.* 301: 136-150.

Manners D. J., Masson A. J., Patterson J. C. 1973. The structure of beta-1,3-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem J.* 135 :19-30.

- Martínez-Rocha A. L., Roncero M. I. G., López-Ramírez A., Mariné M., Guarro J., Martínez-Cadena G., Di Pietro A.** 2008. Rho1 has distinct functions in morphogenesis, cell wall biosynthesis and virulence of *Fusarium oxysporum*. *Cell Microbiol.* 10: 1339-1351.
- Martín-Urdíroz M., Roncero M. I. G., González-Reyes J. A., Ruiz-Roldán C.** 2008. ChsVb, a class VII chitin synthase involved in septation, is critical for pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Eukaryot Cell.* 7: 112-121.
- Maubon D., Park S., Tanguy M., Huerre M., Schmitt C., Prévost M. C., Perlin D. S., Latgé J. P., Beauvais A.** 2006. AGS3, an alpha(1-3)glucan synthase gene family member of *Aspergillus fumigatus*, modulates mycelium growth in the lung of experimentally infected mice. *Fungal Genet. Biol.* 43: 366–375.
- Mazur P., Baginsky W.** 1996. In vitro activity of beta-1,3-D-glucan synthase required the GTP-binding protein Rho1. *J Biol Chem.* 271: 14604-14609.
- Mazur P., Morin N., Baginsky W., El Sherbeini M., Clemas J. A., Nielsen J. B., Foor F.** 1995. Differential expression and function of two homologous subunits of yeast beta-1,3-D-glucan synthase. *Mol Cell Biol.* 15: 5671-5681.
- McCarthy P. J., Troke P. F., Gull K.** 1985. Mechanism of action of nikkomycin and the peptide transport system of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol.* 131: 775-780.
- Mehrabi R., Van der Lee T., Waalwijk C., Gert H. J.** 2006. MgSlT2, a cellular integrity MAP kinase gene of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*, is dispensable for penetration but essential for invasive growth. *Mol Plant Microbe Interact.* 19: 389-98.
- Mehta R. J., Kingsbury W. D., Valenta J., Actor P.** 1984. Anti-*Candida* activity of polyoxin: example of peptide transport in yeasts. *Antimicrob Agents Chemother.* 25: 373-374.
- Meletiadiis J., Pournaras S., Roilides E., Walsh T. J.** 2010. Defining fractional inhibitory concentration index cutoffs for additive interactions based on self-drug additive combinations, Monte Carlo simulation analysis, and in vitro-in vivo correlation data for antifungal drug combinations against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 54: 602-609.
- Mellado E., Aufauvre-Brown A., Gow N. A., Holden D. W.** 1996. *The Aspergillus fumigatus* chsC and chsG genes encode class III chitin synthases with different functions. *Mol Microbiol.* 20: 667-79.
- Mengin-Lecreulx D., van Heijenoort J.** Copurification of glucosamine-1-phosphate acetyltransferase and N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase activities of *Escherichia coli*: characterization of the glmU gene product as a bifunctional enzyme catalyzing two subsequent steps in the pathway for UDP-N-acetylglucosamine synthesis. *J Bacteriol.* 176: 5788-95.
- Merzendorfer H.** 2006. Insect chitin synthases: a review. *J Comp Physiol B.* 176: 1-15.
- Merzendorfer H.** 2011. The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: common principles and differences. *Eur J Cell Biol.* 90: 759-769.
- Meyer V., Damveld R. A., Arentshorst M., Stahl U., van den Hondel C. A. M. J. J., Ram A. F. J.** 2007. Survival in the presence of antifungals: genome-wide expression profiling of *Aspergillus niger* in

response to sublethal concentrations of caspofungin and fenpropimorph. *J Biol Chem.* 282: 32935-32948.

Mio T., Adachi-Shimizu M., Tachibana Y., Tabuchi H., Inoue S. B., Yabe T., Yamada-Okabe T., Arisawa M., Watanabe T., Yamada-Okabe H. 1997. Cloning of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* GSC1/FKS1 and its involvement in beta-1,3-glucan synthesis. *J Bacteriol.* 179: 4096-4105.

Mio T., Yabe T., Sudoh M., Satoh Y., Nakajima T., Arisawa M., Yamada-Okabe H. 1996. Role of three chitin synthase genes in the growth of *Candida albicans*. *J Bacteriol.* 178: 2416-2419.

Montijn R. C., Vink E., Müller W. H., Verkleij A. J., Van Den Ende H., Henrissat B., Klis F. M. 1999. Localization of Synthesis of β 1,6-Glucan in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 181: 7414–7420.

Morcx S., Kunz C., Choquer M., Assie S., Blondet E., Simond-Cote E., Gajek K., Chapeland-Leclerc F., Expert D., Soulie M. C. 2013. Disruption of *bcchs4*, *bcchs6* or *bcchs7* chitin synthase genes in *Botrytis cinerea* and the essential role of class VI chitin synthase (*bcchs6*). *Fungal genet biol.*

Morgan B. A., Banks G. R., Toone W. M., Raitt D., Kuge S., Johnston L. H. 1997. The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 16: 1035-1044.

Morgan B. A., Bouquin N., Merrill G. F., Johnston L. H. 1995. A yeast transcription factor bypassing the requirement for SBF and DSC1/MBF in budding yeast has homology to bacterial signal transduction proteins. *EMBO J.* 14: 5679-5689.

Motoyama T., Fujiwara M., Kojima N., Horiuchi H., Ohta A., Takagi M. 1997. The *Aspergillus nidulans* genes *chsA* and *chsD* encode chitin synthases which have redundant functions in conidia formation. *Mol Gen Genet.* 253: 520-528.

Motoyama T., Kadokura K., Ohira T., Ichiishi A., Fujimura M., Yamaguchi I., Kudo T. 2005a. A two component histidine kinase of the rice blast fungus is involved in osmotic stress response and fungicide action. *Fung Genet Biol.* 42: 200-212.

Motoyama T., Kojima N., Horiuchi H., Ohta A., Takagi M. 1994. Isolation of a chitin synthase gene (*chsC*) of *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 58: 2254-2257.

Mouyna I., Henry C., Doering T. L., Latgé J.-P. 2004. Gene silencing with RNA interference in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett.* 237: 317-324.

Muller C., Hjort C. M., Hansen K, Nielsen J. 2002. Altering the expression of two chitin synthase genes differentially affects the growth and morphology of *Aspergillus oryzae*. *Microbiol.* 148: 4025-4033.

Munro C. A. 2010. Fungal echinocandin resistance. *F1000 Biol Rep.* 2: 66.

Munro C. A., Winter K., Buchan A., Henry K., Becker J. M., Brown A. J., Bulawa C. E., Gow N. A. 2001. *Chs1* of *Candida albicans* is an essential chitin synthase required for synthesis of the septum and for cell integrity. *Mol Microbiol.* 39: 1414-1426.

N

Nagata T., Takebe I. 2002. Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplast. *Planta* (Berlin). 92: 301-308.

Nakanishi I., Kimura K., Suzuki T., Ishikawa M., Banno I., Sakane T., Harada T. 1976. Demonstration of curdlan-type polysaccharide and some other beta-1,3-glucans in microorganisms with aniline blue. *J Gen App Microbiol.* 22: 1-11.

Nino-Vega G. A., Carrero L., San-Blas G. 2004. Isolation of the CHS4 gene of *Paracoccidioides brasiliensis* and its accommodation in a new class of chitin synthases. *Med Mycol.* 42: 51-57.

Nitschke J., Altenbach H.-J., Malolepszy T., Mölleken H. 2011. A new method for the quantification of chitin and chitosan in edible mushrooms. *Carbohydr Res.* 1: 1-12.

Noishiki Y., Nishiyama Y., Wada M., Kuga S. 2005. Complexation of alpha-chitin with aliphatic amines. *Biomacromolecules.* 6: 2362-2364.

Nonaka H., Tanaka K., Hirano H., Fujiwara T., Kohno H., Umikawa M., Mino A., Takai Y. 1995. A downstream target RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14: 5931-5938.

Notario V., Kawai H., Cabib E. 1982. Interaction between yeast beta-1,3-glucan synthetase and activating phosphorylated compounds. A kinetic study. *J Biol Chem.* 257: 1902-1905.

Nuoffer C., Horvath A., Riezman H. 1993. Analysis of the sequence requirements for glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Saccharomyces cerevisiae* Gas1 protein. *J. Biol Chem.* 268: 10558-10563.

O

Ochiai N., Fujimura M., Motoyama T., Ichiishi A., Usami R., Horikoshi K., Yamaguchi I. 2001. Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene that confer fludioxonil resistance and osmotic sensitivity in the Os-1 mutants of *Neurospora crassa*. *Pest Manag Sci.* 57: 437-442.

Onishi J., Meinz M., Thompson J., Curotto J., Dreikorn S., Rosenbach M., Douglas C., Abruzzo G., Flattery A., Kong L., Cabello A., Vicente F., Pelaez F., Diez M. T., Martin I., Bills G., Giacobbe R., Dombrowski A., Schwartz R., Morris S., Harris G., Tsiouras A., Wilson K., Kurtz M. B. 2000. Discovery of novel antifungal (1,3)-beta-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 44: 368-377.

Orlean P. 1997. Biogenesis of yeast cell wall and surface components in the molecular biology and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*. Cold Spring Harbor laboratory Press, NY. Pp. 229-362.

Orlean P., Kuranda M. J., Albrigh C. F. 1991. Analysis of glycoproteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* **194**: 682-697.

Osmond B. C., Specht C. A., Robbins P. W. 1999. Chitin synthase III: synthetic lethal mutants and "stress related" chitin synthesis that bypasses the CSD3/CHS6 localization pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**: 11206-11210.

Ouedraogo J. P., Hagen S., Spielvogel A., Engelhardt S., Meyer V. 2011. Survival Strategies of Yeast and Filamentous Fungi against the Antifungal Protein AFP. *J Biol Chem.* **286**: 13859-13868.

Ozaki K., Tanaka K., Imamura H., Hihara T., Kameyama T., Nonaka H., Hirano H., Matsuura Y., Takai Y. 1996. Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **15**: 2196-2207.

P

Paravicini G., Cooper M., Friedli L., Smith D. J., Carpentier J. L., Klig L. S., Payton M. A. 1992. The osmotic integrity of the yeast cell requires a functional PKC1 gene product. *Mol Cell Biol.* **12**: 4896-4905.

Pareja-Jaime Y., Martín-Urdíroz M., González Roncero M. I., González-Reyes J. A., Del Carmen Ruiz Roldán M. 2010. Chitin synthase-deficient mutant of *Fusarium oxysporum* elicits tomato plant defence response and protects against wild-type infection. *Mol Plant Pathol.* **11**: 479-493.

Patel R. M., Heneghan M. N., van Kan J. A. L., Bailey A. M., Foster G. D. 2008. The pOT and pLOB vector systems: improving ease of transgene expression in *Botrytis cinerea*. *J Gen Appl Microbiol.* **54**: 367-376.

Perea S., Gonzalez G., Fothergill A. W., Kirkpatrick W. R., Rinaldi M. G., Patterson T. F. 2002. *In vitro* interaction of caspofungin acetate with voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus spp.* *Antimicrob Agents Chemother.* **46**: 3039-3041.

Pinedo C., Wang C. M., Pradier J. M., Dalmais B., Choquer M., Le Pêcheur P., Morgant G., Collado I. G., Cane D. E., Viaud M. 2008. Sesquiterpene synthase from the botrydial biosynthetic gene cluster of the phytopathogen *Botrytis cinerea*. *ACS Chem Biol.* **3**: 791-801.

Richard M. L., Plaine A. 2007. Comprehensive analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* **6**: 119-33.

Popolo L., Gilardelli D., Bonfante P., Vai M. 1997. Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the ggp1delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* **179**: 463-469.

Popolo L., Gualtieri D., Ragni E. 2001. The yeast cell-wall salvage pathway. *Med Mycol.* **39**: 111-121.

Posas F., Wurgler-Murphy S. M., Maeda T., Witten E. A., Thai T. C., Saito H. 1996. Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YDP1-SSK1 “two component” osmosensor. *Cell*. 86: 865-875.

Q

Qadota H., Python C. P., Inoue S. B., Arisawa M., Anraku Y., Zheng Y., Watanabe T., Levin D. E., Ohya Y. 1996. Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science*. 272: 279-281.

Quidde, T., Buttner, P. and Tudzynski, P. 1999. Evidence for three different specific saponin-detoxifying activities in *Botrytis cinerea* and cloning and functional analysis of a gene coding for a putative avenacinase. *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 273–283.

R

Ram A. F., Brekelmans S. S., Oehlen L. J., Klis F. M. 1995. Identification of two cell cycle regulated genes affecting the beta-1,3-glucan content of cell walls in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*. 358: 165-170.

Rapple C. A., Engle J. T., Goldman W. E. 2004. RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for alpha-(1,3)-glucan in virulence. *Mol. Microbiol.* 53: 153–165

Rattee I. D., Greur M. M. 1974. The physical chemistry of dye absorption. Academic Press New York.

Reese A. J., Doering T. L. 2003. Cell wall alpha-1,3-glucan is required to anchor the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Mol. Microbiol.* 50: 1401–1409.

Reese A. J., Yoneda A., Breger J. A., Beauvais A., Liu H., Griffith C. L., Bose I., Kim M. J., Skau C., Yang S., Sefko J. A., Osumi M., Latge J. P., Mylonakis E., Doering T. L. 2007. Loss of cell wall alpha(1-3) glucan affects *Cryptococcus neoformans* from ultrastructure to virulence. *Mol. Microbiol.* 63: 1385–1398.

Reiser V., Ammerer G., Ruis H. 1999. Nucleocytoplasmic traffic of MAP kinases. *Gene Expr* 7:247-254.

Robledo-Briones M., Ruiz-Herrera J. 2012. Transcriptional regulation of the genes encoding chitin and β -1,3-glucan synthases from *Ustilago maydis*. *Curr Microbiol.* 65: 85-90.

Roemer T., bussey H. 1991. Yeast beta-glucan synthesis : KRE6 encodes a predicted type II membrane protein required for glucan synthesis *in vivo* for glucan synthase activity *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88: 2549-2558.

Roemer T., bussey H. 1995. Yeast Kre1p is a cell surface O-glycoprotein. *Mol Gen Genet.*249: 209-216.

Roemer T., Paravicini G., Payton M. A., Bussey H. 1994. Characterization of the yeast beta-1,6-glucan biosynthetic components, Kre6p and Skn1p and genetics interactions between PKC1 pathway and extracellular matrix assembly. *J. Cell. Biol.* 127: 567-579.

Roncero C. 2002. The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Curr Genet.* 41: 367-378.

Roncero C., Durán A. 1985. Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: *in vivo* activation of chitin polymerization. *J. Bacteriol.* 163: 1180-1185.

Rudall K. M., Kenchington W. 1973. The chitin system. *Biological reviews.* 48: 597-633.

Rui O., Hahn M. 2008. The Slr2-type MAP kinase Bmp3 of *Botrytis cinerea* is required for normal saprotrophic growth, conidiation, plant surface sensing and host tissue colonization. *Mol Plant Pathol.* 8: 173-184.

Ruiz C., Cid V. J., Lussier M., Molina M., Nombela C. 1999. A large-scale sonication assay for cell wall mutant analysis in yeast. 15: 1001-1008.

Ruiz-Herrera J. 1992. Fungal cell wall: structure, synthesis and assembly. CRC Press, Boca Raton.

Ruiz-Herrera J., Elorza M. V., Valentín E., Sentandreu R. 2006. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res.* 6: 14-29.

Ruiz-Herrera J., Gonzales-Prieto J. M., Ruiz-Medrano R. 2002. Evolution and phylogenetic relationships of chitin synthases from yeasts and fungi. *FEMS Yeast Res.* 1: 247-256.

Ruiz-Herrera J., Ortiz-Castellanos L. 2010. Analysis of the phylogenetic relationships and evolution of the cell walls from yeasts and fungi. *FEMS Yeast Res.* 10: 225-243.

Ruiz-Herrera J., San Blas G. 2003. Chitin synthesis as target for antifungal drugs. *Curr Drug Targets Infect Disord.* 3: 77-91.

Rusnak F., Mertz P. 2000. Calcineurin: form and function. *Physiol Rev.* 80 : 1483-1521.

S

Saliba F. 2010. L'anidulafugine : etat de la literature. *journal de mycologie medicale.* 20 : 206-211.

Saxena I. M., Brown R. M., Fevre M., Geremia R. A., Henrissat B. 1995. Multidomain architecture of beta-glycosyl transferases: implications for mechanism of action. *J. Bacteriol.* 177: 1419-1424.

Schimoler-O'Rourke R., Renault S., Mo W., Selitrennikoff C. P. 2003. *Neurospora crassa* FKS protein binds to the (1,3)beta-glucan synthase substrate, UDP-glucose. *Curr Microbiol.* 46: 408-412.

Schumacher J., de Larrinoa I. F., Tudzynski B. 2008. Calcineurin-responsive zinc finger transcription factor CRZ1 of *Botrytis cinerea* is required for growth development and full virulence on bean plants. 7: 584-601.

- Segmuller N., Ellendorf U., Tudzynski B., Tudzynski P.** 2007. BcSAK1 a stress-activated mitogen-activated protein kinase, is involved in vegetative differentiation and pathogenicity in *Botrytis cinerea*.
- Serrano R., Martin H., Casamayor A., Arino J.** 2006. Signaling alkaline pH stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* through the Wsc1 cell surface sensor and the Slt2 MAPK pathway. *J Biol Chem.* 281: 39785-39795.
- Shahinian S., Bussey H.** 2000. Beta-1,6-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 35: 477-489.
- Shahinian S., Dijkgraaf G. J., Sdicu A. M., Thomas D. Y., Jakob C. A., Aebi M., Bussey H.** 1998. Involvement of protein N-glycosyl chain glucosylation and processing in the biosynthesis of the cell wall beta-1,6-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 149: 843-856.
- Shahzad-ul-Hussan S., Ghirlando R., Dogo-Isonagie C. I., Igarashi Y., Balzarini J., Bewley C. A.** 2012. Characterization and carbohydrate specificity of pradimicin S. *J Am Chem Soc.* 134: 12346-9.
- Shaw J. A., Mol P. C., Bowers B., Silverman S. J., Valdivieso M. H., Durán A., Cabib E.** 1991. The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J Cell Biol.* 114: 111-123.
- Shematek E. M., Braatz J. A., Cabib E.** 1980a. Biosynthesis of the Yeast cell wall. I. preparation and properties of beta-1,3-glucan synthetase. *J Biol Chem.* 255: 888-894.
- Simons J. F., Ebersold M., Helenius A.** 1998. Cell wall beta-1,6-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* depends on ER glucosidases I and II, and the molecular chaperone BiP/Kar2p. *EMBO J.* 17: 396-405.
- Smits G. J., Kapteyn J. C., Van den eden H., Klis F. M.** 1999. Cell wall dynamics in yeast. *Curr Opin Microbiol.* 2: 348-352.
- Smits G. J., Van den Eden H, Klis F. M.** 2001. Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology.* 147: 781-794.
- Soulié M-C., Perino C., Piffeteau A., Choquer M., Malfatti P., Cimerman A., Kunz C., Boccara M., Vidal-Cros A.** 2006. *Botrytis cinerea* virulence is drastically reduced after disruption of chitin synthase class III gene (Bcchs3a). *Cell Microbiol.* 8: 1310-1321.
- Soulié M-C., Piffeteau A., Choquer M., Boccara M., Vidal-Cros A.** 2003. Disruption of *Botrytis cinerea* class I chitin synthase gene Bcchs1 results in cell wall weakening and reduced virulence. *Fungal Genet Biol.* 40: 38-46.
- Spetch C. A., Liu Y., Robbins P. W., Bulawa C. E., Iartchouk N., Winter K. R., Riggle P. J., Rhodes J. C., Dodge C. L., Culp D. W., Borgia P. T.** 1996. The chsD and chsE genes of *Aspergillus nidulans* and their roles in chitin synthesis. *Fungal Genet Biol.* 20: 153-167.
- Stasinopoulos S. J., Fisher P. R., Stone B. A., Stanisich V. A.** 1999. Detection of two loci involved in (1-3)-beta-glucan (curdlan) biosynthesis by *Agrobacterium sp.* ATCC31749, and comparative sequence analysis of the putative curdlan synthase gene. *Glycobiology.* 9: 31-41.

Stathopoulos A. M., Cyert M. S. 1997. Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1 encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev.* 11: 3432-3444.

Stevens D. A., Espiritu M., Parmar R. 2004. Paradoxical effect of caspofungin: reduced activity against *Candida albicans* at high drug concentrations. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 3407-3411.

Stone E. A., Fung H. B., Kirschenbaum H. L. 2002. Caspofungin: an echinocandin antifungal agent. *Clin Ther.* 24: 351-77.

Strahl-Bolsinger S., Gentzsch M., Tanner W. 1999. Protein O-mannosylation. *Biochim Biophys Acta.* 1426 : 297-307.

Suresh K., Subramanyam C. 1997. A putative role for calmodulin in the activation of *Neurospora crassa* chitin synthase. *FEMS Microbiol Lett.* 150: 95-100.

T

Takeshita N, Yamashita S, Ohta A, Horiuchi H. 2006. *Aspergillus nidulans* class V and VI chitin synthases CsmA and CsmB, each with a myosin motor-like domain, perform compensatory functions that are essential for hyphal tip growth. *Mol Microbiol.* 59: 1380-94.

Tammes P.M.L. 1964. Isoboles, a graphic representation of synergism in pesticides. *netherlands journal of plant pathology.* 70: 73-80.

Tariq V. N., Devlin P. L. 1996. Sensitivity of fungi to nikkomycin Z. *Fungal Genet Biol.* 20: 4-11.

ten Have A., Breuil W. O., Wubben J. P., Visser J., van Kan J. A. 2001. *Botrytis cinerea* endopolygalacturonase genes are differentially expressed in various plant tissues. *Fungal Genet Biol.* 33: 97-105.

Tentler S., Palas J., Enderlin C., Campbell J., Taft C., Miller T. K., Wood R. L., Selitrennikoff C. P. 1997. Inhibition of *Neurospora crassa* growth by a glucan synthase-1 antisense construct. *Curr Microbiol.* 34: 303-308.

Thompson J. R., Douglas C. M., Li W., Jue C. K., Pramanik B., Yuan X., Rude T. H., Toffaletti D. L., Perfect J. R., Kurtz M. 1999. A glucan synthase FKS1 homolog in *Cryptococcus neoformans* is single copy and encodes an essential function. *J Bacteriol.* 181: 444-453.

Timpel C., Zink S., Strahl-Bolsinger S., Schroppel K., Ernst J. 2000. Morphogenesis adhesive properties and antifungal resistance depend on the Pmt6 protein mannosyltransferase in the fungal pathogen *Candida albicans*. *J. bacterial.* 182: 3063-3071.

Treitschke S, Doehlemann G, Schuster M, Steinberg G. 2010. The myosin motor domain of fungal chitin synthase V is dispensable for vesicle motility but required for virulence of the maize pathogen *Ustilago maydis*. *Plant Cell.* 22: 2476-94.

Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 5116-21. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**; 98: 10515.

U

Uchida Y., Shimmi O., Sudoh M., Arisawa M., Yamada-Okabe H. 1996. Characterization of chitin synthase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*. Both full size and processed enzymes are active for chitin synthesis. *J biochem (Tokyo).* 119: 659-666.

V

Valiente V., Jain R., Heinekamp T., Brakhage A. A. 2009. The MpkA MAP kinase module regulates cell wall integrity signaling and pyomelanin formation in *Aspergillus fumigatus*.

Valiente V., Heinekamp T., Jain R., Hartl A., Brakhage A. A. 2007. The mitogen-activated protein kinase MpkA of *Aspergillus fumigatus* regulates cell wall signaling and oxidative stress response. *Fungal Genetics and Biology.* 1887-1845

van Kan J. A. L. 2006. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci.* 11: 247-253.

Viaud M., Fillinger S., Liu W., Polepalli J. S., Pecheur P. L., Kunduru A. R., Leroux P., Legendre L. 2006. A class III histidine kinase acts as a novel virulence factor in *Botrytis cinerea*. *Mol Plant-Microbe interact.* 19: 1042-1050.

Viladevall L., Serrano R., Ruiz A., Domenech G., Giraldo J., Barcelo A. et al. 2004. Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 279: 43614-43624.

Vink E, Rodriguez-Suarez RJ, Gérard-Vincent M, Ribas JC, de Nobel H, van den Ende H, Durán A, Klis FM, Bussey H. 2004. An in vitro assay for (1,6)-beta-D-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 21: 1121-31.

W

Walker L. A., Munro C. A., de Bruijn I., Lenardon M. D., McKinnon A., Gow N. A. R. 2008. Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. *PLoS Pathog.* 4: e1000040.

Wang Z., Szaniszló P. J. 2000. WdCHS3, a gene that encodes a class III chitin synthase in *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*, is expressed differentially under stress conditions. *J Bacteriol.* 182: 874-881.

Wang Z., Zheng L., Liu H., Wang Q., Hauser M., Kauffman S., Becker J. M., Szaniszlo P. J. 2001. WdChs2p, a class I chitin synthase, together with WdChs3p (class III) contributes to virulence in *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. *Infect Immun.* 69: 7517-7526.

Watanabe N.-A., Miyazaki M., Horii T., Sagane K., Tsukahara K., Hata K. 2012. E1210 a new broad-spectrum antifungal suppresses *Candida albicans* hyphal growth through inhibition of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. *Antimicrob agents and chem.* 56: 960-971

Watanabe Y., Irie K., Matsumoto K. 1995. Yeast RLM1 encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slr2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol.* 15: 5740-5749.

Weber I., Assmann D., Thines E., Steinberg G. 2006. Polar localizing class V myosin chitin synthases are essential during early plant infection in the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell.* 18: 225-242.

Wendland J., Philippsen P. 2001. Cell polarity and hyphal morphogenesis are controlled by multiple rho-protein modules in the filamentous ascomycete *Ashbya gossypii*. *Genetics.* 157: 601-610.

Verwer P. E. B., van Duijn M. L., Tvakol M., Bakker-woudenberg I. A. J M., van de sande W. W. J. 2012. Reshuffling of *Aspergillus fumigatus* cell wall components chitin and beta-glucan under the influence of caspofungin or nikkomyacin Z alone or in combination. *Antimicrob Agents Chemother.* 56: 1595-1598.

Williams K., Cyert M. S. 2001. The eukaryotic response regulator SKN7 regulates calcineurin signaling through stabilization of the Crz1p. *EMBO J.* 20: 3473-3483.

Williams W. S., Cannon R. E. 1989. Alternative environmental roles for cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. *App Env Microbiol.* 55: 2448-2452.

Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P., van Kan J. A. L. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Mol Plant Pathol.* 7: 561-580.

Wilson R. A., Talbot N. J. 2009. Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. *Nat Rev Microbiol.* 7: 185-95.

Wood P. J. 1980. Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides. *Carbohydr Res.* 81: 271-287.

X

Xoconostle-Cázares B., Specht C. A., Robbins P. W., Liu Y., León C., Ruiz-Herrera J. 1997. Umchs5, a gene coding for a class IV chitin synthase in *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol.* 22: 199-208.

Xu J. R., Zhao X., Dean R. A. 2007. From genes to genomes: A new paradigm for studying *Magnaporthe oryzae*. *Advances in Genetics.* 57: 175-218.

Xu J. R. 2000. MAP kinase in fungal pathogens. *Fungal Genet. Biol.* 31: 137-152.

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

Y

Yamada-Okabe T., Sakamori Y., Mio T., Yamada-Okabe H. 2001. Identification and characterization of the genes for N-acetylglucosamine kinase and N-acetylglucosamine-phosphate deacetylase in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Eur J Biochem.* 268: 2498-505.

Yamaguchi H., Hiratani T., Iwata K., Yamamoto Y. 1982. Studies on the mechanism of antifungal action of aculeacin A. *J Antibiot (Tokyo).* 35: 210-219.

Yamochi W., Tanaka K., Nonaka H., Maeda A., Musha T., Takai Y. 1994. Growth site localization of the Rho1 small GTP-binding protein and its involvement in bud formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 125: 1077-1093.

Yang M., Jin K., Xia Y. 2011. MaFKS, a Beta-1,3-glucan synthase, is involved in cell wall integrity, hyperosmotic pressure tolerance and conidiation in *Metarhizium acridum*. *Curr Genet.* 1: 1-12.

Yarden O., Yanofsky C. 1991. Chitin synthase 1 plays a major role in cell wall biogenesis in *Neurospora crassa*. *Genes Dev.* 5: 2420-30.

Yip C. L., Welch S. K., Klebl F., Gilbert T., Seidel P., Grant F. J., O'Hara P. J., MacKav V. L. 1994. Cloning and analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* MNN9 and MNN1 genes required for complex glycosylation of secreted proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91: 2723-2727.

Yoda K., Kawada T., Kaibara C., Fujie A., Abe M., Hitoshi H., Shimizu J., Tomishige N., Noda Y., Yamasaki M. 2000. Defect in cell wall integrity of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* caused by a mutation of the GDP-mannose pyrophosphorylase gene VIG9. *Biosci Biotechnol Biochem.* 64: 1937-1941.

Yoshida S., Ikeda E., Uno I., Mitsuzawa H. 1992. Characterization of a staurosporine and temperature sensitive mutant, *stt1*, of *Saccharomyces cerevisiae*: STT1 is allelic to PKC1. *Mol Gen Genet.* 231: 337-344.

Yoshida S., Ohya Y., Nkano A., Anraku Y. 1994b. Genetic interactions among genes involved in the STT4-PKC1 pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* 242: 631-640.

Yoshida S., Ohya Y., Goebel M., Nakano A., Anraku Y. 1994a. A novel gene, STT4, encodes a phosphatidylinositol 4-kinase in the PKC1 protein kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 269: 1166-1172.

Yoshimi A., Tsuda M., Tanaka C. 2004. Cloning and characterization of the histidine kinase gene *Dic1* from *Cochliobolus heterostrophus* that confers dicarboximide resistance and osmotic adaptation. *Mol Genet Genomics.* 271: 228-36.

Yu J.-H., Hamari Z., Han K.-H., Seo J.-A., Reyes-Domínguez Y., Scazzocchio C. 2004. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol.* 41: 973-981.

Z

Zevenhuizen L. P., Bartnicki-Garcia S. 1969. Chemical structure of the insoluble hyphal wall glucan of *Phytophthora cinnamomi*. *Biochem.* 8: 1496-1502.

Zhao X., Oh S. H., Hoyer L. L. 2007. Deletion of ALS5, ALS6 or ALS7 increases adhesion of *Candida albicans* to human vascular endothelial and buccal epithelial cells. *Med Mycol.* 45: 429-434.

Zhu W.-Y., Gooday G. W. 1992. Effects of nikkomycin and echinocandin on differentiated and undifferentiated mycelia of *Botrytis cinerea* and *Mucor rouxii*. *Mycological Research.* 96: 371-377.

Congrès et communications :

- 1- Congrès international : Botrytis-Sclerotinia post genome workshop. Lyon 2011
Communication par poster:
AntiBotrytis synergy between inhibitors of chitin synthases and β -(1,3)-glucan synthase.

- 2- Congrès international: The second international fungal cell wall meeting. Giens 2011
Communication par Poster:
AntiBotrytis synergy between inhibitors of chitin synthases and β -(1,3)-glucan synthase.

- 3- Congrès international: 11th European conference on fungal genetics. Marburg 2012
Communication orale:
Microarray analysis of antifungal synergy between inhibitors of chitin synthases and β -(1,3)-glucan synthase.