

Maîtrise du cycle sexué

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

3.1.1. Isolement de souches sauvages des deux types sexuels

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

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

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

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

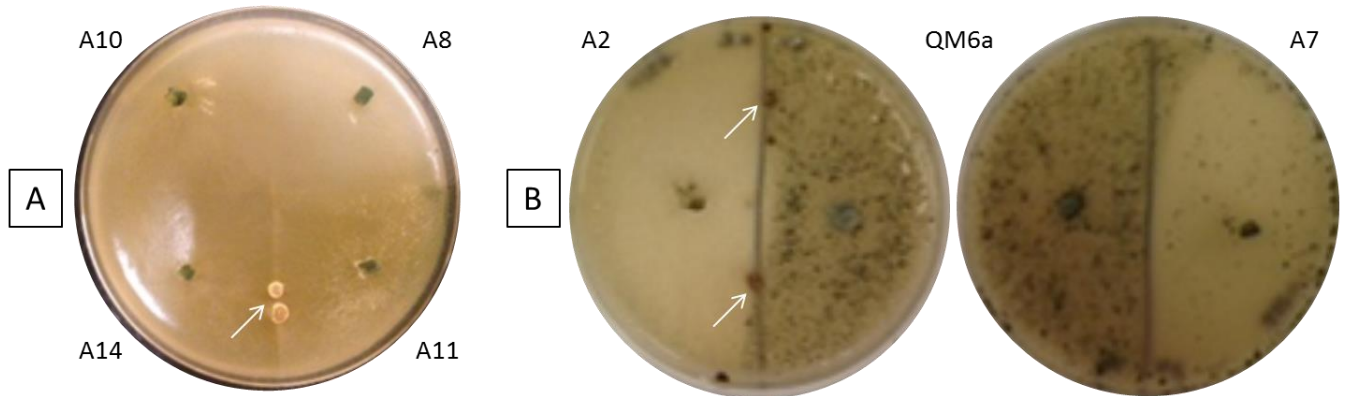


Figure 30 : Test Mat ou croisements sexués pour l'identification des types sexuels.
Les stromata sont pointés par les flèches blanches.

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

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

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

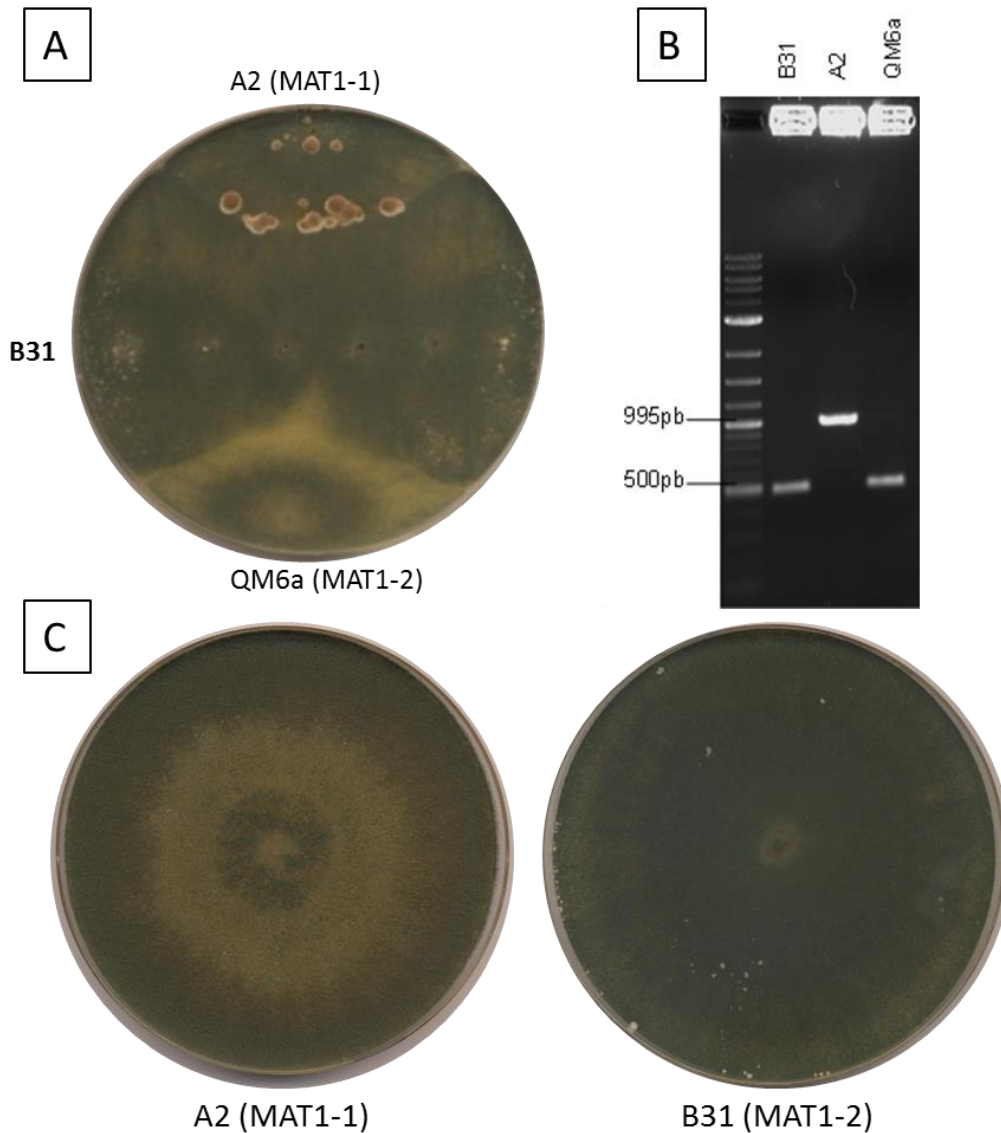


Figure 31 : Identification de la souche B31.

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

3.1.2. Cycle de vie de *T. reesei*

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

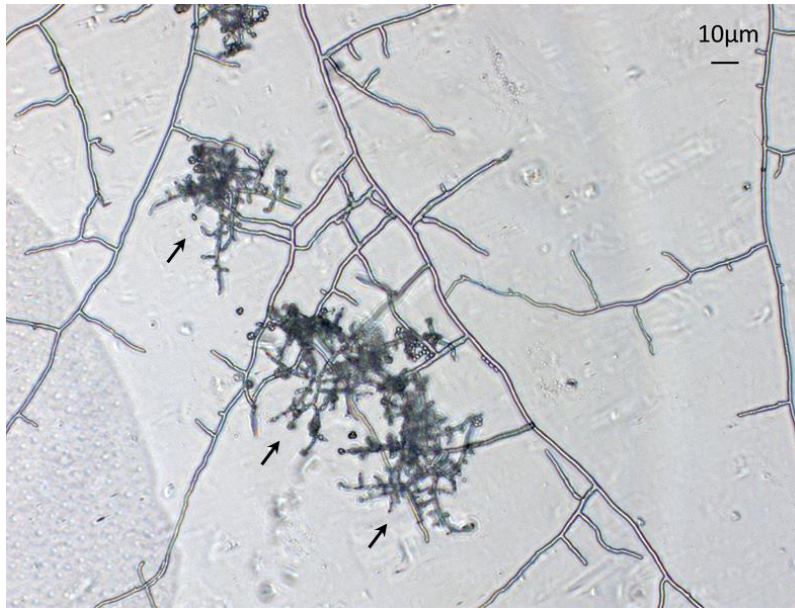


Figure 32 : Hyphes ayant différencié des conidiophores

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

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

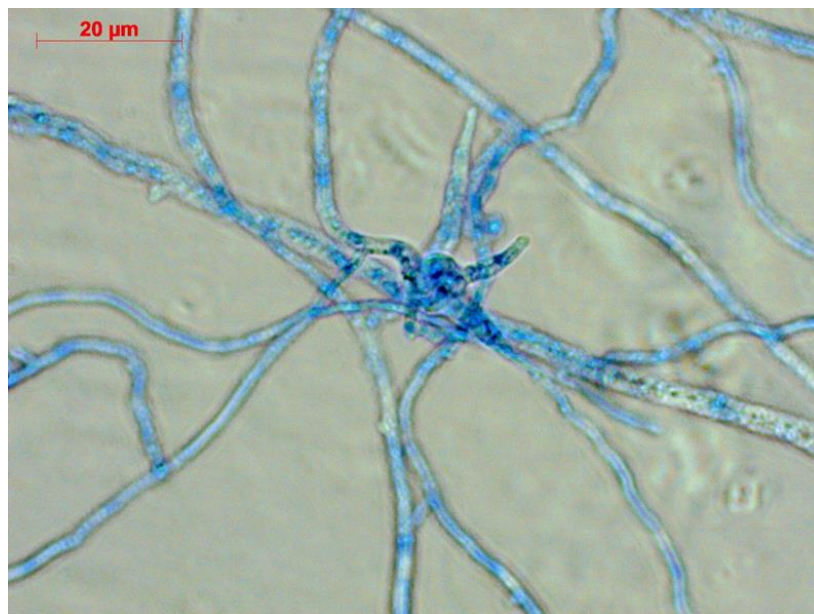


Figure 33 : Hyphes entrelacées colorées au Bleu de lactophénol

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

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

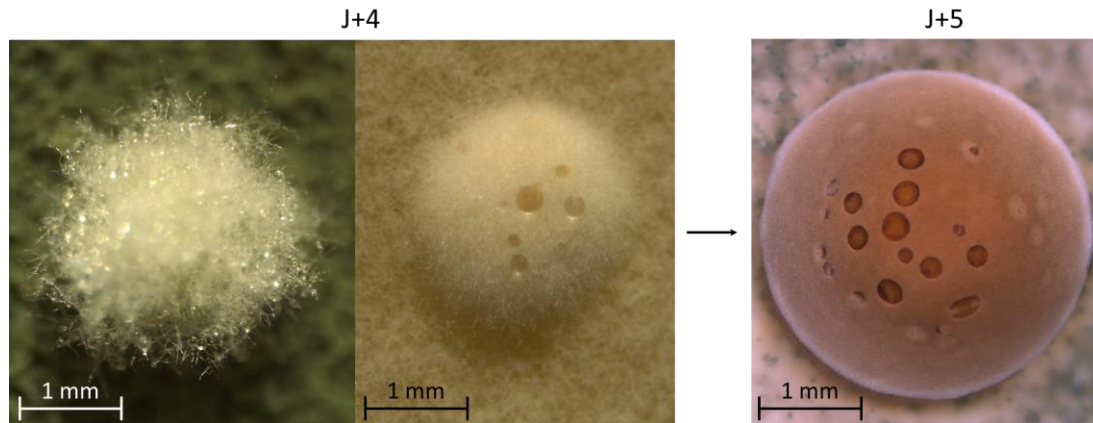


Figure 34 : Des boules cotonneuses et un stromata

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

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

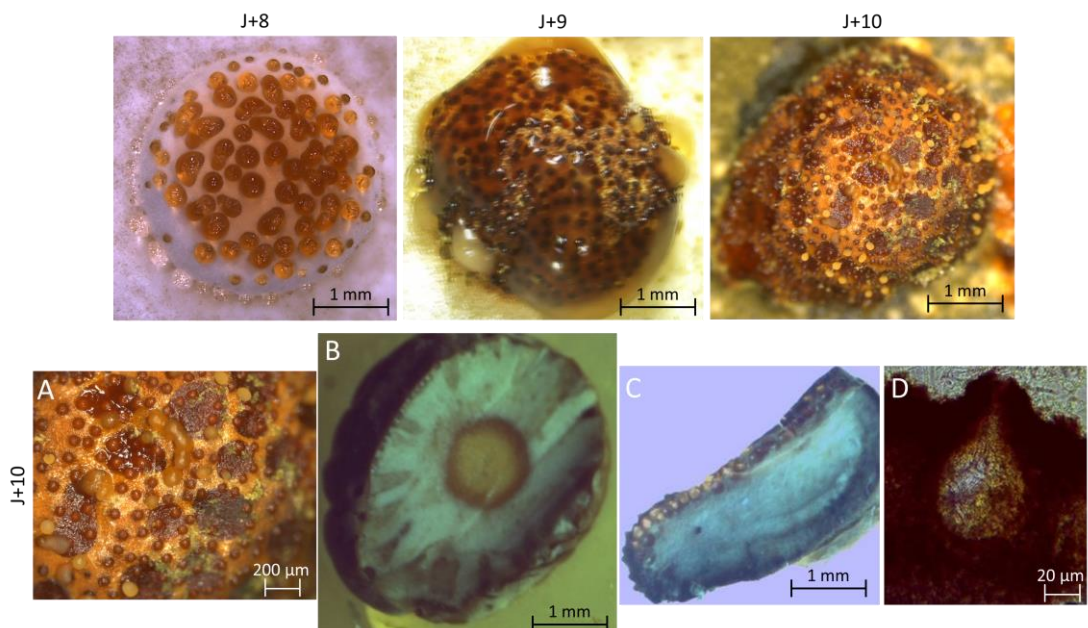


Figure 35 : Les stromata à divers stades de développement

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

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

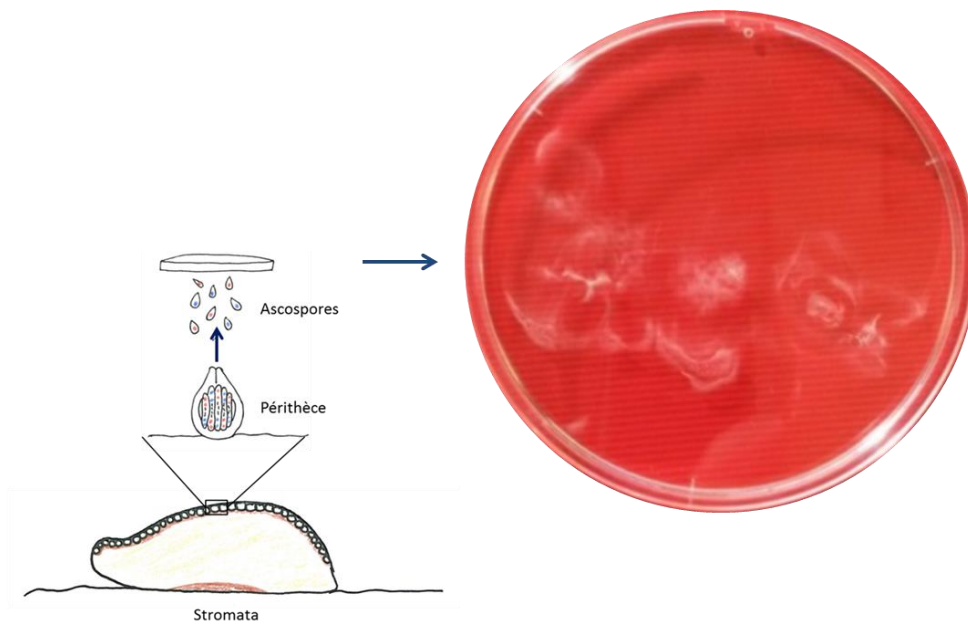


Figure 36 : Libération des ascospores

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

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

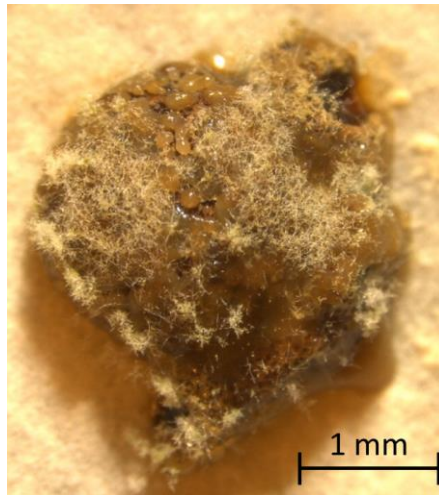


Figure 37 : Le stromata en fin de cycle de reproduction
L'observation du stromata a été faite à l'aide de la loupe binoculaire Leica S8 APO.

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

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

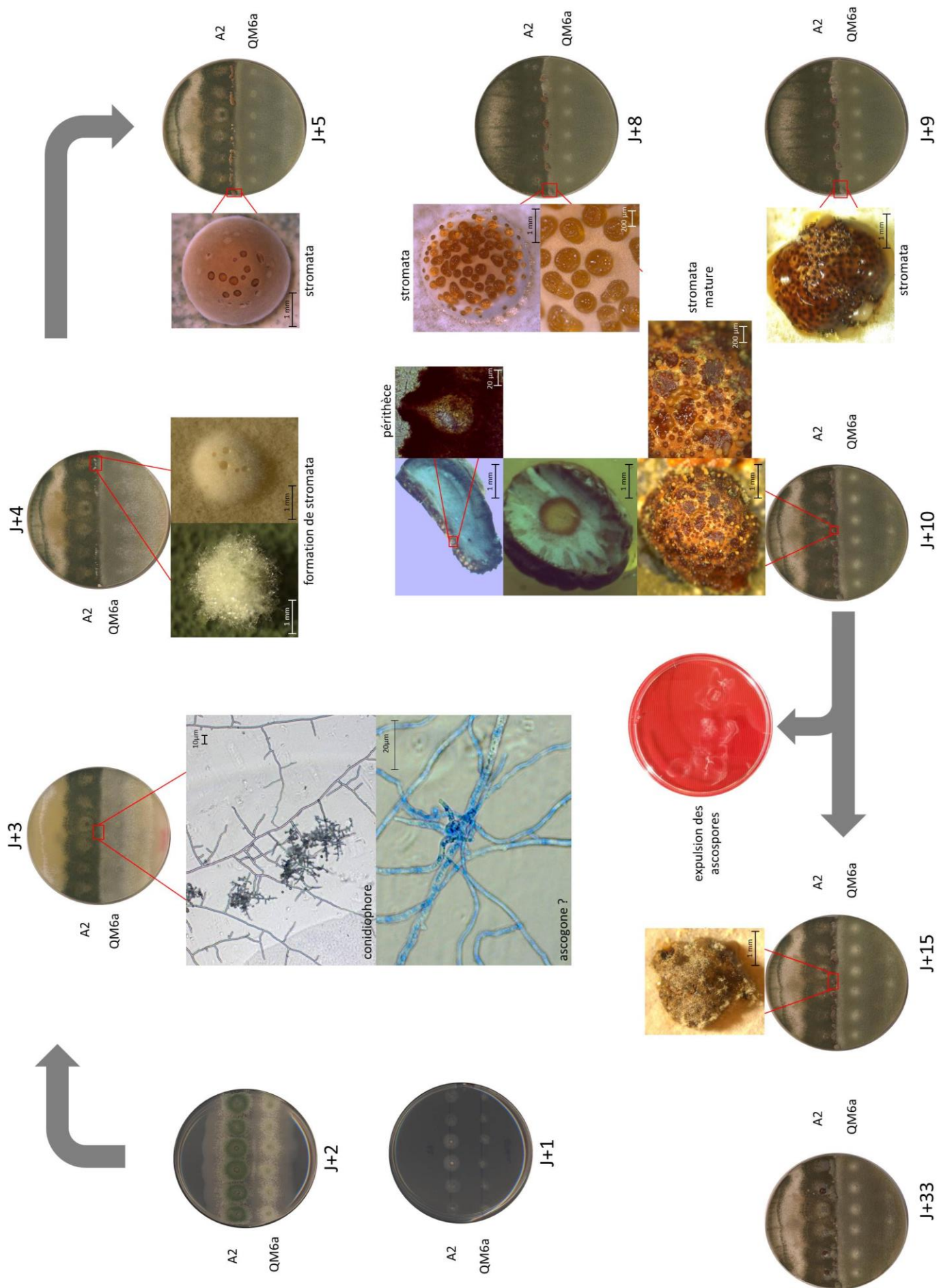


Figure 38 : Cycle de reproduction entre les souches QM6a et A2

3.1.3. Récupération, conservation et germination des ascospores

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

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

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

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

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

Tableau 7: Taux de germination des ascospores

Les ascospores du croisement A2x RutC30 sont récoltées et leur concentration est ajustée à 1.10^6 cellules/ml de CTS50. Elles sont stockées en cryotubes à 4 °C, -20 °C et -80 °C. Le jour de la récolte (T0) et après deux semaines, un mois et six mois de conservation, 2, 20 et 200 ascospores sont mises à germer sur milieu Agar-H₂O puis comptées après 48 h d'incubation à 30 °C

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

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

3.1.4. Optimisation de la formation des stromata

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

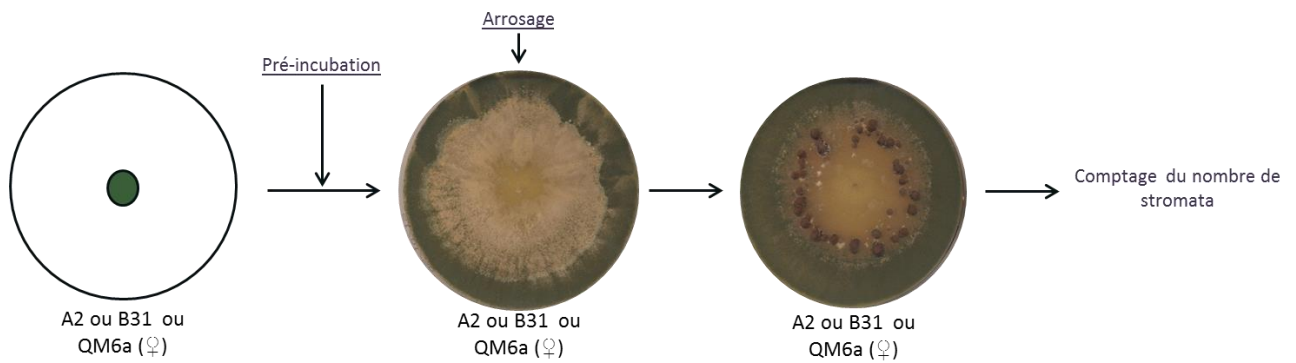


Figure 39 : Méthode de reproduction sexuée par arrosage.

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

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

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

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

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

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

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

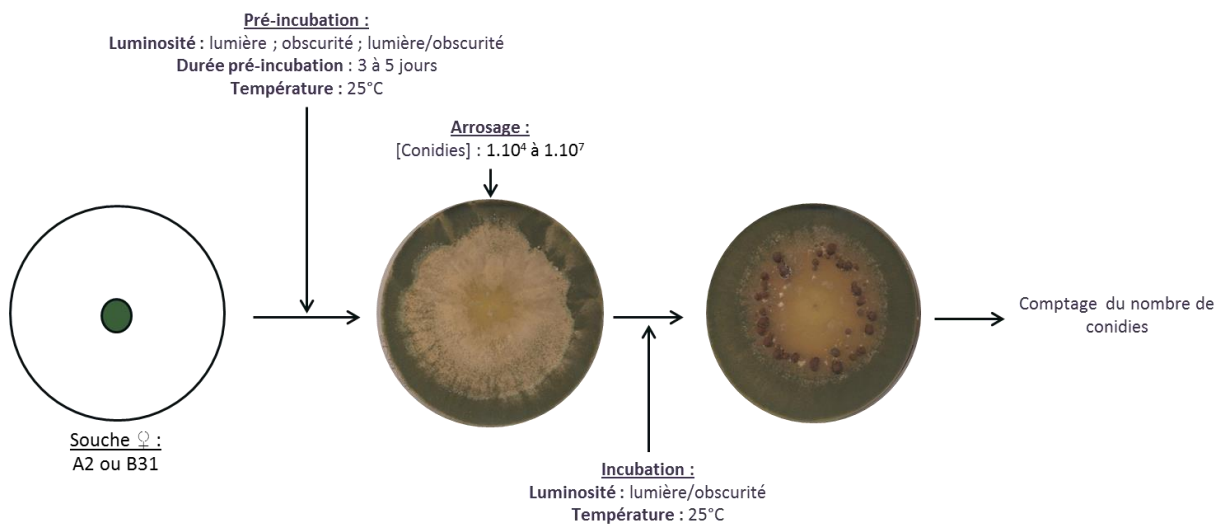


Figure 40 : Récapitulatif des paramètres expérimentés pour optimiser la formation des stromata.

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

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

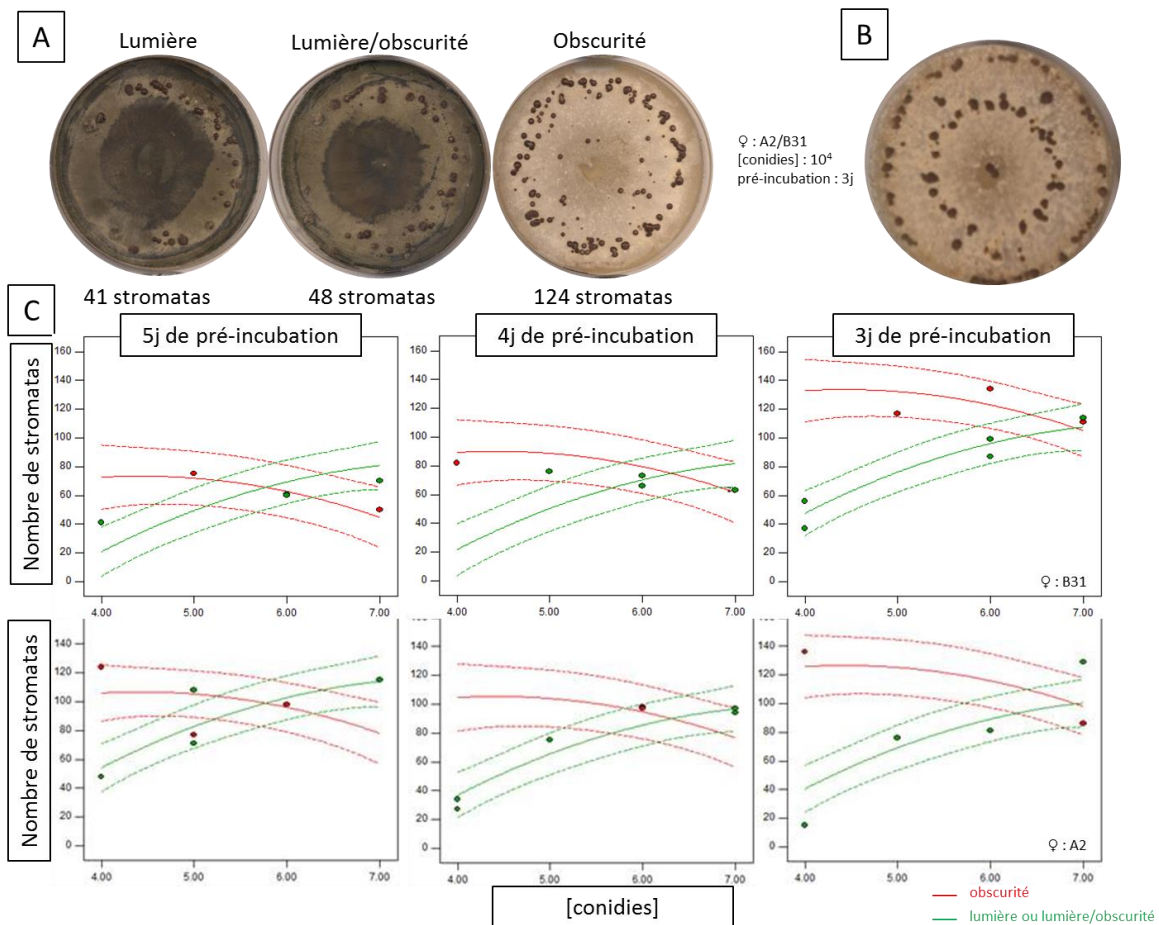


Figure 41: Optimisation de la reproduction sexuée par arrosage.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.1.5. Effets de différents milieux sur la formation des stromata

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

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

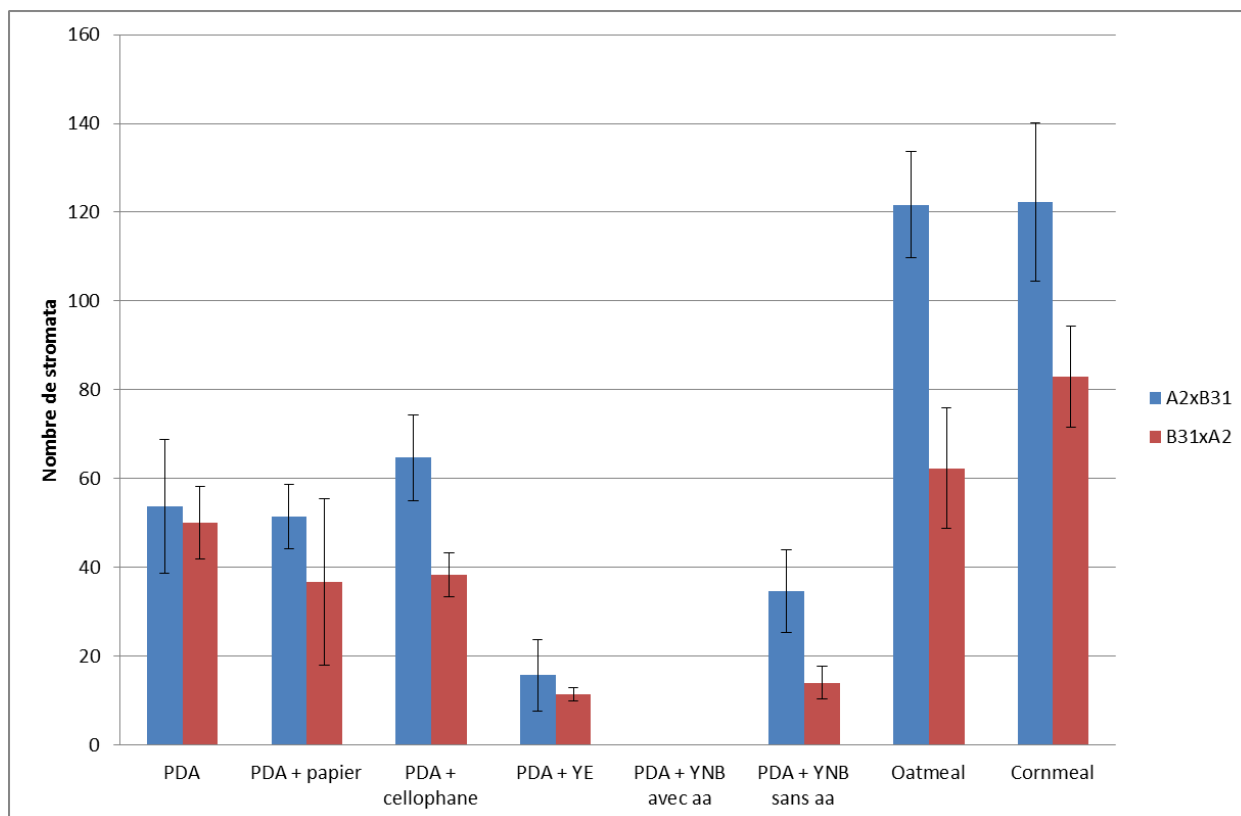


Figure 42 : Quantification des stromata obtenus sur différents milieux de culture.

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

3.1.6. Comparaison des méthodes de croisement

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

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

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

3.1.7. Discussion

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.2.1. Stratégie de la « souche assistante »

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

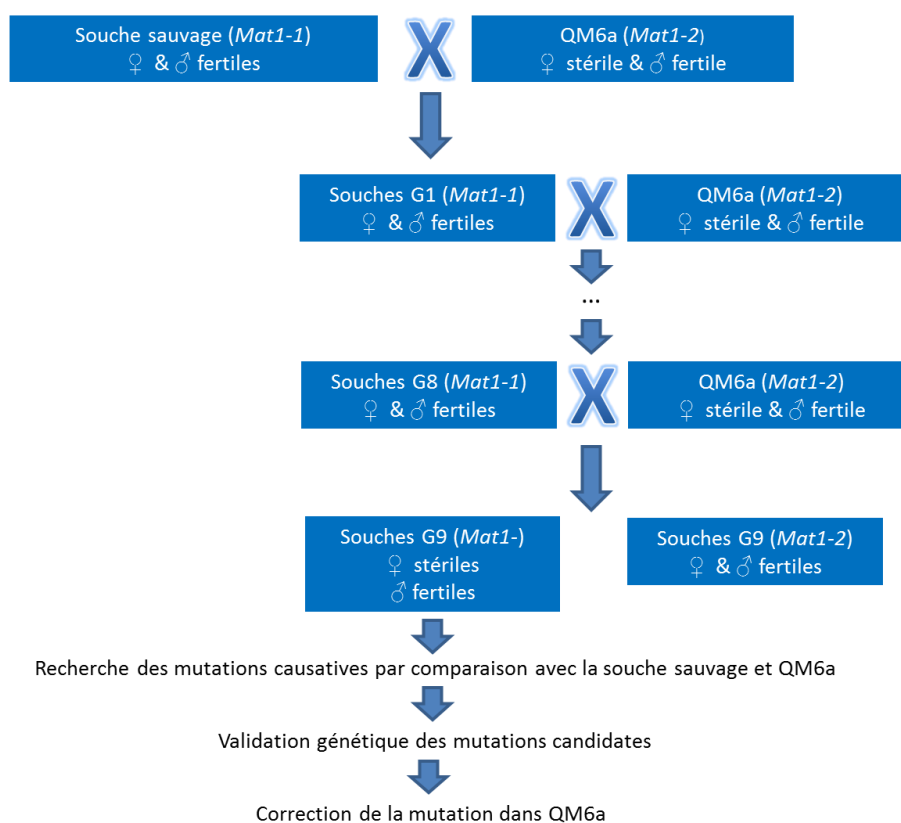


Figure 43 : Stratégie d'identification du gène responsable de la stérilité femelle de QM6a.
Adapté de Kubicek et al., 2014

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

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

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

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

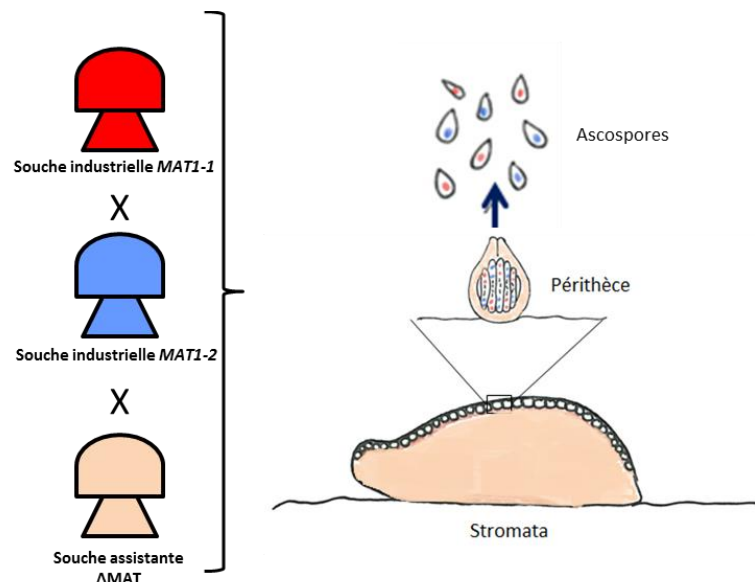


Figure 44 : Stratégie de la souche assistante appliquée à *T. reesei*.

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

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

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

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

3.2.2. Prérequis à la stratégie de la souche assistante

Avant de construire les souches nécessaires, il est impératif de s'assurer que la souche dont le locus *MAT* sera invalidé est femelle fertile, qu'elle n'est pas végétativement incompatible avec la souche femelle stérile QM6a (*MAT1-2*) et qu'elle est capable de faire des anastomoses avec elle.

Chez champignons filamenteux, les cellules hétérocaryotiques formées par la fusion de souches incompatibles sont rapidement détruites. Ce mécanisme de reconnaissance du non-soi est appelé incompatibilité végétative (Bégueret et al., 1994). La stratégie reposant sur la formation d'un hétérocaryon, l'existence d'une incompatibilité entre les souches conduirait à un échec de cette approche. Enfin, il est important de vérifier la capacité des souches à faire des anastomoses entre elles pour qu'il puisse y avoir formation d'hétérocaryon.

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

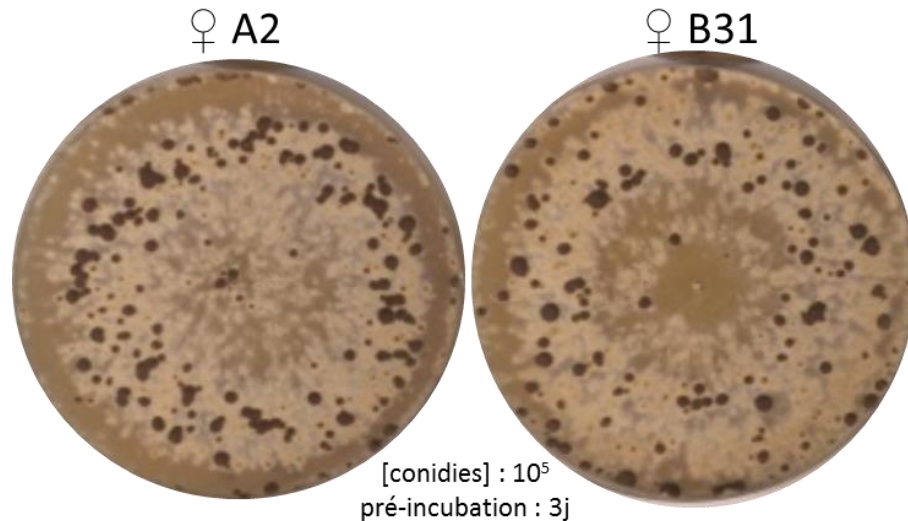


Figure 45 : Test de la fertilité femelle des souches A2 et B31.

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

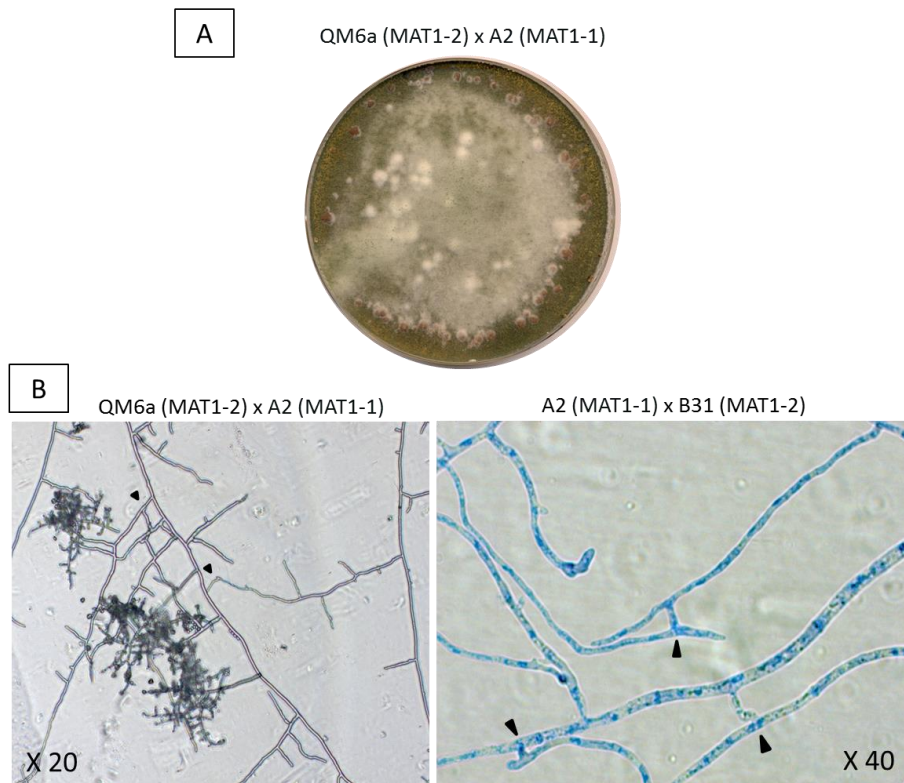


Figure 46 : Validation des prérequis.

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

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

3.2.3. Construction des souches outils

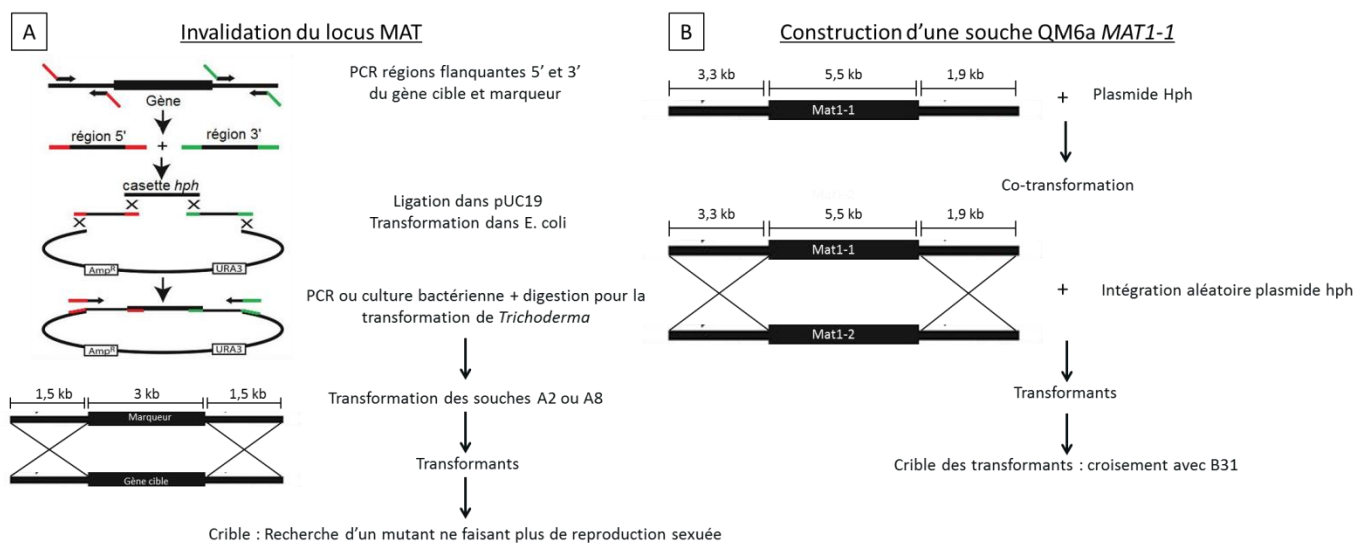


Figure 47 : Stratégie de construction des souches outils.

Stratégie d'inactivation du locus *MAT* (A) et stratégie de remplacement du locus *MAT1-2* de QM6a par le locus *MAT1-1* (B).

3.2.3.1. Souche assistante Δ MAT

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

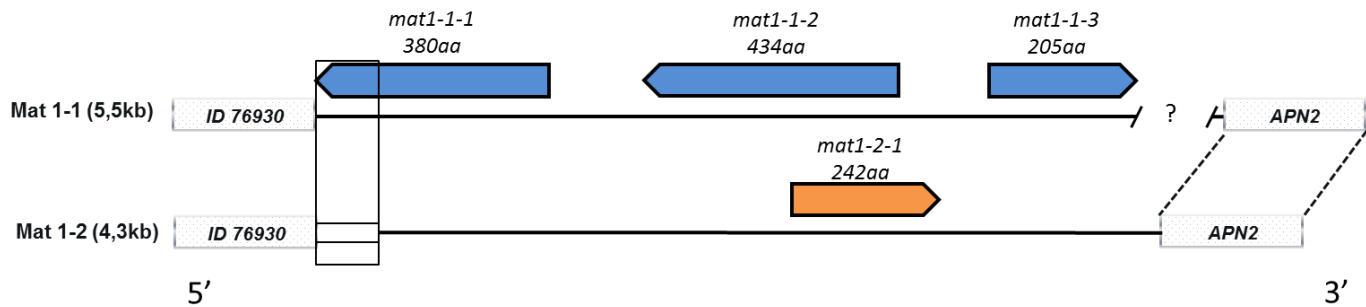


Figure 48 : Les loci *MAT* de *T. reesei*.

Dans la souche de type sexuel *MATI-1*, il n'existe pas de séquençage de la région se trouvant entre les gènes *MATI-1-3* et *APN2* qui est marquée d'un point d'interrogation. Les régions adjacentes choisies bordent les gènes *MATI-1-1* et *MATI-1-3*.

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

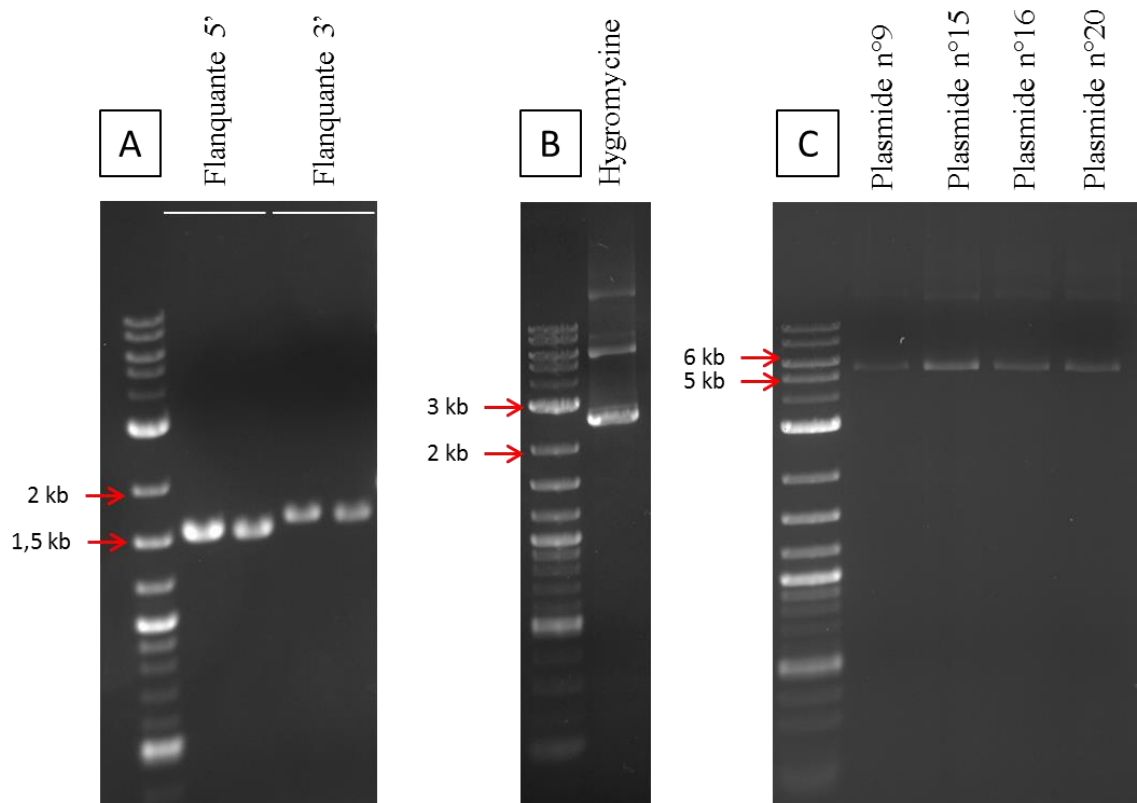


Figure 49 : obtention de la cassette d'inactivation du locus *MAT1-1*

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

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

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

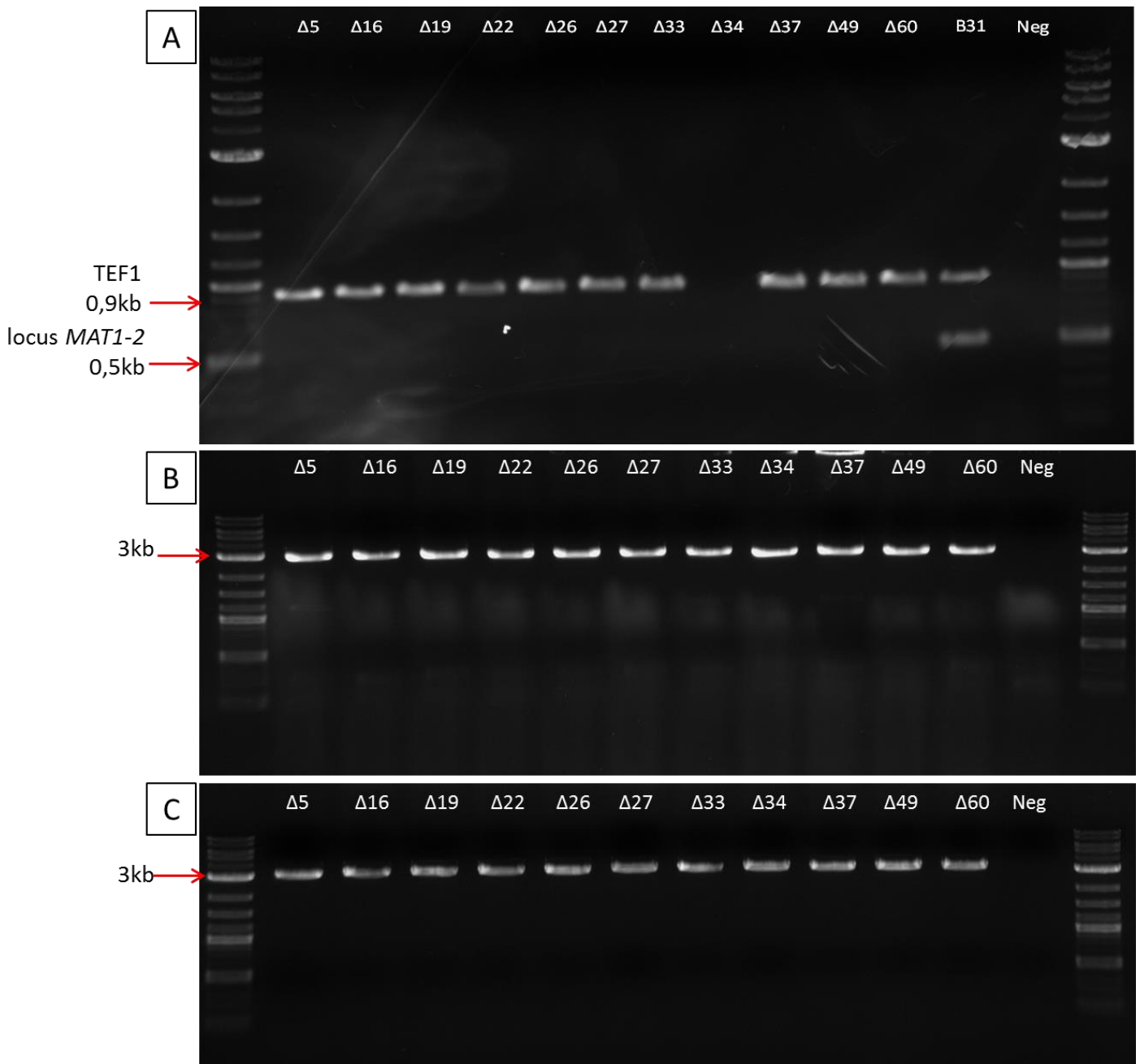
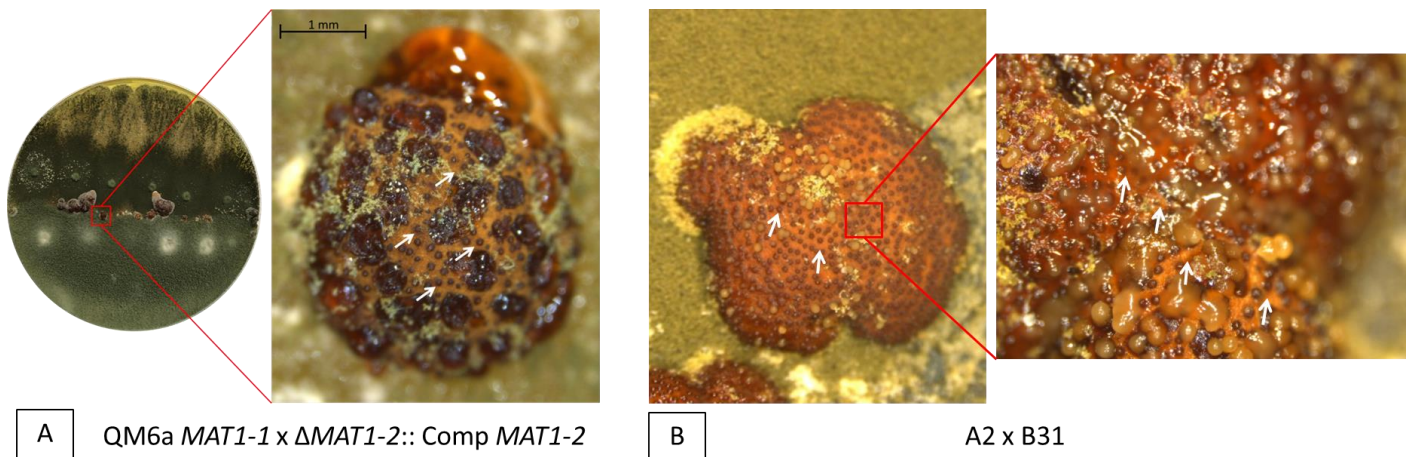


Figure 50 : Vérification par amplification PCR de l'inactivation du locus *MAT1-2*

L'inactivation du gène est vérifiée en amplifiant avec les amorces *MAT1-2-F* interne et *MAT1-2-R* interne un fragment interne de 500 pb du locus *MAT1-2*. Cette amplification se fait en tandem avec celle d'un fragment de 880 pb du gène de ménage *tef1* à l'aide du couple d'amorce EF1/EF2 (A). Pour valider l'insertion de la cassette d'inactivation au locus, la jonction 5' (3 kb) est amplifiée à l'aide du couple d'amorces *DMAT1-2verif5F/verifHygro5'*(B) tandis que la jonction 3' (3,1 kb) est amplifiée à l'aide du couple d'amorces *DMAT1-2verif3R/verifHygro3'* (C).

Afin de vérifier que le phénotype observé provient de l'inactivation du locus *MAT*, un test de complémentation a été réalisé. Le plasmide de complémentation portant le locus *MAT1-2* sauvage ainsi que le gène de résistance à la phléomycine est transformé dans la souche B31 ::*ΔMAT1-2-hph* n°60 par la méthode des protoplastes. Cette expérience contrôle a généré 11 transformants purifiés qui ont été soumis à un crible (Figure 47A) basé sur la fertilité des souches ayant intégré dans leur génome le locus *MAT1-2*. Sur 11 transformants purifiés, 7 sont capables de produire des stromata fertiles (Figure 51).



A QM6a *MATI-1* x Δ *MATI-2*:: Comp *MATI-2*

B A2 x B31

Figure 51 : Reproduction sexuée après complémentation de l'inactivation du locus *MATI-2*

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

3.2.3.2. Souche QM6a *MATI-1*

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

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

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

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

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

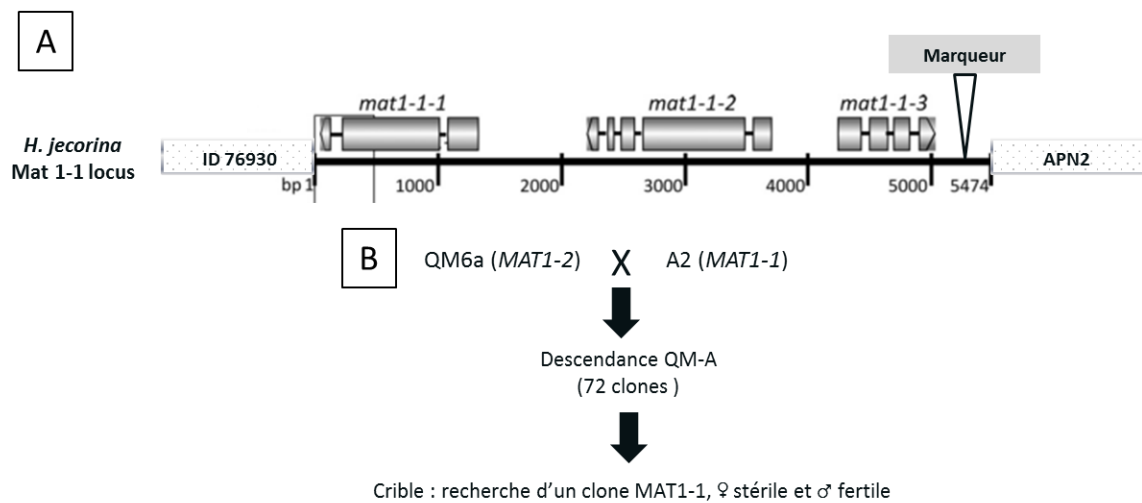


Figure 52 : Stratégies alternatives pour l'obtention d'une souche *MAT1-1*.
Soit par remplacement du locus *MAT1-2* selon la stratégie de Kubicek et al. (2014) (A) soit par reproduction sexuée (B).

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

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

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

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

Tableau 9: Essais de tricaryon.

Des plugs de mycélium des trois partenaires sont broyés et 10 μ L du broyat sont déposés au centre de chaque boîte de Petri. Chaque essai a été répété trois fois.

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

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

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

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

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

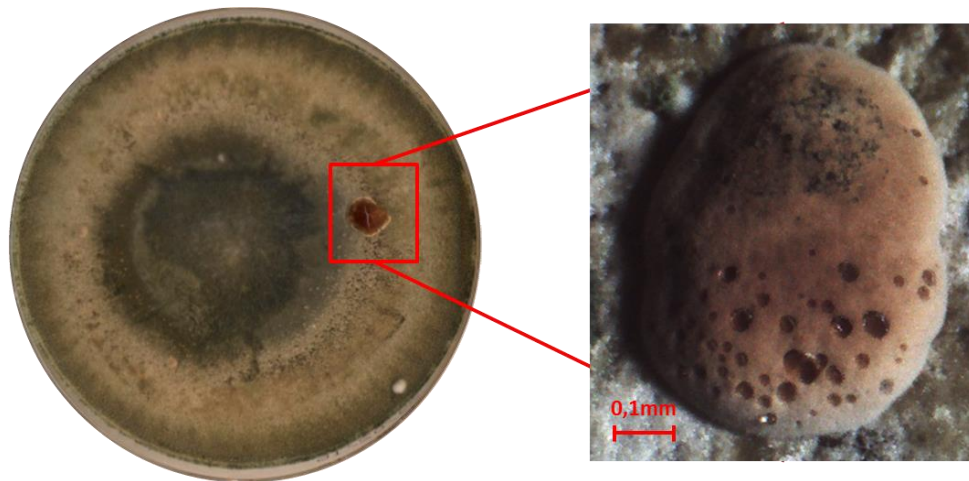


Figure 53 : Stromata obtenu avec la stratégie de la souche assistante

Les mycéliums des souches B31:: Δ MAT n°60, QM6a *MATI-1* et QM6a *MATI-2* ont été mixés puis les boîtes de Petri ont étéensemencées avec ce mélange et incubées à 24 °C avec une alternance de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité.

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

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

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

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

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

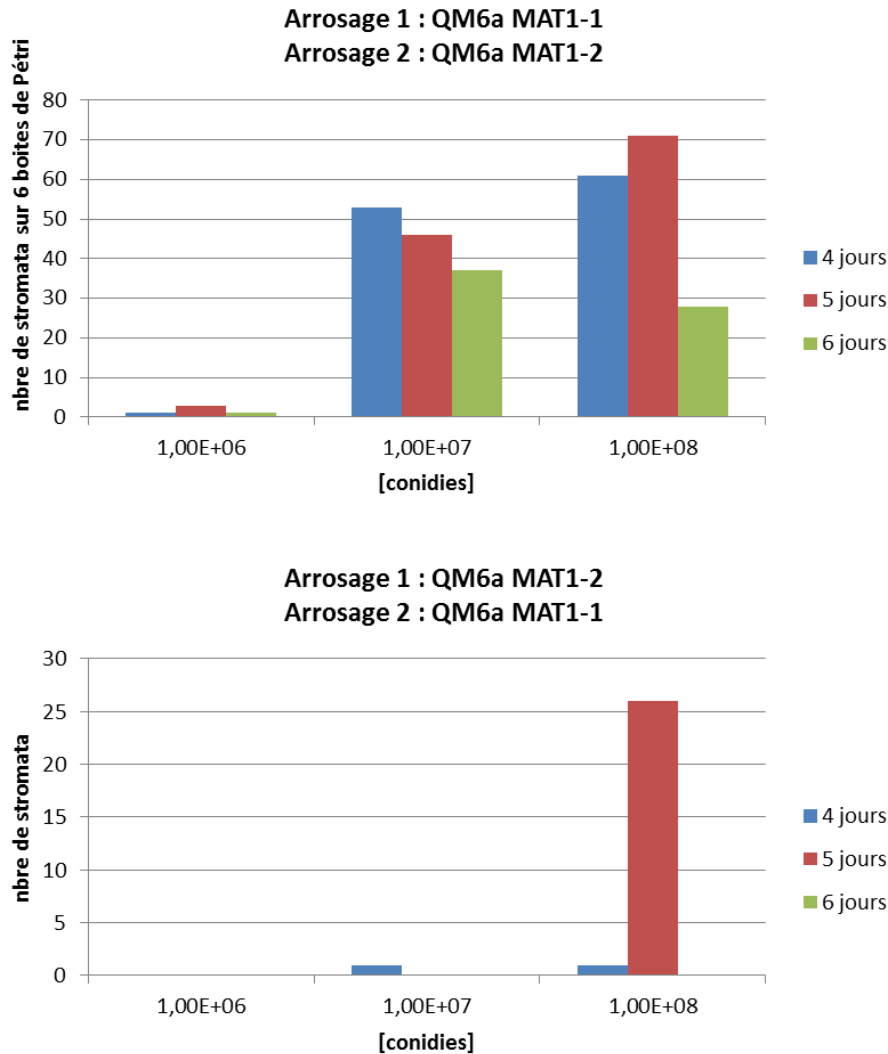


Figure 54 : Nombre de stromata obtenus suite à la variation des paramètres de l'arrosage séquentiel
Sont représentés les stromata totaux de six expériences par condition.

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

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

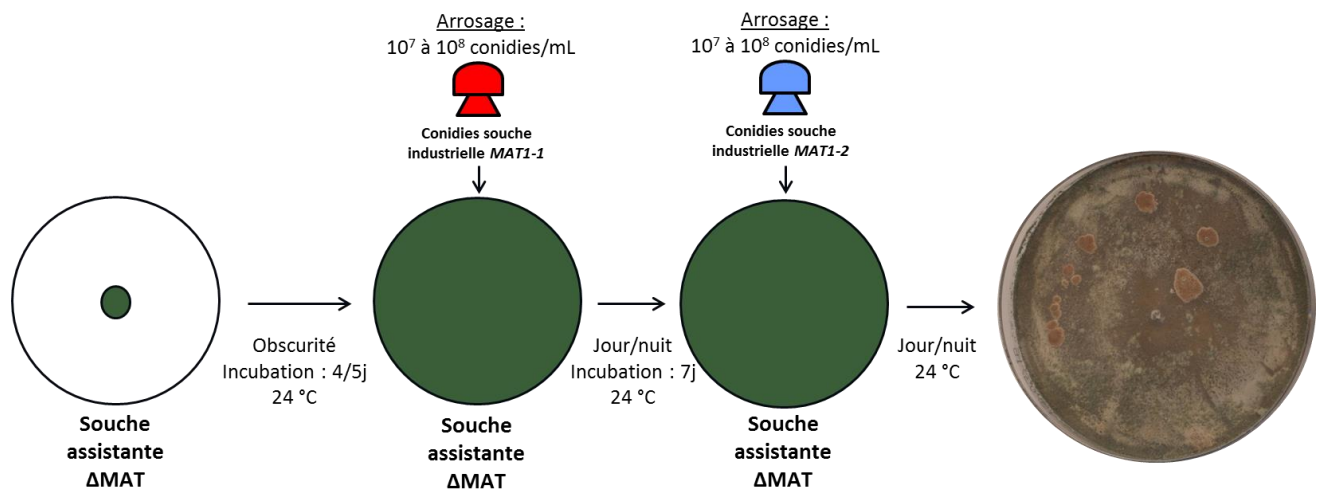
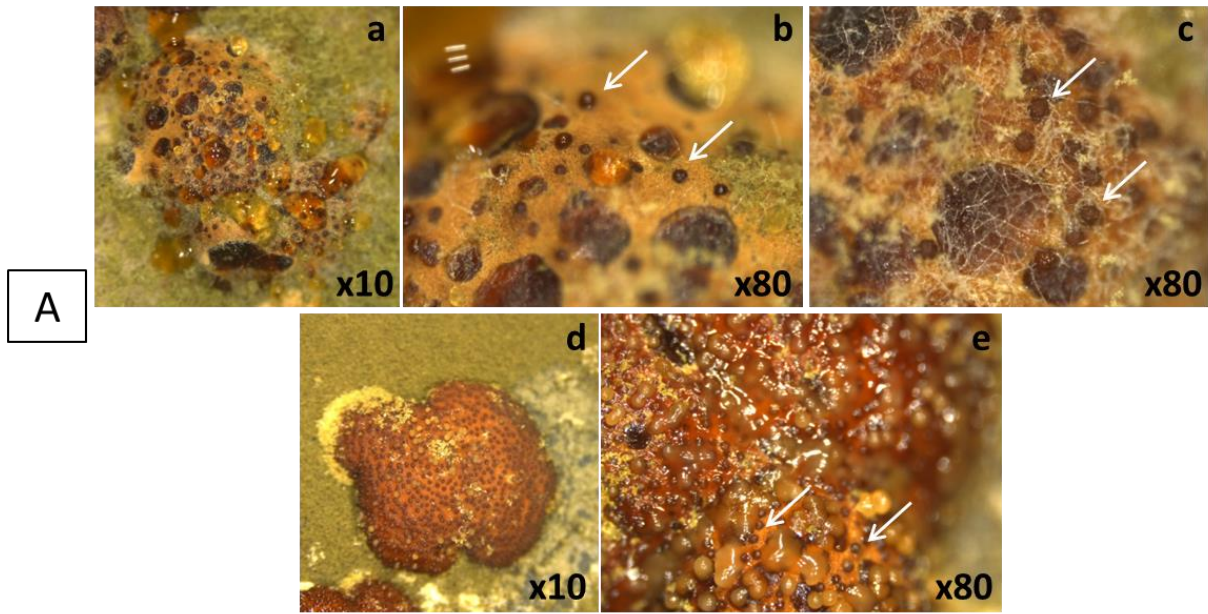


Figure 55 : Conditions optimales pour l'obtention de stromata par la stratégie de la souche assistante

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

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

Tricaryon : B31:: Δ MAT-hygro x QM6a MAT1-2 x QM6a MAT1-1-hygro



Croisement sauvage : A2 x B31

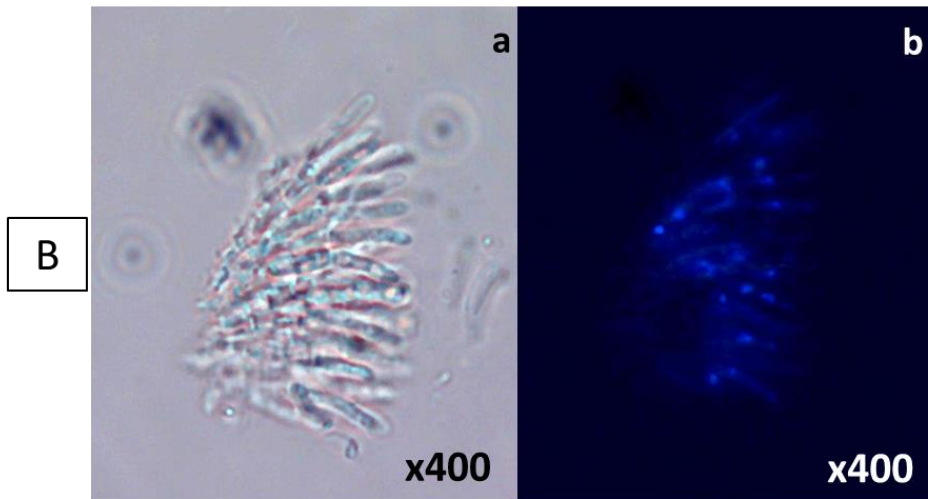


Figure 56 : Observation d'un stromata issu d'un tricaryon

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

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

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

3.2.5. Etude de l'événement de fécondation

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

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

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

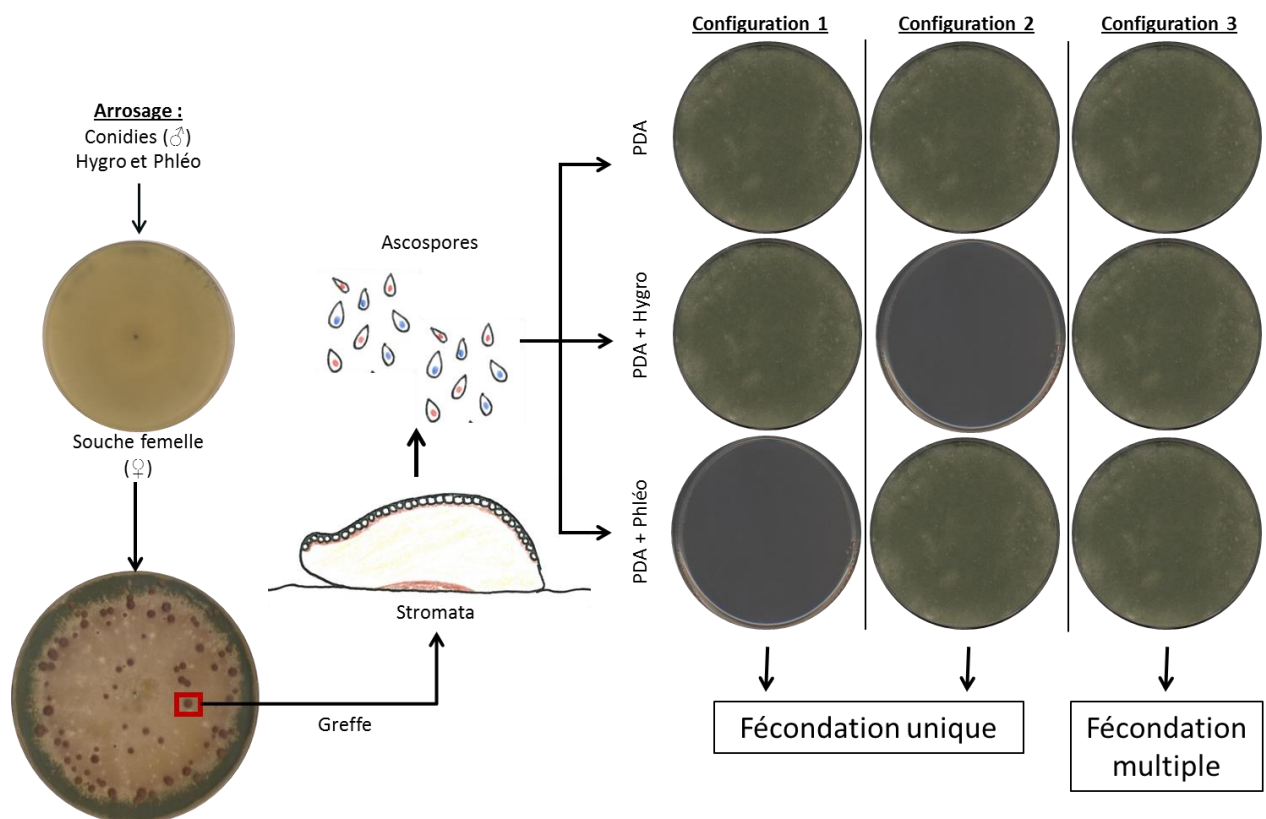


Figure 57 : Principe de l'expérience de fécondation
 PDA-Hygro = PDA-Hygomycine et PDA-Phléo = PDA-Phléomycine

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

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

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

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

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

Tableau 12 : Résultats attendus et interprétations

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

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

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

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

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

3.2.5.2. Mise en place du protocole

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

récoltées par des conidies et ainsi fausser les résultats avec les stromata secondaires, les greffes seront effectuées sur le milieu Agar-H₂O.

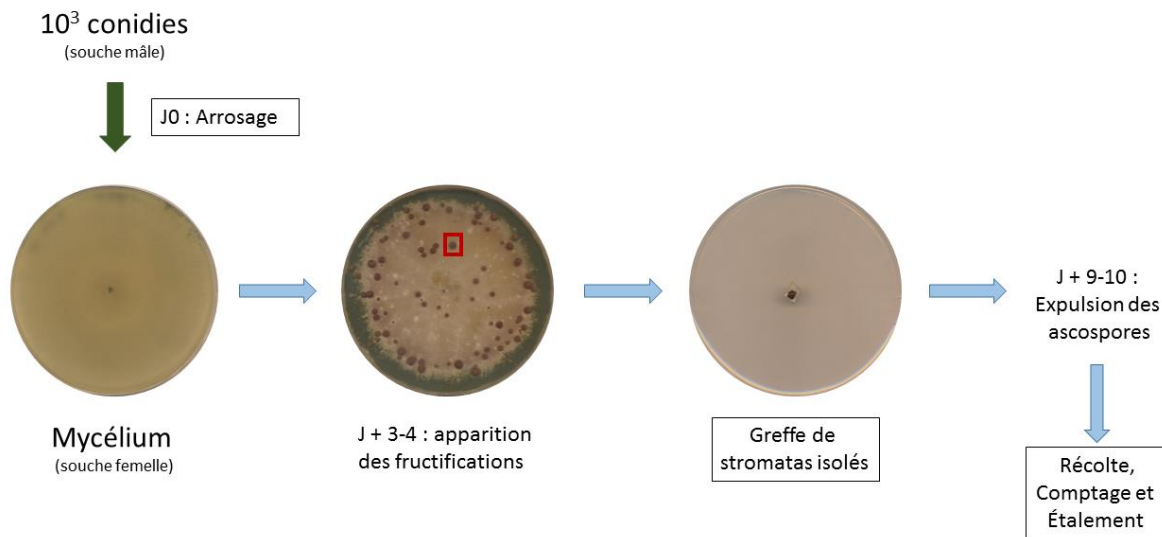


Figure 58 : Mise en œuvre de la reproduction sexuée par arrosage pour l'étude de l'événement de fécondation

Les ascospores issues de stromata isolés et de ceux restant sur les boîtes de croisements (stromata en vrac sur milieu PDA) sont récoltées dans du CTS 50 et comptées sur cellule de Malassez. La concentration moyenne d'ascospores récoltées est d'environ 10⁵ cellules/mL pour celles issues de stromata isolés et 10⁶ cellules/mL pour les stromata en vrac. Afin d'avoir suffisamment de matériel, les ascospores sont récoltées une seconde fois deux jours après. 100 µL d'ascospores issues de chaque stromata greffé et des trois boîtes de croisement sont ensuite étalés sur milieux PDA, PDA-Hygro et PDA-Phléo. Les profils de résistance sont obtenus après 48 h d'incubation à 30 °C.

3.2.5.3. Réalisation et analyse des différents croisements

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

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

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

Les différents croisements sont désignés par : femelle (mâle)

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

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

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

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

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

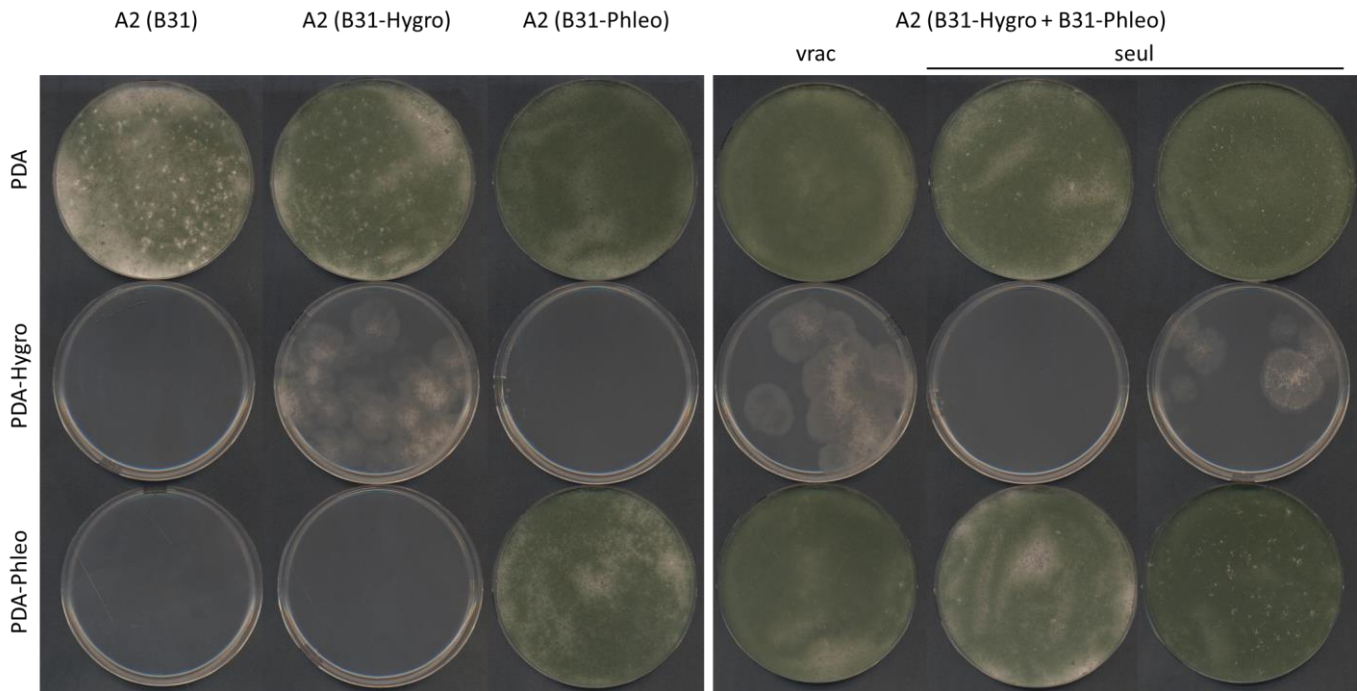


Figure 59 : Profils de croissance des ascospores issues des croisements A2 (B31)

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

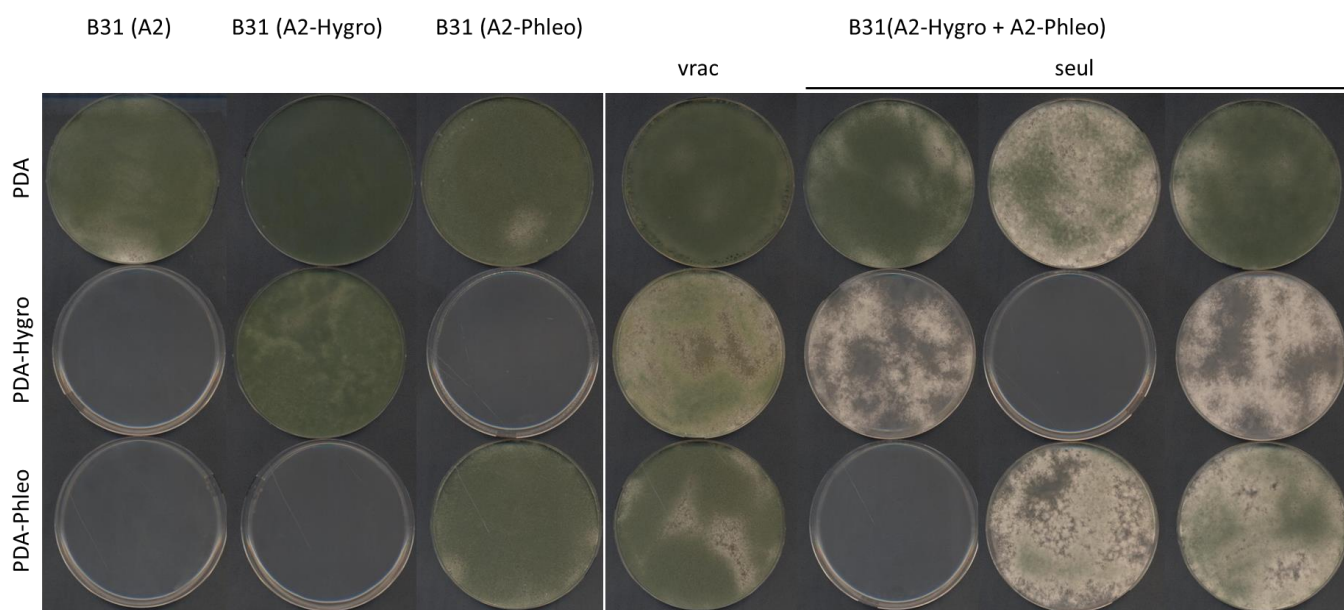


Figure 60 : Profils de croissance des ascospores issues des croisements B31 (A2)

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

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

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

3.2.6. Discussion

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

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

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

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

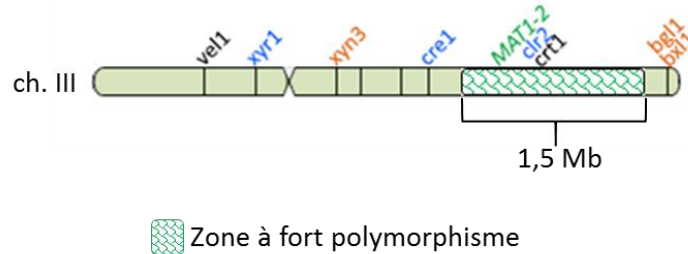


Figure 61 : Zone de non recombinaison autour du locus *MATI-2* chez QM6a.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.3.1.1. La stratégie d'amélioration des performances

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

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

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

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

3.3.1.2. Crible de sélection des descendants RuA

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

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

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

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

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

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

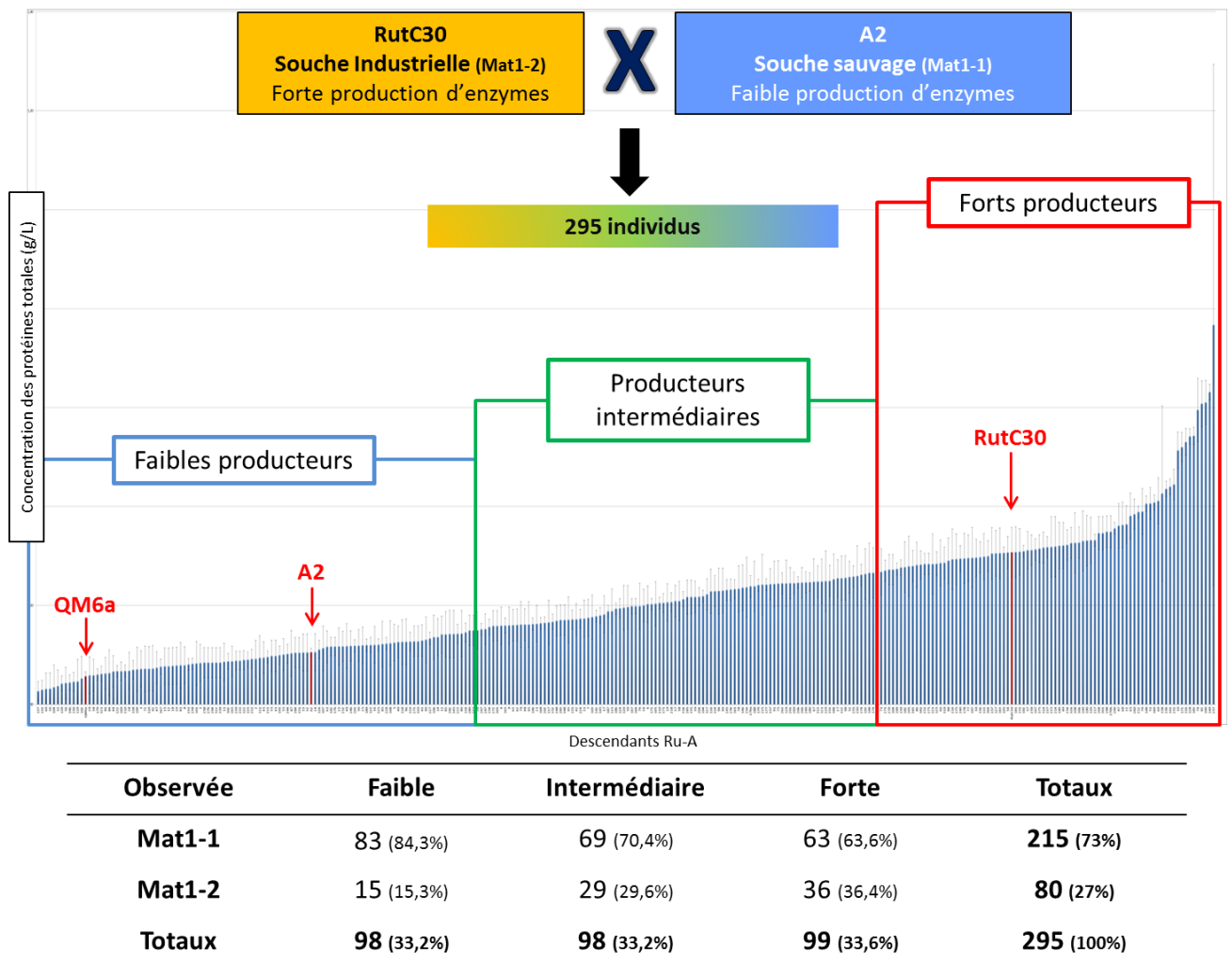


Figure 62 : Profil de sécrétion protéiques des 295 descendants issus du croisement A2 par RutC30.

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

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

l'addition des effets de plusieurs gènes. Ce résultat est cohérent avec la littérature qui répertorie des mutations dans de nombreux gènes impliqués dans la régulation de la production de cellulases tels que *cre1*, *xyl1*, *ace2*, etc... (Ilmen et al., 1996; Portnoy et al., 2011; Seiboth et al., 2011), sans compter ceux potentiellement présents dans les gènes codant pour des différentes endonucléases, exonucléases et β -glucosidases que compte le répertoire enzymatique de *T. reesei* (Aro et al., 2005; Herpoël-Gimbert et al., 2008).

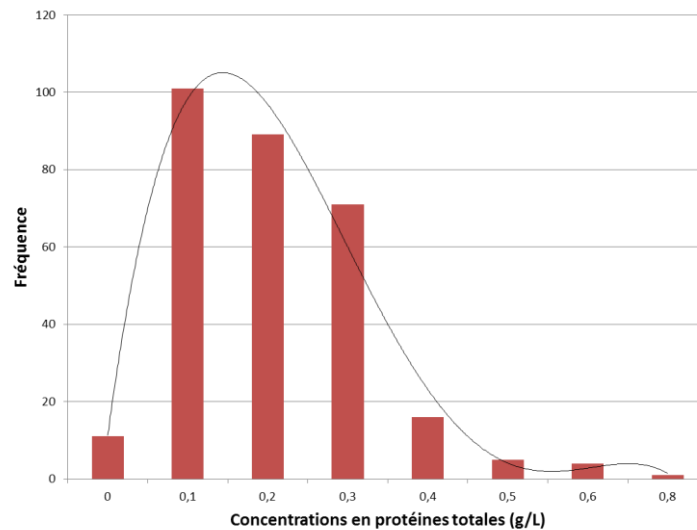


Figure 63 : Répartition des individus par classe en fonction de leur production de protéines.

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

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

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

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

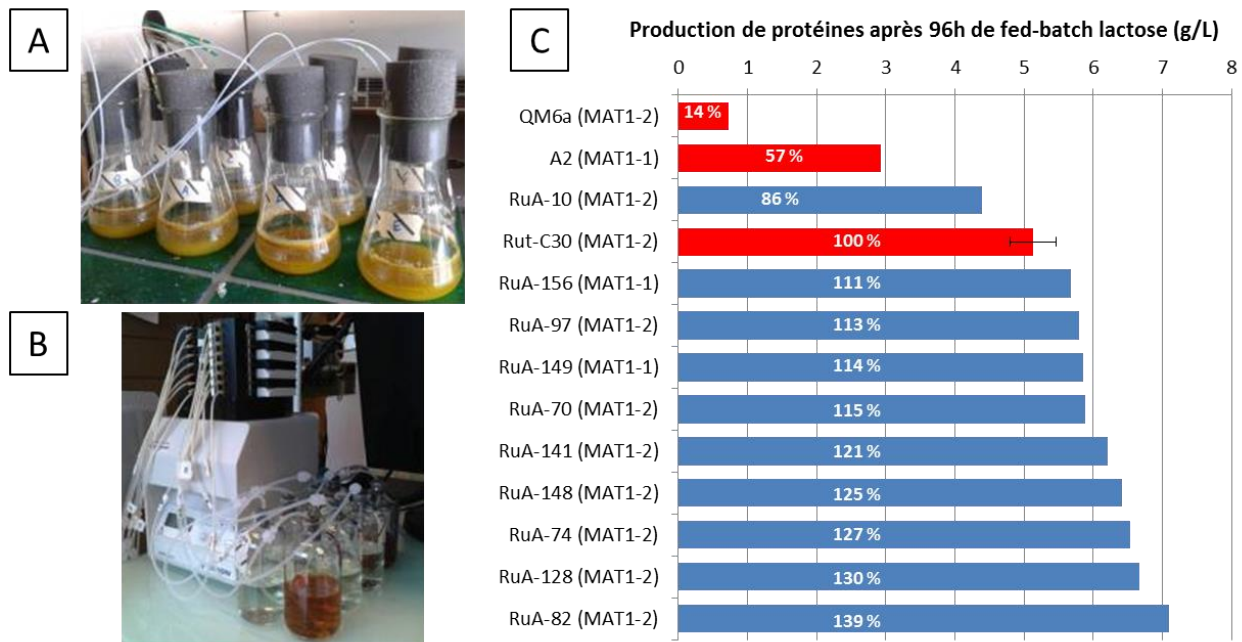


Figure 64 : Crible de la production de protéines en fioles alimentées

La méthodologie des fioles alimentées permet de tester huit souches en parallèle (A). Chaque fiole est alimentée par des pompes avec un débit de 0,3 mL/h avec une solution contenant 50 g/L de lactose, 0,8 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, et 160 mM NH_3 (B). À 96 h, les protéines totales sécrétées sont dosées (C). La production de protéines en fioles alimentées n'a été évaluée qu'une seule fois pour toutes les souches sauf pour la souche de référence RutC30. Les pourcentages représentent le taux de production de protéines par rapport à la souche de référence RutC30.

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

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

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

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

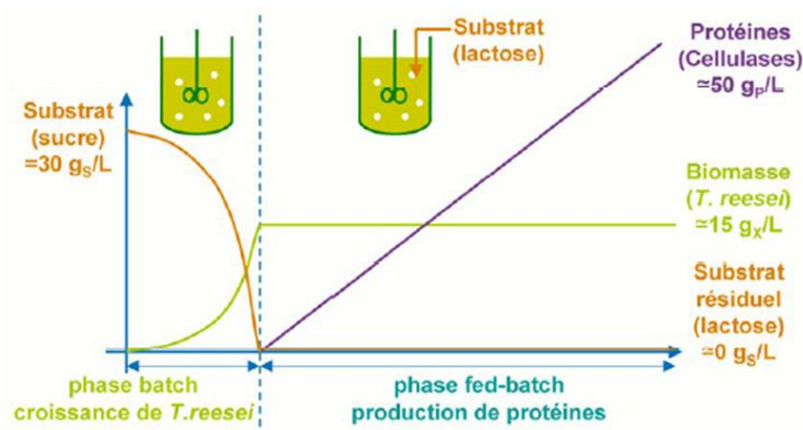


Figure 65 : Principe du procédé de production de cellulases d'IFP Énergies nouvelles.
Extrait de Jourdiier et al., 2012.

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

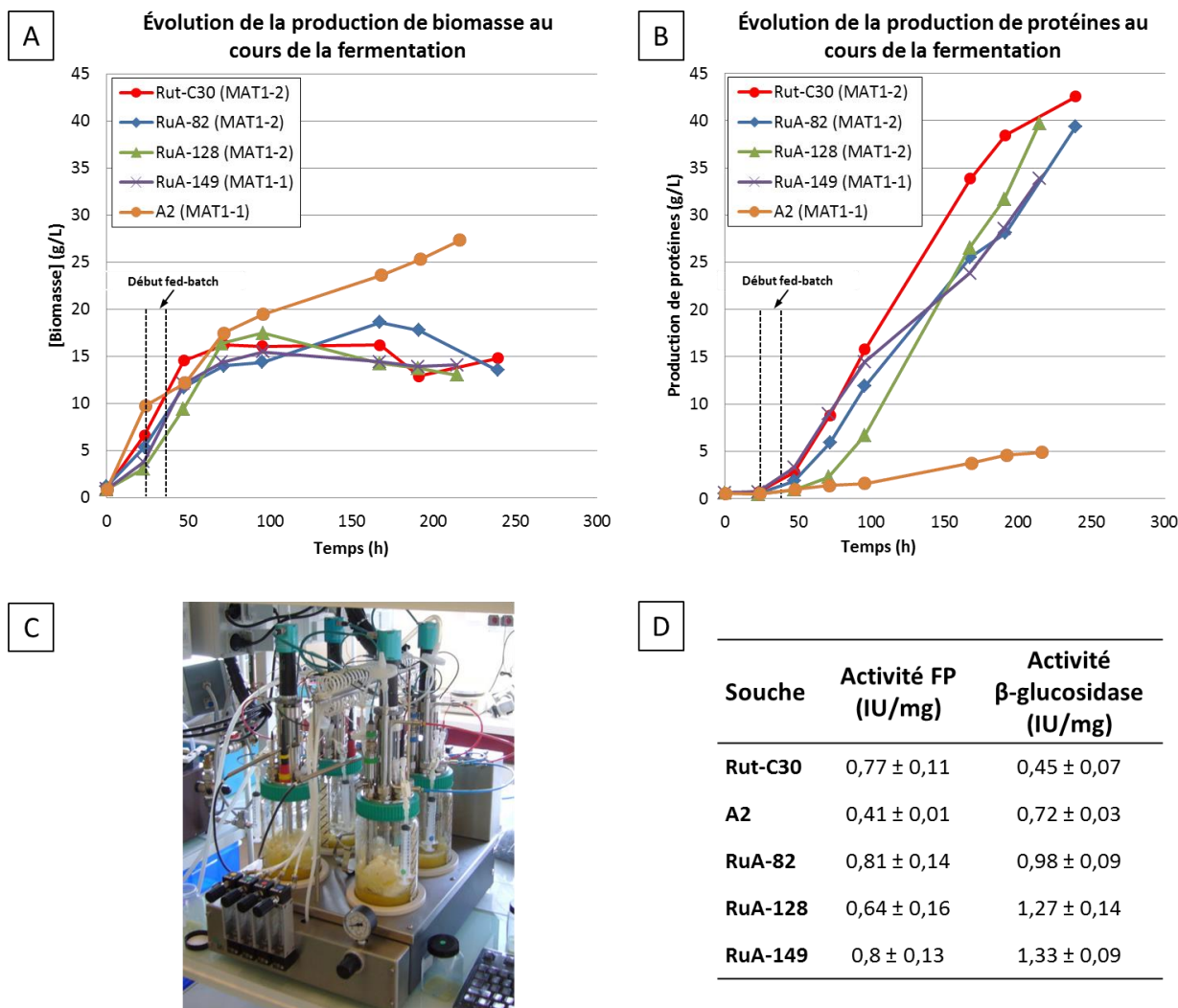


Figure 66 : Évaluations de la productivité en bioréacteur.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

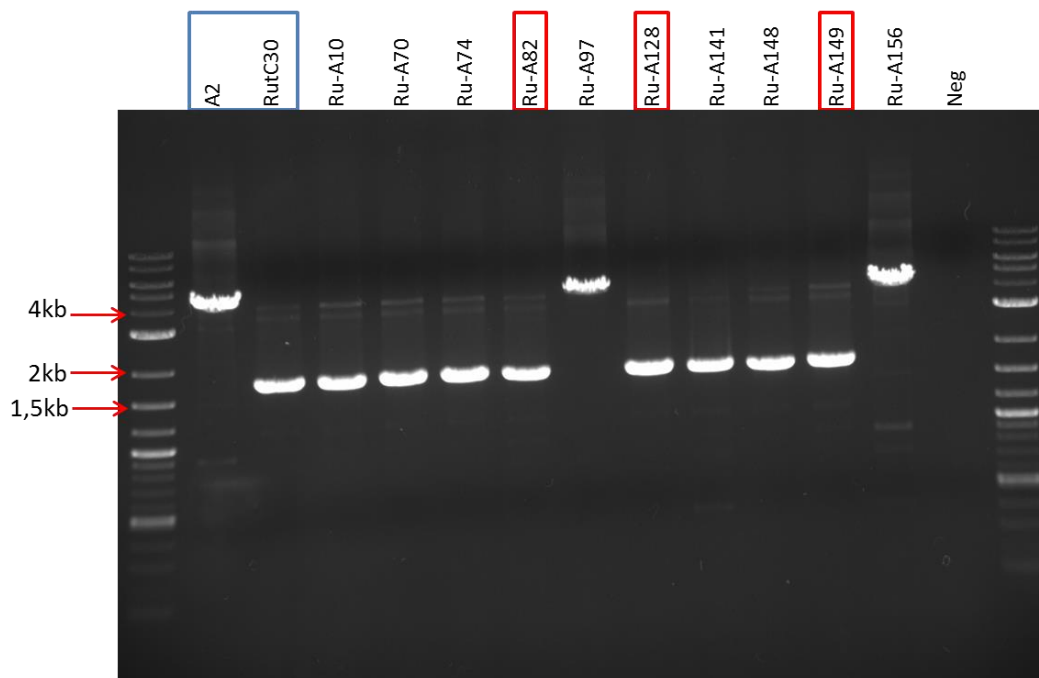



Figure 67 : Détection par PCR de la troncation du gène *cre1*.

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

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

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



	<i>bgl1</i>	$\Delta Cre1$	$\Delta 85 kb$	<i>idc1</i>
A2 (MAT1-1)	Blue	Blue	Blue	Blue
RuA-10 (MAT1-2)	Yellow	Yellow	Blue	Yellow
RutC30 (MAT1-2)	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
RuA-156 (MAT1-1)	Blue	Blue	White	Blue
RuA-97 (MAT1-2)	Yellow	Blue	Blue	Yellow
RuA-149 (MAT1-1)	Blue	Yellow	Yellow	Blue
RuA-70 (MAT1-2)	Yellow	Yellow	Yellow	Blue
RuA-141 (MAT1-2)	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
RuA-148 (MAT1-2)	Yellow	Yellow	Blue	Blue
RuA-74 (MAT1-2)	Yellow	Yellow	Blue	Blue
RuA-128 (MAT1-2)	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
RuA-82 (MAT1-2)	Yellow	Yellow	Blue	Yellow

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

3.3.1.4. Étude de la fertilité femelle

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

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

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

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

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

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

3.3.2.1. La stratégie du BSA-Seq

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

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

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

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

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

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

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

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

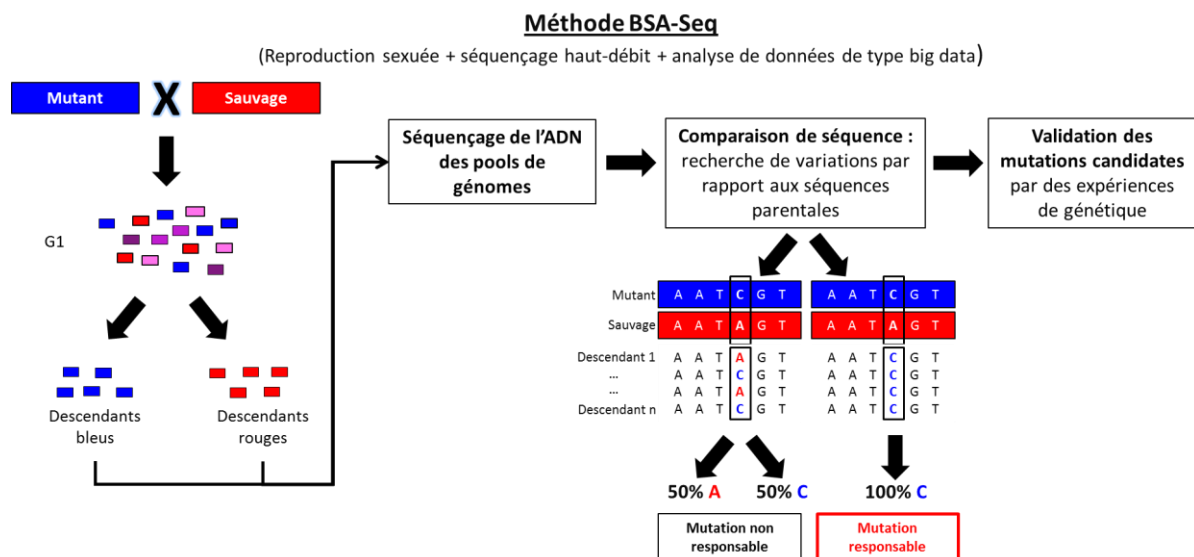


Figure 68 : Principe de la méthode BSA-Seq.

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

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

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

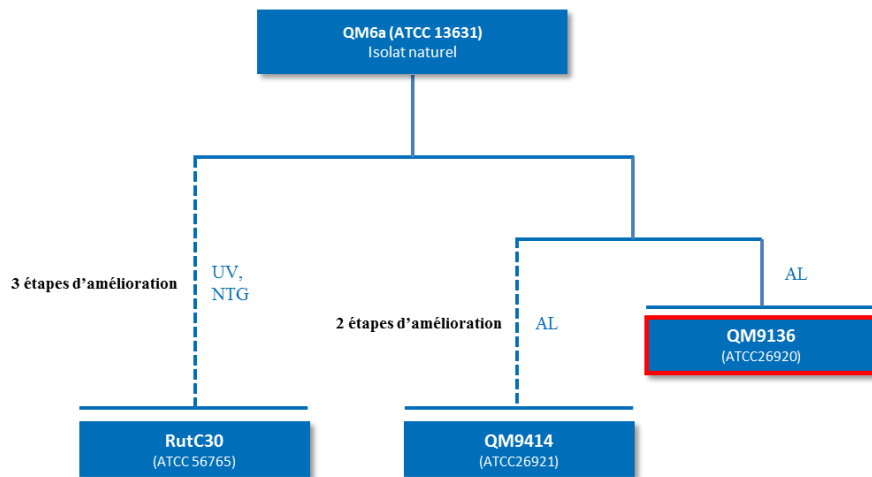


Figure 69 : Généalogie de la souche QM9136

La souche QM9136 a été obtenue suite à une étape de mutagenèse aléatoire par accélération linéaire (AL).

La souche QM9136 a été générée suite à une mutagenèse de l'isolat naturel QM6a (Mandels et al., 1971). Contrairement à la souche QM6a, la souche QM9136 ne produit plus aucune cellulase. La mutation responsable de ce phénotype cellulase-négatif a été élucidée grâce au séquençage de son génome par Lichius et al., (2015) et l'analyse des fonctions des gènes touchés par des mutations. Le séquençage a mis en évidence une mutation de type InDel dans le gène majeur de la production de cellulases *xyl1* (Trire2 : 122208) qui est un régulateur de la régulation de l'expression des gènes de cellulases. La délétion de la base A2294 est à l'origine d'un décalage de la phase de lecture du gène *xyl1* qui produit une protéine XYR1 tronquée à qui il manque les 140 acides aminés de la partie C-terminale. La complémentation de cette mutation restaure la production de cellulase.

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

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

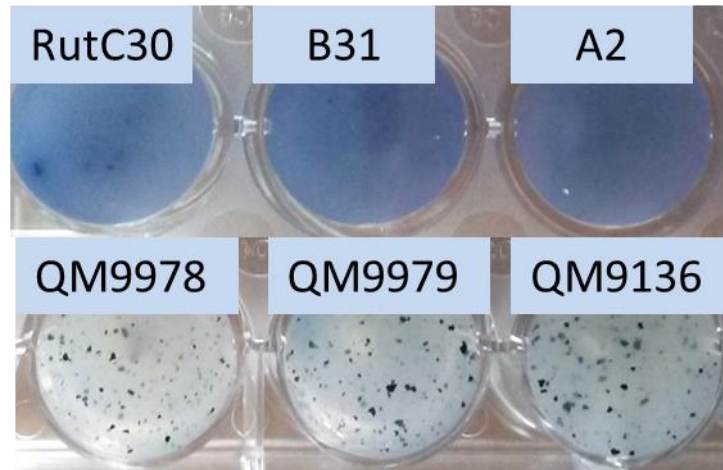


Figure 70 : Crible AZCL-He-Cellulose pour distinguer les souches productrices ou non de cellulases

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

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

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

3.3.2.3. Constitution des groupes de ségrégants

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

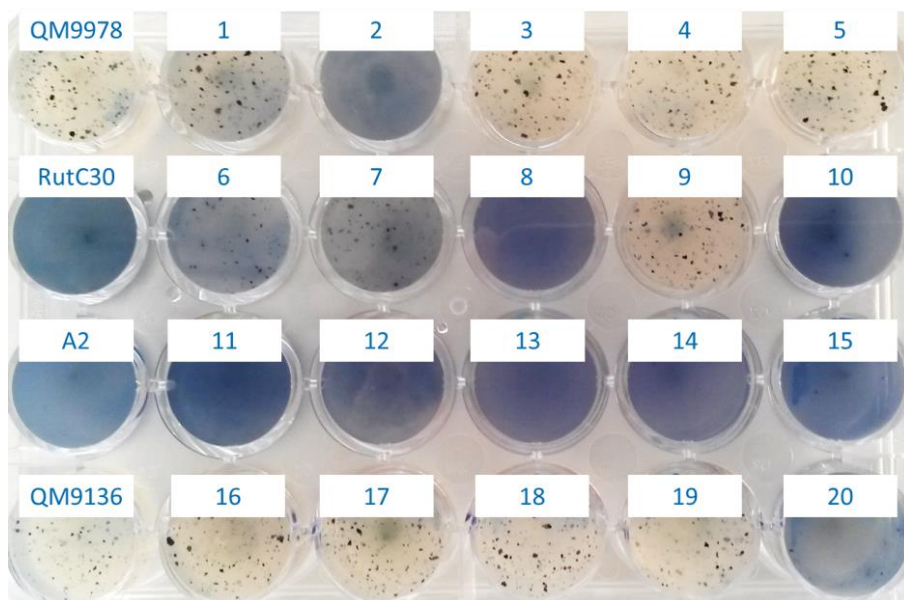


Figure 71 : Criblage des descendants du croisement A2xQM9136

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

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

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

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

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

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

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

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

Tableau 15 : Résumé du séquençage des deux groupes de descendants

Le nombre de lectures et les taux de couvertures indiqués sont ceux obtenus après les étapes de filtrages.

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

3.3.2.5. Séquençage et analyses des génomes parentaux

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

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

Tableau 16 : Résumé du séquençage de la souche sauvage A2

Le nombre de lectures et les taux de couvertures indiqués sont ceux obtenus après les étapes de filtrages et de trimming.

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

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

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

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

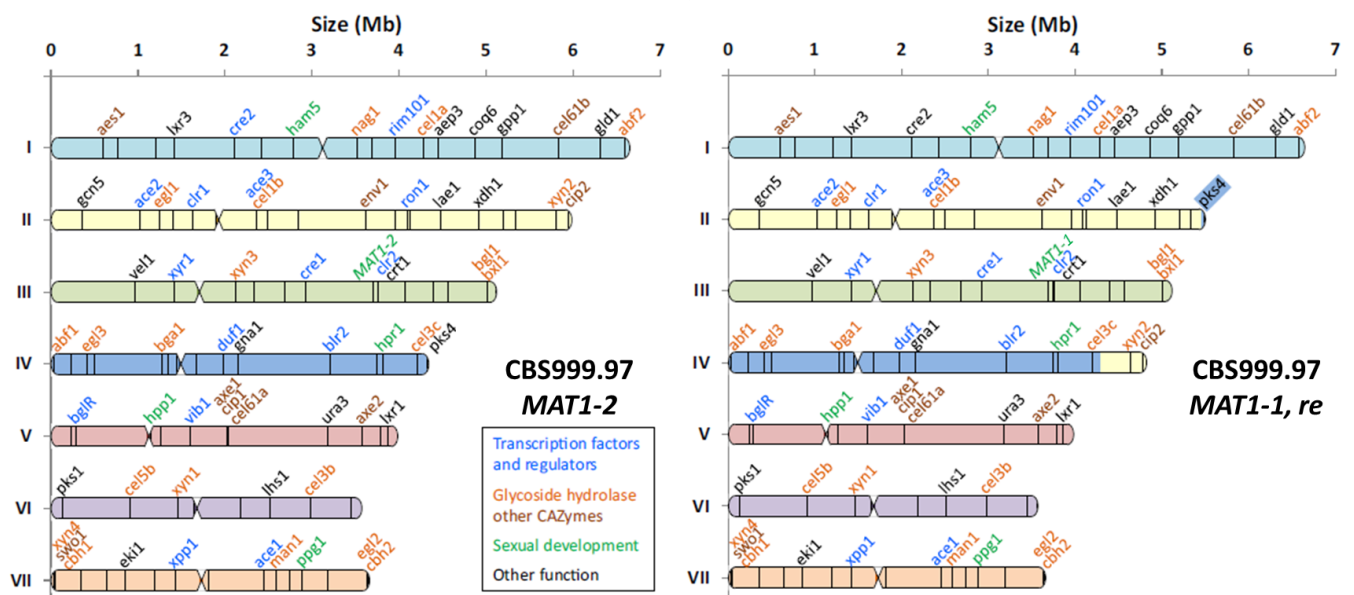


Figure 72 : Différence de caryotype entre les descendants *MAT1-2* et *MAT1-1re* de la souche CBS999.97

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

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

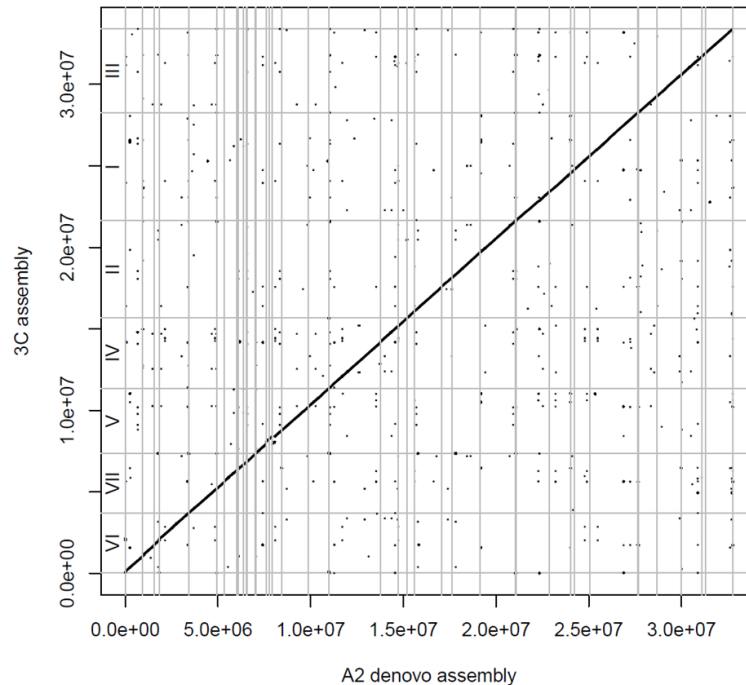


Figure 73 : Matrice de similarité entre les souches A2 et QM6a

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

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

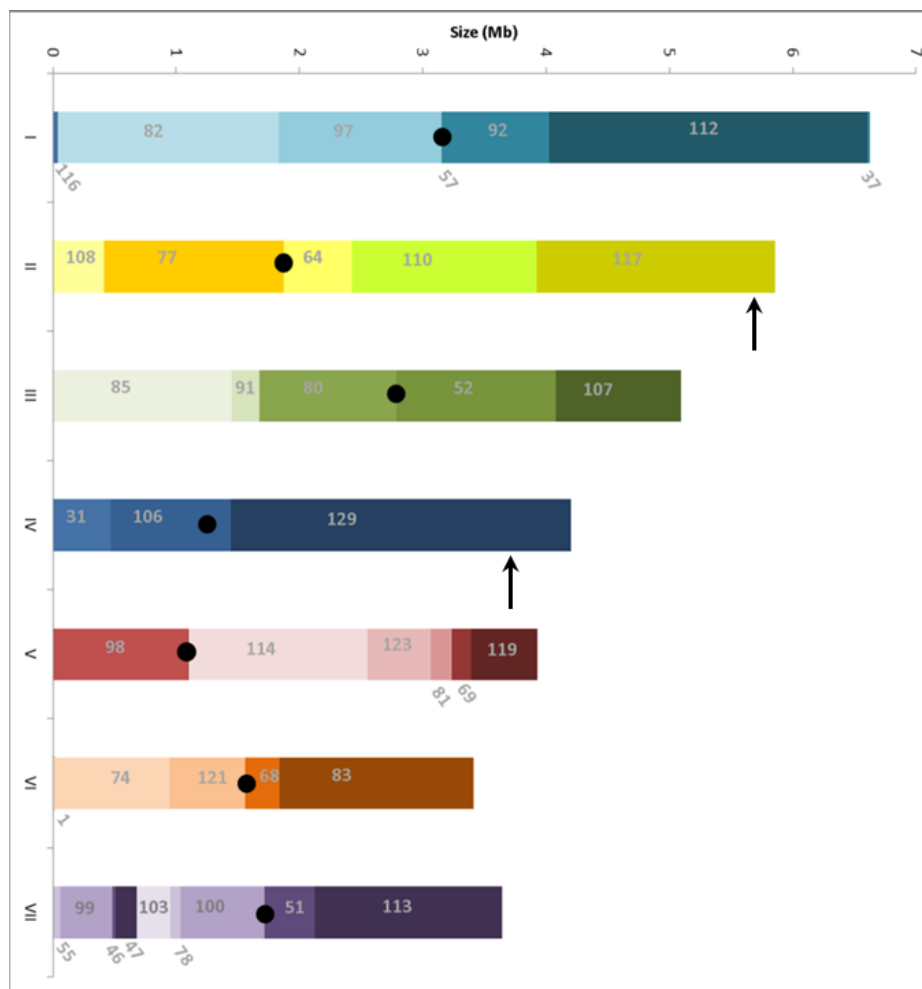


Figure 74 : Caryotype de la souche sauvage A2

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

3.3.2.6. Identification des mutations candidates

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

Tableau 17 : Nombre de variants détectés par groupe de descendants

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

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

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

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

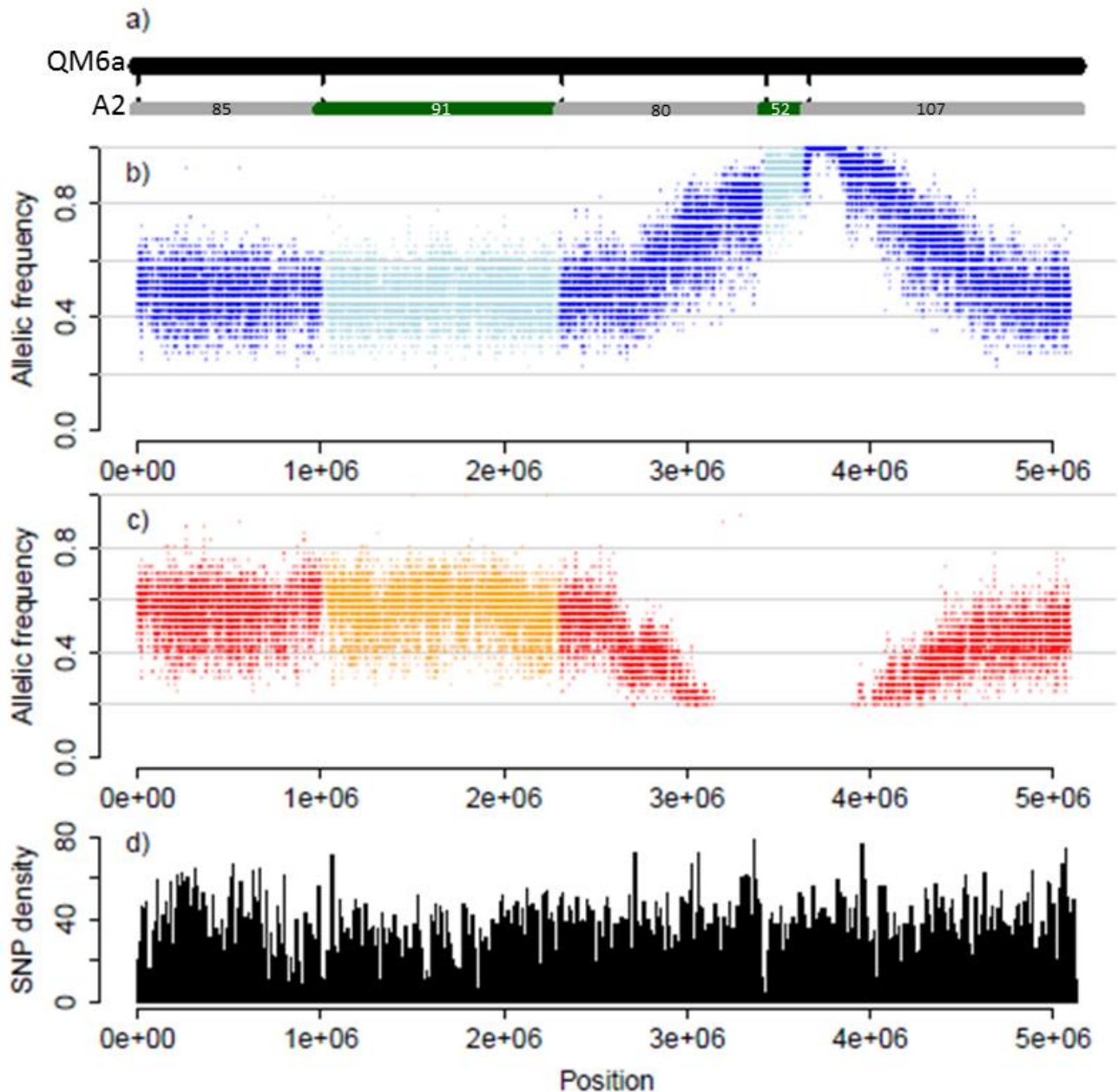


Figure 75 : Cartographie des SNPs sur le génome A2 et représentation de leurs fréquences alléliques

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

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

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

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

3.3.2.7. Validation génétique de la mutation candidate

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

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

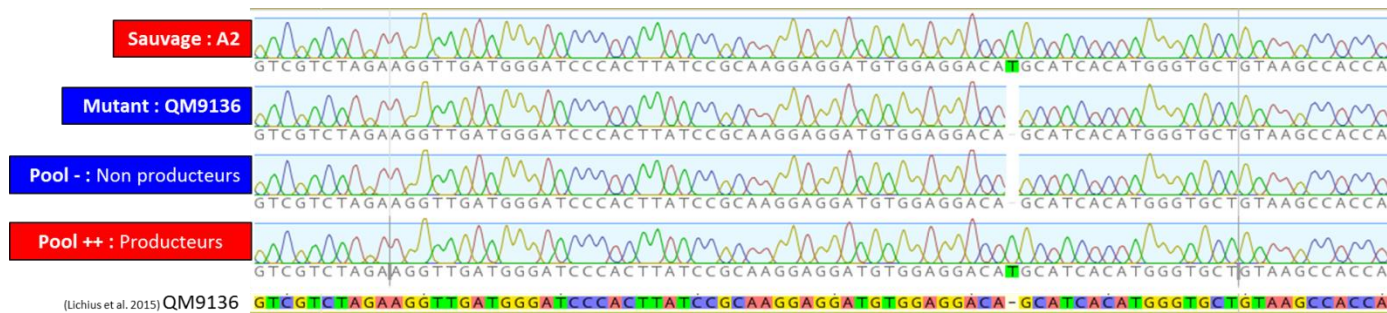


Figure 76 : Alignement des gènes *xyr1* des différentes souches parentales et groupe de descendants
 Un fragment interne de 1000pb du gène *xyr1* a été amplifié à l'aide du couple d'amorces Xyr1-F/ Xyr1-R puis il a été séquencé à l'aide du couple d'amorces Xyr1-seq-F/ Xyr1-seq-R.

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

3.3.3. Conclusion et discussion

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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