



MASTER 2 BMC PARCOURS GENOPATH ANNÉE 2021-2022

Titre du sujet de stage :

Camouflage moléculaire de la paroi chez le champignon phytopathogène *Botrytis cinerea*

Nom, adresse de l'Unité d'accueil / Nom du responsable de l'unité :

UMR5240, Laboratoire de Microbiologie, Adaptation et Pathogénie (MAP)
(CNRS, Université Lyon 1, INSA, BAYER SAS)
Université LYON 1, 10 rue Raphaël Dubois, LWOFF, F-69622 Villeurbanne Cedex
Responsable : Dr. William NASSER

Nom, adresse de l'Equipe d'accueil / Nom du responsable d'équipe :

Equipe de Génomique Fonctionnelle des Champignons Phytopathogènes
Laboratoire Mixte, BAYER S.A.S., 14, impasse Pierre Baizet, BP 99163, 69263 Lyon Cedex 09
Responsable : Dr. Nathalie POUSSEREAU

Nom, tel, adresse e-mail de l'encadrant de stage :

Dr. Mathias CHOQUER, tel : 0472852282, E-mail : mathias.choquer@univ-lyon1.fr

Sujet de stage :

Ce sujet de stage de Master 2 s'inscrit dans la problématique de la santé des plantes et s'intéresse aux champignons phytopathogènes causant des pertes de rendement considérables en agriculture. La paroi des champignons, enveloppe fibreuse de chitine, glucanes, et autres polysaccharides interconnectés, est un exosquelette assurant un rôle de support de la forme cellulaire et un rôle de protection vis à vis de l'environnement. Chez les champignons phytopathogènes, la paroi est également la zone de contact avec les plantes qu'ils parasitent et elle se retrouve donc au cœur d'un véritable dialogue moléculaire. Lors d'une infection, les plantes sont capables de dégrader les constituants de la paroi fongique par la sécrétion de chitinases. Les produits de dégradation de la chitine sont fortement immunogènes et perçus par les plantes, ce qui enclenche chez celles-ci des réactions de défense. Dans le but de contourner les mécanismes de défense de la plante, certains champignons sécrètent des enzymes appelées chitine désacétylases (CDA) dont l'action conduit à un décapage superficiel de la chitine contenue dans leur propre paroi. Cette désacétylation convertit la chitine en chitosan, un dérivé peu hydrolysable par les chitinases de la plante ce qui permet de «camoufler» la chitine et d'empêcher ainsi l'induction de l'immunité chez la plante hôte. L'hypothèse de ce camouflage n'a jamais été envisagée chez le champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea*, qui est responsable de la pourriture grise sur plus de 1000 plantes, dont plusieurs d'un fort intérêt agronomique (vigne, plantes maraîchères, tournesol...). Il présente une forte capacité de dissémination de ses spores dans l'environnement et sa manipulation génétique requiert un confinement de type L2.

Par des analyses bio-informatiques, 5 gènes codant pour des CDA sont retrouvés chez *B. cinerea*. Une stratégie de mutagenèse ciblée sur plusieurs de ces gènes a été initiée dans le laboratoire d'accueil de ce stage. Selon l'avancement de ce travail, une expérience de mutagenèse ou de complémentation fonctionnelle pourra être réalisée au cours du stage par transformation chimique de protoplastes du champignon ou par transformation médiée par *Agrobacterium tumefaciens*. Ainsi l'impact de l'absence d'une ou plusieurs CDA sur la physiologie du champignon sera mesuré *in vitro* comparativement à la souche sauvage et à une souche complétementée. Un défaut de croissance, de reproduction (genèse de spores) ou de différenciation révélera un éventuel rôle de ces protéines dans la vie saprophyte de *B. cinerea*. L'absence d'une ou plusieurs CDA pourrait en effet avoir un impact sur la composition ou l'intégrité de la paroi fongique, avec des conséquences négatives sur la biologie du champignon. Il est envisagé d'étudier cet impact chez des souches mutantes, à travers des mesures de réponse à plusieurs stress pariétaux (détergent tel le SDS, stress osmotique au KCl, intercalants de la paroi comme le rouge de congo et le calcofluor, inhibiteurs enzymatiques comme la Nikkomycine et la Caspofongine, enzymes de dégradation de la paroi fongique comme les chitinases...).

L'action des CDA sur la chitine conduit à la formation de chitosan, un polysaccharide détectable à l'aide d'un marqueur fluorescent (OGA488), par conséquent, la fonction de désacétylation des CDA putatives de *B. cinerea* pourra être validée par microscopie confocale en observant l'absence ou la plus faible présence de chitosan à la surface d'une souche mutante en comparaison de la souche sauvage.

Selon l'hypothèse que les CDA jouent un rôle dans le camouflage de l'agent pathogène, un mutant pourrait montrer une virulence plus faible que la souche parentale vis-à-vis d'un ou plusieurs hôtes. Cette hypothèse sera testée en mesurant des cinétiques d'infections de plantes à intérêt agronomique (haricot, tomate).

En utilisant la technique de RT-PCR quantitative, l'analyse de l'expression de gènes de l'hôte impliqués dans certaines voies de défense (éthylène, acide jasmonique, acide salicylique, ...) permettra de répondre à l'hypothèse du camouflage de la paroi en comparant les profils obtenus suite à l'infection par la souche parentale de *B. cinerea* ou bien par les différentes souches mutantes. Enfin, des lignées reportrices et des lignées mutantes d'*Arabidopsis thaliana* pourront être utilisées afin de valider cette hypothèse.

Ce travail permettra de valider si les CDA peuvent représenter une cible antifongique potentielle. Le stage s'effectuera au Centre de Recherche de Bayer (Vaise, Lyon 9ème) qui héberge notre équipe dans le cadre d'un partenariat avec l'Université Lyon 1, le CNRS et l'INSA.

Technologies utilisées :

Transformation génétique de champignon, Biologie moléculaire, Microscope confocal, RT-QPCR, Tests d'inhibition en microplaques.

Mots clés :

Microbiologie, Interaction plante-microorganisme, Génétique fongique.

Publications d'intérêt :

<https://doi.org/10.1111/1462-2920.15416>