



## **Master "Biologie Végétale" co-accrédité :**

# Université d'Angers, de Nantes, et Agrocampus Ouest

Institut de Recherche en Horticulture et Semences  
UMR 1354 - IRHS



# RAPPORT de STAGE EFFECTUE

par

# Ophélie Dubreuil

au

**Laboratoire de Pathologies fongiques des semences (FungiSem)**  
**Institut de Recherche en Horticulture et Semences (IRHS)**  
**UMR 1354 – IRHS**

en vue de l'obtention du  
**Master Biologie Végétale**

# Parcours : Gestion de la Santé des Plantes

(Responsable de stage : Thomas Guillemette,  
Professeur à l'Université d'Angers)

**Sujet :**

# CARACTERISATION DES EISOSOMES, POTENTIELS FACTEURS DE LA PATHOGENICITE CHEZ *ALTERNARIA BRASSICOLA*

Soutenance devant le jury d'examen le 15 Juin 2018





## **Master "Biologie Végétale" co-accrédité :**

**Université d'Angers, de Nantes, et Agrocampus Ouest**

Institut de Recherche en Horticulture et Semences  
UMR 1354 - IRHS



# RAPPORT de STAGE EFFECTUE

par

# Ophélie Dubreuil

au

Laboratoire de Pathologies fongiques des semences (FungiSem)

Institut de Recherche en Horticulture et Semences (IRHS)

UMR 1354 – IRHS

## **en vue de l'obtention du**

# Master Biologie Végétale

# **Parcours : Gestion de la Santé des Plantes**

(Responsable de stage : Thomas Guillemette,  
Professeur à l'Université d'Angers)

**Sujet :**

# CARACTERISATION DES EISOSOMES, POTENTIELS FACTEURS DE LA PATHOGENICITE CHEZ *ALTERNARIA BRASSICOLA*

Soutenance devant le jury d'examen le 15 Juin 2018



**ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT**

Je, soussigné (e) Ophélie Dubreuil, déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

Signature :





**L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :**



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

**Consulter la licence creative commons complète en français :**  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr/>

Ces conditions d'utilisation (attribution, pas d'utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page.





## Remerciements

Effectuer mon stage au sein de l’Institut en Horticulture et Semences (IRHS), et plus précisément de l’équipe « Pathologies fongiques des semences » (FungiSem), a été un grand honneur et un véritable plaisir pour moi. Je tiens donc à remercier dans un premier temps, Jean-Pierre Renou, responsable de l’IRHS, pour m’avoir accueillie au sein de cette structure. Je souhaite également remercier l’équipe administrative de l’Université d’Angers, ainsi que les enseignants pour les connaissances que j’ai pu acquérir, leur disponibilité et leurs conseils avisés. Les nombreuses personnes m’ayant entourée tout au long de ces six mois, ont permis de rendre cette expérience unique. Ainsi, je souhaite remercier chaque personne ayant contribué au bon déroulement de ce stage.

Je tiens à remercier Pascal Poupard, chef de l’équipe FungiSem, d’avoir transmis ma demande de stage à son équipe et de m’avoir si bien accueillie durant celui-ci.

Un grand merci à Thomas Guillemette, professeur à l’Université d’Angers, qui m’a donné l’opportunité de réaliser un stage aussi passionnant qu’enrichissant, fait confiance tout au long de ces six mois et donné des conseils précieux aussi bien concernant le stage que mon avenir professionnel.

Merci à Justine Colou de m’avoir donné l’opportunité de réaliser un stage à ses côtés pour faire avancer sa thèse, pour la qualité de son encadrement et sa gentillesse. La confiance qu’elle m’a portée m’a fortement touchée : elle m’a permis de travailler en autonomie alors que les journées pouvaient parfois sembler interminables sur l’agenda. Avoir évolué en apprenant à ses côtés fut un réel plaisir. Sa bonne humeur et son éternel optimisme resteront toujours dans mon esprit comme exemples à suivre. Merci également pour tous ces bons moments passés ensemble aussi bien au laboratoire qu’en dehors. Ils resteront d’excellents souvenirs.

Merci au personnel du plateau technique IMAC (IMAgerie Cellulaire) de la Structure Fédératrice de Recherche Qualité et Santé du Végétal (SFR QUASAV). Aurélia Rolland, responsable opérationnelle, et Fabienne Simonneau, responsable technique, m’ont accueillie dans leurs locaux, formée aux différentes techniques de microscopie et aidée lorsque j’en avais besoin. Merci également au personnel de la plateforme du Service Commun d’Imageries et d’Analyses Microscopiques (SCIAM) de l’Université d’Angers. Florence Manero, technicienne, a eu la gentillesse de prendre en charge nos mutants fongiques, de nous conseiller et de nous donner accès au Microscope Électronique à Transmission.

Merci à toutes les autres personnes de l’équipe FungiSem : Philippe Simoneau, Nelly Bataillé Simoneau, Claire Campion, Josiane Lecorff, Philippe Grappin, Bruno Hamon, Sophie Aligon, Muriel Marchi, Franck Bastide, Marie-Anne Le Moigne, Nubia Vélasquez, Anthony Kwasiborski, Kévin Fontaine et Julia Courtial. Merci de m’avoir accueillie et intégrée dans l’équipe si chaleureusement, ainsi que pour l’aide qu’ils ont pu me fournir. Leur bonne humeur quotidienne participe à l’ambiance plus qu’agréable de cette équipe. Travailler à leur côté fut un réel bonheur.

De façon plus générale, merci à l’ensemble du personnel de l’IRHS pour votre bonne humeur et votre sympathie.



# Table des matières

Table des matières .....	
Table des figures .....	
Table des tableaux .....	
Liste des annexes .....	
Liste des abréviations.....	
<b>Caractérisation des eisosomes, potentiels facteurs de la pathogénicité chez <i>Alternaria brassicicola</i> .....</b>	<b>1</b>
1- Introduction.....	1
1-1 Pathosystème <i>Alternaria brassicicola</i> – Brassicacées .....	1
1-2 Domaines MCC/eisosomes .....	3
2- Matériels et méthodes.....	7
2-1 Matériel fongique .....	7
2-2 Création de mutants fongiques.....	7
2-3 Tests phénotypiques <i>in vitro</i> .....	9
2-4 Microscopie.....	10
2-5 Phénotypage sur plantes.....	11
3- Résultats.....	12
3-1 Localisation cellulaire des eisosomes.....	12
3-2 Impact des eisosomes sur la structure membranaire .....	13
3-3 Capacité de résistance aux stress.....	13
3-4 Etude de l'agressivité des mutants des domaines MCC/eisosomes chez <i>Altenaria brassicicola</i> .....	14
4- Discussion.....	15
5- Conclusion et perspectives .....	19



## Table des figures

<u>Figure 1</u> : Présentation des symptômes caractéristiques induits par la souche sauvage d' <i>Alternaria brassicicola</i> .....	<b>2</b>
<u>Figure 2</u> : Cycle infectieux d' <i>Alternaria brassicicola</i> .....	<b>2</b>
<u>Figure 3</u> : Schéma de la structure d'un domaine MCC/eisosomes chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	<b>3, 5</b>
<u>Figure 4</u> : Déroulé de la création de la cassette <i>lsp1-APEX2-M13</i> .....	<b>8</b>
<u>Figure 5</u> : Photographies de conidies germées réalisées au microscope optique à épifluorescence.....	<b>12</b>
<u>Figure 6</u> : Photographies de coupes de conidies réalisées au microscope électronique à transmission. (A et B) Souche sauvage Abra 43 (C et D) Souche $\Delta slm1$ (E et F) Souche $\Delta lsp1$ .....	<b>13</b>
<u>Figure 7</u> : Photographies de coupes de conidies réalisées au microscope électronique à transmission. (A et B) Souche $\Delta pil1-lsp1$ .....	<b>13</b>
<u>Figure 8</u> : Photographies de coupes de conidies réalisées au microscope électronique à transmission. (A) Souche sauvage Abra 43 (B) Souche $\Delta pil1-lsp1$ .....	<b>13</b>
<u>Figure 9</u> : Mesure du diamètre des colonies des doubles mutants $\Delta pil1-lsp1$ en comparaison à la souche sauvage en présence de sorbitol 2 M dans le milieu PDA.....	<b>14</b>
<u>Figure 10</u> : Aire sous la courbe de croissance des différents doubles mutants $\Delta pil1-lsp1$ en comparaison à la souche sauvage en présence de DMSO 1%.....	<b>14</b>
<u>Figure 11</u> : Photographie des symptômes induits par <i>Alternaria brassicicola</i> sur feuille de choux.....	<b>14</b>
<u>Figure 12</u> : Photographies de conidies germées sur feuilles de choux réalisées au microscope électronique à balayage.....	<b>14</b>
<u>Figure 13</u> : Pourcentage de graines contaminées par les mutants $\Delta lsp1$ , $\Delta slm1$ et $\Delta pil1-lsp1$ et la souche sauvage (Abra43). .....	<b>15</b>



## Table des tableaux

<u>Tableau I</u> : Tableau des profils d'expression des gènes codant des protéines des domaines MCC/eisosomes.....	<b>1, 18</b>
<u>Tableau II</u> : Récapitulatif des protéines présentes dans les domaines MCC/eisosomes chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (souche de référence) et de leurs homologues chez <i>Alternaria brassicicola</i> .....	<b>3, 5, 15</b>
<u>Tableau III</u> : Liste des mutants des domaines MCC/eisosomes d' <i>Alternaria brassicicola</i> .....	<b>7</b>
<u>Tableau IV</u> : Présentation des trois cycles PCR successifs permettant la fusion de deux fragments d'ADN, ou plus.....	<b>8</b>
<u>Tableau V</u> : Molécules analysées pour déterminer leur action sur la croissance fongique par néphélométrie laser.....	<b>10</b>
<u>Tableau VI</u> : Tableau récapitulatif des résultats obtenus avec les différents tests de résistances aux stress effectués.....	<b>13, 14, 17</b>



## **Liste des annexes**

Annexe : Protocole utilisé par le SCIAM pour la préparation des échantillons pour les observations au microscope électronique à transmission .....**11**



## Liste des abréviations

*A. brassicicola* : *Alternaria brassicicola*

*A. thaliana* : *Arabidopsis thaliana*

*C. albicans* : *Candida albicans*

GFP : Green Fluorescent Protein

IMAC : Imagerie Cellulaire (plateau technique)

KO : Knock Out

MCC : Membrane Compartment of Can1

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDA : Potato Dextrose Agar

PDB : Potato Dextrose Broth

PI<sub>4,5</sub>P<sub>2</sub> : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

*S. cerevisiae* : *Saccharomyces cerevisiae*

SCIAM : Service Commun d'Imageries et d'Analyses Microscopiques (plateforme)

SFR QUASAV : Structure Fédérative de Recherche Qualité et Santé du Végétal

Tableau I: Tableau des profils d'expression des gènes codant des protéines des domaines MCC/eisosomes. Les expressions des gènes ont été analysées sous différentes conditions de stress et au moment de la contamination de semences.

(par rapport au témoin : + : le gène est surexprimé ; NS : l'expression du gène est inchangée ; - : le gène est sous-exprimé ; / : les données sont non disponibles) (Belmas, données non publiées ; N'Guyen, 2015)

# **Caractérisation des eisosomes, potentiels facteurs de la pathogénicité chez *Alternaria brassicicola***

## **1- Introduction**

Les végétaux en culture peuvent être soumis à des stress abiotiques (déshydratation, températures extrêmes, carences nutritives, ...) ou biotiques (micro-organismes pathogènes, animaux, nématodes, insectes). Les agents pathogènes responsables des stress biotiques ont mis en place des mécanismes, globalement dénommés facteurs de pathogénicité, leur permettant soit d'attaquer les tissus hôtes (formation d'appressoria, production de toxines...), soit de se protéger contre les contraintes chimiques et physiques rencontrées lors de la colonisation de tels tissus (protection contre les métabolites de défense, tolérance au stress hydrique sur semences...). Ces derniers sont primordiaux au succès de l'infection et leur inhibition ciblée pourrait donc permettre par la suite de développer de nouvelles méthodes de protection.

Dans le cadre des travaux de thèse de G. N'Guyen (2015), des analyses transcriptomiques menées chez le champignon phytopathogène *Alternaria brassicicola* confrontés à des stress hydriques (exposition au sorbitol, dessiccation) ont mis en évidence l'expression accrue de gènes liés à la structuration et au fonctionnement des domaines membranaires MCC (Membrane Compartment of Can1) /eisosomes par rapport aux conditions témoins (Tableau I). Ce champignon est confronté à ce type de contraintes hydriques lors du processus infectieux, en particulier lorsqu'il colonise les semences. L'objectif de ce stage était donc d'étudier chez ce mycète le rôle potentiel de ces domaines membranaires dans le pouvoir pathogène et dans l'adaptation à des contraintes environnementales.

### **1-1 Pathosystème *Alternaria brassicicola* – Brassicacées**

#### **1-1-1 Brassicacées**

La famille des *Brassicaceae*, autrefois connue sous le nom de *Cruciferae*, a une grande importance économique. En effet, ce ne sont pas moins de 3709 espèces végétales qui sont regroupées dans ce groupe monophylétique (Al-Shehbaz *et al*, 2006). Se comptent parmi

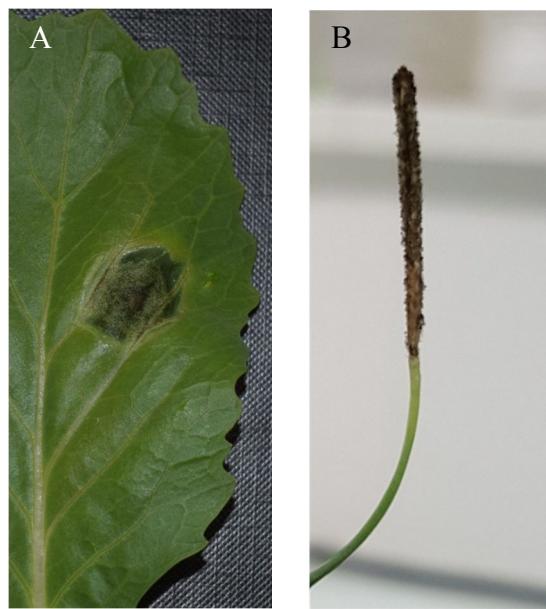


Figure 1 : Présentation des symptômes caractéristiques induits par la souche sauvage d'*Alternaria brassicicola* (A) sur feuilles de choux et (B) sur siliques d'*Arabidopsis thaliana*.

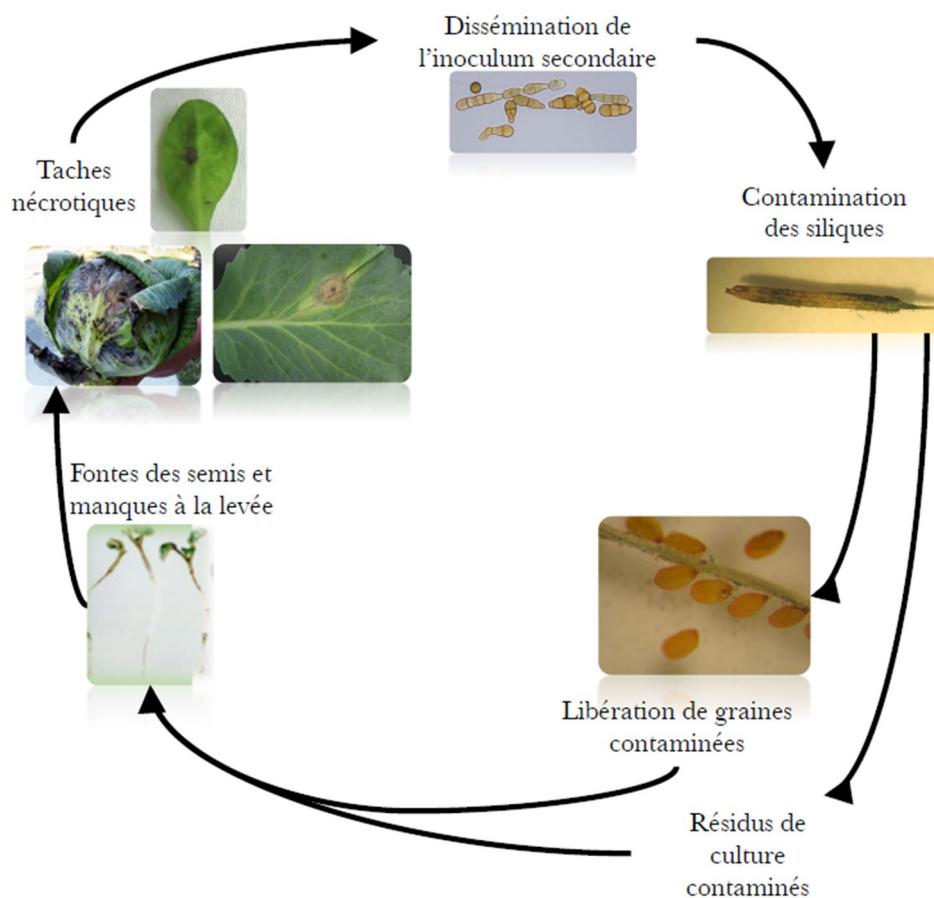


Figure 2 : Cycle infectieux d'*Alternaria brassicicola*. (Pochon, 2012)

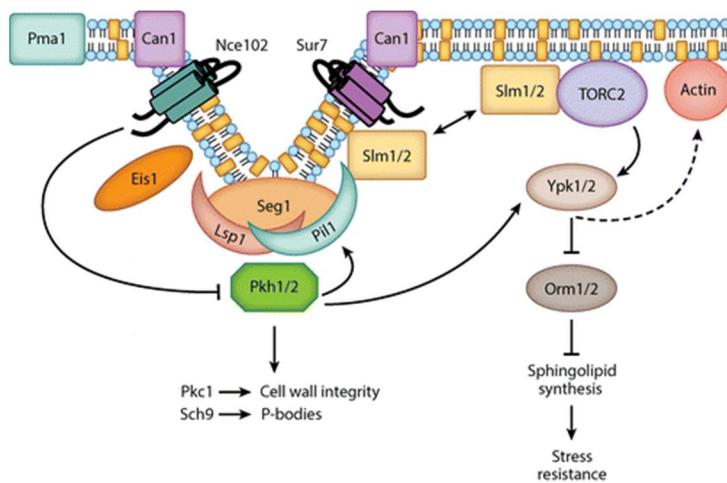
celles-ci aussi bien des espèces ornementales (ibéris, giroflée) que des espèces dédiées à la consommation (choux, radis, colza ou encore moutarde), ainsi qu'une plante modèle utilisée en recherche : *Arabidopsis thaliana*. Cette famille de végétaux est sensible à des agents pathogènes bactériens, viraux et fongiques (par exemple *Xanthomonas campestris* *pv campestris*, virus de la mosaïque du tournesol, *Alternaria brassicicola*) (Al-Kaff *et al.*, 1994 ; Vicente *et al.*, 2000 ; Belmas *et al.*, 2018).

### **1-1-2 *Alternaria brassicicola***

*Alternaria brassicicola* est un ascomycète de la classe des *Dothideomycetes*. Il est responsable de la maladie des « tâches noires » des Brassicacées, autrement nommée l’alternariose. Cet agent pathogène a un spectre d’hôtes restreint aux membres de la famille des Brassicacées (Nowicki *et al.*, 2012 ; Pochon, 2012). Les principaux symptômes causés par ce champignon sont : l’apparition de taches sombres entourées d’un halo chlorotique sur les tiges et les feuilles de ses hôtes (diminution de la surface de photosynthèse et accélération de la senescence), l’apparition de nécroses sur les siliques et l’infection des semences (Figure 1). Cette dernière étape induit une réduction de la germination, de la vigueur des graines et donc d’importantes fontes des semis (Nowicki *et al.*, 2012).

Le cycle d’infection d’*A. brassicicola*, présenté dans la figure 2, est caractéristique des champignons nécrotrophes. L’inoculum primaire du champignon est initialement présent dans les résidus de cultures et sur les graines déjà contaminées. La transmission se fait alors soit directement de la graine à la plantule, si la graine parvient à germer, soit des résidus aux parties aériennes de l’hôte. Le champignon se développe alors et induit les symptômes typiques de l’alternariose. *A. brassicicola* va alors produire des conidies au niveau des zones nécrotiques à la surface des organes aériens afin d’effectuer une dissémination asexuée vers les plantes avoisinantes. Des symptômes apparaissent sur les tiges et les siliques des plantes primo-infectées et certaines des plantes environnantes, rendant les fruits impropre à la consommation et contaminant les graines, ce qui prépare le prochain cycle d’infection (Pochon, 2012).

Le traitement de ce champignon est une combinaison de l’adaptation des pratiques culturales et de traitements chimiques tels que des fongicides pré- et post- levée. Les semences sont également vérifiées et certifiées avant distribution, ce qui permet de réduire l’incidence de la maladie (Nowicki *et al.*, 2012).



**Figure 3 :** Schéma de la structure d'un domaine MCC/eisosomes chez *Saccharomyces cerevisiae* (Douglas *et al.*, 2014)

**Tableau II :** Récapitulatif des protéines présentes dans les domaines MCC/eisosomes chez *Saccharomyces cerevisiae* (souche de référence) et de leurs homologues chez *Alternaria brassicicola* (Douglas *et al.*, 2011 ; Foderaro *et al.*, 2017 ; N'Guyen, 2015). (ND : Données non disponibles).

Protéines	Fonctions	Nombre de copies par cellule	Présence chez <i>Alternaria brassicicola</i>	E-value par rapport à la souche de référence
<b>Protéines des domaines MCC</b>				
<b>Sur7</b>	Symporteur de la famille de Sur7	17 000	AB08885.1	2,00E-32
Fmp45	Symporteur de la famille de Sur7	329	AB03776.1	0,003
Pun1	Symporteur de la famille de Sur7	1 660	AB03912.1	1,00E-09
Ynl194c	Symporteur de la famille de Sur7	ND	/	/
<b>Nce102</b>	Symporteur de la famille de Nce102	1824	AB04716.1	2,00E-19
Fhn1	Symporteur de la famille de Nce102	ND	/	/
Can1	Transporteur H+ - Arginine	ND	AB08516.1	2,00E-108
Fur4	Transporteur H+ - Uracile	3	AB04392.1	2,00E-153
Tat2	Transporteur H+ - Tyrosine et Tryptophane	752	AB08109.1	2,00E-136
<b>Protéines des eisosomes</b>				
<b>Pil1</b>	Domaine BAR	115 000	AB08863.1	5,00E-142
<b>Lsp1</b>	Domaine BAR	104 000	AB09572.1	2,00E-67
Pkh1	Protéine-sérine-thréonine kinase	ND	AB04691.1	6,00E-111
Pkh2	Protéine-sérine-thréonine kinase	ND	AB07167.1	2,00E-45
Eis1	Inconnu	5 570	AB07928.1	0,034
<b>Slim1</b>	Domaine BAR et domaine PH	5 190	AB02000.1	8,00E-91
Slim2	Domaine BAR et domaine PH	2 610	AB05189.1	2,00E-30
Seg1	Inconnu	ND	/	/
Mdg1	Inconnu	1 240	AB06956.1	3,00E-10
Ygr130c	Inconnu	10 300	AB09979.1	0,002
Pst2	Identiques au protéine "flavodoxin-like"	2 330	AB10448.1	1,00E-63
Rfs1	Identiques au protéine "flavodoxin-like"	7 060	/	/
Ycp4	Identiques au protéine "flavodoxin-like"	14 600	AB02777.1	9,00E-81
Msc3	Inconnu	131	/	/
Rgc1	Protéine contenant un domaine homologue à la pleckstrine	300	/	/
Aim3	Inconnu	ND	/	/
Mrp8	Inconnu	1 550	/	/
Sap1	ATPase de la famille AAA (putative)	300	AB02208.1	5,00E-140
Yta6	ATPase de la famille AAA (putative)	259	AB02031.1	3,00E-79
Xrn1	Exonucléase	11 700	AB10419.1	2,00E-120

## 1-2 Domaines MCC/eisosomes

La membrane plasmique des champignons est composée de divers domaines se différenciant par leur taille, leur composition et leur stabilité. Les domaines MCC/eisosomes ont d'abord été identifiés chez *Saccharomyces cerevisiae* (Walther *et al.*, 2006). Ils sont alors décrits comme des zones stables et ponctuelles correspondants à des invaginations membranaires (environ 300 nm de longueur et 50 nm de profondeur) présentes sur la membrane plasmique. Ces domaines semblent jouer un rôle dans l'organisation de cette membrane (Douglas *et al.*, 2011).

Le rôle et la structure des domaines MCC/eisosomes ont déjà été étudiés chez d'autres organismes fongiques, filamenteux et levures, notamment : *Ashbya gossypii* (Seger *et al.*, 2011), *Aspergillus nidulans* (Vangelatos *et al.*, 2010), *Schizzosaccharomyces pombe* (Kabeche *et al.*, 2011) et *Candida albicans* (Reijnst *et al.*, 2011), mais leur impact sur la capacité fongique à infecter les plantes et les semences n'a pas été analysé.

### 1-2-1 Domaines “Membrane Compartment of Can1” (MCC)

Suite à la découverte de ces domaines, initiée par la visualisation des protéines Sur7 et Can1 marquées à la GFP sur la membrane plasmique, d'autres protéines les composant ont par la suite été identifiées (Alvarez *et al.*, 2009 ; Grossmann *et al.*, 2008 ; Fröhlich *et al.*, 2009). Ainsi, plusieurs transporteurs ont été identifiés tels que des transporteurs de nutriments et deux familles différentes de transporteurs qui contiennent quatre domaines transmembranaires nommés « tetraspanners ». Une de ces familles de « tetraspanners » comprend la protéine Sur7 et ses paralogues : Fmp45, Pun1 et Ynl194c. L'autre famille de « tetraspanners » comprend les protéines Fhn1 et Nce102 (Douglas *et al.*, 2011). L'ensemble des protéines des domaines MCC est présenté sur la figure 3 et le tableau II.

#### 1-2-1-1 Nce102

Cette protéine présente dans les domaines MCC semble impliquée dans la formation des eisosomes puisqu'en cas de délétion du gène correspondant, il y a une réduction importante du nombre d'eisosomes formés (Grossmann *et al.*, 2008). Cette protéine n'est pas uniquement localisée dans les domaines MCC mais aussi dans le cytoplasme : sa localisation cellulaire est dépendante des concentrations intracellulaires en sphingolipides, ce qui pourrait indiquer que Nce102 a un rôle de senseur de ces lipides (Douglas *et al.*, 2011 ; Fröhlich *et al.*, 2009).



La protéine Nce102 semble réguler négativement l'activité de protéines kinases Pkh ce qui a pour conséquence d'empêcher la phosphorylation d'une protéine importante des eisosomes : Pil1 (Fröhlich *et al.*, 2009).

### 1-2-1-2 Sur7

Sur7 est une protéine membranaire des domaines MCC, liée à la machine endocytique (Walther *et al.*, 2007). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la protéine Sur7 n'est pas associée aux domaines dès le début de leur formation, mais plutôt suite à la formation de la courbure initiée par l'association des eisosomes aux domaines MCC. Sa présence serait régulée par la concentration en phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI<sub>4,5</sub>P<sub>2</sub>), un phospholipide abondant dans la membrane plasmique. Ainsi, en cas de forte concentration intracellulaire de cette molécule, Sur7 est localisée sur la partie supérieure des sillons alors qu'en faible concentration de PI<sub>4,5</sub>P<sub>2</sub>, la protéine est répartie de façon homogène sur la membrane plasmique (Karotki *et al.*, 2011). Chez un autre organisme, *Aspergillus nidulans*, l'homologue de Sur7 est également retrouvé de façon membranaire et nucléaire dans les ascospores matures mais aussi dans des vacuoles des ascospores en germination (Athanasopoulos *et al.*, 2013).

La protéine Sur7 serait impliquée dans la tolérance fongique à des stress osmotiques, dans l'étape de sporulation et dans le métabolisme en sphingolipides (Young *et al.*, 2002). Chez *C. albicans* la protéine permettrait d'induire une organisation spatiale correcte de la paroi cellulaire (Wang *et al.*, 2011). Toujours chez *C. albicans*, Sur7 serait aussi impliquée dans la tolérance à un large panel de stress (chaleur et exposition au cuivre) ainsi que dans la virulence du champignon (Douglas et Konopka, 2014).

### 1-2-1-3 Autres transporteurs

D'autres transporteurs sont également réunis au sein des domaines MCC. Ils peuvent aussi bien être des transporteurs de nutriments que des symporteurs de molécules spécifiques. Les symporteurs identifiés sont à ce jour au nombre de trois : Can1 qui est une arginine perméase, Fur4 qui est une uracile perméase et Tat2 qui est une tryptophane/tyrosine perméase (Douglas *et al.*, 2011). Ces transporteurs ne sont cependant pas spécifiques aux domaines MCC puisqu'ils sont retrouvés également dans d'autres microdomaines présents dans la membrane plasmique. De plus, ils peuvent également être localisés temporairement dans le cytoplasme lorsqu'il y a dépolarisation de la membrane plasmique (Mollinedo, 2012).



## **1-2-2 Eisosomes**

Les eisosomes ont été décrits pour la première fois par le Walther *et al.* en 2006. Ces structures correspondent à un ensemble de protéines associées à la membrane plasmique et situées à la périphérie des domaines MCC. Vingt protéines ont été identifiées comme étant des protéines des eisosomes chez *S. cerevisiae* (tableau II, figure 3). Les protéines les plus importantes du complexe protéique, de par leur nombre de copies de transcrits au sein des cellules, sont : Pil1, Lsp1, Eis1, Seg1/Ymr086w, Slm1, Slm2 et les protéines kinases Pkh1 et Pkh2 (Douglas *et al.*, 2011 ; Foderaro *et al.*, 2017).

Les études qui ont suivi leur découverte sont très contradictoires tant sur le rôle que sur le fonctionnement des eisosomes. Par exemple, alors que certaines publications les décrivent comme des structures stables et immobiles (Walther *et al.*, 2006 ; Douglas *et al.*, 2014), d'autres les définissent comme partiellement ou totalement mobiles (Luo *et al.*, 2008 ; Olivera-Couto *et al.*, 2015). La taille des eisosomes est définie comme uniforme et leur population est d'environ 20 à 50 structures par cellule, réparties de façon homogène et aléatoire le long de la membrane plasmique chez *Saccharomyces cerevisiae* (Moreira *et al.*, 2009 ; Moreira *et al.*, 2012).

### **1-2-2-1 Pil1 / Lsp1**

Les protéines Pil1 et Lsp1 se situent sur la partie inférieure du sillon. Ces protéines semblent jouer un rôle important dans le déclenchement de la formation des domaines MCC/eisosomes (Walther *et al.*, 2006). Ces protéines, possédant un domaine BAR, permettent l'ancrage à la membrane et l'initiation de la courbure (Olivera-Couto *et al.*, 2011 ; Walther *et al.*, 2006 ; Zimmerberg et McLaughlin, 2004). La délétion du gène *lsp1* n'affecte pas la formation des domaines MCC/ eisosomes contrairement à la délétion du gène *pil1*. Ainsi, bien que *pil1* et *lsp1* soient considérés comme des paralogues, leurs fonctions respectives ne semblent pas complètement similaires (Walther *et al.*, 2006). Le nombre et la taille des eisosomes sont limités par la quantité de protéines Pil1 présentes dans la cellule. La protéine Pil1 semble ainsi être un régulateur de la biogénèse des eisosomes (Moreira *et al.*, 2009).

Les protéines Pil1 et Lsp1 sont phosphorylées par les protéines kinases Pkh1 et Pkh2, qui sont connues pour être activées par des changements du niveau en sphingolipides au sein des membranes et pour avoir un rôle de régulateur de certaines fonctions cellulaires telle que l'endocytose (Luo *et al.*, 2008 ; Walther *et al.*, 2007). Les modifications induites par les



phosphorylations semblent réguler l'assemblage ou le désassemblage des domaines MCC/eisosomes.

### **1-2-2-2 *Slm1 / Slm2***

Les protéines Slm1 et Slm2 sont des homologues dont les rôles au sein des cellules sont redondants (Fadri *et al.*, 2005). Ces protéines sont nécessaires à la bonne formation des eisosomes. Leur mutation entraîne une réduction du nombre d'eisosomes et une accumulation de Pil1 dans le cytoplasme (Kamble *et al.*, 2011). Les protéines Slm1/2 contiennent également un domaine de type BAR et pourraient donc jouer un rôle dans la courbure de la membrane (Olivera-Couto *et al.*, 2011). Elles possèdent aussi un domaine PH situé en C-terminal qui leur permet de s'associer à la membrane plasmique. Les domaines PH ne sont, par contre, pas impliqués dans leur recrutement au niveau des eisosomes, cela semble être le rôle des domaines BAR (Douglas *et al.*, 2014 ; Olivera-Couto *et al.*, 2011).

La mutation d'une de ces deux protéines induit un problème de formation ou de stabilité des eisosomes et affecte le fonctionnement des protéines kinases Pkh1 et Pkh2 (Douglas *et al.*, 2011). De plus, Slm1 et Slm2 joueraient également un rôle dans l'organisation du cytosquelette d'actine autour des domaines MCC/eosome et dans le recyclage de la membrane (Daquinag *et al.*, 2007 ; Kamble *et al.*, 2011).

### **1-2-3 Rôles des domaines MCC/eisosomes**

Le rôle des domaines MCC/eisosomes n'est pas encore bien connu, cependant plusieurs hypothèses ont été émises. Dans un premier temps, plusieurs auteurs proposent un rôle des protéines Pil1 et Lsp1 dans le déroulement de l'endocytose (Murphy *et al.*, 2011 ; Walther *et al.*, 2006 ; Walther *et al.*, 2007). D'autres travaux suggèrent que les domaines MCC/eisosomes permettraient plutôt de protéger certaines protéines membranaires de l'endocytose. En effet, Grossmann *et al.* ont montré en 2008 que les protéines Can1 semblent plus stables au niveau des domaines MCC/eisosomes que lorsqu'elles quittent ces domaines.

Il a également été suggéré que ces domaines aient un rôle dans l'intégrité membranaire, dans la réponse à de nombreux stress (osmotiques, thermiques), et dans la résistance à la dessiccation (Dupont *et al.*, 2010 ; Hosiner *et al.*, 2011 ; Luo *et al.*, 2008 ; Yoshikawa *et al.*, 2009 ; Young *et al.*, 2002). Les protéines des domaines MCC/eisosomes ont été décrites comme étant importantes dans le maintien de la paroi cellulaire. Par exemple, la protéine Sur7 a été décrite comme jouant un rôle potentiel dans la synthèse de la paroi suite à l'exposition des stress thermiques ou pariétaux par exemple. Par ailleurs, Nce102 semble

Tableau III : Liste des mutants des domaines MCC/eisosomes d'*Alternaria brassicicola*.

			Mutation et nom des mutants		
	Protéines	Nombre de copies par cellule	Fond de mutation	Délétion	Marquage GFP
Protéines des eisosomes	Pil1	115 000	Sauvage	<i>Δpil1</i>	Pil1-GFP
	Lsp1	104 000	Sauvage	<i>Δlsp1</i>	Lsp1-GFP
	Lsp1	104 000	<i>Δpil1</i>	<i>Δpil1-lsp1</i>	non
	Slm1	5 190	Sauvage	<i>Δslm1</i>	non
Protéines des domaines MCC	Nce102	1 824	Sauvage	<i>Δnce102</i>	Nce102-GFP
	Sur7	17 000	Sauvage	non	Sur7-GFP

avoir un rôle de senseur de sphingolipides et pourrait avoir un rôle dans la réponse à un stress osmotique (Foderaro *et al.*, 2017).

Les profils transcriptomiques indiquent une accumulation des transcrits codant des protéines des domaines MCC/eisosomes chez des cultures d'*A. brassicicola* confrontées à des contraintes hydriques (Tableau I) (N'Guyen, 2015). Ces résultats suggèrent que ces domaines pourraient avoir un rôle dans la réponse à ces stress ainsi que dans la pathogénicité du champignon. Dans le but de répondre à cette problématique, des mutants fongiques déficients pour une protéine de ces domaines (mutants Knock Out, KO), ou qui expriment une de ces protéines fusionnée à la GFP ont été générés. L'objectif de ce stage était donc de caractériser ces mutants et en particulier de déterminer la sensibilité des mutants KO à certains stress ainsi que leur capacité à infecter les plantes. D'autre part, les mutants GFP ont permis d'évaluer la localisation cellulaire de diverses protéines constitutives de ces domaines.

Les données transcriptomiques associées à des recherches bibliographiques ont permis de sélectionner des gènes codant des protéines clés des domaines MCC/eisosomes et pour lesquelles des sur-expressions lors de conditions de stress hydriques et osmotiques ont été observées (N'Guyen, 2015). Une fois les gènes sélectionnés, les mutants ont été créés (Tableau III). Deux de ces mutants,  $\Delta pil1$  et  $\Delta nce102$ , ont déjà été phénotypés, ils ne seront donc pas traiter au cours de ce stage.

## 2- Matériels et méthodes

### 2-1 Matériel fongique

La souche *Alternaria brassicicola* Abra43 est celle qui a été utilisée comme souche de référence lors de ce stage. Elle provient de la collection de l'équipe et, à partir de cette souche, de nombreux mutants ont été créés (Tableau III). Les différentes souches obtenues sont cultivées sur milieu PDA (Potato-Dextrose Agar) à 22°C et à l'obscurité.

### 2-2 Crédation de mutants fongiques

La plupart des mutants analysés dans ce travail étaient déjà obtenus avant le début de ce stage, cependant il a fallu générer un mutant contenant la protéine Lsp1 fusionnée avec la protéine APEX qui code pour une ascorbate peroxydase (Lam *et al.*, 2014).

La création se passe en deux étapes : la création de la cassette d'ADN, qui va permettre de supprimer, altérer, ou marquer une protéine, suivie de la transformation de la souche fongique, ici Abra43.

**Tableau IV**: Présentation des trois programmes PCR successifs permettant la fusion de deux fragments d'ADN, ou plus. Pour chaque cycle, le mix PCR à réaliser est indiqué ainsi que le programme utilisé (Yu *et al.*, 2004).

Mix pour la première PCR		Mix pour la seconde PCR		Mix pour la troisième PCR	
Produit	Volume (en µL)	Produit	Volume (en µL)	Produit	Volume (en µL)
H2O	33	H2O	34	H2O	33
DMSO	1,5	DMSO	1,5	DMSO	1,5
Tampon AT	10	Tampon AT	10	Tampon AT	10
dNTP 10mM	1	dNTP 10mM	1	dNTP 10mM	1
Amorce "Forward"	1	Produit PCR1	1	Amorce "Forward"	1
Amorce "Reverse"	1	Produit PCR2	1	Amorce "Reverse"	1
Taq Phusion (Thermo Scientific)	0,5	Produit PCR3	1	Taq Phusion (Thermo Scientific)	0,5
ADNg ou plasmide	2	Taq Phusion (Thermo Scientific)	0,5	ADNg ou plasmide	2
<b>Total</b>	<b>50</b>	<b>Total</b>	<b>50</b>	<b>Total</b>	<b>50</b>

Programme pour la première PCR

Température	Durée
98°C	30sec
98°C	10sec
60°C	30sec
72°C	5min
72°C	5min

x30

Programme pour la seconde PCR

Température	Durée
94°C	2min
94°C	30sec
58°C	10min
72°C	5min
72°C	10min

x15

Programme pour la troisième PCR

Température	Durée
98°C	30sec
98°C	10sec
60°C	30sec
72°C	5min
72°C	5min

x35

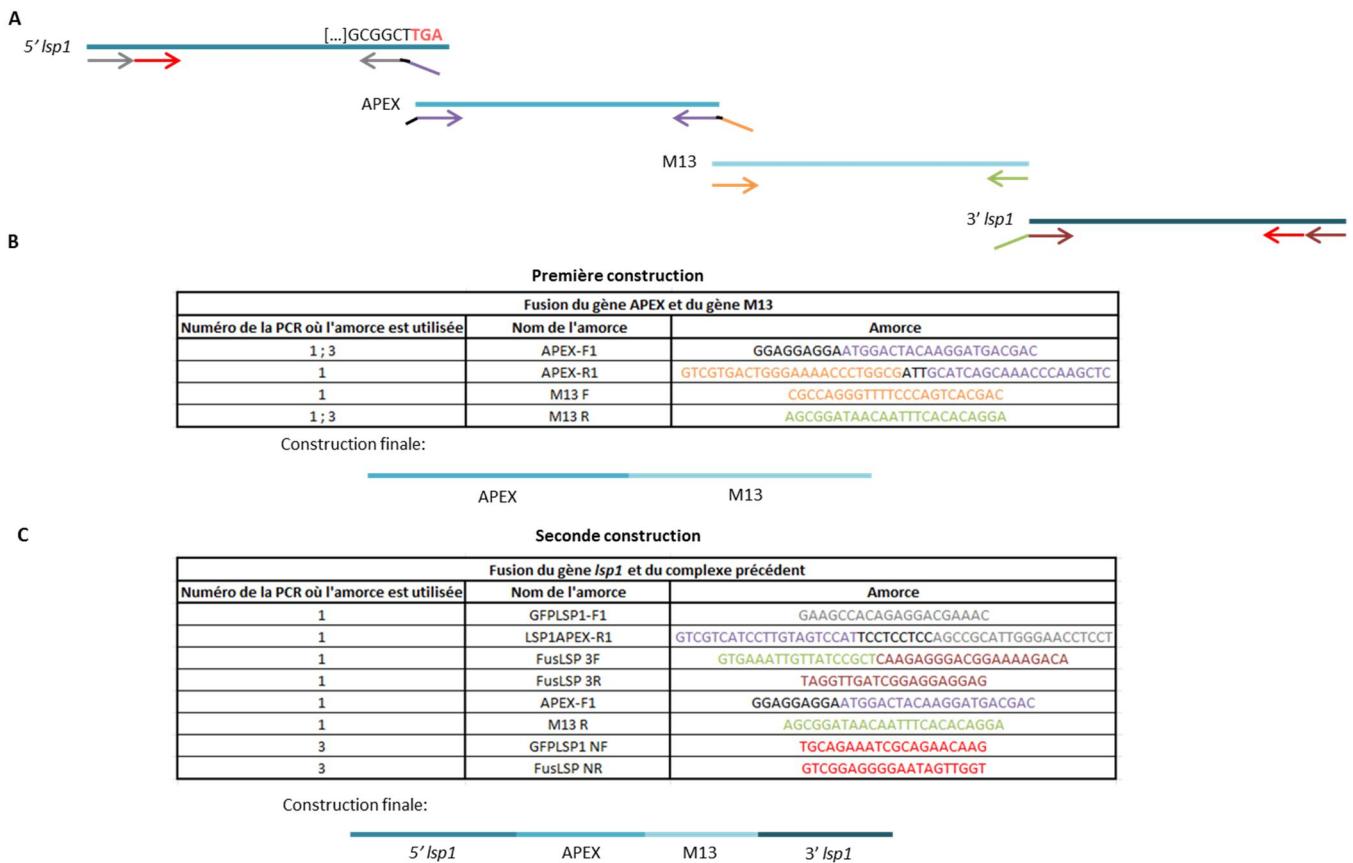


Figure 4 : Déroulé de la création de la cassette *lsp1-APEX2-M13*. (A) Schéma des différents fragments PCR à fusionner ainsi que de la position des différentes amores. (B) Amores utilisées pour la création de la première cassette : APEX2-M13 et sa visualisation. (C) Amores utilisées pour la création de la cassette finale et sa visualisation.

## 2-2-1 Création de la cassette

Après avoir ciblé le ou les gènes d'intérêt, ici *lsp1*, les amorces correspondantes ont été dessinées. Le gène *lsp1* est fusionné au gène de l'APEX et au gène de résistance à l'hygromycine B grâce à trois PCR successives (Tableau IV) (Yu *et al.*, 2004). La création de la cassette a été divisée en deux parties afin de faciliter la fusion des éléments entre eux : dans un premier temps APEX et le gène de résistance à l'antibiotique (M13) ont été assemblés, puis le complexe fraîchement formé a été fusionné avec le gène *lsp1*. Les conditions de ces trois PCR sont les mêmes, seules les amorces changent (Figure 4). La purification des fragments PCR obtenus est réalisée à la fin des premières et troisièmes PCR, grâce au kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

## 2-2-2 Transformation d'*Alternaria brassicicola*

Une préculture d'*A. brassicicola* est prévue la veille de la transformation dans 100 ml de milieu PDB (Potato dextrose broth) (15 heures à 24°C et 175 rpm). La suspension obtenue a été divisée en deux dans des tubes 50 ml avant d'être centrifugée pendant 10 minutes à 5500 rpm. Une fois le surnageant enlevé, les culots ont été lavés à l'aide d'une solution tampon de NaCl concentrée à 0.7 M puis centrifugés, et ce à deux reprises. Le culot ainsi lavé a ensuite été resuspendu dans 20 ml de la solution enzymatique filtrée à 20 µm (20 mg/ml de Driselase (Sigma) et 10mg/ml de Kitalase (Wako) dans une solution tampon de NaCl concentrée à 0.7 M). Les tubes ont été incubés pendant 4 heures à 32°C avec une agitation par retournement effectuée toutes les 30 minutes. Au bout des 4 heures, la paroi du champignon a été digérée par les enzymes et les protoplastes obtenus ont été filtrés sur une maille d'un diamètre de 30 µm puis centrifugés pendant 7 minutes à 5000 rpm. Le culot a été resuspendu très délicatement dans 10 ml de STC (4 ml de Sorbitol 3 M, 0,1 ml de Tris pH 7.5 1 M et 0.5 ml de CaCl<sub>2</sub> 1 M), avant d'être à nouveau centrifugé et mis en suspension dans 500 µl de STC.

La suspension ainsi obtenue a été divisée dans deux tubes de 15 ml. Un volume de 20 µl de l'ADN de la cassette a été ajouté au premier tube, tandis que le second a servi de témoin. L'ensemble a été mélangé par "rolling" (agitation par frottement du tube entre les mains) avant d'être incubé pendant 30 minutes dans de la glace. Trois ajouts successifs de PEG ont été réalisés au goutte à goutte (200 µl, 200 µl puis 800 µl). Après chacun d'entre eux, la suspension est mélangée par "rolling" puis incubée 5 minutes dans la glace. Un ml de STC y a ensuite été ajouté, et la concentration obtenue en protoplastes a pu être estimée par dénombrement sur cellule de Thoma. 250 µl de la suspension ont ensuite été mélangés à



20 ml de milieu de régénération (1 g de yeast extract, 1 g d'amicase, 342 g de sucre et 16 g d'agar bactériologique pour 1 L de milieu) avant d'être coulés dans chacune des boîtes de Pétri. Le lendemain, 15 ml d'eau gélosée à 12 µg/ml d'hygromycine B sont utilisés pour former une surcouche au-dessus du milieu de régénération, seul un témoin est réalisé sans ajout de marqueur de sélection dans la surcouche. Les boîtes sont incubées à 24°C pendant 7 jours. Une fois que les potentiels transformants ont percé la surcouche, ils sont transférés sur une boîte de PDA contenant de l'hygromycine B concentrée à 12 µg/ml et incubés jusqu'à réalisation d'une extraction d'ADN pour vérifier la présence de la cassette par PCR.

L'extraction d'ADN se fait au micro-ondes. Pour cela des successions de 15, 10 et 5 secondes de passage au micro-ondes sont réalisées suite à l'ajout de 100 µl de tampon de lyse. Après ajustement à 400 µl avec le même tampon, les tubes sont incubés à 80°C pendant 10 minutes. Une centrifugation de 15 minutes à 15 000 g est réalisée suite à l'ajout d'un volume de Phénol-Chloroforme-Isoamyl (25 : 24 : 1). La phase aqueuse est récupérée et additionnée à 10 µl d'acétate de potassium et à 0.5 volume d'isopropanol. Suite à une incubation de 5 minutes dans la glace, une centrifugation est effectuée à 10 000 g pendant 10 minutes. Une fois le surnageant retiré, le culot est lavé à l'aide d'éthanol 80 % et séché à l'aide d'une évaporation sous vide, avant d'être repris dans 100 µl d'eau stérile.

L'insertion de la cassette est ensuite vérifiée à l'aide de cinq PCR et des couples d'amorces ciblant (i) la région Internal Transcribed Spacer (témoin positif), (ii) deux amplicons ancrés dans la cassette : un lié à la région 5' en amont du gène, et un lié à la région 3' en aval du gène, (iii) l'intérieur du gène ainsi que (iv) l'intérieur de la cassette.

## 2-3 Tests phénotypiques *in vitro*

Ces tests ont été effectués à partir de la souche sauvage, Abra43 et des souches mutantes déficientes respectivement pour les gènes *lsp1*, *slm1* et *pilllsp1*.

### 2-3-1 Test PEG

Cinq µl de suspension de conidies (à 10<sup>4</sup> conidies/ml) ont été déposés sur des membranes de cellophane posées sur un milieu PDA. Après incubation pendant 24 heures à 22°C, les membranes ont été placées sur un papier buvard stérile imbibé de PDB ou de PDB+PEG à - 2MPa. Les boîtes contenant les buvards sont conservées à 22°C dans l'obscurité. Les diamètres des colonies sont ensuite mesurés au bout de 5, 7 et 10 jours.

Tableau V : Molécules analysées pour déterminer leur action sur la croissance fongique par néphéломétrie laser. La concentration d'application et le solvant utilisé sont indiqués.

<b>Stress appliqués</b>	<b>Molécules testées</b>	<b>Concentration</b>	<b>Diluant/Témoin utilisé</b>
<b>Stress osmotique</b>	Sorbitol	0,7M	H2O
		1,2M	H2O
<b>Molécule de défences des plantes</b>	Brassinine	100µM	DMSO 0,5%
	Camalexine	60µM	DMSO 0,5%
<b>Stress oxydatif</b>	DMSO	1%	DMSO 0,5%
	Menadione	30mM	H2O (100ml)
	H2O2	10mM	H2O
<b>Stress pariétal</b>	Calcofluor White	200mM	H2O
		400mM	H2O
	Congo Red	50mM	H2O
		100mM	H2O
	Zymolyase	10mg/mL	H2O (100ml)
	SDS	150µg/ml	H2O
<b>Autres molécules</b>	Myriocine	5ng/ml	Méthanol
	FK506	20µg/ml	Ethanol + Tween

### **2-3-2 Test dessiccation**

Cent  $\mu\text{l}$  de suspension de conidies (à  $2.10^3$  conidies/ml) sont étalés sur une membrane posée sur milieu PDA. Le lendemain, les membranes sont transférées dans les couvercles et placées dans des boites contenant ou non du silicagel. L'humidité relative à l'intérieur des boites est alors d'environ 70 % pour les boites témoins et de 1% pour les boites contenant du silicagel. L'ensemble est incubé à l'obscurité et à 22°C pendant 4 jours. Les membranes sont ensuite redéposées sur un milieu PDA et stockées dans la même salle que précédemment. Le nombre de conidies germées est décompté 4 jours plus tard.

### **2-3-3 Test de sensibilité à différentes molécules en milieu liquide**

Des suivis de croissance fongique en présence ou non de molécules ciblées (Tableau V) ont été réalisés en multiplaqué par néphéломétrie laser (NEPHELOstar (BMG LABTECH)) d'après la procédure décrite par Joubert *et al.* (2010). Les cultures ont été réalisées dans 300  $\mu\text{l}$  de PDB à partir d'une suspension de  $10^5$  conidies/ml et contenant la molécule testée (ou le solvant de référence) à un volume maximal de 10%. Les données sont issues de 3 répétitions biologiques comprenant chacune 3 répétitions techniques.

### **2-3-4 Test sorbitol et température**

Dans des boites contenant du PDA ou du PDA à 2M de Sorbitol, une goutte de 5 $\mu\text{l}$  d'une suspension de  $10^4$  conidies/ml est déposée au centre. Les boites sont ensuite placées à l'obscurité et à quatre températures différentes : 10°C, 22°C, 30°C et 37°C. La lecture des diamètres se fait au 4<sup>ème</sup>, 7<sup>ème</sup> et 10<sup>ème</sup> jour.

Pour l'ensemble de ces tests, les analyses statistiques des résultats ont été réalisées grâce à une Anova multiple.

## **2-4 Microscopie**

### **2-4-1 Microscopie optique à épifluorescence**

L'observation des échantillons au microscope optique à épifluorescence a été réalisée sur le plateau IMAC de la SFR QUASAV. Les conidies ont été mises en culture dans du PDB à 175 rpm et à 22°C pendant une nuit. Les suspensions ont ensuite été placées entre lames et



lamelles pour être observées au microscope optique à épifluorescence (AxioZeiss). Les images ont ensuite été visualisées à l'aide du logiciel Zen.

#### **2-4-2 Microscopie électronique à balayage**

L'observation des échantillons au microscope électronique à balayage a été réalisée sur le plateau IMAC de la SFR QUASAV. Les feuilles de choux de la variété Bartolo et les rosettes d'*Arabidopsis thaliana* de l'écotype Ler ont été inoculées avec 5 µl de suspensions des souches étudiées respectivement concentrées à  $10^5$  et  $10^4$  conidies/ml. Les plants inoculés sont placés pour la nuit dans un phytotron réglé pour être à une température de 22°C le jour et 19°C la nuit avec un cycle jour/nuit de 8 heures de lumière et 16 heures d'obscurité. Le lendemain, les feuilles sont découpées au niveau du dépôt, puis collées au socle du microscope électronique à balayage (Phenom Pro). Les échantillons sont congelés jusqu'à -24°C le temps de l'observation. A partir des photographies obtenues en mosaïques, les nombres de tubes germinatifs et d'appressoria sont décomptés.

#### **2-4-3 Microscopie électronique à transmission**

La préparation des échantillons et leur visualisation ont été effectuées sur la plateforme nommée SCIAM de l'université d'Angers d'après le protocole adapté de Pigné *et al.*, 2017 (Annexe I). Les observations sont réalisées au microscope électronique à transmission JEOL JEM-1400 à une tension d'accélération de 120 kV.

### **2-5 Phénotypage sur plantes**

#### **2-5-1 Inoculation sur feuilles de choux**

Des dépôts de 5µl de suspensions de conidies (calibrées à  $10^5$  conidies/ml) ont été réalisés sur la face supérieure de la troisième feuille vraie de choux (variété Bartolo) âgés de 6 semaines. Sur chaque feuille, des dépôts de la souche sauvage Abra43 et la souche mutée (ou un témoin négatif, l'eau) ont été réalisés respectivement de part et d'autre de la nervure centrale. Les plants ont ensuite été placés pendant 5 jours dans un phytotron en condition jours courts (22°C en jour et 19°C en nuit avec un cycle jour/nuit de 8 h de lumière et 16 h d'obscurité). Les mini-serres contenant les choux ont été bâchées les 2 premiers jours suivant l'infection. Les symptômes ont été observés 5 jours post-inoculations.

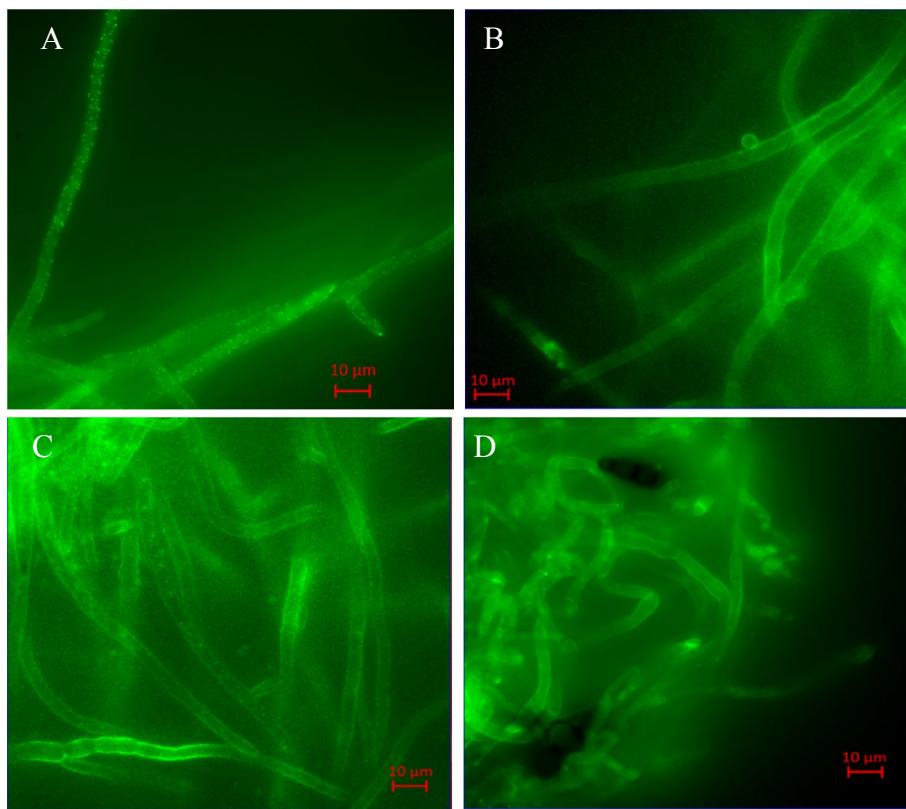


Figure 5: Photographies de conidies germées réalisées au microscope optique à épifluorescence. (A) Souche *pill*-GFP (B) Souche *lsp1*-GFP (C) Souche *nce102*-GFP (D) Souche *sur7*-GFP. Les observations ont été effectuées suite à une mise en culture de 15h environ des conidies.

### **2-5-2 Inoculation sur rosettes d'*Arabidopsis thaliana***

Les plants d'*A. thaliana* utilisés sont de l'écotype Ler et ont été cultivés dans une salle en condition jours courts (22°C en jour et 19°C en nuit avec un cycle jour/nuit de 8 h de lumière et 16 h d'obscurité). Les faces supérieures de rosettes âgées de 5 semaines ont été inoculées avec un dépôt de 5µl de suspension concentrée à 10<sup>4</sup> conidies/ml. Les rosettes ont ensuite été placées pendant 10 jours dans un phytotron en condition jours courts et bâchées durant les deux jours suivant l'infection. Les symptômes ont été observés 10 jours post-inoculation.

### **2-5-3 Inoculation sur siliques d'*Arabidopsis thaliana***

Les plants d'*A. thaliana* de l'écotype Ler ont été cultivés en condition jours longs, (16 heures d'éclairage avec une température de 22°C et 8 heures d'obscurité avec une température de 19°C). Les inoculations ont eu lieu sur des plantes présentant 10 siliques matures, soit quand elles sont âgées d'environ 5 semaines. Les 5 premières siliques ont été inoculées à l'aide de deux dépôts de 2,5 µl de suspensions concentrées à 10<sup>3</sup> conidies/ml chacun respectivement à la base et au sommet de la silique. Les plantes ont ensuite été placées dans un phytotron en condition jours longs et bâchées les deux jours suivant l'inoculation (Pochon *et al.*, 2013).

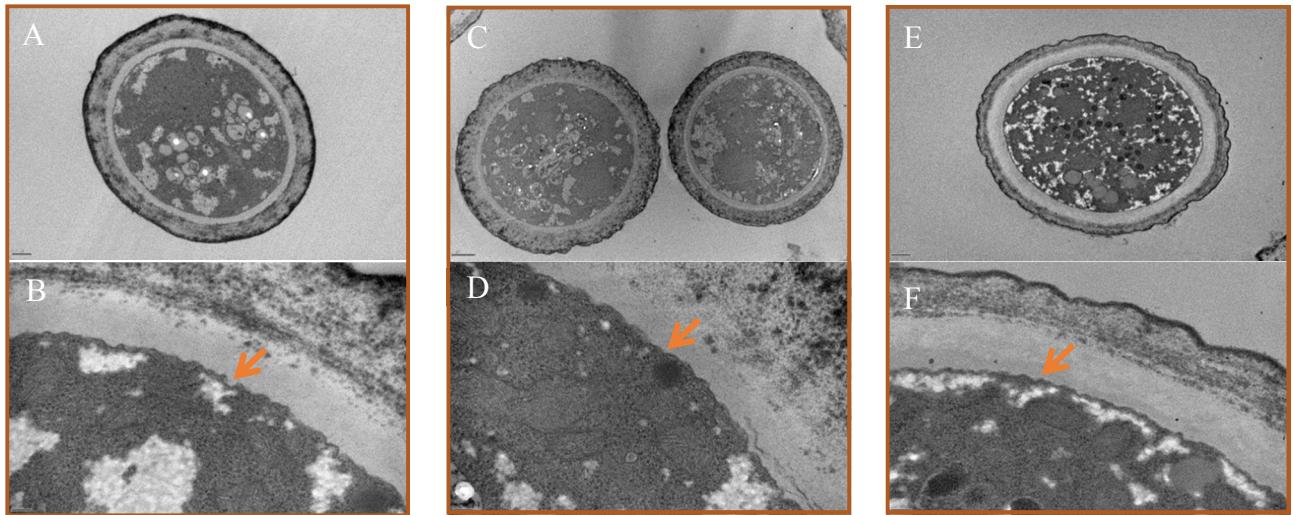
Au dixième jour post-inoculation, les siliques ont été récoltées, les graines ainsi que les siliques ont été déposées sur milieu PDA. Les graines contaminées ont été dénombrées 3 à 4 jours plus tard.

## **3- Résultats**

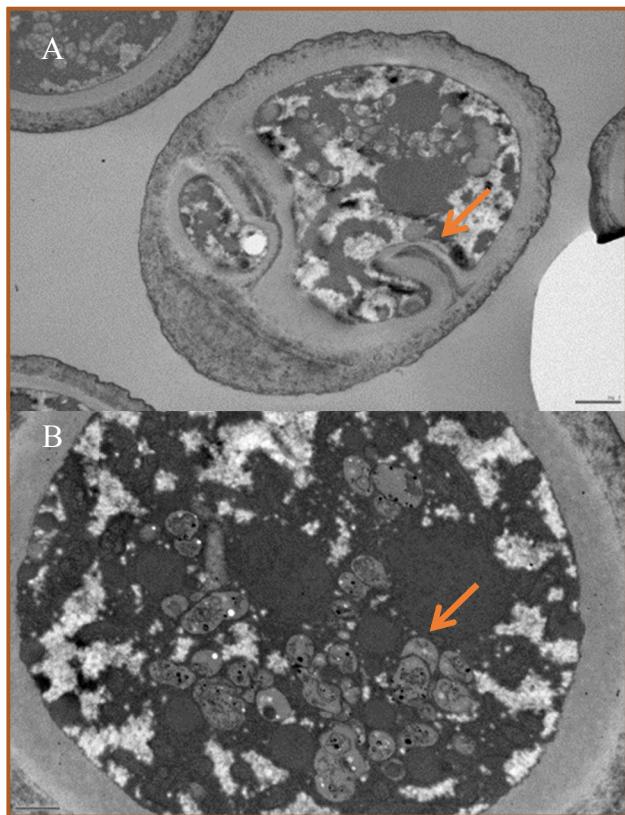
### **3-1 Localisation cellulaire des eisosomes**

Dans l'optique de localiser les protéines des domaines MCC/eisosomes au sein des hyphes d'*A. brassicicola*, ces dernières ont été fusionnées à la GFP sous contrôle du promoteur natif. Sans appliquer de stress particulier, les protéines Pill1 et Lsp1 (Figure 5. A et B) semblent être principalement localisées au niveau de la membrane plasmique. Les protéines Pill1 sont dispersées le long de la membrane, et observables sous forme de points d'une intense fluorescence.

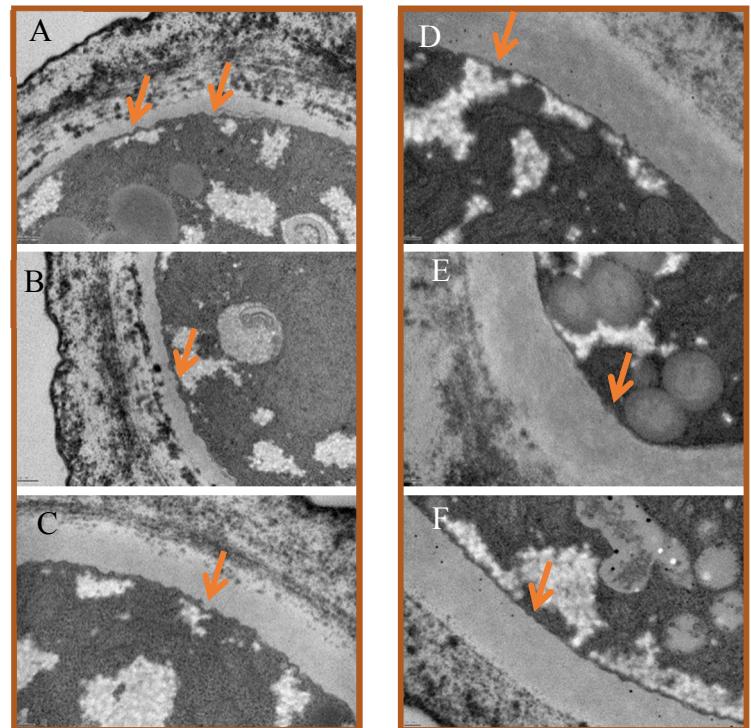
Dans les mêmes conditions basales, les protéines des domaines MCC, Nce102 et Sur7 sont également visibles sur la membrane plasmique avec des niveaux de fluorescence



**Figure 6 :** Photographies de coupes de conidies réalisées au microscope électronique à transmission. Les images supérieures représentent une vue d'ensemble des conidies alors que les images inférieures détaillent la structure de la membrane plasmique. (A et B) Souche sauvage Abra 43 (C et D) Souche *Δslm1* (E et F) Souche *Δlsp1*. Les flèches orange indiquent la présence de domaine MCC/eisosomes potentiels.



**Figure 7 :** Photographies de coupes de conidies réalisées au microscope électronique à transmission. A : vue d'ensemble des conidies. B : détails la structure de la membrane plasmique. (A et B) Souche *Δpil1-lsp1*. Les flèches orange indiquent la présence d'internalisation membranaire.



**Figure 8 :** Photographies de coupes de conidies réalisées au microscope électronique à transmission. (A, B, C) Souche sauvage Abra 43 (D, E, F) Souche *Δpil1-lsp1*. Les flèches orange indiquent la présence de domaine MCC/eisosomes.

beaucoup moins élevés (Figure 5. C et D). Toutefois, elles sont aussi observables à l'intérieur des hyphes, dans des organites particuliers.

### 3-2 Impact des eisosomes sur la structure membranaire

Dans le but d'identifier l'éventuel impact de la délétion des gènes ciblés sur la structure cellulaire des conidies, des images au microscope électronique à transmission ont été réalisées. Comme indiqué dans les photographies 6.A et 6.B, les conidies de la souche sauvage disposent d'une membrane plasmique bien structurée, qui présente de façon régulière un grand nombre d'invaginations comprises entre 100 et 300 nm de largeur et 20 et 40 nm de profondeur (exemple d'invagination marquée par la flèche orange), que nous suspectons être les sites des domaines MCC/eisosomes.

Les mutants *Δslm1* et *Δlsp1* semblent avoir une structure similaire à celle de la souche sauvage (Figure 6.C, D, E et F) ne présentant pas de différence significative du nombre et des dimensions de leurs invaginations par rapport à la souche sauvage. Des problèmes structuraux au sein des conidies du double mutant *Δpill-lsp1* sont par contre clairement visibles (Figure 7.A), notamment liés à la présence en excès de vésicules internalisées qui semblent correspondre à des invaginations de l'espace périmembranaire (Figure 7.B). À plus fort grossissement, la membrane plasmique présente des domaines MCC/eisosomes putatifs qui apparaissent moins nombreux et d'une taille beaucoup plus réduite (Figure 8).

Pour identifier précisément les domaines MCC/eisosome sur les coupes de mycètes visualisées en microscope électronique à transmission, nous avons initié le marquage spécifique de la protéine Lsp1 par fusion avec la protéine APEX2 qui code une ascorbate peroxydase (Lam *et al.*, 2015). Cette protéine est capable de former un complexe osmiophilique, qui, en contact avec du tétr oxyde d'osmium, forme un précipité noir à l'endroit même où est localisée la protéine marquée. Ce précipité noir empêche les électrons de passer et est donc visible au microscope électronique à transmission. Les mutants potentiels ont d'ores et déjà été isolés, cependant l'intégration des cassettes n'a pas encore été vérifiée par PCR.

### 3-3 Capacité de résistance aux stress

Des tests de sensibilité à différents stress ont été réalisés afin d'avoir un aperçu du champ d'action des protéines codées par les gènes des domaines MCC/eisosomes ciblées dans cette étude (tableau VI).

Tableau VI : Tableau récapitulatif des résultats obtenus avec les différents tests de résistances aux stress effectués. ( S : la souche est sensible à la condition testée, N : la souche ne montre pas de différence en présence et en absence de stress ) Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'une ANOVA multiple. 3 répétitions biologiques ont été effectuées.

Stress appliqués	Molécules testées	Témoin		Eisosomes	
		<i>Abra43</i>	$\Delta lsp1$	$\Delta slm1$	$\Delta pil1-lsp1$
<i>Stress osmotique</i>	Sorbitol	N	N	N	N
	Sorbitol 2M (22°C)	N	N	N	S
	PEG	N	N	N	N
<i>Molécule de défences des plantes</i>	Brassinine	N	N	N	N
	Camalexine	N	N	N	N
<i>Stress oxydatif</i>	DMSO	N	N	N	S
	Menadione	N	N	N	N
	H2O2	N	N	N	N
<i>Stress hydrique</i>	Dessiccation	N	N	N	N
<i>Stress pariétal</i>	Calcofluor White	N	N	N	N
	Congo Red	N	N	N	N
	Zymolyase	N	N	N	N
	SDS	N	N	N	N
<i>Autres molécules</i>	Myriocine	N	N	N	N
	FK506	N	N	N	N
	Fumonisine B1	N			

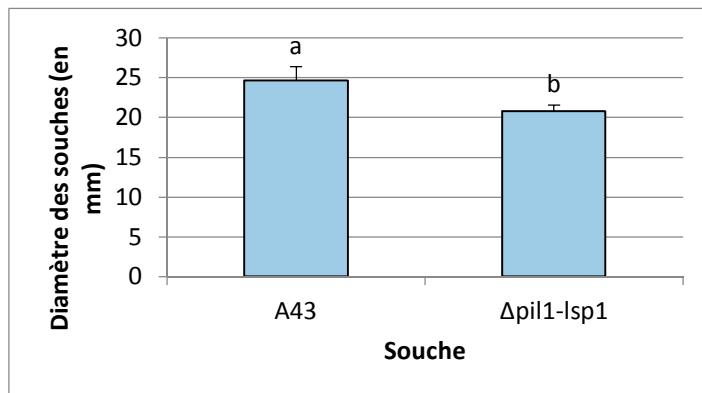


Figure 9 : Mesure du diamètre des colonies des doubles mutants  $\Delta pil1-lsp1$  en comparaison à la souche sauvage en présence de sorbitol 2 M dans le milieu PDA. Ces mesures ont été réalisées dix jours post-inoculation. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'une ANOVA multiple. 3 répétitions biologiques ont été effectuées.

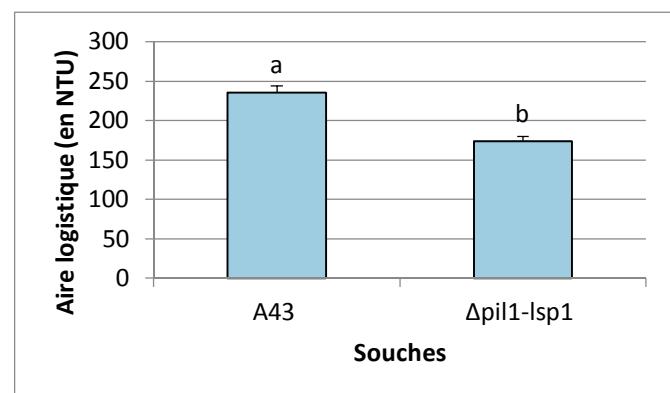


Figure 10 : Aire sous la courbe de croissance des différents doubles mutants  $\Delta pil1-lsp1$  en comparaison à la souche sauvage en présence de DMSO 1%.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'une ANOVA multiple. 3 répétitions biologiques ont été effectuées.

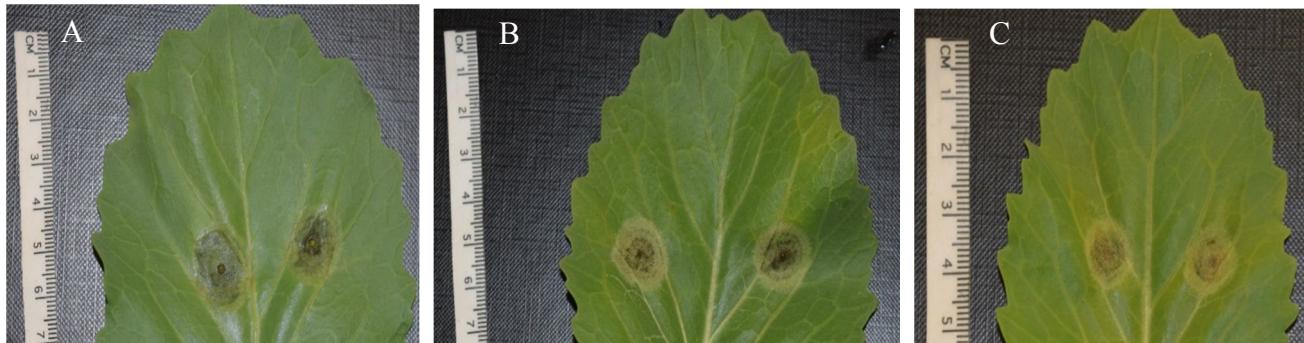


Figure 11 : Photographie des symptômes induits par *Alternaria brassicicola* sur feuille de choux. (A) Souche  $\Delta lsp1$  (B) Souche  $\Delta slm1$  (C) Souche  $\Delta pil1-lsp1$ . La souche sauvage Abra43 est placée à droite de la feuille et la souche déletée testée est à gauche de la feuille.

Globalement, les mutants KO présentent peu de différences significatives vis-à-vis de la souche sauvage dans les conditions de stress étudiées (tableau VI). Les mutants *Δlsp1* et *dslm1* ont un profil de résistance aux différents stress particulièrement similaire à celui du témoin. La souche *Δpill-lsp1*, quant à elle, présente une sensibilité accrue au sorbitol 2 M à 22°C (Figure 9) ainsi qu'au DMSO 1 % (Figure 10).

### **3-4 Etude de l'agressivité des mutants des domaines MCC/eisosomes chez *Altenaria brassicicola***

#### **3-4-1 Symptômes sur plantes**

Afin de visualiser l'impact des protéines des eisosomes sur l'agressivité du champignon, des inoculations sur plantes ont été réalisées. Les différentes souches ont tout d'abord été testées sur des rosettes d'*A. thaliana*. Cependant les symptômes induits ne présentaient pas de différences significatives lorsqu'ils sont comparés entre eux.

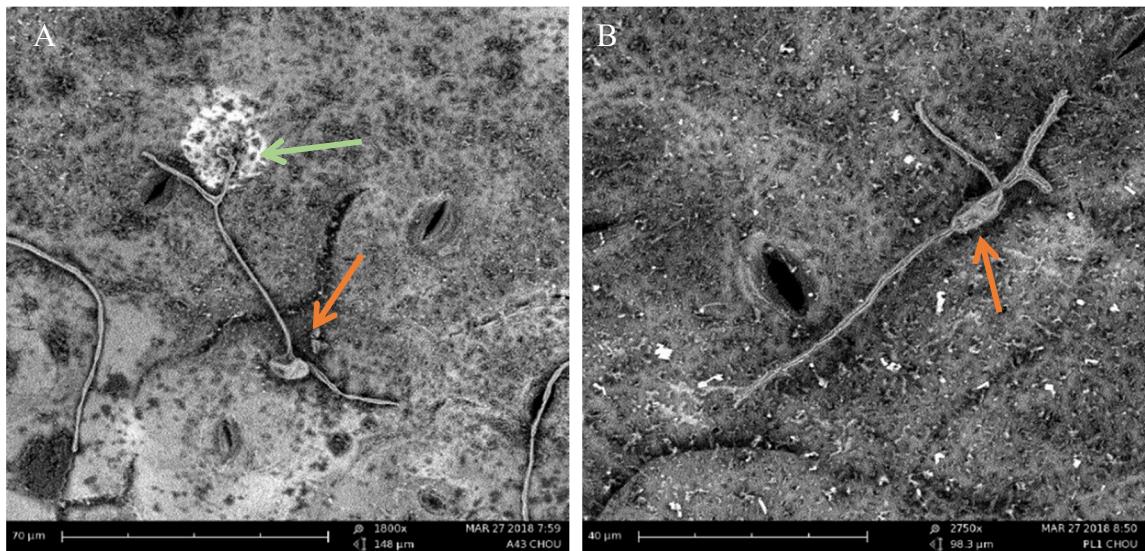
Les mutants ont ensuite été testés sur des feuilles de choux. Les symptômes induits par le double mutant *Δpill-lsp1* et les simples mutants *Δslm1* et *Δlsp1* ne sont pas significativement différents de ceux induits par la souche sauvage (Figure 11).

#### **3-4-2 Formation d'appressoria**

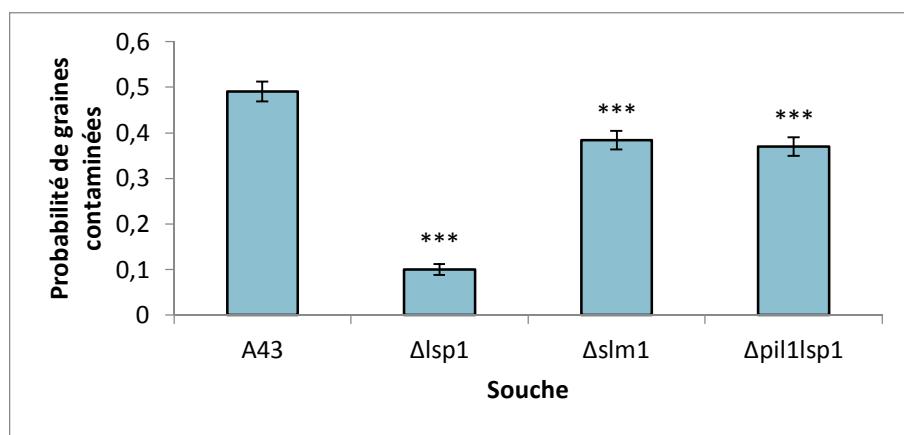
Des observations en microscopie électronique à balayage ont également été menées au niveau des points d'inoculations du champignon sur feuilles. La photographie A de la figure 12 correspond à une conidie germée de la souche sauvage d'*A. brassicicola* sur feuille de chou. Au bout d'un des tubes germinatifs issus de cette conidie, une structure de pénétration des tissus hôte, appelée appressorium, entourée d'un halo blanc est nettement visible (flèche verte). La deuxième photographie montre une conidie germée de la souche *Δpill-lsp1* sur feuille de chou (Figure 12.B). Cette conidie produit également des tubes germinatifs mais aucun appressorium n'est observé ici.

Les observations ont été réalisées avec la souche sauvage ainsi qu'avec les mutants délétés, selon le même principe que pour les photographies présentées en figure 12. Afin de visualiser l'impact des mutations sur la formation d'appressoria, un ratio a été réalisé entre le nombre de tubes germinatifs observés et le nombre d'appressoria décomptés.

Lorsque les résultats sont comparés entre eux, il apparait que la souche formant le plus d'appressoria est la souche sauvage (environ 25% de tubes germinatifs se terminent par un



**Figure 12 :** Photographies de conidiospores germées sur feuilles de choux réalisées au microscope électronique à balayage. (A) Souche Abra 43 (B) Souche  $\Delta$ pill-lsp1. Les observations ont été effectuées 15h post-inoculation. *Les flèches orange indiquent les conidiospores. La flèche verte indique l'appressorium.*



**Figure 13 :** Probabilité de graines contaminées par les mutants  $\Delta$ lsp1,  $\Delta$ slm1 et  $\Delta$ pill-lsp1 et la souche sauvage (Abra43).

Significativité : 0 \*\*\* 0.001 \*\* 0.01 \* 0.05 . 0.1 ‘ 1

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'une régression logistique. 3 répétitions biologiques ont été effectuées.

appressorium). Les mutants sont quant à eux plus ou moins impactés dans la formation d'appressoria puisque les ratios diminuent en fonction des gènes délétés. Ainsi, le mutant  $\Delta slm1$  semble être le moins impacté avec un ratio d'environ 20%, il est suivi des mutants  $\Delta lsp1$  et  $\Delta pil1$  (environ 11%) ainsi que du mutant  $\Delta nce102$  (environ 7%). Le mutant le plus impacté dans la formation d'appressoria est  $\Delta pil1-lsp1$  avec un pourcentage de tubes germinatifs s'achevant par un appressorium d'environ 5%.

Que les visualisations aient été réalisées sur feuilles de choux ou sur rosettes d'*A. thaliana*, le pourcentage d'appressoria par tube germinatif restait le même d'un mutant à l'autre.

### 3-4-3 Transmission aux semences

Pour finir, la capacité de transmission aux semences d'*A. thaliana* a été testée pour chaque génotype fongique. Comme indiqué sur la figure 13, tous les mutants sont affectés de façon significative dans leur capacité de transmission aux semences avec une intensité variable selon les gènes délétés.

Le mutant le moins affecté dans cette capacité est  $\Delta slm1$  pour lequel une diminution d'environ 15% du nombre de graines contaminées est constatée par rapport à la souche sauvage. Vient ensuite le double mutant  $\Delta pil1-lsp1$  quant à lui voit son nombre de graines contaminées réduit de 25% environ. Et enfin le mutant  $\Delta lsp1$  est la souche la plus affectée dans sa capacité de transmission aux semences puisqu'elle a vu diminuer de 5 fois sa capacité à infecter les graines par rapport à la souche témoin.

## 4- Discussion

Les différentes protéines des domaines MCC/eisosomes marquées par de la GFP ont été localisées. La protéine Pil1 est observée principalement sur la membrane des hyphes, tout comme la protéine Lsp1 qui semble toutefois plus diffuse le long de la membrane. Cette diffusion inattendue pourrait être due à la présence du marqueur GFP qui modifierait la structure de la protéine l'empêchant ainsi de se regrouper en patch au niveau des eisosomes. De plus, le nombre de copies de transcrits de *lsp1* par cellule est légèrement plus faible que celui du gène *pil1* chez *S. cerevisiae* (Tableau II). Aucune donnée n'est connue sur le nombre de copies de transcrits du gène *lsp1* chez *A. brassicicola*, mais le plus faible niveau de



fluorescence observé chez le mutant exprimant la protéine fusionnée à la GFP va dans le sens d'un nombre de transcrits de *lsp1* plus restreint que pour *pil1*.

Les protéines Nce102 et Sur7 sont, quant à elles, retrouvées à la fois au niveau des membranes mais aussi au niveau de vésicules internalisées. Nce102 est connue comme n'étant pas une protéine uniquement localisée dans les membranes plasmiques (Douglas *et al.*, 2011), elle peut également être retrouvée des organites tels que le réticulum endoplasmique (Loibl *et al.*, 2010). Tout comme Nce102, la protéine Sur7 est décrite chez d'autres mycètes comme étant localisée dans plusieurs structures en fonction de l'organisme étudié et de son stade de développement (Athanasopoulos *et al.*, 2013 ; Karotki *et al.*, 2011). Il n'est donc pas surprenant de retrouver cette protéine à la fois dans la membrane plasmique et dans d'autres organites tels que les vacuoles ou les endosomes (Athanasopoulos *et al.*, 2013).

Pour préciser l'identité de ces organites, nous prévoyons de traiter les mutants GFP concernés avec des marqueurs de certains organites, comme les « ER-Tracker » qui se lient au réticulum endoplasmique, pour observer une éventuelle co-localisation des signaux de fluorescence (Cole *et al.*, 2004). Afin d'obtenir des images avec une diffusion moindre de la fluorescence et donc une visualisation plus fine de la GFP, les souches ayant leurs protéines marquées seront observées au microscope optique confocal. De plus, il serait également pertinent de faire un suivi de la localisation des différentes protéines avant et après l'application d'un stress, tel que le DMSO par exemple. Cela permettrait d'appréhender le comportement des protéines lors des réponses de résistances aux stress.

Suite à l'observation de la localisation des protéines des domaines MCC/eisosomes, l'impact des mutations a été observé grâce au microscope électronique à transmission. Les délétions des gènes *slm1* et *lsp1* ne semblent pas avoir d'impact sur la structure de la membrane plasmique. Cependant le double mutant  $\Delta pil1-lsp1$  induit une diminution du nombre et de la taille des invaginations ainsi que des internalisations supposées de la membrane plasmique. Ces résultats ont déjà pu être observés dans des études récentes chez *Candida albicans* (Foderaro *et al.*, 2017). Cela semble ainsi confirmer que les protéines Pil1 et Lsp1 sont importantes pour la conformation de la membrane plasmique et le maintien des eisosomes. Ainsi, une mutation du gène *lsp1* seul ne semble pas mener à une anomalie structurale des eisosomes. Cela suggère que lorsque ce gène est muté, son paralogue *pil1* serait capable de compenser la mutation.

De même pour le gène *slm1*, une délétion de ce gène ne semble pas affecter la membrane plasmique. Or un homologue de ce gène reste toujours présent en cas de délétion



de *slm1*, il est donc possible que par redondance fonctionnelle l'homologue *slm2* puisse compenser la perte du *slm1* (Fadri *et al.*, 2005).

La visualisation de la structure de la membrane plasmique au microscope électronique a été effectuée sur des conides fraîches. Cette visualisation pourrait également être réalisée sur des conides germantes et/ou en présence d'un stress osmotique.

De nombreux tests de résistance aux stress ont par la suite été réalisés (Tableau VI). Comme précédemment montré dans les résultats, la délétion des gènes *lsp1* et *slm1* ne révèle pas de différence majeure face à des stress par rapport à la souche sauvage. Seul le double mutant *Δpill-lsp1* montre des différences significatives sur certains tests : lorsqu'il est en présence de sorbitol à 2 M à 22°C et lorsqu'il est en présence de DMSO à 1 %. Ainsi le double mutant montrerait une faiblesse face à ce stress osmotique. La présence de DMSO, qui induit un stress membranaire, perturbe également la croissance des souches lorsque les gènes *pill* et *lsp1* sont déletés simultanément.

Deux autres mutants ont également été étudiés avant le début du stage : *Δnce102* et *Δpill*. Ces deux mutants sont aussi sensibles à la présence de DMSO et le mutant *Δpill* a en plus une sensibilité accrue lorsque qu'il est exposé à 2 M de sorbitol à 30°C.

La délétion du gène *pill* engendre donc une sensibilité aux stress osmotiques et thermiques alors que la délétion de *lsp1* n'engendre pas de changement de résistance face à ces stress. Ainsi, il se pourrait que seule la protéine Pill soit importante pour la résistance à ces stress. La mutation de *pill* ne serait pas compensée par la protéine Lsp1 alors qu'inversement la mutation de *lsp1* serait compensée par la présence de Pill.

L'impact de la délétion des gènes codant les protéines des domaines MCC/eisosomes sur l'agressivité d'*Alternaria brassicicola* a été observé. Dans un premier temps, une observation de la présence d'appressoria selon les mutations a été réalisée. Les mutants *Δlsp1*, *Δpill*, *Δnce102* et *Δpill-lsp1* sont plus ou moins fortement impactés dans la formation d'appressoria. Le mutant *Δslm1* ne semble, en revanche, pas ou peu affecté dans ce mécanisme. Les protéines Lsp1, Pill et Nce102 auraient ainsi un rôle important la formation d'appressoria lors de l'infection d'une plante hôte.

Les appressoria sont des structures spécialisées dans la pénétration des tissus hôtes. Les septines, des GTP-binding protein, ont été décrites comme jouant un rôle fondamental dans la capacité des champignons à subir des modifications de leur formes ainsi que dans l'organisation du cytosquelette d'actine dans le but de faciliter une croissance invasive. Il a été démontré par exemple que les septines sont nécessaires à l'obtention d'appressoria fonctionnels chez le champignon phytopathogène *Magnaporthe oryzae*. Les septines



interviennent à la base du tube germinatif afin de diriger la différenciation des appressoria (Momany *et al.*, 2017).

Les protéines Lsp1, Pil1 et Nce102 pourraient donc être liées aux septines dans la formation des appressoria. Les domaines des MCC/eisosomes sont entourés de patchs d'actine, or les septines réagissent également avec cette molécule, il se pourrait donc que ces domaines soient des bases d'initiation de la formation de tubes germinatifs se différenciant en appressoria (Douglas *et al.*, 2014 ; Momany *et al.*, 2017).

Pour compléter ces observations, il serait possible de cibler spécifiquement l'actine ou la septine à l'aide de marqueurs moléculaires (lifeact pour l'actine par exemple) ou de mutant mCherry (pour les septines), ce qui permettrait de visualiser les patchs d'actine chez le sauvage et chez les mutants (Riedl *et al.*, 2008 ; Subach *et al.*, 2009). Il serait intéressant d'observer la localisation des eisosomes lors de la formation des appressoria. Pour cela, il faudrait utiliser les mutants marqués à la GFP soit sur feuilles de choux ou d'*Arabidopsis*, soit sur des membranes de téflon, qui imitent l'aspect d'une feuille végétale et qui sont des supports plus propices aux observations microscopiques

Des inoculations sur plantes ont été réalisées sur deux plantes hôtes d'*A. brassicicola* : *Brassica oleracea* et *Arabidopsis thaliana*. Que ce soit sur rosettes d'*A. thaliana* ou sur feuilles de choux, les symptômes induits par les mutants  $\Delta lsp1$ ,  $\Delta slm1$  et  $\Delta pil1-lsp1$  ne sont pas significativement différents de ceux induits par la souche sauvage. Ces résultats ne sont pas forcément très cohérents avec l'altération de la formation d'appressoria visualisée au microscope électronique à transmission chez ces mutants. Néanmoins, d'autres possibilités de pénétration existent, notamment *via* les stomates, ce qui pourrait compenser la diminution de structure de pénétration chez ces génotypes.

*A. brassicicola* est capable de se transmettre aux semences et il s'agit d'une étape clé de son cycle infectieux. Cette capacité a été évaluée *via* le pathosystème *A. brassicicola/Arabidopsis thaliana* pour chaque mutant et comparée à celle de la souche de référence. Il apparaît que tous les mutants générés sont significativement impactés dans leur capacité de transmission aux semences à des degrés variables selon les génotypes. Le génotype le plus impacté est  $\Delta lsp1$ . Des analyses ont également été réalisées auparavant sur les mutants  $\Delta nce102$  et  $\Delta pil1$ , qui sont aussi impactés dans leur capacité de transmission aux semences. Il se pourrait au vu des résultats et des données transcriptomiques (Tableau I) que les protéines constitutives des eisosomes (plus que celles des domaines MCC) jouent un rôle non négligeable dans le mécanisme de transmission aux semences. Il est intéressant de constater que les eisosomes semblent spécifiquement impacter l'infection des organes



reproducteurs, sans perturber la colonisation des tissus végétatifs. Ce type de profil a déjà été observé pour un mutant déficient dans l'histidine kinase AbNik1 liée à la voie de l'osmoprotection chez *A. brassicicola* (Pochon *et al.*, 2012). Concernant la difficulté des mutants eisosome à se transmettre aux semences, deux hypothèses principales peuvent être soulevées. La première concerne la difficulté de ces mutants à pénétrer les siliques qui est peut-être plus forte que celle rencontrée sur feuille. Il est possible que la pénétration des tissus reproducteurs soit davantage dépendante des appressoria que sur tissus végétatifs. D'autre part, il est possible que ces mutants peinent à tolérer les contraintes hydriques liées à la colonisation des semences. Néanmoins, concernant cette dernière hypothèse, il est étonnant de constater que le mutant  $\Delta lsp1$  n'apparaît pas sensible au stress osmotique (sorbitol et PEG) alors qu'il est le plus impacté dans ces aptitudes à se transmettre aux semences.

## 5- Conclusion et perspectives

Globalement, l'extinction de protéines constitutives des domaines MCC/eisosome a peu d'impact sur la tolérance fongique aux stress osmotiques, oxydatifs ou pariétaux qui ont été testés en conditions *in vitro*. Seul le double mutant  $\Delta pil1-lsp1$  présente des sensibilités accrues aux stress osmotiques et au DMSO ainsi que des altérations de la structure cellulaire. De façon assez étonnante, les mutants sont affectés dans leur capacité de colonisation des semences, alors qu'ils conservent leur potentiel d'infection des tissus foliaires. Le mutant  $\Delta lsp1$  est particulièrement peu performant pour se transmettre aux semences alors qu'il n'apparaît pas hypersensible aux stress hydriques et osmotiques auquel il est susceptible d'être confronté sur ce type d'organe. Ces résultats suggèrent qu'un mécanisme, autre que la tolérance aux perturbations hydriques, influence la phase de colonisation des siliques et des semences. Les observations des propagules infectieuses permettent d'émettre l'hypothèse que la réduction significative du nombre d'appressoria générés chez les mutants participerait à la baisse du pouvoir pathogène.

De nombreuses perspectives, précisées précédemment, permettraient d'appréhender plus en profondeur le rôle des protéines des domaines MCC/eisosomes. Il serait notamment intéressant d'observer un potentiel déplacement de ces protéines suite à l'application d'un stress osmotique ou hydrique, de visualiser l'impact des délétions sur la structure membranaire de conidies germantes ou ayant subies un stress ou bien encore d'observer la localisation des protéines marquées par de la GFP au niveau des appressoria.



## Bibliographie

- Al-Kaff, N. and Covey, S.N.** (1994) Variation in Biological Properties of Cauliflower Mosaic Virus Clones. *Journal of General Virology*, **75**, 3137–3145.
- Al-Shehbaz, I.A., Beilstein, M.A. and Kellogg, E.A.** (2006) Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): an overview. *Plant Systematics and Evolution*, **259**, 89–120.
- Alvarez, F.J., Douglas, L.M. and Konopka, J.B.** (2009) The Sur7 protein resides in punctate membrane subdomains and mediates spatial regulation of cell wall synthesis in *Candida albicans*. *Communicative & Integrative Biology*, **2**, 76–77.
- Athanasiopoulos, A., Boleti, H., Scazzocchio, C. and Sophianopoulou, V.** (2013) Eisosome distribution and localization in the meiotic progeny of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, **53**, 84–96.
- Belmas, E., Briand, M., Kwasiborski, A., et al.** (2018) Genome Sequence of the Necrotrophic Plant Pathogen *Alternaria brassicicola* Abra43. *Genome Announcements*, **6**.
- Cole, L., Davies, D., Hyde, G. J., and Ashford, A. E.** (2004) ER-Tracker dye and BODIPY-brefeldin A differentiate the endoplasmic reticulum and Golgi bodies from the tubular-vacuole system in living hyphae of *Pisolithus tinctorius*. *Journal of Microscopy*, **197**, 239–249.
- Daquinag, A., Fadri, M., Jung, S.Y., Qin, J. and Kunz, J.** (2007) The Yeast PH Domain Proteins Slm1 and Slm2 Are Targets of Sphingolipid Signaling during the Response to Heat Stress. *Molecular and Cellular Biology*, **27**, 633–650.
- Douglas, L.M. and Konopka, J.B.** (2014) Fungal Membrane Organization: The Eisosome Concept. *Annual Review of Microbiology*, **68**, 377–393.
- Douglas, L.M., Wang, H.X., Li, L. and Konopka, J.B.** (2011) Membrane Compartment Occupied by Can1 (MCC) and Eisosome Subdomains of the Fungal Plasma Membrane. *Membranes*, **1**, 394–411.
- Dupont, S., Beney, L., Ritt, J.-F., Lherminier, J. and Gervais, P.** (2010) Lateral reorganization of plasma membrane is involved in the yeast resistance to severe dehydration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1798**, 975–985.
- Fadri, M., Daquinag, A., Wang, S., Xue, T. and Kunz, J.** (2005) The Pleckstrin Homology Domain Proteins Slm1 and Slm2 Are Required for Actin Cytoskeleton Organization in Yeast and Bind Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate and TORC2. *Molecular Biology of the Cell*, **16**, 1883–1900.
- Foderaro, J., Douglas, L. and Konopka, J.** (2017) MCC/Eisosomes Regulate Cell Wall Synthesis and Stress Responses in Fungi. *Journal of Fungi*, **3**, 61.
- Fröhlich, F., Moreira, K., Aguilar, P.S., Hubner, N.C., Mann, M., Walter, P. and Walther, T.C.** (2009) A genome-wide screen for genes affecting eisosomes reveals Nce102 function in sphingolipid signaling. *The Journal of Cell Biology*, **185**, 1227–1242.



**Grossmann, G., Malinsky, J., Stahlschmidt, W., Loibl, M., Weig-Meckl, I., Frommer, W.B., Opekarová, M. and Tanner, W.** (2008) Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. *The Journal of Cell Biology*, **183**, 1075–1088.

**Hosiner, D., Sponder, G., Graschopf, A., Reipert, S., Schweyen, R.J., Schüller, C. and Aleschko, M.** (2011) Pun1p is a metal ion-inducible, calcineurin/Crz1p-regulated plasma membrane protein required for cell wall integrity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1808**, 1108–1119.

**Joubert, A., Simoneau, P., Campion, C., et al.** (2011) Impact of the unfolded protein response on the pathogenicity of the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*. *Molecular Microbiology*, **79**, 1305–1324.

**Kabeche, R., Baldissard, S., Hammond, J., Howard, L. and Moseley, J.B.** (2011) The filament-forming protein Pil1 assembles linear eisosomes in fission yeast. *Molecular Biology of the Cell*, **22**, 4059–4067.

**Kamble, C., Jain, S., Murphy, E. and Kim, K.** (2011) Requirements of Slm proteins for proper eisosome organization, endocytic trafficking and recycling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biosciences*, **36**, 79–96.

**Karotki, L., Huiskonen, J.T., Stefan, C.J., et al.** (2011) Eisosomes Proteins Assemble into a Membrane Scaffold. *The Journal of Cell Biology*, **195**, 889–902.

**Lam, S.S., Martell, J.D., Kamer, K.J., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., Mootha, V.K. and Ting, A.Y.** (2014) Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling. *Nature Methods*, **12**, 51–54.

**Loibl, M., Grossmann, G., Stradalova, V., Klingl, A., Rachel, R., Tanner, W., Malinsky, J. and Opekarova, M.** (2010) C Terminus of Nce102 Determines the Structure and Function of Microdomains in the *Saccharomyces cerevisiae* Plasma Membrane. *Eukaryotic Cell*, **9**, 1184–1192.

**Luo, G., Gruhler, A., Liu, Y., Jensen, O.N. and Dickson, R.C.** (2008) The Sphingolipid Long-chain Base-Pkh1/2-Ypk1/2 Signaling Pathway Regulates Eisosome Assembly and Turnover. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 10433–10444.

**Mollinedo, F.** (2012) Lipid raft involvement in yeast cell growth and death. *Frontiers in Oncology*, **2**.

**Momany, M. and Talbot, N.J.** (2017) Septins Focus Cellular Growth for Host Infection by Pathogenic Fungi. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **5**.

**Moreira, K.E., Schuck, S., Schrul, B., Fröhlich, F., Moseley, J.B., Walther, T.C. and Walter, P.** (2012) Seg1 controls eisosome assembly and shape. *The Journal of Cell Biology*, **198**, 405–420.

**Moreira, K.E., Walther, T.C., Aguilar, P.S. and Walter, P.** (2009) Pil1 Controls Eisosome Biogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, **20**, 809–818.



**Murphy, E.R., Boxberger, J., Colvin, R., Lee, S.J., Zahn, G., Loor, F. and Kim, K.** (2011) Pil1, an eisosome organizer, plays an important role in the recruitment of synaptojanins and amphiphysins to facilitate receptor-mediated endocytosis in yeast. *European Journal of Cell Biology*, **90**, 825–833.

**N'Guyen, G.** (2015) Etudes des déterminants moléculaires impliqués dans la capacité de transmission d'*Alternaria brassicicola* aux semences d'*Arabidopsis thaliana*. *Thèse – Université d'Angers*

**Nowicki, M., Nowakowska, M., Niezgoda, A. and Kozik, E.** (2012) Alternaria Black Spot of Crucifers: Symptoms, Importance of Disease, and Perspectives of Resistance Breeding. *Vegetable Crops Research Bulletin*, **76**.

**Olivera-Couto, A., Graña, M., Harispe, L. and Aguilar, P.S.** (2011) The eisosome core is composed of BAR domain proteins. *Molecular Biology of the Cell*, **22**, 2135–2421.

**Olivera-Couto, A., Salzman, V., Mailhos, M., Digman, M.A., Gratton, E. and Aguilar, P.S.** (2015) Eisosomes Are Dynamic Plasma Membrane Domains Showing Pil1-Lsp1 Heterooligomer Binding Equilibrium. *Biophysical Journal*, **108**, 1633–1644.

**Pigné, S., Zykwinska, A., Janod, E., et al.** (2017) A flavoprotein supports cell wall properties in the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*. *Fungal Biology and Biotechnology*, **4**.

**Pochon S.** (2012) Etudes des mécanismes moléculaires impliqués dans la transmission des agents pathogènes aux semences d'*Arabidopsis thaliana*. *Thèse -Université d'Angers*

**Pochon, S., Simoneau, P., Pigné, S., et al.** (2013) Dehydrin-like Proteins in the Necrotrophic Fungus *Alternaria brassicicola* Have a Role in Plant Pathogenesis and Stress Response. *PLoS ONE*, **8**.

**Reijnst, P., Walther, A. and Wendland, J.** (2011) Dual-colour fluorescence microscopy using yEmCherry-/GFP-tagging of eisosome components Pil1 and Lsp1 in *Candida albicans*. *Yeast*, **28**, 331–338.

**Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., et al.** (2008) Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nature Methods*, **5**, 605–607.

**Seger, S., Rischatsch, R. and Philippse, P.** (2011) Formation and stability of eisosomes in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Journal of Cell Science*, **124**, 1629–1634.

**Subach, F.V., Patterson, G.H., Manley, S., Gillette, J.M., Lippincott-Schwartz, J. and Verkhusha, V.V.** (2009) Photoactivatable mCherry for high-resolution two-color fluorescence microscopy. *Nature Methods*, **6**, 311–311.

**Vangelatos, I., Roumelioti, K., Gournas, C., Suarez, T., Scazzocchio, C. and Sophianopoulou, V.** (2010) Eisosome Organization in the Filamentous Ascomycete *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*, **9**, 1441–1454.



**Vicente, J., Conway, J., King, G. and Taylor, J.** (2000) Resistance To Xanthomonas Campestris Pv. Campestris In Brassica Spp. *Acta Horticulturae*, 61–67.

**Walther, T.C., Aguilar, P.S., Fröhlich, F., Chu, F., Moreira, K., Burlingame, A.L. and Walter, P.** (2007) Pkh-kinases control eisosome assembly and organization. *The EMBO Journal*, **26**, 4946–4955.

**Walther, T.C., Brickner, J.H., Aguilar, P.S., Bernales, S., Pantoja, C. and Walter, P.** (2006) Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature*, **439**, 998–1003.

**Wang, H.X., Douglas, L.M., Aimanianda, V., Latgé, J.-P. and Konopka, J.B.** (2011) The Candida albicans Sur7 Protein Is Needed for Proper Synthesis of the Fibrillar Component of the Cell Wall That Confers Strength. *Eukaryotic Cell*, **10**, 72–80.

**Yoshikawa, K., Tanaka, T., Furusawa, C., Nagahisa, K., Hirasawa, T. and Shimizu, H.** (2009) Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, **9**, 32–44.

**Young, M.E., Karpova, T.S., Brugger, B., Moschenross, D.M., Wang, G.K., Schneiter, R., Wieland, F.T. and Cooper, J.A.** (2002) The Sur7p Family Defines Novel Cortical Domains in *Saccharomyces cerevisiae*, Affects Sphingolipid Metabolism, and Is Involved in Sporulation. *Molecular and Cellular Biology*, **22**, 927–934.

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

**Zimmerberg, J. and McLaughlin, S.** (2004) Membrane Curvature: How BAR Domains Bend Bilayers. *Current Biology*, **14**.



# **Annexe**



Annexe : Protocole utilisé par le SCIAM pour la préparation des échantillons pour les observations au microscope électronique à transmission (Adapté de Pigné *et al.*, 2017).

## PREPARATION DES ECHANTILLONS MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION

Spores - Justine COLOU

### 1) FIXATION CHIMIQUE

Fixateur paraformaldéhyde 2% glutaraldéhyde 2% dans tampon cacodylate de sodium 0,1M pH 7,4 la nuit sous vide. Centrifugation 5 min à 4500 rpm et rinçage dans tampon cacodylate. Stockage à 4°C.

### 2) POST FIXATION

Centrifugation 5 min à 4500 rpm  
1 rinçage tampon cacodylate (1 mL)  
Centrifugation 5 min à 4500 rpm  
Tétr oxyde d'osmium 1 % dans H<sub>2</sub>O pendant 1h à température ambiante

### 3) DESHYDRATATION (A chaque étape : centrifugation 5 min à 4500 rpm)

H <sub>2</sub> O déminéralisée	3 x 5 min
Ethanol 50%	20 min
Ethanol 70%	20 min
Ethanol 95%	20 min
Ethanol 100%	3 x 30 min

### 4) INCLUSION EN RESINE EPON

Centrifugation 5 min à 4500 rpm.  
Oxyde de propylène 2 x 15 min  
Centrifugation 5 min à 4500 rpm

Remplacer le 2<sup>e</sup> bain d'oxyde de propylène par le mélange suivant :

Oxyde de propylène	1 vol
Solution finale d'Epon	1 vol

Centrifugation 5 min à 4500 rpm.  
Laisser le tube débouché sous la hotte fermée et allumée pendant 18 heures minimum.

Mettre le prélevement dans la solution finale d'Epon pendant 4 heures minimum.

Changer à nouveau le bain de solution finale d'Epon.

Polymérisation à l'étuve :

24h à 37°C

24h à 45°C

48h à 60°C

### Préparation de l'Epon :

Sol A	
EMBEd 812 (Epon 812)	31 mL ou 37,8g
DDSA (2-Dodecetyl succinic anhydride)	50 mL ou 49,7g

### Sol B

EMBEd 812	50 mL ou 60,7g
NMA (Nadic Méthyl Anhydride)	44,5 mL ou 55g

Agiter à l'aide de l'agitateur rotatif. Conservation à 4°C.

### Solution finale d'Epon (à préparer extemporanément) :

Sol A	2 vol
Sol B	3 vol

Agiter à l'aide de l'agitateur rotatif pendant 15 min.

Ajouter 2,5 % de DMAE et agiter pendant 15 minutes.

### 5) COUPE

Coupes ultrafines de 60 nm d'épaisseur réalisées avec un ultramicrotome Leica UC7 et déposées sur des grilles de cuivre.

### 6) CONTRASTE

Coloration à l'acétate d'uranyle 3% dans éthanol 50° pendant 15 min puis rinçage à l'eau déminéralisée.

### 7) OBSERVATION

Microscope JEOL JEM-1400 à une tension d'accélération de 120 kV.





**Ophélie DUBREU, 2018. Caractérisation des eisosomes, potentiels facteurs de la pathogénicité chez *Alternaria brassicicola*.**

Equipe FungiSem (Pathologies fongiques des semences), UMR 1345-IRHS, Institut de Recherche en Horticulture et Semences, 42 rue Georges Morel, 49071 Beaucouzé CEDEX, France.

## RESUME

Les eisosomes, découverts en 2006 sur *Saccharomyces cerevisiae*, sont des protéines membranaires associées à des domaines «Membrane Compartment of Can1» (MCC). Neuf protéines appartenant à ces domaines et vingt protéines constitutives des eisosomes ont été identifiées chez cet organisme, cependant leurs rôles ne sont encore pas bien définis. Des études menées sur différents champignons pathogènes de l'Homme (*Candida albicans*) ou des végétaux (*Ashbya gossypii*) suggèrent que ces domaines pourraient jouer un rôle dans la tolérance à certains stress environnementaux ainsi que dans leur pathogénicité. Des travaux antérieurs menés au sein de l'équipe FungiSem montrent que la plupart des gènes codant les protéines constitutives de ces domaines sont fortement exprimés chez *Alternaria brassicicola* en cas de forte contrainte hydrique, suggérant que ces domaines membranaires pourraient aussi jouer un rôle lors de la colonisation des semences par le mycète.

Dans le cadre de ce stage, le rôle des eisosomes a été étudié chez *A. brassicicola* via la création et la caractérisation phénotypique de mutants qui sont soit déficients pour certaines protéines du complexe eisosomal, soit exprimant des protéines eisomales fusionnées à la GFP (Green Fluorescent Protein). Des tests de résistance des mutants à divers stress (hydriques, osmotiques, pariétaux, oxydatifs, etc...) ont été réalisés. L'impact des mutations sur la structure membranaire ainsi que leurs localisations cellulaires ont également été analysés par diverses techniques de microscopie. L'impact des mutations sur la pathogénicité sur plantes a également été évalué sur rosettes et siliques (étude de la transmission aux semences) d'*Arabidopsis thaliana* et sur feuilles de *Brassica oleracea*. Les résultats ont été complétés par une observation des structures infectieuses au niveau des points d'inoculation.

Les protéines des domaines MCC/eisosomes sont principalement localisées dans la membrane plasmique, cependant certaines protéines comme Nce102 ou Sur7, peuvent également être retrouvées à l'intérieur d'organites encore à identifier. Une mutation des deux gènes paralogues *pil1* et *lsp1* entraîne une déformation structurelle de la membrane avec la formation d'invaginations complexes et imposantes. Cette même mutation induit également une sensibilité de la souche à des stress osmotiques et oxydatifs. Les mutants pour lesquels les gènes des eisosomes sont délétés présentent également une diminution plus ou moins importante de leur capacité à se transmettre aux semences et de leur capacité à former des appressoria.

**Mots clés :** *Alternaria brassicicola*, domaines MCC, eisosomes, pathogénicité, semences.

---

**Ophélie Dubreu, 2018. Characterization of eisosomes, potential pathogenic factors in the fungus *Alternaria brassicicola*.**

Equipe FungiSem (Pathologies fongiques des semences), UMR 1345-IRHS, Institut de Recherche en Horticulture et Semences, 42 rue Georges Morel, 49071 Beaucouzé CEDEX, France.

## ABSTRACT

Eisosomes, discovered in *Saccharomyces cerevisiae* in 2006, are membrane proteins associated to MCC (Membrane Compartment of Can1) domains. Nine proteins belonging to those domains and twenty eisosome proteins have been identified in this microorganism, but their functions are still not clear. MCC/eisosomes domains have been found in other fungi, such as the human pathogen *Candida albicans* or the plant pathogen (*Ashbya gossypii*). Recent studies suggested that they might have a role in the response to various environmental stresses and in the pathogenicity. Previous works carried out in the FungiSem team, showed that most of the genes coding for proteins of those domains were found to be upregulated in *Alternaria brassicicola* when the fungus was exposed to high water stress, suggesting that those domains would play a role during the seeds colonization by the fungi.

In this study, the role of those eisosomes was investigated in *A. brassicicola* by characterizing KO mutants and strains expressing GFP fused proteins. Susceptibility assays to various stress were performed. Moreover, the effect of mutations on the membrane structure and their cellular localisation was examined using several microscopic tools. The impact on the pathogenicity was also studied thanks to inoculations on *Arabidopsis thaliana* (leaves and siliques) and on *Brassica oleracea* (leaves only). The results were correlated with observations of the infection structures at the point of inoculation.

MCC/eisosome domain proteins were mainly found to be localized in the plasma membrane, but some proteins like Nce102 or Sur7, were also visualized in other still unidentified organites. A mutation of both gene *pil1* and *lsp1* led to a structural deformation of the plasma membrane with large and unusual invaginations. The same mutation induced a higher susceptibility to osmotic and water stress. The eisosome mutants also exhibited a decrease in their ability to form appressoria and to be transmitted to seeds.

**Key words:** *Alternaria brassicicola*, eisosomes, MCC domains, pathogenicity, seeds.