

Les biocarburants

1.1.1. Contexte climatique et énergétique

La demande énergétique mondiale devrait augmenter d'environ 40 % d'ici 2040 du fait de la forte croissance démographique et économique de certains pays émergents (International Energy Agency, 2014). En 2010, la demande énergétique mondiale était satisfaite à plus de 80 % par des énergies fossiles : le pétrole fournit 33 % des besoins mondiaux, suivi par le charbon (27 %) et enfin le gaz (21 %). Ces chiffres illustrent bien la dépendance mondiale aux énergies fossiles. D'après les auteurs de la BP Statistical Review of World Energy (BP, 2015), les réserves d'hydrocarbures sont abondantes, mais concentrées dans un petit nombre de pays, ce qui soulève la question de la sécurité d'approvisionnement. En effet, fin 2014, les pays de l'OPEP (27 pays) possédaient plus de 70 % des réserves mondiales de pétrole et 50 % des réserves de gaz étaient réparties entre la Russie, l'Iran et le Qatar. Du fait de la répartition des ressources, l'approvisionnement peut être rapidement perturbé par des catastrophes naturelles, des incidents techniques (catastrophe industrielle), mais aussi des événements géopolitiques, voire terroristes. Une rupture d'approvisionnement plus ou moins brutale pourrait avoir des conséquences sur l'économie mondiale, c'est pourquoi, plus que la disponibilité des ressources dans le sous-sol, c'est bien l'accès aux ressources et leur valorisation qui préoccupent les dirigeants.

Parallèlement, les conclusions du GIEC (Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat) montrent que les changements climatiques en cours sont liés aux émissions de gaz à effet de serre provoquées par les activités humaines. D'après leurs prévisions, le réchauffement climatique pourrait atteindre 5,5 °C en moyenne à la surface du globe par rapport à la période préindustrielle de 1850, mettant en péril de nombreuses populations et écosystèmes. C'est pourquoi, la communauté internationale a décidé de freiner la hausse des températures à 2 °C d'ici 2100. Cela implique que les émissions de gaz à effet de serre ne dépassent pas 2 900 gigatonnes, or entre 1870 et 2011, les deux tiers de ce total ont déjà été émis (Giec, 2014). Pour respecter cet objectif, il faut réduire d'une façon considérable, les émissions de gaz à effet de serre au cours des prochaines décennies en procédant notamment à des changements dans les modes de productions énergétiques actuels.

Face aux besoins énergétiques croissants, au réchauffement global et à la dépendance énergétique de nombreux pays, les gouvernements ont mis en place des politiques de diversification énergétique qui donnent une part belle aux énergies renouvelables : les biocarburants, les énergies solaires et éoliennes, la géothermie, l'hydraulique. Le présent travail est focalisé plus spécifiquement sur les biocarburants.

1.1.2. La fabrication des biocarburants : 3 générations

Les biocarburants sont issus de la transformation de biomasse ou matière organique d'origine végétale. Ils sont utilisés soit en remplacement, soit en complément des carburants conventionnels dans le secteur des transports. Leur usage présente des intérêts considérables :

- ils sont facilement stockables jusqu'à leur utilisation, car sous forme liquide,
- ils sont simples à utiliser puisqu'ils peuvent être mélangés aux carburants conventionnels et distribués sans avoir à modifier les infrastructures existantes et les véhicules,
- ils sont une source d'énergie constante et contrôlable et les matières premières nécessaires à leur fabrication sont disponibles en Europe.

On distingue 3 générations de biocarburants selon l'origine de la biomasse utilisée et les procédés de transformation associés.

1.1.2.1. La première génération de biocarburants

Les biocarburants de première génération sont fabriqués à partir des organes de réserve des végétaux et sont répartis en deux familles :

- le **biodiesel** , destiné aux moteurs diesel, est fabriqué à partir de plantes à huile (colza, palme, tournesol). Les huiles extraites de ces plantes subissent une transformation chimique (transestérification ou hydrotraitement), qui leur confère des propriétés voisines de celles des gazoles auxquels elles sont mélangées.
- le **bioéthanol** est destiné aux moteurs à essence. Il est obtenu par la fermentation alcoolique du sucre contenu dans la betterave et la canne à sucre ou obtenu après l'hydrolyse de l'amidon extrait du maïs, ou de céréales. L'éthanol obtenu peut être transformé en ETBE (Ethyl Tertio Butyl Ether) par addition avec de l'isobutène (généralement d'origine pétrolière), afin de favoriser le mélange avec l'essence (Figure 1).

Ces biocarburants de première génération sont produits à l'échelle industrielle, majoritairement par les États-Unis, le Brésil et l'Europe. Cependant, ils ne couvrent que 2,5 % de la consommation énergétique mondiale (BP, 2015).

Les biocarburants de 1^{ère} génération présentent un bilan carbone assez variable selon la matière première utilisée (Simbolotti, 2007). Si la production à partir de betteraves permet une réduction des émissions de 50 à 60 % (par rapport à l'essence), celle à partir du maïs permet une réduction de seulement 15 et 25 % (Simbolotti, 2007). Enfin, vivement controversés car produits à partir de matières premières pouvant être utilisées dans une chaîne alimentaire animale ou humaine ou pouvant

entraîner la conversion de zones naturelles en parcelles agricoles, les biocarburants de première génération devraient être progressivement complétés par des biocarburants de deuxième génération.

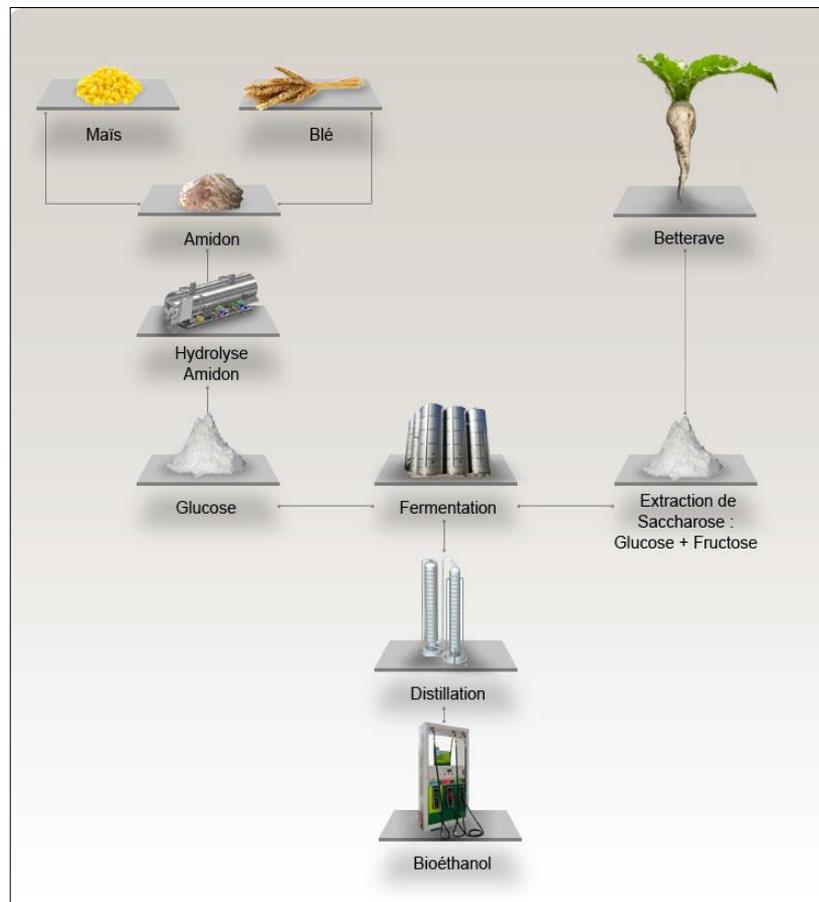


Figure 1: Procédé de production d'éthanol de 1ère génération

Le glucose extrait de la betterave ou après hydrolyse de l'amidon du maïs et du blé est fermenté en éthanol qui est purifié et concentré par distillation avant d'être mélangé aux carburants conventionnels. (www.bioethanolcarburant.com).

1.1.2.2. La deuxième génération de biocarburants

Les biocarburants de deuxième génération utilisent la lignocellulose contenue dans toutes les parois végétales. Il est ainsi possible de valoriser les résidus agricoles et forestiers (pailles, tiges, feuilles), les résidus de l'industrie papetière ou même des plantes dédiées à croissance rapide (miscanthus, peuplier...). Ces différentes ressources sont disponibles en grande quantité (Ballerini, 2011). La valorisation de cette lignocellulose étant plus complexe, elle fait intervenir plus d'étapes que pour les biocarburants de première génération et elle se répartit en deux filières :

- la **voie thermochimique** débute avec un traitement thermique permettant de déstructurer la biomasse qui sera ensuite gazéifiée. Le gaz de synthèse obtenu est purifié puis transformé en hydrocarbures de synthèse par la réaction de Fischer-Tropsch (Froment et al., 2004). L'inconvénient majeur de cette méthode est que la gazéification nécessite une

production importante de chaleur, ce qui contribue à dégrader le bilan énergétique de ce procédé,

- la **voie biochimique** fait intervenir quatre étapes : une première étape de prétraitement physico-chimique vise à rendre la cellulose et les hémicelluloses, principaux composants des parois végétales, accessibles à un cocktail enzymatique qui va, dans une seconde étape, les hydrolyser en monosaccharides de glucose. Enfin, les sucres libérés sont fermentés en éthanol qui sera concentré et purifié par distillation (Figure 2) (Margeot et al., 2009). Chacune des 4 étapes doit être optimisée et plus particulièrement l'étape d'hydrolyse enzymatique qui fait généralement intervenir les cellulases produites par un seul microorganisme : le champignon filamenteux *Trichoderma reesei*. Cette étape peut représenter à elle seule entre 15 et 30 % du coût total de production en fonction de la configuration des procédés choisis (quantité d'enzymes utilisée, hydrolyse et fermentation simultanées ou séquentielles...) (National Renewable Energy Laboratory, 1999; Lynd et al., 2005; Klein-Marcuschamer et al., 2012).

Leur production permettraient de réduire les émissions nettes de CO₂ de 70 % (Simbolotti, 2007).

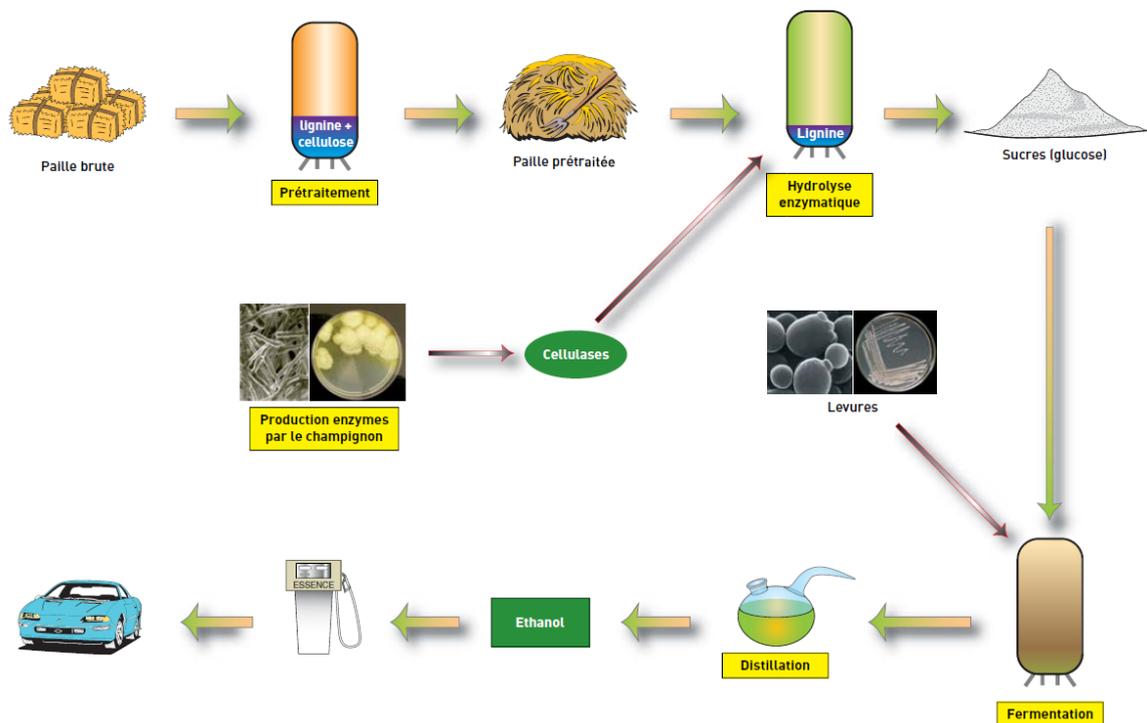


Figure 2 : Procédé de production d'éthanol de 2^{ème} génération par la voie biochimique.
(IFP Énergies nouvelles).

De nombreux programmes de recherche dans le monde visent à lever les derniers verrous empêchant la commercialisation à prix compétitifs des biocarburants et avec les meilleurs bilans environnementaux possibles. Aujourd'hui, quelques unités préindustrielles utilisant la voie biochimique ont vu le jour aux États-Unis, au Brésil, et en Italie. En France, le projet Futurol

(<http://www.projetfuturo1.com/>) vise à développer et à mettre sur le marché un procédé, des technologies et des produits (enzymes, levures) pour la production de bioéthanol par voie biochimique.

1.1.2.3. Troisième génération

Les biocarburants de 3^{ème} génération, qui sont encore au stade de recherche en laboratoire, mettent en jeu des algues. En effet, les algues présentent de nombreux avantages : certaines d'entre elles produisent naturellement beaucoup d'huile (environ 80 % de la matière sèche, donc présentant des rendements en biocarburants potentiellement élevés), se développent en captant du CO₂ (ce qui permettrait de recycler les émissions de l'industrie), et ont une croissance plus rapide que les plantes terrestres en accaparant pas ou peu de surfaces agricoles. Si théoriquement, les biocarburants de troisième génération semblent prometteurs, les procédés de fabrications actuels présentent encore trop d'inconvénients. Les méthodes existantes d'extraction des huiles nécessitent des équipements coûteux et énergivores, et la culture en bassin à ciel ouvert nécessite par unité de production autant d'eau qu'une unité de blé ou coton. De plus, les algues ont besoin comme les plantes pour leur croissance de phosphore, d'azote et de potassium qui sont les composants majeurs des engrais agricoles, ce qui va avoir un impact sur ces approvisionnements déjà limités. Enfin, au vu des rendements d'extractions et des stratégies de cultures actuelles, pour pouvoir remplacer significativement les carburants conventionnels, la surface terrestre dédiée à leur culture risque d'occuper beaucoup plus d'espace que prévu (Hannon, Gimpel et al. 2010 - Biofuels from algae).

1.1.2.4. Conclusion

Le biocarburant de deuxième génération est, hormis celui de la première, la génération la plus proche du développement industriel et de la mise sur le marché. Actuellement, les biocarburants de deuxième génération produits par voie fermentaire sont ceux sur lesquels se porte l'intérêt des politiques et des scientifiques. Même si toutes les étapes de ce procédé doivent être optimisées, un effort particulier est porté sur l'étape d'hydrolyse enzymatique mettant en jeu les enzymes du champignon filamenteux *T. reesei*. Parmi les améliorations envisagées pour une diminution du coût de l'hydrolyse, l'ingénierie génétique de *T. reesei* est une solution. Elle permettrait d'obtenir un champignon produisant par exemple plus d'enzymes ou produisant des enzymes plus performantes. Même si le champignon filamenteux qui nous intéressera dans la suite de cet exposé est *T. reesei*, il est important de dresser un état de l'art des différentes stratégies d'amélioration de souches utilisées par les industriels.

1.2. Les champignons dans l'industrie et l'alimentation

1.2.1. L'utilisation des champignons dans l'industrie

Les champignons, du fait de leur capacité de biotransformation (processus consistant à réaliser une transformation chimique avec l'organisme lui-même ou à l'aide de ses enzymes purifiées) et de leur capacité à produire une extraordinaire palette de métabolites secondaires, sont utilisés à des fins industrielles et commerciales depuis de nombreuses décennies. Ainsi, les levures et certains champignons filamenteux jouent un rôle essentiel dans des domaines d'activité aussi divers que l'agriculture et des industries alimentaires et pharmaceutiques.

Dans l'agroalimentaire, pains à pâte levée, brioches, charcuteries et fromages n'existeraient pas sans ces organismes à fort potentiel de biotransformation. Le vin et la bière sont ainsi obtenus respectivement grâce à *Saccharomyces cerevisiae* (Figure 3A) ou *Saccharomyces carlsbergensis*, tandis que le saké est obtenu par la coopération entre le champignon filamenteux *Aspergillus oryzae* et la levure *S. cerevisiae*. Si la fabrication du fromage ne repose pas directement sur les capacités métaboliques des levures et champignons filamenteux, ces derniers contribuent à leurs qualités gustatives. Ils interviennent lors de l'étape d'affinage : la croûte blanche des camemberts et bries est obtenue par ensemencement de *Penicillium camemberti* (Figure 3B), tandis que les bleus (roquefort, gorgonzola, stilton) sont obtenus par ajout de *Penicillium roqueforti*. Quant aux saucissons, c'est le développement à leur surface de *Penicillium nalgiovense* qui leur confère leur robe blanche typique, leur texture et leur goût.

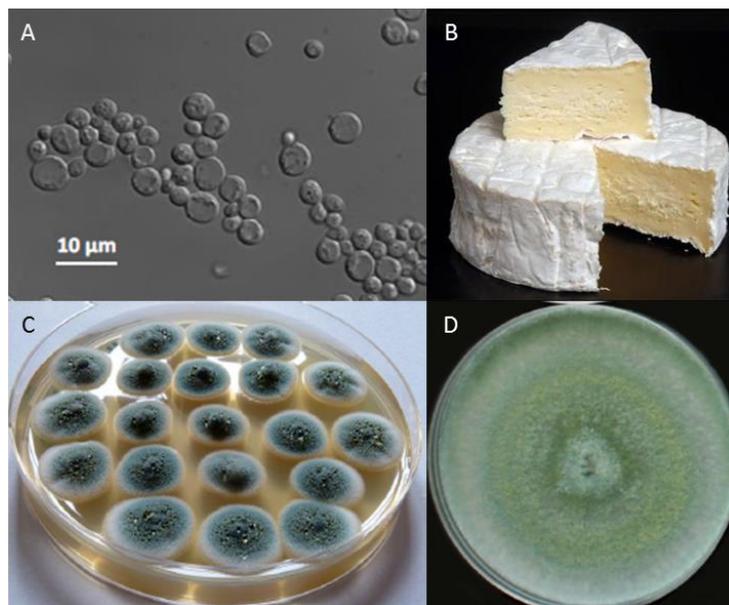


Figure 3 : Les champignons dans l'industrie.

S. cerevisiae (A), *P. camemberti* forme la croûte blanche du camembert (B), *P. chrysogenum* (C) et *T. harzianum* (D). (Photos A et C : Silar, 2016 ; Photo B : <http://www.cheesewiki.com> ; Photo D : Błaszczuk et al., 2014).

Dans le domaine pharmaceutique, l'exemple le plus célèbre est celui de la pénicilline produite par *Penicillium notatum* (aussi appelé *Penicillium chrysogenum* Figure 3C) et découvert par Alexander Fleming en 1928. D'autres molécules antibiotiques (céphalosporines), anticholestérolémiques (statines), immunosuppresseurs (cyclosporines), antifongiques, anticancéreux, alcaloïdes... sont sécrétées par des champignons filamenteux (Wenger, 1984; Manzoni and Rollini, 2002; Campos Muñiz et al., 2007; Mahmood et al., 2010; Schuster and Schmoll, 2010). À l'échelle industrielle, les souches productrices, dont le rendement métabolique aura préalablement été amélioré par sélection et/ou génie génétique, sont cultivées en fermenteurs. Les molécules d'intérêt, sécrétées dans le milieu de culture, peuvent alors être purifiées. Si les industriels exploitent d'abord les molécules naturellement produites par les champignons, ils s'en servent également pour produire des molécules provenant d'autres organismes. Par exemple, *S. cerevisiae* est utilisé pour produire de l'insuline humaine, des albumines et les antigènes nécessaires à la fabrication des vaccins contre l'hépatite B et les papillomavirus humains. *S. cerevisiae* sert ainsi d'« usine » pour l'expression de 20 % des protéines hétérologues du domaine des biopharmaceutiques (Nielsen, 2013).

D'autres secteurs industriels utilisent la capacité de biotransformation et la production des métabolites fongiques. Ainsi, les industriels piochent régulièrement dans le répertoire des acides organiques (acide citrique, acide lactique), des vitamines (riboflavine), des hormones (gibbérellines), des colorants, des arômes (arômes bananes ou noix de coco) et des enzymes (cellulases, amylases, phospholipases, protéases, hémicellulases...) produits. Le marché des enzymes vaut 3 milliards d'euros (<http://www.novozymes.com>) et l'Association des fabricants de produits enzymatiques de fermentation (Amfep - <http://www.amfep.org/>) répertorie plus de 70 enzymes. Les producteurs d'enzymes utilisées par les acteurs industriels du secteur des enzymes sont principalement sélectionnés parmi les espèces *Trichoderma* et *Aspergillus* (Paloheimo et al., 2016). Leurs enzymes peuvent être utilisées dans des procédés agro-alimentaires, dans l'alimentation animale et dans divers processus industriels tels que la production de bioéthanol, le traitement du papier et des pulpes, et des procédés de l'industrie textile (Tableau 1) (Paloheimo et al., 2016). Les cellulases de *T. reesei* sont utilisées pour produire du bioéthanol de deuxième génération (Kumar et al., 2008; Bischof et al., 2016) mais aussi dans les procédés de l'industrie textile (Paloheimo et al., 2016). Les amylases, les glucoamylases et les glucose isomérase sont par exemple utilisés pour augmenter la pureté et le rendement du glucose produit à partir d'amidon (Charnock and McCleary, 2005). Les xylanases sont utilisés pour le blanchiment du papier mais également comme additif dans la farine de blé pour améliorer la manipulation de la pâte et des produits cuits au four et en association avec la pectinase, et la cellulase participe à la clarification des jus de fruits (Beg et al., 2001).

Tableau 1 : Listes des enzymes fongiques

Cette liste est non exhaustive. Adapté de Charnock and McCleary, (2005) et Paloheimo et al., (2016).

Application	Enzymes
Conversion de l'amidon	Glucoamylases, amylases
Agro-alimentaire	Oxydoréductases, pectinases, protéases, cellulases
Alimentation animale	Phytases, protéases, xylanases
Traitement des pulpes et du papier	Oxydoréductases, phospholipases, xylanases
Industrie textile	Cellulases, oxydoréductases
Détergents	Oxydoréductases, lipases, cellulases
Biocarburant	Cellulases, beta-glucanases

Dans un tout autre domaine, les champignons filamenteux comme *Pleurotus ostreatus* sont capables de métaboliser un large spectre de composés toxiques comme par exemple des dérivés d'explosifs (Axtell et al., 2000) ou encore des dérivés du pétrole (Stamets, 2005) et sont donc utilisés à des fins de bioremédiation des sols contaminés. Enfin, les champignons peuvent servir d'agents de bio-contrôle comme *Trichoderma harzianum* (Figure 3D) (Verma et al., 2007) pour empêcher la prolifération des maladies du système racinaire des plantes ou encore comme *Beauveria bassiana* pour contrôler les populations de parasites tels que les charançons rouges du palmier (Dembilio et al., 2010) ou les moustiques (Scholte et al., 2004).

Au-delà de leur capacité de biotransformation et de production de molécules à haute valeur ajoutée, les champignons filamenteux sont faciles à manipuler et peu exigeants en nutriments. Ils peuvent être cultivés en grande quantité en bioréacteur et surtout sécrètent dans le milieu extérieur les métabolites (primaires ou secondaires) qu'ils produisent, ce qui facilite leur purification. Cependant, pour des raisons de rentabilité et de performance inhérentes à toutes industries, les champignons filamenteux, ne peuvent pas être utilisés tels qu'ils sont dans la nature, et sont donc souvent améliorés par génie génétique.

1.2.2. Les méthodes d'amélioration des souches fongiques

L'amélioration génétique vise à améliorer les voies métaboliques responsables de la production de composés d'intérêts (enzymes, antibiotiques...) pour améliorer leurs titres et/ou générer de nouveaux composés. Elle vise aussi à améliorer la maniabilité des souches, c'est-à-dire leur stabilité et leur comportement en bioréacteur, mais aussi de permettre la production des molécules d'intérêt à l'aide de substrats moins coûteux. La mutagénèse est une technique communément utilisée pour améliorer des souches et vise à introduire des mutations de façon volontaire dans l'ADN afin de créer des gènes génétiquement modifiés. Les mutations peuvent toucher les éléments régulateurs du gène ou son produit et peuvent engendrer des souches aux caractéristiques intéressantes d'un point de vue industriel. Il existe deux méthodes d'amélioration couramment utilisées chez les bactéries et champignons filamenteux : la mutagénèse aléatoire et l'ingénierie génétique.

1.2.2.1. La mutagénèse aléatoire

Les isolats naturels à l'origine des souches industrielles ont dans un premier temps été génétiquement améliorés par **mutagénèse aléatoire** qui consiste à générer aléatoirement dans l'ADN des mutations. Les modifications engendrées peuvent être des substitutions, insertions ou suppressions d'un ou plusieurs nucléotides, mais aussi des translocations de fragments d'ADN. Ces mutations sont provoquées par l'exposition de l'organisme cible à des agents mutagènes d'origine chimique ou physique tels que des agents alkylants (nitrosoguanidine et éthylméthylsulfonate) ou des rayons UV et rayons ionisants. La collection de mutants obtenue (quelques milliers d'individus) est alors sélectionnée pour un phénotype d'intérêt donné à l'aide d'un crible à petite échelle qui tente d'imiter les conditions de cultures réelles.

La mutagénèse aléatoire est relativement simple à mettre en œuvre, ne nécessite pas une connaissance approfondie de l'organisme à muter mais un crible adapté pour identifier le phénotype recherché. De plus, si elle intervient dans une souche qui n'a jamais été modifiée génétiquement, alors l'organisme généré n'est pas considéré comme OGM (organisme génétiquement modifié) selon l'article D531-2 du Code de l'Environnement français. Cette méthode efficace a permis d'obtenir la souche NRRL-1951 (CBS307.48) de *P. chrysogenum* qui produit 150 mg/L de pénicilline, soit 100 000 fois plus que la souche utilisée par Fleming, après une série de mutagénèses aléatoires (Kück and Böhm, 2013). De même, le meilleur producteur de cellulases du domaine public, la souche de *T. reesei* RutC30, a été obtenue après trois étapes de mutagénèses aléatoires (Peterson and Nevalainen, 2012).

Néanmoins, cette méthode présente quelques désavantages comme l'imprévisibilité du résultat obtenu, la difficulté à identifier la mutation responsable du caractère d'intérêt et la génération d'un grand nombre de mutations collatérales qui peuvent affaiblir la souche. Ainsi, la physiologie générale, le taux de croissance, les performances dans des procédés à grande échelle, etc du microorganisme muté peuvent être affectés. De surcroît, plusieurs tours de mutagénèses sont souvent nécessaires pour améliorer les microorganismes ce qui a pour conséquence d'augmenter le nombre de mutations collatérales. Bien qu'efficace, cette méthode ne peut donc pas être l'unique technique mise en œuvre pour l'amélioration des microorganismes.

1.2.2.2. L'ingénierie génétique

L'ingénierie génétique est un ensemble de techniques de manipulation des génomes qui permet de générer des organismes possédant de nouvelles caractéristiques. Ainsi, il est possible de contrôler l'expression des gènes à l'aide de promoteurs forts, d'augmenter le nombre de copies du gène

d'intérêt, d'invalider des gènes présentant des activités non désirées (facteur de transcription avec une activité répresseur ou protéases dégradant les protéines produites...), d'introduire des nouvelles propriétés ou encore d'améliorer les performances des protéines elles-mêmes. Les modifications souhaitées (substitutions, insertions ou suppressions) sont introduites de façon précise dans le génome de l'organisme étudié, par transformation génétique. Néanmoins, les organismes ainsi obtenus sont considérés comme des OGM.

La transformation des champignons se déroule en trois étapes. D'abord, il faut rendre le champignon compétent à recevoir l'ADN puis il faut introduire le matériel génétique à l'intérieur des noyaux des cellules devenues compétentes. Enfin, les cellules transformées sont sélectionnées afin de différencier parmi les nombreuses cellules compétentes utilisées celles qui ont été génétiquement modifiées. La transformation peut se faire dans un protoplaste, cellule dont la paroi a été préalablement digérée, ou dans des conidies. Trois techniques de pénétration d'ADN dans la cellule sont disponibles. Une méthode « universelle » qui est efficace chez de nombreux champignons filamenteux utilise du polyéthylène-glycol (PEG) qui perméabilise de façon temporaire et réversible la membrane plasmique des protoplastes et permet l'entrée de l'ADN dans la cellule. La perméabilisation de la membrane plasmique de protoplastes ou de la paroi de conidies par application d'un courant électrique ou électroporation est aussi couramment utilisée. La méthode du biolistique qui vise à bombarder des conidies intactes à l'aide de micro-projectiles d'or ou de tungstène enrobés de l'ADN recombinant, a été mise en place. Enfin, la méthode de transformation utilisant *Agrobacterium tumefaciens*, et son ADN-Ti (tumor inducing), présente de très bonnes fréquences de transformation. Ces méthodes sont utilisées avec succès chez *T. reesei*, *Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*... (de Groot, M J et al., 1998; Ruiz-Diez, 2002; Nevalainen and Te'o, 2004; Zeilinger, 2004).

La transformation de l'ADN recombinant nécessite l'utilisation de marqueurs de sélection, comme les marqueurs d'auxotrophie (*pyr4*, *ade2*...) ou de résistance aux antibiotiques (*hph*, *ble*, *amds*...). Le gène d'intérêt peut être sur le même vecteur que le marqueur de sélection ou il peut être co-transformé avec lui. Cependant, comme la majorité des marqueurs de sélection sont des gènes de résistance à des antibiotiques, une dissémination des OGM dans la nature pourrait entraîner des transferts de leurs gènes de résistance à des organismes de l'environnement, créant ainsi des organismes résistants aux antibiotiques. Ainsi, en vertu du principe de précaution, il est préférable qu'une souche industrielle utilisée à grande échelle soit dépourvue de marqueurs de résistance aux antibiotiques, ce qui nécessite de s'en débarrasser après la génération de souches améliorées. D'autre part, leur nombre étant limité, des systèmes permettant leur recyclage après transformation ont été développés.

Le gène *pyr4* de *T. reesei*, codant une orotidine 5'-monophosphate carboxylase (OMP), est utilisé comme marqueur bidirectionnelle de sélection. Les souches mutées dans ce gène sont auxotrophes

pour l'uracile mais prototrophes et résistantes à l'acide 5-fluoroorotique (5'FOA) qui est converti par l'OMP en un intermédiaire toxique (Hartl and Seiboth, 2005). Les souches auxotrophes à l'uracile qui intègrent le marqueur de sélection *pyr4* dans leur génome deviennent prototrophes à l'uracile et sont capables de pousser sur un milieu minimum contenant de l'uracile (Figure 4A). Suite à la transformation, ce marqueur peut être recyclé grâce à la recombinaison homologe lorsque deux sites répétés bordant le gène *pyr4* ont été intégrés dans la cassette. Les clones dont le marqueur de sélection *pyr4* a été éliminé, sont sélectionnés par culture sur un milieu contenant le 5-FOA et pour leur auxotrophie à l'uridine (Figure 4B) (Hartl and Seiboth, 2005). L'utilisation d'un marqueur bi-directionnel permet d'avoir un crible de sélection à la fois lors de la transformation et lors de l'étape de recyclage.

Une méthode alternative de recyclage s'inspirant du système de recombinaison Cre/loxP du bactériophage P1 (Thomson and Ow, 2006) a également été mise en place chez *T. reesei*. Dans ce type de cassette, le gène de résistance bi-directionnel est bordé par deux sites loxP. Lorsque la recombinase Cre, qui a été co-introduite avec la cassette de sélection, est induite, elle catalyse la recombinaison homologe entre les deux sites loxP. Dans le cas d'une cassette Cre/loxP portant le marqueur *pyr4*, l'excision sera sélectionnée sur milieu 5-FOA en s'assurant de l'auxotrophie à l'uracile des transformants (Figure 4C) (Seidl and Seiboth, 2014).

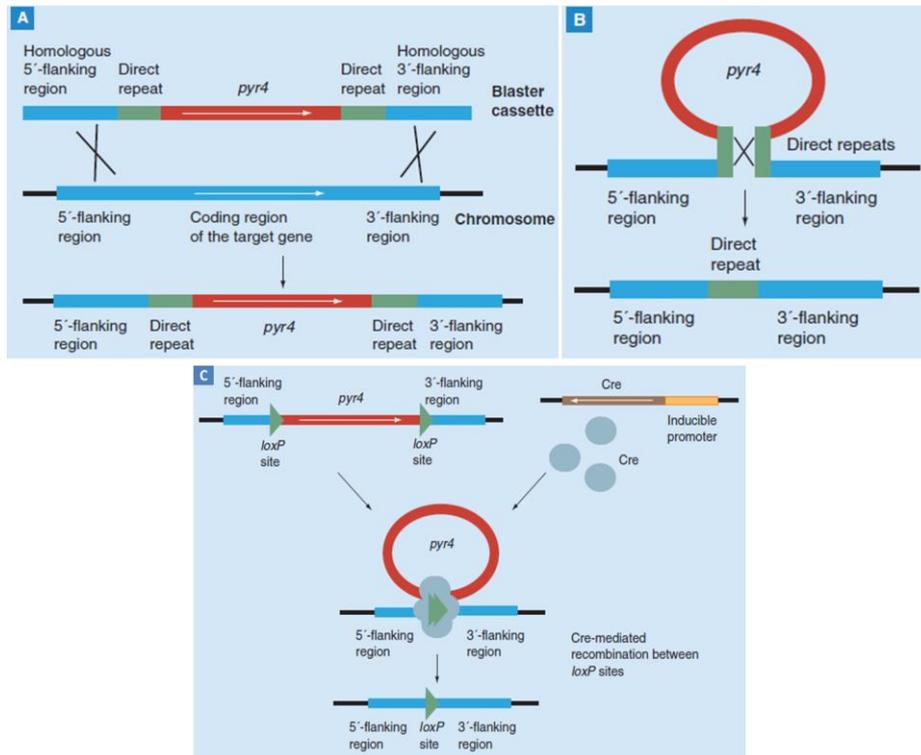


Figure 4 : Systèmes de recyclage des marqueurs de sélection.

La cassette recyclable est composée du marqueur *pyr4* qui est bordé de deux séquences répétées. Lors d'une invalidation, cette cassette va remplacer dans le gène cible par recombinaison homologue rendant le champignon prototrophe à l'uridine (A). Pour exciser le marqueur de sélection, la souche est cultivée en présence de 5-FOA et d'uridine. La recombinaison homologue entre les deux sites répétées permet d'éliminer le marqueur (B). Dans le système de recombinaison Cre/*loxP*, le marqueur de sélection est bordé de deux sites *loxP*. Lorsque la recombinase Cre est induite, un dimère Cre se forme au niveau de chaque site *loxP* et induit une recombinaison des deux sites. Le succès de l'excision de *pyr4*, rend la souche auxotrophe à l'uridine (C) (Seidl and Seiboth, 2014).

L'intégration de l'ADN en ingénierie génétique, repose sur les mécanismes de réparation homologue et non homologue de l'ADN qui permettent soit une intégration à un locus précis soit une intégration ectopique de l'ADN. La voie de réparation homologue (HR) repose sur l'action des protéines RAD52 qui permettent l'interaction entre les séquences d'ADN homologues (Shrivastav et al., 2008). Cette voie est en compétition avec la voie de recombinaison non homologue qui repose sur l'action de l'hétérodimère Ku70/Ku80 et la ligase IV-Xrcc4. Ce dernier mécanisme est conservé chez les eucaryotes et est favorisé chez les champignons filamenteux (Krogh and Symington, 2004; Ninomiya et al., 2004). Lorsqu'on souhaite compléter une mutation ou surexprimer un gène, l'intégration ectopique de l'ADN est généralement favorisée mais peut également se faire à un locus précis. Par contre, l'invalidation d'un gène ne peut se faire que par remplacement du gène natif par la cassette d'invalidation et nécessite donc l'utilisation de la voie HR. Pour favoriser l'intégration *in situ*, il faut abolir la voie du NHEJ par l'invalidation des gènes *ku70* ou *mus53*. Des souches invalidées pour cette voie sont disponibles pour différents champignons et présentent une fréquence de recombinaison homologue proche de 100 % (Krappmann, 2007). Cependant, son abolition peut engendrer une hypersensibilité aux UV et une dégénérescence sur le long terme des souches modifiées (Guangtao et al., 2009). Afin de minimiser l'impact de la lésion génétique que représente

l'invalidation du complexe *ku*, il est préférable de restaurer la voie NHEJ. Cela peut se faire soit en réintroduisant par transformation le gène sauvage invalidé, mais cela nécessite l'utilisation d'un nouveau marqueur de sélection, soit en éliminant l'invalidation par la reproduction sexuée.

Enfin, l'ingénierie génétique des champignons filamenteux peut s'appuyer sur l'édition de génome (*genome editing*) qui utilise les ciseaux moléculaires que sont les nucléases, pour insérer, remplacer et supprimer un fragment d'ADN du génome. La technique de génie génétique CRISPR/Cas9 est une technique qui permet de modifier précisément le génome de n'importe quel type de cellules (bactéries, végétaux, champignons, animaux). À l'origine, il s'agit d'un système de défense immunitaire qui empêche l'invasion de bactéries par des phages et virus. La séquence CRISPR est une région de l'ADN bactérien contenant de courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées – « *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* », qui correspondent en fait à de petits morceaux d'ADN étranger qui, intégrés dans le génome, confèrent une résistance aux phages et virus. Comme toute séquence d'ADN, la séquence CRISPR est transcrite en ARN qui va aller se fixer à l'endonucléase Cas9. Si le complexe ARN/Cas9 rencontre l'ADN viral complémentaire à l'ARN produit, il s'y fixe et Cas9 clive l'ADN étranger. En génie génétique, l'ADN étranger est remplacé par un ARN guide qui cible le gène à couper et un ADN contenant les mutations souhaitées va servir de matrice de réparation de la cassure qui mettra en jeu le système de réparation homologue de la cellule (Doudna and Charpentier, 2014). Ainsi, la séquence d'ADN d'intérêt sera intégrée dans le génome au site désiré. Cette méthodologie mise en place en 2014 chez *E. coli* (Doudna and Charpentier, 2014) commence à être appliquée chez les champignons filamenteux comme *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus nidulans*, *Ustilago maydis*, *T. reesei* (Liu et al., 2015; Nødvig et al., 2015; Schuster et al., 2016; Zhang et al., 2016).

1.2.2.3. Conclusion

Les techniques communément utilisées pour l'amélioration des souches fongiques possèdent toutes des avantages et des inconvénients qui sont résumés dans le Tableau 2. Une autre méthode d'amélioration envisageable mais qui n'a pas été mentionnée ici est la reproduction sexuée. Elle est en effet peu ou pas utilisée car de nombreuses espèces fongiques industrielles sont considérées comme asexuelles et se multiplient exclusivement de façon clonale.

Tableau 2: Récapitulatif des avantages et inconvénients des différentes techniques d'amélioration de souche.

Méthodes d'amélioration	Avantages	Inconvénients
Mutagenèse aléatoire	Mise en œuvre simple Pas besoin de connaissances du génome de l'organisme Ne sont pas des OGM	Génère des mutations collatérales Identification difficile des mutations causatives du phénotype d'intérêt Nécessite un crible adapté Criblage de très nombreux mutants
Ingénierie génétique	Mutations bien identifiées Criblage de peu de mutants	Connaissance du génome de l'organisme à améliorer Mise en œuvre chronophage Nécessite des marqueurs de sélection OGM Voie de réparation NHEJ Introduire le transgène dans la cellule

1.2.3. La reproduction sexuée

1.2.3.1. Reproduction sexuée et multiplication clonale

Dans la nature, de nombreux champignons alternent entre reproduction asexuée et reproduction sexuée. La reproduction asexuée, ou multiplication végétative, se base sur le phénomène de mitose et permet de générer rapidement un grand nombre de descendants possédant le même patrimoine génétique que le parent et entre eux. A l'inverse, la reproduction sexuée permet, grâce à la fusion des gamètes de deux parents génétiquement différents et au phénomène de méiose, d'obtenir des descendants présentant une diversité génétique (Tableau 3).

Approximativement 20% des espèces connues de champignons sont définies comme asexuelles (Dyer and Kück, 2017). Pourtant, la majorité des champignons filamenteux utilisés à des fins industrielles ont longtemps été considérés comme asexués. Toutefois, une absence de reproduction sexuée peut signifier que les conditions d'observation du cycle sexuel n'ont pas été identifiés ou que le partenaire sexuel compatible n'est pas présent (Dyer and O'Gorman, 2012). Enfin, comme les champignons filamenteux peuvent produire des structures de reproduction asexuée et sexuée aux morphologies très différentes, le même organisme peut avoir été décrit par les mycologues sous deux noms différents. Le champignon sous sa forme sexuée est appelée téléomorphe tandis que la forme asexuée porte le nom d'anamorphe.

Il a fallu attendre le milieu des années 1990 et l'avènement du séquençage et de l'analyse génomique, pour démontrer que les organismes dits anamorphes, également appelés *fungi imperfecti*, présentaient des signes de recombinaison sexuelle et possédaient les gènes nécessaires à la reproduction sexuée (Kück and Pöggeler, 2009; Billiard et al., 2012; Kück and Böhm, 2013).

Lors de la reproduction asexuée, la réplication de l'ADN doit être hautement fidèle afin de permettre le maintien du patrimoine génétique sur de nombreuses générations. Bien que le taux d'erreur de réplication de l'ADN polymérase soit très faible, des erreurs peuvent subsister (Kunkel, 2004). Ces « erreurs » constituent des variations génétiques qui sont à l'origine de l'évolution des espèces. Ainsi, dire que la reproduction asexuée est purement clonale et permet de conserver le patrimoine génétique, n'est pas totalement exact. Grâce à ces erreurs, l'adaptation d'une population asexuelle à un environnement nouveau peut être très rapide si une mutation favorable apparaît et envahit la population. Cependant, l'accumulation de certaines variations génétiques peut conduire à l'apparition et l'accumulation de mutations délétères pouvant entraîner la mort de l'individu. Le basculement vers la reproduction sexuée permet de ramener les mutations à leur état d'origine quasiment systématiquement (Lehtonen et al., 2012; Heitman et al., 2013).

Tableau 3 : Comparaison entre la reproduction sexuée et la multiplication clonale

La reproduction sexuée nécessite de l'énergie pour trouver un partenaire sexuel puis pour effectuer la méiose qui nécessite plus d'énergie que la mitose (a), alors que la multiplication végétative ne nécessite pas d'interagir avec un partenaire sexuel et qu'il n'y a pas de méiose (b). La diversité est stable s'il y a une distribution aléatoire des allèles de gènes et elle est augmentée s'il y a des associations préférentielles entre les allèles (c). La diversité est stable s'il n'y a pas de sélection, mais elle est diminuée s'il y a une expansion clonale (d). Chez les champignons, la méiose peut générer des spores capables de résister à des conditions environnementales rudes et d'être plus efficacement dispersées (e). L'adaptation d'une population provenant de la multiplication végétative peut être efficace s'il existe un génotype favorable et qu'il se répand dans la population (f). D'après Heitman et al., (2013).

	Reproduction sexuée	Multiplication végétative
Cout énergétique	Élevé (a)	Faible (b)
Niveau de recombinaison	Élevé	Faible
Diversité génétique	Stable ou augmentée	Stable ou diminuée (d)
Adaptation à un environnement changeant/fluctuant	Rapide (e)	Lente (f)
Purge des mutations délétères	Efficace	Peu efficace
Sélection des mutations bénéfiques	Efficace	Peu efficace

La reproduction sexuée nécessite deux parents pour produire une descendance, à laquelle, seulement 50 % du patrimoine génétique de chaque parent sont transmis alors que la reproduction asexuée ne nécessite qu'un parent qui produit un descendant à qui 100 % de son patrimoine génétique sont transmis (Lehtonen et al., 2012; Heitman et al., 2013). D'autre part, elle permet d'obtenir de très nombreux descendants rapidement et à un faible cout énergétique (Heitman et al., 2013). En effet, tous les individus de la population sont capables de se multiplier et, ne gaspillent pas d'énergie à trouver un partenaire et à fabriquer les structures nécessaires à la reproduction sexuée (Lehtonen et al., 2012). A l'inverse, bien que la reproduction sexuée soit importante pour l'évolution et le maintien des espèces, elle a un coût considérable. Elle requiert de l'énergie et du temps pour trouver le partenaire adéquat, pour réaliser les trois étapes nécessaires à l'accomplissement de la reproduction sexuée, à savoir, la

réunion des gamètes, la caryogamie et la méiose, et pour fabriquer les structures qui contiendront la descendance (Lehtonen et al., 2012). La méiose a un coût énergétique supérieur à celui de la mitose notamment parce qu'il y a deux étapes de division au lieu d'une seule. Dans la nature, si un individu possède un génotype adapté à une niche écologique, la reproduction asexuée va lui permettre de la coloniser par expansion clonale et d'évincer d'éventuels compétiteurs. Cependant, en cas de fluctuations environnementales rapides, ces individus ne seraient plus adaptés au milieu et pourraient disparaître sauf s'ils réussissent à faire évoluer rapidement leur information génétique en enclenchant une reproduction sexuée (Holmström and Jensen, 2004) qui va produire une diversité de descendants parmi lesquels certains seront en mesure de faire face à la pression de sélection de leur environnement.

La reproduction sexuée est gouvernée par les gènes du type sexuel qui assure la compatibilité entre les partenaires mis en jeu. Pour certains champignons, la reproduction sexuée ne peut avoir lieu qu'entre individus possédant des allèles opposés du type sexuel : c'est l'hétérothallisme. Inversement, d'autres champignons sont considérés comme homothalliques, c'est-à-dire, que la compatibilité sexuelle ne requiert pas de différence génétique notamment car ces espèces possèdent dans leur génome les différents allèles du type sexuel. Chez les individus hétérothalliques, dès lors que les types sexuels sont compatibles la reproduction sexuée peut survenir selon deux stratégies qui sont l'autogamie (selfing ou intratetrad mating) ou l'allogamie (outcrossing) comme présenté Figure 5 (Giraud et al., 2008). Le selfing ou l'intratetrad mating ont lieu entre individus génétiquement identiques (sauf au niveau du type sexuel) mais issus d'événements méiotiques différents (Figure 5) tandis que l'outcrossing se fait entre individus génétiquement différents. Les homothalliques en plus d'être capables de faire du selfing, de l'intratetrad mating et de l'outcrossing sont également capables de se reproduire avec un individu issu du même événement méiotique (**Intra-haploid mating** dans la Figure 5) (Giraud et al., 2008).

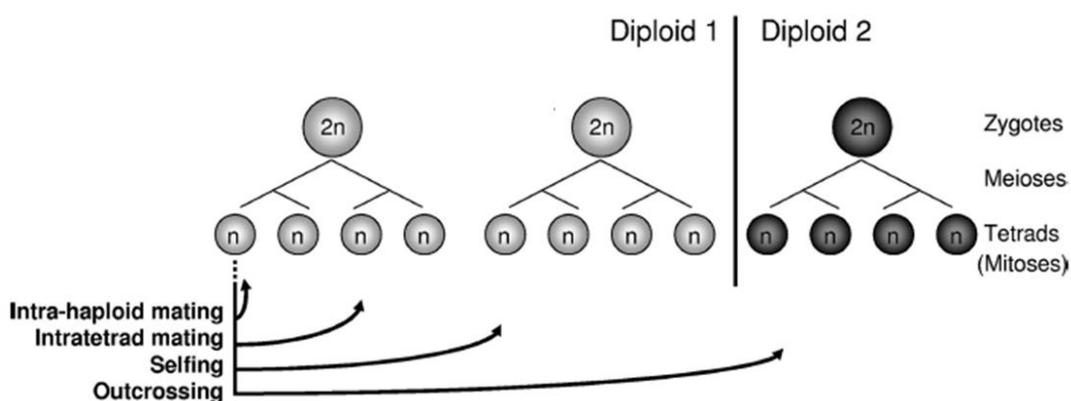


Figure 5 : Les différentes stratégies de croisements de descendants issus de la méiose de deux génotypes diploïdes
Sont représentés les produits de deux méioses. Les différents modes de reproduction sexuée sont indiqués par les flèches provenant de l'individu de l'extrémité de gauche. L'intra-haploid mating qui est caractéristique des espèces homothalliques se fait entre individus issus d'un même événement méiotique tandis que l'intratetrad mating implique les descendants de deux produits méiotiques différents au sein d'une même tétrade. Le selfing se fait entre individus de même génotype mais issus d'asque différent. L'outcrossing a lieu entre individus de génotype différent. (Giraud et al., 2008).

D'un point de vue génomique, la stratégie de reproduction choisie a un impact sur son évolution. Chez les souches asexuelles ou celles qui subissent un haut degré d'autogamie, le faible taux de recombinaison favorise l'homozygotie, l'accumulation de mutations récessives délétères et peut avoir un impact défavorable sur la valeur sélective ou fitness de l'individu (Charlesworth and Charlesworth; Keller and Waller, 2002). La théorie veut donc que les souches asexuées ou hautement autogames soient des culs-de-sac évolutifs (Takebayashi and Morrell, 2001). La stratégie d'outcrossing, quant à elle, devrait permettre d'empêcher l'extinction des espèces. En effet, l'allogamie présente tous les bénéfices que confère la reproduction sexuée, à savoir, l'élimination des mutations délétères, la création de diversité génétique, l'augmentation de la vigueur des descendants par rapport aux parents grâce à l'hétérosis... (Ingvarsson, 2001)

1.2.3.2. Reproduction sexuée : un outil d'amélioration et de génétique

La reproduction sexuée est la méthode la plus répandue pour l'amélioration des animaux et des végétaux et comme il s'agit d'un processus naturel, les descendants obtenus par ce biais ne sont pas soumis aux mêmes obligations de traçabilité que les OGM obtenus par ingénierie génétique et ils sont mieux acceptés par les utilisateurs et consommateurs. Enfin, la reproduction sexuée peut être utilisée chez les organismes pour lesquels la manipulation génétique n'est pas possible.

La découverte d'une sexualité chez certains champignons industriels tels que, *Aspergillus flavus* (Horn et al., 2009), *Aspergillus tubingensis* (Horn et al., 2013), *Penicillium chrysogenum* (Hoff et al., 2008), *Penicillium roqueforti* (Ropars et al., 2012), *Rhizopus oryzae* (Gryganskyi et al., 2010) et *T. reesei* (Seidl et al., 2009) ouvre de nouvelles possibilités en termes d'amélioration génétique de ces souches.

Ainsi, dans le cadre de l'amélioration de souches industrielles, la reproduction sexuée permettrait de croiser des souches présentant des caractères d'intérêt afin de sélectionner parmi la descendance les individus les combinant. Par exemple, une souche industrielle produisant un métabolite secondaire important mais possédant une vitesse de croissance faible pourra être croisée avec une souche produisant peu de métabolites secondaires mais présentant une forte croissance (Figure 6A). La descendance générée sera alors criblée pour sa forte production de métabolites secondaires et pour une meilleure vitesse de croissance. La reproduction sexuée comme moyen d'amélioration est déjà utilisée en routine chez la levure *S. cerevisiae* (Marullo et al., 2006; Marullo et al., 2009). La levure est sensible à l'élévation de la température au cours de la fermentation du vin rouge, ce qui peut entraîner un arrêt du processus. Le croisement entre deux souches commerciales, l'une thermosensible et l'autre thermorésistante a permis d'obtenir des souches à la fois thermorésistantes et efficaces pour la fermentation alcoolique (Marullo et al., 2009). Chez les champignons filamenteux, une amélioration

réussie des performantes a été démontrée chez *P. chrysogenum* (Böhm et al., 2013) entre la souche Q176 et IB 08/921. La souche Q176, bien que produisant un fort titre de pénicilline, fabrique un pigment jaune appelé chrysogénine. Inversement, la souche IB 08/921 sécrète très peu de pénicilline et pas de chrysogénine. Le croisement de type allogame a généré des descendants présentant diverses associations des caractéristiques parentales, dont la souche AS 1-2-54 produisant un fort titre de pénicilline et pas de chrysogénine (Böhm et al., 2013; Böhm et al., 2015). Ce croisement a permis d'améliorer la maniabilité de la souche puisque l'élimination de la chrysogénine améliore la purification de la pénicilline.

En plus de permettre la combinaison des caractéristiques parentales, la recombinaison au cours du cycle de reproduction sexuée peut générer des descendants possédant des effets bénéfiques inattendus. Ce phénomène est connu sous le nom de « ségrégation transgressive » (Rieseberg et al., 1999). Chez *A. flavus*, la reproduction sexuée a généré le descendant IC2193 qui est capable de produire quatre fois plus d'aflatoxine que la meilleure souche parentale IC278 (Olarte et al., 2012).

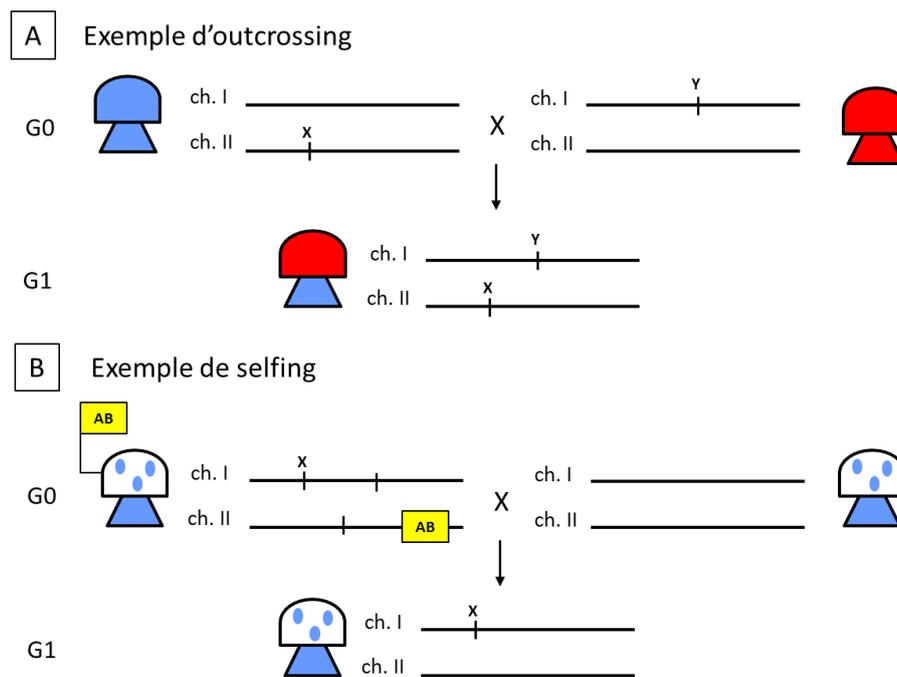


Figure 6 : Exemples d'amélioration génétique par reproduction sexuée.

Exemple d'outcrossing où le croisement entre deux souches génétiquement différentes permet de générer des descendants dont certains possèdent les caractéristiques intéressantes des parents (A). Exemple de selfing entre une souche générée par mutagenèse aléatoire et ingénierie génétique et sa souche parente. Ce croisement va permettre d'éliminer le marqueur de sélection et des mutations collatérales (B). Marqueur de sélection antibiotique (AB) par reproduction sexuée. X et Y représentent 2 mutations d'intérêts. ch. I = chromosome I ; ch. II = chromosome II ; G0 = génération zéro ; G1 = génération un.

Par ailleurs, la reproduction sexuée avec une souche sauvage permettrait d'éliminer les marqueurs de sélection et les mutations collatérales issus de l'amélioration par ingénierie génétique et les mutagenèses aléatoires à l'origine des souches industrielles (Figure 6B).

La reproduction sexuée est aussi un outil de génétique classique important. Elle permet d'identifier les bases génétiques de phénotypes d'intérêt. Ainsi, associée à de la cartographie de gènes, de l'analyse de ségrégation en mélange (Bulk Segregant Analysis : BSA) ou de l'analyse de locus de caractères quantitatifs (LCQ ou QTL), elle permet de vérifier la fonction d'un gène ou encore d'identifier des gènes d'intérêt (Ashton and Dyer, 2016). Chez le champignon *Botrytis cinerea*, la reproduction sexuée a permis d'identifier le gène responsable de la résistance aux antifongiques (Kretschmer et al., 2009). Trois souches de *B. cinerea*, respectivement MDR1, MDR2 et MDR3, présentent un phénotype de multirésistance différent. Grâce à la technique du clonage positionnel, il a été déterminé que les phénotypes observés chez les individus MDR1 et MDR2 avaient pour origine deux loci et que le croisement entre ces deux individus pouvait mener à la production d'individus MDR3 via la recombinaison génétique.

La reproduction sexuée est utile lors des études de complémentation de gènes. Lorsque des ADN recombinants porteur de mutations sont transformés et des invalidations de gènes sont faites, il faut que la souche mutée soit complétement avec le gène original afin d'en démontrer la restauration et par la même occasion confirmer la fonction du gène. Cette tâche peut être rendue difficile par l'absence de multiples marqueurs de sélection ou peut être plus longue et fastidieuse qu'un croisement. En croisant la souche invalidée avec une souche complétement avec le gène sauvage, si une corrélation peut être établie entre la présence du gène sauvage et la restauration du phénotype sauvage dans la descendance, alors l'implication du gène est confortée (Schmoll and Dattenböck, 2016).

Enfin, parfois il est nécessaire de générer des souches porteuses de multiples invalidations pour démontrer la fonction ou l'effet synergique de ces gènes. La manipulation génétique peut être utilisée mais peut poser problème si le nombre de gènes à invalider successivement est trop grand. La reproduction sexuée peut alors être une alternative : il suffit de croiser les souches complémentaires contenant les invalidations d'intérêt. La descendance obtenue est alors criblée pour identifier ceux qui possèdent la combinaison d'invalidations désirée. L'usage de la reproduction sexuée comme outil de génétique classique est appliqué avec succès chez les champignons modèles tels que *P. anserina*, *A. nidulans*, *N. crassa* (Todd et al., 2007). Elle a permis de générer chez *P. anserina* un sextuple mutant pour les facteurs de transcription à homéodomaine (Coppin et al., 2012).

Ces croisements doivent idéalement être entrepris entre souches génétiquement similaires afin de limiter les effets dus aux interactions génétiques (Ashton and Dyer, 2016). La combinaison de caractéristiques d'intérêt via la reproduction sexuée entre souches industrielles va se heurter à la difficulté de trouver des partenaires de croisement possédant des caryotypes compatibles. En effet, les traitements mutagènes sévères qui ont permis l'obtention de ces souches ont parfois généré des réarrangements chromosomiques importants. Or il a été démontré que l'hétérogénéité des

chromosomes pouvait conduire à une réduction de la viabilité de la descendance obtenue ou à une stérilité totale. Notamment des expériences de reproduction sexuée entre différents isolats géographiques de *Neurospora tetrasperma*, présentant des caryotypes différents, ont généré des croisements totalement stériles ou une descendance à la viabilité diminuée (Jacobson, 1995; Poggeler et al., 2000). Des résultats similaires ont été obtenus chez *P. chrysogenum* et chez *P. roqueforti*, confirmant que l'homogénéité des chromosomes parentaux contribue au succès de l'événement de reproduction sexuée (Ropars et al., 2016).

1.2.4. Le cycle parasexuel et la fusion de protoplastes

Le cycle parasexuel est une stratégie employée par les champignons sans cycle sexuel ou en possédant un très lent pour échanger de l'information génétique, générer de nouvelles associations alléliques et donc accroître la biodiversité. Le cycle parasexuel a été mis en évidence chez de nombreux champignons dont *A. nidulans*, *P. roqueforti*, *M. oryzae*... (Pontecorvo, 1956; Durand et al., 1992; Zeigler et al., 1997). Il consiste en trois étapes : l'hétérocaryotisation (formation d'un mycélium hétérocaryotique), la diploïdisation (fusion des noyaux) avec une recombinaison par crossing-over mitotique et enfin l'haploïdisation (formation de descendants haploïdes) (Figure 7). Le cycle parasexuel est initié par la fusion (ou anastomose) des hyphes. Ce processus naturel présente les mêmes étapes que celles qui ont lieu lorsque deux protoplastes fusionnent. La fusion des protoplastes peut avoir lieu spontanément mais est généralement induite par l'ajout de PEG et est utilisée pour obtenir des souches améliorées. La fusion de protoplastes de deux mutants auxotrophes de l'agent de bio-contrôle *Trichoderma harzianum* Rifai (ATCC 32173) peut générer des souches de type non parentale et prototrophe. Le pouvoir antagoniste de ces nouvelles souches vis-à-vis de pathogènes des sols a été testé : une des souches prototrophes a poussé plus rapidement que les souches parentales et a surpassé tous les champignons pathogènes, contrôlant ainsi efficacement la maladie fongique induite par *Rhizoctonia* (Pe'er and Chet, 1990). La fusion des protoplastes présente l'avantage de pouvoir contourner l'incompatibilité végétative (Dales and Croft, 1977) qui conduit à la destruction programmée de l'hétérocaryon formé par deux souches incompatibles (Bégueret et al., 1994).

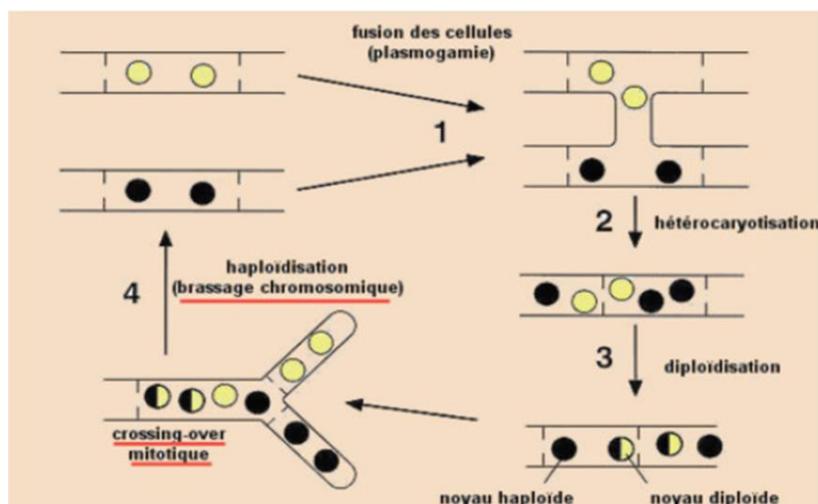


Figure 7 : Représentation schématique d'un cycle parasexuel chez un champignon filamenteux.

Deux mycéliums haploïdes fusionnent (1), puis après plasmogamie l'échange de noyaux aboutit à la formation d'un mycélium hétérocaryotique (2). Des événements de fusions entre les deux types de noyaux peuvent survenir, aboutissant alors à la formation de noyaux diploïdes hétérozygotes (3). Il s'en suit une étape de crossing-over mitotique consistant en une recombinaison intrachromosomique suivie d'une étape d'haploïdisation (4) qui conduit à la formation de plusieurs descendants haploïdes. Tiré de la thèse d'Anne Goarin, 2011.

1.3. Le champignon *Trichoderma reesei*

1.3.1. Origines, taxonomie et écologie

La première description d'un spécimen du genre *Trichoderma* remonte à 1794 (Persoon, 1794). Un lien avec leurs téléomorphes *Hypocrea* a été suggéré quelques décennies plus tard (Tulasne et al., 1861), mais il faudra attendre les années 1990, avec l'établissement de profils génétiques (PCR fingerprinting) et l'analyse de leurs ADN ribosomiaux (ITS1, ITS2, gène 5.8S) pour en avoir la confirmation (Kuhls et al., 1996). Le potentiel de ces champignons en tant que producteurs d'antibiotiques, d'antifongiques (pyridone, trichodine, pyridoxatine ; Wu et al., 2014), agents de biocontrôle (*T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. asperellum* ; Zeilinger and Omann, 2007), producteurs d'enzymes cellulolytiques (Mandels and Reese, 1957) n'a été découvert qu'au milieu du 20^e siècle. Récemment, *T. longibrachiatum* a été reconnu comme pathogène opportuniste de mammifères immunodéprimés dont les humains (Kredics et al., 2003).

Les champignons du genre *Trichoderma* font partie des saprophytes les plus communément isolés. Ils sont fréquemment retrouvés dans les sols, sur les bois en décomposition, sur d'autres champignons et sur d'innombrables autres substrats dans de nombreuses zones géographiques (aussi bien tempérées que tropicales) et systèmes écologiques, démontrant ainsi leur caractère opportuniste et leur grande adaptabilité (Druzhinina et al., 2011). De nombreuses espèces de *Trichoderma* ont été découvertes et la Sous-commission internationale de taxonomie des *Trichoderma* et *Hypocrea* (ISTH : <http://www.isth.info/biodiversity/index.php>) répertorie 104 espèces caractérisées au niveau

moléculaire qui sont réparties en cinq sections. D'un point de vue morphologique, les espèces du genre *Trichoderma* se caractérisent par leur croissance rapide, leur production abondante de conidies portées par des conidiophores embranchés et la capacité à produire des stromata (Gams and Bissett, 1998; Błaszczyk et al., 2014). Ces souches produisent des pigments allant du jaune au rouge, bien que certains spécimens incolores existent également. Les conidies peuvent également avoir une coloration variée allant de l'incolore à diverses teintes de vert voire de gris ou marron.

Trichoderma reesei (Tableau 4) est un champignon filamenteux isolé dans les Iles Salomon durant la Seconde Guerre Mondiale alors que ce dernier dégradait rapidement les équipements en coton de l'armée américaine. Face à ce problème, le corps des intendants militaires a mis en place un programme d'étude visant à identifier l'agent responsable (Mandels and Reese, 1957). C'est ainsi que fut isolée la souche QM6a (pour « quarter master » qui est un grade militaire) qui a été rattachée dans un premier temps à l'espèce des *Trichoderma viride*. En 1977, l'unique isolat naturel QM6a a été ensuite reconnu comme une espèce à part entière et a été baptisée *T. reesei* en l'honneur de son découvreur Elwyn T. Reese. Il appartient à la section *Longibrachiatum* et se caractérise par une croissance rapide, sa production abondante de conidies vertes (Figure 8A) portées par des conidiophores embranchés et sa sécrétion de pigments jaunes (Gams and Bissett, 1998). Ce champignon appartient à la classe des *Sordariomycetes* et à l'ordre des *Hypocreales*.

Tableau 4 : Classification de *T. reesei*

Règne :	<i>Fungi</i>
Embranchement :	<i>Ascomycota</i>
Sous-embranchement :	<i>Pezizomycotina</i>
Classe :	<i>Sordariomycetes</i>
Sous-classe :	<i>Hypocreomycetidae</i>
Ordre :	<i>Hypocreales</i>
Famille :	<i>Hypocreaceae</i>
Genre :	<i>Trichoderma</i>
Espèce :	<i>reesei</i>

Les champignons modèles *Neurospora crassa* et *Podospira anserina* sont des *Sordariomycetes* (mais de l'ordre des *Sordariales*) pour lesquels de nombreuses études sur la reproduction sexuée ont été menées (Figure 8B) et seront utilisés à titre comparatif tout au long de ce manuscrit.

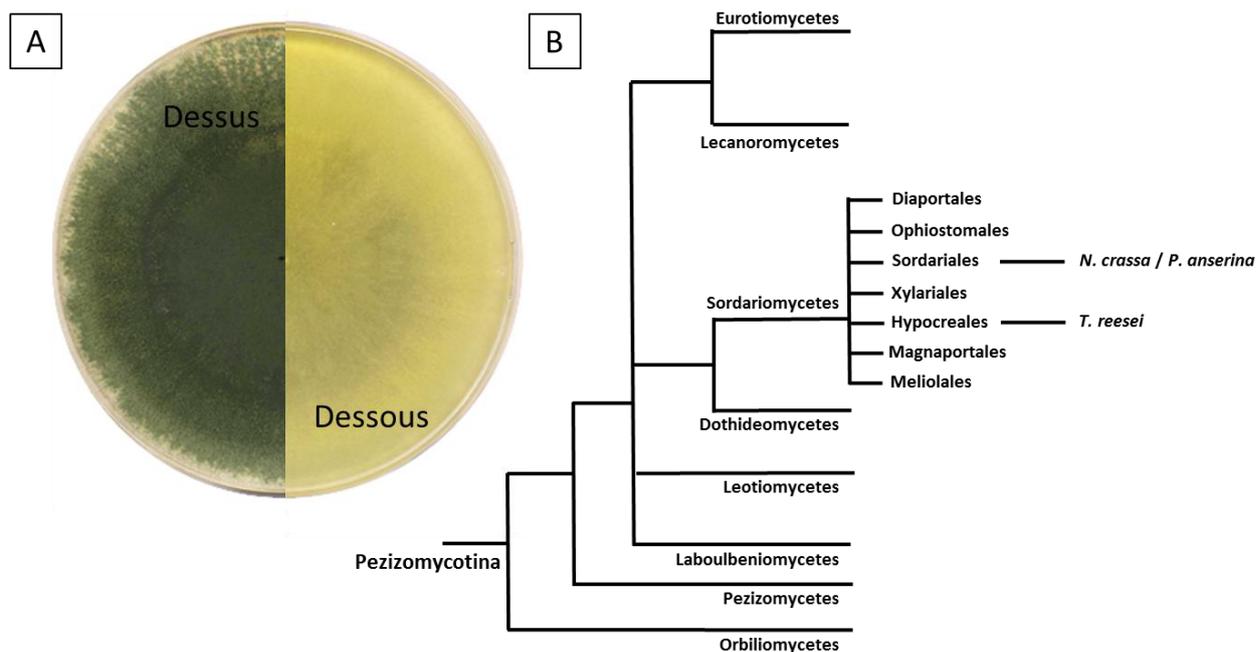


Figure 8 : *Trichoderma reesei*.

T. reesei sur milieu PDA (A). Son mycélium porte des conidies vertes en surface et sécrète un pigment jaune qui lui est caractéristique. Arbre phylogénétique des Pezizomycotina auquel appartiennent les espèces du genre *Trichoderma* (B). D'après <http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>.

1.3.2. Le champignon cellulolytique *T. reesei*

T. reesei est un outil majeur pour la production industrielle de différentes enzymes (phospholipases, protéases, amylases, cellulases) (Seiboth et al., 2011; Bischof et al., 2016) utilisées dans le traitement du papier et des pulpes (Buchert et al., 1998), dans les procédés textiles, dans des procédés agro-alimentaires (Seiboth et al., 2011) et surtout dans la production de biocarburant de deuxième génération (Kumar et al., 2008). Ce choix est motivé par des considérations technologiques et économiques liées à sa forte capacité sécrétoire, sa facilité de culture en fermenteurs industriels. L'utilisation sûre et de longue date de ce champignon, lui a valu l'attribution du statut GRAS (Generally Recognized as Safe) par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis.

T. reesei est reconnu pour son efficacité à dégrader les parois végétales et est le principal organisme producteur de cellulases utilisé par l'industrie (Kubicek et al., 2009). Le terme générique « cellulases » correspond en fait à un cocktail enzymatique contenant :

- des cellulases, dont l'action synergique des endoglucanases, exoglucanases ou cellobiohydrolases et β -glucosidases (Kubicek et al., 2009) permet d'hydrolyser la cellulose (chaîne de résidus glucoses assemblés par des liaisons glycosidiques β -1-4) qui est le polysaccharide majoritaire restant suite à l'étape de prétraitement physico-chimique de la biomasse,

- d'hémicellulases qui hydrolysent l'hémicellulose (hétéropolymère constitué de pentoses comme le xylose ou l'arabinose et d'hexoses comme le mannose, glucose ou galactose) (Kubicek et al., 2009)
- et d'enzymes auxiliaires qui hydrolysent la lignine (polymères phénoliques complexes).

Si l'on considère uniquement les cellulases, *T. reesei* produit et sécrète majoritairement deux exoglucanases (CBHI et CBHII), cinq endoglucanases (EGI, EGII, EGIII, EGVI, EGV) et deux β -glucosidases (BGLI et BGLII) (Lynd et al., 2002). À elles seules, les enzymes CBHI, CBHII, EGI et EGII dans une proportion approximative de 60 : 20 : 10 : 10, peuvent représenter jusqu'à 90 % de la quantité totale de protéines sécrétées tandis que les β -glucosidase représentent moins de 1 % (Markov et al., 2005; Herpoël-Gimbert et al., 2008; Margeot et al., 2009; Gusakov, 2011)

En 2008, le génome de la souche *T. reesei* QM6a a été séquencé par le Joint Genome Institute (JGI) (Martinez et al., 2008). Le génome de 33,4 Mb a été assemblé en 89 scaffolds et 9129 gènes ont été prédits. L'utilisation de la technique de capture de conformation de la chromatine ou Hi-C permettant de générer une matrice de contact des séquences d'ADN, associée à l'outil bioinformatique GRAAL, a permis de réassembler les scaffolds en 7 chromosomes et d'identifier ceux, riches en AT (< 67 %), qui correspondent aux centromères (Figure 9) (Marie-Nelly et al., 2014; Jourdiier et al., 2017). Le nombre de chromosomes assemblés est conforme au caryotype connu pour cette souche (Carter et al., 1992; Mantyla et al., 1992). Toutefois, ce nouvel assemblage ne comprend pas les régions télomériques et les intervalles entre les scaffolds ne sont pas comblés.

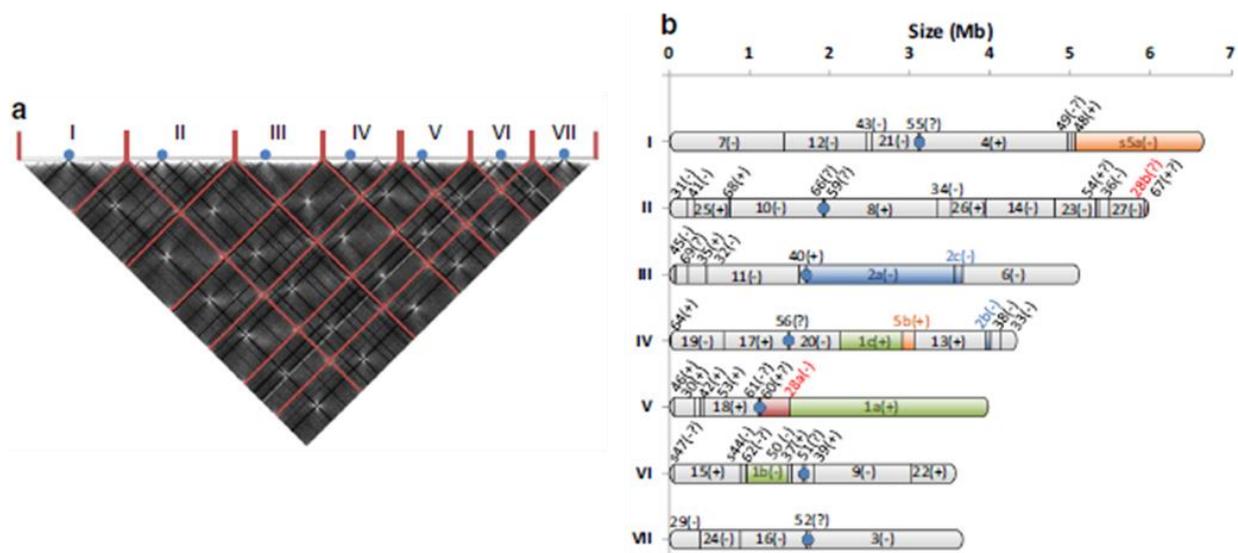


Figure 9 : Réassemblage des scaffolds de *T. reesei* en sept chromosomes.

Le génome de référence de *T. reesei* du JGI a été réassemblé à l'aide de la technique de Hi-C associée à l'outil de bioinformatique GRAAL. **a.** La matrice de contact générée par le réassemblage GRAAL : les bars rouges indiquent les limites des chromosomes et les points bleus représentent les centromères. **b.** Ordre et orientation des scaffolds réassemblés. Les incertitudes d'orientation sont notées avec un point d'interrogation. Les scaffolds 1, 2, 5 et 28 qui étaient mal assemblés dans le génome de référence sont respectivement représentés en vert, bleu, orange et rouge. Les centromères sont représentés par des losanges bleus. D'après Jourdiier et al., (2017).

Très récemment, l'association de la technologie Pacific Biosciences (PacBio) et du séquençage Illumina, par Li et al. (2017), a permis d'obtenir sept chromosomes complétés des régions télomériques et des régions entre les scaffolds. Ce nouvel assemblage révèle un génome plus grand que précédemment (34,9 Mb) avec 10 877 gènes dont 1 630 nouvellement prédits. Les 1,5 Mb de séquences nouvelles correspondent à des régions riches en AT, dont 7 centromères, 14 subtélomères et 2 329 zones riches en AT.

En 2008, le premier inventaire du répertoire d'enzymes cellulolytiques de *T. reesei* avait permis d'identifier seulement 200 séquences codantes d'enzymes cellulolytiques contre 211 en moyenne chez les autres sordariomycètes étudiés et 265 chez les *Eurotiomycetes*, faisant conclure à Martinez et al., (2008) que *T. reesei* ne possédait qu'un petit nombre de gènes cellulolytiques pour un dégradeur efficace de biomasse végétale. Une ré-annotation des gènes de cellulases sur les nouvelles versions du génome de *T. reesei* fait finalement passer ce nombre à 228 dont seulement un tiers est regroupé en cluster (Häkkinen et al., 2012). Ces gènes sont majoritairement situés dans les régions subtélomériques des chromosomes et le regroupement en cluster n'a pas d'impact sur leur expression (Druzhinina et al., 2016).

1.3.3. Les souches hyper-productrices

Bien que la souche QM6a produise des cellulases, elle ne peut pas être utilisée telle quelle en industrie pour produire un cocktail enzymatique rentable. Des campagnes d'amélioration génétique visant à augmenter la production de cellulases et basées essentiellement sur de la mutagenèse aléatoire, ont été initiées depuis les années 1970 dans différents laboratoires publics et privés. Toutes les souches utilisées de nos jours par les chercheurs et les industriels dérivent de l'isolat QM6a (Figure 10). Combinées à des cribles de sélection adéquats, ces campagnes ont généré des souches ayant une forte capacité de sécrétion (40 à 100 g/L de protéines, en fonction des souches et des protocoles de production) (Cherry and Fidantsef, 2003; Kubicek et al., 2009), des activités enzymatiques spécifiques meilleures et la capacité de produire les cellulases à partir de sucres inducteurs solubles et métabolisables (Seiboth et al., 2011).

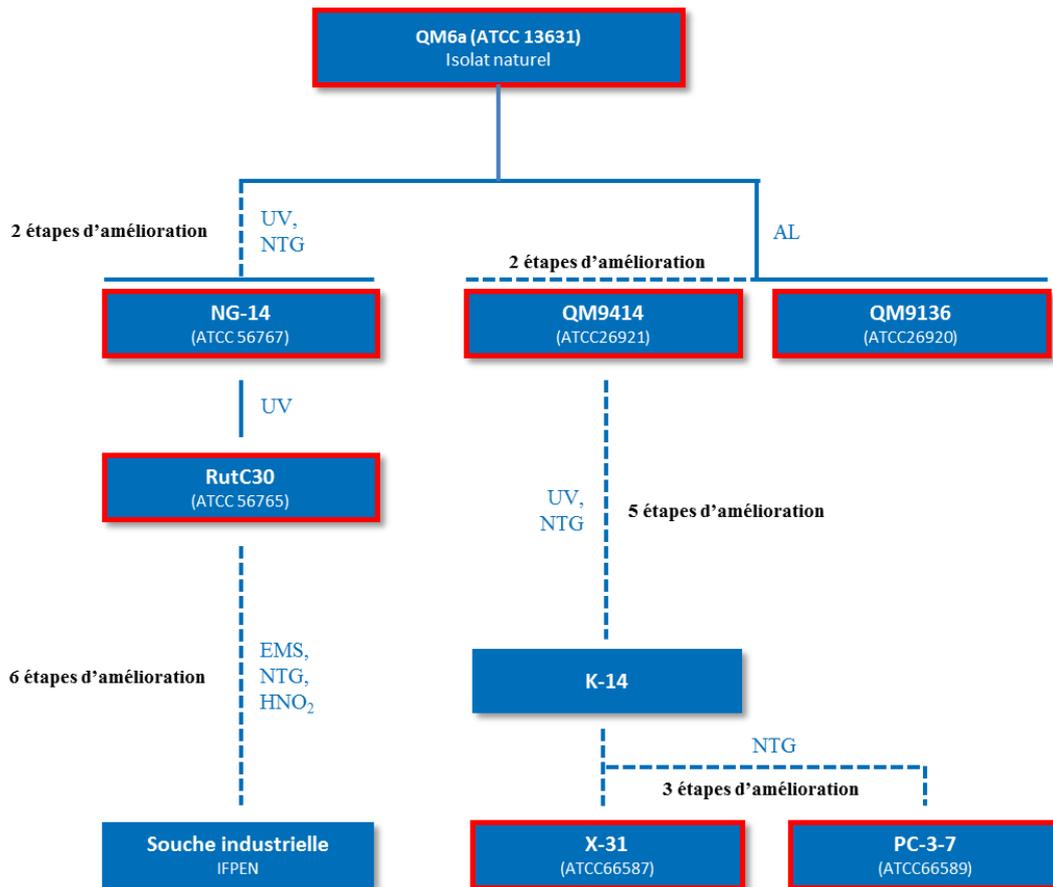


Figure 10 : Généalogie simplifiée des souches hyper-productrices dérivant de la QM6a.

Les agents mutagènes utilisés et le nombre de mutagénèses réalisées par rapport à la QM6a sont mentionnés. Les traits pleins correspondent à une seule étape d'amélioration tandis que les traits en pointillé correspondent à plusieurs étapes d'amélioration. Les souches entourées de rouge sont celles pour lesquelles un séquençage est disponible. UV : rayonnement ultra-violet ; NTG : nitrosoguanidine ; AL : accélérateur linéaire ; EMS : éthylméthylsulfonate ; HNO₂ : acide nitreux.

La première souche améliorée, QM9123, produit deux fois plus de cellulases que la souche d'origine (Mandels et al., 1971). Deux mutagénèses supplémentaires ont abouti à la souche QM9414 qui a un niveau de production quatre fois supérieure à celui de la souche QM6a (Mandels, 1975). Cette souche est souvent utilisée comme référence en recherche (Mach et al., 1995; Biely et al., 2014) et a servi de souche parentale à de nombreux programmes d'amélioration dont dérivent notamment les souches K-14, X-31 et PC-3-7 (Kawamori et al., 1985; Kawamori et al., 1986). Néanmoins, les mutations responsables du phénotype d'hyperproduction des souches QM9123 et QM9414 ne sont pas connues.

Les souches X-31 et PC3-7 ont été obtenues suite à deux tours de mutagénèse qui visaient à sélectionner des mutants résistant à la répression catabolique et dont la production de cellulases est fortement induite par du sophorose. La souche PC3-7 présenterait selon le Dr K. Tokuyasu (communication personnelle) un phénotype de faible viscosité, caractère essentiel pour une conduite de fermentation bien contrôlée.

La première tentative de mutagénèse a aussi généré le mutant QM9136 (Mandels et al., 1971) qui possède dans son génome 8 InDel et 6 SNV et qui *a contrario* ne produit plus aucune cellulase. Le déterminant de ce phénotype cellulase-négatif sera élucidé grâce au séquençage de son génome en 2015 par Lichius et al. qui a mis en évidence un InDel dans le gène *xyr1*, régulateur majeur de la production de cellulases, et dont la complémentation restaure la production de cellulases.

Au même moment, l'université Rutgers (USA) génère sa propre lignée dont le mutant le plus connu est la souche hyper-productrice de référence du domaine public, RutC30 (Peterson and Nevalainen, 2012). Elle est obtenue suite à 3 étapes de mutagénèse dont le but final était de s'affranchir de la répression catabolique. En effet, l'induction de la majorité des gènes de cellulases est forte en présence cellulose ou de ses dérivés, comme le sophorose et le lactose..., mais quasi nulle en présence de glucose (Kubicek and Penttila, 1998).

Pour ce faire, la souche QM6a exposée aux UV et soumise à un crible sélectionnant la capacité accrue à hydrolyser la cellulose a conduit à la souche M7 qui n'est plus disponible. Ensuite la souche M7 a été soumise à un traitement à la nitrosoguanidine (NTG). La souche NG14 qui présentait une capacité de sécrétion et une activité cellulase accrues, mais une répression catabolique encore trop importante a ainsi été isolée (Montenecourt and Eveleigh, 1979). L'analyse de mutations présentes dans cette souche a permis d'identifier 90 SNV, 3 InDel, 4 translocations, 2 délétions et une inversion ((Le Crom et al., 2009). La souche NG14 a subi une nouvelle mutagénèse UV et les mutants ont été criblé pour une forte activité cellulolytique et une résistance au 2-deoxyglucose (2-DG), permettant ainsi l'isolement de la souche RutC30 (Montenecourt and Eveleigh, 1979). Le 2-DG est un analogue du glucose qui est assimilé par la cellule mais non métabolisable par la voie de la glycolyse, ce qui conduit à l'inhibition de croissance des clones ayant un mécanisme de répression catabolique intact. La RutC30 sécrète deux fois plus de protéines que son parent NG14, et peut produire plus de 30 g/l de protéines en suivi un protocole de production industriel. Les recherches des deux dernières décennies ont révélé de nombreux changements génétiques dans RutC30 par rapport à QM6a dont 179 SNV, 5 InDel et 8 larges variations structurales (4 translocations, 3 délétions et une inversion). Tout d'abord, les caryotypes établis présentent des réarrangements chromosomiques avec un gain en taille des chromosomes III et VI (numérotation selon Jourdier et al., (2017)) et une diminution en taille du chromosome I (Carter et al., 1992; Mantyla et al., 1992; Vitikainen et al., 2010). À cela s'ajoute, une troncation d'environ 2,5 kb dans le gène *cre1*, régulateur clé de la répression catabolique chez les champignons, qui a été montrée par Ilmen et al., (1996). Une large région génomique d'environ 85 kb, comprenant 29 gènes codant entre autres pour des facteurs de transcription, des transporteurs et des enzymes du métabolisme primaire, a été perdue (Seidl et al., 2008). Egalement, un nombre important de mutations ponctuelles a été identifié (Vitikainen et al., 2010, Le Crom et al., 2009, Koike et al., 2013). Plus récemment, un nouveau assemblage avec la technique Hi-C (Jourdier et al., 2017) a

permis de préciser les point de cassure des larges variations structurales de reconstruire le caryotype (Figure 11).

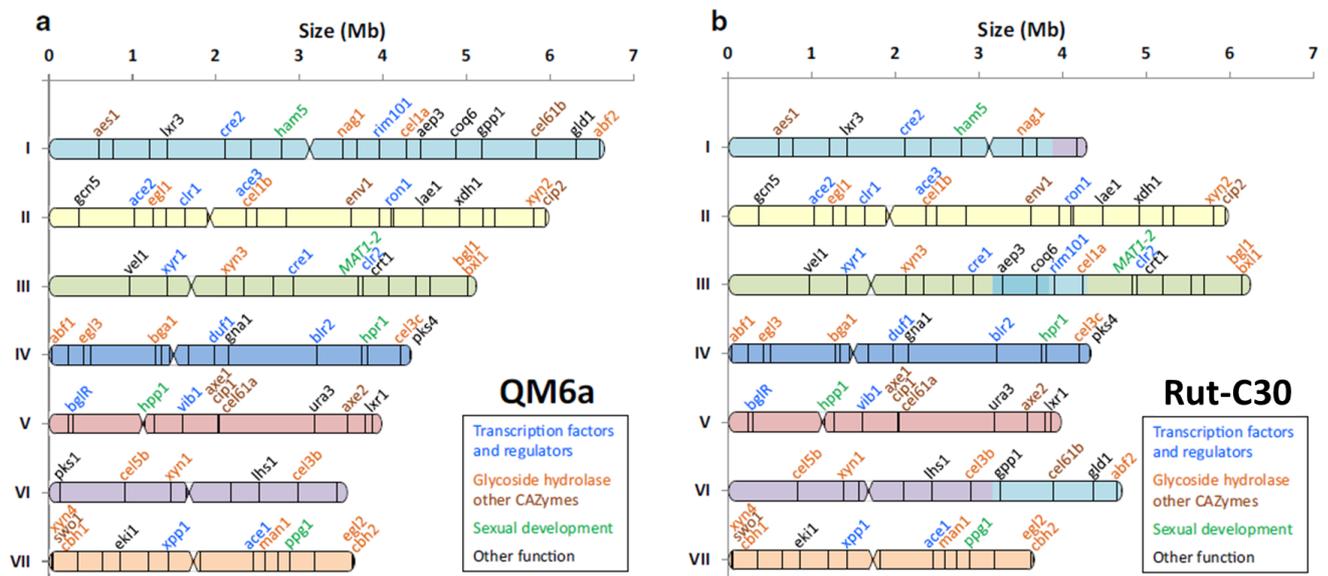


Figure 11: Réarrangements chromosomiques de la souche RutC30 par rapport à la souche QM6a.

Les cartes chromosomiques des souches QM6a (a) et RutC30 (b) ont été établies par Jourdiere et al., (2017). Le caryotype final de la RutC30 montre des changements significatifs des chromosomes I, III et VI par rapport à ceux de la QM6a. Des gènes emblématiques de *T. reesei* ont été placés le long des chromosomes pour servir de bornes de localisation. La délétion de 85kb présente sur le chromosome VI est matérialisée par l'absence du gène *pks1*. Adaptée de Jourdiere et al., (2017)

Pour toutes les souches générées par mutagenèse aléatoire, bien que les variations génétiques par rapport à l'isolat naturel QM6a soient connues il est difficile d'établir un lien formel entre mutation et phénotype à cause du grand nombre d'évènements génétiques identifiés.

Actuellement, ces souches continuent à être améliorées par des techniques de génie génétique (Cherry and Fidantsef, 2003; Percival Zhang et al., 2006) aussi bien dans la recherche publique qu'industrielle et font l'objet de nombreux brevets.

1.4. Reproduction sexuée et cycle de vie chez les souches sauvages de *T. reesei*

1.4.1. *T. reesei*, un champignon hétérothallique

La relation téléomorphe/anamorphe qui existe entre les *Hypocrea* et les *Trichoderma* est connue depuis longtemps (voir ci-dessus ; Kuhls et al., 1996) ont montré que *T. reesei* est en fait un isolat anamorphe de l'espèce *Hypocrea jecorina*. Cette espèce est très proche mais distincte de *Hypocrea schweinitzii* (Kuhls et al., 1996), une espèce considérée pendant un temps comme synonyme (Samuels

et al., 1994). Il a été décidé par la communauté scientifique que les individus *Trichoderma/Hypocrea* seraient regroupés sous le nom de *Trichoderma* (<http://www.isth.info/>). Dans la suite de ce manuscrit, afin d'en simplifier la lecture, seul le nom de *Trichoderma* sera utilisé, même si dans la littérature, l'organisme apparaît tantôt sous le nom de *Trichoderma reesei* ou d'*Hypocrea jecorina*. La souche QM6a est en fait une souche homocaryotique ne possédant qu'un seul des deux types sexuels requis pour la reproduction sexuée. Pour bien comprendre ceci, il est nécessaire de faire un court rappel sur la reproduction sexuée chez les ascomycètes filamenteux ou *Pezizomycotina*.

Les ascomycètes filamenteux sont hermaphrodites c'est-à-dire qu'ils différencient à la fois des structures mâles et femelles et peuvent respectivement donner ou recevoir un noyau (Leslie and Klein, 1996; Nieuwenhuis et al., 2011). La reproduction sexuée peut être contrôlée par deux types sexuels, *MAT1-1* et *MAT1-2*. Chez les champignons dits hétérothalliques bipolaires, la reproduction sexuée s'effectue entre individus de types sexuels compatibles *MAT1-1* et *MAT1-2* (Figure 12). Ainsi les structures femelles de la souche *MAT1-1* seront fécondées par les structures mâles de la souche *MAT1-2* ou vice-versa. En effet, pour qu'un croisement entre deux souches fonctionne, il suffit que l'une des deux souches soit femelle fertile et l'autre mâle fertile (Saleh et al., 2012).

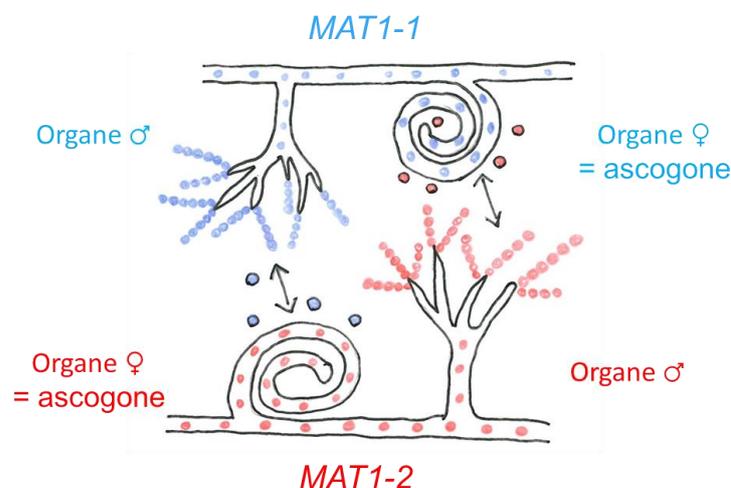


Figure 12 : Reproduction sexuée chez un champignon ascomycète filamenteux hétérothallique et hermaphrodite.

Lieckfeldt et al., (2000) ont isolé trois souches sauvages de *T. reesei* à partir de terre provenant de régions tropicales (Guyane française pour CBS999.97 et Brésil pour les deux autres souches 97-177 et 97-178). La souche CBS999.97 (nommée 97-38 dans l'article) est capable de former spontanément des fructifications dont les ascospores produits montrent une ségrégation bipolaire des types sexuels (50 % *MAT1-1* et 50 % *MAT1-2*) prouvant que *T. reesei* est un champignon hétérothallique. La souche CBS999.97 est donc hétérocaryotique et possède les deux types sexuels. Quant aux deux autres souches 97-177 et 97-178, elles sont incapables de former des fructifications spontanées ou par

confrontation l'une avec l'autre, suggérant qu'elles sont homocaryotiques et du même type sexuel. En revanche, elles forment des fructifications en confrontation avec la souche CBS999.97.

L'analyse de plus de vingt isolats sauvages de *T. reesei* issus de diverses zones géographiques montre que les deux types sexuels sont répartis équitablement (Seidl et al., 2009). Ce résultat est en adéquation avec ce qui est observé chez les champignons hétérothalliques (Dyer et al., 2016). Lorsque certains de ces isolats géographiques sont croisés avec les ascospores *MATI-1* et *MATI-2* issues de la souche CBS999.97 et isolées par Chuang et al., 2015, des fructifications sont obtenues. Mais de façon surprenante, ces différents isolats géographiques ne sont pas capables de se croiser entre eux (Chuang et al., 2015).

Le croisement entre souches sauvages CBS999.97 *MATI-1* et CBS999.97 *MATI-2* de *T. reesei* produit des stromata (Figure 13A et B). Ces structures macroscopiques (3-4 mm à 2 cm) constituées d'hyphe condensés et pigmentés en surface, regroupent sous leur surface des périthèces (Figure 13C et D) contenant la progéniture qui se présente sous forme d'asques. Les asques contiennent 16 ascospores uninucléées et non mélanisées (Figure 13E à G) (Seidl et al., 2009). Leur morphogénèse est décrite plus loin dans ce manuscrit.

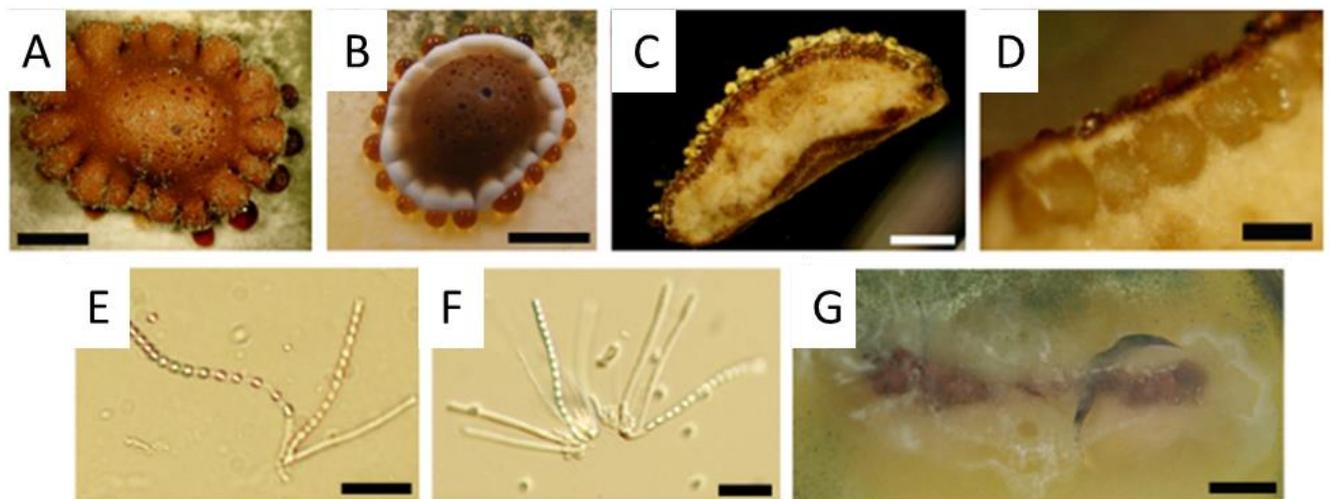


Figure 13 : Morphologie des fructifications et des ascospores de *T. reesei*.

Les stromata (A-B) présentent des périthèces qui sont enchâssés sous leur surface (C-D). Ils contiennent des asques à 16 ascospores (E-F) qui sont éjectés hors du périthèce et forment un halo blanchâtre sur les couvercles de boîtes de Petri (G). Échelle : 2 mm (A, B, C) ; 0,5 mm (D) ; 30 μ m (E, F) ; 1 cm (G). Adapté de Seidl et al., 2009.

La dissection des asques de croisements entre CBS999.97 *MATI-1* et CBS999.97 *MATI-2* ou QM6a pour comprendre comment les gènes ségrégent dans la descendance ont mis en évidence que la souche CBS999.97 *MATI-1* a un patrimoine génétique significativement différent de celui de la CBS999.97 *MATI-2* (Chuang et al., 2015). Les souches ont alors été renommées CBS999.97

MAT1-1re (*re* pour *recombinant*) et CBS999.97 *MAT1-2wt* (*wt* pour *wild type*) pour indiquer le réarrangement chromosomique présent dans la souche CBS999.97 *MAT1-1re* mais absent de CBS999.97 *MAT1-2wt*, de la souche QM6a et des autres souches sauvages de *T. reesei* analysées. L'analyse détaillée (séquençage, nombre de copies de gènes) de la descendance montre qu'en présence d'hétérozygotie de séquence, la méiose génère de l'aneuploïdie segmentale qui peut être positive (i.e. augmentation de la production d'hémicellulases) ou négative (ascospores non viables). Par exemple, l'augmentation de la production d'hémicellulases dans certains descendants aneuploïdes est due au fait que l'un des clusters de gènes de cellulases se trouve être en deux copies au lieu d'une seule dans le génome (Chuang et al., 2015).

Comme la découverte de la reproduction sexuée est relativement récente chez *T. reesei* et qu'elle n'a pas encore été exhaustivement étudiée, il est supposé que son cycle sexuel (Figure 14) ressemble à celui des autres *Pezizomycotina*, dont *P. anserina*, au moins sur les étapes les plus importantes. Toutefois il est possible que certaines étapes décrites ci-dessous soient très différentes chez *T. reesei*. Le cycle sexuel implique une alternance entre phases haploïde et diploïde ponctuées par la caryogamie et la méiose à l'origine de nouvelles combinaisons génétiques (Peraza-Reyes and Berteaux-Lecellier, 2013). La reproduction sexuée a lieu à l'intérieur de fructifications pluricellulaires qui sont constituées de tissu sexuel (hyméniums) entourés d'une enveloppe protectrice (Peraza-Reyes and Berteaux-Lecellier, 2013).

Le cycle sexuel de *T. reesei* débute avec la libération d'ascospores (« ascospore discharge », Figure 14), de chacun des deux types sexuels, qui en germant vont être à l'origine d'un mycélium capable, dans des conditions favorables, de différencier les organes mâle (conidiophores) et femelle (que nous supposons être des ascogones ; ascogonium, Figure 14). *T. reesei* étant un champignon hétérothallique bipolaire, la fertilisation n'a lieu qu'entre gamètes mâle et femelle de types sexuels opposés (Coppin et al., 1997). La reconnaissance entre les structures de reproduction compatibles fait intervenir le système phéromone/récepteur (description au Chapitre 1.4.3) qui guide la fusion du gamète male avec le gamète femelle et déclenche la différenciation des stromata.

Il n'existe aucune indication concernant les événements ayant lieu dans les stromata de *T. reesei* mais les étapes qui s'y déroulent sont probablement les mêmes que chez les autres ascomycètes comme *P. anserina* (Peraza-Reyes and Malagnac, 2016). Chez cette espèce, les noyaux parentaux ne fusionnent pas immédiatement mais se divisent pour former dans un premier temps un syncytium (Coppin et al., 1997). Les noyaux nouvellement divisés migrent par paires de types sexuels opposés pour former un hyphe spécialisé en forme de crochet (crozier formation, Figure 14) composé de trois cellules : une cellule apicale binucléée et deux cellules basales uninucléées. La caryogamie a alors lieu dans la cellule apicale qui va s'allonger pour donner l'asque final. Les deux cellules basales fusionnent

et se divisent pour donner un nouveau syncytium et une nouvelle cellule en forme de crochet (Peraza-Reyes and Berteaux-Lecellier, 2013). Ce mécanisme, appelé la propagation de l'état dicaryotique, est à l'origine de la présence de nombreux asques dans un même périthèce. Dans l'asque, le dicaryon subit alors la méiose et une mitose post méiotique qui va aboutir à la formation de 8 noyaux qui sont empaquetés deux par deux dans des ascospores pour former des asques avec quatre ascospores. Chez *T. reesei*, le dicaryon subit la méiose et deux mitoses post méiotiques qui vont aboutir à la formation de 16 ascospores uninucléés (Chuang et al., 2015). Le cycle sexuel s'achève alors avec l'expulsion des ascospores matures.

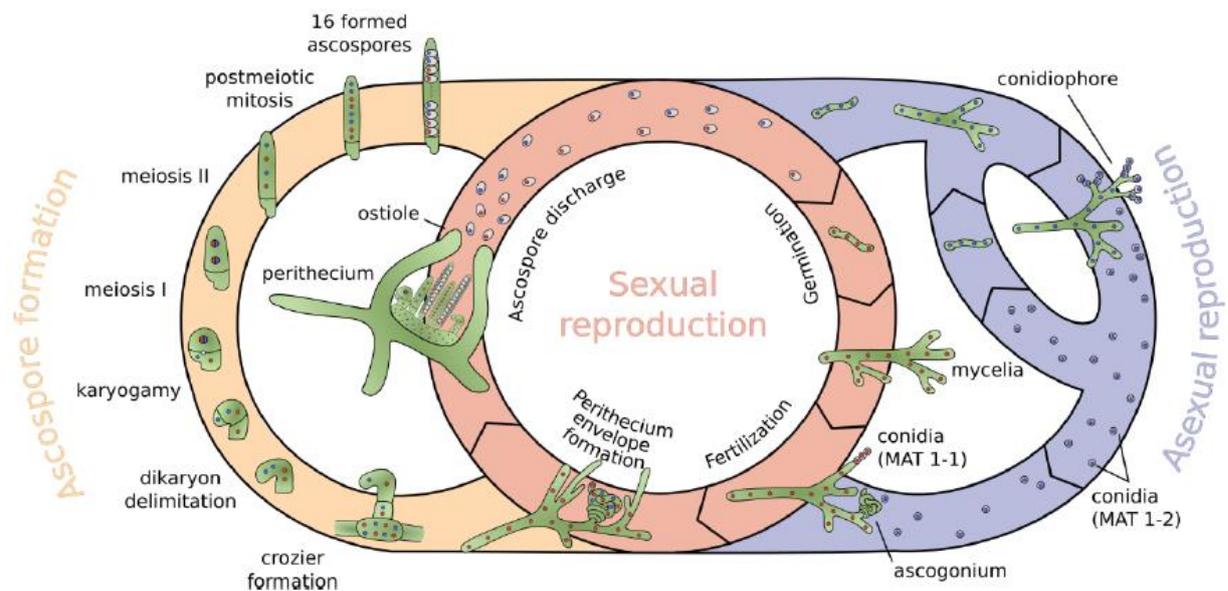


Figure 14 : Cycle de vie théorique de *T. reesei* combinant un cycle sexué et un cycle asexué.

Le cycle de vie débute par la germination d'ascospores et la formation de mycéliums de types sexuels opposés. Le mycélium peut amorcer une reproduction asexuée (en bleu) et produire des conidies asexuées capables de germer et de former un nouveau mycélium. Il peut aussi amorcer une reproduction sexué (en rouge) au cours de laquelle des ascogones seront différenciés, fertilisés par les conidies et transformés en périthèces au sein desquels (en jaune) aura lieu la caryogamie, les méioses et les mitoses successives conduisant à la production de 16 ascospores uninucléés. Le cycle de reproduction est inspiré du cycle de vie du champignon ascomycète *P. anserina*. Tiré de la thèse de Dante Parodi, (2014).

1.4.2. Les types sexuels

Chez les champignons hétérothalliques bipolaires comme *T. reesei*, la reproduction sexué ne peut avoir lieu qu'entre partenaires de types sexuels compatibles. Les types sexuels sont déterminés par les deux allèles ou idiomorphes *MAT1-1* et *MAT1-2* présents au locus MAT (Figure 15) sur le chromosome III (Figure 11). Ces idiomorphes correspondent à des séquences génomiques différentes contenant un ou plusieurs gènes (Debuchy and Turgeon, 2006). Ce système bipolaire est aussi présent chez les levures *S. cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* chez qui il a été largement étudié. Les types sexuels codent des facteurs de transcription (matTFs) qui sont impliqués dans la régulation de l'expression des gènes phéromone/récepteur, et agissent sur la caryogamie et la méiose (Coppin et al., 1997).

La souche *T. reesei* QM6a porte l'idiomorphe *MATI-2*, d'une taille de 4,3 kb et composé du gène unique *MATI-2-1* (ID 124341) codant pour une protéine à domaine HMG (Seidl et al., 2009). La structure de l'idiomorphe *MATI-1* (GenBank accession no. FJ599756) a été déterminée à partir de descendants de type sexuel *MATI-1* de la souche sauvage CBS999.97. L'idiomorphe *MATI-1* a une taille de 5,5 kb et se compose des trois gènes qui par analogie avec d'autres ascomycètes hétérothalliques bipolaires sont les gènes *MATI-1-1*, *MATI-1-2* et *MATI-1-3* codant respectivement pour une protéine de la famille MAT α -HMG, une protéine à domaine PF17043 et une protéine de la famille MATA-HMG (Seidl et al., 2009). Par ailleurs, il est intéressant de noter que 486 bp (paire de bases) de la partie 3' du gène *MATI-1-1* sont présents dans les deux idiomorphes mais inactifs chez la souche *MATI-2* (Seidl et al., 2009). Les données de RNAseq dont nous disposons au laboratoire montrent cependant qu'il sont transcrits (Poggi-Parodi et al., 2014). Ce gène tronqué a également été retrouvé chez les membres du genre *Grosmania* et *Ophiostoma* (Tsui et al., 2013). Une recombinaison inégale entre les loci MAT lors de l'appariement des chromosomes est l'événement le plus probable à l'origine de la présence du morceau du gène *MATI-1-1* dans le locus *MATI-2*. Dans un premier temps le gène *MATI-1-1* aurait été intégré par recombinaison dans le locus *MATI-2* puis au cours du temps, il aurait dégénéré puis aurait été inactivé ; enfin une partie aurait été perdue (Tsui et al., 2013). A l'exception de cette particularité, l'organisation des idiomorphes est similaire à celle observée chez les champignons modèles *N. crassa* et *P. anserina*. Ainsi, l'idiomorphe *MATI-1* de *T. reesei* est l'homologue des idiomorphes **A** de *N. crassa* et **mat-** de *P. anserina*, tandis que l'idiomorphe *MATI-2* de *T. reesei* est l'homologue des idiomorphes **a** de *N. crassa* et **mat+** de *P. anserina* (Coppin et al., 1997).

Les gènes situés de part et d'autre du locus MAT sont très conservés chez les ascomycètes. Il s'agit des gènes *APN2*, qui code pour une DNA lyase, et *SLA2* qui code pour un facteur contrôlant l'assemblage du cytosquelette (Kück and Böhm, 2013). Chez *T. reesei*, le gène *APN2* (Trire2 : 59147) est bien présent mais l'orthologue de *SLA2* est remplacé par un gène codant pour une protéine de fonction inconnue (Trire2 : 76930) (Seidl et al., 2009). Chez *T. atroviride* et *T. virens*, ce même gène ainsi que la même organisation des loci MAT sont retrouvés (Seidl et al., 2009).

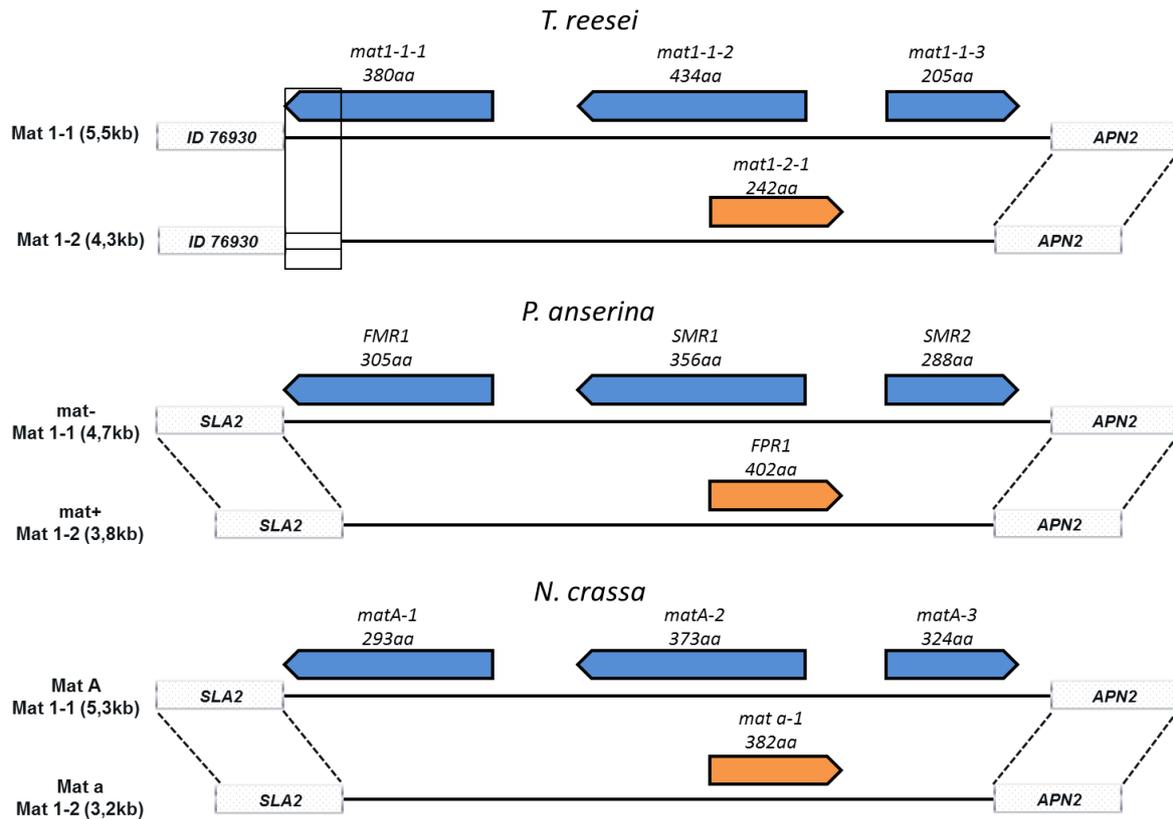


Figure 15 : Idiormorphes du locus MAT chez *T. reesei*, *P. anserina* et *N. crassa*.

Le locus *MATI-1* contient trois gènes, et le locus *MATI-2* en contient qu'un seul. La boîte blanche à gauche du locus *MATI-2* de *T. reesei* correspond aux 437 aa présents chez les deux idiormorphes mais inactifs dans le locus *MATI-2*. Adapté de Coppin et al., 1997; Seidl et al., 2009.

L'invalidation du locus MAT chez *P. anserina* (Coppin et al., 1993) et *N. crassa* (Ferreira et al., 1998) entraîne une absence complète de reproduction sexuée, même si des structures reproductives mâle et femelle sont produites. Les gènes *FMR1* ou *MATI-1-1* et *FPR1* ou *MATI-2-1* sont requis lors de la fertilisation qu'ils régulent, et sont impliqués tout comme *SMR2* ou *MATI-1-3* dans la reconnaissance intercellulaire (entre partenaires compatibles) (Figure 16) (Arnaise et al., 2001a). Quant au gène *SMR1* ou *MATI-1-2* sa fonction est inconnue mais c'est un gène conservé chez les *Sordariomycetes* (Debuchy and Turgeon, 2006).

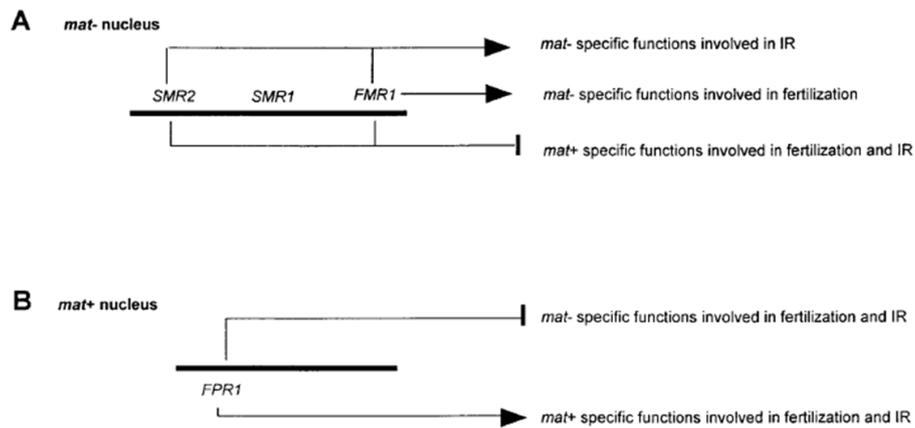


Figure 16 : Rôle des gènes des loci MAT dans la reproduction sexuée.

Le rôle de régulation de la fécondation et de la reconnaissance internucléaire (IR) par les gènes *FMR1*, *SMR1*, *SMR2* et *FPR1*. L'activation est représentée par une flèche tandis que la répression est représentée par une barre (Arnaise et al., 2001a).

Outre des actions sur la reproduction sexuée, des études transcriptomiques ont mis en évidence que l'action des matTFs s'exerce aussi dans le contrôle de nombreux processus biologiques n'ayant pas de lien direct avec la reproduction sexuée comme par exemple le métabolisme général, la morphologie ou le métabolisme secondaire (Coppin et al., 1997; Kück and Böhm, 2013; Dyer and Kück, 2017). Chez *P. anserina*, 157 gènes sont régulés par les gènes des types sexuels parmi lesquels des gènes directement impliqués dans la reproduction sexuée mais aussi des gènes du métabolisme primaire et secondaire (Bidard et al., 2011). Une des hypothèses pour expliquer ce grand nombre de gènes est la nécessité de mobiliser l'énergie et les ressources nécessaires au développement des périthèces. Chez *Penicillium chrysogenum*, 254 gènes sont sous le contrôle direct du facteur de transcription à α -domaine *MATI-1-1*, parmi lesquels des gènes impliqués dans la reproduction sexuée mais aussi des gènes du développement asexué, de la morphogénèse, du métabolisme des acides-aminés, du fer et du métabolisme secondaire (Becker et al., 2015). Parallèlement, il a été démontré que le facteur de transcription à domaine HMG *MATI-2* avait en plus d'un rôle dans la reproduction sexuée, un impact sur des processus développementaux tels que la sporulation, la germination des conidiospores et leur propriété de surface (Böhm et al., 2015). Enfin, il est bien connu chez *N. crassa*, que les loci du type sexuel contrôlent également l'incompatibilité végétative (Coppin et al., 1993; Saube, 2000).

À ce jour, chez *T. reesei*, aucune étude n'a été réalisée quant au rôle exact des gènes *mat* dans la reproduction sexuée et sur d'autres processus. Il est cependant fort probable que ces gènes soient, à l'image des autres champignons filamenteux, surtout impliqués dans la reproduction sexuée mais également possiblement dans le développement asexué, le métabolisme secondaire et la morphogénèse.

1.4.3. Le système phéromone récepteur

Une des premières étapes de la reproduction sexuée est la détection de la présence du partenaire de type sexuel compatible. Chez les levures et les champignons filamenteux, cette reconnaissance du partenaire s'appuie sur le système phéromones/récepteurs et va conduire à la fusion des gamètes de type sexuel opposé.

Les phéromones sont des petites molécules diffusibles ou « signal » chimique (Figure 17) qui peuvent diffuser dans le milieu et qui sont perçues par des récepteurs spécifiques (Figure 17). La levure de type sexuel **a** va produire les phéromones bleues qui seront senties par les cellules **α** grâce à leur récepteur bleu tandis que les levures de type sexuel **α** vont produire des phéromones rouges qui seront senties par les récepteurs des cellules **a**. La production de ces molécules dépend du type sexuel (Merlini et al., 2013).

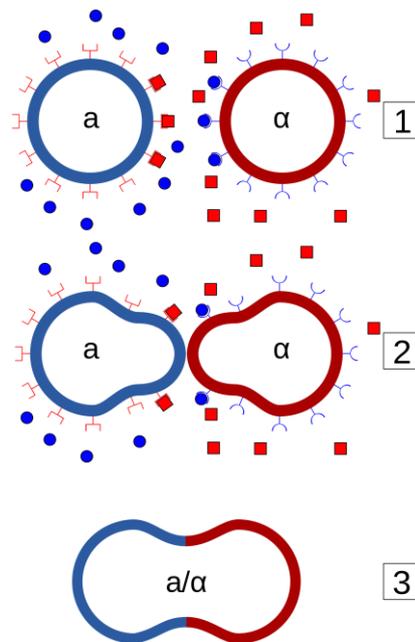


Figure 17 : Le système phéromone/récepteur chez les levures.

Lors de la reproduction sexuée entre deux levures haploïdes compatibles, celles-ci émettent des phéromones (rond bleu ou carré rouge) (1) qui sont reconnues par des récepteurs ancrés à leur surface (bleu ou rouge) (2). La perception des phéromones entraîne un rapprochement des partenaires (2) qui finissent par fusionner pour former une cellule diploïde (3).
Source : https://en.wikipedia.org/wiki/Mating_of_veast

Chez les champignons, deux types de phéromones existent : les **phéromones-a** et les **phéromones-α** (Schmoll et al., 2010). *P. anserina*, possède deux gènes codant pour les précurseurs de phéromones mfm et mfp (Figure 18). La phéromone mfm (*mating facteur minus*) est une **phéromone-α** de 13 acides aminés qui résulte du traitement d'une molécule précurseur se composant de plusieurs répétitions du peptide **α** bordées par des sites d'action de la protéase Kex2 tandis que la phéromone mfp (*mating facteur plus*) est un polypeptide de 24 acides aminés qui se termine par un

motif CAAX similaire à la phéromone hydrophobe **a** de *S. cerevisiae* (Coppin et al., 2005). Pour être actives, ces pré-phéromones doivent subir plusieurs étapes de maturation. Chez *N. crassa*, la phéromone de **type-a** est connue sous le nom de mfa-1 et la phéromone de type- α est connue sous le nom de ccg-4 (Figure 18) (Bobrowicz et al., 2002). Chez tous les ascomycètes, les phéromones sont essentielles pour la fertilité mâle car si les gènes les codant sont invalidés, il n'y plus d'attraction du trichogyne par le gamète male (Bistis, 1983; Coppin et al., 2005). Chez *N. crassa* et *P. anserina*, la transcription des gènes de précurseurs de phéromones est mating-type dépendante. Leurs gènes sont transcrits de façon basale pendant la croissance mais dès que le mycélium entre en phase stationnaire et devient sexuellement compétent, le niveau de transcrits augmente drastiquement chez *P. anserina* (Debuchy and Turgeon, 2006) et chez *N. crassa* (Bobrowicz et al., 2002).

Chez *T. reesei*, un peptide **phéromone- α** , nommé **ppg1** présente les mêmes caractéristiques que ses homologues chez les autres champignons (Schmoll et al., 2010). Bien qu'aucun gène codant pour un peptide **phéromone-a** n'ait été trouvé dans le génome de *T. reesei*, il a été montré que le peptide phéromone **hpp1** assume cette fonction (Schmoll et al., 2010). Il est appelé **phéromone-h** (type-hybride) et possède les caractéristiques des deux types de phéromones précédemment décrites : 3 domaines CAAX en C-terminal et deux sites Kex2 qui ne semblent pas fonctionner.

La transcription des gènes des précurseurs *ppg1* et *hpp1* n'est pas claire car les deux seules études à ce sujet sont contradictoires (Schmoll et al., 2010; Seibel et al., 2012b). L'analyse de l'expression de *ppg1* et *hpp1* par quantification des ARN par Northern Blot mené par Schmoll et al., (2010) montre que leur expression est indépendante du type sexuel tandis que l'étude par PCR quantitative de Seibel et al., (2012b) indique que l'expression de *ppg1* est dépendante du type sexuel *MATI-1* et que celle de *hpp1* dépend du type sexuel *MATI-2*. Les données transcriptomiques dont nous disposons au laboratoire et qui portent uniquement sur des souches *MATI-2* montrent que *ppg1* n'est pas exprimé dans ces souches quelle que soit la condition testée. Bien sûr, ces données devraient être confirmées par une étude dédiée. Dans les études menées par Schmoll et al., (2010) et Seibel et al., (2012b), *hpp1* et *ppg1* sont exprimés à plusieurs stades de la reproduction sexuée, depuis le contact entre les souches compatibles jusqu'à l'apparition des fructifications. La localisation génomique de HPP1 est différente de celle des gènes de **phéromones-a**, qui est conservée chez de nombreux *Sordariomycetes*. En revanche, chez les espèces proches de *T. reesei*, *T. atroviride* et *T. virens*, le locus HPP1 est synténique (Schmoll et al., 2010).

Des récepteurs de phéromones, à la surface des cellules, vont permettre de « sentir » le signal chimique émis par le partenaire compatible et activer les voies de signalisation en aval. Chez les ascomycètes hétérothalliques, il existe deux types de récepteurs, associés chacun à un type sexuel. Ainsi chez *P. anserina* et *N. crassa*, les récepteurs PaPRE2 et NcPRE2 perçoivent les **phéromones- α** tandis que les récepteurs PaPRE1 et NcPRE1 perçoivent les **phéromones-a** (Figure 18). Les gènes des

récepteurs sont également transcrits de façon mating-type dépendante chez *P. anserina* mais pas chez *N. crassa* (Debuchy et al., 2010a). Ces récepteurs appartiennent à la famille des protéines transmembranaires couplées aux protéines G, également appelées protéines à 7 domaines transmembranaires. L'invalidation des gènes de récepteurs dans *N. crassa* et *P. anserina* conduit à une stérilité femelle (Bidard et al., 2011; Kim et al., 2012).

T. reesei possède deux récepteurs couplés aux protéines G (Figure 18) : HPR1 perçoit les **phéromones-h** (*MAT1-2*) et est associé au type sexuel *MAT1-1* et HPR2 perçoit les **phéromones- α** (*MAT1-1*) et est associé au type sexuel *MAT1-2*. Ces récepteurs sont importants pour la fertilité femelle. Pour que le développement sexué puisse avoir lieu, une paire fonctionnelle de phéromone et récepteur, HPP1-HPR1 ou PPG1-HPR2, est nécessaire (Seibel et al., 2012b). Par ailleurs, il a été montré que les récepteurs jouaient un rôle dans les événements de post-fertilisation comme la genèse des ascospores (Seibel et al., 2012b). Les quatre gènes de précurseurs de phéromones et de récepteurs sont transcrits dans les souches de chacun des deux types sexuels. Cependant leur niveau d'expression est augmenté dans le type sexuel correspondant (Seibel et al., 2012b).

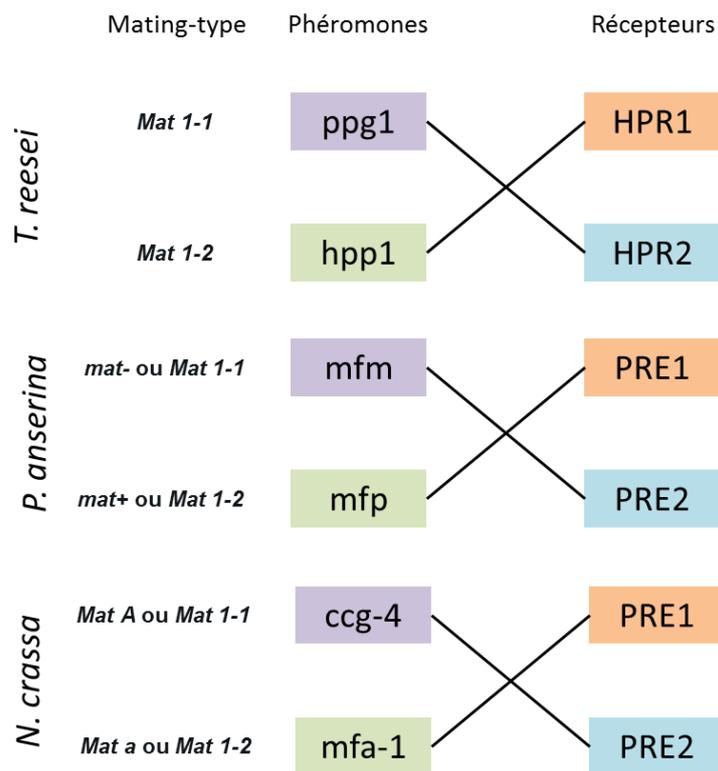


Figure 18 : Le système phéromone/récepteur mating-type dépendant chez *T. reesei*, *P. anserina* et *N. crassa*. En violet, les phéromones du type- α ; en vert, les phéromones du type-a ; en orange, les récepteurs de type-a et en bleu, les récepteurs de type- α . Les lignes pleines permettent d'associer la phéromone avec son récepteur.

1.4.4. Développement des périthèces

Suite à l'attraction entre des différents partenaires, la fabrication des fructifications est initiée. Il n'existe aucune étude sur la morphogénèse des stromata et des périthèces dans *T. reesei*. Les seules données existantes sur le genre *Hypocrea* portent sur *H. gelatinosa* (Vincens, 1917) et *H. schweinitzii* (Hanlin, 1965). D'un point de vue phylogénétique, *H. gelatinosa* appartient au clade *Harzianum* tandis que *T. reesei/H. jecorina* appartient au clade *Longibrachiatum* (Druzhinina et al., 2006). *H. schweinitzii* dont l'anamorphe est *T. citrinoviride* est très proche de *T. reesei/H. jecorina* puisque leurs séquences ITS1 ne diffèrent que par seulement 5pb (soit 2,2 %) (Kuhls et al., 1996).

Les fructifications, chez *H. gelatinosa* et *H. schweintzii*, sont des stromata charnus (Figure 19A ; Figure 20A) qui englobent sous leur surface des périthèces dont les ostioles dépassent, et qui deviennent spongieux en vieillissant. Ils se présentent isolés ou parfois soudés les uns aux autres en un amas difforme.

Chez *H. gelatinosa* (Vincens, 1917), le développement des périthèces débute avec l'apparition sur le mycélium d'ébauches de stromata qui sont le résultat d'amas de mycélium grêles et condensés. À mesure que le stromata mûrit, le mycélium devient compact et forme une croûte qui est d'abord blanche puis prend une teinte marron. Au plus jeune stade où le stromata d'*H. gelatinosa* a pu être coupé, deux hyphes, plus épais que les cellules avoisinantes, sont observés sous sa surface dont l'un s'enroule autour de l'extrémité de l'autre (Figure 19B). De façon similaire, chez *H. schweinitzii*, un hyphe recroquevillé, septé et uninucléé qui est plus épais que ceux environnant et qui ressemble à un initial d'ascogone est observé (Figure 20B).

Une anastomose se fait entre les deux hyphes épais de *H. gelatinosa*, et le noyau de l'hyphe donneur passe dans l'hyphe receveur et la cellule receveuse se multiplie activement (Figure 19C). C'est également ce qui est observé chez *H. schweinitzii* (Figure 20C), même si aucune fusion entre les hyphes donneur et receveur n'a pu être mise en évidence par Hanlin (1965).

Les cellules entourant la cellule multinucléée prolifèrent pour former une assise de cellules concentriques qui sont à l'origine de l'enveloppe externe du périthèce. Si selon Vincens (1917) ces cellules sont d'origine stromatique (Figure 19D), aucune précision n'est donnée par Hanlin (1965) quant à leur origine (Figure 20C, D).

Parallèlement, la cellule receveuse multinucléée des deux espèces décrites se multiplie activement pour former un groupe de cellules plectenchymateuses volumineuses. Chez *H. gelatinosa* les cellules centrales s'écartent les unes des autres pour laisser place à une cavité (Figure 19E). Se faisant, les

cellules les plus périphériques sont comprimées contre les cellules de l'enveloppe et s'aplatissent verticalement pour former la paroi interne du périthèce. Chez *H. schweinitzii*, la taille du périthèce augmente et les cellules les plus internes de la cavité périthéciale croissent de quelques microns vers le centre la cavité (Figure 20E).

Les cellules plectenchymateuses apicales sont différenciées en paraphyses tandis que les cellules basales sont différenciées en pseudoparenchyme et pseudohyménium (Figure 20F) chez *H. schweinitzii*. De la même façon, les cellules plectenchymateuses de *H. gelatinosa* se spécialisent mais l'auteur ne fait pas de distinction en fonction de leur origine et les considère toutes comme étant des paraphyses.

Chez *H. gelatinosa*, aucun détail n'est donné sur la formation de l'hyménium qui apparaît selon Vincens (1917) suite à la résorption des paraphyses et qui va être à l'origine d'asques depuis le centre de la cavité vers les parties latérales et presque jusqu'à la voûte (Figure 19F, G). La genèse des ascospores n'a pas pu être observée chez *H. gelatinosa*, mais celles obtenues sont ovales, allongées, hyalines et sont éjectées du périthèce à peu près simultanément et de façon rapide. Chez *H. schweinitzii*, c'est la propagation de la cellule receveuse multinucléée qui est à l'origine d'une couche de cellules ascogènes à la base du périthèce (Figure 20G). Au fur et à mesure que les asques croissent vers le haut et se mêlent aux paraphyses, ces dernières se désintègrent (Figure 20I, H). Les cellules ascogènes multinucléées se divisent en plusieurs cellules dans lesquelles migrent deux noyaux (Figure 20J). Les cellules binucléées forment un crochet qui s'allonge pour donner l'asque (Figure 20K) dans lequel les deux noyaux fusionnent. La caryogamie est suivie d'une méiose puis d'une mitose donnant naissance à 8 noyaux qui sont encapsulés et qui se divisent à nouveau. Les noyaux mère et fille migrent chacun à une extrémité de la spore et un septum se forme pour donner deux cellules accolées. À maturité, chaque paire de cellules se disloquent et libèrent 16 spores.

Parallèlement, l'ostiole qui permet l'expulsion des ascospores est formé. Pour Vincens (1917), sa formation résulte du soulèvement de la croute du stromata à cause de l'allongement tangentiel continu du plectenchyme de la voûte qui, se faisant, pousse les cellules de l'enveloppe du périthèce. L'ostiole est tapissé de paraphyses issues d'hyphes de l'enveloppe ou du plectenchyme de la voûte (Figure 19F). Hanlin (1965) ne détaille pas le développement de l'ostiole mais dit qu'il provient de la différenciation des cellules de l'enveloppe externe du périthèce (Figure 20F, G, H). Le col de ce dernier est tapissé de paraphyses et il dépasse légèrement de la surface du stromata (Figure 20H).

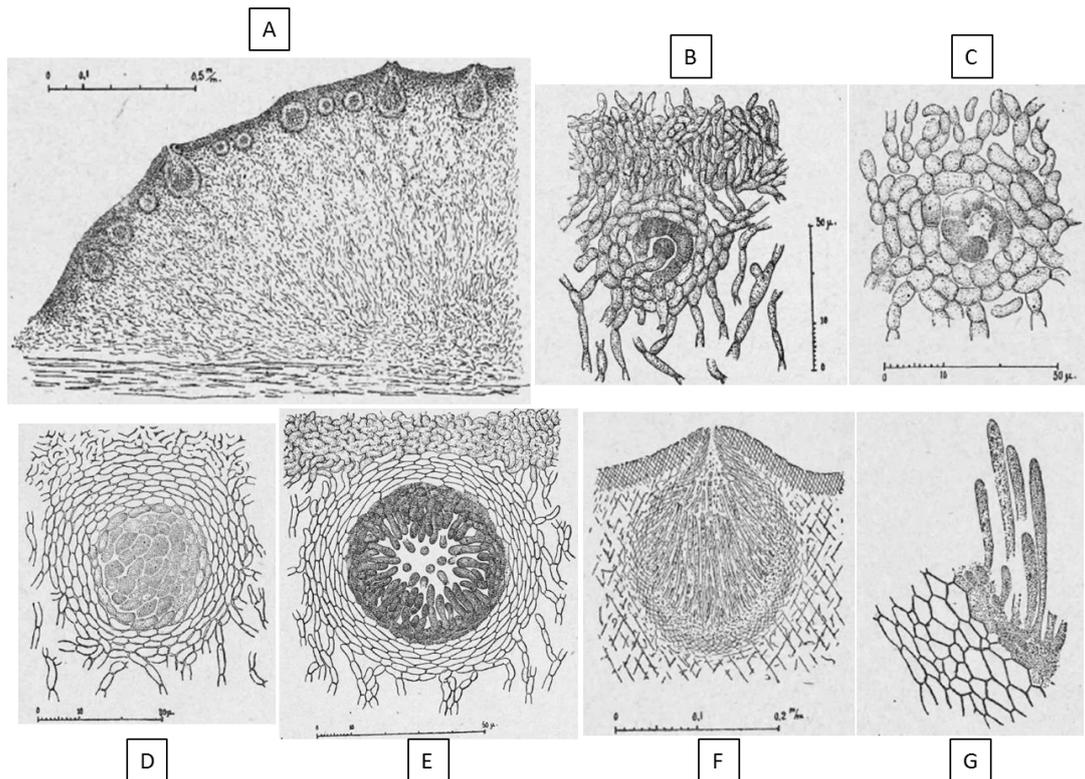


Figure 19 : Développement des périthèces chez *H. gelatinosa*.

La fructification ou stromata englobe de nombreux périthèces qui présentent divers états de développement (A). Dans l'ébauche de fructification, il y a deux hyphes plus épais que ceux avoisinants, dont l'un s'enroule autour de l'extrémité de l'autre (B). Il y a anastomose entre les deux hyphes et le noyau de l'hyphe enveloppante passe dans la cellule centrale (C). Une ébauche de périthèce après la multiplication de la cellule centrale (D). Les parois du jeune périthèce sont tapissées de paraphyses qui s'écartent les uns des autres (E) et se résorbent pour laisser la place au développement de l'hyménium (F) dont on voit une partie de l'hyménium ainsi que la paroi du périthèce (G). Adapté de la thèse de François Vincens (1917).

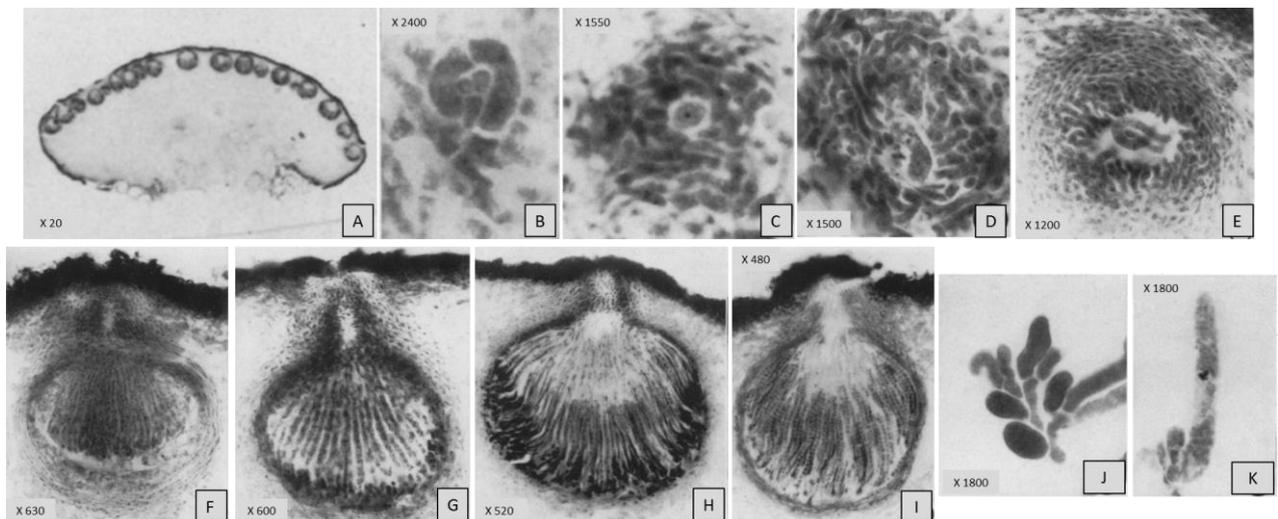


Figure 20 : Développement des périthèces chez *H. schweinitzii*.

Stromata présentant sous sa surface les périthèces (A). L'Initial d'ascogone est un hyphe épais recroquevillé (B). Lorsqu'il devient multinucléé, les cellules qui l'entourent prolifèrent pour former l'enveloppe du périthèce (C et D). Les cellules de la cavité se développent (E) puis celles de l'apex se transforment en paraphyses tandis que celles de la base forme les tissus pseudo-parenchymateux et hyméniaux (F). Les cellules ascogènes se forment à la base du périthèce (G) et donnent naissance aux ascus (H) qui contiennent les ascospores (I). Des cellules ascogènes (J) parmi lesquelles on distingue un crochet, des grosses cellules ovales binucléées et une cellule allongée qui est l'ébauche d'un ascus (K). Adapté d'après Hanlin (1965).

Chez *H. gelatinosa* et *H. schweinitzii*, le développement du périthèce semble similaire et en adéquation avec ce qui est décrit chez les *Pezizomycotina*. Néanmoins, ni Vincens (1917) ni Hanlin (1965), ne traitent de l'origine des nombreux périthèces qui constituent un stromata ni de l'origine des tissus stromatique.

1.4.5. Régulation du développement sexuel par la lumière

Il est reconnu que la lumière a un impact sur la croissance du mycélium, la conidiation et le développement sexuel de nombreux champignons dont *A. nidulans*, *N. crassa*, *P. anserina* (Fuller et al., 2015). L'équilibre entre reproduction sexuée et reproduction asexuée est influencé par la lumière (Debuchy et al., 2010b). La reproduction sexuée de *T. reesei* est favorisée par une alternance de 12h de lumière et 12h d'obscurité (Chen et al., 2012). Chez *N. crassa*, la réponse à la lumière est médiée par le complexe White Collar (WCC) qui se compose des deux photorécepteurs white-collar 1 (WC-1) et white-collar 2 (WC-2). Ce dernier agit comme activateur du troisième photorécepteur VDD qui permet d'adapter la réponse à la lumière et d'inactiver le complexe WC (Schafmeier and Diernfellner, 2011). Chez *T. reesei*, les orthologues de WC-1, WC-2 et VDD sont respectivement BLR1, BLR2 et ENV1 qui permettent de percevoir la lumière bleue (Castellanos et al., 2010). Il a été montré précédemment que BLR1 et BLR2 ne sont pas essentiels dans le processus d'induction de la reproduction sexuée mais influencent positivement la formation des fructifications : leur inactivation n'empêche pas la formation de stromata mais entraîne une diminution de leur nombre (Chen et al., 2012; Seibel et al., 2012a).

ENV1 a quant à lui une influence considérable sur le développement sexué : il est essentiel pour la fertilité femelle puisque aucun stromata n'est obtenu lors du croisement entre une souche sauvage invalidée pour ENV1 et la souche femelle stérile QM6a alors qu'un croisement entre une souche sauvage et la souche QM6a est parfaitement fertile. ENV1 régule négativement l'expression des gènes des précurseurs de phéromones *hpp1* et *ppg1* et des récepteurs *hpr1* et *hpr2*, et son absence entraîne une dérégulation de leur expression et un défaut d'identité sexuelle (Seibel et al., 2012a).

Un autre facteur important du développement des champignons est le complexe VELVET (VeA), qui est bien étudié chez les *Aspergilli* (Bayram and Braus, 2012) et qui a un rôle crucial dans tous les processus développementaux dépendant de la lumière. Chez *T. reesei*, il a été démontré que l'orthologue de VeA, appelé VEL1, est indispensable pour la régulation de la production des métabolites secondaires ainsi que les développements sexué et asexué (Karimi Aghcheh et al., 2014). VEL1 a un impact sur la régulation du système phéromone-récepteur et plus particulièrement sur la régulation de la transcription des récepteurs de phéromones. En effet en son absence, le récepteur *hpr1* est cinq fois moins transcrit dans les souches *MATI-1* et *hpr2* est vingt-cinq fois moins transcrit dans

les souches *MATI-2*. C'est donc l'absence des récepteurs de phéromone correspondant au type sexuel qui est responsable de la stérilité femelle.

Une étude récente a mis en évidence une interconnexion entre les voies de régulation impliquant ENV1 et VEL1 (Bazafkan et al., 2017). Cette étude montre que ces deux protéines interviennent dans la régulation de processus impliquant la lumière et que cette régulation est dépendante du type sexuel *MATI-1*. A la lumière, l'action de ces deux régulateurs se complètent tandis qu'à l'obscurité leur action est antagoniste.

1.5. Reproduction sexuée et cycle de vie chez la souche industrielle QM6a

1.5.1. QM6a est femelle stérile

La souche QM6a est la souche à l'origine de toutes les souches industrielles. Jusqu'à récemment, aucune des tentatives de reproduction sexuée décrites dans la littérature entre la souche QM6a et d'autres souches de *T. reesei* n'a abouti, suggérant que la souche QM6a est asexuelle et se reproduit exclusivement de façon clonale (Kuhls et al., 1996). L'identification du locus *MATI-2*, dans la souche QM6a (Seidl et al., 2009) a permis de faire des essais de croisement avec une souche de type sexuel compatible c'est-à-dire avec une souche *T. reesei* CBS999.97 *MATI-1* (Figure 21). Les auteurs de cet essai parviennent à obtenir la formation de stromata fertiles à la confrontation des deux souches (Figure 21).

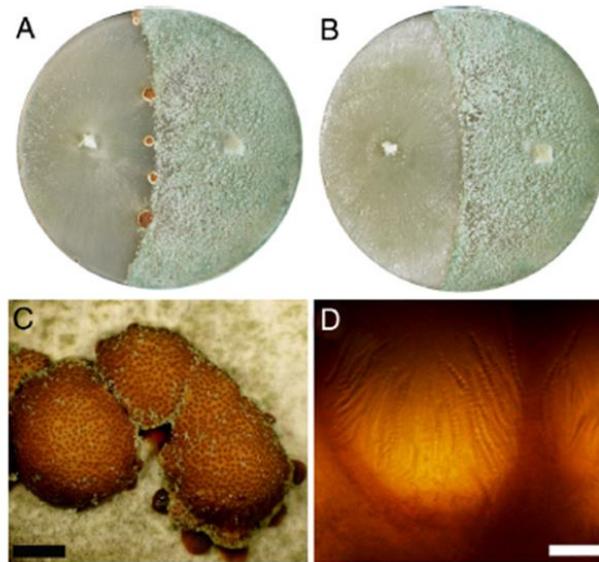


Figure 21 : Reproduction sexuée de *T. reesei*.

(A) Le croisement entre QM6a (*MATI-2*) et *H. jecorina* (*MATI-1*) sur boîte de Petri donne lieu à la formation de stromata au niveau de la zone de rencontre des 2 souches fongiques. (B) Lorsque QM6a (*MATI-2*) est croisée avec une souche du même type sexuel, aucun stromata ne se forme. (C) Les petits points noirs à la surface du stromata correspondent aux ostioles des périthèces cachés sous sa surface (Échelle : 2mm). (D) Les périthèces fertilisés contiennent des asques à 16 ascospores (Échelle : 2 mm). (Seidl et al., 2009)

Fort de ce succès, Seidl et al. testent la capacité de quelques souches hyper-productrices de cellulases, dont la RutC30, à faire de la reproduction sexuée avec *T. reesei* CBS999.97 *MATI-1*. Bien que ces souches présentent de nombreuses mutations dues aux nombreuses mutagenèses subies, elles sont capables de se croiser avec l'isolat naturel *T. reesei* CBS999.97 *MATI-1*.

Les auteurs poursuivent en réalisant une conversion de type sexuel, c'est-à-dire en changeant la cassette *MATI-2* par la cassette *MATI-1* provenant de la souche CBS999.97 dans la souche QM6a. Cette nouvelle souche, QM6a *MATI-1* est alors croisée avec les souches *T. reesei* CBS999.97 *MATI-2* et QM6a *MATI-2*. Dans le premier cas, le croisement est fertile alors que dans le second il est stérile. Ce résultat suggère donc que la souche QM6a est femelle stérile (Figure 22) car pour qu'un croisement entre deux souches aboutisse, il faut qu'au moins l'une des deux souches soit femelle fertile et l'autre mâle fertile (Saleh et al., 2012). Il est important de rappeler que toutes les souches hyper-productrices de cellulases ont été générées à partir de la QM6a, ce qui veut dire qu'elles sont toutes de type sexuel *MATI-2* et qu'elles sont femelles stériles mais mâles fertiles.

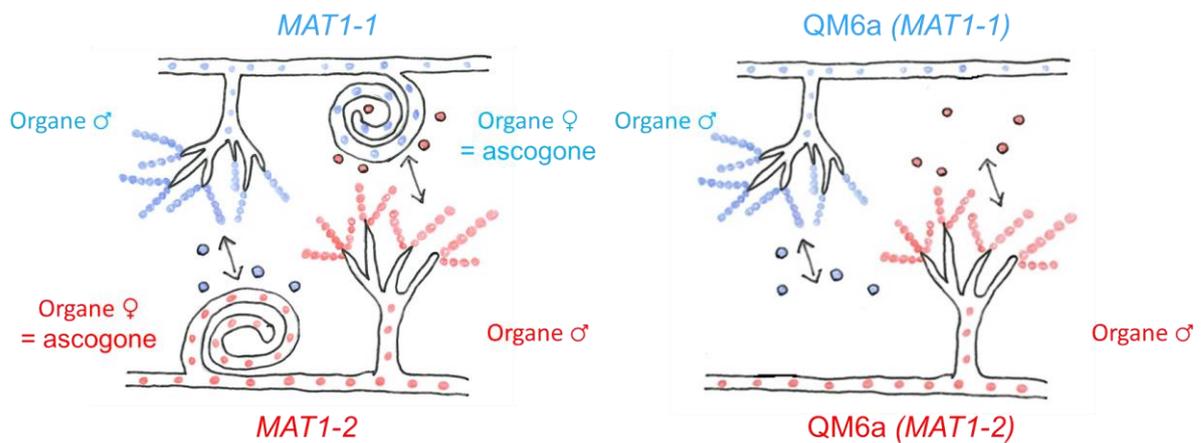


Figure 22 : La reproduction sexuée chez *T. reesei*.

À gauche, une reproduction sexuée entre souches mâle et femelle fertiles qui aboutira à l'obtention d'une descendance. À droite, une reproduction sexuée entre souches QM6a mâle fertile mais femelle stérile, qui ne permettra pas d'obtenir de descendants.

L'hypothèse la plus probable pour expliquer la stérilité femelle de la souche QM6a est que cette fertilité femelle ait été perdue en raison de son maintien au laboratoire depuis des décennies où elle a été propagée de façon asexuelle. En effet, Saleh et al., (2012) ont montré, chez le pathogène du riz *Magnaporthe oryzae*, qu'une propagation asexuelle durant 10 à 19 générations aboutit à la perte de la fertilité femelle chez toutes les souches testées. Ce résultat s'expliquerait par une dérive génétique ayant lieu lorsque le champignon est maintenu dans des conditions environnementales favorables (abondance de nutriments, pas de pression de sélection, pas de compétiteurs). La fertilité femelle peut donc être perdue facilement et rapidement.

Par ailleurs, le développement sexué est un mécanisme complexe qui implique plusieurs étapes : la reconnaissance et l'attraction du partenaire, la fertilisation, la formation de la fructification dans laquelle va avoir lieu la fusion des noyaux mâle et femelle qui est immédiatement suivie de la caryogamie et de la méiose. De plus, la fabrication des fructifications intervient dans des conditions environnementales spécifiques mettant en jeu différents stimuli environnementaux comme les nutriments, la lumière, l'oxygénation, la présence du partenaire de reproduction, la température, le pH. Leur perception se fait à l'aide de récepteurs couplés à des protéines relais qui sont soit des protéines G soit des protéines RAS. Ces dernières activent les cascades de régulation dépendantes des PKA-AMPC ou des MAPK qui vont amplifier les stimuli environnementaux et activer les facteurs de transcription activateur ou répresseur de l'expression des gènes responsables de la formation de la fructification. Au minimum, quelques 200 autres gènes sont impliqués à différents niveaux dans le développement sexuel des champignons (Pöggeler et al., 2006; Dyer and O'Gorman, 2012; Dyer and Kück, 2017). Ainsi le développement sexué est un mécanisme complexe qui requiert la coordination de nombreux processus biologiques dont certains ne sont pas spécifiques du sexe. La perte de la

fertilité peut donc être multifactorielle et être due à un ou des gènes défectueux intervenant à différents niveaux du processus et ayant un rôle de près ou de loin sur lui.

1.5.2. Remédier à la stérilité femelle

La découverte d'une reproduction sexuée chez un champignon d'une telle importance industrielle ouvre de nouvelles perspectives d'amélioration des souches et de nouveaux champs de recherche. La reproduction sexuée peut être un outil d'amélioration rapide et efficace, mais si elle ne peut pas avoir lieu entre les souches industrielles, son utilité reste limitée. Des études tentent de comprendre pourquoi les souches industrielles de *T. reesei* sont femelles stériles et comment y remédier.

En 2012, Seibel et al., (2012) s'intéressent à la régulation du système phéromone/récepteur entre les souches sauvages CBS999.97 *MAT1-1* et CBS999.97 *MAT1-2* avec la souche QM6a. Ils montrent que les gènes de la souche QM6a sont exprimés au même moment que ceux de la CBS999.97 *MAT1-2* mais avec un niveau de transcription différent. Ainsi, vingt fois plus de transcrits du gène *hpp1* sont détectés dans la souche QM6a par rapport à la souche CBS999.97 *MAT1-2*. Cette dérégulation transcriptionnelle pourrait entraîner une réponse retardée et inappropriée pouvant contribuer au défaut de stérilité femelle de QM6a.

Rapidement, Linke et al., (2015) et Schmoll et al., (2015) recherchent les gènes capables de restaurer la fertilité femelle chez QM6a. Pour cela, ils croisent la QM6a avec une CBS999.97 *MAT1-1*. La descendance est rétrocroisée (ou backcross) huit fois de suite avec la QM6a pour obtenir des souches *MAT1-1* fertiles contenant un pourcentage minimum de matériel génétique de la CBS999.97 (Figure 23).

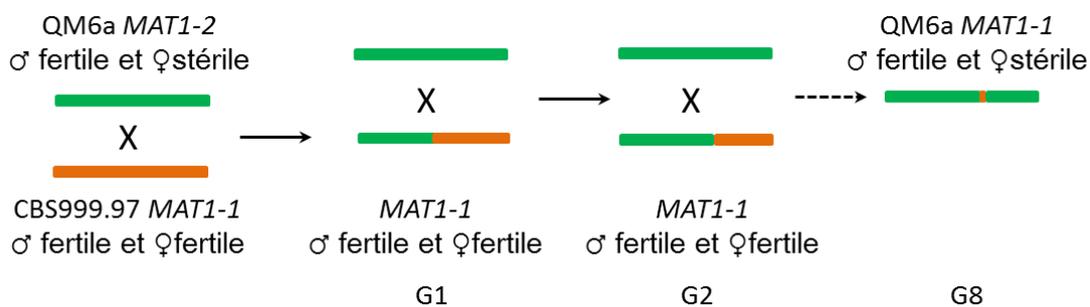


Figure 23 : Recherche des gènes capables de restaurer la fertilité femelle chez QM6a.

À chaque rétrocroisement, la quantité du patrimoine génétique CBS999.97 diminue dans la descendance (notée G1 à G8, pour génération 1 à 8). D'après Linke et al., (2015).

La comparaison génomique des descendants *MAT1-1* fertiles avec la QM6a permet d'identifier quatre gènes pour Linke et al., (2015) et six gènes candidats pour Schmoll et al., (2015). Seul le gène

Trire2 :67350 (appelé *idc1* dans la suite du manuscrit), commun aux deux brevets, permet de restaurer la production des stromata. Le séquençage de l'allèle fonctionnel du gène *idc1* dans les souches femelles fertiles RL1/A8-02 and RL2/A8-11 générées par Linke et al., (2015) a permis de déterminer que ce gène *idc1* a une taille de 5121 nucléotides et est interrompu par trois introns (Figure 24). La séquence du gène *idc1* (Trire2 :67350) non fonctionnel issue de QM6a diffère de 91 nucléotides, dont neuf sont localisés dans des introns, par rapport à la séquence sauvage. L'introduction d'une version sauvage du gène *idc1* dans la souche QM6a *MAT1-1* entraîne une restauration de sa fertilité et l'obtention des stromata fertiles (Linke et al., 2015) lors d'un croisement avec une souche QM6a *MAT1-2*. Toutefois la régulation du gène doit être importante car sur plusieurs transformants un seul présente une restauration complète de la fertilité (communication personnelle). Cette souche à la fertilité femelle restaurée n'existait pas au début de cette thèse et a été mise à disposition que très récemment.

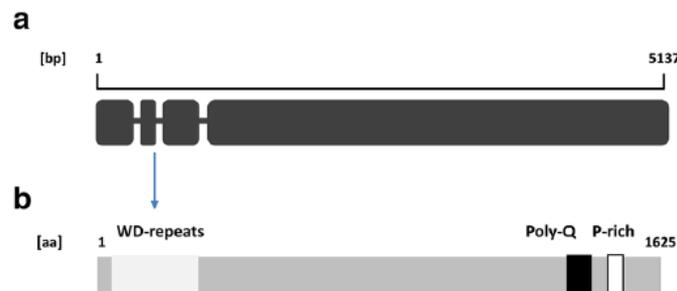


Figure 24 : Le gène *idc1* de *T. reesei*.

(a) Le gène *idc1* est interrompu par 3 introns. (b) L'ADNc et la traduction *in silico* de ce gène révèlent l'existence d'une région répétée riche en sérine (WD-repeats) en N-terminal, d'une région riche en proline (P-rich) en C-terminal et d'un stretch de glutamine (Linke et al., 2015).

Ce gène a pour orthologue *ham-5* chez *N. crassa*, (Aldabbous et al., 2010) et *IDC1* chez *P. anserina*, (Jamet-Vierny et al., 2007). La perte de fonction du gène *ham-5* de *N. crassa* (Aldabbous et al., 2010) et *IDC1* chez *Podospora* (Chan Ho Tong et al., 2014) entraîne un défaut de la fusion entre hyphes. Or, la fusion des hyphes est un processus important du développement des champignons et notamment pour la croissance végétative et la reproduction sexuée. Chez *N. crassa*, *ham-5* est impliqué dans la mobilisation de la cascade de signalisation MAPK et de ses composants NRC-1, MEK-2 et MAK-2, nécessaires à la fusion hyphale. *ham-5* interagit grâce à sa partie N-terminale avec MEK-2 et permet de les transporter du cytoplasme jusqu'à l'extrémité de l'hyphé où a lieu la fusion. (Jonkers et al., 2014; Jonkers et al., 2016).

Chez *P. anserina*, *IDC1* est un composant d'une des trois cascades MAP kinase qui sont impliquées dans la transmission de signal. La présence de mutations dans le gène *IDC1* empêche la formation de pigments et d'hyphes aériens, empêche le développement de la « dégénérescence Crippled Growth », cause une stérilité femelle et affecte la capacité de *P. anserina* à enclencher le mécanisme de défense d'interférence hyphale en présence d'un autre champignon (Jamet-Vierny et al., 2007). Le gène *idc1*

est requis dans le développement du protopérithèce en périthèce, et de son niveau d'expression dépend le nombre de fructifications. Une souche exprimant peu *IDCI* produit peu de fructifications tandis que la surexpression du gène entraîne la production de nombreux protopérithèces dont un faible nombre deviendra mature. En effet, la production de protopérithèces et de périthèces nécessite des nutriments qui sont puisés dans les hyphes avoisinants. Ainsi, si trop de protopérithèces sont produits, il n'y aura plus suffisamment de nutriments pour permettre aux périthèces de se développer jusqu'au bout (Jamet-Viery et al., 2007).

1.6. Enjeux et objectifs de la thèse

Dans le cadre de la production de bioéthanol de deuxième génération, parmi les améliorations envisagées pour diminuer le coût de l'étape d'hydrolyse enzymatique, l'ingénierie génétique de *T. reesei* est une des solutions. Elle permettrait d'améliorer les performances de sécrétion du champignon filamenteux producteur de cellulases, les propriétés des enzymes et de maîtriser la stabilité des souches en conditions industrielles. Il est cependant crucial de maîtriser les outils de modifications génétiques permettant d'obtenir des souches industrielles performantes et génétiquement stables.

Comme de nombreux champignons industriels, *T. reesei* a longtemps été considéré comme ayant exclusivement un cycle asexuel. La mise en évidence de l'existence d'un cycle de reproduction sexuée chez le champignon filamenteux *T. reesei* ouvre de nouvelles perspectives d'amélioration des souches utilisées en biotechnologies. L'utilisation de la reproduction sexuée en complément des outils de génétique et de biologie moléculaire classiques ouvre de nouvelles perspectives pour :

- servir de socle pour de nouvelles méthodes de criblage et de sélection de mutations pouvant conférer des caractères d'intérêt dépendants de gènes nombreux ou non identifiés,
- éliminer les mutations délétères s'accumulant dans les souches ayant une reproduction clonale et contribuer à stabiliser les souches industrielles en conservant leurs performances,
- éliminer les marqueurs de sélection de type résistance à un antibiotique dans les souches industrielles.

Les objectifs de cette thèse sont :

- dans un premier temps, de maîtriser le développement de la reproduction sexuée dans des souches sauvages qui sont à la fois mâle et femelle fertiles et la reproduction entre souches sauvages femelles fertiles et souches industrielles mâles fertiles. L'étude de la reproduction sexuée chez *T. reesei* est récente et la littérature sur le sujet est limitée.

Étudier les étapes et les mécanismes du cycle sexué pourra nous permettre d'être plus efficace pour le développement d'outils,

- dans un second temps, de mettre en place cette reproduction sexuée entre des souches industrielles qui sont mâle fertile et femelle stérile, à l'aide de la stratégie originale de la « souche assistante » développée chez le champignon ascomycète *P. anserina* (Jamet-Vierny et al., 2007). Cette stratégie fait intervenir une souche qui « prêtera » sa capacité à développer des fructifications aux souches industrielles,
- dans un dernier temps, de mettre en application la reproduction sexuée entre les souches industrielles et les souches sauvages. Ce croisement a pour but de générer de la diversité génétique parmi laquelle de nouvelles souches améliorées pour leurs performances cellulolytiques seront isolées. Il permettra aussi d'identifier les mutations impliquées dans la production de cellulases et/ou dans d'autres phénotypes d'intérêt industriel. Pour l'identification des mutations, la technique du *Bulk Segregant Analysis*, associée aux nouvelles techniques de séquençage haut débit a été utilisée. Cette nouvelle méthodologie est en plein essor et n'a pas encore été utilisée chez *T. reesei*.