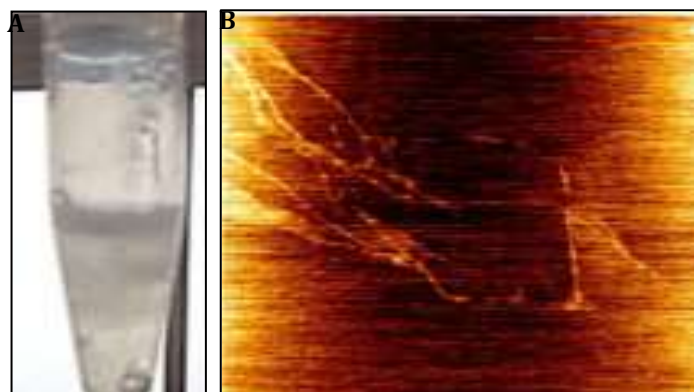


SSPWood



A : The recombinant PcSSP1 forms a gel at pH8.0
B : This gel is composed of fibers as shown by Atomic Force Microscopy imaging.

Functional characterization of fungal small secreted proteins in relation to wood degradation

Responsable scientifique : Mélanie MOREL-ROUHIER, UMR 1136 Interactions arbre-Microorganismes

Partenaires Labex : S. Dumarçay (LERMAB)

Collaborations : Philippe Silar (Université Paris Diderot)

Contexte — La dégradation du bois par les champignons lignolytiques est au cœur des recherches actuelles pour l'amélioration des processus de valorisation de la biomasse végétale. La plupart des études concerne les systèmes enzymatiques extracellulaires de dégradation, en revanche très peu de données sont disponibles concernant les processus associés qui permettent aux champignons de résister à l'environnement oxydant lié à la dégradation du bois et en particulier aux extractibles qui peuvent être toxiques pour la cellule. En plus des systèmes classiques de réponse aux stress, des petites protéines sécrétées (SSP) semblent jouer un rôle dans la réponse cellulaire à ces extractibles. Leur fonction est actuellement inconnue mais une spécificité a pu être établie entre l'essence de bois et l'excrétion de ces enzymes.

Objectifs — Le principal objectif du projet était de préciser le rôle des SSP dans la physiologie des champignons lignolytiques (modification du bois, signal, réponse au stress, détoxification.....).

Démarche — Pour déterminer le rôle de ces protéines dans les processus de dégradation du bois, plusieurs approches ont été utilisées : des approches de génomique comparative, de transcriptomique et de protéomique qui ont permis d'avoir une vue globale de l'occurrence et l'implication potentielle de ces protéines lors de la dégradation du bois, et une approche plus ciblée qui a consisté en la production et la purification d'une SSP recombinante de *Phanerochaete chrysosporium* (PcSSP1) en système hétérologue bactérien et sa caractérisation biochimique. Enfin une approche plus physiologique a été abordée pour caractériser cette protéine d'un point de vue fonctionnel par la réalisation de mutants knock-out de *Podospora anserina* et de mutants surexprimeurs de SSP1 de *P. chrysosporium*.

Résultats marquants —

- Le profil de sécrétion des SSP chez différentes espèces d'Aspergilli montre qu'il existe une spécificité entre les espèces et que la présence de certaines de ces protéines dans les sécrétomes en particulier les HsbA pourrait être liée aux processus de dégradation de la biomasse.
- Certains gènes codant des SSP chez *P. chrysosporium* sont induits en présence d'extractibles de chêne suggérant un rôle potentiel soit dans les mécanismes de dégradation de ces molécules toxiques pour le champignon, soit dans la réponse au stress associé à ces processus de dégradation.
- La production de SSP1 de *P. chrysosporium* a révélé des caractéristiques biochimiques particulières : la protéine contient 4 cystéines sous forme oxydées qui la rendent très stable et thermo-résistante.
- La protéine présente des structures secondaires de type feuillets beta et hélices alpha à pH 8.0. De plus à pH 8.0, les protéines s'organisent entre elles sous forme de filaments visualisables en microscopie de force

atomique, et leur assemblage forme une sorte de gel visualisable à l'œil nu. Cette organisation est due à la présence au sein de la séquence protéique, d'une extension riche en alanine et glycine du côté C-terminal et est dépendante de la force ionique du tampon utilisé.

- PcSSP1 présente une activité β -glucuronidase uniquement lorsqu'elle est présente une organisation macromoléculaire sous forme de fibres.
- Les mutants knock-out de 2 orthologues de PcSSP1 chez *P. anserina* montrent des phénotypes de sensibilité au rouge congo, suggérant que les protéines pourraient avoir un rôle dans le maintien de l'intégrité de la paroi fongique en condition de stress.
- La mise au point d'une technique de transformation génétique de *P. chrysosporium* a permis d'obtenir des mutants surexprimant la GFP seule ou fusionnée à la SSP1.

Principales conclusions incluant des points-clés de discussion — L'implication de ces petites protéines sécrétées pourrait avoir un rôle important dans les processus de dégradation du bois puisque de nombreux gènes codant ces protéines sont présents dans les génomes des champignons lignolytiques. De plus certains d'entre eux sont induits en présence de molécules issues du bois telles que les extractibles qui peuvent être toxiques pour les champignons. Nos premiers résultats suggèrent que SSP1 de *P. chrysosporium* de par son état d'agrégation pourrait protéger les cellules fongiques en s'accumulant au niveau de la paroi permettant son maintien en condition de stress et piéger les molécules toxiques relarguées lors de la dégradation du bois, limitant ainsi leur effets délétères sur l'activité des enzymes de dégradation.

Perspectives — Les perspectives de ce projet sont la validation du rôle de SSP1 de *P. chrysosporium* par l'obtention et la caractérisation de mutants chez cet organisme. De plus, des mutants knock-out ont été réalisés chez *P. anserina* en collaboration avec Philippe Silar (Université Paris Diderot) et sont encore en cours de caractérisation. Les protéines correspondantes seront produites et caractérisées pour évaluer leur capacité à former des fibres. Les protéines de *P. anserina* présentant des homologies de séquences avec des protéines impliquées dans l'organisation de la paroi chez la levure et le développement des appressoria chez des champignons pathogènes, leur caractérisation sera réalisée de manière approfondie. Enfin, la formation de ce gel protéique pourrait avoir des applications biotechnologiques, une analyse plus biophysique permettra d'évaluer son potentiel de valorisation.

Valorisation —

SSPWood allowed to get a PhD grant for Nicolas Valette, thus its participation is highlighted in bold in the publications and presentations listed above.

Publications :

Valette N, Benoit-Gelber I, Falco MD, Wiebenga A, de Vries RP, Gelhaye E, Morel-Rouhier M. (2016) Secretion of small proteins is species-specific within *Aspergillus* sp. *Microb Biotechnol*. 2016 May 7. doi: 10.1111/1751-7915.12361.

Valette N, Perrot T, Sormani R, Gelhaye E, Morel-Rouhier M. (2017) Antifungal activities of wood extractives. *Fungal Biology Reviews*. 31:113-123.

Valette N, Fernández-González AJ, Cuenot S, Gelhaye E, Morel-Rouhier M. Self-assembly of the small secreted protein SSP1 from *Phanerochaete chrysosporium* is required for β -glucuronidase activity. In preparation for submission to *Biochimica and Biophysica Acta - General Subjects*.

Fernández-González AJ, **Valette N**, Kohler A, Sormani R, Gelhaye E and Morel-Rouhier M. The early responses of *Phanerochaete chrysosporium* to oak extractives reveal the involvement of new detoxification enzymes. In preparation for submission to *Environmental Microbiology*.

Oral presentation at conferences and meetings: (speaker underlined)

Morel-Rouhier M, **Valette N**, Sormani R and Gelhaye E. The various strategies developed by lignolytic fungi to cope with wood extracts. Trinational minisymposium "Environmental microbiology and biomass" Strasbourg 2015, April 10th.

Valette N, Gelhaye E and Morel-Rouhier M. Characterization of small proteins secreted by lignolytic fungi. Journées *Jean-Chevaugnon* Aussois 2016, January 25-29th.

Poster presentations at conferences:

Valette N, Gelhaye E and Morel-Rouhier M. Characterization of small proteins secreted by lignolytic fungi. ECFG Paris 2016, April 3-6th.

Valette N, Cuenot S, Gelhaye E and Morel-Rouhier M. Characterization of small proteins secreted by lignolytic fungi. 2nd MPIterMic-ABRE Workshop on Plant-Fungus Interaction Marburg (Germany) 2016, October 26-29th.

Fernandez Gonzalez AJ, **Valette N**, Perrot T, Sormani R, Gelhaye E and Morel-Rouhier M. Antifungal activity of wood extractives. 29th Fungal genetics Conference Asilomar California (USA) 2017, March 14-19th.

Valette N, Fernandez-Gonzalez AJ, Cuenot S, Sormani R, Gelhaye E and Morel-Rouhier M. Characterization of a *Phanerochaete chrysosporium* new protein putatively involved in biomass degradation. 29th Fungal genetics Conference Asilomar California (USA) 2017, March 14-19th.

Poster price :

Valette N, Gelhaye E and Morel-Rouhier M. Caractérisation fonctionnelle de petites protéines sécrétées chez les champignons lignolytiques. Doctoral school seminar, 2015, January 15th.

Effet levier du projet —

Ce projet a permis la caractérisation fonctionnelle d'une SSP de champignon lignolytique qui au début de ce travail était complètement inconnue. Il a également permis de mettre en évidence que les SSP ne sont pas seulement sécrétées dans le but d'établir des interactions (symbiotiques ou pathogènes) plante-champignon, mais elles pourraient avoir un rôle plus générique dans les mécanismes de résistance aux stress chez les champignons. Ceci ouvre d'importantes perspectives notamment pour le développement de molécules antifongiques. De plus ces caractéristiques biophysiques particulières, de par la formation de fibres formant un gel, pourraient avoir des applications en biotechnologies, notamment pour le piégeage de certaines molécules. Enfin ce projet a également permis de travailler sur la mise au point d'une technique de transformation génétique d'un basidiomycète modèle (*P. chrysosporium*) qui permettra de lever d'importants verrous concernant la caractérisation des processus physiologiques propres aux champignons dégradeurs de bois.