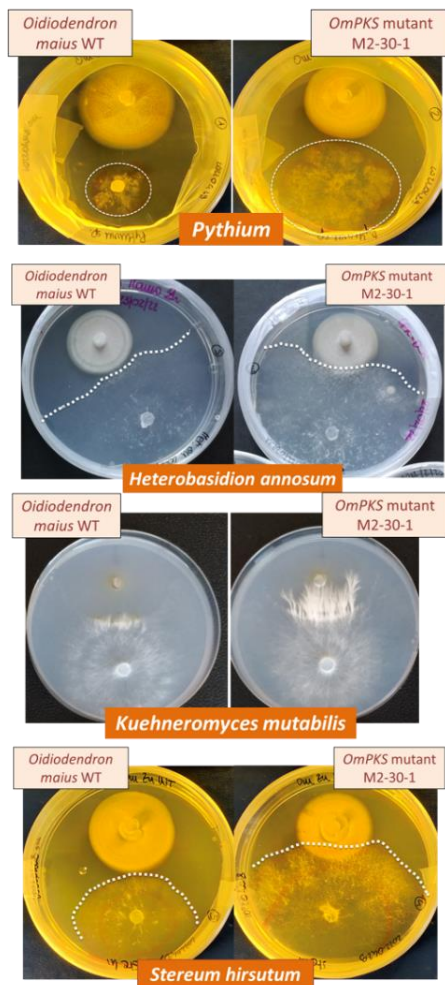


In vitro tests showing higher antagonistic activities for the *O. maius* wild type strain when compared to the PKS mutants



Isolation, identification et caractérisation structurelle et fonctionnelle de (nouvelles) polykétide synthases produites par le champignon éricoïde endomycorhizien *Oidiodendron maius*

Responsable scientifique : Elena MARTINO, UMR Interactions Arbres/Micro-organismes (IAM) 1136

Partenaires Labex : Annetret KOHLER, UMR Interactions Arbres/Micro-organismes (IAM) 1136

Collaborations : Christophe JACOB and Sabrina COLLIN, UMR 7365 CNRS/UL ; Pascale TSAN, UMR 7036 CNRS/UL ; Silvia PEROTTO, Stefania DAGHINO, Simone BELMONDO, Marco CHIAPPELLO - DiBIOS, University of Turin, Italy ; Shingo MIYAUCHI, (Max Planck Institute – Köln) ; Ekaterina SHELEST (German Centre for Integrative Biodiversity Research, Halle-Jena-Leipzig, Germany)

Action thématique concernée : WP1

Contexte — Les champignons produisent une grande variété de métabolites secondaires biologiquement actifs, dont une grande partie sont des polykétides, produits par des polykétides synthases (PKS). Les polykétides fongiques jouent un rôle dans l'adaptation écologique et évolutive des champignons : ils peuvent être des précurseurs de toxines, des pigments importants pour la virulence ou pour la résistance aux stress abiotiques, ils sont également importants pour la croissance, le développement sexuel et la production de spores. Jusqu'à présent, l'étude des polykétides fongiques a été limitée par la difficulté d'identifier et de caractériser le polykétide lui-même. Ce n'est que récemment qu'une analyse plus approfondie du potentiel génétique des champignons pour la production de polykétides est devenue possible grâce à l'augmentation rapide des projets de séquençage des génomes fongiques. Désormais, le clonage sélectif des gènes codant pour les PKS fongiques peut précéder l'identification du métabolite produit, ce qui contribue à la diversité et à l'analyse fonctionnelle des polykétides fongiques. Alors qu'il existe une littérature abondante sur le rôle des PKS dans les interactions pathogènes ou dans la lutte biologique, aucune donnée n'est disponible concernant le rôle des PKS et des polykétides produits dans les interactions symbiotiques. Une étude génomique comparative de 60 champignons de taxonomie et d'écologie différentes a montré que *Oidiodendron maius*, un champignon symbiotique endomycorhizien, contient jusqu'à présent le plus grand nombre de gènes codant pour des PKS. En outre, les données transcriptomiques disponibles ont fourni une liste des gènes les plus induits au cours de la symbiose entre *O. maius* et sa plante hôte, dont plusieurs gènes codant pour des PKS.

Objectifs — L'objectif général du projet était de caractériser certaines polykétides synthases du champignon *O. maius* afin de comprendre leur rôle dans la signalisation moléculaire entre le champignon et la plante hôte, et d'identifier de nouvelles molécules présentant un intérêt potentiel pour la pharmacologie, l'ingénierie écologique, le biocontrôle et la réponse au stress. En particulier, les objectifs du projet comprenaient : i) la prédiction *in silico* des clusters de gènes de biosynthèse dans le génome de *O. maius* et l'analyse de l'expression dans la symbiose ; ii) la prédiction des domaines, l'analyse phylogénétique et la comparaison des PKS de *O. maius* avec d'autres enzymes fongiques caractérisées fonctionnellement et iii) la génération de mutants dépourvus de gènes PKS hautement régulés en symbiose, afin d'analyser leur phénotype mycorhizien, leur réponse aux stress abiotiques et leurs activités antagonistes par rapport à la souche sauvage.

Démarche — Construction du vecteur de disruption OmPKS197601 et transformation médiée par *Agrobacterium* : afin d'obtenir des mutants knock-out, des plasmides ont été conçus pour trois gènes PKS sélectionnés et clonés dans le vecteur pCAMBIA0380_HYG. Le vecteur pCAMBIA0380_HYG_PKS197601 a été cloné dans *Agrobacterium tumefaciens* LBA1100, et utilisé pour transformer les conidies non germées de *O. maius* selon le protocole décrit dans Abbà et al. (2009). Analyses phylogénétiques et bioinformatiques - Prédiction des clusters de gènes de biosynthèse : antiSMASH 4.1 a été utilisé pour la prédiction des clusters de gènes de biosynthèse effectuée sur le cluster de calcul de l'INRAE-Nancy. Des groupes de gènes régulés à la hausse ou à la baisse ont été déterminés et une analyse de regroupement hiérarchique a été effectuée avec les log2 normalisés des gènes à l'aide d'un script R personnalisé. Intégration des données multi-omiques et visualisation : l'expression différentielle des gènes a été calculée à partir des données RNA-seq. Les protéines sécrétées ont été prédites à l'aide de méthodes décrites précédemment (Pellegrin et al., 2015). Les annotations CAZy ont été fournies par l'équipe CAZy (www.cazy.org). L'identification des éléments transposables (TE) a été réalisée avec Transposon Identification Nominative Genome Overview (TINGO ; Morin et al., 2019). Enfin, les fichiers de sortie obtenus à partir des différentes analyses et des annotations fonctionnelles de JGI Mycocosm ont été nettoyés, triés, combinés et visualisés avec le package R karyoploteR à l'aide d'un ensemble de scripts R personnalisés, *Visually Integrated Numerous Genes of Omics* (VINGO). Description des domaines PKS et analyses phylogénétiques : un arbre phylogénétique a été construit avec 47 séquences de domaines protéiques KS de *O. maius*, ainsi qu'avec les séquences protéiques de certaines enzymes PKS bien caractérisées d'autres espèces fongiques : l'arbre phylogénétique a été reconstruit en utilisant la méthode du maximum likelihood dans le programme PhyML (v3.1/3.0 aLRT). iTOL tree of life a été utilisé pour visualiser l'arbre phylogénétique.

Résultats marquants —

- Prédiction *in silico* de groupes de gènes de biosynthèse (BGC) dans le génome de *O. maius* et analyse de l'expression dans la symbiose : en utilisant antiSMASH, un total de 59 groupes de gènes a été prédit dans le génome de *O. maius*. Parmi ceux-ci, 25 PKS et 11 hybrides PKS-NRPS ont été identifiés. Un total de 3 groupes de gènes co-régulés vers le haut ou vers le bas a été identifié dans les conditions de la formation mycorhizienne selon l'ensemble des données RNA-seq analysées.

- Vue génomique globale des groupes de gènes prédits : la transcription différentielle des gènes entre deux conditions (racines mycorhizées vs mycélium) a été calculée et montrée en utilisant une analyse de regroupement hiérarchique. Un total de 47 gènes PKS ont été combinés avec les lectures normalisées des gènes en utilisant

DESeq2. Trois gènes codant pour PKSs étaient fortement régulés dans les conditions mycorhiziennes : PKS 197601 et PKS200887 étaient régulés à la hausse et PKS174030 était fortement régulé à la baisse dans la condition mycorhizienne par rapport au mycélium.

- Prédiction de domaine et analyse phylogénétique : Une analyse Blastp a été effectuée pour toutes les séquences protéiques prédites des PKS et des hybrides PKS-NRPS de *O. maius*, en utilisant la base de données NCBI. Un arbre phylogénétique a été construit avec toutes les séquences du domaine protéique KS de *O. maius*, ainsi que les séquences protéiques de certaines enzymes PKS bien caractérisées dans d'autres espèces fongiques.

- Parmi les trois gènes codant pour les PKS et fortement régulés dans les conditions mycorhiziennes, des mutants dépourvus du gène 197601 des PKS ont été générés afin d'analyser leur phénotype mycorhizien. 700 mutants ont été collectés en culture unique et un criblage par PCR a été effectué. Le résultat négatif de la PCR a confirmé le knock-out du gène PKS 197601 chez trois mutants de *O. maius*. Une analyse Southern blot a été réalisée pour valider les mutants obtenus. Les trois mutants candidats d'*O. maius* ont été utilisés pour des synthèses mycorhiziennes *in vitro*, pour des tests de croissance en présence de Cd et pour des tests de biocontrôle. Aucune différence significative n'a été observée entre la souche sauvage et les mutants PKSs lors des tests de mycorhization et de croissance en présence de Cd, tandis que les tests de biocontrôle bactérien et fongique ont donné des résultats prometteurs.

Principales conclusions incluant des points-clés de discussion —

- Les mutants dépourvus des gènes PKS hautement exprimés dans la symbiose n'ont pas montré un phénotype différent significatif par rapport à la souche sauvage.

- De même, les mutants PKS n'ont pas montré une incapacité majeure à se développer sur un milieu enrichi en Cd par rapport à la souche sauvage.

- D'autre part, les mutants PKS semblent avoir une capacité de biocontrôle plus faible contre des souches bactériennes et fongiques par rapport à la souche sauvage. D'autres tests *in vitro* sont en cours pour confirmer ces observations.

Perspectives —

Afin d'identifier certains (nouveaux) polykétides produits par *O. maius*, l'expression hétérologue de certaines PKS d'*O. maius* dans la levure est envisagée. Aucune donnée n'est actuellement disponible sur les polykétides produits par ce champignon symbiotique, et les recherches futures devraient permettre d'obtenir une meilleure image de son potentiel génétique dans la voie de biosynthèse des polykétides, ainsi que la caractérisation de certains de ces composés, leur rôle potentiel et l'identification éventuelle de nouvelles molécules présentant un intérêt potentiel pour le biocontrôle, la pharmacologie et l'ingénierie écologique.

Valorisation —

(**scientifique** : publications, chapitre d'ouvrage, présentation lors de conférences, ... signaler d'éventuels prix) ;
(**économique** : enveloppe Soleau, brevet, licence, ... ; **diffusion** : communiqué de presse, interview, ...)

Belmondo S., Daghino S., Miyauchi S., Wu G., Meloni D., Aiello C., Collin S., Kohler A., Perotto S., Martino E., Jacob C. Polyketide synthases in the ericoid endomycorrhizal fungus *Oidiodendron maius*. 15th European Conference on Fungal Genetics (ECFG15); 17 – 20 February 2020, Rome, Italy. Poster presentation

Belmondo S., Daghino S., Miyauchi S., Wu G., Meloni D., Aiello C., Collin S., Kohler A., Perotto S., Martino E., Jacob C. Characterization of polyketide synthases in an ericoid endomycorrhizal fungus using a molecular approach. 1st Conference for Young Botanists (CYBO); 6 – 7 February 2020, Genova, Italy. Oral presentation

Martino E., Daghino S., Belmondo S., Meloni D., Miyauchi S., Collin S., Kohler A., Jacob C., Perotto S. Polyketide synthases in the ericoid endomycorrhizal fungus *Oidiodendron maius*. 114° Congresso S.B.I. (IPSC); 4 – 7 September 2019, Padova, Italy. Poster presentation.

Effet levier du projet —

Contrat pour Simone Belmondo, post-doc du groupe de l'Université de Turin, travaillant au projet (01/06/2019 - 31/05/2020) ; contrat pour Marco Chiapello, post-doc du groupe de l'Université de Turin, travaillant au projet (01/12/2021-01/06/2022).