



Figure 1: Modèle 2D d'une séquence pré-miRNA pour un microRNA-like, régulateur de l'expression génique chez *Phanerochaete chrysosporium* (A) et un volcano plot de la variation d'expression de microRNA-like en condition de stress (B). La séquence du microRNA-like mature est indiquée en vert sur la figure A. Chaque point représente le fold-change versus p-value pour chacun des 684 microRNA-like identifiés.

Exploration du miRnome du champignon ligninolytique *Phanerochaete chrysosporium* lors du stress induit par les extractibles du bois

Prénom, Nom du porteur : Sylvain DARNET, UMR Interactions Arbres/Micro-organismes (IAM) 1136

Partenaires Labex : Faculté des Sciences et Technologies, Campus Aiguillettes, Vandœuvre-lès-Nancy Cedex

Action thématique concernée : WP1

Contexte —

Dans le contexte de la préservation des écosystèmes, de la gestion forestière et du développement économique durable, la compréhension des facteurs clés qui améliorent la durabilité du bois revêt une importance cruciale. La durabilité du bois est directement liée à la proportion de lignine/cellulose, et l'accumulation de métabolites spécialisés, connus sous le nom d'extractibles du bois. Les champignons ligninolytiques sont résistants aux extractibles du bois et comprendre ces mécanismes est crucial pour développer de nouvelles stratégies pour augmenter la durabilité du bois et obtenir des micro-organismes avec des capacités de détoxification pour des applications biotechnologiques.

Objectifs —

L'objectif est d'identifier les microARN-likes (miARNs) du champignon ligninolytique *Phanerochaete chrysosporium* et d'évaluer le réseau de régulation génique, contrôlé par ces petits ARNs, permettant la tolérance au stress, notamment dans des conditions de dégradation du bois.

Démarche —

La première année, des approches bioinformatique ont été utilisées pour prédire et caractériser les miARNs à partir des séquences du génome de *P. chrysosporium*.

La deuxième année, le champignon a été cultivé sur conditions standards et en présence de phytostéroïdes, des extractibles lipophiles, bioactifs et antimicrobiens, présents dans l'ensemble des bois, résineux comme feuillus. Les ARN de petite taille (sRNA) ont été extraits et les bibliothèques de sRNA ont été préparées pour être séquencées sur une plateforme NGS Illumina. Pour chaque condition, quatre réplicas ont été réalisés.

L'analyse bioinformatique a permis d'identifier différents types de sRNA et notamment des miARNs à partir des données de séquençage. L'expression des miARNs présente des variations significatives entre conditions et les transcrits ciblés (ARNm) par ces miARNs ont été prédits.

Résultats marquants —

- Un pipeline bioinformatique pour identifier les miARNs et leurs loci dans les génomes a été développé. Notre base de données de miARN contient 1145 séquences, extraites d'articles scientifiques et de bases de données d'ARNs.
- Des conditions de culture ont été optimisées pour tester les réponses au stress et évaluer les rôles des stéroïdes dans la physiologie des champignons ligninolytiques.
- L'ARN total a été extrait pour 4 cultures du champignon en condition témoin et 4 en condition de stress aux extractibles. La qualité et la quantité d'ARN total ont été suffisantes pour préparer les bibliothèques de type NGS pour le séquençage des sRNA.
- Les **8 bibliothèques** ont été séquencées et pour chaque il a été obtenu entre **9 et 12 millions de reads de haute qualité**, ayant plus de 99% des bases séquencées avec un facteur de qualité (QV) supérieur à 20.
- Les étapes de pré-traitement des données de séquençage consistent à retirer les reads de basse qualité ou contenant des adaptateurs, à retirer les reads qui présentent des similitudes avec les ARNt, ARNr et autres ncRNAs qui ne sont pas des miRNAs. La dernière étape du pré-traitement est la comparaison des reads entre eux, pour ne conserver que les séquences uniques. Au final, environ **500 000 à 800 000 reads uniques** ont été obtenus par bibliothèque.
- Pour la prédiction de miRNAs à partir des données de séquençage, l'ensemble des reads a été rassemblé et analysé par l'outil miRdeep2. Ainsi **684 miRNAs ont été prédits**, dont 257 séquences présentant des homologies avec des miRNAs de champignons, identifiés chez d'autres espèces.
- L'analyse de l'expression montre que 43 % des microRNAs sont exprimés en moyenne à plus de 100 reads et 7% à plus de 1000 reads. Le test d'expression différentielle entre les deux conditions démontre que **40 microRNAs sont significativement surexprimés dans la condition de stress et 19 sous-exprimés**.
- La prédiction des cibles des **miRNAs sous-exprimés** en conditions de stress indique que potentiellement **607 transcrits sont régulés** par ce mécanisme. L'analyse d'enrichissement en terme Gene Ontology (GO) montre que les catégories les plus représentées sont liées à des **processus métaboliques (acides aminés et carbohydrates) et réponse au stress**. Les **transcrits cibles des microRNAs surexprimés** sont au nombre de **2994** et dans des catégories GO associées, les plus représentées sont celles de la régulation de la transcription, le **transport vésiculaire, le réticulum endoplasmique et la biosynthèse des lipides**.

Principales conclusions incluant des points-clés de discussion —

Les données de séquençage de bibliothèques de sRNA ont permis de faire la prédiction de **684 miRNAs, dont 427 nouveaux miRNAs sans homologie** chez d'autres champignons. Cette prédiction montre un nombre important de miRNAs car seulement 168 miRNAs ont été identifiés chez *Ganoderma lucidum*, 364 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, par exemple. A titre de comparaison, la levure *Saccharomyces cerevisiae* n'a pas de microRNA fonctionnel. Un total de 1917 microRNAs sont comptabilisés pour le génome humain et 327 pour celui d'*Arabidopsis*, deux organismes modèles pour les ARNs régulateurs. L'analyse de l'expression de ces miRNAs montre des variations significatives en condition de stress. Ce résultat indique que **le profil du miRnome varie en fonction des conditions** et que **les miRNAs ont une fonction de régulation**, impliquée dans **la réponse au stress de ce champignon**. L'autre élément appuyant le rôle de régulateur central des miRNAs est le fait que les **transcrits ciblés par la régulation sont spécifiques à la réponse au stress**, constituée par l'exposition aux phytostéroïdes, extractibles lipophiles du bois. Effectivement, les miRNAs surexprimés, qui dégradent les transcrits ciblés ou inhibent la traduction de ceux-ci, reconnaissent des transcrits codant pour la biosynthèse de lipides, de l'ergostérol et le transport vésiculaire. Ceci semble suggérer que les miRNAs peuvent réguler l'homéostasie lipidique, plus particulièrement la biosynthèse et le prélèvement de ceux-ci dans le milieu extérieur.



Perspectives —

L'identification de la présence du mécanisme de régulation par miRNA chez le champignon *P. chrysosporium*, notamment au stress, ouvre de nouvelles perspectives. Ainsi, ces résultats confirment que la technique de *silencing* peut être utilisée pour la caractérisation de gènes sur des approches de génétique reverse. De plus, l'implication des miRNAs comme régulateurs centraux de la réponse au stress est une piste à explorer pour des applications biotechnologiques, pas seulement chez les champignons ligninolytiques. Des travaux précurseurs montrent que les microRNAs peuvent être des régulateurs permettant d'augmenter la résistance aux solvants (éthanol) durant la fermentation, avec des répercussions importantes de rendement en bioréacteurs.

Valorisation —

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

A ce jour, le projet miR-2-woodex n'a pas encore été évalué mais la préparation d'un article de type *short communication* est en cours.

Effet levier du projet —

À la suite du projet miR-2-woodex, un projet de recherche structurant a été financé par le pôle A2F de l'Université de Lorraine afin d'étudier la biosynthèse de l'ergostérol et la tolérance au stress chez les champignons ligninolytiques. Un financement de thèse a été obtenu en 2023 pour comprendre les mécanismes d'homéostasie lipidique, notamment pour les stérols, chez un champignon ligninolytique *Ophiostoma piceae*. *O. piceae* est un exosymbionte du scolyte *Ips typographus*, qui lui est auxotrophe aux stérols pour sa reproduction et son développement. La caractérisation du métabolisme stérolique et du rôle des miRNAs dans l'homéostasie lipidique peut déboucher sur des applications biotechnologiques, comme la lutte contre les insectes ravageurs.