



CONSTRUCTION DE SOUCHES *Trichoderma reesei* FLUORESCENTES POUR UN CRIBLAGE HAUT-DEBIT DE TRANSFORMANTS PAR CYTOMETRIE EN FLUX

Hugues Mathis

► To cite this version:

Hugues Mathis. CONSTRUCTION DE SOUCHES *Trichoderma reesei* FLUORESCENTES POUR UN CRIBLAGE HAUT-DEBIT DE TRANSFORMANTS PAR CYTOMETRIE EN FLUX. *Biotechnologies*. 2016. hal-01467645

HAL Id: hal-01467645

<https://ephe.hal.science/hal-01467645>

Submitted on 14 Feb 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



École Pratique
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté

par

MATHIS Hugues

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

TITRE : CONSTRUCTION DE SOUCHES *T. reesei* FLUORESCENTES POUR UN CRIBLAGE HAUT-DEBIT DE TRANSFORMATION PAR CYTOMETRIE EN FLUX

soutenu le 14 Décembre 2016

devant le jury suivant :

Pr. THENET Sophie – Présidente
Dr. MARGEOT Antoine – Tuteur scientifique
Dr. STOCKHOLM Daniel – Tuteur pédagogique
Dr. DEBUCHY Robert – Rapporteur
Dr. LALUCQUE Hervé – Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr. MARGEOT Antoine

Laboratoire de : IFPEN – Département Biotechnologies. Directeur : *Dr. MONOT Frédéric*

et de

Pr. BOUIX Marielle

Laboratoire de : UMR Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires.

Directeur : *DR. BOUE François*



École Pratique
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté

par

MATHIS Hugues

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

TITRE : CONSTRUCTION DE SOUCHES *T. reesei* FLUORESCENTES POUR UN CRIBLAGE HAUT-DEBIT DE TRANSFORMATION PAR CYTOMETRIE EN FLUX

soutenu le 14 Décembre 2016

devant le jury suivant :

Pr. THENET Sophie – Présidente
Dr. MARGEOT Antoine – Tuteur scientifique
Dr. STOCKHOLM Daniel – Tuteur pédagogique
Dr. DEBUCHY Robert – Rapporteur
Dr. LALUCQUE Hervé – Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr. MARGEOT Antoine

Laboratoire de : IFPEN - Département Biotechnologies. Directeur : *Dr. MONOT Frédéric*

et de

Pr. BOUIX Marielle

Laboratoire de : UMR Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires.

Directeur : *DR. BOUE François*

Remerciements

Dans un premier temps, je souhaite remercier les membres du jury : Sophie Thénét, pour avoir si gentiment accepté de présider ce jury, Robert Debuchy et Hervé Lalucque pour avoir accepté d'être rapporteur et examinateur de ce mémoire de fin d'étude. Je souhaite également remercier Daniel Stockholm pour sa disponibilité mais surtout pour avoir accepté d'être mon tuteur pédagogique.

Dans un second temps, je tiens à remercier Mme Véronique Ruffier Meray, Directrice de la direction « Chimie et physico chimie appliquée » d'IFPEN, pour m'avoir soutenu dans la reprise de mes études, mais aussi guidé dans le choix du parcours professionnel.

Je souhaiterais ensuite remercier mes collègues d'IFPEN, à commencer par mon Chef de département Frederic Monot, qui depuis le début soutient sans relâche mon initiative d'évolution professionnelle, mais aussi pour ses conseils avisés et son temps d'écoute malgré un emploi du temps très chargé. Je souhaite surtout remercier mon Chef de projet Antoine Margeot, il paraît que dans notre organisation matricielle nous n'avons pas de lien hiérarchique, malgré tout cela fait bientôt 10 ans que je travaille sur tes projets, toujours avec enthousiasme ! Un grand merci pour ton soutien sans faille, ta patience, ta confiance en notre équipe, ainsi que ta bienveillance.

Je souhaite remercier tous les cadres du département de Biotechnologie pour leur soutien et leur aide. Frédérique Bidard-Michelot, sache que si je parlais « le jeune » malgré mon grand âge, je dirais : « je kiffe » nos échanges scientifiques, toujours à croire en mes idées, à m'écouter et prête à échanger. Merci à Etienne Jourdié dont on aimerait connaître la cartographie neuronale tellement ça va vite là-haut : merci pour ces échanges toujours très stimulants. Merci Fadhel Ben Chaabane pour ta bonne humeur communicative, ton intérêt mais aussi ton réseau professionnel. Peut-être un peu moins pour tes nombreuses idées de manipulation en plus d'un programme de cytométrie déjà bien chargé ! Je tiens aussi à remercier Nicolas Lopes Ferreira, peut-être qu'un jour nous retravaillerons ensemble, et merci également à Senta Blanquet. Je souhaite aussi remercier tous mes collègues OETAM comme on dit par ici, je vais peut-être passer sous peu du « côté obscur de la force », mais ce n'est pas pour autant que j'oublierais mes années de technicien à vos côtés. Enfin, merci également à Nicolas Pannacci du département « Physico-chimie des matériaux et fluides complexes ». Toutes les idées développées dans ce manuscrit font suite à une présentation sur le développement d'outils de microfluidique, et les premières expériences ont été faites avec ton concours.

Un très grand merci à l'équipe BioMip (UMR GMPA, AgroParisTech-INRA) pour son accueil de deux mois dans leurs locaux Grignonais en cet hiver heureusement clément. Merci à Marielle Bouix pour son ouverture d'esprit (avoir accepté des champignons filamenteux dans ses cytomètres était une vraie gageure !), sa très précieuse aide et son œil acéré sur les cytogrammes qui défilent. Merci à Sarrah Ghorbal de m'avoir formé à l'utilisation du cytomètre et de m'avoir accueilli à ses côtés, votre aide fut très précieuse à la bonne réussite de cette expérience professionnelle hors de mes bases.

Sommaire

Liste des abréviations	6
Liste des Figures.....	7
Liste des Tableaux.....	10
I. Introduction	11
II. Etat de l'art – Etude Bibliographique	14
a) Production de biocarburants de deuxième génération	14
b) Hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique	15
c) <i>Trichoderma reesei</i>	17
d) Les stades de développement de <i>Trichoderma reesei</i>	18
e) Transformations génétiques de <i>Trichoderma reesei</i>	20
f) Vecteurs de transformation	22
g) Marqueurs de sélection.....	24
h) Cytométrie en flux (CMF)	26
i) Choix du promoteur	28
III. Matériels et Méthodes	30
a) Matériel biologique et constructions génétiques	30
b) Transformations fongiques	34
<i>b-1) Transformation biolistique</i>	34
<i>b-2) Transformation calcique</i>	35
c) Cytométrie en Flux	36
d) Observations microscopiques en fluorescence.....	37
e) Conditions de culture des souches.....	37
IV. Résultats.....	38
a) Construction des premières souches fluorescentes	38
b) Mise au point du vecteur de transformation – quelle stratégie ?	40
<i>b-1) Choix de promoteurs alternatifs à pCBHI</i>	41
<i>b-2) Conception d'un variant de GFP optimisé pour T. reesei</i>	42
c) Paramètres du suivi cinétique de la fluorescence à l'aide du cytomètre en flux : adaptation au cas des spores.....	43
<i>c-1) Numération des spores et vitesse de passage devant le laser</i>	44
<i>c-2) Viabilité et conservation des spores</i>	46
<i>c-3) Correspondance entre FSC et Taille réelle</i>	50
<i>c-4) Evaluation du profil d'autofluorescence basale</i>	51
<i>c-5) Caractérisation de la fenêtre Spores Fluorescentes SF</i>	52

c-6) Fenêtrage pour l'analyse de données de CMF.....	54
d) Test du promoteur pCBH1.....	56
e) Test des promoteurs constitutifs (pX-LGFP).....	57
f) Test du variant EGFP ^{OPT}	60
f-1) Comparaison du variant EGFP ^{OPT} versus LGFP	60
f-2) Evaluation de l'effet transformant pour pTEF-EGFP ^{OPT}	62
f-3) Analyse d'un mélange 50/50 d'un contrôle CL847 et d'un transformant pTEF-EGFP ^{OPT}	65
f-4) Criblage des promoteurs constitutifs associés au variant EGFP ^{OPT}	66
f-5) Evaluation du promoteur pCBHI avec le variant EGFP ^{OPT}	69
V. Conclusion & Perspectives	71
a) Validation des objectifs de l'étude et criblage des promoteurs	71
b) Estimation de l'hétérogénéité clonale	72
c) Indicateurs d'intérêt en CMF pour l'étude de <i>T. reesei</i>	72
d) Limites de la méthode	73
e) Vers d'autres applications de la CMF ?	74
e-1) Utilisation de plusieurs marqueurs fluorescents	74
e-2) Intérêt des séquences IRES	75
e-3) Intérêt pour le suivi de fermentation	75
e-4) Autres perspectives pour le criblage haut-débit.....	76
Références.....	77
Annexe A	84
Annexe B	85
Annexe C	87
Annexe D.....	89
Annexe E	90
Annexe F.....	91
Annexe G.....	92
Annexe H.....	93
Annexe I	94

Liste des abréviations

- *A. nidulans* = *Aspergillus nidulans*
- AMT = Agrobacterium-mediated Transformation
- BD = Becton, Dickinson & Company
- BG = β -glucosidases
- BioMip = Bioproduits, Aliments, Micro-organismes et Procédés
- *C. albicans* = *Candida albicans*
- CBH = cellobiohydrolases ou exoglucanases
- cFDA = marqueur Di-acétate de 5-carboxyfluorescéine
- CMF = Cytométrie en Flux
- dNTP = deoxynucleoside triphosphate
- EG = endoglucanases
- F45 = milieu synthétique nutritif pour *T. reesei*
- FL1 = Axe de la fluorescence en cytométrie en flux
- FSC = Forward Scatter (paramètre cytométrie)
- GFP = Green Fluorescent Protein (LGFP et EGFP = variants de la GFP)
- GMn-X = Moyenne géométrique de la taille (Unités de Taille, axe FSC)
- GMn-Y = Moyenne géométrique de la fluorescence (Unités de Fluorescence, axe FL1)
- GMPA = Génie Microbiologique des Procédés Alimentaires
- IFPEN = IFP Energies Nouvelles
- IP = marqueur iodure de propidium
- LB = Lysogeny Broth ou Luria-Bertani
- *N. crassa* = *Neurospora crassa*
- NEB = NEW ENGLAND BioLabs
- NV = Fenêtre « Non Viabiles » sur les cytogrammes
- *P. anserina* = *Podospira anserina*
- PCR = Polymerase Chain Reaction
- PDA = Potato Dextrose Agar
- PD = Potato Dextrose
- PEG = Polyéthylène Glycol
- S = Fenêtre « Spores non germées » sur les cytogrammes
- SF = Fenêtre « Spores Fluorescentes » sur les cytogrammes
- SnF = Fenêtre « Spores non Fluorescentes » sur les cytogrammes
- SSC = Side Scatter (paramètre cytométrie)
- *T. reesei* = *Trichoderma reesei*
- UMR = Unité Mixte de Recherche
- WT = Wild Type

Liste des Figures

Figure 1 : Organisation de la lignocellulose aux différentes échelles, d'après Ritter et al., 2008

Figure 2 : Actions des principales enzymes du sécrétome de *T. reesei*. BG = β -glucosidase, CBH I = Cellobiohydrolase, CBH II = Cellobiohydrolase, EG = Endoglucanase. Adapté d'après Vanholme et al. 2013.

Figure 3 : Généalogie simplifiée des souches de *T. reesei* les plus étudiées, d'après Durand et al., 1988a. Pointillés = étapes de mutagénèse multiple ; UV = Ultraviolet, NTG = Nitrosoguanidine, AL = Accélérateur Linéaire, EMS = Ethylmethylsulfonate.

Figure 4 : Exemple de composition du cocktail enzymatique de CL847 après culture sur milieu lactose-lactose. D'après Margeot, 2014.

Figure 5 : Schématisation des différents stades de croissance des champignons filamenteux et ordres de grandeurs associés. Focus sur les stades précoces de développement : la germination (encart rouge).

Figure 6 : Principales transformations génétiques pour les champignons filamenteux, d'après van den Hondel & Punt, 1991. CaCl₂ = Chlorure de Calcium, PEG = Polyethylene Glycol, Li acetate = Lithium Acetate.

Figure 7 : Construction du plasmide pUT1140, vecteur de la transformation de *T. reesei*.

Figure 8 : Composantes d'un cytomètre en flux associé à un trieur de type FACS, d'après Fraiser et Brown, ISV.

Figure 9 : Schématisation des premières étapes de constructions génétiques des vecteurs de transformation T1, T2 et T3. Les étapes de purification et ligation sont les mêmes pour toutes les constructions. PCR = Polymerase Chain Reaction, Purif. = purification, Digest. = digestion, Ligat. = ligation.

Figure 10 : Représentation du système de tir biolistique. D'après Bio Rad.

Figure 11 : {Gauche} spore bourgeonnante de 5 μ m ; {Centre} spore avec un tube de germination ; {Droite} spore avec un hyphes en cours de branchement

Figure 12 : Evolution d'une germination de spores au cours du temps (t₀, t+16 h et t+20 h) sur milieu PDA, aérobie, 22 °C. Grossissement x10. Echelle = 25 μ m.

Figure 13 : Observation de la fluorescence (signal vert) à partir de gélose prélevée au centre de cultures en milieu solide pour CL847 (gauche) et deux clones pCBHI-LGFP (centre et droite). x40 (images 375 x 375 μ m). Exemple représentatif parmi 4 à 6 images/souche.

Figure 14 : Exemple de l'aspect d'un nuage de spores CL847 à t+24h. Cas de spores cryoconservées.

Figure 15 : Comparaison des comptages du cytomètre en flux à différentes concentrations en spores (1/20 à 1/2000). Moyennes obtenues à partir de triplicats pour un Speed 4.

Figure 16 : Comparaison de l'impact de la vitesse de passage devant le laser (Speed) sur le Count de la CMF pour une dilution au 20ème de la solution mère de spores.. Moyennes obtenues à partir de triplicats.

Figure 17 : Fenêtres d'acquisition pour un suivi de viabilité. Identification de la zone R1 à partir de la répartition des particules en fonction de leur granulométrie et taille (haut gauche) ; Répartition des particules en fonction de la fluorescence verte (cFDA) (haut droite) ; Répartition des particules en fonction de la fluorescence rouge (IP) (bas gauche) ; Répartition des particules selon l'intensité des deux marquages cFDA et IP (bas droite).

Figure 18 : Evolution de la viabilité de cultures CL847 cryoconservées à -20°C dans l'eau MilliQ (●), le milieu PD Glycérol 20% (■) ou le milieu CTS 50 (▲) au cours du temps.

Figure 19 : Evolution de la viabilité (◆, axe de gauche) de cultures CL847 conservées au réfrigérateur dans l'eau MilliQ au cours du temps et de la population totale de spores (▲, axe de droite)

Figure 20 : Evolution de la viabilité (◆, axe de gauche) et de la population totale (▲, axe de droite) de spores CL847 au cours du temps sur boîte de Pétri de 9 cm de diamètre (culture en milieu solide)

Figure 21 : Comparaison des réglages FSC de la CMF pour définir les fenêtres d'acquisition optimales pour la détection des spores. Cas de billes calibrées de 2 à 15 µm.

Figure 22 : Caractérisation de l'autofluorescence basale pour des spores fraîches du contrôle non transformé CL847 dans l'eau (haut) ou dans F45 + Lactose (bas) à t+24h.

Figure 23 : Comparaison des profils de Morphologie, Fluorescence et Fluorescence = f(Taille) pour le contrôle levure WT (ligne haute) et un transformant levure pTEF-LGFP représentatif parmi 3 réplicats. Temps t0 à gauche des pointillés, t+20h à droite. Le fenêtrage correspond à la région d'intérêt pour les levures, ou RI.

Figure 24 : Fenêtres d'acquisition pour un suivi cinétique de fluorescence. Répartition des particules en fonction de la taille (gauche) ; répartition des particules en fonction de la fluorescence (centre) ; répartition des particules entre fluorescence et taille (droite). S = Spores non Germées, SF = Spores Fluorescentes, SnF = Spores non Fluorescentes, NV = Non viables.

Figure 25 : Récapitulatif des résultats de CMF pour le contrôle CL847 de trois manipulations. Estimation de la part du Count Total en fenêtre SF(vert) et en fenêtre SnF(gris) Moyennes obtenues à partir d'un triplicata technique.

Figure 26 : Comparaison des profils de fluorescence à t+24h pour le contrôle CL847 (gauche) et pTEF-LGFP (droite). La fluorescence s'écartant du domaine linéaire Fluorescence = f(Taille) est identifiée par la fenêtre SF.

Figure 27 : Suivi cinétique de l'expression de fluorescence sur spores cryoconservées à -20°C : comparaison d'un contrôle CL847 (ligne haute) vs un transformant pTEF-LGFP (ligne basse) au cours du temps (t0 à t+24h). Extrait représentatif parmi 4 contrôles et 4 transformants. Gating « Spores Fluo », équivalent SF.

Figure 28 : Comptage des spores présentant dans la fenêtre "Spores Fluo" correspondant à la verticalité se détachant de la linéarité basale Fluorescence = $f(\text{Taille})$ pour 4 contrôles CL847 et 4 transformants pTEF-LGFP.

Figure 29 : Comparaison des profils de Fluorescence et de Fluorescence = $f(\text{Taille})$ pour CL847 (ligne haute), pTEF-LGFP (ligne du milieu) et pTEF-EGFPOPT (ligne basse) à t0 (gauche des pointillés) et t+20h (droite des pointillés).

Figure 30 : Suivi de la quantité de particules dans la fenêtre SF au cours du temps de germination. Moyenne de 3 réplicats pour chaque souche.

Figure 31 : Observations en lumière visible (colonne gauche) et en épi-fluorescence (colonne droite) du clone pTEF-EGFPOPT E1 à t+18h (ligne haute) et t+22h (ligne basse)

Figure 32 : Evolution du ratio Fluorescence/Taille au cours du temps pour les transformants E1 à E9 (hors E7) de pTEF-EGFPOPT. Comparaison aux contrôles CL847. Moyennes obtenues sur la base de triplicats.

Figure 33 : Expression de fluorescence d'un mélange 50/50% de CL847/pTEF-EGFPOPT E2, à t0

Figure 34 : Observations en transmission (gauche) et en épi-fluorescence (droite) du mélange 50/50% CL847/E2 à t+20h.

Figure 35 : Profils de répartition de la population (Count Total) dans la fenêtre SF (Vert) et la fenêtre SnF (Gris). Cinétique de germination (rouge) pour 8 promoteurs constitutifs et le contrôle CL847. Moyenne issues de triplicats.

Figure 36 : Profils d'augmentation de la taille moyenne (GMn-X, pointillés bleu) et de l'intensité de fluorescence (GMn-Y, trait plein vert) dans la fenêtre SF pour 8 promoteurs constitutifs et le contrôle CL847. Moyenne issues de triplicats.

Figure 37 : Profils de répartition de la population (Count Total) dans la fenêtre SF (Vert) et la fenêtre SnF (Gris). Cinétique de germination (rouge) pour les constructions du promoteur pCBHIC-EGFPOPT et pCBHIL-EGFPOPT, versus le contrôle CL847. Moyenne issues de triplicats.

Figure 38 : Schématisation de changements structuraux attendus suite à l'intégration d'une bille de tungstène (jaune) enrobée d'ADN dans les spores (grises) lors d'une transformation biolostique.

Figure 39 : Schématisation de l'insertion au locus souhaité de gènes d'intérêt (GOI) conduisant au remplacement de la fluorescence d'origine (orange, jaune, bleu) par la fluorescence associée aux gènes (vert, rouge, violet).

Figure 40 : Encapsulation de spores de *T. reesei* dans des billes d'alginate (3%) durant la germination. D'après Delgado-Ramos et al., 2014.

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Principaux avantages et inconvénients des méthodes de transformation fongique.

Tableau 2 : Marqueurs de sélection les plus courants pour les transformations de *T. reesei*. D'après Steiger, 2013. Aux = marqueur auxotrophique, ds = marqueur dominant, rep = gène rapporteur.

Tableau 3 : Principaux promoteurs utilisés pour les études génétiques chez *T. reesei*. D'après Steiger, 2013

Tableau 4 : Caractéristiques des constructions génétiques étudiées. La cassette de sélection est toujours composée du marqueur antibiotique Hygromycine sous contrôle du promoteur cpc. Trois transformations distinctes ont été réalisées pour obtenir les 21 souches : T1, T2 et T3.

Tableau 5 : Comparaison des effets de paramètres physiques sur la germination des spores.

Tableau 6 : Correspondances de Kazusa entre codons et acides aminés pour *T. reesei*. Champs = codon / acide aminé / fraction / fréquence (pour mille) / (nombre). D'après <http://www.kazusa.or.jp/codon/>.

I. Introduction

IFPEN est un Etablissement Public à caractère Industriel et Commercial (EPIC) créé en 1944, possédant quatre tutelles (Ministère de l'Environnement, de l'Energie et de la Mer, Ministère des Finances et Comptes Publics, Ministère de l'Education Nationale et de l'Enseignement Supérieur et de de la Recherche, Ministère de l'Economie, de l'Industrie et du Numérique) et établi sur deux sites géographiques dont Rueil-Malmaison (92). La principale mission d'IFPEN est d'apporter aux acteurs publics et à l'industrie des technologies performantes, économiques et propres pour relever les défis sociétaux du 21^{ème} siècle, en favorisant l'émergence d'un mix énergétique durable. Une autre mission est axée sur la création de richesses et d'emplois, en soutenant l'activité économique française et européenne, ainsi que la compétitivité des filières industrielles associées. En 2014, IFPEN comptait un effectif total équivalent temps de plein de 1 663 personnes, dont 1 132 chercheurs.

IFPEN compte dix Directions de recherche, parmi lesquelles R07, intitulée « Chimie et Physico-chimie appliquées ». Les objectifs des équipes de R07 sont de répondre aux besoins environnementaux et d'évolution des industries en qualifiant produits et matériaux impliqués dans 1) le captage du CO₂, 2) Les comportements des batteries alimentant les véhicules hybrides, 3) Les techniques de traitement de l'eau dans la production pétrolière et 4) Le traitement de la biomasse pour la production de biocarburants. Ce dernier objectif est plus particulièrement porté par le Département Biotechnologies (R072). Sa mission est axée sur l'amélioration des performances des biocatalyseurs (activité et stabilité), aussi bien des cellulases que des micro-organismes les produisant. Un deuxième enjeu est le développement de techniques de fermentation pour optimiser la culture des micro-organismes dans des conditions industrielles, ainsi que des compétences en génie chimique pour l'extrapolation.

Mes activités de recherche se déroulent au sein du Département R072, plus particulièrement au sein de l'équipe *Trichoderma*. Elle compte quinze permanents et a pour mission la production d'enzymes cellulolytiques par le champignon filamenteux *Trichoderma reesei*, dans le cadre de la conversion de la biomasse lignocellulosique en bioéthanol. Au centre de cette thématique de recherche, le projet FUTUROL vise à mettre au point et valider un procédé de production d'éthanol par voie biologique. Le projet est soutenu par OSEO, labellisé par le Pôle de Compétitivité Industries et Agro-Ressources (IAR) et comporte onze partenaires privés et publics, dont IFPEN. Prévu sur huit ans, le projet mettra en place un pilote puis un prototype, parallèlement aux travaux de R&D. La problématique de mes recherches s'est construite à partir de la nécessité d'optimiser le producteur de cellulases *T. reesei*. Un objectif de l'équipe est de rendre plus performant le sécrétome de *T. reesei* contenant principalement cinq enzymes. La stratégie repose donc sur l'identification de l'enzyme limitante afin d'améliorer sa qualité et/ou quantité. Ainsi, pour optimiser le cocktail enzymatique de *T. reesei*, il est nécessaire de réaliser des transformations successives de la souche afin de modifier les gènes associés aux enzymes d'intérêt. Pour cela, il est essentiel de maîtriser le protocole de transformation mais aussi de bien concevoir le vecteur génétique contenant le nouveau gène ainsi qu'un marqueur de sélection permettant de différencier les souches transformées des autres. Aujourd'hui, ce sont des marqueurs antibiotiques qui sont

utilisés à l'échelle du laboratoire, ce qui n'est pas idéal pour une exploitation industrielle des souches.

En effet, des micro-organismes multi-résistants pourraient représenter un risque lors d'une dissémination et pourraient nécessiter des mesures de confinement et de contrôle renforcées. Dans ce contexte, le recours à des marqueurs de sélection non antibiotiques représente un fort intérêt. Mon idée a été de tester un marqueur fluorescent, ce qui permettrait de palier à la fois au nombre de marqueurs disponibles (large gamme de couleurs possible, contrairement aux antibiotiques au nombre plus limité), comme aux problèmes éthiques associés aux antibiotiques. Une autre option aurait pu être les marqueurs de sélection basés sur l'auxotrophie, cependant ceux-ci rendraient plus difficile la croissance de souches et nécessiteraient des transformations successives, au contraire des marqueurs fluorescents. Cependant, une limitation actuelle du passage aux marqueurs fluorescents est leur nécessaire couplage à des outils de criblage haut-débit, comme la cytométrie en flux ou la microfluidique par exemple. En effet, il n'est pas possible de sélectionner sur la fluorescence par simple observation en microscopie, lorsque l'on considère des populations à cribler de l'ordre du million d'individus ! Un système haut-débit permettrait une plus haute fréquence de tri et représente donc une étape essentielle au développement de marqueurs de sélection de type fluorescent. Toutefois, seuls les premiers stades de germination sont acceptables pour une analyse en cytométrie en flux, étant donné le seuil de coupure physique que représente la buse d'injection, de l'ordre de 100 μm . Il est donc essentiel que la fluorescence s'exprime de façon précoce pour observer les spores au tout début de leur germination, mais aussi assez fortement pour une bonne détection. Ces deux critères conditionneront la réussite du passage aux marqueurs fluorescents, jusqu'à présent méconnus au laboratoire autrement que pour leur rôle de rapporteurs.

Ainsi, le stage a été fondé sur un double objectif : 1) construire des souches de *T. reesei* en utilisant un marqueur de sélection antibiotique mais aussi un rapporteur fluorescent (choix de la « green fluorescent protein », ou GFP) et 2) tester sa détection à l'aide de la cytométrie en flux, permettant de comparer plusieurs constructions génétiques et de repérer les meilleures conditions d'expression de la fluorescence. Cette stratégie a débuté par le choix de neuf promoteurs sur la base d'une étude bibliographique et des connaissances du laboratoire. J'ai réalisé de nombreuses constructions génétiques pour tester ces neuf promoteurs contrôlant soit le variant LGFP, soit le variant EGFP. La deuxième étape a été la découverte puis la mise en œuvre de la cytométrie en flux, via des aspects théoriques (UE Cytométrie en Flux EPHE) puis pratiques. Il est à noter que toutes les expérimentations en cytométrie en flux ont été menées lors d'un détachement de 2 mois au sein de l'équipe BioMiP (Bioproduits, aliments, Micro-organismes et Procédés) de l'UMR GMPA (Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires) sur le site d'AgroParisTech Grignon (78). Ce groupe assure une double mission de recherche et d'enseignement dans le domaine de l'ingénierie des transformations des produits agricoles, alimentaires et biologiques.

Il est important de préciser que la cytométrie en flux est très peu utilisée pour étudier les champignons filamenteux du fait des risques d'encrassement encourus lors de la manipulation de mycélium et de dissémination des spores, sachant que la cytométrie est principalement appliquée dans le domaine médical. J'ai ainsi créé des protocoles propres aux

spores de *T. reesei*, mis en œuvre des tests de viabilité, de suivi de germination puis des cinétiques d'expression de la GFP dans différentes conditions. Enfin, le traitement des données cytométriques, la prise en compte de divers contrôles et l'analyse statistique ont complété cette étude. Enfin, au-delà du développement d'un marqueur fluorescent pour faciliter le transfert à l'échelle industrielle et l'automatisation de la sélection des transformants, ce projet s'inscrit également dans un parcours d'évolution professionnelle au sein d'IFPEN (Technicien à Ingénieur). Pour le mener à bien, j'ai identifié deux éléments clefs : cultiver mon expertise scientifique et établir un réseau. La réalisation d'une partie du stage hors IFPEN a contribué à ce nouveau positionnement, en me permettant de construire une question de recherche, de prendre contact avec les différents acteurs puis d'organiser les différentes étapes du projet.

II. Etat de l'art – Etude Bibliographique

a) Production de biocarburants de deuxième génération

Dans un contexte mondial de réchauffement climatique, production de gaz à effet de serre et diminution des ressources énergétiques fossiles, la production de biocarburants (ou agrocarburants) représente l'un des leviers de la politique économique et environnementale. Ceux-ci sont produits à partir de composés chimiques présents dans la biomasse végétale. Au niveau européen, la directive 2009/28/CE (ou directive EnR) vise à augmenter la part de ressources renouvelables dans le bouquet énergétique. Cela représente un objectif de 20% d'énergie renouvelable pour la consommation annuelle de l'Union Européenne à l'horizon 2020 (Dusser, 2013). En France, cela a conduit à l'élaboration d'un plan national de développement des biocarburants, visant à leur incorporation croissante dans les carburants traditionnels, jusqu'à atteindre 7% à partir de 2010, d'après le Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Energie.

Cependant, il existe aujourd'hui trois types de biocarburants, qui ne sont pas équivalents au plan économique ni écologique :

- Biocarburants de 1^{ère} génération. Ils sont produits à partir de trois grands types de cultures : 1) les huiles végétales (colza, tournesol), qui après modifications chimiques produisent des biodiesels qui sont mélangés au gazole (Casanave et al., 2007) ; 2) les plantes amylacées (blé, maïs) dont est extrait l'amidon puis le glucose en tant que sucre fermentescible pour la production d'éthanol à mélanger à l'essence ; 3) les plantes sucrières (betteraves, canne à sucre) dont est directement extrait le glucose en tant que substrat de fermentation pour produire le bioéthanol à mélanger à l'essence.
- Biocarburants de 2^{ème} génération (Margeot et al., 2009). Ils sont produits à base de biomasse de type lignocellulose (la fraction la plus importante des plantes), comme par exemple les résidus agricoles (paille de blé, tiges de maïs, etc) ou résidus forestiers (Da Silva Perez et al., 2011), ou encore des sous-produits de la transformation du bois et du papier. Deux voies de transformation sont possibles : 1) thermochimique par gazéification de la biomasse puis recondensation du gaz produit en hydrocarbures pour mélange avec le gazole ; 2) biochimique par extraction de sucres simples après hydrolyse de la lignocellulose par des enzymes pour fermentation en éthanol, à mélanger à l'essence.
- Biocarburants à partir d'algues, présentés comme la potentielle 3^{ème} génération (Schenk et al., 2008). La valorisation envisagée est de même type que pour les biocarburants de 2^{ème} génération, c'est-à-dire la transformation de sucres en bioéthanol pour mélanger à l'essence ou de lipides en biodiesel pour mélanger au gazole.

Les biocarburants de 1^{ère} génération n'utilisent qu'une faible partie de la plante, déjà valorisée par ailleurs pour l'alimentation. Au contraire, les biocarburants de 2^{ème} génération permettent de valoriser la fraction non alimentaire, notamment la lignocellulose et d'autres coproduits cellulotiques. De plus, un autre intérêt de ces biocarburants de 2^{ème} génération est qu'ils présentent un meilleur bilan en termes d'émissions de gaz à effet de serre : 70% de baisse par rapport aux carburants fossiles contre 30% pour la première génération, environ (Edwards et al., 2006). De plus, les sucres simples issus de l'hydrolyse enzymatique de la lignocellulose représentent des entités énergétiques de base utilisables pour alimenter divers procédés biologiques (Gurtler, 2008), ouvrant la voie à d'autres débouchés que les biocarburants et qui pourraient contribuer notamment au remplacement du pétrole utilisé à grande échelle dans l'industrie chimique.

b) Hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique

Le composant principal des parois végétales est la cellulose, polymère linéaire formé d'homopolymères de 8 000 à 12 000 unités de D-glucose liés en β -1-4 (degré de polymérisation autour de 10 000). La structure linéaire de la cellulose permet la formation de liaisons hydrogènes en intra et inter chaînes de cellulose, qui s'agrègent alors en fibrilles élémentaires de 36 chaînes de cellulose. Cette structure confère à la cellulose une forte résistance à l'hydrolyse enzymatique via les liaisons hydrogènes présentes entre les chaînes de cellulose adjacentes, d'où une structure cristalline et insoluble dans la plupart des solvants (Himmel et al., 2007 ; Jorgensen et al., 2007 ; Wei et al. 2009). De plus, à l'exception de rares cas (cotonnier) où la cellulose est presque pure, les fibres de cellulose sont la plupart du temps entourées d'une matrice composée d'autres biopolymères structuraux, notamment les hémicelluloses et la lignine (Figure 1), constituant respectivement 20 à 35% et 5 à 30% de la matière sèche des plantes. Les hémicelluloses sont des polysaccharides hétérogènes composés de monomères de D-glucose, D-galactose, D-mannose, D-xylose, L-arabinose, acide D-glucuronique et d'acide 4-O-méthyl-D-glucuronique, dont la composition exacte varie en fonction du type de végétal. Il s'agit d'un polymère branché, possédant un degré de polymérisation d'environ 200 et pouvant être acétylé. Enfin, la lignine est le composant d'origine non polysaccharidique le plus abondant de la lignocellulose. Elle est constituée de trois monomères de base : alcool D-paracoumarylique, alcool coniférylique et alcool sinapylique, connectés par des liaisons éther (Jorgensen et al., 2007).

Ces trois polymères vont s'imbriquer et interagir pour former une structure complexe et résistante. La lignine forme une couche protectrice autour de la cellulose. Elle est aussi capable de former des liaisons covalentes avec l'hémicellulose. Enfin, une couche de cellulose amorphe peut également entourer la cellulose cristalline, ce qui limite d'autant plus l'accès des enzymes cellulolytiques (Wei et al., 2009). Ainsi, les microfibrilles s'organisent en macrofibrilles assurant la stabilité structurale de la paroi cellulaire végétale (Rubin, 2008).

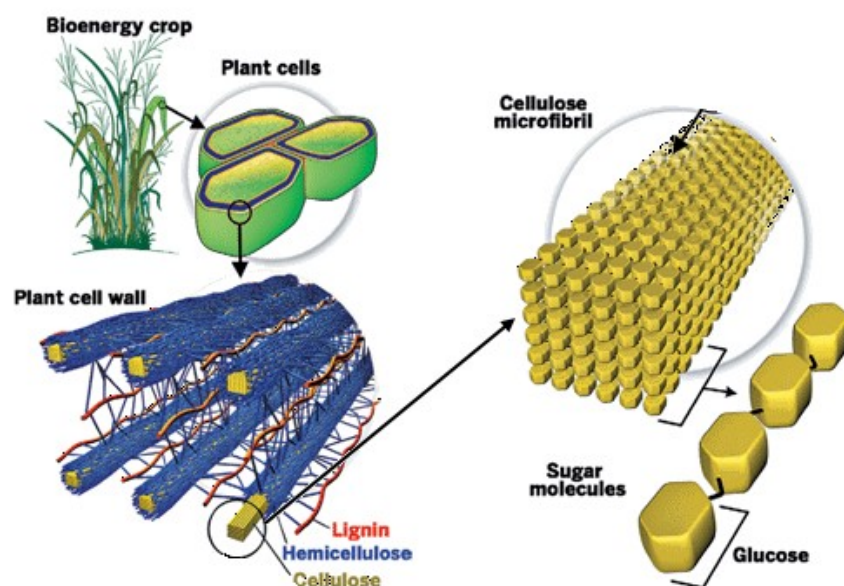


Figure 1 : Organisation de la lignocellulose aux différentes échelles, d'après Ritter et al., 2008

Cette complexité des parois cellulaires nécessite donc une action synergique de trois catégories d'enzymes pour assurer efficacement l'hydrolyse destinée à libérer leurs monosaccharides constitutifs : les cellulases divisées en « endoglucanases » et « exoglucanases », les hémicellulases et des enzymes accessoires modifiant et dégradant la lignine :

- Les exoglucanases (ou exo-1,4- β -d-glucanases ou cellobiohydrolases ou CBH) clivent les unités de cellulose aux extrémités des chaînes et présentent une activité élevée sur la cellulose cristalline. Les CBH I agissent au niveau des extrémités réductrices et les CBH II au niveau des extrémités non réductrices.
- Les endoglucanases (ou endo-1, 4- β -d-glucanases ou EG) peuvent hydrolyser les chaînes de cellulose en leur milieu (via la liaison glucosidique en β -1,4). Leur action est plus particulièrement efficace sur les zones amorphes, ce qui génère de nouvelles extrémités hydrolysables par les enzymes de type CBH.

Enfin, les diholosides tels que le cellobiose et les autres oligosaccharides solubles résultant de l'action de ces deux enzymes sont clivés par les β -glucosidases (ou BG) en glucose (Aro et al., 2005 ; de Vries & Visser, 2001 ; Harman & Kubicek, 1998). L'action de ces principales enzymes est schématisée en Figure 2.

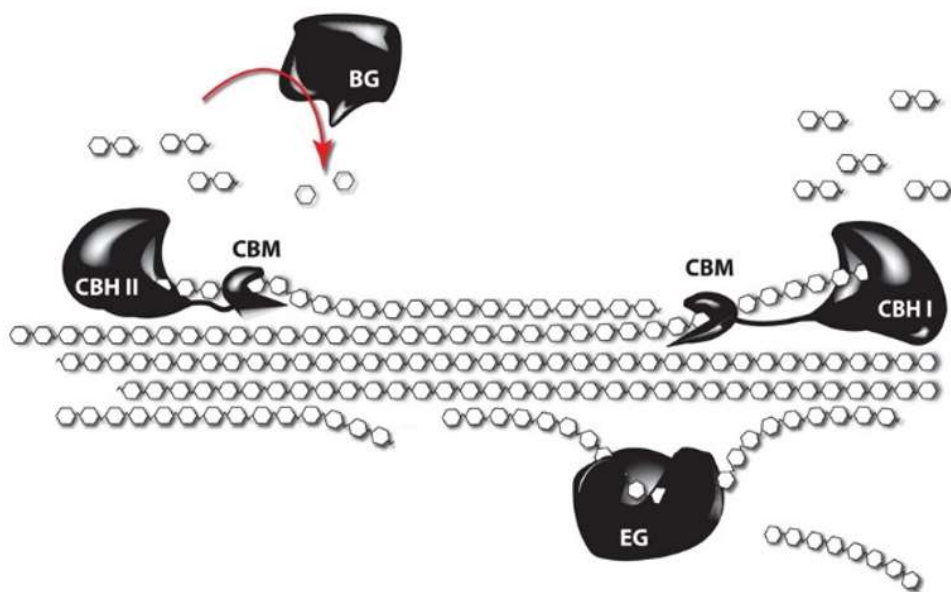


Figure 2 : Actions des principales enzymes du sécrétome de *T. reesei*. BG = β -glucosidase, CBH I = Cellobiohydrolase, CBH II = Cellobiohydrolase, EG = Endoglucanase. Adapté d'après Vanholme et al. 2013.

c) *Trichoderma reesei*

Trichoderma reesei est un champignon filamenteux, issu de l'embranchement des Ascomycètes, qui regroupent l'ensemble des organismes possédant un thalle septé ou unicellulaire (levures). Si leur reproduction peut être sexuée, avec formation de spores méiotiques (ascospores) dans des asques en forme de massue ou de sac, beaucoup d'Ascomycètes se reproduisent par multiplication asexuée. Les souches de *T. reesei* employées aujourd'hui pour la production de cellulases proviennent d'un isolat naturel nommé QM6a découvert durant la Seconde Guerre Mondiale dans les îles Salomon à cause de la détérioration des tentes et uniformes en coton de l'armée américaine (Seiboth et al., 2011). A l'origine nommé *T. viride*, la souche a été reconnue comme une nouvelle espèce et nommée d'après l'un des premiers chercheurs l'ayant caractérisée, Elwyn T. Reese (Reese, 1976). Par la suite, grâce à des analyses phylogénétiques, *T. reesei* n'a pu être discriminé du champignon *Hypocrea jecorina*, suggérant qu'ils appartiennent à la même espèce (Kuhls et al., 1996). Cependant, étant donné ces raisons historiques, le nom *T. reesei* reste le plus utilisé pour la désignation de l'espèce dans les publications et brevets. Enfin, le séquençage du génome de la souche de référence, *T. reesei* QM6a, a été effectué en 2008 (Martinez et al., 2008). La séquence, contenant 33,8 Mb contient 9129 gènes dont seulement 2 codent pour les cellobiohydrolases. La séquence complète est disponible via le Joint Genome Institute (JGI, <http://genome.jgi.doe.gov/Trire2/Trire2.home.html>).

La principale raison de l'intérêt suscité par *T. reesei* repose sur le fait qu'il s'agit d'un hyperproducteur de cellulases. Les souches actuelles ont été obtenues après plusieurs étapes de mutagenèse aléatoire et de sélection (Durand et al., 1988a). L'objectif était d'améliorer la souche de référence QM6a pour la production de cellulases, via l'emploi d'agents mutagènes

chimiques ou physiques. Au sein d'IFPEN, la souche de référence est *T. reesei* CL847. Son pool enzymatique est composé d'une vingtaine d'enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose dans le cas d'une croissance sur lactose-xylose (Herpoël-Gimbert et al., 2008). La généalogie simplifiée entre QM6a et CL847 est présentée en Figure 3.

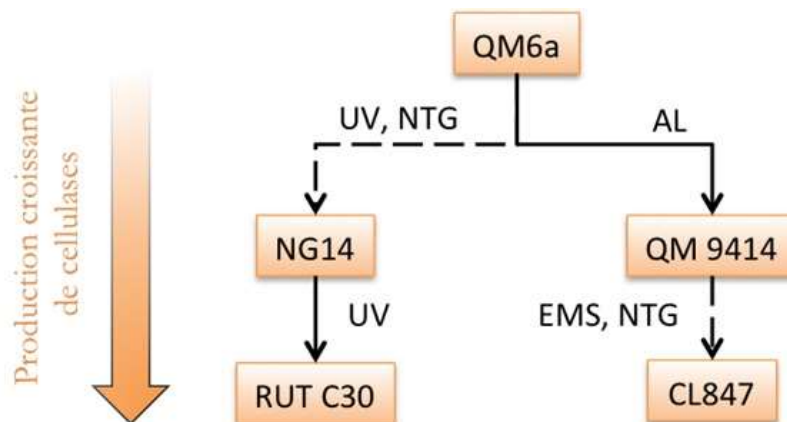


Figure 3 : Généalogie simplifiée des souches de *T. reesei* les plus étudiées, d'après Durand et al., 1988a. Pointillés = étapes de mutagénèse multiple ; UV = Ultraviolet, NTG = Nitrosoguanidine, AL = Accélérateur Linéaire, EMS = Ethylmethylsulfonate.

La grande majorité du pool enzymatique de *T. reesei* est constitué de cellobiohydrolases, notamment Cel7A (CBHI) et Cel6A (CBHII), qui représentent 70 à 80% de la totalité des cellulases sécrétées par CL847 lors d'une culture sur lactose, comme le montre la Figure 4.

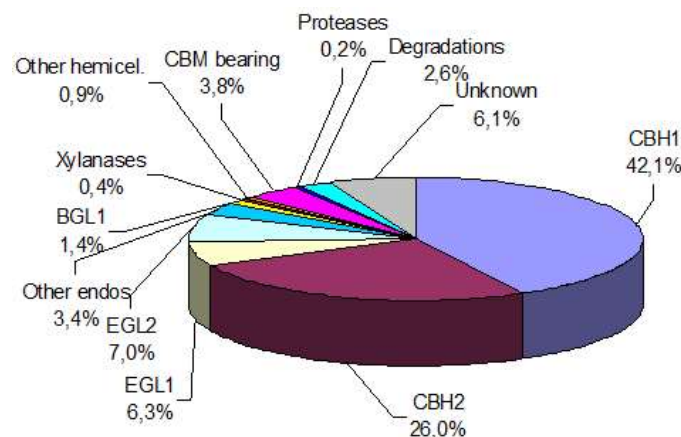


Figure 4 : Exemple de composition du cocktail enzymatique de CL847 après culture sur milieu lactose-lactose. D'après Margeot, 2014.

d) Les stades de développement de *Trichoderma reesei*

La biologie fongique est inextricablement liée aux spores, parties intégrantes du cycle de vie d'un champignon filamenteux, et contraignent sa manipulation. Les expérimentations sur les champignons commencent toujours par des spores et se terminent quand la culture a démarré une nouvelle production de spores. Il est donc essentiel de connaître les stades de développement du champignon ainsi que les morphologies associées. Il existe trois phases

dans le développement fongique : la germination, la croissance et la sporulation, comme présentées en Figure 5.

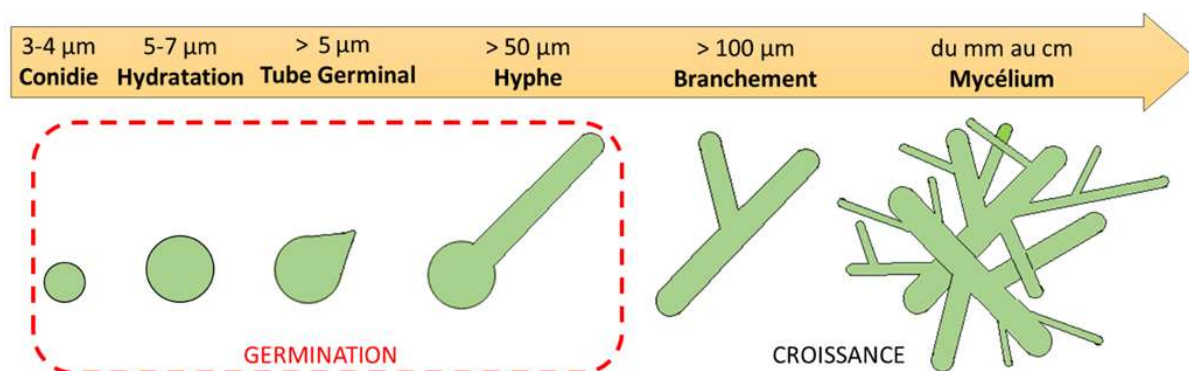


Figure 5 : Schématisation des différents stades de croissance des champignons filamenteux et ordres de grandeurs associés. Focus sur les stades précoces de développement : la germination (encart rouge).

La germination est un processus divisé en quatre étapes : 1) activation : la spore sort de son état de dormance en réponse à des conditions environnementales appropriées, 2) gonflement isotrope (entrée d'eau et de nutriments), 3) établissement d'une polarité cellulaire et 4) formation d'un tube germinal qui conduira à un hyphe puis au mycélium (d'Enfert et al., 1997). L'activation (1) nécessite des facteurs environnementaux essentiels tels que l'eau, l'oxygène et le dioxyde de carbone ainsi que des facteurs additionnels tels que les acides aminés, les sucres et les sels. Ceux-ci dépendent de l'espèce fongique. La croissance isotrope (2) représente le premier changement morphologique de la germination. Elle est concomitante à l'entrée d'eau (d'où son gonflement de 2 à plusieurs fois son diamètre de dormance, cf Figure 5) et à la résurgence d'activités métaboliques telles que la synthèse de protéines et d'ARN.

Les hyphes ou éléments végétatifs filamenteux, sont caractérisés par des structures tubulaires d'un diamètre moyen de 4 à 6 µm formant des filaments longs, fins et ramifiés. Ceux-ci créent une masse emmêlée appelée mycélium ou thalle. Les hyphes sont composés d'une paroi externe, plongée dans une matrice de polymères de glucose (glucanes) ou de mannose (mannanes) et de protéines. Selon les classes de champignons, les hyphes peuvent être segmentés (septés) par des cloisons transversales solidaires de la paroi (septum) qui se forment à intervalles réguliers. Chaque branche possède une extrémité (ou apex) qui permet son extension. Par itération de cette unité modulaire d'hyphe, le mycélium se forme par expansion radiale. Par la suite, des hyphes branchés peuvent être pontés par de courtes excroissances qui connectent le mycélium tout entier afin de former une continuité protoplasmique (Maheshwari, 2012). Ainsi, tous les organites cellulaires vitaux sont présents dans l'apex des hyphes, sur une région d'environ 100 µm de long, afin de permettre l'extension des extrémités terminales. Le mycélium se répand alors dans le substrat et sécrète des enzymes digestives qui décomposent les constituants du substrat afin de permettre l'absorption de solutés carbonés, azotés, phosphatés ou sulfurés.

Il est opportun de préciser que la souche de *Trichoderma reesei* utilisée au laboratoire (CL847) et descendant de QM6a, est un clone asexué haploïde (Saloheimo et al., 2014) produisant deux types de spores : des conidies et des chlamydospores (Howell, 2003).

e) Transformations génétiques de *Trichoderma reesei*

Au-delà de la mutagénèse aléatoire (Figure 3) ayant permis d'améliorer sensiblement les souches de *T. reesei* à des fins industrielles, les équipes de recherche se sont tournées vers l'ingénierie génétique afin d'optimiser non plus quantitativement, mais qualitativement, le sécrétome fongique. Pour atteindre cet objectif, il est nécessaire de modifier des séquences génomiques d'intérêt. Cette méthode, ou transformation génétique, nécessite la pénétration d'un transgène à travers la paroi fongique. Les transformations reposent donc sur la conception du vecteur d'ADN, qui peut être soit circulaire (cas du plasmide bactérien), soit linéaire (cf I-f). Les séquences principales du vecteur sont un marqueur de sélection fongique (cf I-g) et/ou une séquence génétique d'intérêt. Celle-ci doit être encadrée d'un promoteur (cf I-i) et d'un terminateur pour permettre la synthèse protéique.

D'autre part, les transformations reposent sur une procédure permettant d'introduire le vecteur dans le champignon. Elle peut être réalisée via des méthodes biologiques ou physiques. La première transformation fongique a été rapportée en 1973 par Mishra & Tatum sur une souche de *Neurospora crassa*. En 1978, Hinnen et al. proposent une méthode de transformations de levures, qui deviendra par la suite la « méthode des protoplastes » ou « méthode CaCl_2/PEG », en utilisant le marqueur de sélection leucine sur une souche de *Saccharomyces cerevisiae*. Au-delà de cette méthode devenue référence (calcique/PEG), d'autres protocoles de transformations se sont développés, basés sur les protoplastes mais aussi sur des spores. Les principaux types de transformations génétiques pour les champignons filamenteux sont récapitulés en Figure 6.

Mycelial treatment	References
Protoplasts	
CaCl ₂ /PEG	Peberdy (1989) and references therein
liposomes	Radford <i>et al.</i> (1981)
electroporation	Ward <i>et al.</i> (1989); Thomas & Kenerly (1989); Goldman, Van Montagu & Herrera-Estrella (1990)
Intact cells	
Li acetate	Fincham (1989) and references therein; Bej & Perlin (1989)
biolistic	Armaleo <i>et al.</i> (1990)

Figure 6 : Principales transformations génétiques pour les champignons filamenteux, d'après van den Hondel & Punt, 1991. CaCl_2 = Chlorure de Calcium, PEG = Polyethylene Glycol, Li acetate = Lithium Acetate.

Historiquement, la transformation calcique/PEG est la plus couramment utilisée pour les champignons filamenteux, notamment pour *T. reesei* (Pentilla et al., 1987). Cette méthode est basée sur les quatre étapes suivantes :

- Préparation des protoplastes en cellules compétentes (capacité d'intégrer le vecteur d'ADN) via la digestion enzymatique (β -(1,3)-glucanase et chitinase) de la paroi fongique, d'où l'obtention de sphéroplastes.
- Traitement de ces cellules avec l'ADN (intégration) en présence de CaCl_2 et PEG.

- Régénération des protoplastes.
- Sélection/criblage des transformants.

De plus, elle requiert la présence de stabilisateurs osmotiques (saccharose, sorbitol, NaCl, MgSO₄...) pour éviter que les protoplastes ne se disloquent. Un premier inconvénient majeur de cette méthode est la variabilité de l'efficacité de la formation des protoplastes. Ceux-ci doivent être frais car le stockage réduit fortement la fréquence de transformation. De plus, les protoplastes comptent parfois plusieurs noyaux cellulaires (problème de pluri-nucléation), ce qui nécessite de longues étapes de purification pour obtenir des transformants homocaryons. De ce fait, des méthodes physiques telles que l'électroporation (Goldman et al., 1990 ; Kim & Miasnikov, 2010) ou le tir biolistique (Lorito et al., 1993 ; Te'o et al., 2002) sont aujourd'hui couramment utilisées pour introduire le vecteur d'ADN dans les champignons filamenteux (Mach & Zeilinger, 1998). Elles présentent l'avantage d'éviter les étapes de préparation des protoplastes (pluri-nucléés) en utilisant directement des spores (haploïdes), évitant ainsi la formation de transformants hétérocaryotiques.

D'autres avantages de l'électroporation sont : 1) la simplicité de la préparation des cellules insensibles au choc osmotique (pas de stabilisateur osmotique) et 2) une plus haute reproductibilité de transformation (Mach & Zeilinger, 1998). De même, les avantages du tir biolistique sont : 1) la simplicité de la méthode permettant un nombre important de transformations dans un temps court ; 2) la facilité de standardisation de cette méthode et 3) une quantité de transformants par µg d'ADN comparable aux méthodes de référence mais avec une bien meilleure stabilité (Lorito et al., 1993).

En complément, la méthode de transformation par *Agrobacterium* (*Agrobacterium*-mediated transformation ou AMT) est apparue au début des années 2000 pour les champignons filamenteux (de Groot et al., 1998). Cette procédure est basée sur la capacité de souches d'*Agrobacterium* telles qu'*A. tumefaciens* de transférer de l'ADN à des cellules lors d'une contamination de type tumorale. L'ADN est ensuite intégré dans le génome de la cellule à une position aléatoire. Cette méthode a été utilisée tout d'abord pour des cellules végétales, puis appliquée pour des levures et des champignons filamenteux (Utermark & Karlovsky, 2008) tels que *T. atroviride* et *T. reesei* (Zeilinger, 2004 ; Zhong et al., 2007).

Les principaux avantages et inconvénients des quatre méthodes de transformation décrites précédemment sont résumés dans le tableau suivant (Tableau 1).

Tableau 1 : Principaux avantages et inconvénients des méthodes de transformation fongique.

Technique	Avantages	Inconvénients	Références
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (biologique)	Applicable aux conidies, protoplastes et hyphes. Transfert d'une seule ou d'un faible nombre de copie(s) du transgène. Coût faible.	Durée élevée car étape préalable de transfert d'ADN dans <i>A. tumefaciens</i> .	de Groot et al., 1998 Zeilinger, 2004
Protoplastes CaCl₂/PEG (biologique)	Méthode standard pour les champignons filamenteux. Robuste. Applicable à une vaste gamme de souches	Durée élevée car étape préparation des protoplastes qui doivent être frais + étape de purification des transformants polynucléés. Variabilité de l'efficacité de préparation des protoplastes (pb reproductibilité transformation).	Penttila et al., 1987 Mach et al., 1998
Tir biolistique (physique)	Simple. Rapide. Absence de prétraitement des cellules. Transformation de plusieurs transgenes possible. Indépend de la physiologie du champignon.	Equipement spécial requis (gene gun). Coût élevé. Protocole complexe de par la préparation des projectiles (greffage ADN).	Lorito et al., 1993
Electroporation (physique)	Simple. Rapide. Applicable aux procaryotes comme aux eucaryotes.	Equipement spécial requis (électroporateur). Coût moyen. Meilleure reproductibilité de transformation.	Goldman et al., 1990 (PEG) Schuster et al., 2012 (conidie)

Enfin, des protocoles alternatifs de transformation se développent, et pourraient être appliqués aux champignons filamenteux tels que *T. reesei* :

- Méthode par « agitation avec des billes de verre » (Costanzo & Fox, 1988). Les cellules fongiques peuvent être génétiquement transformées par une forte agitation avec des billes de verre en présence de vecteurs d'ADN. Il s'agit d'une méthode rapide, au coût faible mais à la faible efficacité de transformation.
- Méthode par « shock-wave » (Magana-Ortiz et al., 2013). Les suspensions de spores subissent des ondes de choc qui sont produites par l'application d'un haut voltage à travers des cristaux piézoélectriques qui s'expansent soudainement. La méthode est rapide, et serait reproductible malgré la viabilité des conidies qui peut être affectée par le traitement.

f) Vecteurs de transformation

Historiquement, le transgène est apporté à la cellule fongique via un vecteur d'ADN circulaire nommé plasmide. Il s'agit d'une molécule distincte de l'ADN chromosomique et capable d'auto-réplication, c'est-à-dire contenant au minimum une origine de répllication bactérienne (ori ou dans l'exemple de la Figure 7, pBR322) et une cassette de sélection (généralement un marqueur antibiotique). Cependant, aucun plasmide auto-répliatif n'a

encore été identifié à ce jour pour *T. reesei* (pas d'origine de réplication), bien que de tels plasmides existent chez d'autres champignons, comme par exemple *S. cerevisiae* (Brewer & Fangman, 1987) ou *A. nidulans* (Aleksenko & Clutterbuck, 1996) ou *C. albicans* (Kurtz et al., 1987). La construction du vecteur de transformation est assurée par des enzymes de restriction coupant le plasmide, puis des ligases qui le recircularisent suite à l'intégration de la séquence d'intérêt. L'organisation d'un plasmide est schématisée en Figure 7 pour pUT1140, une construction spécifique à *T. reesei* comportant une origine de réplication (origin), une cassette de sélection (sous promoteur fongique *cpc* suivi du promoteur bactérien *IM7*, du gène de résistance à l'hygromycine et du terminateur fongique *TrpC*) et une cassette d'expression (sous promoteur et terminateur de l'enzyme CBH1) où sera intégrée le gène d'intérêt. Ce plasmide est dérivé de pAN7-1 (Punt et al., 1987).

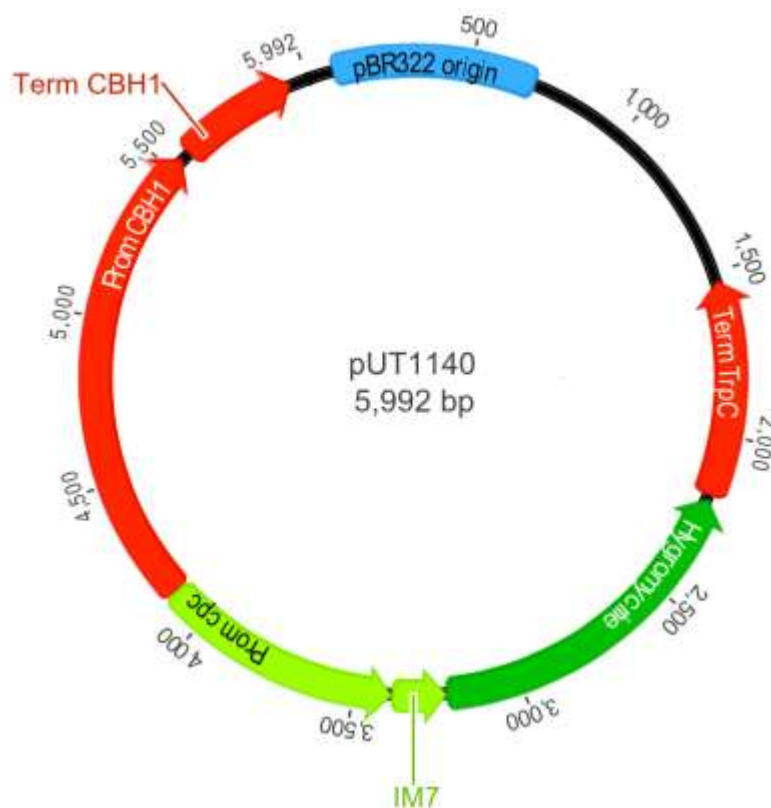


Figure 7 : Construction du plasmide pUT1140, vecteur de la transformation de *T. reesei*

Il est à noter que le vecteur de transformation peut être linéarisé avant son transfert dans la cellule fongique. C'est le cas lors d'une digestion enzymatique d'un plasmide ou de l'utilisation d'un fragment amplifié par PCR notamment.

Suite à la transformation, l'intégration du vecteur peut avoir lieu via deux grands types de mécanismes. L'intégration de type 1 est effectuée par recombinaison homologue, c'est-à-dire que tout ou partie du plasmide s'intègre au niveau d'une région du génome fongique reconnue par homologie. L'intégration de type 2 est ectopique, c'est-à-dire que le transgène s'insère de façon aléatoire dans le génome fongique sans région d'homologie apparente.

Contrairement aux levures, pour lesquelles la transformation du transgène se fait principalement par recombinaison homologe, l'intégration dans les champignons filamenteux se déroule communément de façon ectopique. En effet, la fréquence d'intégration homologe (type 1) a été déterminée de l'ordre de seulement 2% chez *T. reesei* (Mach et al., 1994). Ainsi, la cellule fongique transformée peut contenir une ou plusieurs intégration(s) du transgène, localisée(s) de façon aléatoire sur les chromosomes.

Il est donc essentiel de construire le vecteur de transformation de façon raisonnée, et en particulier la cassette de sélection comportant le(s) marqueur(s) (voir détails au chapitre g) et le(s) promoteur(s) (voir détails au chapitre i).

g) Marqueurs de sélection

La séquence génétique codant pour le marqueur de sélection est essentielle pour discriminer les cellules fongiques qui ont été transformées de celles qui n'ont pas incorporé le vecteur d'ADN. Le gène de sélection peut conférer une résistance à un antibiotique (marqueur dominant) ou compléter une auxotrophie (marqueur auxotrophique). Celle-ci est l'incapacité d'un organisme à synthétiser un composé organique spécifique nécessaire à sa croissance.

Les marqueurs antibiotiques sont les plus efficaces à l'échelle du laboratoire puisque seuls les organismes ayant intégré le gène d'intérêt seront capables de croître sur le milieu sélectif contenant le composé toxique. Contrairement aux marqueurs auxotrophiques, il n'y a donc pas de nécessité de contrôler parfaitement la composition du milieu de culture. Il y a également moins de risque de faux positifs. Les marqueurs dominants présentent cependant deux inconvénients. Le premier est la difficulté d'utiliser ces marqueurs pour des applications industrielles, non pas pour des raisons de coût (maintien d'une pression de sélection sur le vecteur plasmidique), car *T. reesei* ne conserve pas les plasmides, mais pour raisons d'acceptabilité de la souche (risque de transferts horizontaux en cas de dispersion de la souche dans l'environnement). Le second est que le marqueur dominant est à usage unique, contrairement à un marqueur auxotrophique tel que *pyrG*, qui code à la fois pour une auxotrophie à l'uracile et une sensibilité à l'acide 5-fluorouracile (5-FOA), d'où un possible système bidirectionnel (« two-way selection »). Quelques exemples de marqueurs communément utilisés pour les transformations de *T. reesei* sont proposés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Marqueurs de sélection les plus courant pour les transformations de *T. reesei*. D'après Steiger, 2013.
Aux = marqueur auxotrophique, ds = marqueur dominant, rep = gène rapporteur.

Name	Type (ds, aux, rep)	Species of origin	Description	Reference
<i>pyr4/ ura3</i>	aux	<i>T. reesei</i>	Orotidine-5'-monophosphate carboxylase activity, uridine auxotrophy (5-fluoro orotic acid resistance), bidirectional marker	Gruber <i>et al.</i> , 1990; Bergès <i>et al.</i> , 1991; Smith <i>et al.</i> , 1991
<i>ura5</i>	aux	<i>T. reesei</i>	Orotate phosphoribosyltransferase, uridine auxotrophy (5-fluoro orotic acid resistance)	Bergès <i>et al.</i> , 1991
<i>hph</i>	ds	<i>E. coli</i>	Hygromycin B resistance	Herrera-Estrella <i>et al.</i> , 1990; Mach <i>et al.</i> , 1994
<i>ben</i>	ds	<i>Neurospora crassa</i>	Benomyl resistance	Peterbauer <i>et al.</i> , 1992
<i>bar</i>	ds	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Phosphinotricin resistance	Steiger <i>et al.</i> , 2011
<i>Sh ble</i>	ds	<i>Streptoalloteichus hindustanus</i>	Bleomycin/zeocine resistance gene	Montero-Barrientos <i>et al.</i> , 2007
<i>amdS</i>	ds	<i>Aspergillus nidulans</i>	Acetamidase, bidirectional marker	Kelly <i>et al.</i> , 1985
<i>arg2</i>	aux	<i>T. virens</i>	Carbamoyl phosphate synthetase (arginine auxotrophy)	Baek <i>et al.</i> , 1998
<i>dsRed</i>	rep	<i>Discosoma sp.</i>	Red fluorescent protein	Mikkelsen <i>et al.</i> , 2003
<i>gusA</i>	rep	<i>E. coli</i>	β -Glucuronidase	Bae <i>et al.</i> , 2000
<i>gfp</i>	rep	<i>Aequorea victoria</i>	Green fluorescent protein	Zeilinger <i>et al.</i> , 1999

D'autres marqueurs sont couramment utilisés en biologie moléculaire comme gènes rapporteurs de localisation (protéines, ARN, etc), d'identification (lignées cellulaires) ou d'interactions moléculaires : ce sont les protéines fluorescentes. La plus courante est la Green Fluorescent Protein (GFP). Cette protéine a été découverte en 1962 chez la méduse *Aequorea victoria* (Shimomura et al., 1962) et le gène a été isolé et cloné en 1992 (Prasher et al., 1992). La GFP compte 238 acides aminés pour une protéine de 27,4 kDa. Elle possède deux pics d'excitation à 395 nm et 470 nm et un pic d'émission à 508 nm. Son expression a été généralisée pour d'autres organismes, tels que *C. elegans* et *E. coli* en 1994 (Chalfie et al., 1994). Les principaux avantages de la GFP qui en font un excellent gène rapporteur sont : 1) la simplicité de sa détection *in vivo* qui ne requiert pas de substrat supplémentaire pour son expression, seulement l'utilisation d'UV ou d'une lumière bleue pour l'excitation, 2) sa facilité de fusion en C et N-terminal avec de nombreuses protéines intracellulaires (protéines de fusion) sans perte d'activité, 3) sa stabilité vis-à-vis de nombreuses enzymes et milieux, 4) pas de nécessité de fixer les tissus ou cellules puis d'ajouter un révélateur, 5) son expression continue dans le temps et les différents stades de développement d'un microorganisme, 6) son expression facilement quantifiable par fluorimétrie (Lorang et al., 2001). Cependant, quelques limitations de la GFP sont : le temps de latence d'activation de son chromophore, sa dénaturation à haute température (37°C) et le besoin d'oxygène (Lorang et al., 2001).

Cependant, le gène sauvage de la GFP (*A. victoria gfp*) ne confère pas une fluorescence suffisante pour de nombreux champignons, car elle n'est pas traduite de façon optimale. De ce fait, des formes modifiées de la GFP (variants) ont été développées pour les levures (Cormack et al., 1997) et les champignons filamenteux (Fernandez-Abalos et al., 1998), afin d'accroître la fluorescence, la solubilité et la résistance au bleaching (extinction de la fluorescence lors d'une excitation prolongée). Ainsi, les principaux variants de la GFP, tels que SGFP, yEGFP ou EGFP1, possèdent au moins la substitution à l'acide aminé 65 d'une sérine par une thréonine, d'où un décalage du maximum d'excitation à 488 nm.

De ce fait, la GFP et ses variants sont aujourd'hui couramment utilisés chez *T. reesei* à différentes fins, telles que la localisation de protéines intracellulaires (Mustalahti et al., 2013), le test de nouveaux promoteurs (Zou et al., 2012), ou l'étude de facteurs de transcription dans différentes conditions d'induction des cellulases et xylanases (Lichius et al., 2014), par exemple. Parmi les différentes études utilisant la GFP chez *T. reesei*, il apparaît que la protéine soit capable de marquer les cellules fongiques à différents stades de germination, bien que le mycélium soit la forme la plus courante. De plus, et Zhong al. (2011) ont eu recours à la GFP comme gène rapporteur pour le screening de transformants de *T. reesei* obtenus par AMT. Les auteurs décrivent la GFP comme un rapporteur vital représentant une stratégie prometteuse pour accélérer les études de mutagenèse et d'analyse des fonctionnalités génomiques de *T. reesei*.

Cette approche de criblage de transformants basée sur la fluorescence représente un fort potentiel pour permettre à terme un remplacement des marqueurs dominants. Il s'agit de la thématique centrale de notre étude, avec une originalité supplémentaire. En effet, Zhong et al. (2011) se placent à une échelle intermédiaire de criblage, puisqu'ils n'utilisent plus un comptage sous microscope mais une détection automatisée de la fluorescence en plaque 96 puits. Cependant, nous sommes convaincus qu'une telle approche serait d'autant plus puissante une fois combinée à des outils de criblage haut débit, comme par exemple la cytométrie en flux (CMF). En effet, l'efficacité de transformation ne permet pas aujourd'hui une détection certaine de la fluorescence à l'échelle des microplaques. Or l'identification d'une dizaine de millions de transformants en cytométrie en flux serait envisageable en 1 heure par exemple. Enfin, un criblage complet serait finalement possible en récupérant des populations transformées (y compris avec différents transgènes, marqués par différents protéines fluorescentes) via le recours à un trieur de cellules (« cell sorter »).

A notre connaissance, aucune étude ne fait état à ce jour de cette démonstration de concept, bien que la fonction de gène rapporteur de la GFP ait déjà été exploitée chez *T. reesei* par cytométrie en flux (Thronset et al., 2010).

h) Cytométrie en flux (CMF)

Afin d'envisager la combinaison de marqueurs fluorescents et d'outils haut-débit, il est nécessaire de mieux comprendre l'applicabilité de ces techniques aux champignons filamenteux. En effet, l'analyse et le screening de champignons par cytométrie en flux sont peu développés par rapport aux études sur les cellules de mammifères, levures ou bactéries,

étant donné les limitations imposées par la taille et la structure du mycélium. En particulier, le développement filamenteux de ces espèces peut provoquer une obstruction des canaux et la présence de spores représente une difficulté supplémentaire pour le nettoyage ainsi qu'un risque de dissémination. Cependant, la première étude de l'activité métabolique de *N. crassa* avait été réalisée en cytométrie en 1978 (Serna & Stadler, 1978).

La cytométrie en flux est une mesure des propriétés physiques et optiques des cellules transportées par un liquide vecteur jusqu'à une source d'excitation lumineuse. La grande force de la CMF est de considérer individuellement chaque cellule. Elle permet d'effectuer une analyse multiparamétrique de chacune, à la fois qualitative et quantitative, de façon non destructive, très rapide et avec une sensibilité élevée. La limite de la méthode est la nécessité de placer le matériel biologique à étudier en suspension, il est donc nécessaire d'isoler les populations (pas d'étude directe d'un tissu ou d'un biofilm par exemple). Les principaux composants de la CMF sont décrits en Figure 8.

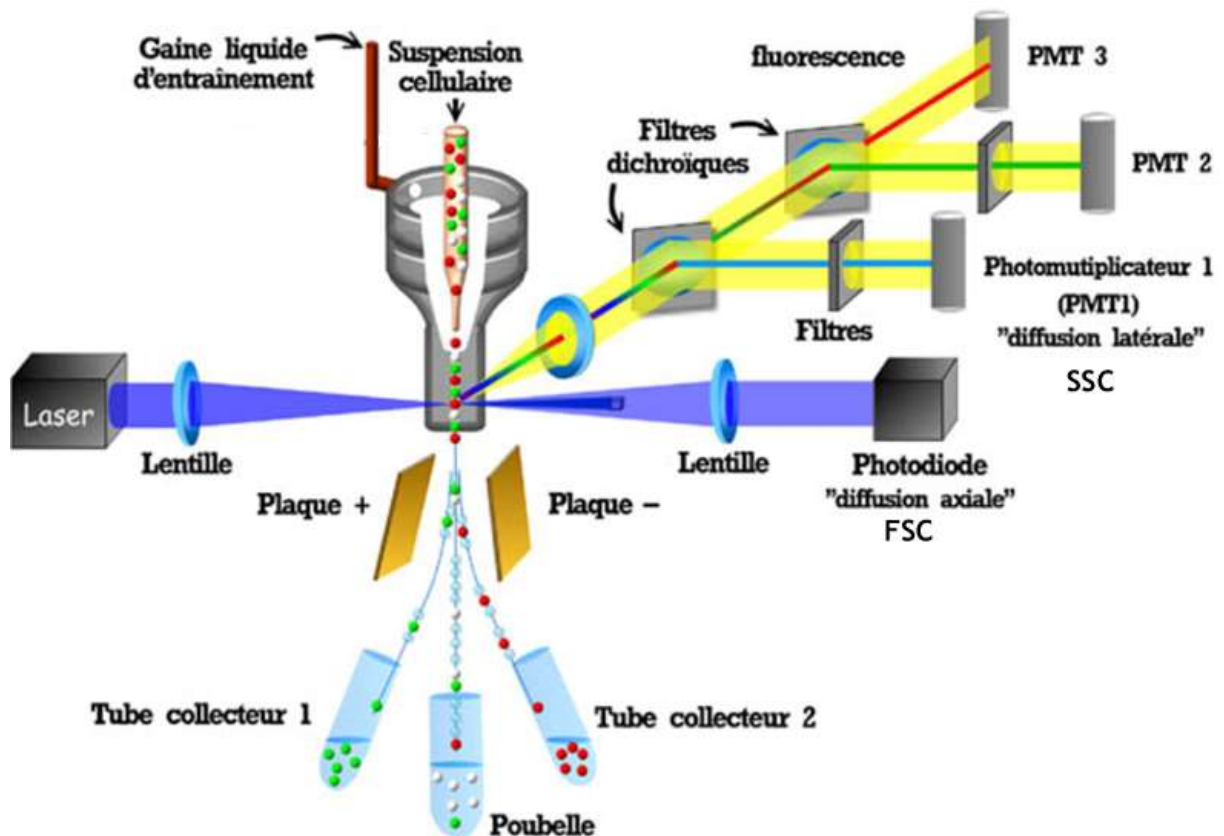


Figure 8 : Composantes d'un cytomètre en flux associé à un trieur de type FACS, d'après Fraiser et Brown, ISV.

Sur le plan historique, Andrew Moldavan (1934) introduit le concept de comptage de cellules par mesure d'extinction des signaux lors du passage des cellules circulant dans un tube capillaire devant un détecteur photoélectrique. En 1953, un système d'injection de l'échantillon dans un flux laminaire est employé pour la première fois (Crosland-Taylor, 1953) et en 1969, le laser est adopté comme source lumineuse (Van Dilla et al., 1969). En 1973, Herzenberg décrit l'analyse et le tri cellulaire en utilisant le système de déflection des gouttes sur un appareil appelé « Fluorescence Activated Cell Sorter » (FACS) (Hullet et al., 1973). Les

premiers appareils seront commercialisés à partir de 1974 et de nombreuses améliorations seront ensuite apportées, depuis le nombre croissant de lasers, jusqu'à l'association à un ordinateur pour le traitement des données.

La CMF a été utilisée comme outil d'étude des champignons filamenteux pour différentes applications telles que la détermination de la viabilité cellulaire de *C. albicans* (Wenisch et al., 1997), la caractérisation morphologique de différents types de spores issues de basidiomycètes ou myxomycètes (Allman, 1992) ou encore l'évaluation du contenu génétique de spores hétéroplœides chez *P. ostreatus* (Kullman, 2000). D'autres études morphologiques et métaboliques de champignons filamenteux ont également été réalisées, comme par exemple pour *Trichoderma*, *Penicilium* et *Phoma* (Bradner & Nevalainen, 2003).

Du fait de l'impossibilité d'étudier directement le mycélium en CMF, il est nécessaire d'avoir recours aux spores. Cependant, celles-ci sont imperméables aux marqueurs et métaboliquement peu actives. Les marqueurs métaboliques ou d'acides nucléiques ne seront donc détectés que dans une courte fenêtre temporelle : lors des premiers stades de la germination. Le prochain verrou est donc la nécessité de disposer de marqueurs exprimés de façon précoce et forte afin d'être détectables en CMF. De ce fait, une étape de screening sur les promoteurs contrôlant l'expression des marqueurs est indispensable pour obtenir ces deux caractéristiques.

i) Choix du promoteur

Un promoteur est une séquence d'ADN de 20 à 1000 paires de bases qui permet la fixation d'ARN polymérases (notamment Pol II chez les eucaryotes) initiant la transcription de l'ADN en ARN. La séquence du promoteur est typiquement localisée en amont du site d'initiation de la transcription (extrémité 5'). Elle est généralement constituée d'un élément central (« core-élément ») contenant des régions dites consensus et des régions régulatrices du niveau de transcription pouvant être situées en amont ou en aval : les « enhancers » et les « silencers ». La connaissance des promoteurs est essentielle lors de leur utilisation comme outil moléculaire. Il est nécessaire d'évaluer leur niveau d'expression (fort ou faible) ainsi que leur caractéristique constitutive, répressible ou inductible.

Chez *T. reesei*, le pool enzymatique a été très étudié et en conséquence, les gènes tels que *cbh1* et *cbh2* sont bien caractérisés. Ainsi, leurs promoteurs représentent une bonne base pour évaluer l'expression d'un transgène. Le promoteur *cbh1* est tout particulièrement utilisé pour les études génétiques de *T. reesei*, en raison de sa forte expression (Steiger, 2013). Il est cependant inductible au sophorose, lactose ou cellulose et répressible au glucose, ce qui représente une difficulté de mise en œuvre supplémentaire et l'impossibilité d'utiliser des milieux de culture contenant du glucose. Plus généralement, les promoteurs les plus fréquemment utilisés pour les études de *T. reesei* sont résumés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Principaux promoteurs utilisés pour les études génétiques chez *T. reesei*. D'après Steiger, 2013

Gene name	Organism	Characteristics	Reference
<i>cbh1</i>	<i>T. reesei</i>	Strong inducible promoter, inducers: cellulose, sophorose, lactose	Ilmén <i>et al.</i> , 1996
<i>cDNA1</i> , Trire2:110879	<i>T. reesei</i>	Strong constitutive promoter used for the production of EGI, CBHI on glucose	Nakari-Setälä <i>et al.</i> , 1995; Uzbas <i>et al.</i> , 2012
<i>eno1</i>	<i>T. reesei</i>	Strong constitutive promoter used for the production of XYNII	Li <i>et al.</i> , 2012
<i>hbf1</i>	<i>T. reesei</i>	Promotor for hydrophobin expression	Schmoll <i>et al.</i> , 2010
<i>gpd1</i>	<i>T. reesei</i>	Strong constitutive promoter used for the production of XYNII	Li <i>et al.</i> , 2012
<i>nag1</i>	<i>T. atroviride</i>	Inducible promoter, inducers: N-acetyl-D-glucosamine di-N-acetylchitobiose, tri-N-acetylchitotriose	Mach <i>et al.</i> , 1999; Peterbauer <i>et al.</i> , 2002
<i>pdcl</i>	<i>T. reesei</i>	Strong constitutive promoter used for the production of XYNII	Li <i>et al.</i> , 2012
<i>pki1</i>	<i>T. reesei</i>	Strong constitutive promoter, used for hph gene expression	Mach <i>et al.</i> , 1994; Delgado-Jarana <i>et al.</i> , 2000
<i>tef1</i>	<i>T. reesei</i>	Strong constitutive promoter used for the production of EGI, CBHI on glucose	Nakari-Setälä <i>et al.</i> , 1995; Uzbas <i>et al.</i> , 2012
<i>xyn1</i>	<i>T. reesei</i>	Inducible promoter, inducer: xylose, repressor: glucose	Rauscher <i>et al.</i> , 2006; Steiger <i>et al.</i> , 2011

CBHI, cellobiohydrolase (Cel7A); EGI, endo- β -1,4-glucanase; XYNII, endo- β -1,4-xylanases.

Au-delà de *cbh1*, il existe d'autres promoteurs pouvant générer une forte expression mais qui ne nécessitent pas de système d'induction : les promoteurs dits constitutifs. Le délai apporté par l'induction est donc supprimé par le recours à ce type de promoteurs, ce qui représenterait un avantage dans la recherche d'une expression la plus précoce possible. En effet, ce point est essentiel dans le cadre d'applications en lien à un outil haut-débit tel que la cytométrie en flux, puisque ce sont les premiers stades de germination des spores qui sont étudiés.

Les éléments de la stratégie du choix des promoteurs pour la présente étude sont détaillés au Chapitre IV, a). Les recherches se sont appuyées sur une étude bibliographique et l'émission d'hypothèses quant aux avantages et inconvénients potentiels de chacun. Neuf promoteurs constitutifs ou inducibles ont finalement été sélectionnés afin de déterminer leur impact sur l'expression de deux variants de la GFP dans des spores de *T. reesei*, observée en cytométrie en flux.

III. Matériels et Méthodes

a) Matériel biologique et constructions génétiques

La souche mère pour ce projet est *T. reesei* CL847 (voir généalogie en Figure 3). Les constructions étudiées sont issues de trois groupes de transformation, réalisés entre 2013 et 2015, à l'aide de différents vecteurs. Les caractéristiques des 21 souches étudiées sont détaillées dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Caractéristiques des constructions génétiques étudiées. La cassette de sélection est toujours composée du marqueur antibiotique Hygromycine sous contrôle du promoteur cpc. Trois transformations distinctes ont été réalisées pour obtenir les 21 souches : T1, T2 et T3.

Transformation	Vecteur	Promoteur	Rapporteur	Nom Construction
Calcique (T1)	pUT1140	cbh1 long	LGFP	pUT1140-LGFP(T1)
Biolistique (T2)	2PLS ² H ²	cbh1 court	LGFP	pCBH1C-LGFP
		gpd		pGPD-LGFP
		hfb		pHFB-LGFP
		hyd		pHYD-LGFP
		pdh		pPDC-LGFP
		pki		pPKI-LGFP
		ptp		pPTP-LGFP
		tbp		pTBP-LGFP
		tef		pTEF-LGFP
Calcique (T3)	pUT1140	cbh1 long	LGFP	pUT1140-LGFP(T3)
	2PLS ² H ²	cbh1 long	EGFP	pCBH1L-EGFP
		cbh1 court		pCBH1C-EGFP
		gpd		pGPD-EGFP
		hfb		pHFB-EGFP
		hyd		pHYD-EGFP
		pdh		pPDC-EGFP
		pki		pPKI-EGFP
		ptp		pPTP-EGFP
		tbp		pTBP-EGFP
		tef		pTEF-EGFP

La première étape des constructions génétiques est l'intégration du gène rapporteur (LGFP ou EGFP) dans le vecteur de transformation (pUT1140 ou 2PLS²H²). Leurs cartographies, présentées respectivement en Figure 7 et Annexe A, montrent la présence du promoteur cbh1 pour les deux vecteurs. Par défaut, les variants de la GFP seront donc placés sous son contrôle, ou une étape supplémentaire de remplacement de pCBH1 par un autre promoteur devra être effectuée.

Les constructions génétiques étudiées pour ce projet ont été réalisées sur 3 ans, certains protocoles ont donc évolué (tampon, enzymes etc). Le détail des différentes étapes propres à chaque cas est récapitulé pour une meilleure lisibilité en Figure 9 :

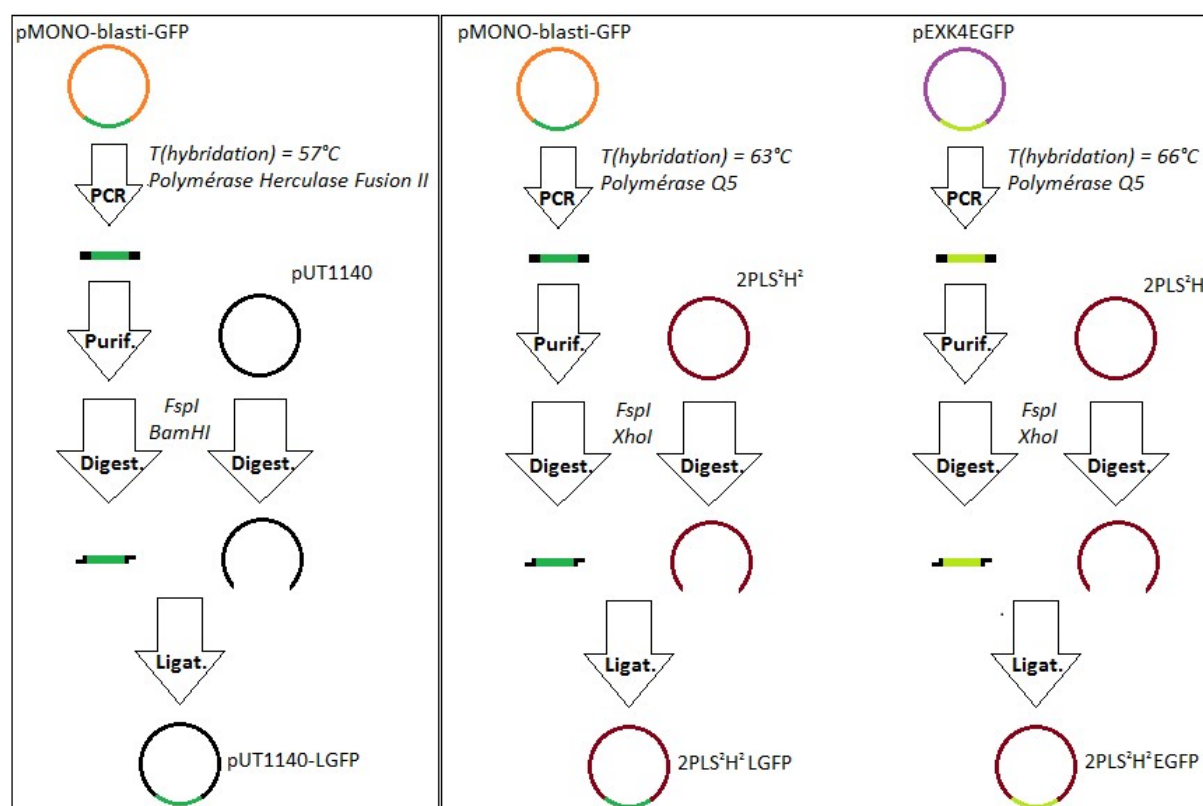


Figure 9 : Schématisation des premières étapes de constructions génétiques des vecteurs de transformation T1, T2 et T3. Les étapes de purification et ligation sont les mêmes pour toutes les constructions. PCR = Polymerase Chain Reaction, Purif. = purification, Digest. = digestion, Ligat. = ligation.

- Le variant LGFP (porté par le plasmide commercial pMONO-blasti-GFP, InvivoGen) a été amplifié par la polymérase Herculase Fusion II (Agilent) dans 50 μ L contenant 1 μ L d'Herculase, 1X de tampon Herculase (Agilent), 25 μ M de dNTP, 0,4 μ M de chaque oligonucléotide (voir séquences en Annexe B) et 100 ng de plasmide pMONO-blasti-GFP. Les conditions de la PCR étaient les suivantes : 2 min de dénaturation à 95°C, suivies de 35 cycles de dénaturation à 95°C pendant 20 s, d'hybridation à 57°C pendant 20 s et d'élongation à 72°C pendant 20 s, à l'issue desquels l'élongation finale est réalisée à 72°C pendant 1 min.
- Le variant LGFP (porté par le plasmide commercial pMONO-blasti-GFP, InvivoGen) a été amplifié par la polymérase Q5 (NEW ENGLAND BioLabs, NEB) dans 50 μ L contenant 0,4 μ L de Q5, 1X de tampon Q5 (NEB), 25 μ M de dNTP, 0,5 μ M de chaque oligonucléotide (voir séquences en Annexe B) et 70 ng de plasmide pMONO-blasti-GFP. Les conditions de la PCR étaient les suivantes : 30 s de dénaturation à 98°C, suivies de 35 cycles de dénaturation à 98°C pendant 10 s, d'hybridation à 63°C pendant 30 s et d'élongation à 72°C pendant 40 s, à l'issue desquels l'élongation finale est réalisée à 72°C pendant 2 min.

- Le variant EGFP (porté par le plasmide pEXK4EGFP) a été amplifié par la polymérase Q5 (NEB) dans les mêmes conditions que précédemment pour le variant LGFP amplifié par Q5, hormis la température d'hybridation portée à 66°C.
- Vérification de la qualité et de la quantité de l'étape d'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (0,4 mg d'agarose dans 40 mL de Tris/Borate/EDTA ou TBE), avec le marqueur de poids moléculaire 2-Log (NEB). Couplage avec un dosage au NanoDrop (Thermo SCIENTIFIC).
- La purification des fragments et plasmides est réalisée à l'aide du QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN).
- La digestion des fragments LGFP et des plasmides pUT1140 est réalisée à l'aide des enzymes FspI (5 U/μL) et BamHI (20 U/μL) (NEB) dans 50 μL de volume réactionnel contenant du tampon 3 1X (NEB), de la BSA 1X (NEB) et 5 μg de matrice à digérer, à 37°C pendant 2 h.
- La digestion des fragments LGFP et des plasmides 2PLS²H² est effectuée par les enzymes FspI (5 U/μL) et XhoI (20 U/μL) (NEB) dans 50 μL de volume réactionnel contenant du tampon 4 1X (NEB), de la BSA 1X (NEB) et 3 μg de matrice à digérer, à 37°C pendant 2 h.
- La digestion des fragments EGFP et des plasmides 2PLS²H² est réalisée à l'aide des enzymes FspI (5 U/μL) et XhoI (20 U/μL) (NEB) dans 50 μL de volume réactionnel contenant le tampon CutSmart 1X (NEB) et 2,5 μg de matrice (EGFP) ou 5 μg de matrice (2PLS²H²) à digérer, à 37°C pendant 2 h.
- La purification des fragments et plasmides est réalisée à l'aide du QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN).
- La ligation des fragments aux plasmides est effectuée via le DNA Ligation Kit (TAKARA).

Suite à la ligation, les trois vecteurs obtenus sont transformés dans 50 μL d'*E. coli* (NEB® 10-beta Competent *E. coli*, NEB) décongelés sur glace. 5 μL des produits de ligation obtenus précédemment sont ajoutés et le mélange est conservé 30 min dans de la glace avant d'être placé dans un bain marie à 42°C pendant 30 s. Il est aussitôt redéposé dans de la glace durant 5 min. 950 μL de milieu riche SOC (NEB) sont ajoutés et le mélange est incubé à 37°C et 225 rpm pendant 1 h. 100 μL sont prélevés et déposés sur une boîte LB Broth Lennox (Becton, Dickinson & Co ou BC) + Hygromycine (InvivoGen) à 50 μg/mL avant incubation sur la nuit à 37°C. Le lendemain, entre 3 et 5 colonies sont repiquées en milieu liquide LB Broth Lennox (BD) à raison d'une colonie pour 5 mL de milieu. L'incubation est effectuée sur la nuit à 37°C et 180 rpm. Les cultures sont alors centrifugées (5000 g, 5 min) afin d'éliminer le surnageant. Le culot bactérien est soumis au QIAprep Spin MiniPrep Kit (QIAGEN) afin d'extraire les plasmides qui sont dosés au NanoDrop. Par ailleurs, la qualité de l'insertion est contrôlée par

électrophorèse des produits issus d'une nouvelle digestion en réutilisant les enzymes déjà employées lors des étapes précédentes (FspI et BamHI ou FspI et XhoI). La présence de deux bandes aux tailles attendues, l'une pour le plasmide linéarisé, l'autre pour l'insert, confirme la qualité des constructions pour les différentes colonies repiquées.

A l'issue de cette étape, les vecteurs pUT1140-LGFP, 2PLS²H²LGFP et 2PLS²H²EGFP sont obtenus en solution concentrée. La dernière étape des constructions génétiques est de placer le variant L ou EGFP désormais inséré non plus sous le contrôle de cbh1 mais d'autre promoteur, afin de tester la force et la précocité de l'expression de la fluorescence (détails des différents promoteurs en Tableau 4). Le protocole de remplacement de cbh1 par un autre promoteur est le suivant :

- Les promoteurs d'intérêt ont été amplifiés par la polymérase Q5 (NEB) dans 50 µL contenant 0,5 µL de Q5, 1X de tampon Q5 (NEB), 25 µM de dNTP, 0,5 µM de chaque oligonucléotide (voir séquences en Annexe b) et 200 ng d'ADN génomique de CL847. Les conditions de la PCR étaient les suivantes : 30 s de dénaturation à 98°C, suivies de 35 cycles de dénaturation à 98°C pendant 10 s, d'hybridation à $T_{\text{hybridation}}$ (voir Annexe b) pendant 30 s et d'élongation à 72°C pendant 90 s, à l'issue desquels l'élongation finale est réalisée à 72°C pendant 3 min.
- Vérification de la qualité et de la quantité de l'étape d'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (0,4 mg d'agarose dans 40 mL de Tris/Borate/EDTA ou TBE), avec le marqueur de poids moléculaire 2-Log (NEB).
- La purification des fragments est réalisée à l'aide du QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN). Couplage avec un dosage au NanoDrop (Thermo SCIENTIFIC).
- La digestion des produits d'amplification des promoteurs et des plasmides (2PLS²H²-LGFP et 2PLS²H²-EGFP) est réalisée à l'aide des enzymes XbaI (20 U/µL) et FspI (5 U/µL) (NEB) dans 50 µL de volume réactionnel contenant le tampon CutSmart 1X (NEB) et 3 µg de matrice (promoteur) ou 10 µg de matrice (plasmides) à digérer, à 37°C pendant 2 h.
- La purification des fragments (promoteurs) est réalisée à l'aide du QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN). La purification des plasmides est réalisée par électrophorèse : les 50 µL de plasmides digérés sont déposés sur gel d'agarose Low Melting à 0,8% (0,32 mg d'agarose dans 40 mL de Tris/Acetate/EDTA, TAE), avec le marqueur de poids moléculaire 2-Log (NEB). La bande d'intérêt, de poids moléculaire supérieur à 5,2 kb, est identifiée et extraite sous UV. Les plasmides (2PLS²H²-LGFP ou 2PLS²H²-EGFP) contenus dans la bande prélevée sont purifiés à l'aide du QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN).
- La ligation des fragments aux plasmides est effectuée via le DNA Ligation Kit (TAKARA).

Les dix-huit produits de ligation obtenus sont transformés dans 50 μ L d'*E. coli* (NEB® 10-beta Competent *E. coli*, NEB) décongelés sur glace. 5 μ L des produits de ligation obtenus précédemment sont ajoutés et le mélange est conservé 30 min dans de la glace avant d'être placé dans un bain marie à 42°C pendant 30 s. Il est aussitôt redéposé dans de la glace durant 5 min. 950 μ L de milieu riche SOC (NEB) sont ajoutés et le mélange est incubé à 37°C et 225 rpm pendant 1 h. 100 μ L sont prélevés et déposés sur une boîte LB Broth Lennox (Becton, Dickinson & Co ou BC) + Hygromycine (InvivoGen) à 50 μ g/mL avant incubation sur la nuit à 37°C. Le lendemain, entre 3 et 5 colonies sont repiquées en milieu liquide LB Broth Lennox (BD) à raison d'une colonie pour 5 mL de milieu. L'incubation est effectuée sur la nuit à 37°C et 180 rpm. Les cultures sont alors centrifugées (5000 g, 5 min) afin d'éliminer le surnageant. Le culot bactérien est soumis au QIAprep Spin MiniPrep Kit (QUIAGEN) afin d'extraire les plasmides qui sont dosés au NanoDrop. Par ailleurs, la qualité de l'insertion est contrôlée par électrophorèse des produits issus d'une nouvelle digestion en réutilisant les enzymes déjà employées lors des étapes précédentes (FspI et BamHI ou FspI et XhoI). La présence de deux bandes, l'une pour le plasmide linéarisé, l'autre pour l'insert, confirme la qualité des constructions pour les différentes colonies repiquées.

A ce stade, les dix-huit vecteurs contenant le variant L ou EGFP sous le contrôle d'autres promoteurs que *cbh1* sont obtenus en solution concentrée, permettant la transformation fongique (de l'ordre du μ g/ μ L).

b) Transformations fongiques

b-1) Transformation biolistique

La transformation biolistique est réalisée par micro-bombardement des spores au moyen d'un jet d'hélium sous pression. La première étape est l'enrobage des particules : 30 à 40 mg de billes de tungstène M17 (Bio Rad ; 1,1 μ m) sont lavées 3 fois dans de l'éthanol absolu et 2 fois dans de l'eau milliQ stérile puis reprises dans 1 mL d'eau milliQ stérile. La préparation pour un tir nécessite 100 μ L de billes lavées, 5 μ L de vecteur à raison d'1 μ g/ μ L, 100 μ L de CaCl_2 à 2,5M et 40 μ L de spermidine free base (SIGMA-ALDRICH) à 0,1M. Le mélange est vigoureusement vortexé et placé sur glace durant 10 min, permettant la mise au contact de l'ADN et des billes. Les particules enrobées d'ADN sont centrifugées 10 s à 429 g, le surnageant est éliminé et les billes sont lavées 2 fois à l'éthanol absolu et reprises dans 80 μ L d'éthanol absolu afin de réaliser le tir. La solution est déposée sur des macrocarriers (Bio Rad), positionnés pour une distance de tir de 3 cm.

L'étape suivante est la préparation des spores. Une culture de CL847 est effectuée sur milieu PDA en boîte de pétri pendant 1 semaine jusqu'à l'obtention d'un lit de spores homogène. Elles sont ratissées, lavées et vortexées afin de récupérer une solution de concentration finale de $5 \cdot 10^8$ spores/mL. A partir de cette solution mère, 200 μ L sont étalés sur chaque boîte. Le tir est préparé en installant le disque de rupture 1350 psi (Bio Rad), comme présenté en Figure 10. Le flux d'hélium est alors mis en route, d'où une élévation de pression qui rompt le disque (« After », Figure 10) et propulse les billes sur la boîte contenant la souche à transformer.

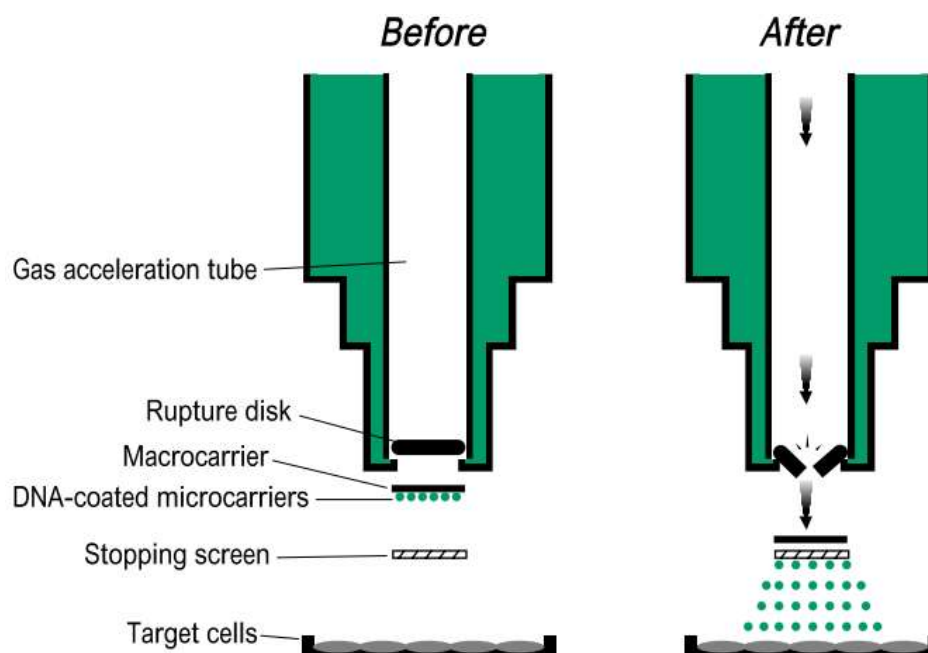


Figure 10 : Représentation du système de tir biolistique. D'après Bio Rad.

Un tir est réalisé pour chaque vecteur (soit 9 tirs au total, voir Tableau 4), à la suite desquels les boîtes sont incubées pendant 2 h à 30°C. Une surcouche de 10 mL de PDA + hygromycine (200 µg/mL) est ajoutée et les boîtes sont remises à incuber jusqu'à développement du mycélium, soit environ 2 jours. Enfin, la dernière étape est le repiquage d'une dizaine de transformants par tir en microplaques.

b-2) Transformation calcique

La première étape de la transformation calcique est l'ensemencement de CL847 dans 5 fioles de Roux contenant 200 mL de milieu PD (Potato Dextrose, BC) placées à incuber 3 jours à 30°C. Le milieu est filtré sur de la gaze afin de récupérer le mycélium, placé dans 200 mL de tampon KPAm (3,4 g KH_2PO_4 + 79,3 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + QSP Eau MilliQ pour 1 L, ajusté à pH 5,8) à 37°C et 100 rpm pendant 30 min. Suite à une nouvelle filtration sur de la gaze, le mycélium est digéré par l'incubation dans 100 mL de KPAm contenant 30 mg/mL de glucanase (Glucanex 250 G, Novozyme) durant 3h à 37°C et 100 rpm. Après filtration sur gaze déposée sur un entonnoir avec un frité n°1, les protoplastes sont récupérés dans le filtrat et purifiés par centrifugation à 4000 rpm pendant 5 min à 4°C. Le culot est concentré et lavé par une succession de resuspensions/centrifugations dans différents milieux :

- Suspension 50 mL de tampon CTS10 (136,9 g saccharose + 100 mL Tris HCL 1M à pH 7,5 + 10 mL CaCl_2 1M + QSP Eau MilliQ pour 1 L). Centrifugation à 4000 rpm, 5 min, 4°C.
- Suspension dans 20 mL de tampon CTS10. Centrifugation à 4000 rpm, 5 min, 4°C.
- Suspension dans 10 mL de tampon CTS10. Centrifugation à 4000 rpm, 5 min, 4°C.
- Suspension dans 10 mL de tampon CTS50 (13,7 g saccharose + 10 mL Tris HCL 1M à pH 7,5 + 5 mL CaCl_2 1M + QSP Eau MilliQ pour 100 mL). Centrifugation à 4000 rpm, 5 min, 4°C.
- Suspension dans 5 mL de tampon CTS50.

Un comptage des protoplastes est alors réalisé en cellule de Malassez. La suspension de protoplastes est centrifugée à 4000 rpm, 5 min et 4°C et resuspendue dans du tampon CTS50 afin d'obtenir une concentration finale de 2×10^8 protoplastes/mL.

Pour la transformation, 50 µL de cette suspension de protoplastes sont prélevés et mélangés à 5 µg de vecteurs obtenus à l'issue du paragraphe a). Après incubation à température ambiante pendant 10 min, 500 µL de tampon PEG (60 g PEG4000 + 1 mL Tris HCL 1M à pH 7,5 + 5 mL CaCl_2 1M + QSP Eau MilliQ pour 100 mL) sont ajoutés pour incubation à température ambiante durant 20 min. 450 µL de tampon CTS50 sont alors ajoutés, suivis de 40 mL de milieu PDA (Potato Dextrose Agar, BC) en surfusion contenant 2M de saccharose et 50 µg/mL d'hygromycine. Le mélange est déposé sur boîtes de pétri à raison de 8 mL/boîte contenant 20 mL de milieu PDA complété avec 0,2M de saccharose et 50 µg/mL d'hygromycine. L'incubation est effectuée à 30°C durant 4 à 5 jours.

L'étape suivante est le repiquage d'une vingtaine de transformants par transfert en microplaques, en prenant soin de prélever le plus tôt possible afin d'identifier des clones bien isolés.

c) Cytométrie en Flux

Toutes les analyses ont été réalisées à l'aide du cytomètre Cyflow Space (SYSMEX) et du laser MLS Blue 488-50 V2 (Quantum Analysis, $\lambda_{\text{excitation}} = 488 \text{ nm}$, $P = 50 \text{ mW}$). La solution tampon utilisée est le Mc ILVAINE (12,29 mL d'acide citrique 0,1M + 7,71 mL de Na_2HPO_4 0,2M) à pH 4. Tous les autres paramètres de CMF ont été ajustés à l'étude des spores de *T. reesei*, ce qui fera l'objet d'une description plus détaillée en IV) Résultats (voir IV-b). Le récapitulatif des paramètres physiques réglables pour le bon fonctionnement de l'appareil est le suivant :

- Concentration en spores [Spores]
- Vitesse d'écoulement Speed
- Sensibilité des Photomultiplicateurs (PMT), au nombre de 4
 - o FSC = taille des particules
 - o SSC = morphologie et état de surface des particules
 - o FL1 = canal de fluorescence verte
 - o FL2 = canal de fluorescence rouge
- Echelle de lecture : logarithmique de deux à quatre décades (linéaire jusqu'à $\log 4$)

Une fois l'appareil pris en main, les réglages majoritairement utilisés (chapitre IV c), d) et chapitre IV e)) pour le suivi cinétique de la fluorescence ont été les suivants : [Spores] = Dilution au $40^{\text{ème}}$, Speed 6, FSC 125 log 3, SSC 200 log 3 et FL1 450 log 4. Pour l'étude de la viabilité à t_0 , les paramètres choisis étaient les suivants : [Spores] = Dilution au $40^{\text{ème}}$, Speed 6, FSC 125 log 3, SSC 200 log 3, FL1 450 log 4 et FL2 500 log 4. Lors d'une détermination de viabilité à des temps plus avancés, les détecteurs FL1 et FL2 sont modifiés puisque les spores grossissent d'où une émission supérieure de fluorescence. Il est donc nécessaire d'abaisser la sensibilité des détecteurs afin de déplacer le pic d'origine vers la première décade des fenêtres Counts = f(FL1) et Counts = f(FL2).

Afin d'exploiter les résultats, des fenêtres graphiques ont été spécifiquement définies en fonction du besoin analytique (viabilité ou fluorescence), comme le montrent les Figures 17 (IV-c-2) et 24 (IV-c-6).

d) Observations microscopiques en fluorescence

Des observations en épi-fluorescence ont été réalisées à AgroParisTech Grignon à l'aide du microscope CyScope® HP (Sysmex), afin de confirmer la présence de spores et de mycélium fluorescents.

Une confirmation de la présence de mycélium fluorescent a également été effectuée par observations directes de cubes de gélose contenant la souche CL847 non transformée (contrôle) ou deux souches de type pUT1140-LGFP(T3) en microscopie confocale à balayage laser (MCBL) (AgroParisTech Massy) dans les conditions suivantes : microscope inversé SP2 (Leica), laser Argon ($\lambda_{\text{excitation}} = 488 \text{ nm}$), PMT 800, Offset -6.

e) Conditions de culture des souches

Dans le cas du promoteur pCBHI, il est nécessaire de procéder à une induction de celui-ci. Pour cela, un milieu de culture synthétique a été développé (E. Jourdier, IFPEN) : F45. Sa composition est la suivante : 8,7 K_2HPO_4 + 4,2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 0,3 g MgSO_4 + 1,5 g Corn Steep + 1 mL éléments traces + 11,6 g acide malique (pour 1L), ajusté à pH 6. Les spores sont issues de tubes cryoconservés à -20°C en milieu PD + Glycérol (20%). Elles sont resuspendues dans le milieu synthétique F45 + Lactose (10 g/L). Pour tester les conditions d'induction, ce milieu pourra être décliné pour une autre quantité de lactose (test de 20 et 50 g/L) ou un autre inducteur de pCBHI, comme le sorbose.

Dans le cas des promoteurs constitutifs, le milieu de culture utilisé est un milieu riche commercial, sous forme liquide PD (Potato Dextrose, BC) ou solide PDA (Potato Dextrose Agar, BC). Les suspensions de spores, fraîches ou issues de cryotubes, ont été remises en culture en milieu PD à 25°C , 125 rpm en journée entre 2 et 4h, puis à 15°C en statique sur la nuit, avant d'être replacée à 25°C jusqu'à t+24h en général.

Les levures étudiées sont issues de cultures sur boîtes (la souche sauvage sur milieu commercial YPD et les souches transformées milieu commercial CSM - ura), dont quelques colonies sont suspendues dans leur milieu liquide. L'incubation est réalisée à 25°C , 125 rpm durant 4h puis sur la nuit à 15°C en statique, comme précédemment pour les spores fongiques.

IV. Résultats

Les premières étapes expérimentales avaient pour objectifs de mettre au point le matériel génétique nécessaire aux transformations et à l'étude en cytométrie en flux (cf IV-a). Pour cela, diverses stratégies ont été évaluées afin de choisir un promoteur d'expression et un variant pour la GFP (cf IV-b). Par la suite, les expérimentations se sont concentrées sur la mise au point de la méthode cytométrique, en évaluant la compatibilité entre la CMF et le champignon (cf IV-c). Une fois le fenêtrage établi pour un bon fonctionnement, le criblage des promoteurs a démarré avec pCBHI (cf IV-d), puis huit promoteurs constitutifs (cf IV-e). Enfin, le passage de la LGFP à EGFP a permis de mettre en exergue l'importance de l'effet variant (cf IV-f).

a) Construction des premières souches fluorescentes

La première étape de cette étude était de parvenir à créer des objets de petite taille (ici spores fongiques de quelques microns) qui soient fluorescents, afin d'évaluer si des techniques de criblage haut-débit telles que la cytométrie en flux seraient en mesure de les détecter, voire de les trier. Pour atteindre cet objectif, la première étape de la stratégie a consisté en une étude de faisabilité avec pour but de valider des constructions permettant d'obtenir des spores fluorescentes. L'un des problèmes principaux identifiés pour la manipulation de microorganismes filamenteux en CMF est le seuil de coupure physique qui sera appliqué par la buse. Idéalement, il faudrait donc veiller à ce que les spores soient manipulées au début de la germination. Pour mieux contrôler les conditions de germination, l'influence de divers paramètres physico-chimiques sur la croissance des hyphes (lumière, température, oxygène et milieu de culture) a été étudiée. Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau suivant (Tableau 5).

Tableau 5 : Comparaison des effets de paramètres physiques sur la germination des spores

Paramètre	Effet ?	Commentaires
Milieu	Oui	Pas de germination dans l'eau, germination en milieu nutritif (Potato Dextrose)
Confinement	Oui	Pas de germination en « anaérobie » (scellage vernis ou paraffine) par rapport à un milieu aéré avec germination.
Agitation	Non	Pas de différence entre 0 et 150 rpm.
Lumière	Non	Pas de différence entre lumière visible et obscurité.
Température	Faible	Pas de différence entre 20 et 30°C mais pas de germination à 4°C

Deux points clef sont apparus à l'issue de ces tests : 1) il n'y a pas de germination dans l'eau, un milieu nutritif est nécessaire (source carbonée) ; 2) ni l'agitation, ni la lumière n'impactent la germination, tout comme la température sur la plage 20 – 30°C.

La plage de travail pour maîtriser la germination de spores sera donc en présence d'oxygène (bouchons en mousse), à 25°C, sous agitation ou en statique. Un milieu nutritif devra être utilisé car propice à la germination. Tester la conservation des spores dans l'eau permettrait en cas des résultats positifs de disposer d'un pool de spores « contrôles » car non germées.

Les principaux stades de germination d'une spore observés lors de l'étude de faisabilité sont présentés schématiquement à partir des observations microscopiques (optiques) réalisées sur différentes cultures de *T. reesei* (Figure 11).

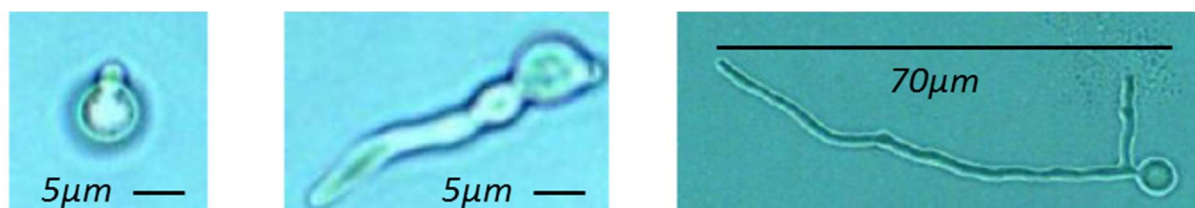


Figure 11 : {Gauche} spore bourgeonnante de 5 µm ; {Centre} spore avec un tube de germination ; {Droite} spore avec un hyphe en cours de branchement

Les objets recherchés en CMF auront donc une taille initiale comprise entre 5 µm (spores non germées) et une taille finale de 70 µm (spores avec un hyphe développé).

En se basant sur les conditions optimales déterminées précédemment, un suivi de la germination a été effectué par observations en microscopie optique, afin d'évaluer la fenêtre temporelle à appliquer en CMF (Figure 12).

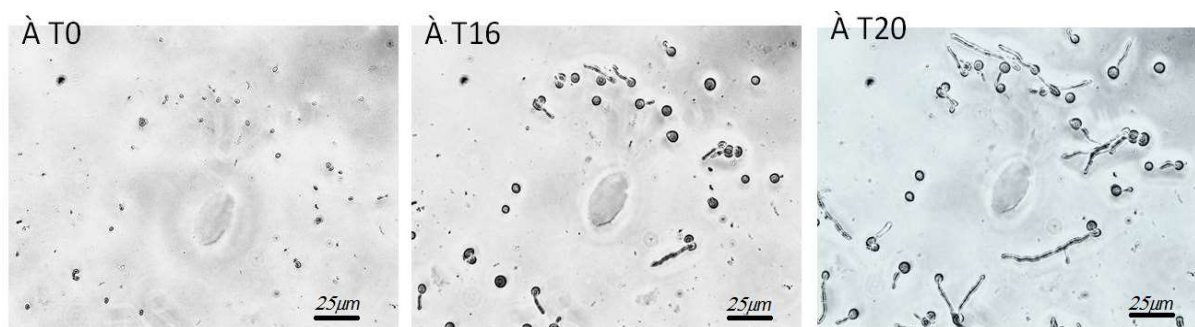


Figure 12 : Evolution d'une germination de spores au cours du temps (t0, t+16 h et t+20 h) sur milieu PDA, aérobie, 22 °C. Grossissement x10. Echelle = 25 µm.

Entre t+5 h et t+8 h, un début de gonflement est observé (le diamètre de la spore double). A t+16 h, des hyphes sont apparus, et à t+20 h, quelques branchements sont visibles. Enfin, à t+37 h, le mycélium observé est devenu très dense.

La fenêtre de temps serait donc de l'ordre de 20 h en suivi continu, ce qui n'est pas réalisable au laboratoire, à moins de séparer les observations en deux fois 10-12 h. Pour cela, une phase de croissance ralentie devra être intercalée durant la nuit séparant les observations. D'après les résultats précédents, il sera intéressant d'abaisser la température afin d'abaisser la vitesse de germination.

Une souche CL847 a été transformée avec une cassette contenant le variant LGFP, sous le contrôle du promoteur CBHI. Les premières observations en microscopie épi-fluorescente n'ont pas permis de révéler une fluorescence des spores de pCBHI-LGFP, à moins de pousser très fortement les réglages (intensité laser et PMT). Cependant, la présence de mycélium fluorescent a été validée pour vérifier que les constructions qui seront analysées en CMF ont bien été transformées. Pour cela, des observations ont été réalisées en microscopie confocale, permettant de comparer deux souches transformées avec le contrôle CL847 (Figure 13).

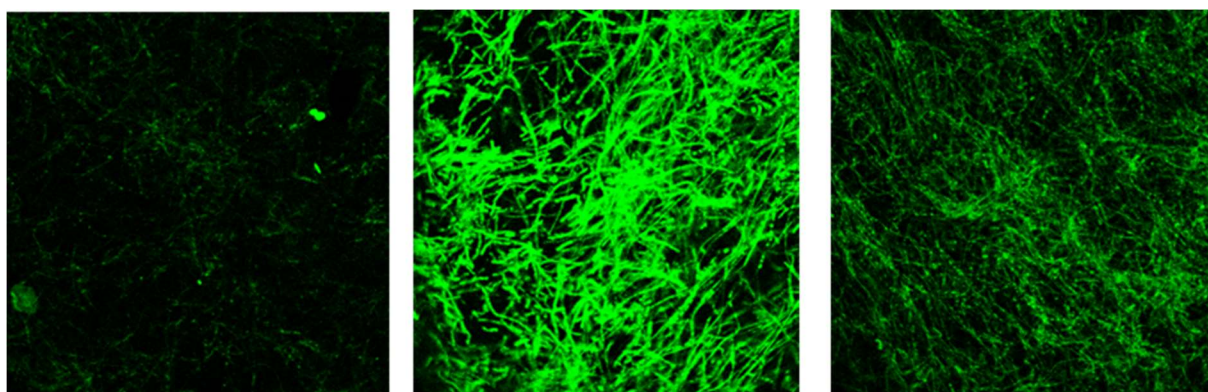


Figure 13 : Observation de la fluorescence (signal vert) à partir de gélose prélevée au centre de cultures en milieu solide pour CL847 (gauche) et deux clones pCBHI-LGFP (centre et droite). x40 (images 375 x 375 μ m).
Exemple représentatif parmi 4 à 6 images/souche.

Le mycélium est légèrement autofluorescent pour CL847 mais sans commune mesure avec les deux variants de pCBHI-LGFP, émettant un signal beaucoup plus intense, attribuable à l'expression de la GFP. Les souches expriment bien la protéine fluorescente LGFP. Ces souches seront par la suite testées en CMF, avec d'autres constructions permettant de tester un autre variant de la GFP et divers promoteurs pour le contrôle de l'expression de la fluorescence.

b) Mise au point du vecteur de transformation – quelle stratégie ?

La stratégie de recherche repose sur l'obtention de souches de *T. reesei* fluorescentes, comme montré précédemment pour la forme mycélium (Figure 13). L'expression de la GFP avait été placée sous le contrôle du promoteur CBHI (pCBHI), bien connu pour le niveau important d'expression des enzymes cellulolytiques placées sous son contrôle. Cependant, cette intensité représentait également une limitation potentielle car pCBHI contrôlant 40% de l'expression de la cellulase principale de *T. reesei*, il était possible qu'utiliser ce système pour exprimer de la fluorescence conduise à une perte de productivité des transformants (souche industrielle dédiée à la production de cellulases et non de fluorescente). De même, un

problème de recombinaison par loop out n'était pas à exclure avec les deux promoteurs pCBHI qui seraient alors présents dans la construction, le premier pour les enzymes cellulolytiques, le second pour l'expression de la GFP. Le test d'autres promoteurs constitutifs pourrait également conduire à une recombinaison, mais il est alors probable que la croissance même des transformants serait également affectée. Ceux-ci ne seraient donc pas sélectionnés et seuls les transformants sans épissage létal seraient conservés.

De ce fait, sur la base de la preuve de concept réalisée à l'aide du promoteur pCBHI bien connu, une recherche bibliographique a été entreprise afin d'identifier d'autres candidats de promoteurs. Les critères de choix étaient 1) la précocité de l'expression puisqu'en CMF, la détection n'est possible que pour les stades les plus précoces de germination ; 2) l'intensité car les capteurs doivent être en mesure de percevoir la fluorescence émise, même sur des objets aussi petits que des spores. D'autre part, lors la préparation de la présente étude, une compilation des variants de la GFP utilisés chez *T. reesei* a été réalisée. Il est apparu que la LGFP, portée par le plasmide commercial à disposition au laboratoire lors de la preuve de concept, n'était pas le variant le plus commun utilisé chez les champignons, contrairement à la SGFP et la EGFP. Dans la littérature, il apparaît comme plutôt employé dans l'étude des eucaryotes supérieurs. De ce fait, il a été décidé de garder le variant LGFP dans l'étude car déjà présent et bien connu au laboratoire, mais aussi d'anticiper une meilleure expression de fluorescence pour la CMF en utilisant un variant EGFP (variant le plus utilisé dans les publications récentes pour les champignons), dont le gène a été construit à façon pour *T. reesei* par optimisation de codon.

b-1) Choix de promoteurs alternatifs à pCBHI

La première alternative identifiée à pCBHI était les promoteurs utilisés pour l'expression des marqueurs antibiotiques. En effet, une hypothèse raisonnable est que lors de la transformation, la protection vis-à-vis des antibiotiques est probablement nécessaire très tôt lors de la germination des spores. Elle doit également être suffisante pour permettre la survie de la souche. Des promoteurs caractérisés dans la littérature pour des études de *T. reesei* sont notamment : pPKI, pTEF, pPDC et pGPD (voir Tableau 3).

La deuxième alternative à pCBHI s'est basée sur une compilation des données de RNA seq de la littérature pour deux autres ascomycètes : *Neurospora* et *Podospora* (champignons parmi les plus étudiés donc les mieux décrits). L'idée de cette recherche était d'identifier des séquences responsables de l'activation précoce d'une fonction chez *Neurospora* et *Podospora*, puis de rechercher leurs orthologues chez *T. reesei*. La stratégie était de compter sur des séquences orthologues entre les trois ascomycètes déjà connues dans la littérature, via des tables de correspondance (FUNGIpath, <http://fungipath.i2bc.paris-saclay.fr/ortho.php>). Cette recherche a permis d'établir une liste de promoteurs s'activant précocement lors de la germination. Les travaux de Kasuga et al. (2005) sur la transcription chez *Neurospora crassa* ont mis en exergue les quantités d'ARN de t0 à t+16h. L'accès aux données brutes de cette étude (Supplementary Data S2), a permis de classer 1287 ARN en fonction de l'intensité de leur activation, notamment à 2, 4 et 8h. Les 15 meilleurs candidats ont été extraits pour ces trois temps, soient 34 séquences annotées obtenues du fait des redondances. Grâce à ces

références NCU (code pour les numéros de locus attribués aux gènes identifiés), une étude des orthologues chez *T. reesei* a pu être lancée sur FUNGIpath. 30 correspondances ont été obtenues entre *N. crassa* et *T. reesei*, parmi lesquelles les 10 meilleurs candidats ont été extraits en prenant comme référence l'activation à 2 et 8h, des temps compatibles avec le cytométrie en flux et la germination des spores (voir paragraphe IV –a)). Leur profil devait également être cohérent, sans présenter de sauts d'activation/inactivation lors de la cinétique 0 – 16h. Les profils d'activation ont été tracés pour ces 10 séquences annotées (voir Annexe C-1), permettant de repérer le meilleur candidat à 2h et le deuxième meilleur à 8h (le premier donnait comme correspondance une « putative protein », soit une protéine inconnue), soient respectivement PTP (Potassium Transport Protein, NCU 06449.1, orthologue TRI120752) et TBP (Thiamin Biosynthesis Protein, NCU 09245.1, orthologue TRI121620). Ce choix a également été motivé par la logique des fonctionnalités de ces protéines : les pompes à potassium étant directement impliquées dans l'équilibre ionique de la cellule ; la thiamine (vitamine B1) étant un précurseur de l'enzyme thiamine pyrophosphate.

La même stratégie a été appliquée à partir de données de RNA seq issus de *Podospora* (données non publiées) et montrant une activation à t0, t+8h, t+16h et t+24h, soient 10 552 séquences, dont 5 335 ont un orthologue chez *T. reesei*, parmi lesquels les dix meilleurs candidats ont été identifiés. Les profils d'activation ont été tracés (voir Annexe C-2) et les deux meilleurs candidats ont été choisis sur la base de l'activation à 8h, soient HYD (Hydrolase, PA_3_10370, orthologue TRI69066) et HFB (alpha/beta Hydrolase Fold Protein, PA_5_13010, orthologue TRI106120).

Les promoteurs sélectionnés à partir de l'étude bibliographique des promoteurs les plus utilisés chez *T. reesei* ont été pPKI, pTEF, pPDC et pGPD. L'étude des données de RNA seq de *N. crassa* et *P. anserina* a également permis de sélectionner respectivement pPTP et pTBP ; pHYD et pHFB. Ces huit promoteurs feront ainsi l'objet d'une étude en association au variant LGFP et au variant EGFP, afin de déterminer s'ils permettent une expression de fluorescence compatible aux contraintes de la CMF (expression forte et précoce). Les constructions génétiques contenant ces huit promoteurs ont été réalisées, comme le montre le tableau des transformations (Tableau 4).

b-2) Conception d'un variant de GFP optimisé pour T. reesei

Des recherches ont été entreprises quant à la réalisation d'une optimisation de codons à partir du tableau de Kazusa (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>). Celui-ci a quantifié pour plus de 35 000 micro-organismes la fréquence d'usage des codons pour les acides aminés, permettant une hiérarchisation des codons pour chaque acide aminé. Dans le cas de *T. reesei* (référéncé sous sa nomenclature *Hypocrea jecorina*), le tableau de correspondance Codons/Acides aminés est le suivant (Tableau 6).

Tableau 6 : Correspondances de Kazusa entre codons et acides aminés pour *T. reesei*. Champs = codon / acide aminé / fraction / fréquence (pour mille) / (nombre). D'après <http://www.kazusa.or.jp/codon/>.

<i>Hypocrea jecorina</i> [gbpln]: 118 CDS's (54050 codons)											
fields: [triplet] [amino acid] [fraction] [frequency: per thousand] ([number])											
UUU	F	0.35	13.3	(	719)	UCU	S	0.13	10.7	(	580)
UUC	F	0.65	24.3	(	1311)	UCC	S	0.26	20.4	(	1101)
UUA	L	0.01	0.7	(	39)	UCA	S	0.08	6.4	(	345)
UUG	L	0.10	7.9	(	428)	UCG	S	0.20	16.0	(	866)
						UAU	Y	0.24	8.6	(	463)
						UAC	Y	0.76	27.5	(	1486)
						UAA	*	0.42	0.9	(	50)
						UAG	*	0.33	0.7	(	39)
						UGU	C	0.22	3.0	(	164)
						UGC	C	0.78	10.6	(	575)
						UGA	*	0.25	0.5	(	29)
						UGG	W	1.00	16.7	(	904)
CUU	L	0.12	9.4	(	510)	CCU	P	0.22	12.3	(	663)
CUC	L	0.39	29.9	(	1617)	CCC	P	0.45	25.4	(	1375)
CUA	L	0.03	2.3	(	125)	CCA	P	0.12	6.9	(	371)
CUG	L	0.35	27.3	(	1473)	CCG	P	0.21	11.9	(	641)
						CAU	H	0.23	5.3	(	285)
						CAC	H	0.77	17.7	(	957)
						CAA	Q	0.21	8.7	(	469)
						CAG	Q	0.79	31.9	(	1725)
AAU	I	0.33	16.0	(	866)	ACU	T	0.17	10.7	(	578)
AUC	I	0.63	31.0	(	1676)	ACC	T	0.43	27.2	(	1470)
AUA	I	0.04	2.1	(	115)	ACA	T	0.12	7.5	(	405)
AUG	M	1.00	20.1	(	1085)	ACG	T	0.29	18.3	(	987)
						AAU	N	0.18	8.3	(	447)
						AAC	N	0.82	38.4	(	2077)
						AAA	K	0.10	4.6	(	250)
						AAG	K	0.90	42.4	(	2293)
GUU	V	0.17	11.2	(	608)	GCU	A	0.20	18.0	(	972)
GUC	V	0.56	36.9	(	1992)	GCC	A	0.53	48.0	(	2596)
GUA	V	0.04	2.4	(	131)	GCA	A	0.12	10.5	(	566)
GUG	V	0.23	14.8	(	800)	GCG	A	0.16	14.2	(	765)
						GAU	D	0.28	15.8	(	854)
						GAC	D	0.72	41.0	(	2214)
						GAA	E	0.21	10.2	(	551)
						GAG	E	0.79	38.0	(	2052)
						GGU	G	0.16	14.0	(	754)
						GGC	G	0.60	51.0	(	2758)
						GGA	G	0.16	13.3	(	720)
						GGG	G	0.08	7.0	(	378)

Cette méthode permet de déterminer les codons majoritaires. Différentes stratégies sont alors possibles afin de tenter une optimisation de l'expression de protéines, comme la GFP : 1) utiliser tous les codons les plus représentés, 2) réaliser un système aléatoire, 3) reproduire la séquence de Kazusa dans le gène en se basant sur les proportions appliquées *in vivo*, pour se rapprocher des phénomènes vrais. C'est cette troisième option qui a été sélectionnée dans le cadre de notre étude et un gène synthétique du variant EGFP^{OPT} a été créé à façon pour *T. reesei*.

En termes de séquence protéique, le variant EGFP (ou EGFP^{OPT}) se distingue très peu du variant LGFP déjà présent au laboratoire, avec 99% d'identité, soient 237 acides aminés en commun sur 239 au total. Au contraire, les séquences nucléotidiques présentent beaucoup plus de différences (Annexe D). En effet, le pourcentage d'identité n'est plus que de 75%, soient 540 bases communes sur 720. Ce sont principalement des troisièmes bases qui sont modifiées entre les deux variants au sein des codons, soient 153 modifications sur la dernière base sur 180 au total. Cet écart plus important s'explique par la présence de codons synonymes (code dégénéré). Les résultats à venir montrent des écarts fortement significatifs en termes d'expression de fluorescence, d'où l'importance des séquences nucléotidiques employées.

c) Paramètres du suivi cinétique de la fluorescence à l'aide du cytomètre en flux : adaptation au cas des spores

Les premières étapes expérimentales du projet ont été dédiées à la prise en main du cytomètre en flux. Un exemple représentatif de l'allure d'un nuage de spores est présenté en Figure 14. Celui-ci se présente sous la forme de surfaces topographiques de couleurs différentes marquant l'intensité de la population de spores. Un premier amas apparaît au centre, un autre vers la droite de la figure. Ces profils seront explicités dans les paragraphes

suivants, l'objectif étant d'optimiser les réglages du cytomètre et l'analyse des résultats associés.

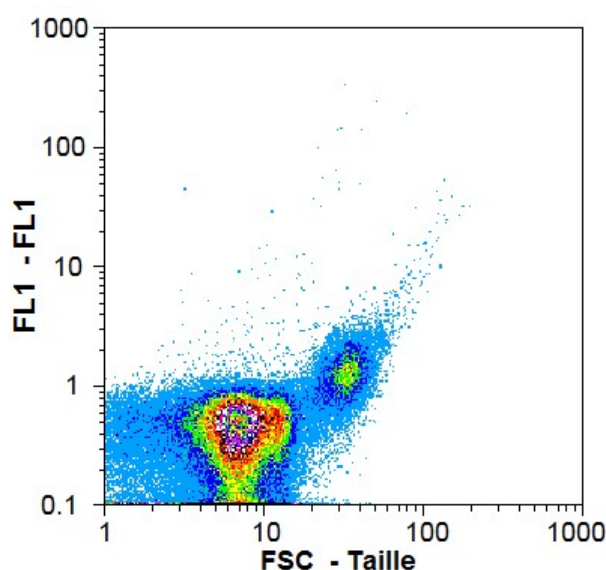


Figure 14 : Exemple de l'aspect d'un nuage de spores CL847 à t+24h. Cas de spores cryoconservées.

Etant donné le peu de connaissances préalables sur l'utilisation de cet outil pour l'étude de la germination de spores, différents points ont dû être évalués : 1) la numération des spores et leur vitesse de passage devant le laser ; 2) la viabilité des spores et l'influence des conditions de stockage et de conservation (quelle température, quels milieux ?) ; 3) la correspondance entre l'unité de taille du cytomètre et la taille réelle ; 4) l'évaluation de l'autofluorescence, c'est-à-dire la fluorescence intrinsèque des spores durant les premiers stades de germination ; 5) le fenêtrage utilisé pour le suivi cinétique de fluorescence. Cette étude a constitué le prérequis sur lequel s'est appuyée l'ensemble de la stratégie expérimentale par la suite.

c-1) Numération des spores et vitesse de passage devant le laser

La première étape lors de la prise en main du cytomètre en flux a été de déterminer quelle dilution de la suspension mère de spores devrait être utilisée pour compter de façon satisfaisante les particules en CMF. La suspension mère a été obtenue en ratissant chaque boîte de Pétri de 9 cm de diamètre avec 5 mL d'eau MilliQ stérile. Cinq dilutions de cette suspension mère ont été testées afin de déterminer l'impact sur le Count Total en CMF (Figure 15).

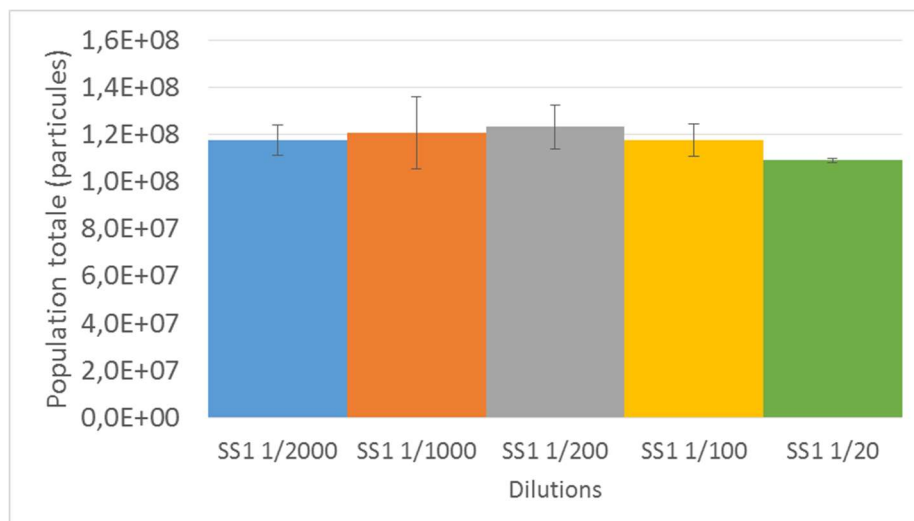


Figure 15 : Comparaison des comptages du cytomètre en flux à différentes concentrations en spores (1/20 à 1/2000). Moyennes obtenues à partir de triplicats pour un Speed 4.

La gamme de dilution 20^{ème} – 2 000^{ème} testée permet d'obtenir des résultats non significativement différents en termes de Count Total (toutes les particules détectées par l'appareil suite aux réglages des paramètres d'acquisition en CMF). Seule la dilution au 20^{ème} est légèrement en deçà, mais de façon non significative par rapport à la dilution au 1 000^{ème} notamment. Un comptage visuel en microscopie optique à l'aide d'une cellule de Thoma a été effectué (10 carrés) pour la dilution au 100^{ème} afin de valider les résultats. Il apparaît très légèrement au-dessus, avec $1,20 \cdot 10^8$ particules, contre $1,17 \cdot 10^8$ pour la CMF, soit une différence non significative. Ainsi, la CMF fournit un comptage juste, quelle que soit la dilution utilisée, bien que le 20^{ème} semble marquer la borne haute de la gamme. Durant les études suivantes, la dilution au 40^{ème} a donc été choisie pour les mesures en CMF.

Un autre paramètre d'intérêt à estimer pour la suite des expériences est la vitesse de passage des particules devant le laser, ou Speed. Trois niveaux (4, 6 et 8) ont été testés pour la borne haute de dilution déterminée précédemment, soit au 20^{ème} (Figure 16).

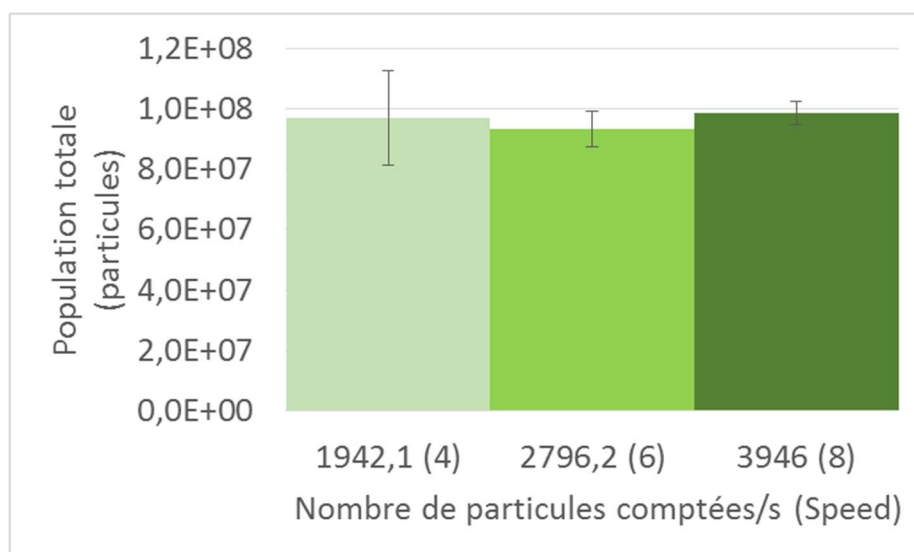


Figure 16 : Comparaison de l'impact de la vitesse de passage devant le laser (Speed) sur le Count de la CMF pour une dilution au 20^{ème} de la solution mère de spores.. Moyennes obtenues à partir de triplicats.

Les trois niveaux de Speed ont été testés afin d'obtenir entre 2 000 et 4 000 particules/s. En effet, il s'agit de la gamme optimale décrite par les utilisateurs de l'appareil, afin de trouver un compromis entre nombre de particules comptées et décantation des particules durant l'analyse. Il est à noter que la valeur à Speed 4 est bien cohérente par rapport à la manipulation précédente (Figure 15), pour la dilution au 20^{ème}. Par la suite, le réglage du Speed sera fixé à 6, d'où une vitesse de l'ordre de 3 000 particules/s, cette valeur pouvant dépendre des populations de particules étudiées. Cette valeur permettra d'avoir des analyses rapides (nombreuses suspensions de spores à tester sur une journée) et minimisant l'attente des répliquats ou des constructions testées à un temps donné.

Les réglages préliminaires de l'appareil ont permis de fixer la plage de travail pour la dilution de la solution de spores à étudier : 40^{ème}, ainsi que la vitesse de passage des particules devant le laser : 6.

c-2) Viabilité et conservation des spores

Pour les études de viabilité, un fenêtrage dédié a été utilisé : la région R1, qui est choisie sur la base des graphiques Counts = f(FSC – taille) et Counts = f(SSC – granulo), comme le montre la Figure 17.

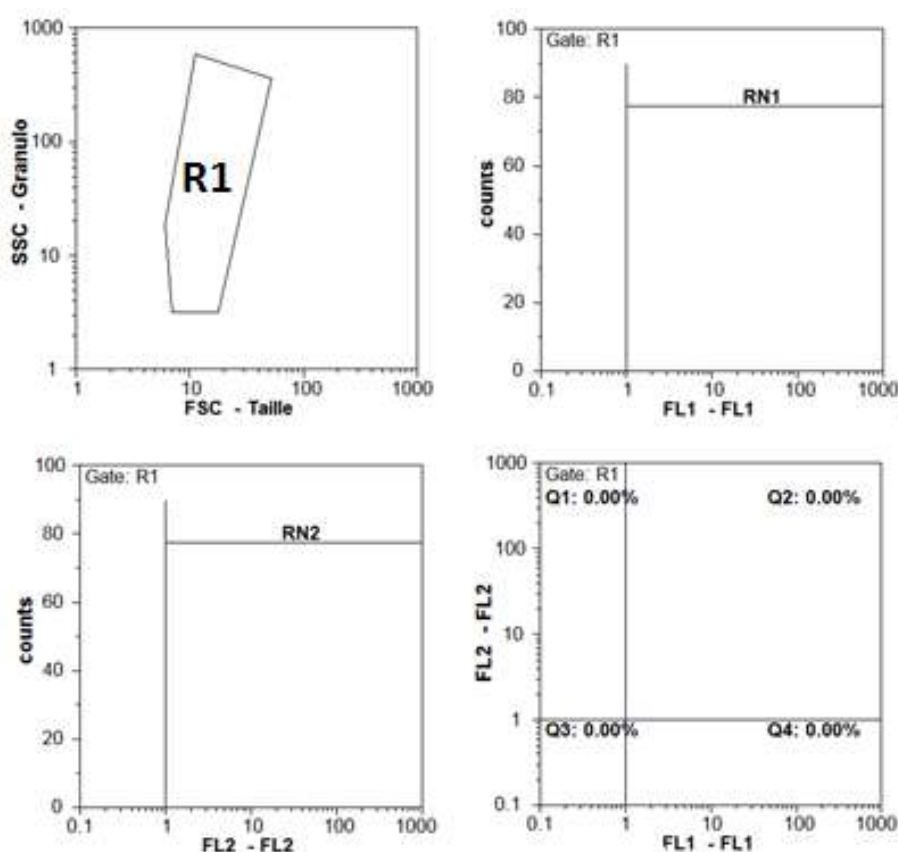


Figure 17 : Fenêtres d'acquisition pour un suivi de viabilité. Identification de la zone R1 à partir de la répartition des particules en fonction de leur granulométrie et taille (haut gauche) ; Répartition des particules en fonction de la fluorescence verte (cFDA) (haut droite) ; Répartition des particules en fonction de la fluorescence rouge (IP) (bas gauche) ; Répartition des particules selon l'intensité des deux marquages cFDA et IP (bas droite).

La fenêtre R1 (Figure 17 haut gauche) est dessinée à façon pour chaque étude, de façon à encercler le nuage de particules correspondant aux spores, sans tenir compte des contaminations (un exemple type du nuage de particules détectées par la CMF est disponible en Figure 14). Elle a été déterminée suite à de nombreux essais et à partir de l'expérience des utilisateurs de la plateforme cytométrie de GMPA. Les trois autres graphiques sont des représentations dédiées aux particules sélectionnées au sein de R1. Le premier graphique $\text{Counts} = f(\text{FL1})$ permet d'observer la dégradation du marqueur cFDA (Di-acétate de 5-carboxyfluorescéine) par les estérases intracellulaires, aboutissant à la production d'une fluorescence verte, portée sur FL1 (Figure 17, haut droite). C'est un marqueur d'activité endoplasmique, donc un indice certain de viabilité. Le second graphique $\text{Counts} = f(\text{FL2})$ correspond au suivi du marqueur IP (Iodure de Propidium), un intercalant de l'ADN qui émet une fluorescence rouge lorsqu'il se fixe sur l'ADN (Figure 17, bas gauche). Il s'agit d'une grosse molécule, qui n'est pas capable de traverser la membrane cytoplasmique, sauf si celle-ci est endommagée. Il s'agit donc d'un marqueur d'intégrité membranaire, lié à la viabilité. Enfin, le troisième graphique $\text{FL2} = f(\text{FL1})$ permet de visualiser le positionnement des particules vis à vis de ces deux indicateurs combinés.

Le graphique de viabilité est divisé en 4 zones : Q1 regroupe les particules n'émettant que de la fluorescence rouge, dont l'intégrité membranaire est donc compromise ; Q2 correspond aux particules émettant les deux signaux fluorescents, soient des cellules en phase de dégénérescence ; Q3 correspond aux cellules non marquées n'émettant ni fluorescence verte ni fluorescence rouge, soient les débris cellulaires ou des particules hermétiques au double marquage ; Q4 regroupe les cellules viables car n'émettant que la fluorescence verte . A partir de ce troisième graphique, un nouvel indicateur clef sera déterminé par la suite : le pourcentage de viabilité, qui correspondra à la part de la population totale située en Q4 et exprimé en %.

Ce fenêtrage permet d'étudier les conditions de conservation de spores, prérequis indispensables aux analyses cytométriques. Pour cela, trois stockages ont été testés tout au long des 2 mois de l'étude : 1) cryo-conservation à -20°C dans différents milieux ; 2) conservation à 4°C au réfrigérateur dans l'eau MilliQ et 3) sur milieu solide (boîte de Pétri) à 25°C .

Pour cela, une suspension de spores CL847 a été suspendue dans trois milieux : Eau MilliQ, CTS 50 ou PD Glycérol (20%) pour un stockage congélateur à -20°C . Plusieurs cycles de congélation/décongélation ont ensuite été réalisés sur les semaines suivantes et la viabilité a été testée en CMF par double marquage IP/cFDA, pour chaque cycle. De plus, un test de stockage à 4°C dans l'eau a débuté en Semaine 3, ensuite poursuivi sur toute la durée du détachement. Des tests de viabilité ont à nouveau été réalisés régulièrement durant les 2 mois pour caractériser l'état des spores. Enfin, la même démarche a été appliquée pour analyser la suspension de spores issue du ratissage de 6 boîtes de Pétri à des temps de stockage couvrant 40 jours. L'ensemble des boîtes provenait d'un même lot et avait subi les mêmes conditions de stockage, à 25°C .

L'objectif était d'évaluer si la viabilité allait chuter au cours du temps, éventuellement de façon différente en fonction des conditions de stockage, afin d'être en mesure de commenter

les résultats des analyses cytométriques et d'adapter au besoin les conditions de stockage au cours du travail expérimental. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 18 pour la cryoconservation, en Figure 19 pour la conservation au réfrigérateur et en Figure 20 pour la conservation sur boîte à 25°C.

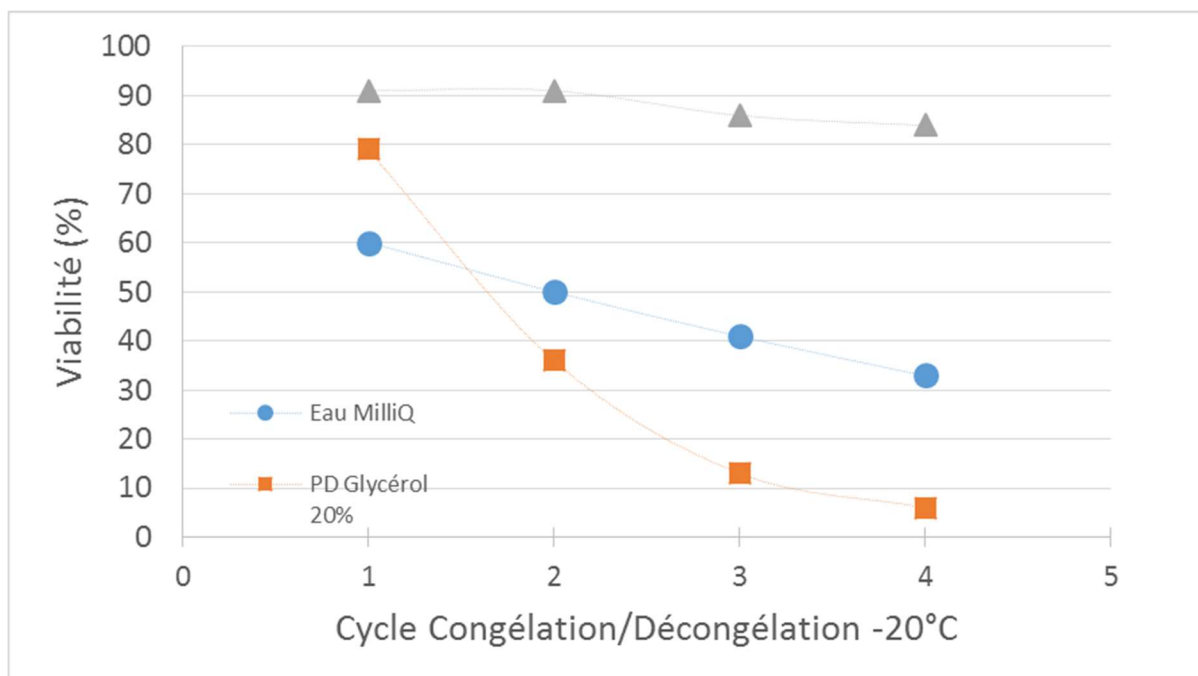


Figure 18 : Evolution de la viabilité de cultures CL847 cryoconservées à -20°C dans l'eau MilliQ (●), le milieu PD Glycérol 20% (■) ou le milieu CTS 50 (▲) au cours du temps.

Le milieu CTS 50 protège bien les spores des cycles successifs de congélation/décongélation. Pour le milieu PD Glycérol, la moitié de la viabilité est perdue à chaque cycle. Dans l'eau, 10% de la viabilité est perdue à chaque cycle à -20°C. Il apparaît donc que le milieu PD Glycérol, pourtant utilisé en routine, n'est pas optimal dans le cas présent. Le milieu CTS 50 présente néanmoins le meilleur potentiel pour préserver les spores.

Même si les spores n'ont jamais été congelées/décongelées plus de deux fois, les mauvais résultats obtenus pour le stockage en milieu PD Glycérol à -20°C ont conduit à abandonner en cours de projet les expériences sur spores congelées, pour ne travailler que sur spores fraîches. La provenance des différentes suspensions de spores étudiées au cours de l'étude sera systématiquement précisée dans les résultats suivants.

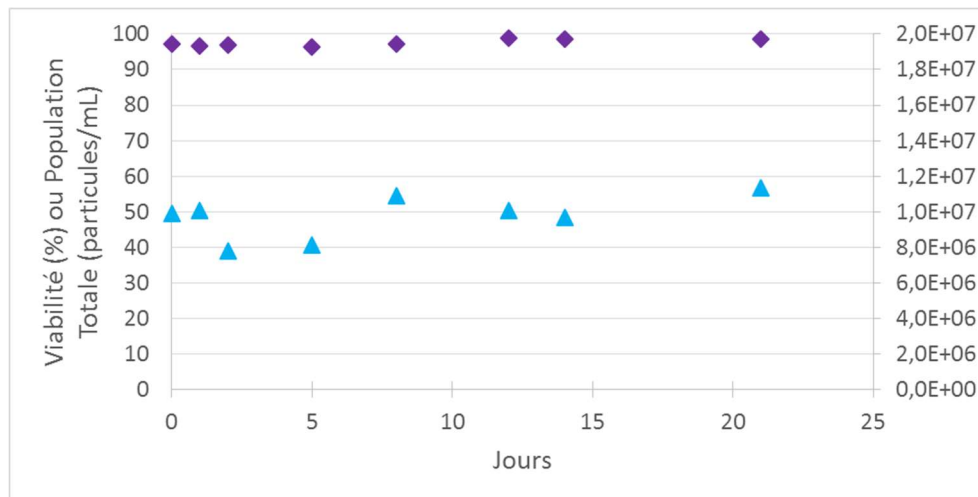


Figure 19 : Evolution de la viabilité (◆, axe de gauche) de cultures CL847 conservées au réfrigérateur dans l'eau MilliQ au cours du temps et de la population totale de spores (▲, axe de droite)

Au contraire, le stockage dans l'eau MilliQ a permis aux spores CL847 de conserver les mêmes propriétés de viabilité sur plus de 20 jours sans apparition de germination ni de casse cellulaire. Il semble donc que ce mode de stockage pourrait être privilégié dans le cas d'une courte à moyenne durée d'expérimentation. C'est le mode de conservation qui sera privilégié dans l'étude suite aux mauvais résultats obtenus pour la viabilité des spores cryoconservées en milieu PD + Glycérol.

Enfin, une dernière étude a permis de suivre la quantité de spores et leur viabilité lors d'un stockage en milieu solide (sur boîte de Pétri) et à chaud (25°C), comme le montre la Figure 20.

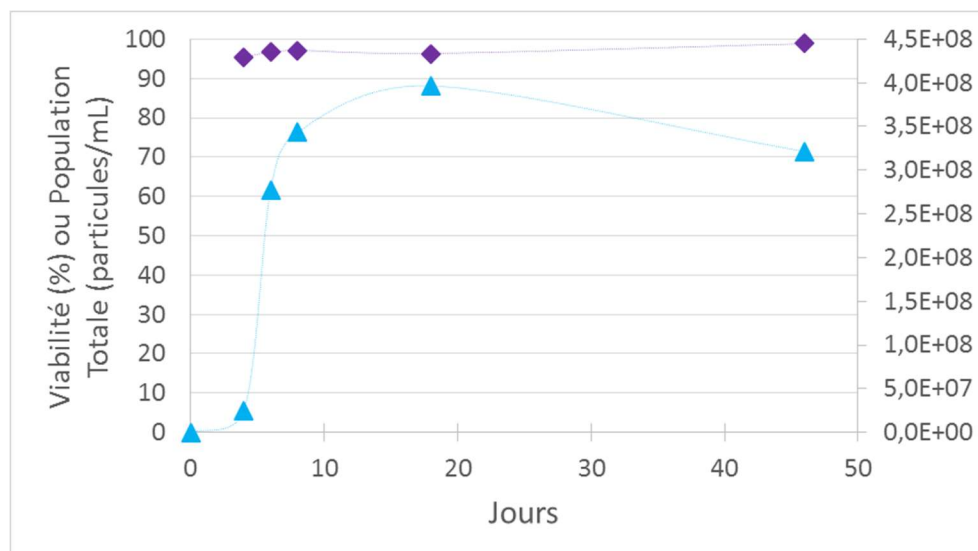


Figure 20 : Evolution de la viabilité (◆, axe de gauche) et de la population totale (▲, axe de droite) de spores CL847 au cours du temps sur boîte de Pétri de 9 cm de diamètre (culture en milieu solide)

La viabilité des spores reste toujours supérieure à 95%. La quantité de spores augmente fortement entre t0 et 10 jours puis se stabilise en restant comprise entre $3,2$ et $3,9 \cdot 10^8$ particules/mL jusqu'à plus de 40 jours.

Les suspensions de spores issues du ratissage des cultures en milieu solide sont utilisables à partir de 10 jours et jusqu'au 40^{ème} lors d'un stockage à chaud (25°C), sans que la qualité de spores ne soient affectées. La quantité de spores diminue de 18% entre 20 et 40 jours, ce qui aura peu d'impact pour les analyses en CMF puisque les résultats ne sont pas normalisés sur le Count Total, tous les indicateurs étant donné en % du comptage total.

c-3) Correspondance entre FSC et Taille réelle

L'étape suivante a permis d'établir une correspondance entre la taille mesurée par l'appareil (FSC) et la taille réelle des particules. Pour cela, des billes calibrées en taille (Flow Cytometry Size Calibration Kit « nonfluorescent microspheres », F13838, Invitrogen) entre 2 et 15 µm ont été passées en CMF. L'objectif était d'optimiser le réglage du FSC pour discriminer un maximum les particules en ajustant la fenêtre, en choisissant la répartition des points sur l'échelle de taille (linéaire ou log) et enfin la sensibilité du PMT, c'est dire le gain. En effet, il est possible de choisir un gain élevé avec échelle log ou un gain faible avec échelle linéaire pour avoir la gamme de spores au centre de la fenêtre. Il n'est pas souhaitable d'aller trop bas (trop en deçà du micron) pour ne pas compter trop de contamination (microbienne ou fongique), cependant il est aussi nécessaire de conserver une échelle de taille assez étendue pour voir les différents stades de germination. Trois ensembles de paramètres ont été testés en CMF pour l'étude des billes calibrées : FSC 125 en log 3 ; FSC 160 en log 3 et FSC 185 en linéaire (lin), comme le montre la Figure 21.

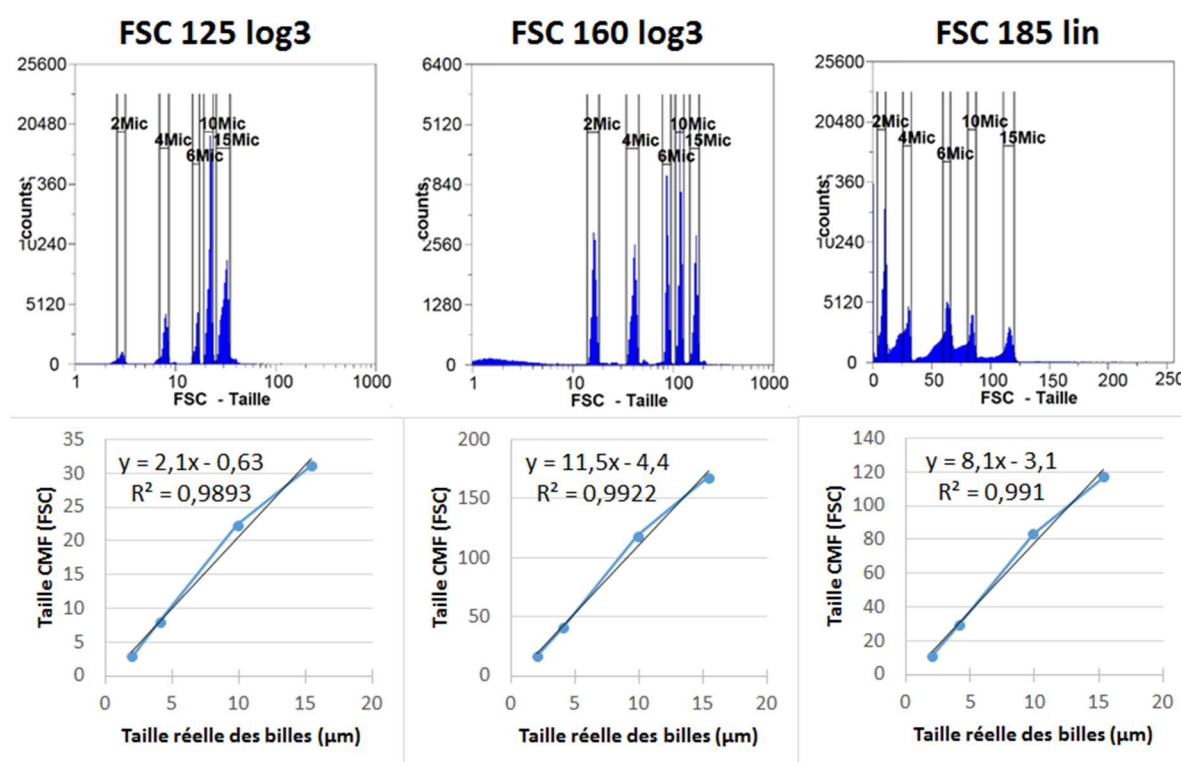


Figure 21 : Comparaison des réglages FSC de la CMF pour définir les fenêtres d'acquisition optimales pour la détection des spores. Cas de billes calibrées de 2 à 15 µm.

Les billes testées comprenaient les tailles 2, 4, 10 et 15 μm , en cohérence avec la gamme de tailles d'intérêt déterminée pour le suivi de germination de spores en IV-a), soit entre 3 et 70 μm . Des régressions linéaires de R^2 supérieurs à 0,989 ont été obtenues. En termes de comparaison de paramètres, c'est le réglage FSC 125 log 3 qui semble le plus pertinent. En effet, il présente la population de spores la plus centrée dans la gamme, évitant les bornes supérieures ou inférieures de la gamme en FSC. De plus, le réglage FSC 160 log 3 montre une traînée vers les très petites tailles, d'où un risque de prise en compte de contaminations ou de débris cellulaires. Au contraire, le passage en échelle linéaire (FSC 185 lin) permet de placer les spores à gauche de la fenêtre sans prise en compte des débris, mais la population de spores apparaît alors en limite basse. De plus, il ne permet pas d'étendre fortement la gamme de taille vers les valeurs hautes, ce qui pourrait se révéler pénalisant lors du suivi de germination (taille jusqu'à 70 μm d'après IV-a)). Par ailleurs, il faudra aussi prendre en compte la différence de morphologie entre une bille ou une levure ronde et une spore en germination, de forme allongée donc anisotrope. Cette étude présentait cependant l'avantage d'estimer la corrélation entre taille FSC du cymomètre et taille réelle en μm avec du matériel calibré en taille.

Ainsi, de par le bon compromis obtenu entre positionnement central de la population de spores et échelle étendue vers les hautes tailles, le réglage FSC 125 log 3 a été retenu pour l'ensemble des analyses de la présente étude. Il est ainsi possible d'utiliser le modèle Taille Réelle = $(\text{FSC} + 0,63)/2,1$ ($R^2 = 0,9893$).

c-4) Evaluation du profil d'autofluorescence basale

L'étape suivante a consisté en la détermination de la fluorescence basale émise par les spores de *T. reesei*, soit le réglage du paramètre FL1. Pour ce faire, des essais ont été réalisés sur des spores issues de la souche sauvage CL847, non germées et placées dans l'eau MilliQ. Les observations de la Figure 22 (graphiques hauts) ont été réalisées à 24h, qui sera par la suite une durée d'analyse classique pour les constructions étudiées, correspondant à un temps d'incubation. Le nuage de spores est compact en termes de taille, centré autour de 10 Unités FSC, c'est-à-dire 5 μm en utilisant l'équation déterminée précédemment. Cette valeur est cohérente avec la physiologie des spores, dont la taille lorsqu'elles sont non germées est de l'ordre de 3 à 5 μm (voir paragraphe IV-a)), en fonction du niveau de gonflement (réhydratation). En termes de fluorescence verte, le gain de FL1 réglé sur 450 a permis au nuage d'occuper la première décade 0,1 – 1 Unités FL1, laissant les trois suivantes pour le suivi d'émission de la GFP. Cette expérience a permis de bien positionner le canal de fluorescence verte pour que la fluorescence endogène (autofluorescence) soit localisée dans la première décade du spectre sur le graphique Counts = f(FL1). L'objectif de cette étape est de n'interpréter par la suite que ce qui sortira de cette première décade vers de plus hautes valeurs.

Pour comparaison, des spores placées en milieu nutritif F45 + Lactose ont également été observées à t+24h, afin de déterminer s'il y a une évolution de l'autofluorescence liée au milieu de culture ou à la germination (Figure 22, graphiques bas).

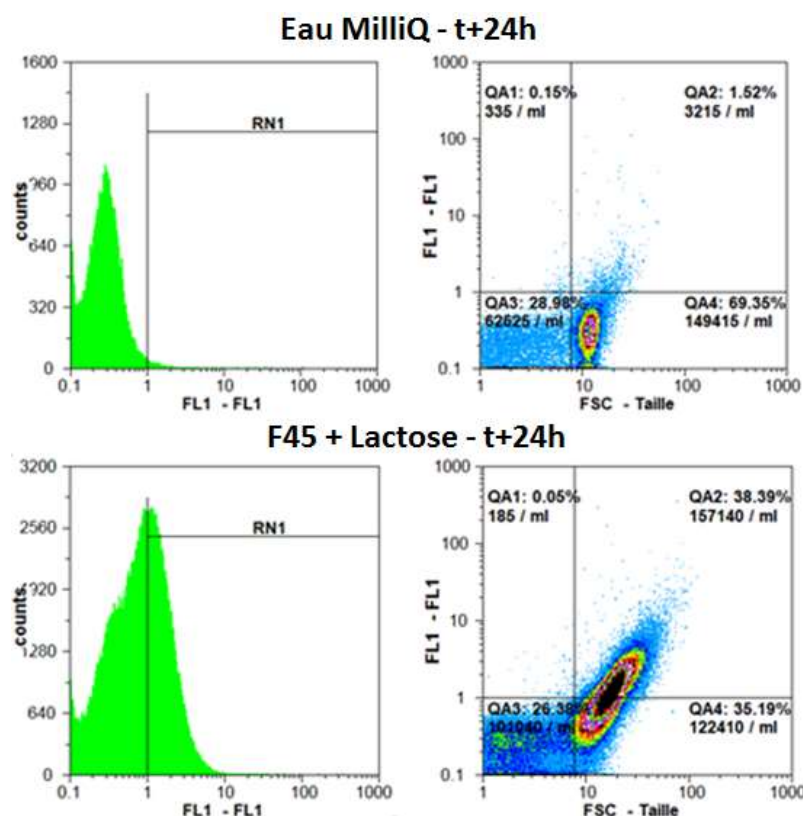


Figure 22 : Caractérisation de l'autofluorescence basale pour des spores fraîches du contrôle non transformé CL847 dans l'eau (haut) ou dans F45 + Lactose (bas) à t+24h.

Il apparaît que la fluorescence sort de sa première décade pour occuper la plage 0,1 – 10 Unités FL1, ce qui signifie que le niveau d'autofluorescence augmente quand les spores germent. En effet, le décalage sur FL1 ne peut s'expliquer que par l'autofluorescence, puisque la souche étudiée ici est le contrôle CL847. Cette évolution est liée à l'augmentation de la surface (ou volume) d'émission. Le profil qui apparaît alors en Figure 22 (graphiques bas) sur le graphique FL1 = f(FSC) est linéaire, montrant une corrélation directe entre fluorescence et taille.

Le niveau de fluorescence basal a été caractérisé sur des spores non transformées CL847 à l'état statique (milieu Eau) ou en croissance (milieu nutritif). L'autofluorescence se traduit par un profil linéaire entre Fluorescence et Taille (FL1 et FSC), qui devra servir de niveau basal par la suite. Seules les intensités de fluorescence se détachant de cette droite pourront être considérées comme une fluorescence attribuable à l'émission de GFP. Cette expérience a donc permis de dessiner le fenêtrage marquant l'autofluorescence basale (fenêtre linéaire SnF présentée plus loin en IV - c-6).

c-5) Caractérisation de la fenêtre Spores Fluorescentes SF

Pour bénéficier d'un contrôle positif, des levures *S. cerevisiae* transformées avec une cassette pTEF-LGFP (plasmide intégratif) ont été comparées avec des levures non transformées (WT). Le suivi cinétique de la fluorescence est réalisé avec un contrôle WT et

trois transformants (levures pTEF-LGFP) à t0, t+4h et t+20h, suite à une incubation en milieu nutritif à 25°C. Une région d'intérêt (appelée R1) a été délimitée à partir du graphique Granulométrie = f(Taille) qui permet d'identifier la population à analyser, afin de s'affranchir des particules ne correspondant pas aux spécifiés morphologiques des levures.

A t0, WT n'exprime pas de fluorescence, avec 99,93% de la population se situant dans la fenêtre non fluorescente. Les trois transformants ont 50% de leur population dans la fenêtre fluorescente. De plus, on observe chez ces derniers une « traînée » de fluorescence de 2 à 200 Unités de fluorescence (sur FL1) et non un spot localisé, compact et circulaire (de 0,1 à 0,6 Unités de fluorescence sur FL1) comme pour la population non fluorescente, comme le montre la Figure 23. Le profil de fluorescence à t0 (Counts = f(FL1)) montre bien la différence entre contrôle WT et le transformant levure pTEF-LGFP. En effet, un seul pic est visible pour WT, en deçà de la zone fluorescente RN1. Au contraire, un pic s'étalant sur toute la région RN1 est bien visible pour les levures pTEF-LGFP. Il est intéressant de noter que l'intensité de fluorescence couvre trois décades d'unités de fluorescence dans le cas des levures pTEF-LGFP.

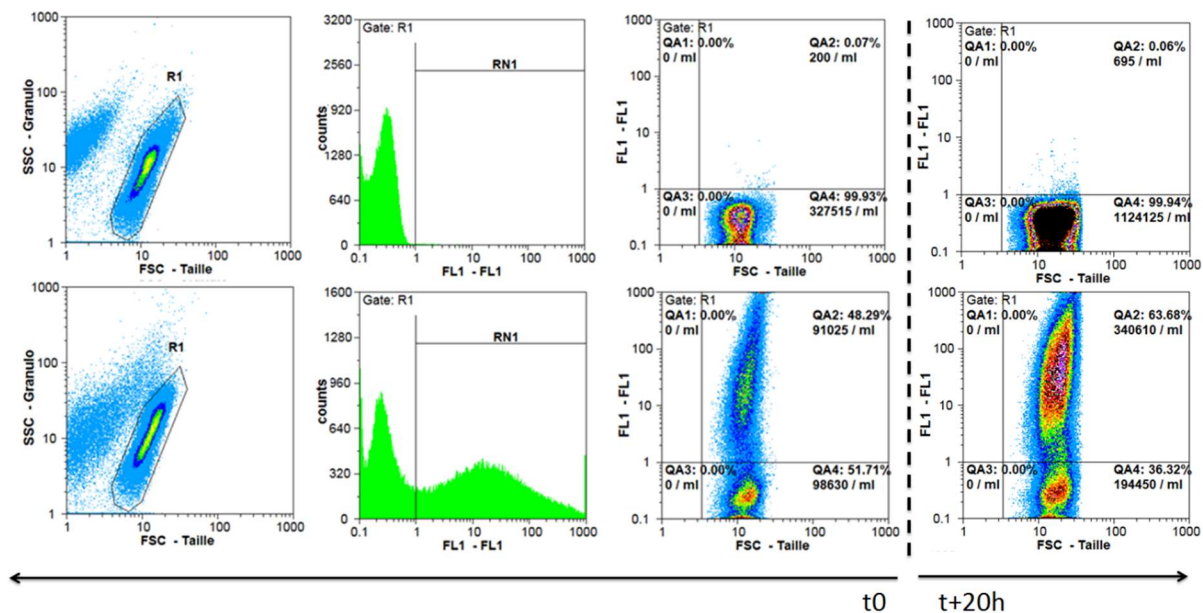


Figure 23 : Comparaison des profils de Morphologie, Fluorescence et Fluorescence = f(Taille) pour le contrôle levure WT (ligne haute) et un transformant levure pTEF-LGFP représentatif parmi 3 réplicats. Temps t0 à gauche des pointillés, t+20h à droite. Le fenêtrage correspond à la région d'intérêt pour les levures, ou R1.

A t+20h, la même tendance est observée pour les levures pTEF-LGFP, mais la répartition passe de 50/50 à 65/35 en faveur de la fenêtre fluorescente (Figure 23, graphiques de droite). Pour le contrôle WT, aucun changement n'est observé en termes de fluorescence, seule la population totale se multiplie, avec à t+20h une population totale de 1 124 125 levures/mL contre à 327 515 à t0. Il y a donc bien une multiplication des individus (x 3,4 entre t0 et t+20h) sans qu'il y ait émission de fluorescence. Pour les transformants, la multiplication x 3 entre t0 et t+20h est également présente mais le pic de fluorescence ne s'est pas élargi pour autant, prouvant que la verticalité est bien la marque de la production de GFP. Il se pourrait que l'étendue du nuage vertical soit la marque d'une population relativement hétérogène en termes d'expression de GFP à un temps donné. Il serait alors logique de s'attendre à priori à retrouver la même chose chez *T. reesei*. Cependant, la verticalité très étirée sur l'axe FL1 pour

les levures est peut-être aussi attribuable à leur cycle de vie, notamment leur reproduction par division cellulaire. En effet, dire que la taille des levures est invariante est un abus de langage car il existe en réalité un facteur 2 sur la taille au stade du bourgeonnement. De ce fait, les levures pourraient former un cycle de fluorescence, d'abord peu émise puis de plus en plus au fur et à mesure que la levure grossit, puis redescendre après que la division au niveau initial de fluorescence. Néanmoins, cette hypothèse à elle seule ne permet pas d'expliquer la plage de dispersion de fluorescence, de l'ordre de 3 log.

Pour l'analyse des spores de *T. reesei*, il faudra donc tenir compte à la fois de la notion de seuil de fluorescence (haut ou bas), ainsi que de la dispersion du signal fluorescent selon FL1 (hétérogénéité d'expression et/ou niveau de croissance variable).

Pour finir, des observations ont été réalisées en épi-fluorescence, sur lesquelles des levures fluorescentes sont visibles dans le cas des transformants pTEF-LGFP, contrairement au contrôle WT. Ces résultats confirment la possibilité d'observer directement de la fluorescence en microscopie, par ailleurs détectée de façon plus sensible en cytométrie.

Le recours à des organismes modèles de type levures a permis de confirmer que le panache vertical de fluorescence est bien la marque d'une production de GFP. Cette étude a permis de définir la fenêtre qui sera attendue pour des spores fluorescentes (qui sera appelée par la suite SF, voir IV - c-6).

c-6) Fenêtrage pour l'analyse de données de CMF

L'organisation des graphiques (tableaux de bord) qui sera la plus utilisée lors de cette étude pour le suivi de fluorescence des spores lors de leur germination est présentée en Figure 24.

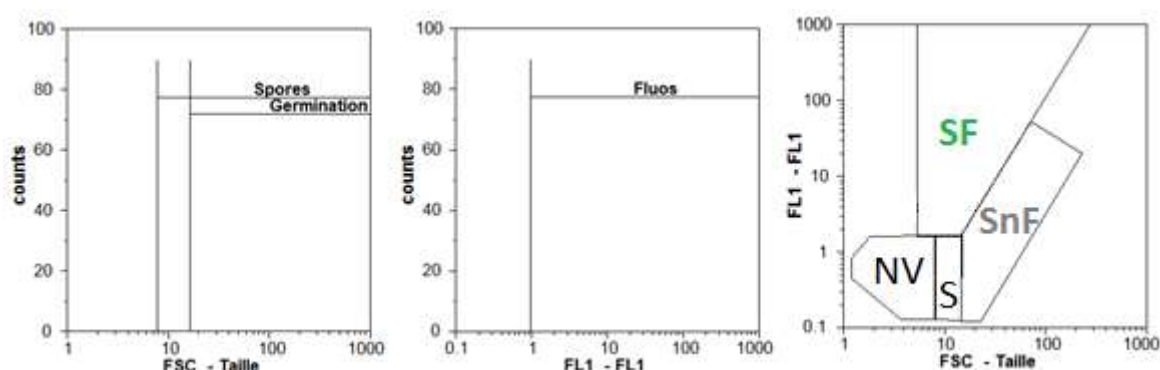


Figure 24 : Fenêtres d'acquisition pour un suivi cinétique de fluorescence. Répartition des particules en fonction de la taille (gauche) ; répartition des particules en fonction de la fluorescence (centre) ; répartition des particules entre fluorescence et taille (droite). S = Spores non Germées, SF = Spores Fluorescentes, SnF = Spores non Fluorescentes, NV = Non viables.

Deux zones sont distinguées sur le graphique Counts = f(FSC – Taille) (Figure 24 gauche) : la fenêtre « Spores » et la fenêtre « Germination ». Elles se différencient par la taille des particules passant devant le laser (voir gamme de taille déterminée en IV – c-1) et modélisée en c-3) par rapport à des billes calibrées) : celles situées en « Spores » correspondent aux

spores non germées, celles situées en fenêtre « Germination » voient leur taille augmenter car elles sont entrées en croissance. Ce graphique permettra par la suite de suivre la croissance des spores au cours du temps et de déterminer un indicateur clef : le pourcentage de germination, défini comme le ratio du nombre de spores en fenêtre « Germination » sur le nombre total de particules comptées (« Count Total »), exprimé en %.

Sur le graphique $\text{Counts} = f(\text{FL1})$, on distinguera la zone « Fluo », qui comportera les particules émettant une fluorescence supérieure au niveau basal (ou autofluorescence), préalablement positionné en première décade sur l'axe FL1 (Figure 24 centre). L'indicateur clef « Spores Fluorescentes » correspond donc au ratio du nombre de particules de la fenêtre « Fluo » sur le nombre total de particules comptées (« Count Total ») et sera exprimé en %.

Enfin, quatre zones remarquables ont été définies sur le graphique $\text{FL1} = f(\text{FSC})$ (Figure 24 droite). Il s'agit d'une combinaison des deux graphiques précédents, qui sera au centre des résultats présentés dans ce rapport, sous la forme d'une lecture topographique, à l'aide de plages de couleur allant du bleu au rouge pour identifier un count faible à fort. Tout d'abord, la fenêtre S correspond aux spores non germées et non fluorescentes. On s'attendra à ce que S soit la zone occupée initialement le nuage de spores à t_0 . La fenêtre NV correspond aux spores en dégénérescence et aux débris cellulaires, puisque la taille est inférieure à celle des spores intègres. Cependant, les deux zones les plus commentées dans les résultats suivants seront SF et SnF. **La fenêtre SF (Spores Fluorescentes) comprend l'ensemble des spores fluorescentes, germées ou non (les spores fluorescentes à t_0 sont incluses dans SF).** Elle correspond au profil vertical obtenu lors de l'étude des organismes modèles (levures) fluorescents en IV – c-5). La fenêtre SnF (Spores non Fluorescentes) correspond aux spores en germination et dont la fluorescence ne passe pas le seuil d'autofluorescence. Elle correspond au profil linéaire $\text{Fluorescence} = f(\text{Taille})$ obtenu précédemment en IV – c-4).

C'est à partir de ce troisième graphique que seront définies la fenêtre SF et la fenêtre SnF, qui ont été dessinées à partir des résultats obtenus sur les premiers contrôles CL847 et les organismes modèles levures. La fenêtre SF a été dessinée en suivant la droite linéaire de l'autofluorescence (SnF) et en maximisant la fluorescence afin de détecter le signal vertical qui sera synonyme d'émission de GFP.

Une phase expérimentale axée sur l'analyse du témoin CL847, étudié sous la forme de trois réplicats biologiques et trois techniques, a permis de tester la robustesse du fenêtrage. Il est ainsi possible d'évaluer les résultats obtenus pour CL847 au sein des fenêtres SF et ou SnF, comme le montre la Figure 25.

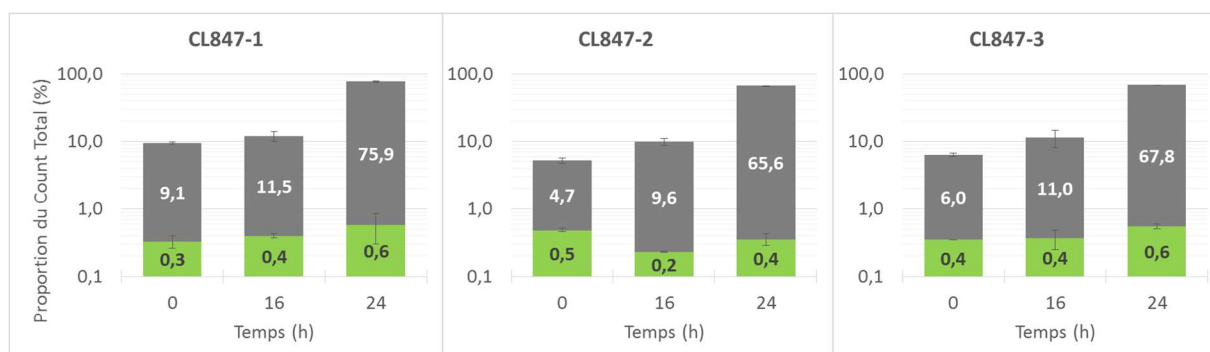


Figure 25 : Récapitulatif des résultats de CMF pour le contrôle CL847 de trois manipulations. Estimation de la part du Count Total en fenêtre SF(vert) et en fenêtre SnF(gris) Moyennes obtenues à partir d'un triplicata technique.

Dans la fenêtre SnF, le pourcentage de spores augmente au cours du temps, de 5 à 10% à t₀, jusqu'à 65 à 76% à t+24h. Ce résultat montre que lorsque les spores entrent en germination, elles se retrouvent bien dans la fenêtre non fluorescente. Le ratio Y/X reste constant au cours du temps ($\approx 0,05$) alors que les spores croissent en taille, de 17 à 30 unités de taille entre t₀ et t+24h, soit entre 8 et 15 μm (selon le modèle établi en IV – c-3)).

Cependant, le paramètre de taille qui sera utilisé pour évaluer la valeur de FSC sera par la suite la moyenne géométrique GMn-x (voir Annexe I), c'est-à-dire la moyenne pondérée dans la fenêtre correspondant aux spores (SnF ou SF selon les cas). Ainsi, l'autofluorescence des spores CL847 est une fonction constante de la taille (0,05 U de Fluorescente / Unité de Taille).

En fenêtre SF, le pourcentage de spores reste constant au cours du temps, de l'ordre de 0,5% du Count total. Cette valeur basale et constante de t₀ à t+24h est donc une expression de bruit créé par le dessin des fenêtres séparant les spores fluorescentes des non fluorescentes. De plus, le ratio Y/X reste constant au cours du temps ($\approx 0,5$) et la taille des spores est constante de t₀ à t+16h (11 unités de taille ou 6 μm) puis augmente très faiblement à t+24h (16 unités de taille ou 8 μm). Cette observation renforce l'interprétation du bruit ou pourrait traduire la présence d'artefacts dans le pool de particules étudiées. Enfin, 16 mesures réalisées en fenêtre SF possèdent des coefficients de variation supérieurs à 10%, contre seulement 3 en fenêtre SnF (voir détails en Annexe E). Il apparaît donc que la fenêtre SF est beaucoup plus bruitée que la fenêtre SnF pour le contrôle CL847.

Ainsi, le dessin des fenêtres « Spores Fluorescentes » (SF) et « Spores Non Fluorescentes » (SnF) semble pertinent puisqu'il permet bien la séparation entre les spores émettant une fluorescence supérieure à leur niveau basal (autofluorescence), bien observable pour les témoins CL847. Il semble intéressant de conserver les indicateurs % Count Total, fluorescence et taille moyenne ainsi que le ratio Fluorescence/Taille (Y/X) pour l'étude quantitative des souches transformées.

d) Test du promoteur pCBH1

Suite aux réglages des paramètres de CMF et à la détermination des zones d'intérêt (fenêtre SF et SnF notamment), un criblage a été réalisé sur la fluorescence émise par les

différentes constructions réalisées. Le premier test a été réalisé sur des constructions issues de la transformation T1, comportant le variant LGFP sous le contrôle du promoteur pCBHI (Tableau Marque Page). Trois clones pCBHI-LGFP ont été testés, contre le contrôle non transformé CL847. Le premier essai n'a montré aucune différence entre les quatre souches testées. Les spores sont situées en fenêtre SnF et forment la droite caractéristique de la relation linéaire entre Fluorescence et Taille établie précédemment (IV – c-4)) comme signature de l'autofluorescence basale. Ce schéma est observé pour les trois clones transformés comme pour le contrôle CL847. Ainsi, aucune émission de fluorescence attribuable à la LGFP n'a été détectée. Un nouveau test a alors été effectué sur les mêmes clones, en augmentant la quantité de lactose de 10 à 20 puis 50 g/L, afin de vérifier que le résultat négatif n'était pas dû à une induction trop faible de pCBHI. Le lactose a également été remplacé par du sorbose pour les mêmes raisons. Cependant, aucune de ces modifications du milieu d'induction n'a permis d'observer un profil différent de celui du contrôle. Les spores germent mais n'expriment pas de fluorescence attribuable à la LGFP dans le temps testé, c'est-à-dire entre t0 et t+16 ou t+24h.

A ce stade, la question de la casse cellulaire provoquée par le stockage à -20°C aurait pu être un élément d'explication pour ces résultats (trop de bruit généré par des débris ?). Cependant, un dernier test avec le variant LGFP placé sous le contrôle de pCBHI sera effectué par la suite sur spores fraîches, sans qu'aucune émission de GFP ne soit détectée. Le profil du nuage représenté sur le graphique FL1 = f(FSC) reste linéaire et caractéristique d'une autofluorescence basale, même avec une viabilité de plus de 92% contre 40 à 65% pour les cas précédents.

En conclusion, contrairement aux essais en microscopie sur mycéliums germés (IV – a)) ayant montré la bonne insertion du variant LGFP et son expression sous le contrôle de pCBHI, les résultats de CMF montrent que cette expression n'est pas assez forte et/ou précoce. Ainsi, soit pCBHI est peu adapté à la CMF, soit l'expression de la LGFP est mauvaise dans *T. reesei*.

e) Test des promoteurs constitutifs (pX-LGFP)

Le promoteur pCBHI n'ayant pas permis d'exprimer une fluorescence assez forte et/ou précoce avec le variant LGFP, les promoteurs alternatifs sélectionnés au paragraphe a) ont fait l'objet d'un criblage. L'hypothèse est ici que les promoteurs constitutifs n'ont pas besoin d'une induction, la production de fluorescence pourrait donc être plus précoce que lors de l'utilisation d'un inducteur.

Dans un premier temps, une stratégie exploratoire a été privilégiée afin de passer en CMF les huit promoteurs pGPD, pHFB, pPDC, pPKI, pPTP, pTBP, pHYD et pTEF, ainsi que le contrôle CL847. Le suivi cinétique est effectué de t0 à t+24h. Le fenêtrage SF/SnF/S/NV n'a pas été employé à ce stade, cet essai ayant un objectif préparatoire, sans recours à la quantification rendue possible par des répétitions. La viabilité des souches n'est pas optimale à t0, en raison de la cryoconservation, entre 25% et 40% seulement sont viables. De plus, les spores de pGPD-LGFP sont très peu concentrées.

Aucune fluorescence supérieure au niveau basal n'est observée pour les sept constructions testées, à part pour pTEF-LGFP à t+24h. Un léger écart à la linéarité Fluorescence = f(Taille) est observé sous la forme d'un faible panache vertical, comme le montre la Figure 26 (flèche noire, droite).

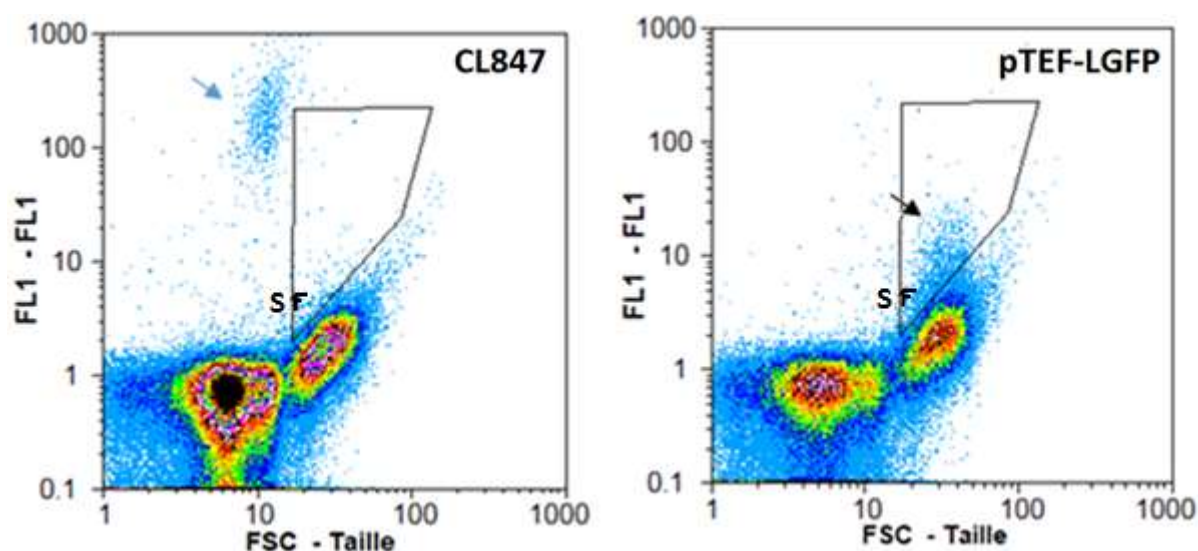


Figure 26 : Comparaison des profils de fluorescence à t+24h pour le contrôle CL847 (gauche) et pTEF-LGFP (droite). La fluorescence s'écartant du domaine linéaire Fluorescence = f(Taille) est identifiée par la fenêtre SF.

Sur les graphiques FL1 = f(FSC), deux populations de spores sont visibles pour le contrôle comme pour pTEF-LGFP. La plus à gauche correspond aux spores mortes ou n'ayant pas encore germé, alors que celle plus à droite correspond aux spores en croissance. Pour cette sous-population, la linéarité Fluorescence = f(Taille) est bien visible pour les deux souches. Un artefact probablement dû à une contamination lors des tests de viabilité est observable pour le contrôle CL847 (Figure 26, flèche bleue), puisque ce spot correspondrait à une émission de fluorescence par des particules alignées en taille avec la sous-population de spores mortes ou n'ayant pas encore germé.

Ces résultats suggèrent que certaines des spores en train de germer émettent une fluorescence supérieure au niveau basal du contrôle pour la construction pTEF-LGFP.

L'objectif suivant a été de comparer quatre contrôles CL847 avec quatre souches pTEF-LGFP. Le suivi cinétique a été réalisé de t0, à t+45h. Aucune différence n'est visible sur les profils de fluorescence avant t+17h. Les contrôles CL847 présentent alors les prémices de la linéarité attendue entre Fluorescence et Taille, alors qu'il apparaît un panache vertical au-dessus de la sous-population en croissance pour pTEF-LGFP. A t+20h et t+24h, les résultats se confirment, la fluorescence présente une verticalité pour les quatre réplicats de pTEF-LGFP, qui n'est pas visible pour les quatre contrôles (Figure 27).

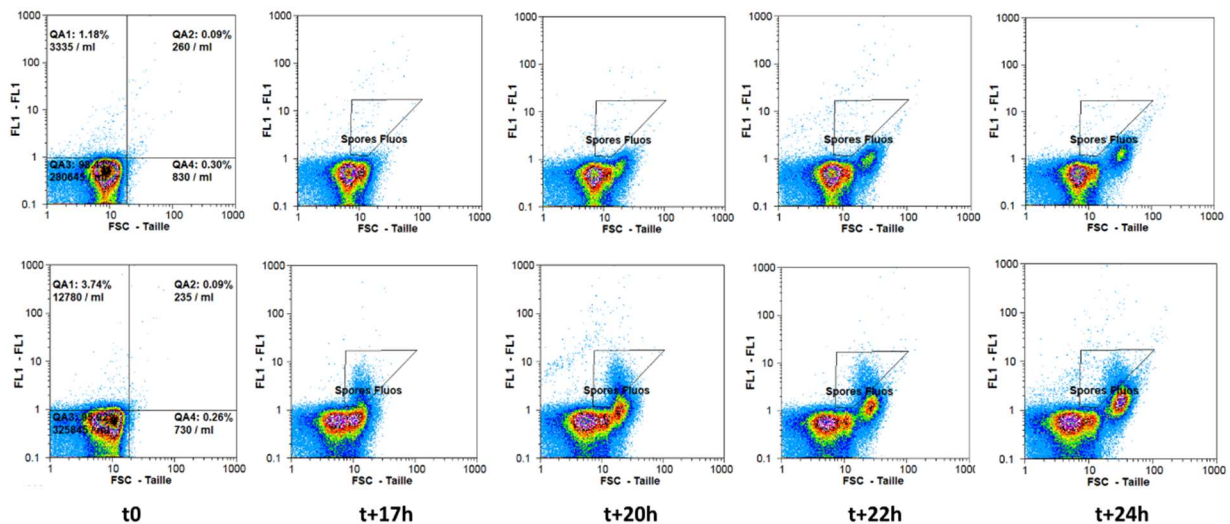


Figure 27 : Suivi cinétique de l'expression de fluorescence sur spores cryoconservées à -20°C : comparaison d'un contrôle CL847 (ligne haute) vs un transformant pTEF-LGFP (ligne basse) au cours du temps (t0 à t+24h). Extrait représentatif parmi 4 contrôles et 4 transformants. Gating « Spores Fluo », équivalent SF.

La proportion de particules présentes dans la fenêtre SF est jusqu'à 30 fois supérieure pour pTEF-LGFP par rapport aux contrôles CL847. Comme le montre l'histogramme suivant, les différences sont très significatives (Figure 28) :

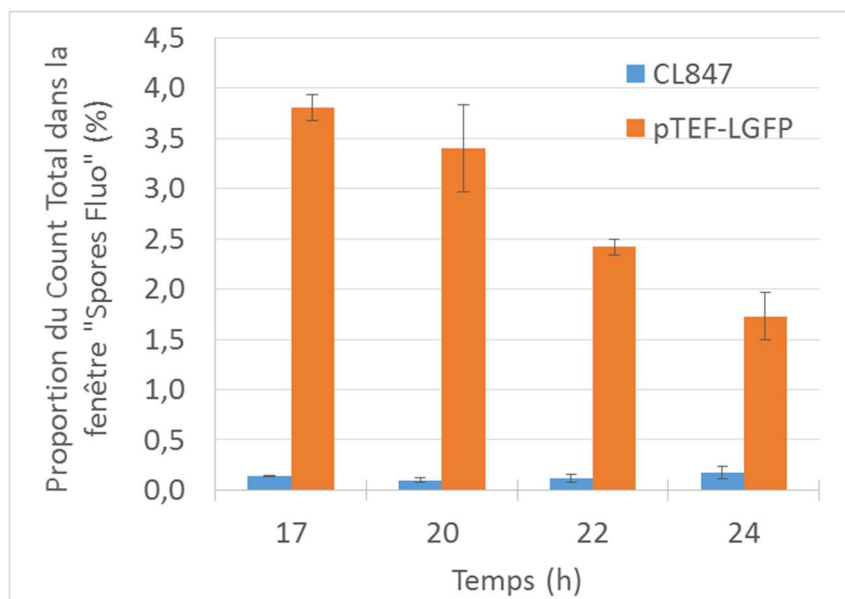


Figure 28 : Comptage des spores présentes dans la fenêtre "Spores Fluo" correspondant à la verticalité se détachant de la linéarité basale Fluorescence = $f(\text{Taille})$ pour 4 contrôles CL847 et 4 transformants pTEF-LGFP

L'écart entre les CL847 et les pTEF-LGFP est maximal à t+17h et t+20h puis se réduit à t+22h et t+24h. Cela s'explique par le seuil de coupure physique imposé par la CMF, les spores ayant atteint un certain stade germination (taille plus élevée) ne sont donc plus comptabilisées. De ce fait, à t+24h, la proportion de spores présentes dans la fenêtre SF n'est plus que 10 fois supérieure pour pTEF-LGFP par rapport à CL847. A partir de t+26h, le panache de vertical (signal positif) qui diminuait déjà à t+24h est éteint, comme le confirme les analyses effectuées à t+28h et t+45h.

pTEF est donc le seul promoteur constitutif en mesure d'exprimer de façon assez précoce (pour la CMF) la fluorescence du variant LGFP. Cette surexpression vis-à-vis de la fluorescence basale du contrôle se traduit par un panache vertical sur les graphiques Fluorescence = f(Taille). Ce résultat confirme qu'il s'agit réellement de la marque d'une production de GFP et sera considéré par la suite comme le signal positif. Cependant le niveau d'expression reste très faible par rapport à celui observé pour les levures (IV – c-5)). En effet, la plage de fluorescence des spores pTEF-LGFP couvre une seule décade sur l'axe FL1, alors qu'elle recouvrait trois décades dans le cas des levures pTEF-LGFP.

f) Test du variant EGFP^{OPT}

f-1) Comparaison du variant EGFP^{OPT} versus LGFP

Suite aux précédents essais, il est apparu comme nécessaire de tester le variant EGFP optimisé (EGFP^{OPT}) pour *T. reesei*, puisque seul le contrôle du variant LGFP par le promoteur constitutif pTEF a permis une détection de fluorescence. L'objectif suivant de l'étude était donc de comparer directement les deux variants LGFP versus EGFP^{OPT} en se plaçant dans les mêmes conditions de culture que précédemment. Des triplicatas biologiques de pTEF-LGFP, de pTEF-EGFP^{OPT} et du contrôle CL847 ont été suivis de t0 à t+24h. A t0, aucune production de fluorescence autre que le niveau basal n'est détectée pour les contrôles CL847 ni pour les pTEF-LGFP. A l'inverse, une importante émission de fluorescence est déjà perçue pour les pTEF-EGFP^{OPT}, de l'ordre de 10 fois supérieure au niveau basal des souches comportant le variant LGFP, avec comme contrôle CL847 (Figure 29).

La tendance de t0 s'affirme à t+20h, la fluorescence pour les contrôles CL847 reste basale, mais une petite verticalité apparaît pour les pTEF-LGFP (voir ligne du milieu en Figure 29), bien qu'elle reste nettement supérieure pour les pTEF-EGFP^{OPT}. En effet, à t+20h, le pic de fluorescence pour les pTEF-EGFP^{OPT} s'est décalé vers de très hauts niveaux, entre 40 et 300 Unités de fluorescence (ligne basse en Figure 29). A t+22h, les résultats restent similaires, bien que la germination soit de plus en plus forte, d'où une verticalité moindre pour les pTEF-LGFP. Enfin, à t+24h, toutes les spores sont en germination, la verticalité reste cependant très majoritaire pour pTEF-EGFP^{OPT} alors qu'elle s'éteint pour pTEF-LGFP.

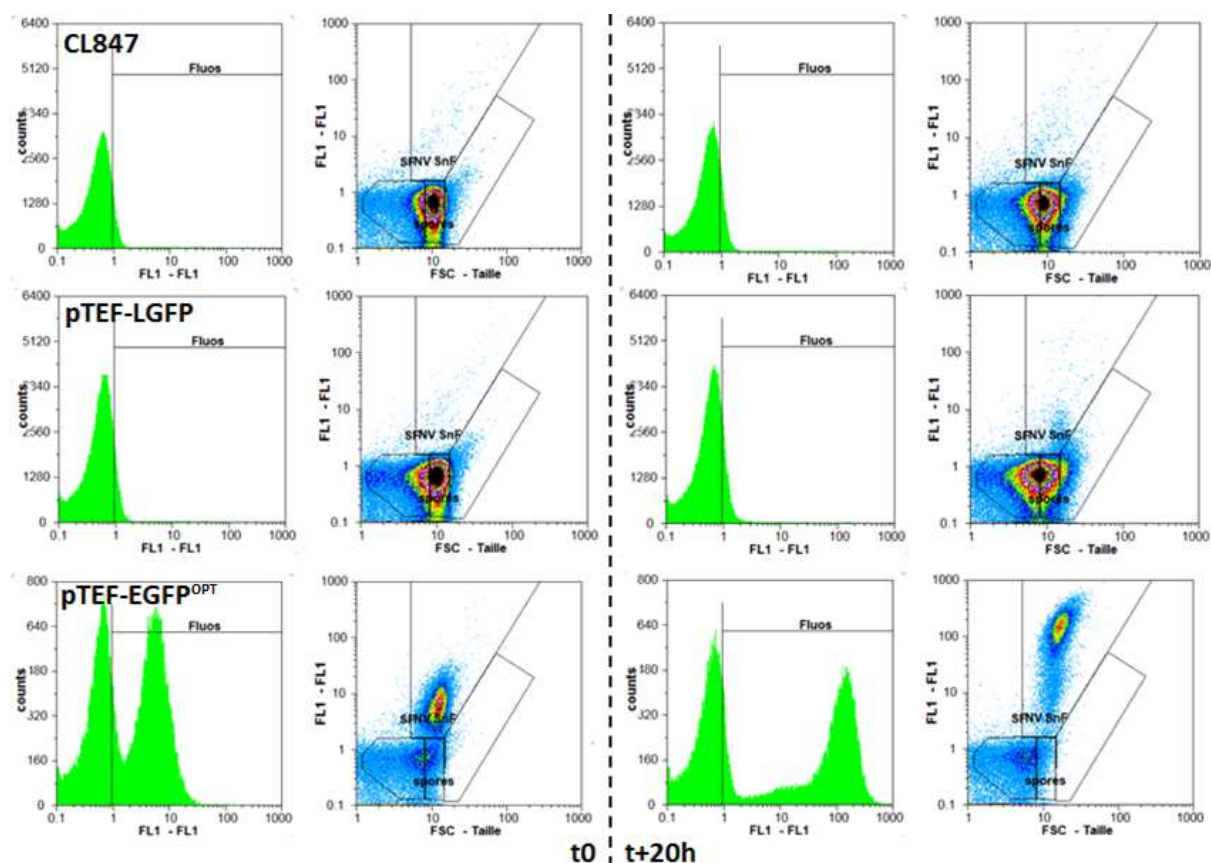


Figure 29 : Comparaison des profils de Fluorescence et de Fluorescence = $f(\text{Taille})$ pour CL847 (ligne haute), pTEF-LGFP (ligne du milieu) et pTEF-EGFP^{OPT} (ligne basse) à t0 (gauche des pointillés) et t+20h (droite des pointillés).

Un récapitulatif de la quantité de spores fluorescentes comptabilisée en CMF pour les trois constructions est présenté en Figure 30.

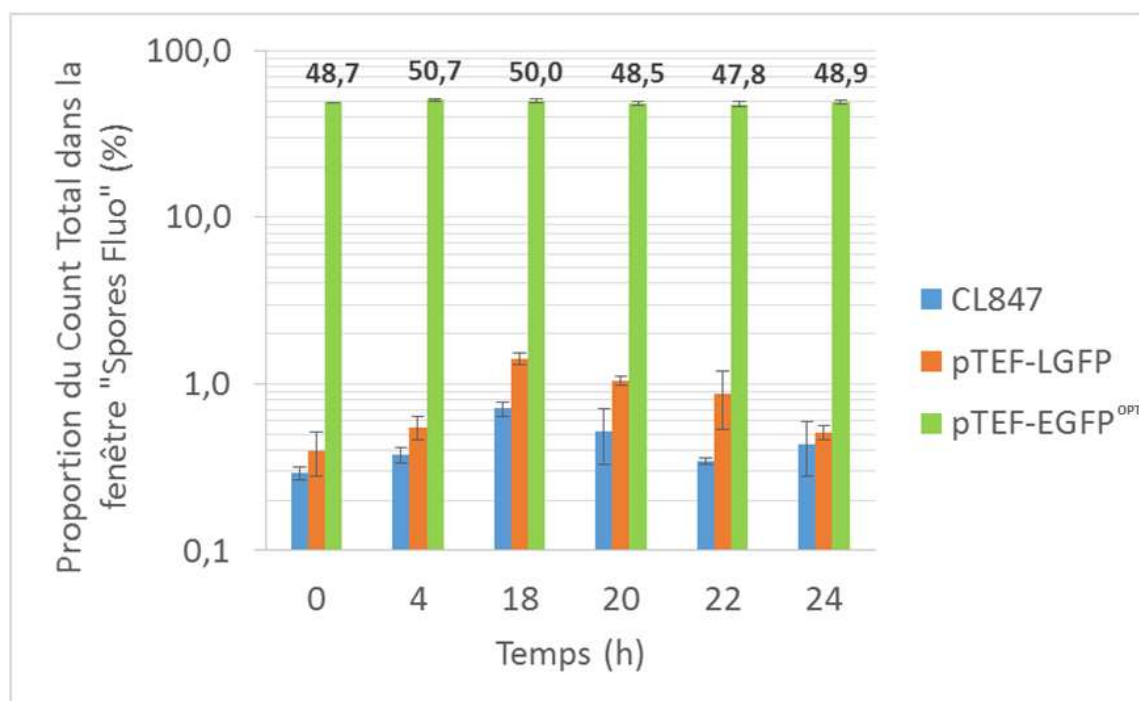


Figure 30 : Suivi de la quantité de particules dans la fenêtre SF au cours du temps de germination. Moyenne de 3 réplicats pour chaque souche.

Le contrôle CL847 présente quelques particules dans la fenêtre SF, correspondant potentiellement à un bruitage numérique du signal (quelques particules sont toujours visibles même avec de l'eau distillée) et/ou à des contaminations issues des passages précédents. En effet, le nombre de particules varie peu au cours du temps. Les spores fluorescentes de pTEF-LGFP sont significativement plus nombreuses à t+18h, t+20h et t+22h, ce qui est en bonne adéquation avec les résultats présentés au chapitre e) précédent. Au contraire, pTEF-EGFP^{OPT} compte la plus forte part de spores fluorescentes (%SF), de l'ordre de 50% de sa population totale (toutes les particules comptabilisées par la CMF). Cette valeur reste constante au cours du temps de t0 à t+24h. Il se pourrait donc que le promoteur pTEF soit actif lors de la sporulation, la EGFP serait alors déjà produite et pourrait être encapsulée dans les spores en formation, d'où la présence de spores fluorescentes dès t0. Par la suite, la production d'EGFP est suggérée par le fait que la verticalité domine le signal. Si cela n'avait été qu'une encapsulation d'EGFP, celle-ci se serait diluée lors de la germination des spores et le signal aurait rejoint la linéarité Fluorescence = f(Taille).

Il existe un fort effet variant de la GFP pour son expression au sein de *T. reesei*. Le variant EGFP^{OPT} permet d'atteindre des niveaux de fluorescence supérieurs à 100 Unités de Fluorescence alors qu'ils ne dépassent pas 10 Unités avec le variant LGFP. Les spores issues de la transformation avec le variant EGFP^{OPT} l'expriment à des niveaux de fluorescence comparables à ceux observés pour les levures transformées avec la LGFP. Ceux-ci avaient d'ailleurs permis une observation directe en épi-fluorescence, laissant supposer qu'il sera possible d'observer les souches fongiques transformées avec le variant EGFP^{OPT} également.

f-2) Evaluation de l'effet transformant pour pTEF-EGFP^{OPT}

Lors de la transformation T3, 24 transformants avaient été sélectionnés pour pTEF-EGFP^{OPT}. Nous avons souhaité réaliser une étude de la variabilité d'expression de la GFP pouvant être engendrée par l'intégration ectopique des constructions génétiques. Dans ce but, 9 transformants ont été sélectionnés parmi les 24 pTEF-EGFP^{OPT}, sur la base d'un examen visuel de sporulation (couleur, forme et quantité apparente cohérentes avec *T. reesei*) : E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8 et E9. L'ensemble de ces clones a été testé en triplicata, contre un triplicata du contrôle CL847. La cinétique de fluorescence a été suivie de t0 à t+24h (voir profils des cytogrammes en Annexe F).

Le contrôle CL847 s'est comporté comme précédemment. Pour les pTEF-EGFP^{OPT}, à t0, le nuage de spores est déjà à cheval entre SF et S, avec entre 43 et 74% de la population totale présente dans la fenêtre SF en fonction des transformants. Il est à noter que ce sont les clones E5 (74%) et E2 (67%) qui comptent le maximum de spores déjà en SF à t0. Le signal positif (vertical) apparaît dès 2h en fenêtre SF. A t+16h, CL847 commence à germer. Pour les clones pTEF-EGFP^{OPT}, la verticalité est toujours très prononcée, avec un profil de fluorescence différent pour les clones E1 à E9 : homogénéité, étalement et intensité variables. La population de spores se scinde en deux au cours de la cinétique pour certains transformants. C'est notamment le cas pour E3, où un panache apparaît en SnF à t+16h, et en particulier pour E7, qui présente dès t0 deux populations équivalentes (50/50) qui vont exprimer des niveaux de fluorescence différenciés, marque probable d'un organisme hétérocaryon lors de la transformation. A t+24h, des sous-populations apparaissent pour tous les clones en fenêtre

SF, bien que la plus fluorescente demeure largement majoritaire. Il est intéressant de noter qu'à ce stade, le niveau d'expression d'EGFP se rapproche de celui observé pour les levures.

Ces résultats sont confirmés en microscopie épi-fluorescente, pour l'exemple du clone E1 (Figure 31). Sur les images à t+18h et surtout t+22h, de longs hyphes apparaissent en lumière visible comme en fluorescence, montrant la croissance des spores et la production de la GFP.

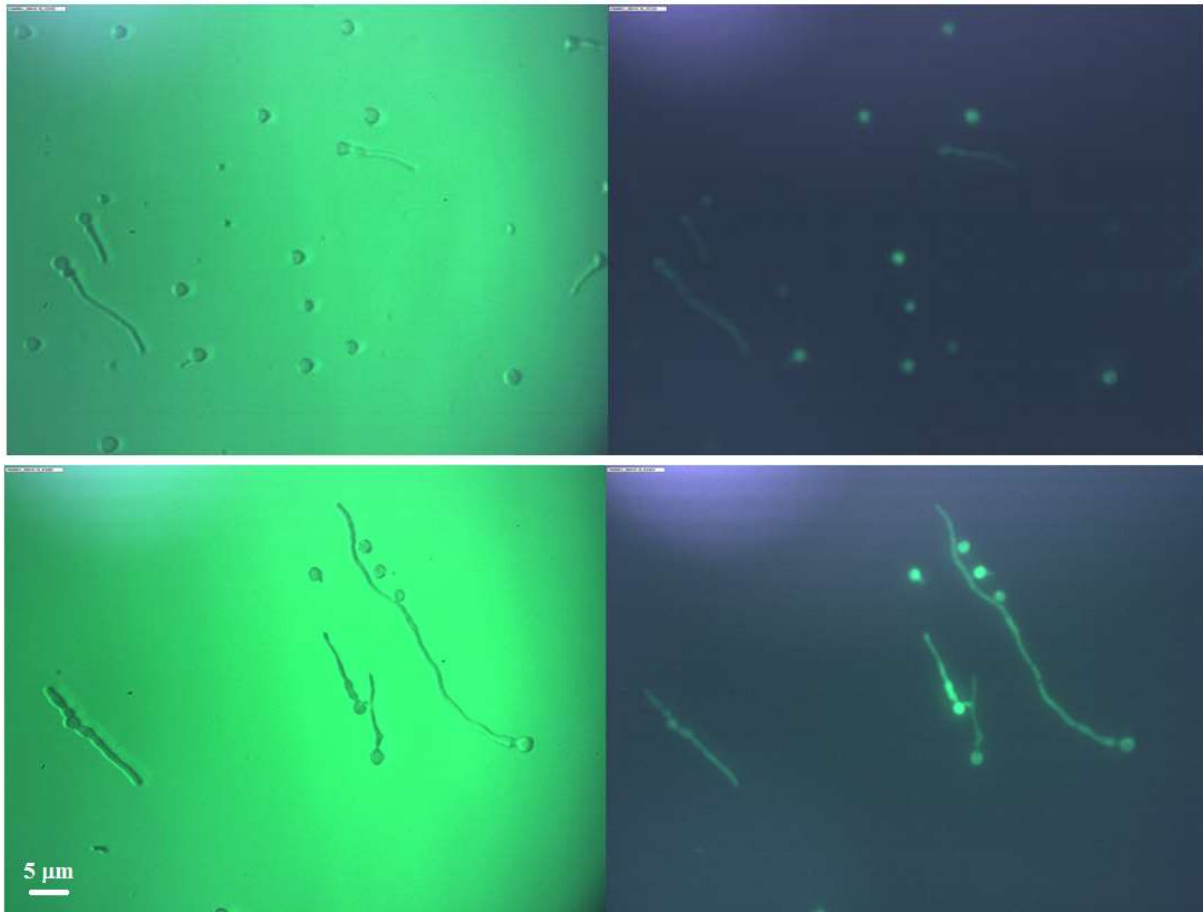


Figure 31 : Observations en lumière visible (colonne gauche) et en épi-fluorescence (colonne droite) du clone *pTEF-EGFP^{OPT}* E1 à t+18h (ligne haute) et t+22h (ligne basse)

Les résultats obtenus ont été analysés quantitativement. E7 a été étudié séparément car il présentait deux sous-populations clairement distinctes en termes d'émission de fluorescence dès t0. L'évolution cinétique du ratio Fluorescence/Taille (Y/X) permet d'évaluer l'effet « transformant » entre les différents clones *pTEF-EGFP^{OPT}* (Figure 32). En effet, cet indicateur traduit une fluorescence rapportée au volume total de spores, soit une évaluation de la productivité spécifique en GFP.

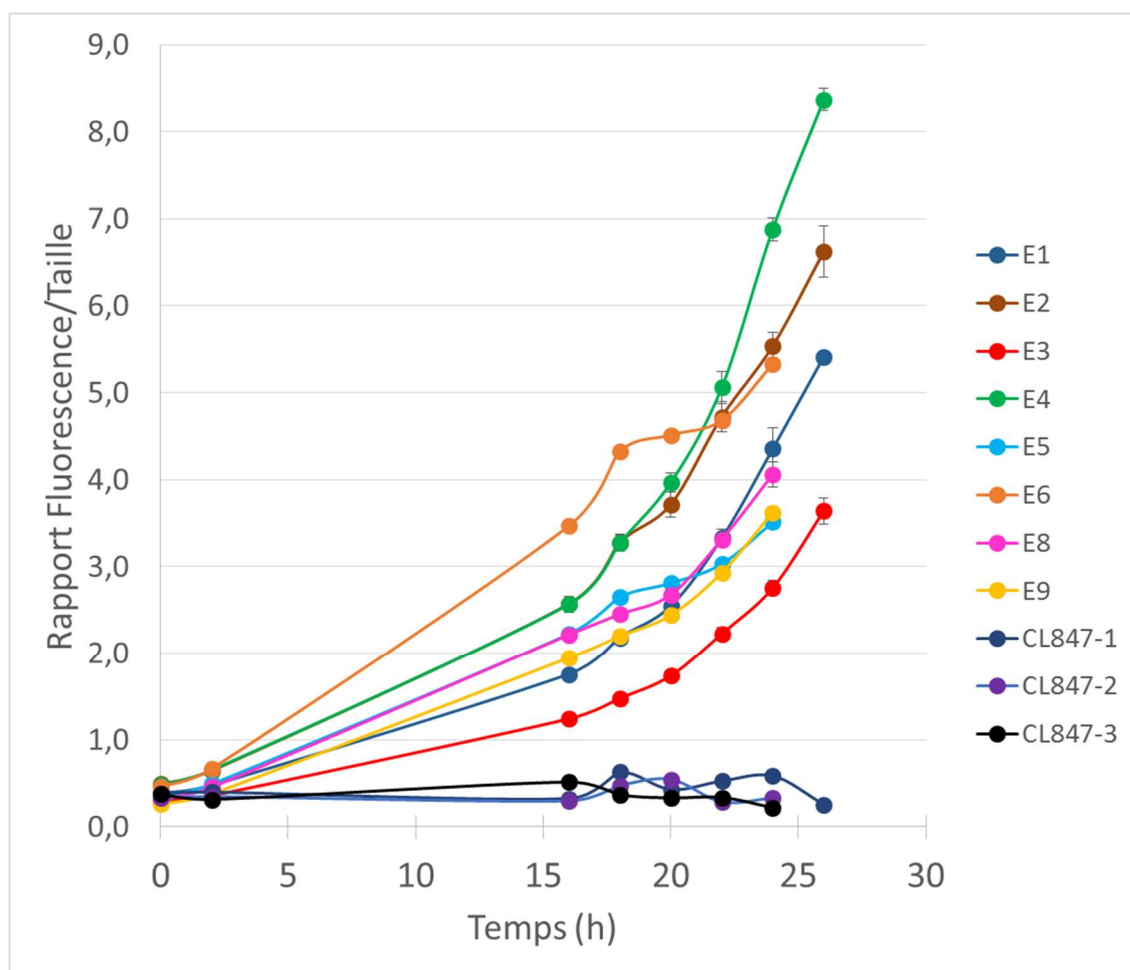


Figure 32 : Evolution du ratio Fluorescence/Taille au cours du temps pour les transformants E1 à E9 (hors E7) de pTEF-EGFP^{OPT}. Comparaison aux contrôles CL847. Moyennes obtenues sur la base de triplicats.

Le faisceau de courbes montre des différences significatives au cours du temps. Sont à noter les faibles écarts types obtenus au sein de chaque clone (si faibles que les écarts sont inférieurs à la taille des points sur les courbes). Il est évident que l'émission de fluorescence par les pTEF-EGFP^{OPT} est significativement supérieure à l'autofluorescence basale mesurée pour les contrôles CL847, pour lesquels le ratio Y/X est constant au cours du temps, comme montré précédemment. Le ratio Y/X des transformants est confondu avec les contrôles à t0 puis se détache à t+2h pour certains et pour tous dès t+16h. Par la suite, l'effet « transformant » se creuse, avec des émissions de fluorescence variables à une même taille de particule. A t+24h, la valeur minimale du ratio Y/X est de 2,8 (pour E3) et sa valeur maximale est de 6,9 (pour E4), soit une variabilité d'un facteur 2,5. Ces écarts s'expliquent probablement par l'intégration ectopique des cassettes de transformation entre les clones.

Ainsi, il est possible de différencier significativement l'émission de fluorescence avec le variant EGFP en comparaison au contrôle CL847. Les clones pTEF-EGFP^{OPT} se classent comme suit en termes d'émission de fluorescence normalisée par la taille à t+24h : E3 < E5 & E9 < E1 & E8 < E2 & E6 < E4. L'écart de production de fluorescence à une taille donnée est de l'ordre 2,5 entre la borne basse et la borne haute (variation comprise entre x 2,9 et x 3 au cours du temps).

E7 représente un cas particulier. En effet, il présente deux populations différentes en émission de fluorescence, dès t0. Celles-ci sont équivalentes en termes de Count Total. A

t+24h par exemple, la population haute représente $39,6 \pm 0,8\%$ du Count Total, contre $36,7 \pm 0,7\%$ pour la population basse. Cette double population ne peut être attribuée à une contamination, du moins cette hypothèse est-elle improbable. Une explication possible serait la présence de deux noyaux au sein du protoplaste (hétérocaryon) au moment de la transformation, qui sont ensuite transformées de façon indépendante, d'où les deux expressions différenciées obtenues.

f-3) Analyse d'un mélange 50/50 d'un contrôle CL847 et d'un transformant pTEF-EGFP^{OPT}

Le fort niveau de différenciation atteint entre les populations transformées et les contrôles grâce à la CMF a été confirmé par la réalisation d'un mélange 50/50% de spores CL847 et de spores issues du transformant pTEF-EGFP^{OPT} E2. Un suivi cinétique de la fluorescence a été réalisé à t0, t+18h et t+20h.

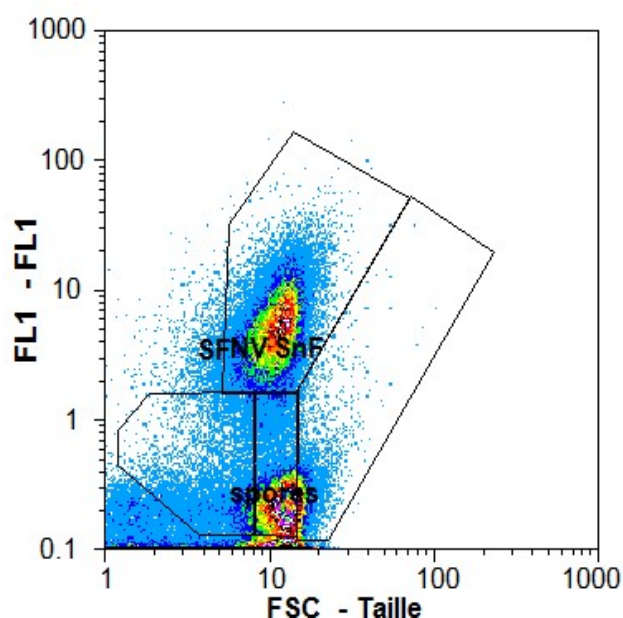


Figure 33 : Expression de fluorescence d'un mélange 50/50% de CL847/pTEF-EGFP^{OPT} E2, à t0

Pour ce mélange 50/50, deux populations sont immédiatement distinctes à t0 (Figure 33) : même taille, même structure mais une intensité de fluorescence très différente. Les spores au même stade de germination se distinguent donc seulement par leur émission de fluorescence (axe Y ou FL1). A t+18h, des observations en épi-fluorescence ont été réalisées (Figure 34). Toutes les spores et tous les hyphes sont fluorescents pour les clones pTEF-EGFP^{OPT}, comme montrés précédemment (voir Figure 31). A t+20h, sur le mix 50/50 % CL847/E2, la moitié des spores est fluorescente et l'autre moitié non, d'où une confirmation des résultats de cytométrie. A t+41h, on observe bien du mycélium vert pour E2 alors que rien ne ressort pour CL84.

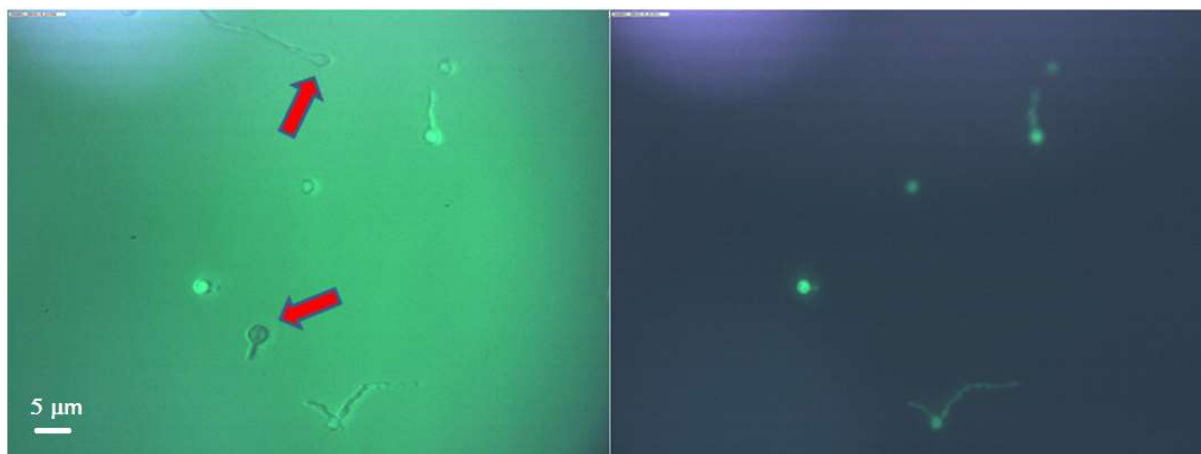


Figure 34 : Observations en transmission (gauche) et en épi-fluorescence (droite) du mélange 50/50% CL847/E2 à t+20h.

Grâce à l'emploi du variant EGFP^{OPT}, il est possible de distinguer les contrôles des transformants, ce qui sera nécessaire pour une application de criblage de transformants.

f-4) Criblage des promoteurs constitutifs associés au variant EGFP^{OPT}

Les résultats précédents ont montré l'intérêt de l'utilisation du variant EGFP optimisé (EGFP^{OPT}). L'objectif suivant a donc été de réaliser un nouveau criblage des promoteurs alternatifs à pCBHI, associé à ce variant et non plus à la LGFP. En effet, il est possible que des niveaux de fluorescence basaux n'aient pas pu être détectés précédemment à cause de l'effet variant de la GFP, mais deviennent à présent quantifiables avec le variant EGFP^{OPT}. L'ensemble des sept promoteurs pGPD, pHFB, pPDC, pPKI, pPTP, pTBP et pHYD ont été criblés en triplicatas avec le variant EGFP^{OPT}, associés au contrôle CL847. Le suivi cinétique de la fluorescence a été réalisé entre t0 et t+24h. Un cytogramme représentatif de chaque souche parmi le triplicat effectué est présenté en Annexe G pour les temps t0, t+18h et t+24h.

A t0, les spores pGFP-EGFP^{OPT} et pPKI-EGFP^{OPT} sont majoritairement situées en S avec un très léger chevauchement vers SF (la population ne traîne pas vers les faibles niveaux de fluorescence mais est concentrée en partie haute de la fenêtre S). Les souches pPTP, pTBP, pHFB et pHYD-EGFP^{OPT} ne se distinguent pas du contrôle CL847 avec toute la population de spores présente en fenêtre S. A t+2h, il n'y a pas d'évolution pour CL847, pPTP, pHYD, pHFB et pTBP-EGFP^{OPT}. Les souches pGPD et pPKI-EGFP^{OPT} commencent à donner un signal vers la fenêtre fluorescente. 55% de la population de pPDC se situe en fenêtre fluorescente, c'est le promoteur qui présente la meilleure verticalité à ce stade. A t+18h, il n'y a pas d'évolution pour CL847, pPTP, pHYD, pHFB et pTBP qui restent en SnF, alors que pGPD présente une population de spores répartie entre les deux fenêtres SF et SnF. Pour pPKI, le nuage de spores est compact et complètement situé en fenêtre fluorescente. L'intensité de fluorescence reste cependant bien moins marquée que pour pTEF. Pour PDC, le nuage se décale vers la linéarité (du fait de la germination plus importante) mais reste de façon compacte dans la fenêtre fluorescente. A t+22h, il n'y a toujours aucun changement pour pPTP, pHYD, pHFB et pTBP, assimilables au contrôle CL847. Pour pGPD, le nuage reste à cheval entre SF et SnF, tout en restant supérieur au contrôle. Pour pPKI, les spores sont dans la partie basse de la fenêtre fluorescente. Pour pPDC, le nuage est retombé vers la fenêtre non fluorescente. Enfin, à

t+24h, le profil linéaire de l'autofluorescence l'emporte pour tous. Seuls pGPD et surtout pPKI présentent une population située dans la fenêtre fluorescente. Le promoteur pPDC possède une population à cheval entre les fenêtres SF et SnF. Globalement, l'intensité de fluorescence est toujours très inférieure aux niveaux atteints pour les transformants pTEF.

Le suivi cinétique de la germination et la répartition des spores entre les fenêtres SF et SnF sont présentés en Figure 35.

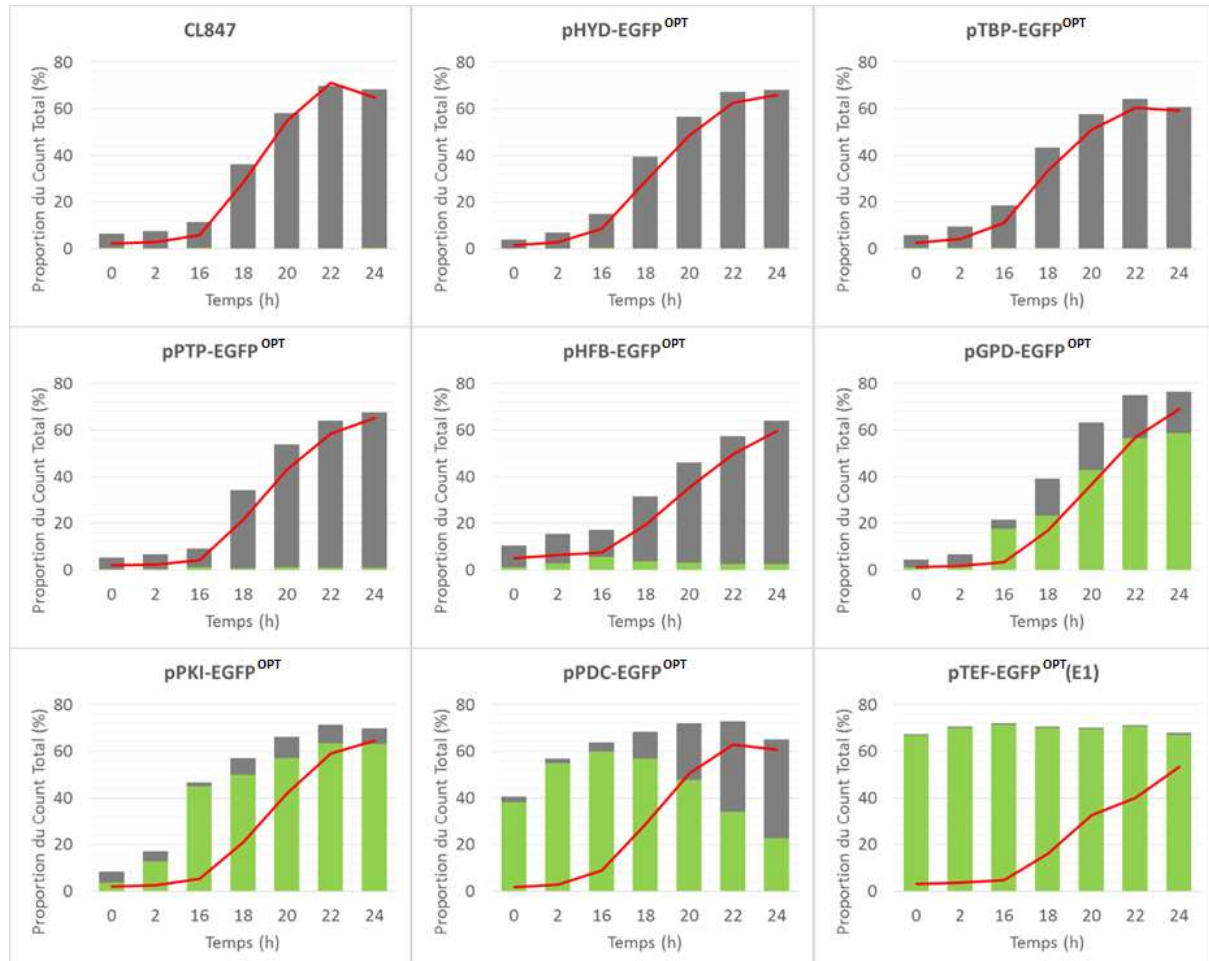


Figure 35 : Profils de répartition de la population (Count Total) dans la fenêtre SF (Vert) et la fenêtre SnF (Gris). Cinétique de germination (rouge) pour 8 promoteurs constitutifs et le contrôle CL847. Moyenne issues de triplicats.

Il est important de rappeler que la fenêtre SF regroupe la fluorescence en croissance ou pas alors que la fenêtre SnF ne comprend que les spores non fluorescentes en germination. C'est pourquoi dans le cas de pTEF par exemple, la germination est basale jusqu'à t+16h alors que la proportion du Count Total est déjà de 65 – 70% dans la fenêtre SF. La représentation de la Figure 35 permet de cribler rapidement le potentiel de chaque promoteur constitutif, comparés au contrôle CL847 et au transformant E1 de pTEF-EGFP^{OPT} (clone au comportement intermédiaire parmi le nuage des Ei, voir Figure 32). A trois exceptions près, tous les coefficients de variation sont inférieurs à 10% pour les données de la Figure 35.

Il apparaît que les promoteurs pHYD, pTBP, pPTP et pHFB ne se distinguent pas du contrôle CL847, ces promoteurs ne semblent donc pas adaptés à la production forte et précoce de GFP, même avec le variant EGFP^{OPT}. Seuls les promoteurs pGPD, pPKI et pPDC permettent l'expression du variant EGFP^{OPT}. L'intensité de fluorescence reste toujours maximale pour pTEF en comparaison à tous les autres promoteurs testés.

Le variant EGFP^{OPT} pourrait donc être mis en œuvre à des fins de criblages haut débit via la cytométrie en flux, sous le contrôle de promoteurs constitutifs comme pTEF, pPKI voire pGPD.

Une autre façon de considérer les données précédentes est de représenter les valeurs moyennes de taille (GMn-X) et de fluorescence (GMn-Y), afin de déterminer non plus la part de population totale émettant une fluorescence, mais plutôt l'intensité atteinte dans la fenêtre SF (Figure 36). Cette représentation a été préférée à celle de l'indicateur Y/X car les signaux évoluant en parallèle, le ratio n'est pas assez discriminant. D'autre part, il était souhaitable de montrer que cinq constructions ne possèdent pas d'augmentation de croissance ni de fluorescence.

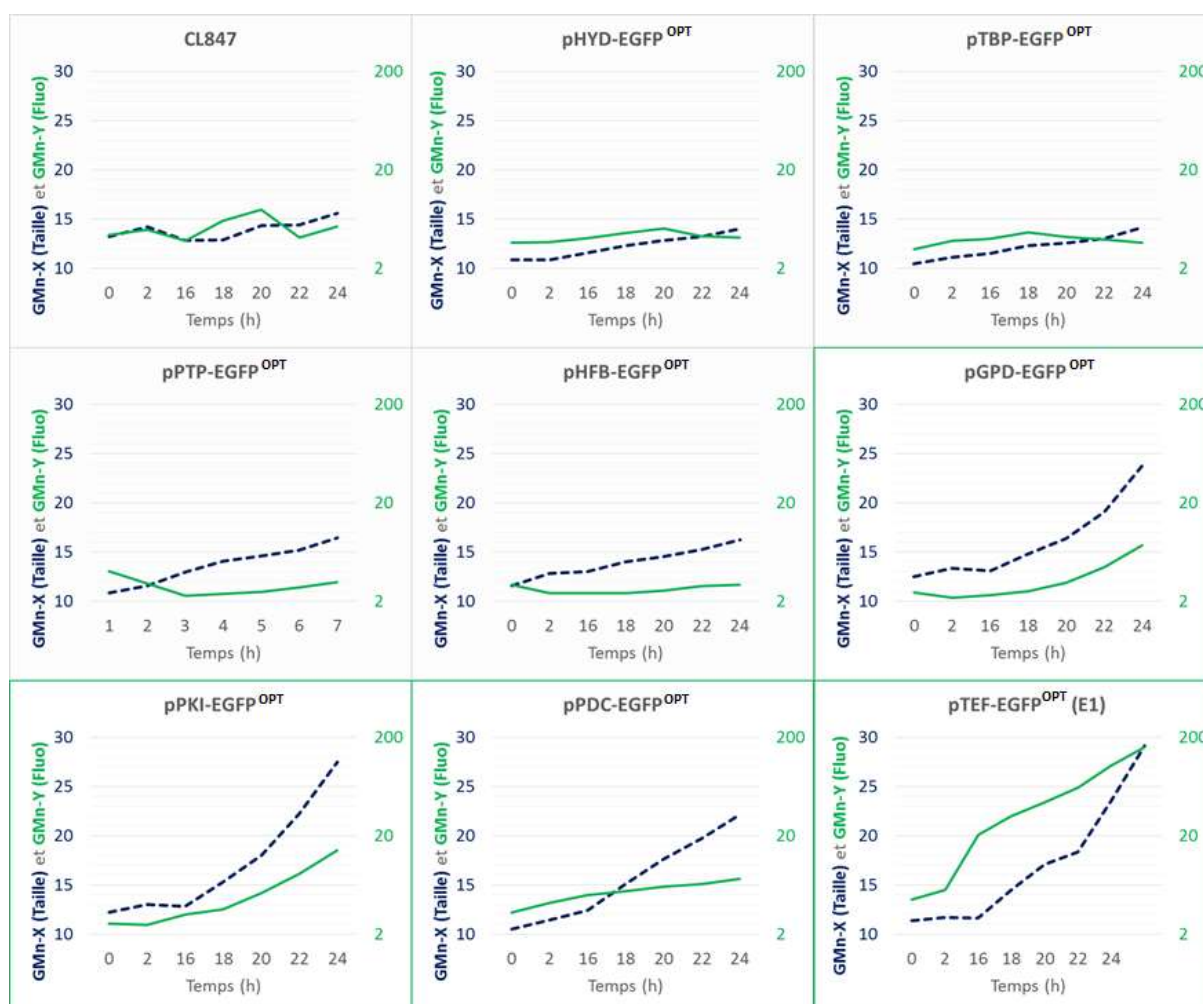


Figure 36 : Profils d'augmentation de la taille moyenne (GMn-X, pointillés bleu) et de l'intensité de fluorescence (GMn-Y, trait plein vert) dans la fenêtre SF pour 8 promoteurs constitutifs et le contrôle CL847. Moyenne issues de triplicats.

Cette nouvelle perspective sur les résultats confirme le précédent classement des promoteurs. Cependant, elle permet aussi de visualiser les différentes cinétiques de

croissance par rapport à l'émission de fluorescence. Les constructions pHYD-EGFP^{OPT} et pTBP-EGFP^{OPT} ne se distinguent pas du contrôle CL847. pPTP-EGFP^{OPT} et pHFB-EGFP^{OPT} présentent des profils similaires : une croissance un peu plus prononcée mais une fluorescence très faible, voire inférieure aux constructions précédentes. Cet exemple illustre bien la raison pour laquelle les Figure 35 et Figure 36 sont complémentaires et doivent être consultées en parallèle. En effet, dans le cas présent, pHYD, pTBP, pPTP et même pHFB présentent si peu de spores en fenêtre SF qu'il est à se demander si leur profil de GMn-X et GMn-Y devraient être commentés (graphiques grisés en Figure 36). Au contraire, les analyses sur pGPD, pPKI, pPDC et les transformants pTEF sont tout à fait justifiées (encarts verts en Figure 36) et permettent de déceler des différences entre profil de croissance et profil de fluorescence.

Le classement des promoteurs constitutifs pour une expression maximisée de GFP (forte et précoce) reste le suivant : pTEF > pPDC (pour t < t+16h) > pPKI > pGPD.

f-5) Evaluation du promoteur pCBHI avec le variant EGFP^{OPT}

Le variant EGFP optimisé (EGFP^{OPT}) a fait la preuve de son intérêt pour l'expression de fluorescence chez *T. reesei*. Trois promoteurs constitutifs ont également montré un potentiel pour le contrôle de l'expression dans des conditions compatibles avec la CMF, c'est-à-dire forte et précoce. Il était intéressant de déterminer à ce stade où se situeraient les niveaux d'expression du variant EGFP^{OPT} avec le promoteur CBHI, certes inductible mais potentiellement porteur d'un très haut niveau d'expression. Pour cela, deux clones issus des mêmes conditions de transformation (T3) ont été testés ensemble, afin d'ôter tout effet potentiel des transformations. Ce test a également permis d'évaluer la construction du promoteur lui-même. En effet, pCBHI fait 1,5 kb, il est donc un peu long pour les constructions. Est-il possible de le raccourcir tout en gardant la même efficacité d'expression ?

Cette étude comprenait donc les constructions pCBHIL-EGFP^{OPT} et pCBHIC-EGFP^{OPT}. Deux types de promoteurs pCBHI ont été testés : une version longue (1,5 kb d'après la littérature, code « L ») et une version courte (1,1 kb, code « C »). Il n'a pas été vérifié que la version courte de CBHI soit encore soumise à la répression glucose. Le suivi cinétique de la fluorescence a été effectué de t0 à t+24h (Annexe H). Le suivi cinétique de la germination et la répartition des spores entre les fenêtres SF et SnF sont récapitulés en Figure 37.

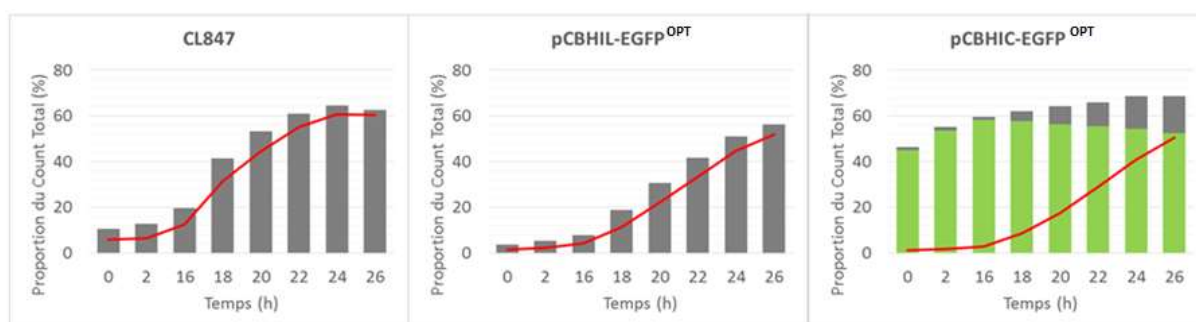


Figure 37 : Profils de répartition de la population (Count Total) dans la fenêtre SF (Vert) et la fenêtre SnF (Gris). Cinétique de germination (rouge) pour les constructions du promoteur pCBHIC-EGFP^{OPT} et pCBHIL-EGFP^{OPT}, versus le contrôle CL847. Moyenne issues de triplicats.

La construction pCBHIL-EGFP^{OPT} ne présente aucune différence avec le contrôle CL847, si ce n'est une croissance retardée. Au contraire, pCBHIC-EGFP^{OPT} présente une forte population en fenêtre fluorescente dès t0 ($45,1 \pm 0,2\%$) alors qu'il n'y a pas encore de spores en germination. Avec le temps, la quantité de spores en fenêtre SF augmente jusqu'à t+16h ($58,2 \pm 0,8\%$), se stabilise jusqu'à t+18h ($57,7 \pm 0,5\%$) puis commence à diminuer jusqu'à t+26h où elle n'est plus que de $52,7 \pm 0,3\%$. En contrepartie, la part du Count total situé en fenêtre SnF augmente de façon continue à partir de t+16h, passant de $1,2 \pm 0,03\%$ à $15,9 \pm 0,4\%$ à t+26h. Il est donc probable que pCBHIC ait fonctionné lors de la sporulation, d'où une EGFP encapsulée dans les spores mais un niveau d'expression peu maintenu lors de la germination suivante.

La courbe de germination est la même pour les versions longue et courte du promoteur CBHI mais l'expression de fluorescence est drastiquement différente. pCBHIC permet de détecter de bons niveaux de fluorescence dans un temps compatible avec la CMF, contrairement à pCBHIL. Cependant, tout comme pPDC précédemment, la fluorescence commence à s'éteindre après t+16 à t+18h, au profit de la croissance des spores. Il serait donc possible d'utiliser la version courte du promoteur pCBHI, mais celui-ci présente comme pTEF le désavantage de compter une fluorescence forte dès t0 (risque d'encapsulation de protéines fluorescentes lors du cycle précédent), ce qui pourrait impacter le suivi de transformation lors duquel les spores n'ont pas déjà germé avant les observations. D'autre part, la fluorescence diminuant avec le temps, seuls les tous premiers stades de germination pourraient être étudiés. Etant donné que pCBHI nécessite une induction et une culture en milieu synthétique, les promoteurs constitutifs semblent finalement posséder un plus grand potentiel pour des études haut-débit à l'aide de la cytométrie en flux, en particulier pTEF et pPKI.

V. Conclusion & Perspectives

Les enjeux de l'étude étaient de contribuer à remplacer les marqueurs antibiotiques, préférentiellement utilisés aujourd'hui pour la sélection de souches transformées de *Trichoderma reesei*. Les marqueurs fluorescents représentaient pour cela une piste de travail intéressante. Cependant, il était nécessaire de démontrer la faisabilité d'un couplage à des méthodes de criblage haut-débit comme la cytométrie en flux (CMF). Cette synthèse sera donc l'occasion de récapituler les principaux résultats : criblage des promoteurs et des variants de la GFP ; hétérogénéité clonale (« effet transformant ») ; mise en place d'indicateurs d'intérêt pour le suivi de la fluorescence et la croissance. Les limites de la méthode à ce stade seront évoquées, ainsi que des idées d'ouverture de la CMF vers d'autres applications pour le laboratoire (utilisation de plusieurs marqueurs fluorescents, criblage sur la morphologie de souches, séquences IRES).

a) Validation des objectifs de l'étude et criblage des promoteurs

Les objectifs étaient premièrement de construire des souches ayant intégré un marqueur fluorescent (ici la GFP), et deuxièmement capables d'exprimer la protéine assez fortement et précocement pour permettre une bonne détection en cytométrie en flux. La première étape a été atteinte puisque 18 constructions comportant des promoteurs constitutifs et quatre comportant le promoteur pCBHI ont pu être sélectionnées à l'issue de transformations sur le critère de la résistance à l'hygromycine. La deuxième étape, plus sensible, a été l'identification des constructions compatibles avec les exigences de la CMF (expression forte et précoce). Le variant EGFP optimisé (EGFP^{OPT}) pour *T. reesei* a largement contribué à ce résultat, conduisant à une bonne émission de fluorescence lorsqu'il est associé à certains promoteurs, plus particulièrement pTEF, pCBHIC (version courte), pPKI, pGPD et dans une moindre mesure pPDC. Les profils d'expression sont cependant distincts, notamment pour pPDC, qui présente comme pTEF une forte intensité fluorescente à t0. Elle croît ensuite jusqu'à t+16h puis décroît fortement jusqu'à disparaître à t+24h. La croissance semble donc l'emporter sur la fluorescence dans le cas de pPDC. Ce promoteur ne présente d'intérêt que pour un criblage avant t+16h (dans les conditions de culture testées). pPKI présente un niveau de fluorescence qui va en s'intensifiant jusqu'à t+24h. pGPD pourrait également présenter un intérêt dans le cas d'un criblage sur la fluorescence mais la proportion de spores en fenêtre SF reste néanmoins toujours inférieure à 50%, l'expression est donc intermédiaire. De ce fait, pPKI semble donc être le meilleur candidat après pTEF pour l'expression forte et précoce de fluorescence, car il possède même l'avantage par rapport à pTEF de ne pas présenter de fluorescence à t0 : elle apparaît lors de la germination. Dans le cas d'un suivi de transformation, le profil de fluorescence sera donc plus proche de celui de pPKI. L'intensité de fluorescence maximale est cependant atteinte dans le cas du promoteur pTEF, qui présente une très forte avance sur tous les autres candidats testés durant la présente étude. A l'inverse, le variant LGFP n'a pas permis d'exprimer la fluorescence dans des conditions compatibles avec la CMF.

A ce stade, la preuve de concept de combinaison entre un marqueur fluorescent et le criblage haut-débit de la CMF a donc été établie. Il est envisageable d'utiliser ce type de marquage pour remplacer les marqueurs antibiotiques. Cependant, il est à noter que les constructions de l'étude possèdent les deux marqueurs (fluorescent et antibiotique) puisqu'il s'agissait d'une étude exploratoire. La prochaine étape sera de réaliser une nouvelle transformation de *T. reesei* avec les cassettes contenant le variant EGFP^{OPT} sous le contrôle d'un des 4 ou 5 promoteurs précédents, sans marqueur antibiotique, puis de réaliser le criblage des clones par CMF.

b) Estimation de l'hétérogénéité clonale

La CMF a permis l'évaluation de l'effet « transformant », basé sur la construction pTEF-EGFP^{OPT}, pour laquelle neuf transformants différents ont été testés. Il a été démontré que l'expression de fluorescence à un temps donné pouvait varier d'un facteur 2,5. Il s'agit probablement d'un effet de l'intégration ectopique du gène d'intérêt. Pour aller plus loin, il serait possible via séquençage, d'identifier des loci préférentiels pour l'expression. De plus, un transformant (E7) a présenté un comportement atypique, avec la présence de deux sous-populations de proportion équivalente, exprimant la fluorescence de façon très différenciée. En effet, les deux sous populations étaient centrées respectivement sur 27 et 155 Unités de Fluorescence soit un facteur 5,7. Cela représente un écart deux fois plus important que la variabilité associée aux transformants (au moins dans le cas de pTEF). Cependant, le choix des neuf transformants étudiés s'est axé sur des critères visuels de sporulation, l'effet transformant est donc très probablement sous-estimé. Le transformant E7 traduit probablement l'existence d'un protoplaste hétérocaryon lors de la transformation, c'est-à-dire possédant deux noyaux, tous deux transformés mais de façon distincte.

c) Indicateurs d'intérêt en CMF pour l'étude de *T. reesei*

Au plan méthodologique, l'étude a montré que la CMF représente un bon outil de détection de la fluorescence pour le champignon filamentueux qu'est *T. reesei*, dans les conditions d'expression précoce et forte. Ce premier verrou une fois levé, nos travaux ont permis de dégager des indicateurs intéressants pour mettre en relation la production de la protéine d'intérêt (ici GFP) et la croissance de la souche (biomasse). D'une part, le pourcentage de viabilité des spores est accessible, via le double marquage. De même, le nombre de spores totales, le nombre de spores germées ainsi que le nombre de spores exprimant la protéine d'intérêt ont pu être quantifiés avec cet appareil (ce n'est pas le cas pour tous les cytomètres dépourvus de la technologie « True Volumetric Absolute Counting technique » spécifique à Sysmex Partec). D'autre part, l'indicateur Y/X (Fluorescence/Taille) permettrait d'estimer de façon plus directe la productivité spécifique de protéines (protéine d'intérêt/biomasse). Ces deux indicateurs paraissent complémentaires pour trouver un bon compromis entre production et biomasse, par exemple lors d'un suivi de fermentation. Il s'agit pour le moins d'un indicateur intéressant, sûrement optimisable (à une taille de référence, un temps donné etc). En modélisant la relation entre les deux indicateurs protéine

d'intérêt/protéines totales et protéine d'intérêt/biomasse, le seul suivi d'un batch de fermentation en CMF permettrait de prédire la productivité de la souche étudiée.

d) Limites de la méthode

Malgré les avancées réalisées lors de l'étude, avant d'envisager la CMF comme un outil de criblage haut-débit de routine, il est nécessaire d'estimer le cas des faux positifs. En effet, lors des suivis du contrôle CL847, quelques particules (spores, contaminations ?) ont été détectées dans la fenêtre SF, de l'ordre de 0,3% de la population totale. Pourtant, les constructions avaient été sélectionnées en amont grâce à la présence d'un marqueur antibiotique, assurant la bonne intégration du vecteur de la GFP. Dans le cas d'un remplacement des marqueurs antibiotiques par des rapporteurs fluorescents, cette pré-sélection n'aurait plus lieu. Ainsi, le criblage en CMF devrait faire face à la présence de beaucoup moins de positifs « vrais », aujourd'hui de l'ordre de 300 individus bien transformés pour 10 millions au départ. En extrapolant les premières données obtenues, 0,3% de la population correspondraient à 30 000 faux positifs. Ceux-ci seraient donc largement supérieurs en nombre aux 300 vrais positifs attendus, d'où un bruit trop élevé par rapport au vrai signal fluorescent. La solution sera l'adaptation du fenêtrage NV/S/SF/SnF établi dans l'étude, et plus particulièrement de la fenêtre SF, en allant plus haut en Unités de fluorescence. Pour cela, le cas de pTEF est d'ores et déjà très intéressant, puisque l'émission de fluorescence a lieu à de très hautes intensités (> 100 voire 500 Unités, voir Figure 29 et Annexe F). Ainsi, créer un fenêtrage « SF vrai » ne prenant en compte que les spores se trouvant au-dessus d'une intensité minimale (seuil à déterminer) et non dans toute l'actuelle fenêtre SF permettrait de ne pas prendre en compte trop de faux positifs lors d'une récupération des spores d'intérêt par FACS. La Figure 36 permet d'identifier un seuil de fluorescence intéressant autour de 20 Unités de FL1. En effet, ce fenêtrage aurait permis de ne pas prendre en compte les constructions autres que pTEF. Pour optimiser le fenêtrage, mettre en place un seuil complémentaire sur la taille serait également un plus. Par exemple, un seuil à 15 Unités de FSC aurait permis de conserver pGDP, pPKI et pPDC sans prendre en compte les constructions de type « faux positifs ». Enfin, utiliser la biolistique comme méthode de transformation devrait créer des objets de granulométrie (taille, rugosité, rigidité) différente en raison de l'intégration de la bille de tungstène portant le transgène. Les résultats alors attendus sont schématisés en Figure 38.

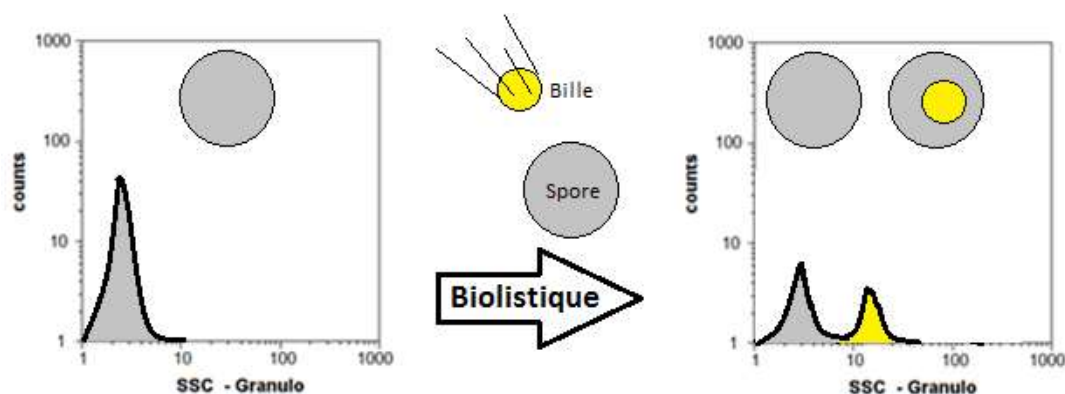


Figure 38 : Schématisation de changements structuraux attendus suite à l'intégration d'une bille de tungstène (jaune) enrobée d'ADN dans les spores (grises) lors d'une transformation biolistique

Une réflexion différente de la lumière serait sûrement produite et identifiable sur le graphique $\text{Counts} = f(\text{Granulométrie})$ en CMF. Ce système permettrait de différencier les faux positifs (spores/particules exprimant de la fluorescence sans avoir intégré le gène d'intérêt) via un double fenêtrage sur $\text{Counts} = f(\text{Granulométrie})$ et $\text{FL1} = f(\text{FSC})$. Il sera alors nécessaire de réaliser un tri des clones, via le couplage à un système FACS par exemple.

e) Vers d'autres applications de la CMF ?

e-1) Utilisation de plusieurs marqueurs fluorescents

Une extension de l'application actuelle de la CMF serait le recours à plusieurs marqueurs fluorescents différents (les appareils les plus récents vont jusqu'à 21 couleurs). Un intérêt de ce multi-marquage est que la CMF pourrait alors cribler des transformants multiples, via l'association de chaque transgène d'intérêt avec une sonde fluorescente, et ce en une seule transformation. En effet, il est important de rappeler qu'aujourd'hui, il est nécessaire de passer par des cycles de transformations/sélections successifs et de savoir recycler les marqueurs, autrement qu'en utilisant la propriété auxotrophique (exemple de *pyr4*). Les marqueurs fluorescents offrent justement une possibilité de recyclage facilité puisqu'un marqueur vert et un rouge se remplaçant à chaque nouvelle intégration seraient par exemple suffisants. Le multi-marquage serait également une façon de réduire le risque de sélection de faux positifs, en réduisant la probabilité d'apparition des cinq marqueurs simultanément pour des souches non transformées.

Pour aller plus loin, il serait intéressant de ne plus subir une intégration ectopique en se tournant vers une intégration dirigée de la cassette contenant le gène d'intérêt. Pour cela, la première étape serait la création d'une souche plateforme disposant de marqueurs fluorescents déposés à des loci d'intérêt identifiés au préalable (par exemple ici le cas du transformant pTEF-EGFP^{OPT} E4 qui exprime très fortement la protéine GFP d'où une insertion probablement à un endroit intéressant du gène, ou bon locus d'expression). Lors de la transformation, les gènes d'intérêt associés à d'autres marqueurs fluorescents viendraient prendre la place des marqueurs originaux, conduisant à trois cas de figure possibles lors du suivi en CMF (Figure 39) : 1) les couleurs de base ont été remplacées par les couleurs associées aux gènes d'intérêt, le gène s'est bien inséré dans le génome de *T. reesei*, et ce au bon locus ; 2) les deux couleurs (origine et associée au gène) sont détectées : le gène d'intérêt s'est donc inséré, mais pas au locus souhaité ; 3) une seule couleur ou aucune détectée, d'où un problème d'excision des séquences fluorescentes lors de la transformation. Ce système permettrait de coupler les fonctions de marqueur rapporteur et marqueur de sélection de la fluorescence.

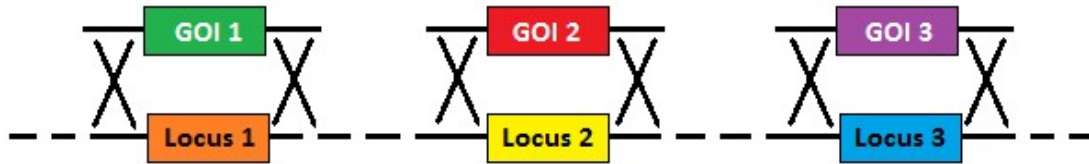


Figure 39 : Schématisation de l'insertion au locus souhaité de gènes d'intérêt (GOI) conduisant au remplacement de la fluorescence d'origine (orange, jaune, bleu) par la fluorescence associée aux gènes (vert, rouge, violet)

e-2) Intérêt des séquences IRES

Afin d'optimiser le couplage CMF/marqueur fluorescent, il serait particulièrement intéressant d'utiliser une séquence IRES (Internal Ribosome Entry Site), permettant de coupler le gène d'intérêt à un marqueur fluorescent. Tous deux seraient alors contrôlés par le seul promoteur du gène d'intérêt (par exemple une enzyme cellulolytique comme CHBI, CBHII, EGI, EGII...). Ainsi, mesurer l'intensité de fluorescence permettrait d'identifier et de quantifier l'extinction de la production enzymatique, qui intervient parfois au cours des repiquages ou lors d'un scale-up (mutation ou action épigénétique dans la lignée au cours des cycles de vie par exemple). Cette méthode serait plus simple que les méthodes actuelles de recherche de l'enzyme sur un gel, ou de dosage des protéines. Cette idée nécessiterait bien sûr des étapes préalables de construction de souches avec la séquence IRES (se rapprocher des études bibliographiques), puis de corrélation entre un dosage d'enzyme et la détection de fluorescence en CMF.

Par ailleurs, les séquences IRES présenteraient un intérêt pour mettre en œuvre un marquage différencié des cinq enzymes principales de *T. reesei* (CBHI, CBHII, EGI, EGII et BGLI) avec cinq marqueurs fluorescents. Les résultats en CMF permettraient alors d'identifier dans le cocktail les proportions de chaque enzyme, en lien à la biomasse totale.

e-3) Intérêt pour le suivi de fermentation

Le dernier avantage de la CMF est son intérêt pour le suivi de fermentation. En effet, pour les bactéries ou les levures, la CMF est aujourd'hui largement utilisée pour des applications de suivi qualité, grâce à la détermination de l'activité métabolique et de l'intégrité membranaire (Laplace-Builhé et al., 1993 ; Bouix & Leveau, 2001 ; Rault et al., 2007 ; Comas-Riu & Rius, 2009 ; Hewitt et al., 2001). La revue de Diaz et al., (2010) présente par exemple les applications récentes de la CMF pour le contrôle de fermentation pour des applications alimentaires et pharmaceutiques, ainsi que le développement de modèles cinétiques dédiés à l'optimisation des bioprocédés. Dans le cas de *T. reesei*, il serait possible de normaliser les batchs par divers indicateurs quantitatifs et qualitatifs de type biométriques, acquis sur une très large population, tels que la numération, viabilité, taille, granulométrie, ou encore production de protéines d'intérêt.

Ainsi, à une échelle plus exploratoire, la CMF pourrait-elle différencier grâce à la taille et/ou la granulométrie, des souches produisant des hyphes ou des hyphes branchés ? En effet, dans le cas de nombreux branchements, le réseau est constitué d'un fort maillage, conduisant

probablement à une augmentation de viscosité. La CMF et ses dérivés (couplage CMF et microscopie : Image Stream[®]) se positionneraient donc comme un outil de prévision intéressant pour la fermentation.

Enfin, la combinaison à un trieur (FACS) pourrait-elle permettre de récupérer les spores qui sont le plus en avance en termes de germination (extrémité droite du nuage formé entre les fenêtres S et SnF) ou le plus en retard (extrémité gauche), afin d'isoler des populations plus homogènes et synchronisées en termes de germination ?

e-4) Autres perspectives pour le criblage haut-débit

Le développement récent d'outils tels la micro et la milli-fluidique ouvrent de nouvelles pistes pour le criblage haut-débit. Ces dernières permettent notamment l'encapsulation de particules dans des gouttelettes d'émulsion (Brouzes et al., 2009) ou dans des microgels (Tan & Takeuchi, 2007). Des spores de *T. reesei* ont ainsi été encapsulées avec succès dans des billes d'alginate, comme le montre la figure suivante (Delgado-Ramos et al., 2014).

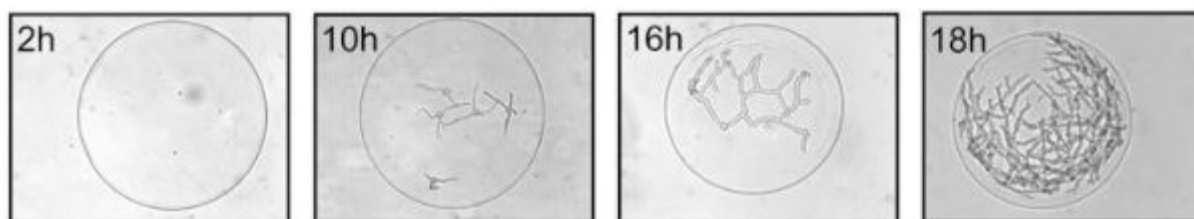


Figure 40 : Encapsulation de spores de *T. reesei* dans des billes d'alginate (3%) durant la germination. D'après Delgado-Ramos et al., 2014.

Ce système pourrait contenir la propagation du mycélium, d'où un allongement de la durée possible des observations. De plus, le recours à des imprimantes 3D par exemple, offrirait la possibilité de designer des encapsulations à façon pour les spores.

La microfluidique offrirait donc une bonne complémentarité avec la CMF, en donnant accès à des phénomènes plus tardifs et à des objets qui pourraient être de plus grande taille. Enfin, les outils microfluidiques sont moins coûteux que les outils de cytométrie en flux.

Références

- Aleksenko, A., & Cullterbuck, A.J. (1996). The plasmid replicator AMA1 in *Aspergillus nidulans* is an inverted duplication of a low-copy number dispersed genomic repeat. *Molecular Microbiology*, 19(3), 565-574.
- Allman, R. (1992). Characterisation of fungal spores using flow cytometry. *Mycological Research*, 96(12), 1016-1018.
- Armaleo, D., Ye, G.-N., Klein, T.M., Shark, K.B., Sandford, J.C., & Johnston, S.A. (1990). Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. *Current Genetics*, 17, 97-103.
- Aro, N., Pakula, T., & Penttilä, M. (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Review*, 29, 719-739.
- Bej, A.K., & Perlin, M.H. (1989). A high efficiency transformation system for the basidiomycete *Ustilago maydis* employing hygromycin resistance and lithium-acetate treatment. *Gene*, 80, 171-176.
- Bouix, M., & Leveau, J.Y. (2001). Rapid assessment of yeast viability and yeast vitality during alcoholic fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 107(4), 217-225.
- Bradner, J.R., & Nevalainen, K.M. (2003). Metabolic activity in filamentous fungi can be analysed by flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods*, 54(2), 193-201.
- Brewer, B.J., & Fangman, W.L. (1987). The localization of replication origins on ARS plasmids in *S. cerevisiae*. *Cell*, 51(3), 463-471.
- Brouzes, E., Medkova, M., Savenelli, N., Marran, D., Twardowski, M., Brian Hutchison, J., Rothberg, J.M., Link, D.R., Perromon N., & Samuels, M.L. (2009). Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening, *PNAS*, 106(34), 14195-14200.
- Casanave, D., Duplan, J.L., & Freund, E. (2007). Diesel fuels from biomass. (2007). *Pure and Applied Chemistry*, 79(11), 2071-2081.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, E., Ward, W.W., Prasher, D.C. (1994). Green Fluorescent Protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148), 802-805.
- Comas-Riu, J. & Rius, N. (2009). Flow cytometry applications in the food industry. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(8), 999-1011.
- Cormack, B.P., Bertram, G., Egerton, M., Gow, N.A., Falkow, S., & Brown, A.J. (1997). Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology*, 143, 303-311.
- Costanzo, M.C., & Fox, T.D. (1988). Transformation of yeast by agitation with glass beads. *Genetics*, 120, 667-670.

Crosland-Taylor, P.J., (1953). A device for counting small particles suspended in a fluid through a tube. *Nature*, 171, 37-38.

Da Silva Perez, D., Berthelot, A., N'Guyen The, N., Guillemain, A., De Morogues, F., & Petit-Conil, M. (2011). Qualité bioénergétique de la biomasse forestière en vue de la production de biocarburants de deuxième génération. *Revue Forestière de France*, LXIII, 2, 135-148.

d'Enfert, C. (1997). Fungal spore germination: insights from the molecular genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 21, 163-172.

de Groot, M.J.A., Bundock, P., Hooykaas, P.J.J., & Beijersbergen, A.G.M. (1998). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology*, 16, 839-842.

de Vries, R.P., & Visser, J. (2001). Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 65, 497-522.

Delgado-Ramos, L., Marcos, T., Ramos-Guelfo, M., Sanchez-Barrionuevo, L., Smet, F., Chavez, S., & Canovas, D. (2014). Flow cytometry of microencapsulated colonies for genetics analysis of filamentous fungi. *Genes Genome Genetics (G3)*, 4(11), 2271-2278.

Diaz, M., Herrero, M., Garcia, L.A., & Quiros C. (2010). Application of flow cytometry to industrial microbial processes. *Biochemical Engineering Journal*, 48, 385-407.

Durand, H., Baron, M., Calmels, T., and Tiraby, G. (1988a). Classical and molecular genetics applied to *Trichoderma reesei* for the selection of improved cellulolytic industrial strains. *FEMS Symp.*, 43, 135-152.

Dusser, P. (2013). Biodiesel : la réglementation européenne et le débat sur son évolution. *OCL*, 20(5), 1-4.

Edwards, R., Mahieu, V., Griesemann, J.C., Larive, J.F., & Rikeard, D. (2006). Well-to-wheels analysis for future automotive fuels and powertrains in the European context. *WTT Report 030506*. New York, Society of Automotive Engineer. SAE transactions.

Fernandez-Abalos, J.M., Fox, H., Pitt, C., Wells, B., & Doonan, J.H. (1998). Plant-adapted green fluorescent protein is a versatile vital reporter for gene expression, protein localization and mitosis in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, 27, 121-130.

Fincham, J.R.S. (1989). Transformation in fungi. *Microbiological Reviews*, 53, 148-170.

Goldman, G.H., Van Montagu, M., & Herrera-Estrella, A. (1990). Transformation of *Trichoderma harzianum* by high-voltage electric pulse. *Current Genetics*, 17, 169-174.

Gruber, F., Visser, J., Kubicek, C.P. & Graaff, L.H. (1990). Cloning of the *Trichoderma reesei* pyrG gene and its use as a homologous marker for a high-frequency transformation system. *Current Genetics*, 18, 447-451.

Gurtler J.L. (2008). Biocarburants : développement et perspectives. *OCL*, 15(4), 235-239.

Harman, G., & Kubicek, C. (1998). *Trichoderma and Gliocladium* (Taylor & Francis).

Herrera-Estrella, A., Goldman, G.H., & Van Montagu, M. (1990). High efficiency transformation system for the biocontrol agents, *Trichoderma* spp. *Molecular Microbiology*, 4, 839-843.

Herpoël-Gimbert, I., Margeot, A., Dolla, A., Jan, G., Mollé, D., Lignon, S., Mathis, H., Sigoillot, J.C., Monot, F., Asther, M. (2008). Comparative secretome analyses of two *Trichoderma reesei* RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains. *Biotechnology for Biofuels*, 1(1), 1-18.

Hewitt, C.J., & Nebe-Von-Caron G. (2001). An industrial application of multiparameter flow cytometry: Assessment of cell physiological state and its application to the study of microbial fermentations. *Cytometry*, 44(3), 179-187.

Himmel, M.E., Ding, S.Y., Johnson, D.K., Adney, W.S., Nimlos, M.R., Brady, J.W., & Foust, T.D. (2007). Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, 315, 804-807.

Hinnen, A., Hicks, J.B., & Fink, J.A. (1978). Transformation of yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 75, 1929-1933.

Howell, C.R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87: 4-10.

Hulett, H.R., Bonner, W.A., Sweet, R.G., & Herzenberg, L.A. (1973). Development and application of a rapid cell sorter, *Clinical Chemistry*, 19(8), 813-816.

Jorgensen, H., Kristensen, J.B., & Felby, C. (2007). Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*, 1, 119-134.

Kasuga, T., Townsend, J.P., Tian, C., Gilbert, L.B., Mannhaupt, G., Taylor, J.W., & Glass N.L. (2005). Long-oligomer microarray profiling in *Neurospora crassa* reveals the transcriptional program underlying biochemical and physiological events of conidial germination. *Nucleic Acids Research*, 33(20), 6469-6485.

Kelly, J.M., & Hynes, M.J. (1985). Transformation of *Aspergillus niger* by the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*. *EMBO Journal*, 4, 475-479.

Kim, S., & Miasnikov, A. (2010). A Method for introducing nucleic acid into fungal cells. Patent US 2010/0304468A1, 12/2010.

Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G.J., Kovacs, W., Meyer, W., Petrini, O., Gams, W., Börner, T., & Kubicek, C.P. (1996). Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 93, 7755-7760.

Kullman, B. (2000). Application of flow cytometry for measurement of nuclear DNA content in fungi. *Folia Cryptogamica Estonica*, 36, 31-46.

Kurtz, M.B., Cortelyou, M.W., Miller, S.M., Lai, M., & Kirsch, D.R. (1987). Development of autonomously replicating plasmids for *Candida albicans*. *Molecular and Cellular Biology*, 7(1), 209-217.

Laplace-Builhé, C., Hahne, K., Hunger, W., Tirilly, Y., & Drocourt, J. (1993). Application of flow cytometry to rapid microbial analysis in food and drink industries. *Biology of the Cell*, 78(1-2), 123-128.

Lichius, A., Seidl-Seiboth, V., Seiboth, B., Kubicek, C.P. (2014). Nucleo-cytoplasmic shuttling dynamics of the transcriptional regulators XYR1 and CRE1 under conditions of cellulose and xylanase gene expression in *Trichoderma reesei*. *Molecular Microbiology*, 94(5), 1162-1178.

Lorang, J.M., Tuori, R.P., Martinez, J.P., Sawyer, T.L., Redman, R.S., Rollins, J.A., Wolpert, T.J., Johnson, K.B., Rodriguez, R.J., Dickman, M.B. & Ciuffetti, L.M. (2001). Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 1987-1994.

Lorito, M., Hayes, C.K., Di Pietro, A., & Harman, G.E. (1993). Biolistic transformation of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* using plasmid and genomic DNA. *Current Genetics*, 24, 349-356.

Mach, R.L., Schindler, M., & Kubicek, C.P. (1994). Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals. *Current Genetics*, 25, 567-570.

Mach, R.L., & Zeilinger, S. (1998). Genetic transformation of *Trichoderma* and *Gliocladium*. In Kubicek, C.P., & Harman, G.E. (eds). *Trichoderma & Gliocladium*, Vol. 1, Taylor & Francis, London, 225-241.

Magana-Ortiz, D., Coconi-Linares, N., Ortiz-Vazquez, E., Fernandez, F., Loske, A.M., & Gomez-Lim, M.A. (2013). A novel and highly efficient method for genetic transformation of fungi employing shock waves. *Fungal Genetics and Biology*, 56, 9-16.

Maheshwari, R. (2012). *Fungi, Experimental Methods in Biology*, Second Editions, Maheshwari, R. & Benett, J.W. (eds), CRC Taylor & Francis, New York.

Malherbe, S., & Cloete, T.E. (2002). Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 1(2), 105-114.

Margeot, A., Hahn-Hagerdal, B., Edlund, M., Slade, R., & Monot, F. (2009). New improvements for lignocellulosic ethanol. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 372-380.

Margeot, A. (2014). Génétique et génomique d'un champignon filamenteux industriel. Mémoire d'Habilitation à Diriger des Recherches, Université Paris 7 – Denis Diderot.

Martinez, D., Berka, R.M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Arvas, M., Baker, S.E., Chapman, J., Chertkov, O., Coutinho, P.M., Cullen, D., Danchin, E.G., Grigoriev, I.V., Harris, P., Jackson, M., Kubicek, C.P., Han, C.S., Ho, I., Larrondo, L.F., de Leon, A.L., Magnuson, J.K., Merino, S., Misra, M., Nelson, B., Putnam, N., Robbertse, B., Salamov, A.A., Schmoll, M., Terry, A., Thayer, N., Westerholm-Parvinen, A., Schoch, C.L., Yao, J., Barabote, R., Nelson, M.A., Detter, C., Bruce, D., Kuske, C.R., Xie, G., Richardson, P., Rokhsar, D.S., Lucas, S.M., Rubin, E.M., Dunn-Coleman, N., Ward, M. & Brettin, T.S. (2008). Genome sequencing and analysis of the biomass-

degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature Biotechnology*, 26(5), 553-560.

Martinez, A.T., Ruiz-Duenas, F.J., Del Rio, J.C., & Guitierrez, A. (2009). Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 348-357.

Mikkelsen, L., Sarrocco, S., Lübeck, M., & Jensen, D.F. (2003). Expression of the red fluorescent protein DsRed-Express in filamentous ascomycete fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 223, 135-139.

Mishra, N.C, & Tatum, E.L. (1973). Non-mendelian inheritance of DNA-induced inositol independence in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 70, 3875-3879.

Moldavan, A. (1934). Photo-electric techniques for the counting of microscopical cells, in Scientific Apparatus and Laboratory Methods, *Science*, 188-189.

Montero-Barrientos, M., Cardoza, R.E., Gutierrez, S., Monte, E., & Hermosa, R. (2007). The heterologous overexpression of hsp23, a small heat-shock protein gene from *Trichoderma virens*, confers thermotolerance to *T. harzanium*. *Current Genetics*, 52, 45-53.

Mustalahti, E., Saloheimo, M., & Joensuu, J.J. (2013). Intracellular protein production in *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) with hydrophobin fusion technology. *New Biotechnology*, 30(2), 262-268.

Pentilla, M., Nevalainen, H., Ratto, M., Salminen, E., Knowles, J. (1987). A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene*, 61, 155-164.

Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., & Cormier M.J. (1992). Primary structure of the Aequoreavictoriagreen-fluorescent protein. *Gene*, 111, 229-233.

Punt, P.J., Oliver, R.P., Dingemans, M.A., Pouwels, P.H., & van den Hondel, C.A.M.J.J. (1987). Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene*, 56, 117-124.

Radford, A., Pope, S., Sazci, A., Fraser, M.J., & Parish, J.H. (1981). Liposome-mediated genetic transformation of *Neurospora crassa*. *Molecular and General Genetics*, 184(3), 567-569.

Rault, A., Béal, C., Ghorbal, S., Ogier, J.C., & Bouix, M. (2007). Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage. *Cryobiology*, 55(1), 35-43.

Rivera, A.L., Magana-Ortiz, D., Gomez-Lim, M., Fernandez, F., & Loske A.M. (2014). Physical methods for genetic transformation of fungi and yeast. *Physics of Life Reviews*, 11, 184-203.

Rubin, E.M. (2008). Genomics of cellulose biofuels. *Nature*, 454, 841-845.

Reese, E.T. (1976). History of the cellulase program at the U.S. Natick Development Center. *Biotechnology Bioengineering Symposium*, 6, 9-20.

Ritter, S. (2008). Lignocellulose: A Complex Biomaterial. *Chemical and Engineering News*, 86(49), 15.

Saloheimo, M., Pakula, T., Aro, N., & Joensuu, J.J. (2014). *Protein production – quality control and secretion stress responses in Trichoderma reesei*. In *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, Chapter 6, Gupta, V.K., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A., Upadhyay, R.S., Druzhinina, I., & Tuohy, M.G. (ed), Elsevier, 81-88.

Schenk, P.M., Thomas-Hall, S.R., Stephens, E., Marx, U.C., Mussgung, J.H., Posten, C., Kruse, O., & Hankamer, B. (2008). Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *BioEnergy Research*, 1, 20-43.

Schuster, A., Bruno, K.S., Collett, J.R., Baker, S.E., Seiboth, B., Kubicek, C.P., & Schmoll, M. (2012). A versatile toolkit for high throughput functional genomics with *Trichoderma reesei*. *Biotechnology for Biofuels*, 5(1), 1-10.

Seiboth, B., Ivanova, C., Seidl-Seiboth, V. (2011). *Trichoderma reesei: A Fungal Enzyme Producer for Cellulosic Biofuels*. In *Biofuel Production-Recent Developments and Prospects*, Chapter 13, dos Santos Bernardes, M.A. (ed), InTech, Rijeka, 309-340.

Serna, L., & Stadler, D. (1978). Nuclear division cycle in germinating conidia of *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology*, 136(1), 341-351.

Shimomura, O., Johnson, F. H., and Saiga, Y. (1962), Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*, *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 59, 223–239.

Steiger, M.G., Vitikainen, M., Uskonen, P., Brunner, K., Adam, G., Pakula, T., Penttilä, M., Saloheimo, M., Mach, R.L., & Mach-Aigner, A.R. (2011). Transformation system for *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) that favors homologous integration and employs reusable bidirectionally selectable markers. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 114-121.

Steiger, M.G. (2013). Molecular tools in *Trichoderma* genetic studies. Chapter 7 in *Trichoderma: biology and applications*, Horwithz, B.A, Singh, U.S., Mala Mukherjee, Schmoll, M. (eds), CABI, Wallingford, 128-143.

Tan, W.H., & Takeuchi, S. (2007). Monodisperse alginate hydrogel microbeads for cell encapsulation. *Advanced Materials*, 19(18), 2696-2701.

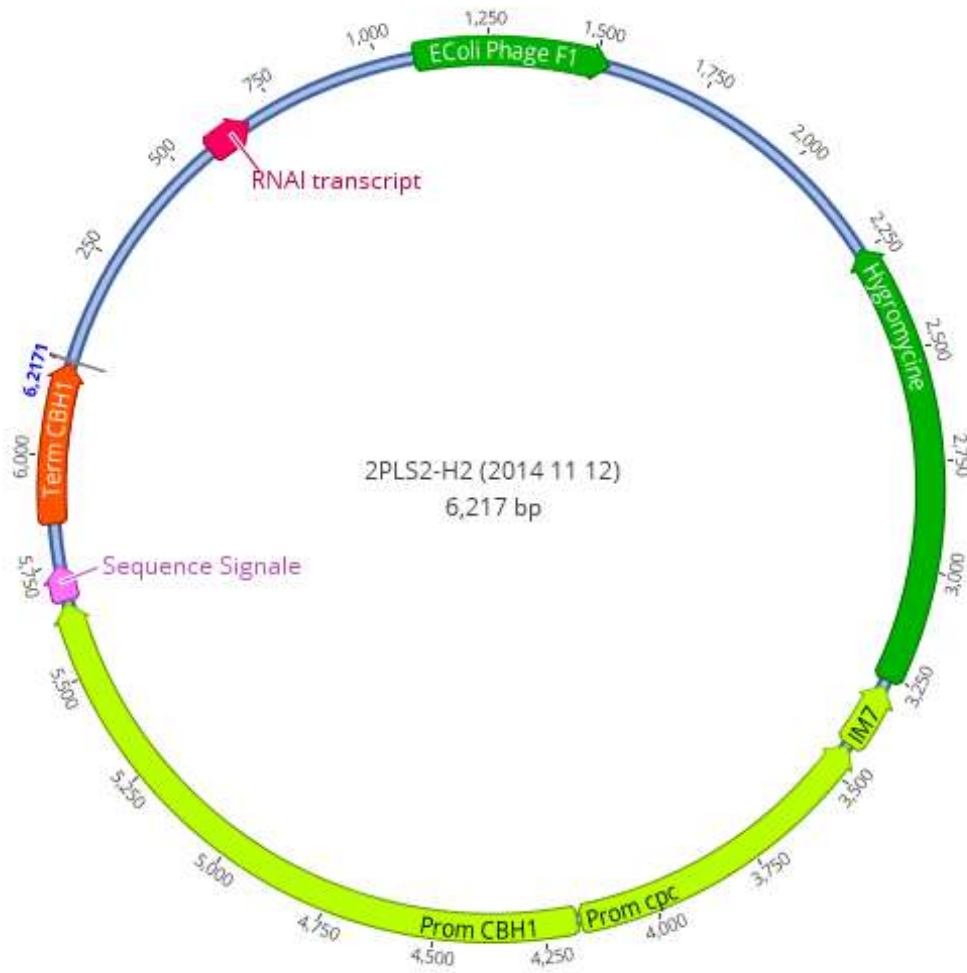
Te'o, V.S., Bergquist, P.L., & Nevalainen, K.M. (2002). Biolistic transformation of *Trichoderma reesei* using the Bio-Rad seven barrels Hepta Adaptor system. *Journal of Microbiological Methods*, 51(3), 393-399.

Thomas, M.D., & Kenerley, C.M. (1989). Transformation of the mycoparasite *Gliocladium*. *Current Genetics*, 15(6), 415-420.

- Thondset, W., Kim, S., Bower, B., Lantz, S., Kelemen, B., Pepsin, M., Chow, N., Mitchinson, C., & Ward, M. (2010). Flow cytometric sorting of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* for improved strains. *Enzyme and Microbial Technology*, 47(7), 335-341.
- Utermark, J., Karlovsky, P. (2008). Genetic transformation of filamentous fungi by *Agrobacterium tumefaciens*. Nature Protocol exchange, Protocol 427, 1-18.
- Van den Hondel, C.A.M.J.J., & Punt, P.J. (1991). Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi. In Peberdy, J.F., Caten, C.E., Ogden, J.E., & Benett, J.W. (eds), *Applied Molecular Genetics of Fungi*. Cambridge University Press, Cambridge, 1-28.
- Van Dilla, M.A., Trujillo, T.T., Mullaney, P.F., & Coulter, J.R. (1969). Cell microfluorometry: a method for rapid fluorescence measurement, *Science*, 163, 1213-1214.
- Vanholme, B., Desmet, T., Ronsse, F., Rabaey, K., Van Breusegem, F., De Mey, M., Soetaert, W., & Boerjan, W. (2013). Towards a carbon-negative sustainable bio-based economy. *Frontiers in Plant Science*, 4, 1-17.
- Ward, M., Kodama K.H., & Wilson L.J. (1989). Transformation of *Aspergillus awamori* and *A. niger* by electroporation. *Experimental Mycology*, 13(3), 289-293.
- Wei, H., Xu, Q., Taylor, L.E., Baker, J.O., Tucker, M.P., & Ding, S.Y. (2009). Natural paradigms of plant cell wall degradation. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 330-338.
- Wenisch, C., Linnau, K.F., Parschalk, B., Zedtwitz-Liebenstein, K., & Georgopoulos, A. (1997). Rapid susceptibility testing of fungi by flow cytometry using vital staining. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(1), 5-10.
- Zeilinger, S., Galhaup, C., Payer, K., Woo, S.I., Mach, R.L., Fekete, C., Lorito, M., & Kubicek, C.P. (1999). Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. *Fungal Genetics and Biology*, 26, 131-140.
- Zeilinger, S. (2004). Gene disruption in *Trichoderma atroviride* via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Current Genetics*, 45, 54-60.
- Zhong, Y.H., Wang, X.L., Wang, T.H., & Jiang, Q. (2007). *Agrobacterium*-mediated transformation (AMT) of *Trichoderma reesei* as an efficient tool for random insertional mutagenesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 1348-1354.
- Zhong, Y.H., Yu, H., Wang, X., Lu, Y., & Wang, T. (2011). Towards a novel efficient T-DNA-based mutagenesis and screening system using green fluorescent protein as a vital reporter in the industrially important fungus *Trichoderma reesei*. *Molecular Biology Reports*, 38, 4145-4151.
- Zou, J., Shi, S., Jiang, Y., van den Brink, J., de Vries, R.P., Chen, L., Zhang, J., Ma, L., Wang, C., & Zhou, Z. (2012). Construction of cellulose hyper-expression system in *Trichoderma reesei* by promoter and enzyme engineering. *Microbial Cell Factories*, 11(1), 21-33.

Annexe A

Cartographie du plasmide 2PLS²-H²



Annexe B

Les séquences des oligonucléotides utilisées pour l'amplification PCR des fragments portant le variant LGFP ou l'EGFP sont détaillées comme suit :

1. Primers de LGFP avec polymérase Herculase Fusion II :

GFP.FspI_For	TCCATCTGCGCA ATGAGCAAGGGAGAAGAACTCTTT
GFP.BamHI_Rev	TCCATCGGATC CTTACTTGTACAGCTCATCCATTCC

2. Primers de LGFP avec polymérase Q5 :

LGFP-FspI (For)	TGCGCA ATGAGCAAGGGAGAAGAACT
LGFP-XhoI (Rev)	GTGCCTCGAG TTACTTGTACAGCTCATCCATTCC

3. Primers de EGFP avec polymérase Q5 :

F2 EGFP FspI (For)	AGGATCT TGCGCA ATGGTGTC
R1 TRE-EGFP XhoI (Rev)	GCCACCT CGAG TTACTTGT

4. Primers des 9 promoteurs avec polymérase Q5

p.ptp XbaI (For)	ATTGGCTCTAGA AAAGGGGATCCCAGCTCCC
p.ptp FspI (Rev)	ATTGGCTGCGCA TGTGTCCGAGGAGATGGATGATAGA
$T_{\text{hybridation}} = 69,5^{\circ}\text{C}$	

p.tbp XbaI (For)	CCCTCTAT CTAGACT TTTGGAAAGG
p.tbp FspI (Rev)	ATTGGCTGCGCA GTTGGAGGATCGAGCAAAAAG
$T_{\text{hybridation}} = 64,1^{\circ}\text{C}$	

p.hyd XbaI (For)	ATTGGCTCTAGA GGGACATGAGATTGACTCGC
p.hyd FspI (Rev)	ATTGGCTGCGCA GGTGAGAAGAGTGGAGGTTG
$T_{\text{hybridation}} = 67,2^{\circ}\text{C}$	

p.hfb XbaI (For)	ATTGGCTCTAGA ACTGCTCTCCGCAGCATGCT
p.hfb FspI (Rev)	ATTGGCTGCGCA AGAGTTGGCCTGTGGTGTGTTGG
$T_{\text{hybridation}} = 72,0^{\circ}\text{C}$	

p.CBH1court XbaI (For)	ATTGGCTCTAGA TTTCCCTGATTGAGCGTACCCGTACAAG
p.CBH1court FspI (Rev)	ATTGGCTGCGCA GATGCGCAGTCCGCGGTTGA
$T_{\text{hybridation}} = 72,0^{\circ}\text{C}$	

p.GPD XbaI (For)	ATTGGCTCTAGA GACGCAGAAGAAGGAAATCG
p.GPD FspI (Rev)	ATTGGCTGCGCA TTTGTATCTGCGAATTGAGCTT
$T_{\text{hybridation}} = 62,0^{\circ}\text{C}$	

p.TEF XbaI (For)	ATTGGCTCTAGA AAAGCGGCGAATGACTCTTC
------------------	--

p.TEF Fspl (Rev)
T_{hybridation} = 64,1°C

ATTGGCTGCGCA TTTGACGGTTTGTGTGATGTAG

p.pdc Xbal (For)
p.pdc Fspl (Rev)
T_{hybridation} = 67,2°C

ATTGGCTCTAGA AGGACTTCCAGGGCTACTTG
ATTGGCTGCGCA GATTGTGCTGTAGCTGCGC

p.pdc Xbal (For)
p.pdc Fspl (Rev)
T_{hybridation} = 69,5°C

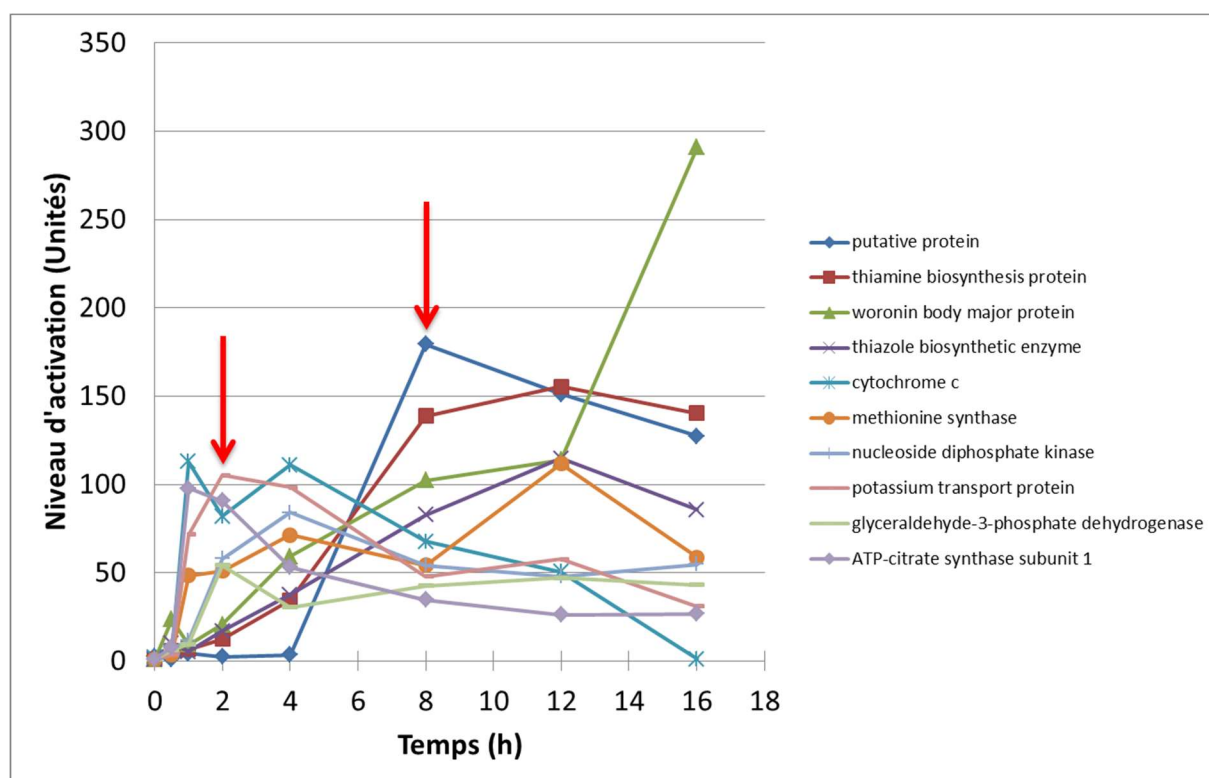
ATTGGCTCTAGA AGGACTTCCAGGGCTACTTG
ATTGGCTGCGCA GATTGTGCTGTAGCTGCGC

Légende : **Gras** = sites de restriction

Annexe C

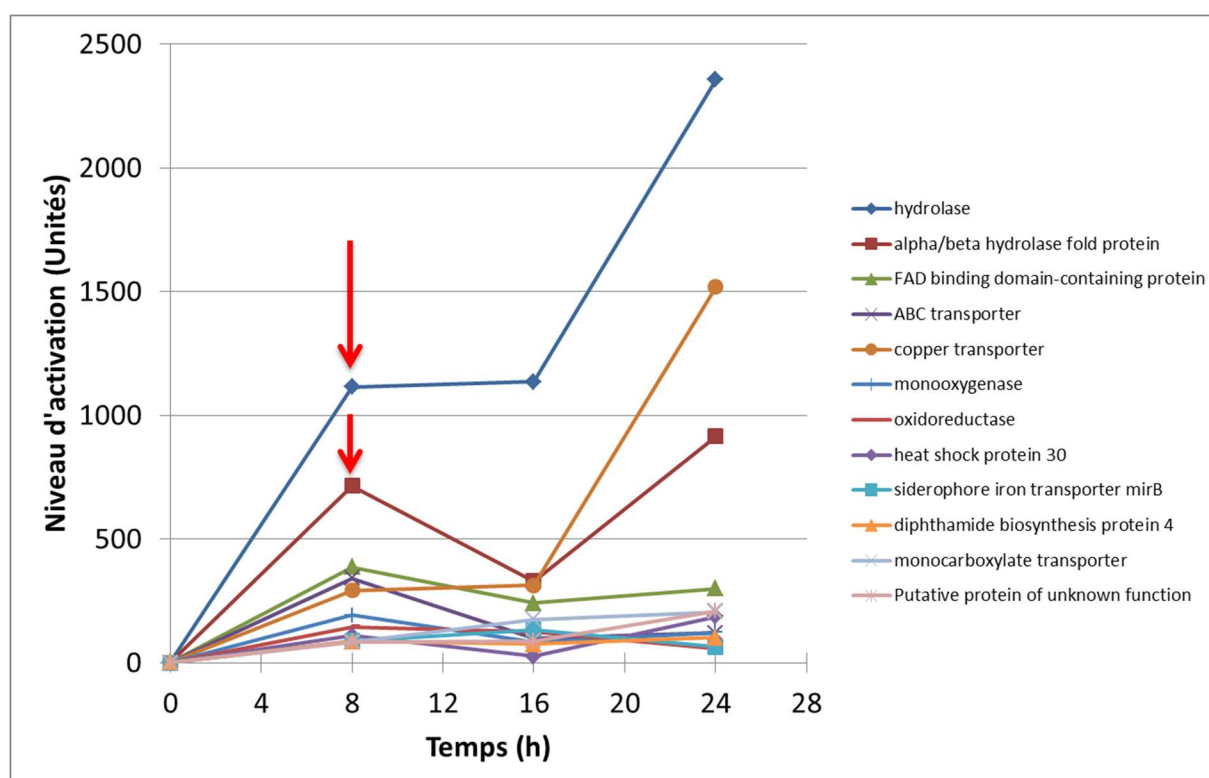
C-1) Etude des données de RNA seq chez *N. crassa*. Recherche d'orthologues chez *T.reesei*. Profils d'activation des séquences ARN d'après Kasuga et al., (2005).

Code NC	0	0,5	1	2	4	8	12	16	Code TRI	Ortholog / Trichoderma
NCU04276.1	3	1	4	2	3	179	151	127	TRI110879	
NCU09345.1	1	6	7	12	34	139	155	140	TRI121620	thiamine biosynthesis protein
NCU08332.1	1	24	9	21	59	102	114	291	TRI123056	woronin body major protein
NCU06110.1	1	10	5	17	37	83	115	85	TRI68608	thiazole biosynthetic enzyme
NCU01808.1	2	5	113	82	111	68	50	1	TRI51130	cytochrome c
NCU08434.1	1	4	48	51	71	54	112	59	TRI3823	methionine synthase
NCU04202.1	1	7	12	58	84	54	48	55	TRI47221	nucleoside diphosphate kinase
NCU06449.1	1	3	71	105	98	48	58	31	TRI120752	potassium transport protein
NCU01528.1	1	6	10	54	30	43	47	43	TRI119735	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
NCU06785.1	1	8	98	91	53	35	26	27	TRI121824	ATP-citrate synthase subunit 1



C-2) Etude des données de RNA seq chez *P. anserina*. Recherche d'orthologues chez *T.reesei*.
 Profils d'activation des séquences ARN d'après des données personnelles non publiées.

Code PA	0	8	16	24	Code TRI	Ortholog / Trichoderma
Pa_3_10370	0	1115	1136	2358	TRI69066	hydrolase
Pa_5_13010	1	714	331	915	TRI106120	alpha/beta hydrolase fold protein
Pa_5_3630	0	388	242	301	TRI65098	FAD binding domain-containing protein
Pa_3_10830	1	342	100	120	TRI47897	ABC transporter
Pa_4_4770	0	293	314	1518	TRI108749	copper transporter
Pa_5_13030	0	193	84	122	TRI59396	monooxygenase
Pa_7_150	1	145	125	58	TRI39588	oxidoreductase
Pa_7_4010	1	110	26	186	TRI46285	heat shock protein 30
Pa_7_120	1	89	135	64	TRI71008	siderophore iron transporter mirB
Pa_1_7880	1	87	76	102	TRI58869	diphthamide biosynthesis protein 4
Pa_5_7050	0	85	176	205	TRI69164	monocarboxylate transporter
Pa_6_9090	0	83	89	209	TRI75394	-----



Annexe D

Alignement des séquences nucléotidiques du variant LGFP avec le variant EGFP^{OPT} optimisé pour *T. reesei* (optimisation de codons).

Identity	1				10				20					30					40					50					60					70
1. 2- LGFP Frame 1	ATG	---	---	AGC	AAG	GG	GA	GA	CTC	TT	TT	AC	GG	GT	GTC	CC	AT	CT	GT	GAG	CT	GA	GG	CT	GAG	CT	GA	GG	CT	GA	GG	CT	GA	GG
2. EGFP Optimisé Frame 1	ATG	GTC	---	AGC	AAG	GG	GA	GA	CTC	TT	TT	AC	GG	GT	GTC	CC	AT	CT	GT	GAG	CT	GA	GG	CT	GAG	CT	GA	GG	CT	GA	GG	CT	GA	GG

Identity					80					90					100					110					120					130					140
1. 2- LGFP Frame 1	GGC	CAC	AA	TTC	CT	GT	CT	GG	GA	GG	GA	GG	GA	GG	GA	GG	GA	GG	GA	GG	GA	GG	GA	GG	GA	GG	GA	GG	GA	GG	GA	GG	GA	GG	
2. EGFP Optimisé Frame 1	GGC	CAC	AA	TTC	AG	GT	AG	GG	GA	GG	GA	GG	GA	GG	GA	GG	GA	GG	GA	GG	GA	GG	GA	GG	GA	GG	GA	GG	GA	GG	GA	GG	GA	GG	

Identity					150					160					170					180					190					200					210
1. 2- LGFP Frame 1	TC	CA	CA	GG	AAG	CT	CC	GT	CC	TGG	CC	AC	CT	GT	ACC	ACC	CT	TA	GG	CT	TA	GG	CT	TA	GG	CT	TA	GG	CT	TA	GG	CT	TA	GG	
2. EGFP Optimisé Frame 1	TC	CA	CA	GG	AAG	CT	CC	GT	CC	TGG	CC	AC	CT	GT	ACC	ACC	CT	TA	GG	CT	TA	GG	CT	TA	GG	CT	TA	GG	CT	TA	GG	CT	TA	GG	

Identity					220					230					240					250					260					270					280
1. 2- LGFP Frame 1	AGC	AG	TAC	CC	GAC	CAC	ATG	AAG	CAG	CA	GAC	TTC	TT	AA	CT	GC	ATG	CC	GA	GG	TA	GT	CAG	GAG	ATG	CC	GA	GG	TA	GT	CAG	GAG	ATG	CC	
2. EGFP Optimisé Frame 1	AGC	AG	TAC	CC	GAC	CAC	ATG	AAG	CAG	CA	GAC	TTC	TT	AA	CT	GC	ATG	CC	GA	GG	TA	GT	CAG	GAG	ATG	CC	GA	GG	TA	GT	CAG	GAG	ATG	CC	

Identity					290					300					310					320					330					340					350
1. 2- LGFP Frame 1	AG	CA	ATC	TTC	TT	AAG	GA	GA	GG	AA	TA	AAG	AC	AG	GC	GA	GT	AAG	TT	GA	GG	GA	AC	CT	GA	GG	GA	AC	CT	GA	GG	GA	AC	CT	
2. EGFP Optimisé Frame 1	AG	CA	ATC	TTC	TT	AAG	GA	GA	GG	AA	TA	AAG	AC	AG	GC	GA	GT	AAG	TT	GA	GG	GA	AC	CT	GA	GG	GA	AC	CT	GA	GG	GA	AC	CT	

Identity					370					380					390					400					410					420					430
1. 2- LGFP Frame 1	GT	AAC	AG	AT	GAG	CT	AA	GGC	AT	GA	TT	AAG	GA	GA	GG	AAC	AT	CT	GG	CAC	AAG	CT	GAG	TAC	GA	GG	CAC	AAG	CT	GAG	TAC	GA	GG	CAC	
2. EGFP Optimisé Frame 1	GT	AAC	AG	AT	GAG	CT	AA	GGC	AT	GA	TT	AAG	GA	GA	GG	AAC	AT	CT	GG	CAC	AAG	CT	GAG	TAC	GA	GG	CAC	AAG	CT	GAG	TAC	GA	GG	CAC	

Identity					440					450					460					470					480					490					500
1. 2- LGFP Frame 1	AAC	TA	AA	CT	CAC	AA	GT	TAC	AT	ATG	GCA	GA	AAG	CAG	AAG	AA	GG	AT	AAG	GT	AA	TTC	AAG	AT	AA	GG	AT	AAG	GT	AA	TTC	AAG	AT		
2. EGFP Optimisé Frame 1	AAC	TA	AA	AG	CAC	AA	GT	TAC	AT	ATG	GCA	GA	AAG	CAG	AAG	AA	GG	AT	AAG	GT	AA	TTC	AAG	AT	AA	GG	AT	AAG	GT	AA	TTC	AAG	AT		

Identity					510					520					530					540					550					560					570
1. 2- LGFP Frame 1	CA	CAC	AAC	AT	GAG	GA	GA	GG	CT	CA	CT	GA	GA	GG	CT	GA	GG	CT	GA	GG	CT	GA	GG	CT	GA	GG	CT	GA	GG	CT	GA	GG	CT	GA	GG
2. EGFP Optimisé Frame 1	CA	CAC	AAC	AT	GAG	GA	GA	GG	CT	CA	CT	GA	GA	GG	CT	GA	GG	CT	GA	GG	CT	GA	GG	CT	GA	GG	CT	GA	GG	CT	GA	GG	CT	GA	GG

Identity					580					590					600					610					620					630					640
1. 2- LGFP Frame 1	CA	GT	CTC	CTC	CC	GA	AA	CAC	TA	CTC	GC	ACT	CA	CT	GC	ACT	CA	CT	GC	ACT	CA	CT	GC	ACT	CA	CT	GC	ACT	CA	CT	GC	ACT	CA	CT	
2. EGFP Optimisé Frame 1	CA	GT	CTC	CTC	CC	GA	AA	CAC	TA	CTC	GC	ACT	CA	CT	GC	ACT	CA	CT	GC	ACT	CA	CT	GC	ACT	CA	CT	GC	ACT	CA	CT	GC	ACT	CA	CT	

Identity					650					660					670					680					690					700					710
1. 2- LGFP Frame 1	GAC	CAC	ATG	GTC	CTC	CT	GAG	TT	GT	AC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	
2. EGFP Optimisé Frame 1	GAC	CAC	ATG	GTC	CTC	CT	GAG	TT	GT	AC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	

Identity					720																														
1. 2- LGFP Frame 1	GAC	CAC	ATG	GTC	CTC	CT	GAG	TT	GT	AC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	
2. EGFP Optimisé Frame 1	GAC	CAC	ATG	GTC	CTC	CT	GAG	TT	GT	AC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	GC	

Code couleur :

- Bases : A = rouge ; C = bleu ; G = jaune ; T = vert. N'apparaissent qu'en cas de différence entre les deux séquences LGFP et EGFP^{OPT}.
- Vert foncé = identité entre les deux séquences
- Tiret noir = non identité entre les deux séquences

Annexe E

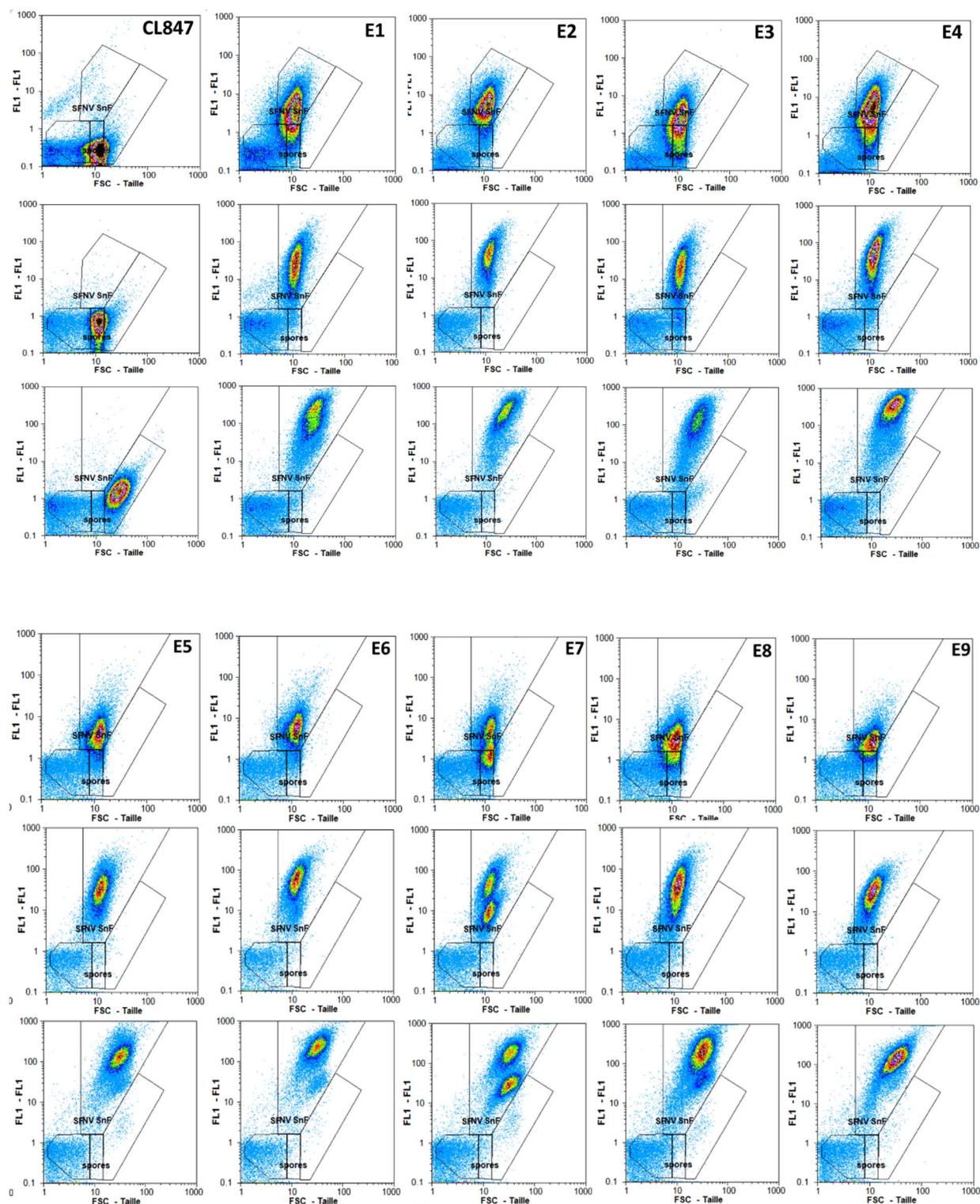
Le récapitulatif des cinétiques d'émission de fluorescence (à t0, t+16 et t+24h) analysées pour 3 réplicats biologiques (composés chacun de 3 réplicats techniques) pour le contrôle CL847, est présenté comme suit. Les coefficients de variation supérieurs à 10% sont colorés en jaune.

	Fenêtre SnF	CL847 (1)				CL847 (2)				CL847 (3)			
		Moy	Ec	Type	CV (%)	Moy	Ec	Type	CV (%)	Moy	Ec	Type	CV (%)
t0	% Count total SnF	9,1	0,36	3,92	4,7	0,46	9,85	6,0	0,43	7,16			
	GMn-x SnF	17,1	0,07	0,40	17,6	0,08	0,46	17,4	0,04	0,23			
	GMn-y SnF	0,5	0,01	1,08	0,6	0,01	1,00	0,6	0,01	1,04			
	Ratio Y/X	0,03	0,00	0,70	0,03	0,00	0,60	0,03	0,00	1,24			
t+16h	% Count total SnF	11,5	1,97	17,14	9,6	1,08	11,30	11,0	3,18	28,96			
	GMn-x SnF	17,8	0,05	0,25	18,4	0,05	0,29	18,4	0,06	0,33			
	GMn-y SnF	0,7	0,02	2,99	0,7	0,00	0,00	0,7	0,03	4,61			
	Ratio Y/X	0,04	0,00	2,73	0,04	0,00	0,29	0,04	0,00	4,93			
t+24h	% Count total SnF	75,9	2,01	2,64	65,6	1,25	1,91	67,8	0,47	0,69			
	GMn-x SnF	28,5	0,51	1,77	32,0	1,07	3,33	30,2	1,08	3,58			
	GMn-y SnF	1,4	0,04	2,54	1,5	0,04	2,36	1,6	0,09	5,39			
	Ratio Y/X	0,05	0,00	1,26	0,05	0,00	4,91	0,05	0,00	1,98			

	Fenêtre SF	CL847 (1)				CL847 (2)				CL847 (3)			
		Moy	Ec	Type	CV (%)	Moy	Ec	Type	CV (%)	Moy	Ec	Type	CV (%)
t0	% Count total SF	0,3	0,07	21,28	0,5	0,03	6,12	0,4	0,00	0,00			
	GMn-x SF	11,1	0,69	6,18	13,3	0,71	5,36	13,0	0,35	2,70			
	GMn-y SF	4,2	0,69	16,38	4,4	0,38	8,72	4,9	0,38	7,69			
	Ratio Y/X	0,4	0,07	18,82	0,3	0,02	5,73	0,4	0,02	5,53			
t+16h	% Count total SF	0,4	0,03	7,50	0,2	0,01	2,47	0,4	0,12	32,54			
	GMn-x SF	11,2	0,44	3,95	12,9	0,43	3,32	12,3	0,28	2,27			
	GMn-y SF	3,7	0,61	16,64	3,8	0,10	2,71	6,4	4,84	75,77			
	Ratio Y/X	0,3	0,04	12,46	0,3	0,02	5,92	0,5	0,38	74,28			
t+24h	% Count total SF	0,6	0,28	47,90	0,4	0,07	19,89	0,6	0,04	7,30			
	GMn-x SF	16,4	2,17	13,23	15,6	1,81	11,64	16,5	0,25	1,53			
	GMn-y SF	9,9	9,25	93,26	5,3	2,32	43,74	3,6	0,30	8,21			
	Ratio Y/X	0,6	0,50	85,65	0,3	0,11	32,02	0,2	0,02	9,13			

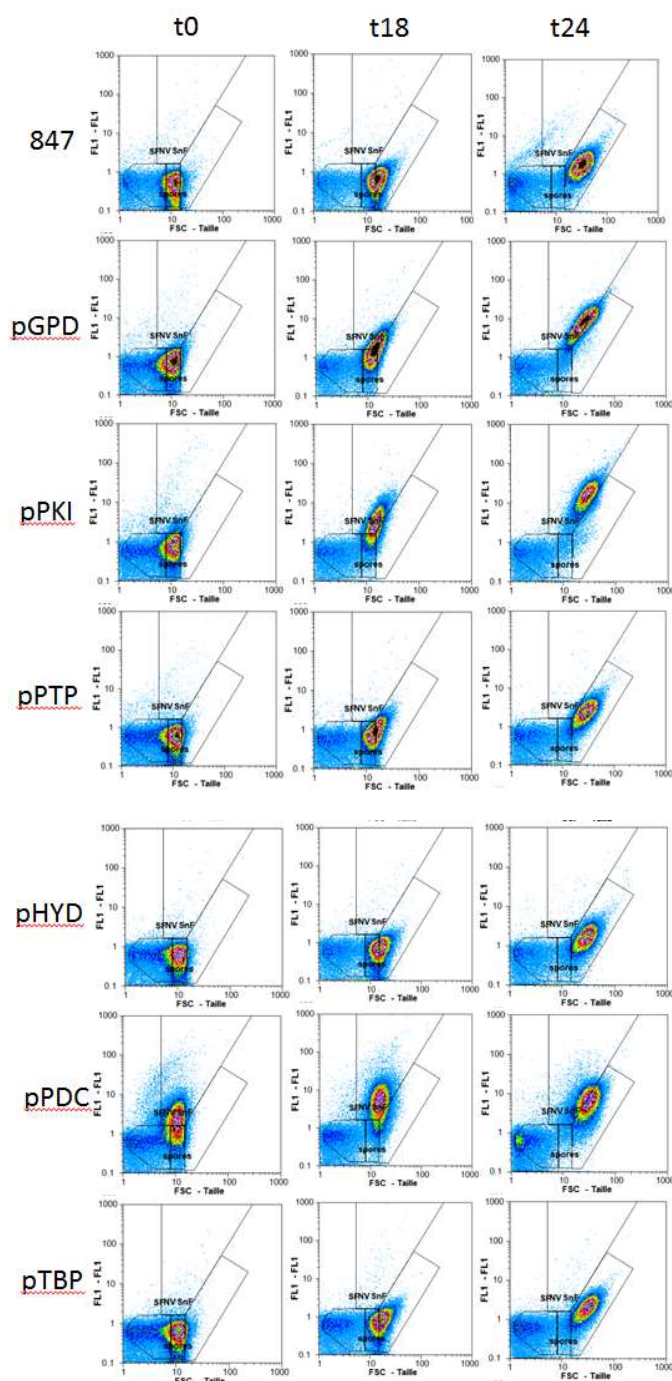
Annexe F

La cinétique d'émission de fluorescence à t_0 , $t+16h$ et $t+24h$ est présentée pour le contrôle CL847 et neuf clones de pTEF-EGFP : E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8 et E9 (cf chapitre f-2).



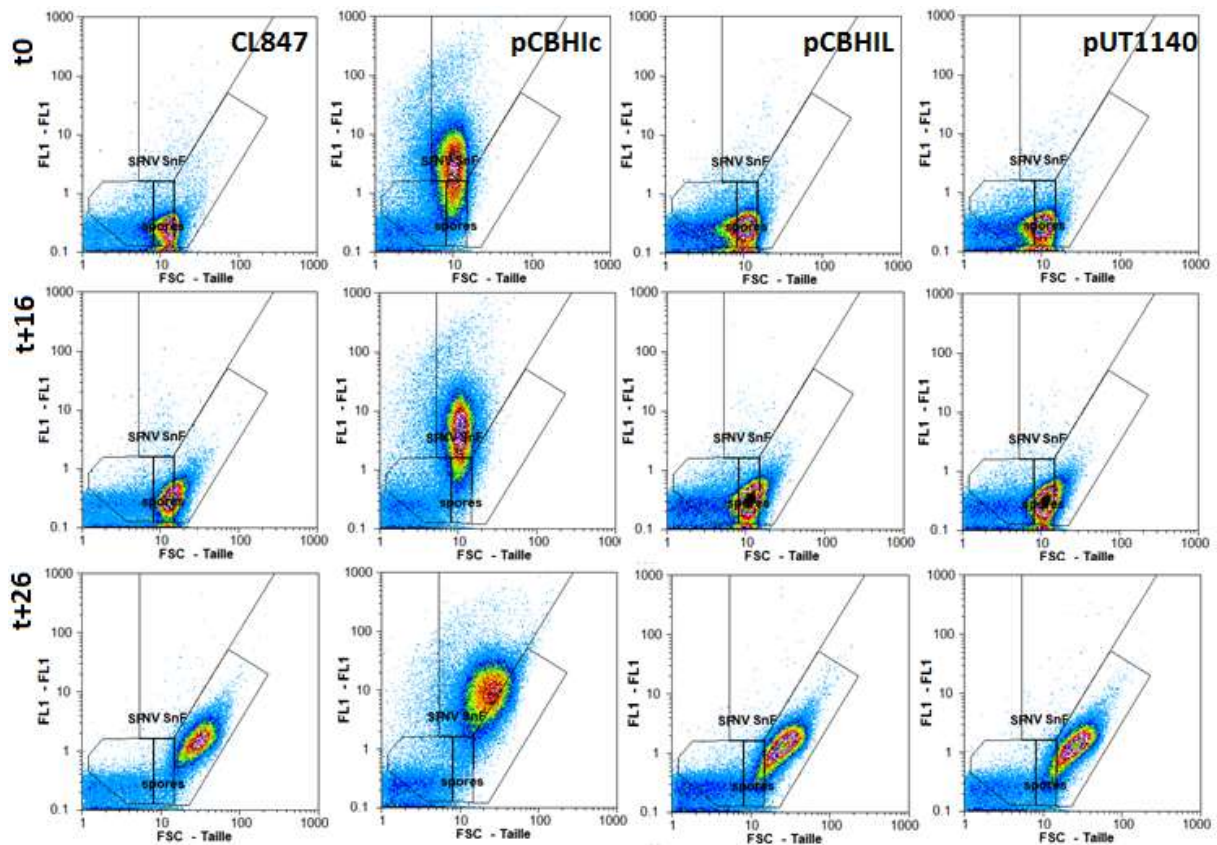
Annexe G

La cinétique d'émission de fluorescence à t0, t+18h et t+24h est présentée pour le contrôle CL847 et les promoteurs constitutifs associés au variant EGFP. Cytogrammes représentatifs parmi trois réplicats.



Annexe H

La cinétique d'émission de fluorescence à t0, t+16h et t+26h est présentée pour le contrôle CL847 et les constructions pCBH1c-EGFP, pCBH1L-EGFP et pUT1140-LGFP. Cytogrammes représentatifs parmi trois réplicats.



Annexe I

La moyenne géométrique dans une région R pour un nombre d'évènements dans la région noté N_R est calculée selon la formule suivante, sur l'axe des abscisses en x ou sur l'axe des ordonnées en y (cf FloMax Operating Manual – Data Analysis, p65).

Geometrical Mean

$$\begin{aligned} GMean &= \bar{x} \\ &= \sqrt[N_R]{\prod_{i \in R} x_i} \\ &= 10^{\left(\frac{1}{N_R} \cdot \sum_{i \in R} \log_{10} x_i \right)} \end{aligned}$$

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Construction de souches de *T. reesei* fluorescentes pour un criblage haut-débit de transformation par cytométrie en flux.

MATHIS Hugues

Date de soutenance : 14/12/2016

RÉSUMÉ

L'objectif de l'étude était de déterminer la faisabilité d'un criblage haut-débit de spores fongiques issues de transformation, permettant l'insertion d'un transgène d'intérêt. Cette étape est aujourd'hui dépendante de marqueurs antibiotiques assurant la sélection des clones. Une alternative a été identifiée via des marqueurs fluorescents, présentant l'avantage de ne pas créer de souches potentiellement multi-résistantes, mais aussi d'être réutilisés successivement (recyclage possible). Cependant, leur mise en œuvre repose sur la capacité à détecter la fluorescence, si possible à haut-débit du fait du faible rendement de transformation (30 pour 1 million). C'est dans ce contexte qu'un protocole de cytométrie en flux (CMF) a été évalué pour sélectionner des spores fongiques. Pour cela, de nombreux paramètres ont dû être adaptés (vitesse, concentration, taille, intensité laser, débit...) pour parvenir à la détermination d'un fenêtrage dédié, permettant d'identifier les spores fluorescentes viables, des spores non fluorescentes et/ou sénescents.

*Une fois l'outil mis en place, huit promoteurs constitutifs et quatre constructions contenant le promoteur de cellulases pCBHI ont été étudiés. Ce criblage a également permis de comparer deux variants de la Green Fluorescent Protein (GFP) : L et EGFP. Ce-dernier a été issu d'une optimisation de codons, afin d'obtenir un variant EGFP dédié à l'étude de *T. reesei*. Celui-ci a donné les meilleures expressions de fluorescence, en particulier lorsqu'il était placé sous le contrôle du promoteur pTEF, pPKI ou pCBHIC. Le suivi cinétique de l'intensité fluorescente de t0 à t+24h, combiné aux indicateurs de viabilité cellulaires ont également permis de suivre à la fois la croissance et l'expression de la protéine d'intérêt. De plus, la comparaison de 9 transformants pTEF-EGFP a permis de mettre en évidence un effet transformant conséquent, soit une variation de l'expression de fluorescence de l'ordre de x 2,5.*

En conclusion, la présente étude a établi la faisabilité d'un passage des marqueurs de sélection de type antibiotique vers une alternative fluorescente. Pour cela, la CMF offre un fort potentiel pour la détection haut-débit qui sera nécessaire à l'analyse de millions de clones. Diverses perspectives ont été proposées, notamment en s'appuyant sur un trieur cellulaire afin d'isoler la population transformée par CMF.

MOTS-CLÉS : *Trichoderma reesei, transformation, promoteurs, spores, cytométrie en flux, GFP, fluorescence.*