



Production de vecteurs MoClo (clonage moléculaire) pour la transformation génétique de *Phanerochaete chrysosporium*

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

Avec la collaboration de Benjamin Petre

Action thématique concernée : WP1

Contexte —

Le manque d'outils de génétique inverse limite les stratégies expérimentales pour l'étude des *Basidiomycota*, et notamment pour l'étude des champignons de pourriture blanche dégradeurs de bois. Ce verrou technologique entrave particulièrement les approches moléculaires en science du bois et de la forêt car les principaux champignons qui soutiennent le fonctionnement des écosystèmes forestiers ou menacent l'industrie du bois appartiennent au phylum des *Basidiomycota*. Des expériences récentes, au sein de L'UMR IAM, ont permis de transformer génétiquement le champignon de pourriture blanche *Phanerochaete chrysosporium*, en utilisant des vecteurs MoClo (Molecular Cloning) et une transformation par Agrobactérie. Ces résultats sont une preuve de concept : la combinaison de vecteurs binaires conçus sur mesure et l'agro-transformation permet de générer des lignées transgéniques stables chez les *Basidiomycota*.

Objectifs —

Le projet « MoClo 4 Phanero » propose de capitaliser sur ce récent succès, en développant une collection complète de vecteurs sous forme d'un ensemble d'éléments modulaires à assembler spécialement dédié à l'étude des *Basidiomycota*, à l'instar des récents kits Moclo mis à disposition d'autres communautés de recherche étudiant les plantes, les bactéries, ou les *Ascomycota*.

Démarche —

La première étape du projet a constitué dans l'identification de séquences d'intérêt (promoteurs, séquences 5' non traduites, peptides d'adressage, étiquette, séquences 3' non traduites, séquences terminatrices) absentes des collections déjà disponibles. Cette étape est suivie de la production de ces séquences et leur clonage dans un système de vecteurs modulaires. Grâce à l'assemblage d'élément du système modulaire, le nombre d'unité transcriptionnelle possible croit de façon exponentielle. Ces unités transcriptionnelles sont ensuite associées au sein d'un vecteur binaire pour la transformation de champignon par des Agrobacteries. La production de vecteur binaire se fait à façon, en fonction de la question biologique posée et *a minima* elle contient un gène d'intérêt et un gène de sélection permettant d'identifier les champignons transformés.

Résultats marquants —

- Trois nouvelles cassettes de résistances pour la sélection de transformants sont disponibles :

Résistance à la Carboxine,
Résistance à l'Hygromycine,
Résistance à l'Itraconazole.

- Afin d'étudier la localisation de protéines d'intérêt, 6 modules ont été créés et devraient permettre de produire autant de marqueurs de compartiments cellulaires.
- Une série de module est en cours de production pour permettre la purification de protéine à partir de champignons transformés.
- Prévus pour la transformation de *Phanerochaete chrysosporium*, les vecteurs déjà produits ont permis la transformation de *Trametes versicolor* et *Fomitiporia mediterranea*. Des essais seront bientôt réalisés pour *Laccaria bicolor*.

Perspectives —

A terme, nous aurons à disposition un ensemble de modules pour permettre la construction de vecteurs binaires contenant des constructions optimisées pour l'expression chez les *Basidiomycota*. Ces vecteurs permettront :

- D'étudier les effets phénotypiques de l'expression ectopique d'un gène d'intérêt,
- D'étudier la localisation subcellulaire de protéine d'intérêt.
- De produire des protéines recombinantes dans un système fongique.