



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Master 2 **Biotechnologies**, **Microbiologie**, **Aliment**,
Nutrition, **Environnement**-Parcours **Biotechnologies**
Microbiennes

Caractérisation des gènes bactériens codant pour des enzymes lignolytiques dans différents environnements

Stage effectué

A IRSTEA

du 19/01/15 au 03/07/15

par Flora KLINGELSCHMITT

Encadré par

Pascal PEU, Ingénieur d'études

Et Jianghao TIAN, Doctorant



IRSTEA,
17 Avenue de Cucillé
CS 64427
35044 Rennes

Sommaire

Abréviations	2
Introduction.....	3
Matériels et Méthodes.....	13
I. Les échantillons	13
1) Souches pures.....	13
2) Les matrices complexes.....	13
3) Echantillons de digestats PRObiotic	14
II. Extraction d'ADN	14
1) Protocole d'extraction d'ADN pour les matrices complexes avec kit MACHEREY NAGEL NucleoSpin Soil	14
2) Protocole d'extraction d'ADN pour les souches pures	15
III. Recherche d'amorces spécifique pour cibler les gènes des oxydases	15
1) Recherche d'amorces pour cibler les gènes des laccases	15
2) Recherche d'amorces pour les gènes des peroxydases.....	16
IV. Polmerase Chain Reaction (PCR)	16
1) PCR avec les amorces Cu1AF et Cu2R ciblant les gènes des laccases	16
2) PCR avec les amorces F_DYPR/R_DYPR ciblant les gènes des Dyp.....	17
V. Clonage avec le kit pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems (PROMEGA)	17
VI. Experion DNA 1K Analysis kit (BIO RAD).....	18
VII. Quantification de l'ADN par qPCR pour les amorces ciblant les gènes des Dyp.....	18
VIII. Construction d'arbres phylogénétiques sur ARB.....	18
Résultats et Discussion	19
I. Résultats de la PCR pour la recherche d'amorces ciblant les gènes des laccases.....	19
1) Amorces ciblant les gènes des laccases à deux domaines Cu2SF-Cu4SR et LacK188F LacK199R	19
2) Amorces ciblant les gènes des laccases construites au laboratoire à partir de la base de données LccED	20
3) Amorces Cu1AF/Cu2R ciblant les gènes des laccases issues de la littérature (Kellner <i>et al.</i> 2008)	22
II. Résultats de la PCR pour la recherche d'amorces ciblant les gènes des Dyp.....	22
1) Amorces F-DYPB/ R-DYPB construites au laboratoire pour cibler les gènes des peroxydases	22
2) Amorces F- DyPR/ R-DyPR construites au laboratoire pour cibler les gènes des peroxydases.....	23
III. Résultats du séquençage des produits amplifiés avec les amorces ciblant les gènes des laccases	24
IV. Résultats du séquençage des produits amplifiés avec les amorces ciblant les gènes des Dyp	28
1) Séquençage des produits de PCR bruts pour la recherche de gènes de Dyp pour les souches pures et sols enrichis à la lignine kraft	28
2) Séquençage par la méthode de clonage pour la recherche de gènes de Dyp dans les matrices complexes.....	29
V. Résultats de la qPCR avec les amorces ciblant les gènes de Dyp	34
Conclusion et perspectives.....	35
Bibliographie.....	36
Annexe	38

Abréviations

dNTP : désoxyribonucléotides

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

Dyp : gène codant pour les Dye peroxydases

LccED: The Laccase Engineering Database

Lmco: laccase multicopper oxidase

PCR: Polymerase Chain Reaction

Introduction

L'Institut National de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture (IRSTEA), anciennement le Centre national du Machinisme Agricole, du Génie Rural et des Eaux et Forêts (CEMAGREF) est issu de la fusion en 1981 du Centre technique du Génie Rural des Eaux et Forêts (CTGREF) et du Centre

National d'Etudes et d'Expérimentations du Machinisme Agricole (CNEEMA). Le changement de nom s'est opéré en 2011 suite à la constatation d'une évolution des missions et objectifs du CEMAGREF vers des problématiques environnementales et agricoles dans une optique de développement durable.

IRSTEA est un établissement public à caractère scientifique et technologique dont les 12 thèmes de recherche sont axés autour des eaux, des écotechnologies et des territoires. Il existe 24 unités de recherche réparties dans 9 centres pour 1750 employés. Cet institut détient de nombreux partenariats et conventions avec des Ministères (Ministère Enseignement supérieur et de la Recherche et Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt principalement), l'Office National des Forêts (ONF), l'Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques (ONEMA) entre autres.

Le centre de Rennes (35).est axé sur deux unités de recherches principales : la gestion environnementale et traitements biologiques des déchets (GERE) et la technologie des équipements agroalimentaires (TERE).

Mon stage, intégré dans l'unité GERE au sein de l'équipe PANDOR (Procédés de vAlorisation agronomique et éNergétique des Déchets ORganiques) s'inscrit dans le cadre d'un sujet de thèse sur les pré-traitements biologiques des substrats lignocellulosiques destinés à la méthanisation.

Des millions de tonnes de déchets d'origines diverses (industrielles, agricoles, urbaines) sont produits chaque année. Traiter et valoriser ces déchets est devenu l'une des priorités nationales.

Par décomposition des déchets organiques, le procédé de méthanisation ou de digestion anaérobie permet d'obtenir une ressource énergétique renouvelable, le biogaz, et de répondre au traitement des déchets. La digestion anaérobie d'où provient le biogaz (composé de 60% de méthane), est un processus de transformation biologique de la matière organique en condition anaérobie et peut-être décrit en quatre étapes majeures : l'hydrolyse, l'acidogenèse, l'acétogenèse et la méthanogenèse, chacune d'elles faisant intervenir des groupes microbiens particuliers. Les substrats introduits dans les digesteurs sont composés, en grande partie, de déjections animales, de déchets agro-alimentaires ou des collectivités. Cependant, la disponibilité de ces matières premières devient de plus en plus le facteur limitant de la filière.

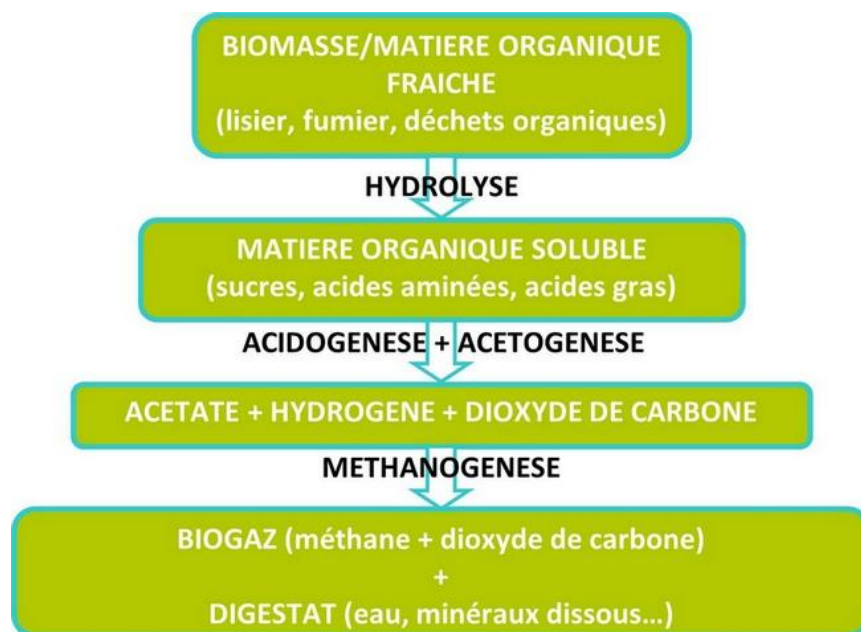


Figure 1: Etapes du procédé de méthanisation

Parmi les déchets encore non employés, certains résidus agricoles présentent un gisement encore non exploité. Chaque année, la France produit environ 84 millions de tonnes de résidus de cultures entre autre. Composés de 60 à 85% de polysaccharides, ils présentent un

intérêt considérable pour la filière de méthanisation. Cette forte disponibilité sur le territoire français est à contrebalancer avec leur faible pouvoir méthanogène (principalement dû à leur constitution ligninocellulosique). En effet, la lignine, par sa liaison à l'hémicellulose et à la cellulose, crée une barrière infranchissable aux enzymes hydrolytiques (Figure 2). Afin de pallier ce problème par une approche écologique et durable, les recherches actuelles se focalisent sur les prétraitements par voie biologique, de la biomasse ligninocellulosique, en amont du processus de méthanisation afin de rompre cette barrière qu'est la lignine et rendre disponible l'holocellulose (cellulose + hémicellulose). (Figure 3).

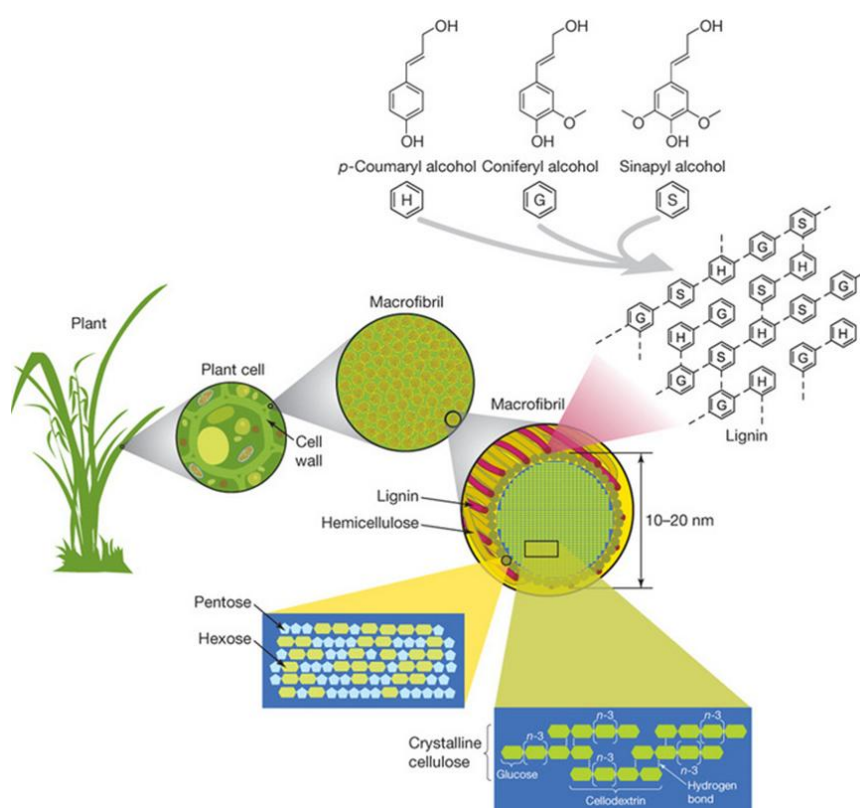


Figure 2 : structure de la lignocellulose (Rubin, 2008)

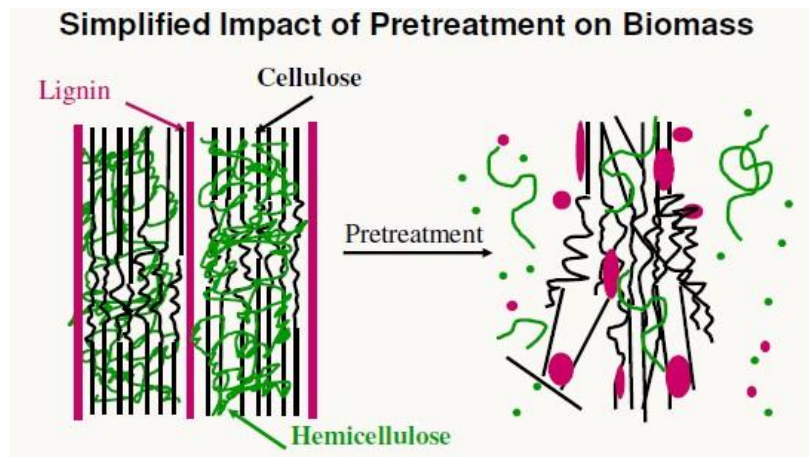


Figure 3 : Schéma simplifié du prétraitement de la biomasse ligninocellulosique par voie biologique (Mosier et al 2005)

Dans la nature, certains microorganismes des règnes fongique et bactérien sont connus pour produire des enzymes capables de dégrader la lignine. De nombreuses publications portent sur la caractérisation de l'activité ligninolytique chez les champignons et leurs applications dans l'industrie. Les plus connus font partie du phylum des basidiomycètes, avec une capacité de dépolymérisation de la lignine très efficace (Hatakka 2001). Cependant, leurs exigences culturelles (humidité, température, pH,...) les rendent difficilement utilisables dans certains environnements industriels. Pour cette raison, il est intéressant de regarder la présence d'activités similaires chez les bactéries, car ces dernières possèdent une grande adaptabilité environnementale et une grande versatilité biochimique (Bholay *et al.* 2012). Découvertes récemment chez les bactéries, les principales appartiennent aux classes (i) des actinomycètes tels que *Rhodococcus jostii* RHA1 (Ahmad *et al.* 2011) et *Streptomyces coelicolor* (Lu *et al.* 2014), (ii) des α -proteobactéries comme *Sphingobium sp.* SYK-6 (Meux *et al.* 2012) et (iii) des γ -proteobactéries comme *Pseudomonas sp.* (Bugg *et al.* 2011).

L'étude de ces bactéries met en évidence un véritable cortège enzymatique, nécessaire pour le bon fonctionnement de la machinerie moléculaire responsable de la dégradation de la lignine. Les principaux groupes d'enzymes connus sont : les laccases, les lignines peroxydases, les manganèses peroxydases, les peroxydases versatiles, et les Dye peroxydases. De plus, peuvent s'ajouter à ces oxydases, plusieurs enzymes accessoires telles que les oxydases glyoxal et les alcoo-oxydases (Furukawa *et al.* 2014). Toutes ces enzymes

sont connues pour être actives en milieu aérobie, l'oxygène jouant un rôle dans la réaction. Cependant, suite à la découverte de micro-organismes ligninolytiques dans le tube digestif de certains animaux, notamment les termites et les ruminants (Mathew *et al.* 2010), les chercheurs commencent à envisager une dégradation de la lignine par voie anaérobie. En analysant le métagénome d'une communauté microbienne anaérobie capable d'une telle dégradation, ils ont retrouvé des familles bactériennes possédant certaines enzymes clés de la dégradation en aérobiose telles que les peroxydases, les cellobioses déhydrogénases, et quelques laccases (van der Lelie *et al.* 2012).

Les laccases appartiennent à la famille des phénols oxydases ayant pour cofacteur enzymatique le cuivre. Ces oxydoréductases utilisent l'oxygène comme accepteur final d'électron. Elles sont aussi bien présentes chez les eucaryotes tels que les champignons et les plantes que chez les procaryotes tels que les bactéries, voire même chez les archées (Ausec *et al.* 2011), et possèdent de nombreuses fonctions, dont certaines ne sont pas encore totalement bien déterminées. Elles sont surtout connues pour leur participation à la synthèse de la lignine chez les plantes et à la dégradation de la lignine chez les champignons et les bactéries. Ces oxydases sont non spécifiques à leur substrat, et ont une capacité d'oxyder une grande variété de substrats (composés aromatiques, composés organométalliques, métaux,...) ce qui constitue une source d'intérêt biotechnologique importante. En effet, ces enzymes sont déjà utilisées dans de nombreuses applications telles que le blanchissement de la pâte à papier, la détoxification, la stabilisation du vin,... (Kunamneni *et al.* 2008). Chez les bactéries, elles participent, entre autre, à la morphogénèse, la pigmentation, à l'oxydation de composés toxiques, ainsi qu'à la protection contre les radiations ultraviolets (Singh *et al.* 2011).

Depuis la découverte de laccases chez les champignons de la pourriture blanche et brune, l'intérêt de la recherche est grandissant. La mise en évidence de la présence de ces enzymes chez les bactéries est beaucoup plus récente. La première laccase bactérienne identifiée a été observée chez *Azospirillum lipoferum*, pour sa fonction dans la formation de la mélanine (Givaudan *et al.* 1993). Plus tard, des chercheurs ont trouvé d'autres laccases bactériennes similaires à celles connues des champignons à l'aide d'alignements de séquences (Alexandre et Zhulin 2000). Contrairement aux laccases fongiques, les laccases bactériennes sont plus actives et plus stables à des conditions de température et de pH élevés, ainsi qu'à de fortes

concentrations ioniques (Dwivedi *et al.* 2011). Elles seraient également dotées d'une capacité d'expression plus efficace vu qu'elles sont dépourvues d'introns et qu'elles ne subissent pas de modifications post-traductionnelles (Ausec, Van Elsas, et Mandic-Mulec 2011). Chez les champignons et les plantes, il est possible de retrouver un ou plusieurs gènes de laccases pour une même espèce, selon le rôle de chacune dans la cellule. L'existence de plusieurs gènes de laccase dans le génome bactérien est un phénomène plus rare, mais possible. Il a été démontré chez certaines espèces la présence de plusieurs gènes codant pour des oxydases, localisés sur le chromosome comme sur le plasmide : 5 gènes chez *Rhodococcus jostii*, et *Rhodococcus opacus*, 4 chez *Arthrobacter aurescens* et 3 chez *Nocardia* (Ausec *et al.* 2011). Bien que de nombreuses informations concernant l'existence de familles multigéniques chez les bactéries restent manquantes, les chercheurs coïncideraient leur présence avec les nombreux rôles physiologiques auxquels les laccases ont déjà pu être vu assignées (pigmentation, oxydation de composés phénoliques, sporulation, la résistance aux UV et aux métaux,...).

L'alignement de séquence des gènes codant pour les laccase présente des similarités au niveau des domaines de liaisons aux quatre atomes de cuivre (Figure 1). Ces régions hautement conservées ont été prises pour cible pour la création d'amorces spécifiques des laccases afin de mieux comprendre leur distributivité (diversité) au sein des organismes (Luis *et al.* 2004). Leur implication dans de multiples fonctions, ainsi que la diversité de leur séquence en acides aminées rendent leur classification difficile.

Cependant, en 2011, la LccED (The LaccaseEngineering Database), une classification basée sur des similarités de séquence, a tout de même été proposée par Hoegger *et al.* sous forme d'une base de données. Des alignements de plus 2200 protéines ont permis de regrouper ces séquences en 11 superfamilles, dont quatre, majoritairement bactériennes (Tableau 1). Cet outil répertoriant les séquences des laccases et oxydases ayant pour cofacteur le cuivre, donne des informations sur la structure des laccases y compris les régions conservées. Les laccases sont typiquement constituées de trois domaines monomériques (Figure 2). Néanmoins, des laccases composées uniquement de deux domaines ont été découvertes pour la première fois chez *Streptomyces coelicolor*. L'analyse moléculaire a permis d'identifier ce type de structure exclusivement chez les bactéries et quelques archées. De plus, les séquences nucléotidiques des régions de liaison aux atomes de cuivre sont

différentes de celles, caractéristiques des laccases à trois domaines, permettant le design d'amorces spécifiques à ce type de laccases (Lu *et al.* 2014). Elles sont regroupées dans la superfamille K des SLAC (Small laccase family) dans la base LccED.

Tableau 1: Origine des séquences répertoriée dans la base de données LccED pour les superfamilles à dominances bactériennes

Superfamille	Nombre de famille	Origines des séquences
Superfamille H (protéines bactériales CopA)	H1 à H4	98% bactériennes
Superfamille I (Bilirubine oxydases)	I1 à I5	70% bactériennes 15% plantes (I3) 10% fongiques (I1) 5% non connues
Superfamille J (protéines bactériales CueO)	J1 à J5	90% bactériennes 10% eucaryotes
Superfamille K (SLAC pour Small laccase family)	1 seule famille	100% bactériennes

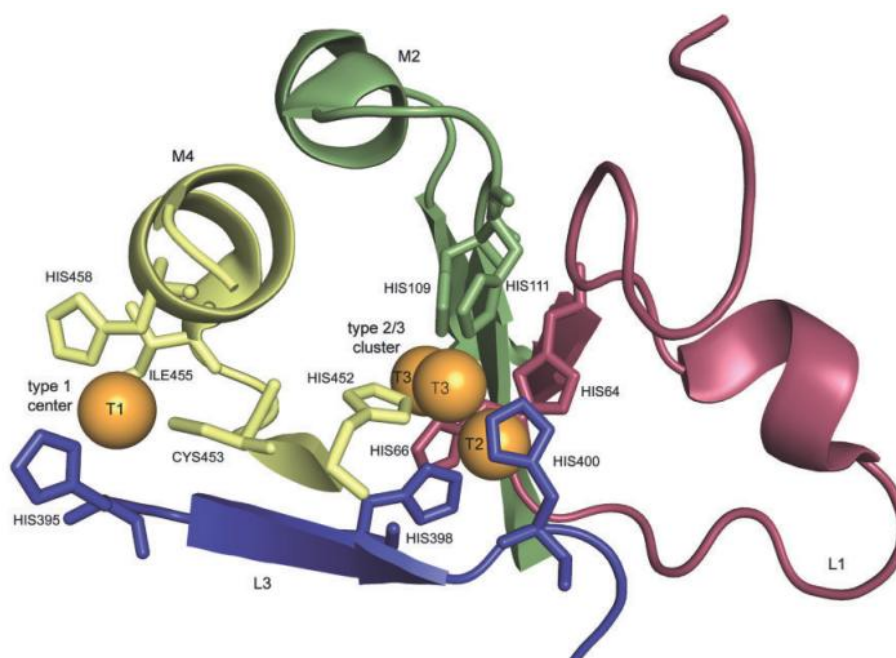


Figure 4 : Structure cristallographique d'une laccase de *Trametes versicolor* (Piontek & al, 2002). Les quatre centres de liaison au cuivre sont représentés en orange, et L1 (en rouge), L2 (en vert), L3 (en bleu) et L4 (en jaune) correspondent à des domaines présentant de grandes similitudes.

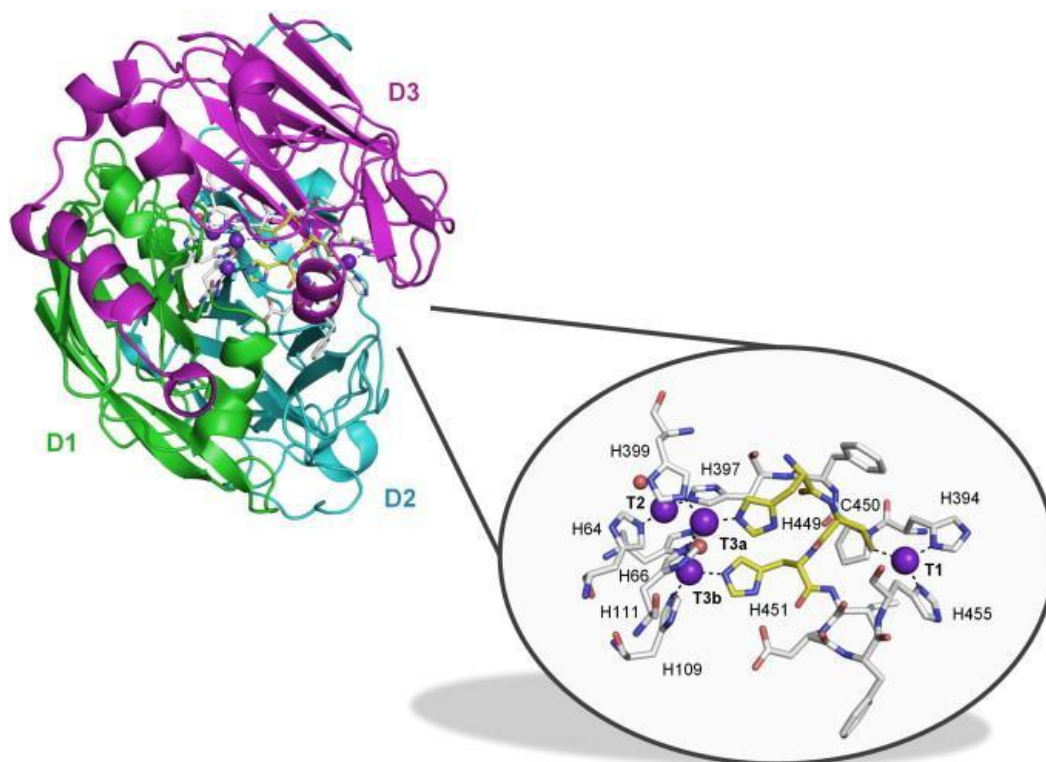


Figure 5 : Structure du site actif d'une laccase de *Trametes trogii* D1 (en vert), D2 (en bleu) et D3 (en violet) représentant les trois domaines contenant les quatre centres de liaison au cuivre (T1, T2, T3a et T3b). Les sphères violettes correspondent aux ions cuivre. (Mate & Alcalde, 2015)

Le deuxième groupe majeur d'enzymes impliquées dans la dégradation de la lignine est celui des peroxydases à hème. Contrairement aux laccases, ces oxydoréductases utilisent le peroxyde d'hydrogène en tant qu'accepteur final d'électrons, et possèdent un fort potentiel d'oxydoréduction. Il inclut, plus particulièrement, les lignines peroxydases, les manganèses peroxydases, les versatiles peroxydases et les Dye peroxydases. Ces dernières, ne présentant aucune homologie de structure avec les autres peroxydases, entrent dans une nouvelle superfamille des peroxydases à hème, appelée Dyp (Figure 3). Elles sont principalement retrouvées chez les bactéries ainsi que dans quelques champignons et archées, La première Dyp, caractérisée en 1995 chez le basidiomycète *Thanatephorus cucumeris*, s'est révélée pouvoir décolorer dix-huit types de colorants, d'où le nom de « Dye Peroxydase - DyP » (Kim *et al.* 1995). Bien qu'elles aient été identifiées en premier lieu chez les champignons, les études postérieures ont montré une prédominance chez les bactéries (Colpa, Fraaije, and van Bloois 2014). La fonction physiologique des Dye peroxydases dans la dégradation de la lignine n'est pas encore très bien connue, cependant elles semblent être l'équivalent

bactérien des enzymes lignines peroxydases présentes chez les champignons (Colpa *et al.* 2013). Leur implication dans la dégradation de la lignine a été découverte à travers l'étude de la protéine DypB de *Rhodococcus jostii* RHA1, capable de dégrader la lignine kraft (lignine retrouvée dans la liqueur noire dans les usines de pâte à papier). (Ahmad *et al.* 2011). Une nouvelle voie de recherche a alors vu le jour, en ce qui concerne les systèmes de dégradation de la lignine par les bactéries (Furukawa, Bello, and Horsfall 2014). D'autres enzymes de type Dyp semblant être impliquées dans la dégradation de la matière ligninocellulosique ont été découvertes depuis, telles que la BsDyP chez *Bacillus subtilis* (Ming *et al.* 2014) ou encore la Dyp1B de *Pseudomonas fluorescens* (Rahmanpour et Bugg 2015)

Suite à une analyse phylogénétique sur la similarité des séquences protéiques des Dyp, disponibles via la base de données PeroxiBase, une classification a été proposée, divisant les Dye peroxydases en quatre classes (A à D). C'est dans la classe D qu'a été découverte la première Dyp chez le basidiomycète *Bjerkandera adusta* Dec 1 (Ogola *et al.* 2009). De nombreuses séquences protéiques de ces enzymes sont répertoriées dans la PeroxiBase, en plus des séquences appartenant aux peroxydases en général (Passardi *et al.* 2007).

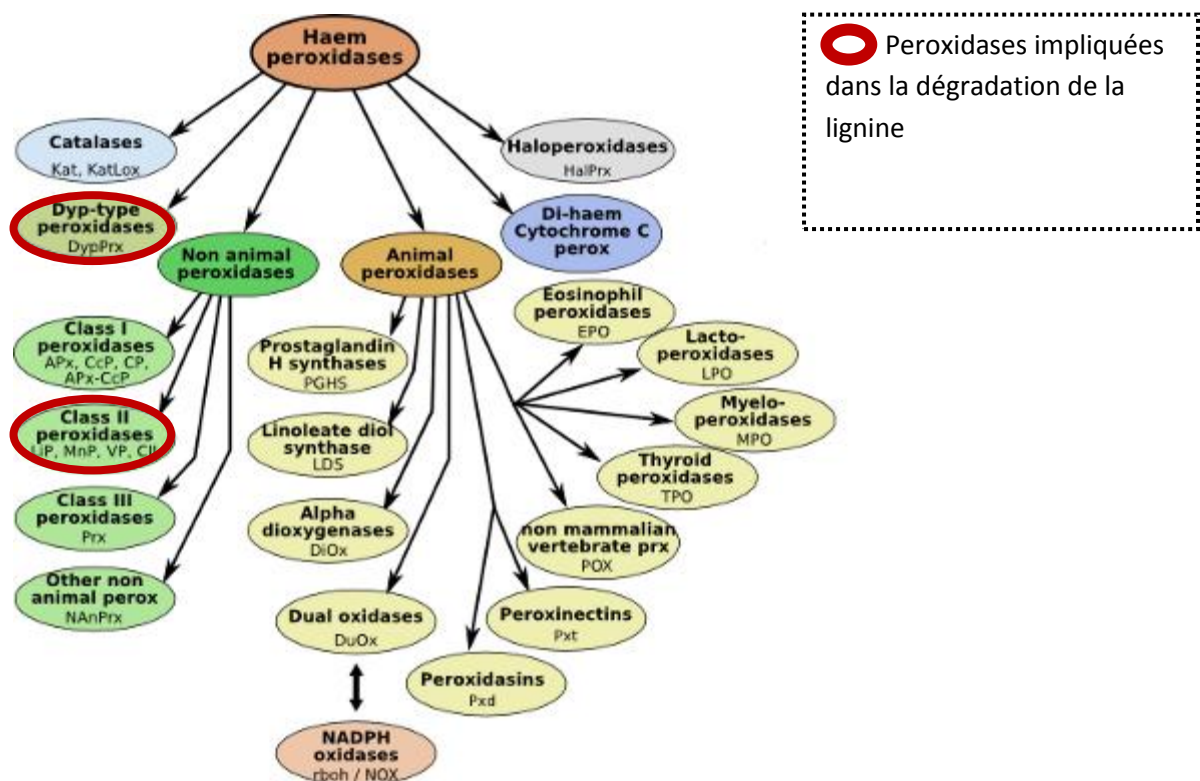


Figure 6 : Familles des peroxydases à hèmes (PeroxiBase,(Passardi *et al.*2007))

Bien que les structures tertiaires des Dyp aient de fortes homologues, les séquences protéiques entre deux différentes classes en ont peu, plus particulièrement entre la classe D et les trois autres (Yoshida et Sugano 2015). Les quatre classes de Dyp précédemment déterminées par une analyse phylogénétique des séquences en acides aminés ne permettent pas de définir la fonction de chaque classe. Récemment, une nouvelle classification des Dyp, basée non pas sur les similarités de séquences mais sur les similarités de structures protéiques des Dyp, a été proposée par Yoshida et Sugano. (2015). Se révèlent alors trois classes distinctes, au lieu des quatre déterminées lors de la première classification. Elles sont nommées par les lettres P, I et V pour Primitive, Intermediate et adVanced selon le degré de compactage des séquences (P, I, V du plus vers le moins compact respectivement). Cette classification ajoute de nouvelles données structurales, notamment par la découverte d'une frontière plutôt mince entre les classes C et D. Elle met également en évidence le manque de données concernant les Dyp.

Les oxydases font l'objet d'un grand intérêt industriel ; cependant, du fait de leur plurifonctionnalité et leur diversité structurale, de nombreuses zones d'ombre restent à éclaircir. Malgré les bases de données existantes sur les enzymes oxydases, les classifications sont sans cesse remises en cause, la relation entre une séquence en acide aminé et une fonction bien précise n'étant pas encore bien déterminée. De plus, bien que la capacité des bactéries à dégrader la matière ligninocellulosique par des oxydases soit dorénavant admise, cette voie reste encore mal comprise.

Le but de cette étude consiste à rechercher des micro-organismes d'intérêts (responsable de la dégradation de la lignine) de par leur activité enzymatique (sécrétion d'oxydases) de façon indirecte (en prospectant leur gènes) dans différentes matrices (milieux aérobies, digestats anaérobies, milieux plus ou moins riches en lignine, ...). Les outils de biologie moléculaire seront utilisés pour cette prospection. Tout d'abord, la recherche et/ou la construction d'amorces spécifiques aux gènes codant pour ces oxydases permettra de mettre en évidence leur présence ou leur absence au sein des matrices testées. Les produits obtenus seront ensuite clonés puis séquencés afin d'identifier les espèces possédant ces gènes d'oxydase. Enfin, la concentration de ces gènes d'oxydases dans les différentes matrices sera aussi quantifiée par PCR quantitative.

Matériels et Méthodes

I. Les échantillons

1) Souches pures

Des souches pures utilisées comme témoins positifs pour les gènes codant pour les laccases et les Dyp.

Souche pure	témoin positif	Provenance
<i>Trametes versicolor</i>	Gènes des laccases avec le couple d'amorces Cu1AF-Cu2R	IRSTEA
<i>E.coli</i>	Gène des laccases de la superfamille J des protéines CueO (LccED) avec le couple d'amorces FJ-RJ	IRSTEA
<i>Bacillus subtilis</i>	Gènes des laccases de la superfamille I des bilirubines oxydases (LccED) et gène des Dyp	DSMZ
<i>Streptomyces albus</i>	Gènes des laccases à deux domaines de la superfamille k (LccED) et gène des Dyp	DSMZ
<i>Rhodococcus jostii</i>	Gènes des Dyp	M. Timothy DH Bugg de Department of Chemistry, University of Warwick, Coventry CV4 7AL,UK
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Gènes des Dyp	Isolement à partir d'un champ de maïs

2) Les matrices complexes

Le compost utilisé pour l'extraction d'ADN est composé de 4% mélange de graisses, de 32% de fraction broyée de biodéchets, de 50% de déchets vert, et 14% de déchets tiers d'IAA (Biodéchets2C). Ensuite, deux types de digestats sont testés, un issu d'un digesteur anaérobie alimenté avec du lisier de porcs et des aliments pour chevaux (IRSTEA) et un second alimenté avec du fumier de bovin (digestatMS). Enfin, trois échantillons provenant d'une forêt de Rennes (sol1) d'un champ de maïs de Rennes (sol4) et de sédiment d'un étang à Rennes (sol6) ont été enrichis avec de la lignine kraft. Les étapes d'enrichissements sont les suivantes : Tout d'abord, les sols sont mélangés avec du compost et une solution salée, le

tout incubé à 30°C pendant une semaine. Ensuite, 100µl d'échantillon est ajouté à une solution de lignine kraft avec de la cycloheximide (anti fongique), le tout incubé pendant une semaine. Pour finir, 100µl de l'enrichissement précédent est ajouté à un milieu de culture contenant encore de la lignine mais cette fois ci purifiée.

3) Echantillons de digestats PRObiotic

En collaboration avec l'INRA de Narbonne, 7 échantillons de digestats issus du projet PRObiotic ont été fournis afin de comparer les réponses sur le nombre de copies de gènes oxydases d'intérêts en utilisant la qPCR. Les échantillons de digestats prélevés sur différents sites de méthanisation (Projet PRObiotic) ont été utilisés dans cette étude notamment vis-à-vis des recettes d'alimentation des digesteurs (fumier, herbes, lisier,...).

Digestats du projet PRObiotic	Composition des intrants
2L	10/12% de co-substrats végétaux 30% de lisier porcin 58/60% de déchets issus de IAA
4B	60% de co-substrats végétaux (1 t céréale + 8 t persil), 20% lactose, 20% fumier/lisier
7L	36% de co-substrats végétaux, 56% effluent, 8% terre de filtration
5L	22.7% de co-substrats végétaux, 71.4% lisier et 5.9% de co-substrats autres
9b	75% de fumier/lisier, 5% marc de pomme, 15% terre de filtration, 5% IAA
1C	30% lisier porcin, 70% boues et graisses
5C	50% lisier, 6.7% paille, 13.3 légumes, 30% IAA

II. Extraction d'ADN

1) Protocole d'extraction d'ADN pour les matrices complexes avec kit MACHEREY NAGEL NucleoSpin Soil

Les ADN de matrices complexes (digestats, compost, sols enrichis en lignine kraft) ont été extraits à l'aide du kit d'extraction d'ADN MACHEREY NAGEL NucleoSpin Soil selon les consignes fournies par le fabricant. Les échantillons trop liquides ont été centrifugés, pesés puis resuspendus dans le tampon de lyse.

2) Protocole d'extraction d'ADN pour les souches pures

Une colonie bactérienne est suspendue dans 50µl d'eau ultra pure. Ensuite, la lyse cellulaire est réalisée par choc thermique en plaçant le tube au bain marie à 100°C pendant 5 minutes puis dans la glace. Les débris cellulaires sont récoltés au fond du tube par centrifugation à 4°C, pendant 10 minutes à 13 000g. Enfin, le surnageant est récupéré et conservé à -20°C.

III. Recherche d'amorces spécifiques pour cibler les gènes des oxydases

1) Recherche d'amorces pour cibler les gènes des laccases

Des amorces issues de la littérature ont été trouvées et testées pour cibler les gènes des laccases. D'autres ont été construites à partir d'alignements de séquences protéiques appartenant aux espèces des superfamilles à dominances bactériennes I et J accessibles sur la base de données LccED. Ces séquences sont ensuite transcrites en séquences nucléotidiques et les régions conservées sont mises en évidence à l'aide du logiciel Bioedit. Les séquences des amorces sont obtenues grâce au logiciel primer 3, puis vérifiées à l'aide du logiciel Blast (Tableau 2).

Tableau 2 : Origines et séquences des amorces testées pour cibler les gènes des laccases

	Nom	Séquence	Cible	Référence	Taille amplicon
Amorces issues de la littérature	Cu1AF	5'-ACM WCB GTY CAY TGG CAY GG-3'	Gènes des laccases à trois domaines fongiques et bactériennes <i>Laccases are widespread in bacteria</i>	Kellner <i>et al.</i> (2008)	142pb
	Cu2R	5'-G RCT GTG GTA CCA GAA NGT NCC-3'		Ausec <i>et al.</i> (2011)	
	Cu2SF	5'-TAC TGG MAC TAC CAC GAC CAY-3'	Gènes des laccases à deux domaines (streptomyces)	Lu <i>et al.</i> (2014)	426pb
	Cu4SR	5'-RTG VSW CTG SAC RTG RCA GTG-3'			
	LacK188F	5'-TAC GGC YTC GAG AAG GGC-3'	Gènes des laccases à deux domaines (streptomyces)	Alves <i>et al.</i> (2014)	488pb
	LacK199R	5'-CCG TGC GTG ATC ATG ACG-3'			
Design d'amorces	F_J	5'-KTA TGT KAT TGS SAG CGA YGG-3'	Gènes des laccases de la superfamille J (protéins CueO)	BDD LccED Superfamille J	90pb
	R_J	5'-ABM ACT TCM DAA CGY TCG CC-3'			
	F_I	5'-KCC GTT TGA TAT YGC SCG TT-3'	Gènes des laccases de la superfamille I (bilirubine oxydase)	BDD LccED Superfamille I	213pb
	R_I	5'-TCC ATC GGW CKC ATC ATH TC-3'			

Avec M= A ou C/ W=A ou T/B= G, T ou C/Y= T ou C/ N=A, T, C, ou G/R=G ou A/ S=G ou C/H=A, T ou C

2) Recherche d'amorces pour les gènes des peroxydases

Le design des amorces F_DYPR/ R_DYPR ciblant les gènes des Dyp est basé sur un alignement de séquences protéiques de Dyp, issues de publications, en prenant comme référence la DyPb de *Rhodococcus jostii*, connue pour ses propriétés ligninolytiques (Ahmad *et al.* 2011). L'alignement pour la création de ces amorces comporte des séquences de Dyp de *Mycobactéries*, *Pseudomonas*, *Serratia* et *Streptomyces*. De même que pour le design d'amorces de gènes de laccases, l'alignement est fait à base de séquences protéiques, retranscrites en séquences nucléotidiques (Tableau 3).

La même méthode a été appliquée pour concevoir les amorces F_DYPB/ R_DYPB en prenant cette fois-ci la séquence BsDyP de *Bacillus subtilis* comme référence. L'alignement se compose notamment de séquence de *Bacillus*, *Streptomyces*, *Amycolatopsis*, *Serratia* (Tableau 3).

Tableau 3 : Caractéristiques des amorces construites pour cibler les gènes des Dye peroxydases

Nom	Séquence (5'→3')	Cible	Origine	Taille
F_DYPR	5'- GAY CTG TGC TTY GAR CTS GC -3'	Gènes des Dyp	Alignement basé sur la séquence an acides aminés de DyPb de <i>Rhodococcus jostii</i> (Ahmad <i>et al.</i> 2011)	450pb
R_DYPR	5'- ASC CGA TRA ART ASG TGC C -3'			
F_DYPB	5'- GCG CAA CCT KMT SGG WTT CAA G -3'	Gènes des Dyp	Alignement basé sur la séquence en acides aminés de BsDyP de <i>Bacillus subtilis</i> (Ming <i>et al.</i> 2014)	450pb
R_DYPB	5'- GAT AAA CAG KAR GCC YGC RTC -3'			

Avec M= A ou C/ W=A ou T/B= G, T ou C/Y= T ou C/ R=G ou A/ S=G ou C

IV. Polmerase Chain Reaction (PCR)

1) PCR avec les amorces Cu1AF et Cu2R ciblant les gènes des laccases

La PCR est effectuée selon le protocole décrit dans la publication de Kellner and al. datant de 2008. Le mix contient environ 30ng d'ADN dans un volume final de 25µl avec 2.5µl de tampon taq 10X, 2µl de dNTP à 2.5mM, 3µl de chaque amorce (10µM) et 1U de taq polymérase. L'amplification par PCR s'effectue sur le thermocycleur MJ Mini (Bio Rad) avec un cycle de dénaturation initial à 94°C de 3min, suivi de 35 cycles (30s à 94°C, 30s à 48°C, 80s à 72°C) et une élongation finale de 10 min à 72°C. Un contrôle négatif sans ADN est réalisé

pour vérifier l'absence d'ADN contaminant. Les gels d'électrophorèse sont effectués avec 2% d'agarose.

2) PCR avec les amorces F_DYPR/R_DYPR ciblant les gènes des Dyp.

Les conditions de PCR pour les amorces F_DYPR et R_DYPR ciblant les gènes des Dyp ont nécessité une optimisation (concentration des réactifs du mix réactionnel, recherche de la température optimale d'hybridation, augmentation de la concentration des échantillons). Le protocole retenu contient 30ng d'ADN dans un volume final de 25 µl avec 2.5µl de tampon taq (10X), 2 µl de dNTP à 2.5mM, 1µl de chaque amorce (10µM) et 1U de taq polymérase. L'amplification s'effectue sur le thermocycleur MJ Mini (Bio Rad) avec un cycle de dénaturation initiale à 94°C de 3min, suivi de 30 cycles (30s à 94°C, 40s à 60°C, 60s à 72°C) et une élongation finale de 10min à 72°C. Les gels d'électrophorèse effectués contiennent 1.5% d'agarose.

V. Clonage avec le kit pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems (PROMEGA)

Les séquences issues de l'amplification par PCR ont été clonées pour pouvoir satisfaire les exigences du séquençage. Précédemment au clonage, les produits de PCR sont purifiés à l'aide du kit de purification Wizard SV Gel and PCR clean-up system (PROMEGA). Le clonage est réalisé directement sur les produits de PCR purifiés, ou après découpage de bandes sur gel d'agarose lorsque les produits ne sont pas purs.

- Les étapes de ligation et de transformation ont été réalisées suivant le protocole **pGEM-T Easy Vector System I**. La quantité d'insert ajoutée au mix de ligation a été calculée en prenant un rapport 1/3 (1 vecteur pour trois inserts) pour les produits amplifiés avec les amorces Cu1AF-Cu2R et avec un rapport de 1/1 pour ceux qui sont amplifiés avec les amorces F-DYPR/R-DYPR.
- Pour maximiser le nombre de transformants, les tubes contenant le mix de ligation avec le produit de PCR sont laissés incubés toute la nuit à 4°C, avant l'étape de transformation.
- Les colonies de couleur blanche sont vérifiées par PCR sur colonie avec les amorces T7prom, ciblant spécifiquement le vecteur pGEM-T.

VI. Experion DNA 1K Analysis kit (BIO RAD)

L'Experion est un appareil d'électrophorèse en circuit microfluide utilisant des puces spécifiques selon le type d'échantillon. Il permet de mesurer en temps réel l'intensité de fluorescence émise en fonction du temps de rétention des acides nucléiques au sein du microréseau. Les échantillons sont déposés sur le gel après purification avec le kit Wizard SV gel and PCR clean-up system (PROMEGA), à une concentration d'environ 50ng/μl.

VII. Quantification de l'ADN par qPCR pour les amorces ciblant les gènes des Dyp

La méthode de qPCR mesure l'amplification de l'ADN tout au long de la réaction grâce à des fluorochromes qui émettent une fluorescence lorsqu'ils sont fixés à de l'ADN double brins. Le mix contient 12.5μl de SYBR green, 0.5μl de chaque amorce (10μM) et 2μl d'ADN dans un volume final de 25μl. Le programme du thermocycleur (Bio Rad) consiste à une dénaturation initiale à 95°C pendant 5min suivi de 40 cycles (30s à 94°C, 30s à 60°C, 30s à 72°C), et une melting curve allant de 65 à 95°C avec 1°C toute les 5s. La gamme étalon est réalisée à partir du produit de PCR obtenu avec les amorces F-DYPR/R-DYPR de *Rhodococcus jostii*. Huit dilutions en série sont effectuées de 7.3×10^1 à 7.3×10^8 copies par puits. L'optimisation des qPCR a été réalisée sur les matrices complexes de type compost, sols enrichis à la lignine kraft et digestatMS.

VIII. Construction d'arbres phylogénétiques sur ARB

Les arbres phylogénétiques ont été construits à l'aide du logiciel ARB. Les séquences sont d'abord alignées à l'aide du programme clustalw, puis, une matrice de distance avec l'algorithme du maximum de vraisemblance est créée.

La base de données permettant de construire l'arbre phylogénétique regroupant les séquences des gènes de laccases a été créé à partir de 1400 séquences de laccases répertoriées dans GENBANK avec des tailles à peu près équivalentes aux séquences issues des échantillons (142pb). De manière similaire, la base de données créée pour construire l'arbre phylogénétique des gènes de Dyp a été obtenue à partir de 8000 séquences de Dyp accessibles sur GENBANK.

Résultats et Discussion

I. Résultats de la PCR pour la recherche d'amorces ciblant les gènes des laccases

1) Amorces ciblant les gènes des laccases à deux domaines Cu2SF-Cu4SR et LacK188F LacK199R issues de publications

Les amplifications avec les amorces issues de publications ciblant les gènes des laccases à deux domaines, caractéristiques de l'espèce *Streptomyces* n'ont pas donné de résultats concluants.

L'acquisition d'une souche pure de *Streptomyces albus*, espèce connue pour ses propriétés ligninolytiques, fournit un témoin positif pour ce couple d'amorces. La paire d'amorces CuSF-CuSR a été réalisée à partir de 25 séquences de laccases issues de publications, dont 14 espèces de *Streptomyces* à deux domaines, et d'autres espèces bactériennes et basidiomycètes à trois domaines. Elles ciblent une séquence de 426 pb située entre la deuxième et la quatrième région codante pour une des zones de liaison au cuivre. Les essais réalisés avec ce jeu d'amorces sur les échantillons de digestatMS ont révélé la présence de deux bandes sur gel d'électrophorèse, dont une qui, comparée au témoin positif, *Streptomyces albus*, semble caractéristique du produit attendu. Cependant, même après l'optimisation des conditions de PCR les bandes obtenues restent de faible intensité tandis qu'une bande assez intense de petite taille est visible, correspondant aux amorces non hybridées, même pour le témoin positif (Figure 7A). Un des problèmes rencontrés fut notamment le manque de reproductibilité des conditions de PCR vis-à-vis de l'article, les auteurs utilisant un mix entièrement préparé, sans information sur son contenu exact.

Le deuxième couple d'amorces LacK188F-LacK199R issu de la littérature (Lu *et al.* 2014) a été construit à partir d'un alignement de séquences de la base de données LccED pour cibler les gènes des laccases des espèces de la famille K (*Streptomyces* sp. à deux domaines). Les tests ont donné de nombreuses amplifications aspécifiques lorsqu'elles étaient utilisées avec les échantillons provenant de matrices complexes (données non présentées).

2) Amorces ciblant les gènes des laccases construites au laboratoire à partir de la base de données LccED

Le couple d'amorces FJ-RJ ciblant les gènes des laccases de la famille J (protéines CueO) issu de la base de données LccED amplifie un produit de petite taille, compliquant l'analyse de séquences par la suite. Plusieurs séquences de laccases répertoriées dans cette famille appartiennent à l'espèce *E. coli*, utilisée comme témoin positif.

L'analyse sur gel d'électrophorèse (figure 7B) montre une bande caractéristique pour *E. coli* et également pour d'autres souches pures telles que *Pseudomonas chlororaphis* et *Salmonella enterica*. Concernant les matrices complexes, seuls les sols 1 et 4 prélevés respectivement dans une forêt et un champ de maïs, semblent contenir le produit recherché mais la présence de bandes parasites remet en cause la spécificité des amorces. Aucune amplification n'est visible pour les échantillons de digestats.

Le couple d'amorces FI-RI conçu pour cibler les gènes des laccases de la famille I (bilirubines oxydases) et issu de la base de données LccED, ne donne pas d'amplification pour les échantillons de matrices complexes. Une bande proche de la taille du témoin positif *Bacillus subtilis* est visible pour le compost, mais de faible intensité (Figure 7C). Ce résultat semble indiquer une forte spécificité des amorces pour l'espèce *Bacillus*, justifié par la grande proportion qu'occupent les séquences de cette espèce au sein de la famille I.

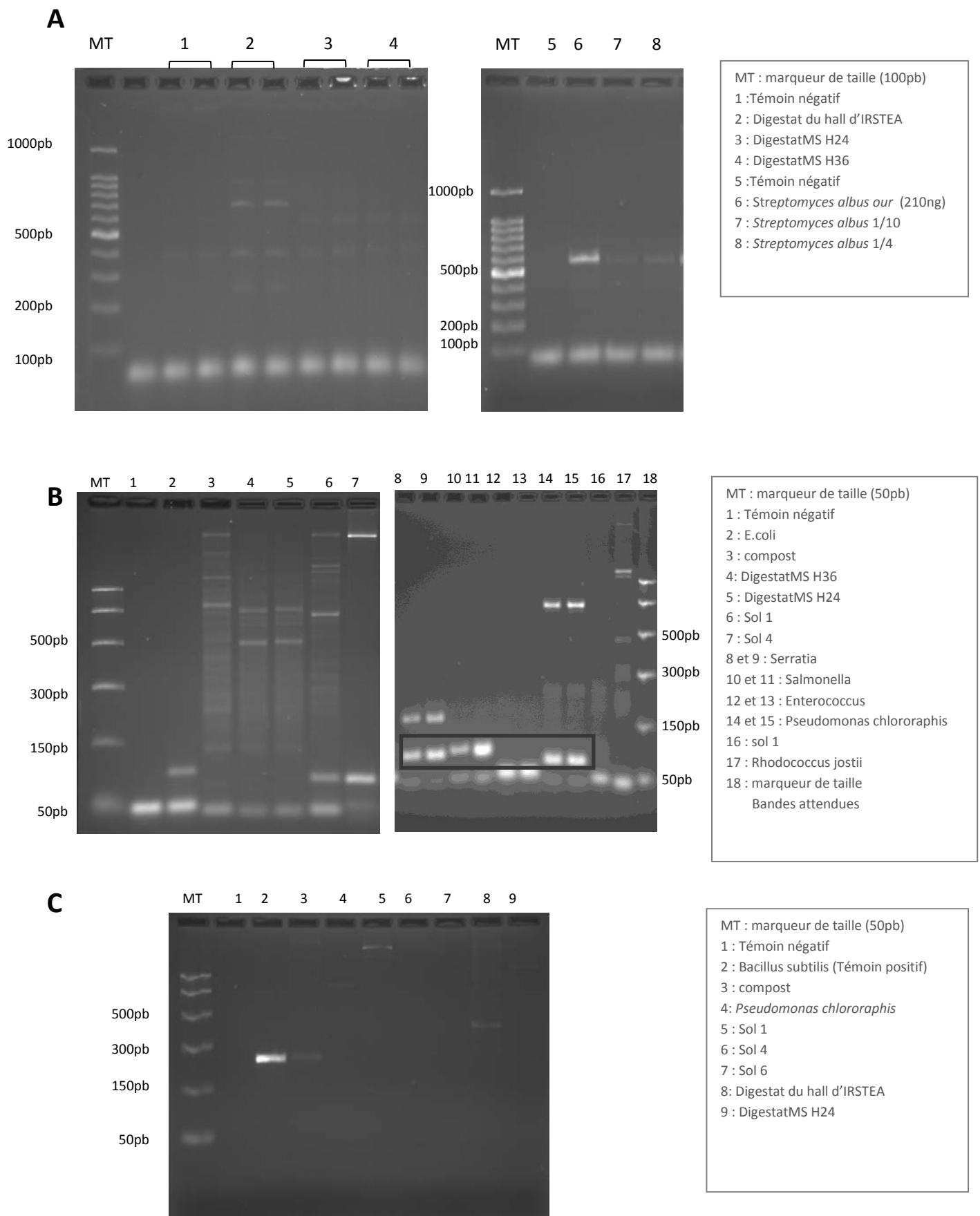


Figure 7 : Gels d'électrophorèse des produits de PCR amplifiés avec le couple d'amorce Cu2SF-Cu4SR issu de la littérature (A), FJ-RJ (B) et FJ-RJ (C), conçu à partir de la base de données LccED, pour cibler les gènes des laccases.

3) Amorces Cu1AF/Cu2R ciblant les gènes des laccases issues de la littérature (Kellner *et al.* 2008)

Le couple d'amorces Cu1AF/Cu2R, issu de la littérature, a été construit pour cibler les régions I et II de la région codant pour la zone de liaison au cuivre des laccases, aussi bien chez les champignons (ascomycètes et basidiomycètes) que chez les bactéries. Ce jeu d'amorces amplifie un produit proche de la taille attendue pour la plupart des échantillons complexes (Figure 8).

Les résultats obtenus avec nos échantillons et le témoin positif semblent en accord avec Kellner *et al.* (2008) et Ausec *et al.* (2011), avec un produit proche de 142pb dans la plupart des échantillons, qui correspondrait à des laccases bactériennes et, un produit de taille supérieure chez *Trametes versicolor*, organisme eucaryote pourvu d'introns.

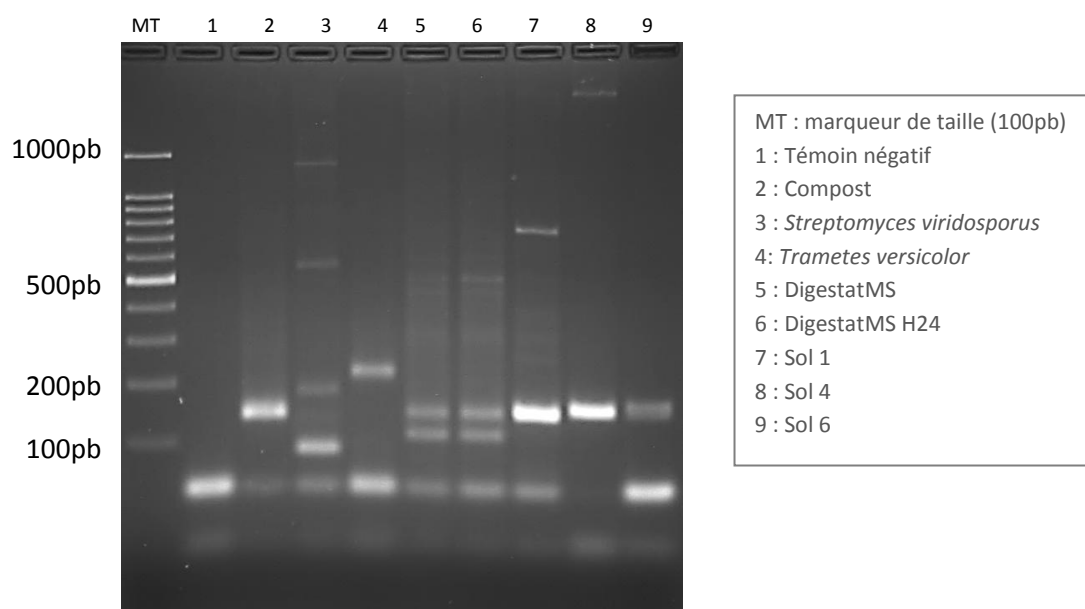


Figure 8 : Gel d'agarose des produits de PCR avec les amorces Cu1AF/Cu2R ciblant les gènes des laccases

Sur les 5 paires d'amorces ciblant les gènes des laccases testées (trois issues de la littérature et deux construites à partir de la base de données LccED), seules les amorces Cu1AF/Cu2R (kellner *et al.* 2008) ont permis d'amplifier des produits sur la plupart des matrices complexes.

II. Résultats de la PCR pour la recherche d'amorces ciblant les gènes des Dyp

1) Amorces F-DYPB/ R-DYPB construites au laboratoire pour cibler les gènes des peroxydases

Les amorces F-DYPB/ R-DYPB, construites à partir d'un alignement de Dyp proche de la séquence BsDyP de *Bacillus subtilis* n'ont pas donné de résultats significatifs lorsqu'elles sont testées sur les matrices complexes. Seul le témoin positif *Bacillus subtilis* a montré un produit de bonne taille sur gel d'électrophorèse (Figure 9). Les autres échantillons ont donnés de nombreux produits aspécifiques, empêchant toute poursuite d'étude avec ce couple d'amorces.

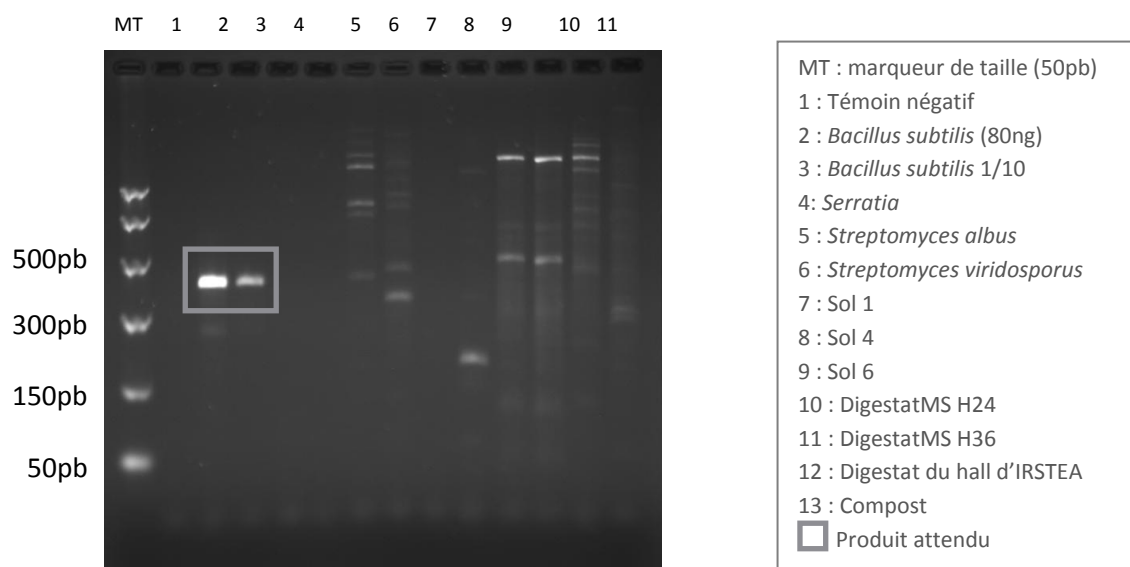


Figure 9: Gel d'électrophorèse des produits de PCR amplifiés avec le couple d'amorce F-DYPB/R-DYPB

2) Amorces F- DyPR/ R-DyPR construites au laboratoire pour cibler les gènes des peroxydases

Les amorces ciblant les gènes des Dyp ont été construites à partir d'un alignement basé sur la séquence Dyp b de *Rhodococcus jostii*, connue pour ses propriétés ligninolytiques. Elles amplifient un produit de la taille attendue entre 400 et 500pb pour la plupart des échantillons excepté dans le sol enrichi à la lignine kraft prélevé dans une forêt (sol1) (Tableau 10). Quelques parasites apparaissent une fois de plus pour l'échantillon de digestat provenant du hall (lisier+aliments) et quelques-unes pour l'échantillon de digestatMS mais négligeables (Figure 10). Comme pour les amorces ciblant les laccases, les échantillons de digestats donnent des réponses différentes, avec une meilleure spécificité des amorces pour les séquences présentes dans l'échantillon de digestatMS. La mesure de l'intensité des bandes donne une mesure qualitative de la concentration en Dyp dans les matrices complexes ; le sol 4 et le sol 1, prélevé respectivement dans un champ de maïs et dans une

forêt, présentent des bandes de très forte intensité contrairement aux échantillons de digestatMS, compost et sol 6, sédiment prélevé au fond d'un étang (Figure 10).

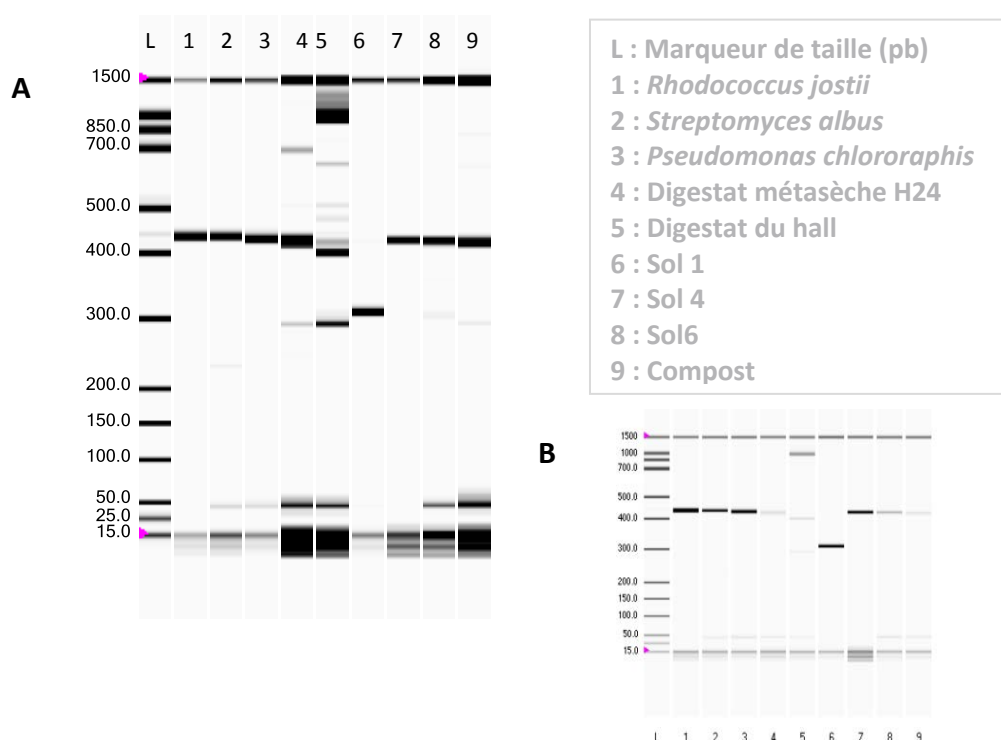


Figure 10 : (A) Gel d'électrophorèse (Experion) des produits de PCR obtenus avec les amorces ciblant les gènes des Dyp ; (B) Gel d'électrophorèse reflétant le degré d'intensité des bandes obtenues pour chaque échantillon

Sur les deux paires d'amorces construites pour cibler les gènes des Dyp, seul le couple d'amorces F-DYPR/R-DYPR a permis de retrouver un produit de taille attendue dans les matrices complexes. De plus, la pureté des produits amplifiés visible sur gel, fait de lui un bon candidat pour la qPCR.

III. Résultats du séquençage des produits amplifiés avec les amorces ciblant les gènes des laccases

Les 35 séquences obtenues par clonage des produits de PCR amplifiés avec les amorces Cu1AF-Cu2R montrent de fortes similarités avec des gènes de laccases lorsqu'elles sont analysées avec le logiciel Blast (tableau 4). La taille de la plupart des séquences reste fidèle à celle précisée dans la littérature autour de 142pb, qui appuie l'idée de séquences bactériennes plutôt que fongiques (dont le produit est de taille supérieure du fait de la présence d'introns) (Kellner *et al.* 2008).

Tableau 4 : Résultats du séquençage avec les amorces ciblant les gènes des laccases

Ech				RESULTATS BLAST			RESULTATS ARB	
	séquence	Nombre de clones	Taille (pb)	Produit	Genre/espèce cultivable la plus proche	% identité**	Espèce associée	% Distance entre les branches*
Compost	Compost_lacA	2	141	lmco gene	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> strain DSM14405	85	Unc. bac isolate AT2S1R2S03	20.6
	Compost-lacB	1	148	lmco gene	<i>Sphingomonas wittichii</i> RW1	73	Unc bact clone bogBF12	29.0
	Compost_lacC	1	136	lmco gene	<i>Pseudomonas resinovorans</i>	69	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain NCGM 1984	15.1
	Compost_lacD	1	147	lmco gene	<i>Nitrobacter hamburgensis</i> X14	74	Unc bac clone fenBE3	49.7
	Compost_lacE	1	139	lmco gene	<i>Gemmatimonadetes bacterium</i> KBS708	80	Unc bac clone bogBD1	27.4
	Compost_lacF	2	141	lmco gene	<i>Delftia</i> sp.	77	Unc bac isolate AS14H1S14	27.0
	Compost_lacG	1	147	Lmco gene	<i>Oligotropha carboxidovorans</i> OM5	75	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp.lactis	60.4
Sol 1	Sol1_lacA	2	142	lmco gene	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	85	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> NH44784-1996	17.6
	Sol1_lacB	1	142	lmco gene	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	85	id	16.2
	Sol1_lacC	4	142	lmco gene	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	84	id	17.8
	Sol1_lacD	2	142	lmco gene	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	84	id	18.3
	Sol1_lacE	1	142	lmco gene	<i>Rhodococcus opacus</i> PD630	96	<i>Rhodococcus opacus</i> PD630	3.0
	Sol1_lacF	1	142	lmco gene	<i>Streptosporangium roseum</i> DSM 43021	78	<i>Bacillus cereus</i> 03BB108	42.5
	Sol1_lacG	1	142	lmco gene	<i>Rhodococcus erythropolis</i> PR4	96	<i>Rhodococcus aetherivorans</i> strain lcdP1	26.1
	Sol1_lacH	1	142	lmco gene	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	79	<i>Rhodococcus erythropolis</i> strain BG43	4.4
Sol 4	Sol4_lacA	2	142	lmco gene	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> NH44784-1996	91	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> NH44784-1996	10.6
	Sol4_lacB	2	142	lmco gene	<i>Brevibacillus laterosporus</i> LMG 15441	78	<i>Bacillus cereus</i> 03BB108	22.7
Sol6	Sol6_lacA	1	139	Ø	Ø	Ø	Unc bac clone 84	11.0
	Sol6_lacB	2	157	Ø	Ø	Ø	Unc bact clone bogAE10	40.1
Digestat MS	DigestatMS_lacA	1	142	Lmco gene	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	73	Acidovorax sp.KKS	31.3
	DigestatMS_lacB	1	104	Ø	Ø	Ø	<i>Pseudomonas syringae</i> pv.pisi str.1704B	67.0
	DigestatMS_lacC	4	104	Ø	Ø	Ø		62.1

*Distance phylogénétique calculée par le logiciel ARB

**% de correspondance des bases entre les séquences

Ø Aucune séquence similaire retrouvée avec le logiciel Blast

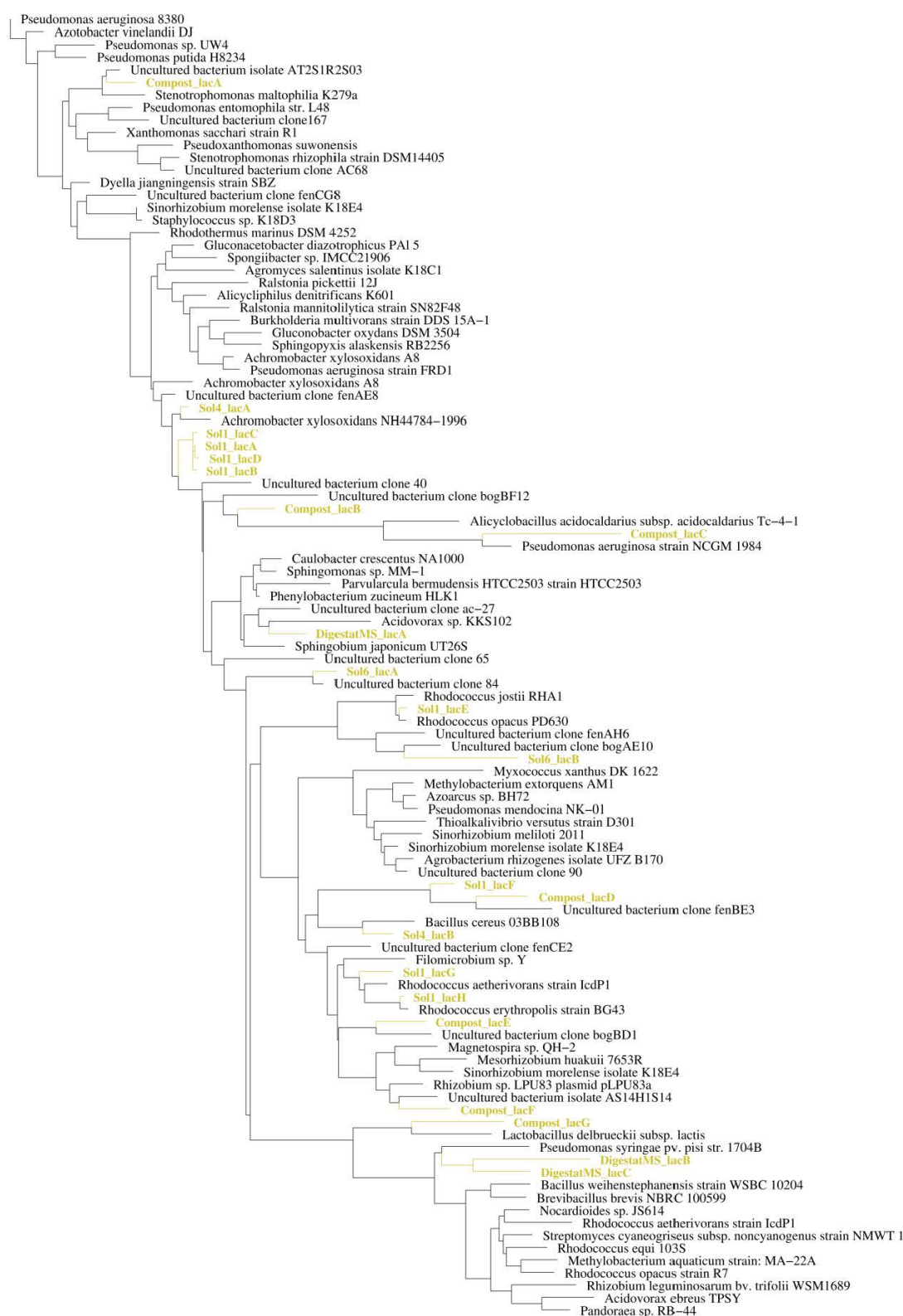
Unc lac : Uncultured bacterium clone, obtenu avec les amorces Cu1AF-Cu2R (Ausec *et al.* 2011)

L'arbre phylogénétique construit à partir de 1400 séquences de laccases issues de la base de données GENBANK permet de mettre en évidence une grande diversité des espèces bactériennes possédant ce gène (Figure 11). Ceci est d'ailleurs justifié par les nombreuses fonctions que possèdent les laccases (sachant que la région ciblée par les amorces se situe au niveau des sites de liaison aux cuivres, très conservée pour la plupart des laccases). Les espèces ou genres identifiés avec les séquences retrouvées dans les différents environnements sont principalement associés aux phyla des Protéobactéries (74%) et quelques-uns aux Actinobactéries (17%) et Firmicutes (9%), qui sont des phyla couramment rencontrés dans les matrices de type compost selon une étude phylogénétique basée sur l'ADN16S de Liu *et al.* (2012).

Après alignement des séquences issues des différents clones, des divergences inter mais également intra échantillons sont mises en évidence. Une importante diversité de séquences est retrouvée dans le compost avec des produits de tailles variables traduisant une grande dispersion au sein de l'arbre phylogénétique. Dans les sols 1 et 4 prélevés respectivement dans une forêt et un champ de maïs, les séquences rencontrées sont moins hétérogènes, avec une taille constante de 142pb. Les espèces retrouvées dans les différentes matrices ne peuvent être déduites seulement à partir de ces résultats, même si pour certaines, les distances des branches de l'arbre phylogénétique laissent peu de place à la suggestion (par exemple, la séquence Sol1_lacE très proche de l'espèce *Rhodococcus*).

Les séquences retrouvées dans le sol6, issu de sédiments prélevés au fond d'un étang, sont difficilement identifiables à l'aide du logiciel Blast, et même si les données de l'arbre permettent de les associer à des séquences de gènes de laccases, des informations complémentaires doivent être apportées pour valider leur nature exacte.

La petite taille du produit amplifié (140pb) met un frein à l'identification exacte des micro-organismes présents dans les échantillons testés et cause des divergences entre les résultats obtenus avec le logiciel Blast et les résultats obtenus avec le logiciel ARB. En effet, les séquences ne sont pas toujours associées aux mêmes espèces selon la méthode d'analyse (Tableau 4).



0.10

Figure 11 : Arbre phylogénétique d'un gène de fonction construit avec le logiciel ARB, en utilisant l'algorithme du maximum de vraisemblance, à partir des séquences nucléotidiques de 1400 laccases bactériennes issues de génome complet et de publications accessibles sur GENBANK. Les séquences notées « uncultured bacterium clone » ont été ajoutées à la base de données par Kellner *et al* en 2008, Ausec *et al* (2011) et Lu *et al* (2014) en utilisant les amorces Cu1AF-Cu2R.

IV. Résultats du séquençage des produits amplifiés avec les amorces ciblant les gènes des Dyp

1) Séquençage des produits de PCR bruts pour la recherche de gènes de Dyp pour les souches pures et sols enrichis à la lignine kraft

Tableau 5 : Résultats du séquençage sur produits de PCR avec les amorces ciblant les gènes des Dyp

séquence	Taille du fragment analysé (pb)	RESULTATS BLAST		
		Produit	Espèce associée	% identité avec la séquence
<i>Rhodococcus jostii</i>	396	Dyp	<i>Rhodococcus jostii</i>	95
<i>Streptomyces albus</i>	392	Dyp	<i>Streptomyces albus</i> J1074,	95
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	396	Dyp	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> strain JD37	97
Sol1	245	Dyp	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	89
Sol4	399	Dyp	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> 06	95

Les produits de PCR obtenus avec les amorces construites au laboratoire, ciblant les gènes des Dyp des souches pures de *Rhodococcus jostii*, *Streptomyces albus*, *Pseudomonas chlororaphis* ainsi que les sols 1 et sol4, enrichis à la lignine kraft, ont été séquencés directement, sans passage par l' étape de clonage. L'alignement de séquences obtenues avec le logiciel blast permet de confirmer que les amorces ciblent bien des gènes de Dyp (Tableau 5).

En effet, une correspondance avec un haut pourcentage de similarité, entre 89 et 97% est établie entre les séquences de souches pures obtenues et les gènes de Dyp répertoriés dans les bases de données accessibles sur blast. Pour le sol 1 qui avait montré une bande de taille inférieure aux autres échantillons sur gel d'électrophorèse, la séquence déduite du clonage semble en effet plus courte (récupération de seulement 245pb (Figure 10, puit 6)). Néanmoins, l'analyse identifie la séquence comme étant proche d'une Dyp bactérienne d'*Achromobacter xylosoxidans*, déjà retrouvée dans le sol 1 associé à des séquences de laccases.

2) Séquençage par la méthode de clonage pour la recherche de gènes de Dyp dans les matrices complexes

Les résultats du clonage des produits de PCR obtenus avec les amorces ciblant les gènes des Dyp sur les matrices complexes [compost, sols enrichis à la lignine kraft prélevés au fond d'un étang (sol6) et en surface d'un champ de maïs (sol4) ainsi que l'échantillon de digestatMS], confirment la présence de gènes de peroxydases dans ces échantillons. La taille attendue d'environ 450 pb est retrouvée pour la plupart des séquences (Tableau 6). La séquence du sol 4 montre de fortes similarités avec le gène de la peroxydase de l'espèce *Pseudomonas chlororaphis*, espèce dont on est sûr de sa présence dans le sol 4 (car elle a été isolée à partir de ce même sol). De plus, les séquences de Dyp de cette espèce très proche phylogénétiquement de celles de *Pseudomonas fluorescens* et *Rhodococcus jostii*, qui sont des espèces connues pour leur potentiel ligninolytique fait d'elle une bonne candidate dans la dégradation de la matière lignocellulosique (Rahmanpour et Bugg. 2014).

Tableau 6 : Résultats du séquençage sur clones avec les amorces ciblant les gènes des Dyp

Ech	séquence	Nombre de clones	Taille (pb)	RESULTATS BLAST			RESULTATS ARB	
				Produit	Genre/espèce cultivable la plus proche	% identité**	espèces proches	% Distance entre les branches*
DigestatMS	DigestatMS_dypA	1	451	Dyp	<i>Rhodococcus pyridinivoran</i>	86	<i>Nocardia farcinica</i> IFM	24.5
	DugestatMS_dypB	2	453	Dyp	<i>Mycobacterium avium</i>	80	<i>Tsukamurella paurometaola</i> DSM	23.4
	DigestatMS_dypC	2	451	Dyp	<i>Mycobacterium neoaurum</i>	85	<i>Mycobacterium neoaurum</i>	17.2
	DigestatMS_dypD	1	450	Dyp	<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	76	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PA1	24.7
	DigestatMS_dypE	1	451	Dyp	<i>Streptomyces albus</i>	99	<i>Paracoccus denitrificans</i>	27.4
	DigestatMS_dypF	1	424	Ø	Ø	Ø	<i>Actinoplanes friuliensis</i> DSM	25.2
	DigestatMS_dypG	1	448	Dyp	<i>Rhodococcus pyridinivoran</i>	85	<i>Nocardia farcinica</i> IFM	26.0
Compost	Compost_dypA	2	451	Dyp	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	84	<i>Mycobacterium neoaurum</i>	17.9
	Compost_dypB	1	453	Dyp	<i>Mycobacterium gilvum</i>	82	<i>Mycobacterium marinum</i>	24.3
	Compost_dypC	2	453	Dyp	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	81	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	20.5
	Compost_dypD	1	453	Dyp	<i>Mycobacterium sp. VKM</i>	84	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	22.1
	Compost_dypE	4	453	Dyp	<i>Rhodococcus pyridinivoran</i>	86	<i>Nocardia farcinica</i> IFM	26.2
	Compost_dypF	2	451	Dyp	<i>Rhodococcus pyridinivoran</i>	86	<i>Nocardia farcinica</i> IFM	56.6
SOL 6	Sol6_dypA	2	301	?	?	?	<i>Streptomyces sq SIREXAA-E</i>	64.2
	Sol6_dypB	3	450	Dyp	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	96	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	4.2
	Sol6_dypC	2	451	Dyp	<i>Mycobacterium neoaurum</i>	84	<i>Mycobacterium neoaurum</i>	18.2
	Sol6_dypD	2	448	Dyp	<i>Burkholderia ubonensis</i>	86	<i>Pseudomonas alkylphenolia</i>	58.3
SOL 4	Sol4_dypA	3	450	Dyp	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	96	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	3.7

*Distance phylogénétique calculée par le logiciel ARB

**% de correspondance des bases entre les séquences

Ø Aucune séquence similaire retrouvée avec le logiciel Blast

L'arbre phylogénétique a été construit à partir de 8000 séquences de Dyp annotées dans les génomes complets d'espèces bactériennes, disponibles sur la base de données GENBANK. Les séquences retrouvées dans les matrices complexes ont été insérées dans l'arbre des Dyp, appartenant principalement aux phyla des actinobactéries (70%) et des protéobactéries (30%) (Figure 12).

L'arbre permet de mettre en évidence deux groupes bactériens. Le premier fait intervenir des espèces appartenant au phylum des protéobactéries, majoritairement de classes gamma et beta. Les séquences des sols se retrouvent principalement dans ce groupe, proche du genre *Pseudomonas*, bactérie connue du sol. Les Dyp de *Pseudomonas chlororaphis*, gamma protéobactérie, se retrouvent très proches des 4 séquences identiques obtenues dans le sol 4 (champ de maïs), ce qui confirme le résultat de séquençage précédant (séquençage sans passage par l'étape de clonage). Il est possible que la prédominance de *Pseudomonas chlororaphis* au sein du sol4 dirige spécifiquement/prioritairement les amorces vers les séquences de cette espèce. La proximité des séquences Sol6_dypB et Sol4_dypA témoigne de la probabilité de retrouver *P. chlororaphis* ou des espèces proches dans ces deux sols.

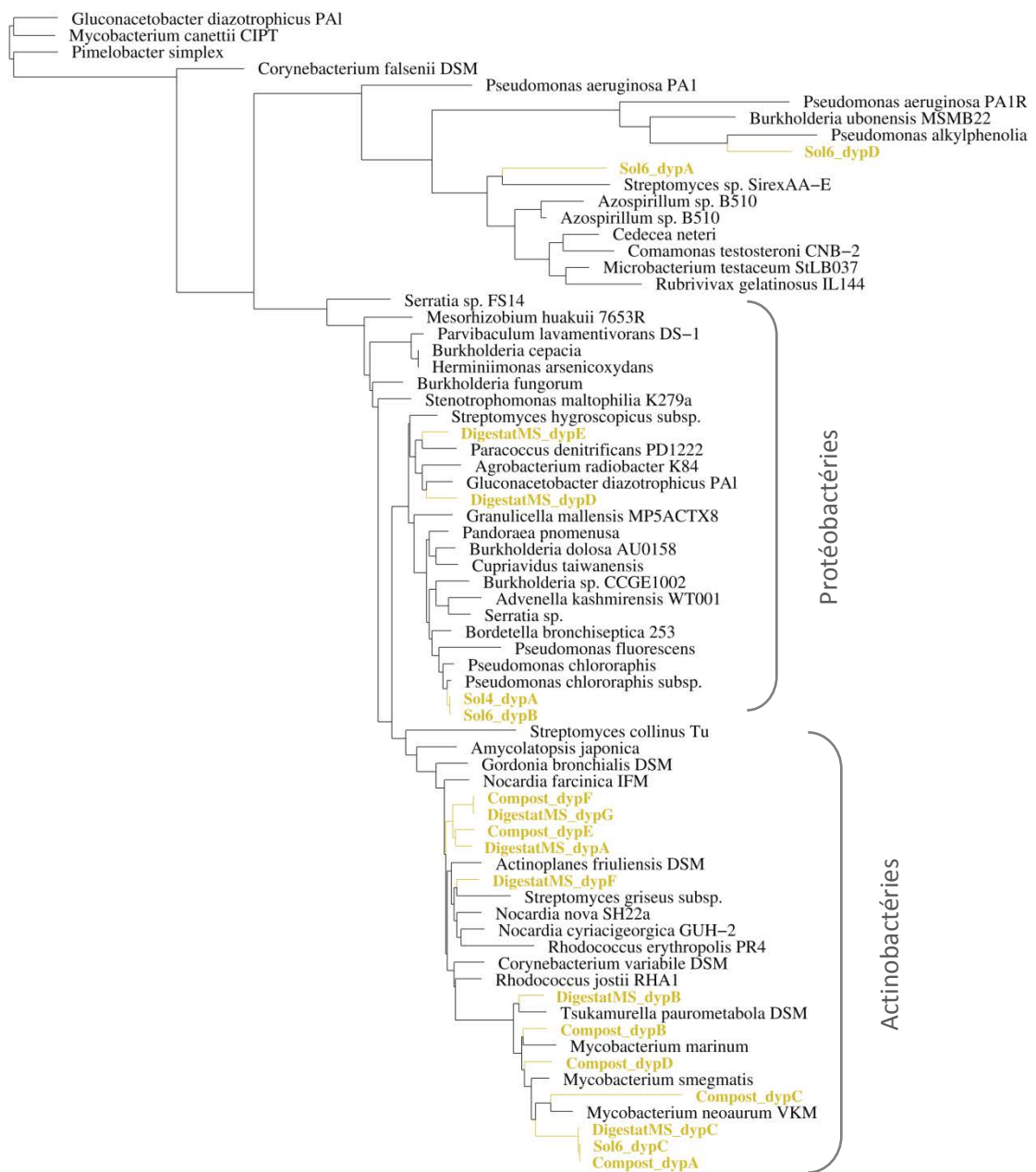
Le second groupe, encore plus homogène que le premier est composé essentiellement d'actinobactéries, toutes de l'ordre des actinomycétales. Toutes les séquences obtenues à partir du compost se retrouvent dans cette partie de l'arbre, ce phylum étant le plus abondant dans le compost avec une proportion de 35% selon la littérature (Shen *et al.* 2014)

Au sein de l'échantillon de digestatMS, des différences significatives entre les séquences nucléotidiques semblent révéler une diversité d'espèces pourvues de Dyp, associées principalement au groupe des actinobactéries (75%), qui représente le phylum le plus abondant dans les digesteurs anaérobies, environ 22% selon Chouari *et al.* (2005) On retrouve également certaines séquences parmi des protéobactéries (25%), qui occupent une proportion non négligeable au sein du digestat, environ 15% (Chouari *et al.* 2005).

Aucune espèce appartenant au Firmicutes n'est représentée alors que ce phylum occupe habituellement une place importante au sein des matrices testées que ce soit les composts (8%) (Liu *et al.* 2012) ou les digestats (22%) (Chouari *et al.* 2005). De plus, il a été admis que *Bacillus subtilis*, appartenant au phylum des Firmicutes pouvait exprimer des Dyp ayant des propriétés de dégradation (Ming *et al.* 2014). Les amorces ne semblent donc pas spécifiques

de ces espèces, dont les séquences nucléotidiques de Dyp sont trop éloignées de celles des espèces appartenant aux phyla retrouvés à travers les échantillons testés.

Globalement, les séquences obtenues par clonage sont principalement apparentées aux genres *Pseudomonas* et *Mycobacterium*, et plus particulièrement à des espèces pathogènes. Cette observation peut être associée au fait que ce sont des espèces beaucoup étudiées, notamment en médecine, leurs séquences sont donc majoritairement recensées sur blast. De plus, les espèces pathogènes nécessitent un cortège enzymatique lourd, important, notamment dans leur système de résistance, de défense, et d'attaque (destruction membranaire,...), d'où l'intervention de peroxydases (Marilize le Roes-Hill 2011).



0.10

Figure 12 : Arbre phylogénétique d'un gène de fonction, le gène codant pour les Dye peroxydases, construit à partir de 8000 séquences nucléotidiques codantes pour des Dyp issues de génomes complets bactériens accessibles sur blast. Il a été créé sur ARB en utilisant l'algorithme du maximum de vraisemblance,

V. Résultats de la qPCR avec les amorces ciblant les gènes de Dyp

Afin de vérifier le protocole de quantification des gènes Dyp dans différents environnements, les échantillons PRObiotic de différents digestats ont été testés.

Tableau 7 : Concentration en gènes de Dyp dans les échantillons PRObiotic

	Echantillons	Nombre copie/g ou ml d'échantillon	Composition des intrants
Echantillons utilisés pour optimiser la qPCR	Compost	$1.4 \cdot 10^5$ copie/g	32% de fraction broyée de biodéchets, 50% de déchets vert
	Sol 4	$8.8 \cdot 10^5$ copie/g	Champ de maïs (Rennes)
	Sol 6	$1.0 \cdot 10^4$ copie/ml	Sédiment étang (Rennes)
	DigestatMS	$1.1 \cdot 10^5$ copie/g	Fumier de bovin
Echantillons PRObiotic	2L	$2.0 \cdot 10^4$ copie/ml	30%lisier porcin, 10% déchets vert
	4B	$5.6 \cdot 10^4$ copie/ml	20% fumier/lisier, 59.7% déchets vert
	7L	$7.0 \cdot 10^3$ copie/ml	37.5% lisier, 36% déchets vert
	5L	$9.0 \cdot 10^4$ copie/ml	71.4% lisier, 24.4% déchets vert
	9B	$5.2 \cdot 10^4$ copie/ml	75% de fumier/lisier, 8% déchets vert
	1C	$1.7 \cdot 10^2$ copie/g	30% lisier porcin
	5C	$1.7 \cdot 10^3$ copie/g	50% lisier, 20% déchets verts

La qPCR optimisée avec les échantillons compost, digestatMS et sols enrichis à la lignine montre des résultats en accord avec ceux de l'Expérior (Figure 10B), le plus grand nombre de copie de gènes de Dyp est retrouvé dans le sol4, alors que le sol6 en possède le moins (Tableau 7). L'optimisation permet d'arriver à une efficacité d'environ 87% et d'une reproductibilité égale à 0.99, ce qui est assez satisfaisant pour poursuivre l'étude. Pour l'ensemble des échantillons, un seul produit est amplifié avec une température de fusion proche de 90°C (Annexe I).

Les résultats sur les échantillons PRObiotic admettent des différences significatives entre les différents échantillons mais aucun lien entre la composition et le nombre de copies de Dyp n'a pu être défini (Tableau 7). La grande variation des conditions entre les digestats ne permet pas de prendre en compte l'ensemble des paramètres intervenant lors du traitement des échantillons, ce qui rend l'analyse difficile. Il serait intéressant de reprendre cette expérience en comparant des échantillons avec moins de paramètres à prendre en compte.

Conclusion et perspectives

Sur l'ensemble des amorces testées pour cibler des gènes des oxydases au sein de matrices complexes de type sols, digestats et compost, deux paires d'amorces ont montré des résultats satisfaisants.

Tout d'abord, les amorces Cu1AF et Cu2R, issues de la littérature (Kellner *et al.* 2008) ont permis de retrouver des gènes des laccases dans la plupart des matrices testées que ce soit en milieu anaérobie (digestat) ou aérobie (compost, sols enrichis à la lignine kraft). Cependant, la diversité des fonctions des laccases caractérisant une grande variabilité de leurs séquences nucléotidiques, associée à la petite taille de la région amplifiée, restent un frein à l'étude complète des séquences obtenues. De plus, le haut degré de dégénérescence des amorces du produit amplifié rend la quantification par qPCR difficile.

Ensuite, le deuxième couple d'amorces F-DPYR/R-DYPR conçu pour cibler les gènes des Dyp, a donné des résultats prometteurs sur les différentes matrices. Les données phylogénétiques classent les séquences obtenues dans les différentes matrices parmi celles de Dyp d'organismes pathogènes du genre de *Pseudomonas* et *Mycobacterium*. Cependant, le manque d'information sur la classification des Dyp empêche l'analyse complète des séquences obtenues. Les données métagénomiques pourraient apporter des informations complémentaires sur les espèces réellement présentes dans les différentes matrices, et confirmer ou pas l'origine des séquences amplifiées par les amorces.

Quelles que soient les amorces testées, les différentes matrices ne réagissent pas de façon similaire, les caractéristiques des différents milieux jouant un rôle dans la composition des communautés bactériennes. La qPCR sur les différents échantillons de digestats PRObiotic n'a pas donné de résultats interprétables. D'autres analyses sont à envisager par la suite avec des conditions de préparation des échantillons plus homogènes.

L'étude des gènes des oxydases constitue une première approche en apportant des indications sur la dynamique des populations présentes au sein des différentes matrices. Elle pourrait être complétée par des analyses transcriptomiques afin d'appréhender la diversité fonctionnelle.

Bibliographie

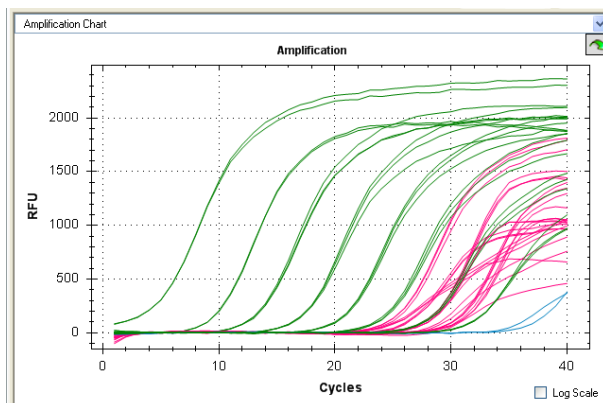
- Ahmad, Mark, Joseph N. Roberts, Elizabeth M. Hardiman, Rahul Singh, Lindsay D. Eltis, and Timothy D. H. Bugg. 2011. "Identification of DypB from *Rhodococcus Jostii* RHA1 as a Lignin Peroxidase." *Biochemistry* 50 (23): 5096–5107. doi:10.1021/bi101892z.
- Alexandre, Gladys, and Igor B. Zhulin. 2000. "Laccases Are Widespread in Bacteria." *Trends in Biotechnology* 18 (2): 41–42.
- Ausec, Luka, Jan Dirk Van Elsas, and Ines Mandic-Mulec. 2011. "Two-and Three-Domain Bacterial Laccase-like Genes Are Present in Drained Peat Soils." *Soil Biology and Biochemistry* 43 (5): 975–83.
- Ausec, Luka, Martha Zakrzewski, Alexander Goesmann, Andreas Schlüter, Ines Mandic-Mulec, and others. 2011. "Bioinformatic Analysis Reveals High Diversity of Bacterial Genes for Laccase-like Enzymes." *PLoS One* 6 (10): e25724.
- Bholay, A. D., Bhavna V. Borkhataria, Priyanka U. Jadhav, Kaveri S. Palekar, Mayuri V. Dhalkari, and P. M. Nalawade. 2012. "Bacterial Lignin Peroxidase: A Tool for Biobleaching and Biodegradation of Industrial Effluents." *Universal Journal of Environmental Research and Technology* 2 (1): 58–64.
- Bugg, Timothy DH, Mark Ahmad, Elizabeth M. Hardiman, and Rahul Singh. 2011. "The Emerging Role for Bacteria in Lignin Degradation and Bio-Product Formation." *Current Opinion in Biotechnology* 22 (3): 394–400.
- Chouari, Rakia, Denis Le Paslier, Patrick Daegelen, Philippe Ginestet, Jean Weissenbach, and Abdelghani Sghir. "Novel Predominant Archaeal and Bacterial Groups Revealed by Molecular Analysis of an Anaerobic Sludge Digester." *Environmental Microbiology* 7, no. 8 (August 1, 2005): 1104–15. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00795.x.
- Colpa, Dana I., Marco W. Fraaije, and Edwin van Bloois. 2014. "DyP-Type Peroxidases: A Promising and Versatile Class of Enzymes." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 41 (1): 1–7.
- Dwivedi, Upendra N., Priyanka Singh, Veda P. Pandey, and Anoop Kumar. 2011. "Structure–function Relationship among Bacterial, Fungal and Plant Laccases." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 68 (2): 117–28.
- Fernandes, Tatiana Alves Rigamonte, Wendel Batista da Silveira, Flávia Maria Lopes Passos, and Tiago Domingues Zucchi. 2014. "Laccases from Actinobacteria—What We Have and What to Expect." *Advances in Microbiology* 2014. http://file.scirp.org/Html/1-2270298_45726.htm.
- Furukawa, Takanori, Fatai Olumide Bello, and Louise Horsfall. 2014. "Microbial Enzyme Systems for Lignin Degradation and Their Transcriptional Regulation." *Frontiers in Biology* 9 (6): 448–71. doi:10.1007/s11515-014-1336-9.
- Givaudan, Alain, Aline Effosse, Denis Faure, Patrick Potier, Marie-Louise Bouillant, and René Bally. 1993. "Polyphenol Oxidase in *Azospirillum Lipoferum* Isolated from Rice Rhizosphere: Evidence for Laccase Activity in Non-Motile Strains of *Azospirillum Lipoferum*." *FEMS Microbiology Letters* 108 (2): 205–10. doi:10.1111/j.1574-6968.1993.tb06100.x.
- Hatakka, Annele. "Biodegradation of Lignin." In *Biopolymers Online*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/3527600035.bpol1005/abstract>.
- Kellner, Harald, Patricia Luis, Bettina Zimdars, Bärbel Kiesel, and François Buscot. "Diversity of Bacterial Laccase-like Multicopper Oxidase Genes in Forest and Grassland Cambisol Soil Samples." *Soil Biology and Biochemistry* 40, no. 3 (2008): 638–48.
- Kunamneni, Adinarayana, Susana Camarero, Carlos García-Burgos, Francisco J. Plou, Antonio Ballesteros, and Miguel Alcalde. 2008. "Engineering and Applications of Fungal Laccases for Organic Synthesis." *Microbial Cell Factories* 7: 32. doi:10.1186/1475-2859-7-32.
- Liu, Dian-Feng, Bin Wang, and Bin Lian. "Dynamic Changes in Bacterial Communities During Compost and Earthworm Treatment of Low-Grade Potassium Ore." *Geomicrobiology Journal* 30, no. 7 (August 9, 2013): 653–61. doi:10.1080/01490451.2012.757999.
- Luis, Patricia, Grit Walther, Harald Kellner, Francis Martin, and François Buscot. 2004. "Diversity of Laccase Genes from Basidiomycetes in a Forest Soil." *Soil Biology and Biochemistry* 36 (7): 1025–36.
- Lu, Lunhui, Guangming Zeng, Changzheng Fan, Jiachao Zhang, Anwei Chen, Ming Chen, Min Jiang, et al. 2014. "Diversity of Two-Domain Laccase-like Multicopper Oxidase Genes in *Streptomyces* Spp.: Identification of Genes Potentially Involved in Extracellular Activities and Lignocellulose Degradation during Composting of Agricultural Waste." *Applied and Environmental Microbiology* 80 (11): 3305–14. doi:10.1128/AEM.00223-14.

- Mate, Diana M., and Miguel Alcalde. 2015. "Laccase Engineering: From Rational Design to Directed Evolution." *Biotechnology Advances* 33 (1): 25–40. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.12.007.
- Marilize le Roes-Hill, Nuraan Khan. "Actinobacterial Peroxidases: An Unexplored Resource for Biocatalysis." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 164, no. 5 (2011): 681–713. doi:10.1007/s12010-011-9167-5.
- Meux, Edgar, Pascalita Prosper, Eiji Masai, Guillermo Mulliert, Stéphane Dumarçay, Mélanie Morel, Claude Didierjean, Eric Gelhaye, and Frédérique Favier. 2012. "Sphingobium Sp. SYK-6 LigG Involved in Lignin Degradation Is Structurally and Biochemically Related to the Glutathione Transferase Ω Class." *FEBS Letters* 586 (22): 3944–50. doi:10.1016/j.febslet.2012.09.036.
- Mosier, Nathan, Charles Wyman, Bruce Dale, Richard Elander, Y. Y. Lee, Mark Holtzapple, and Michael Ladisch. "Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass." *Bioresource Technology* 96, no. 6 (April 2005): 673–86. doi:10.1016/j.biortech.2004.06.025.
- Ogola, Henry Joseph Oduor, Takaaki Kamiike, Naoya Hashimoto, Hiroyuki Ashida, Takahiro Ishikawa, Hitoshi Shibata, and Yoshihiro Sawa. 2009. "Molecular Characterization of a Novel Peroxidase from the Cyanobacterium *Anabaena* Sp. Strain PCC 7120." *Applied and Environmental Microbiology* 75 (23): 7509–18. doi:10.1128/AEM.01121-09.
- Passardi, Filippo, Grégory Theiler, Marcel Zamocky, Claudia Cosio, Nicolas Rouhier, Felipe Teixeira, Marcia Margis-Pinheiro, et al. 2007. "Peroxibase: The Peroxidase Database." *Phytochemistry* 68 (12): 1605–11. doi:10.1016/j.phytochem.2007.04.005.
- Piontek, Klaus, Matteo Antorini, and Thomas Choinowski. 2002. "Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes Versicolor* at 1.90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (40): 37663–69. doi:10.1074/jbc.M204571200.
- Rahmanpour, Rahman, and Timothy DH Bugg. 2015. "Characterisation of Dyp-Type Peroxidases from *Pseudomonas Fluorescens* Pf-5: Oxidation of Mn (II) and Polymeric Lignin by Dyp1B." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 574: 93–98.
- Rubin, Edward M. "Genomics of Cellulosic Biofuels." *Nature* 454, no. 7206 (August 14, 2008): 841–45. doi:10.1038/nature07190.
- Sirim, Demet, Florian Wagner, Lei Wang, Rolf D. Schmid, and Jürgen Pleiss. 2011. "The Laccase Engineering Database: A Classification and Analysis System for Laccases and Related Multicopper Oxidases." *Database* 2011 (January): bar006. doi:10.1093/database/bar006.
- Shen, Zongzhuan, Dongsheng Wang, Yunze Ruan, Chao Xue, Jian Zhang, Rong Li, and Qirong Shen. "Deep 16S rRNA Pyrosequencing Reveals a Bacterial Community Associated with Banana Fusarium Wilt Disease Suppression Induced by Bio-Organic Fertilizer Application." *PLoS ONE* 9, no. 5 (May 28, 2014). doi:10.1371/journal.pone.0098420.
- Sirim, Demet, Florian Wagner, Lei Wang, Rolf D. Schmid, and Jürgen Pleiss. 2011. "The Laccase Engineering Database.[en ligne]. <http://www.lcced.unistuttgart.de/cgibin/LccED1.2/index.pl>.
- Singh, Gursharan, Aditya Bhalla, Paramjit Kaur, Neena Capalash, and Prince Sharma. 2011. "Laccase from Prokaryotes: A New Source for an Old Enzyme." *Reviews in Environmental Science and Bio/technology* 10 (4): 309–26.
- Van der Lelie, Daniel, Safiyh Taghavi, Sean M. McCorkle, Luen-Luen Li, Stephanie A. Malfatti, Denise Monteleone, Bryon S. Donohoe, et al. 2012. "The Metagenome of an Anaerobic Microbial Community Decomposing Poplar Wood Chips." *PLoS One* 7 (5): e36740. doi:10.1371/journal.pone.0036740.
- Yoshida, Toru, and Yasushi Sugano. 2015. "A Structural and Functional Perspective of DyP-Type Peroxidase Family." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 574 (May): 49–55. doi:10.1016/j.abb.2015.01.022.

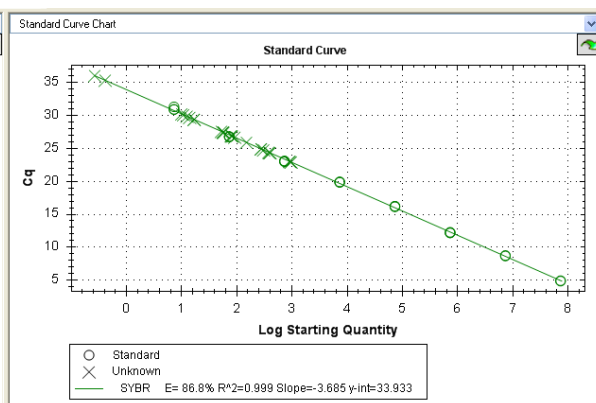
Annexe

Annexe I : Caractéristiques de la qPCR effectuée sur les échantillons compost, digestatMS, sol 4 et sol 6

A

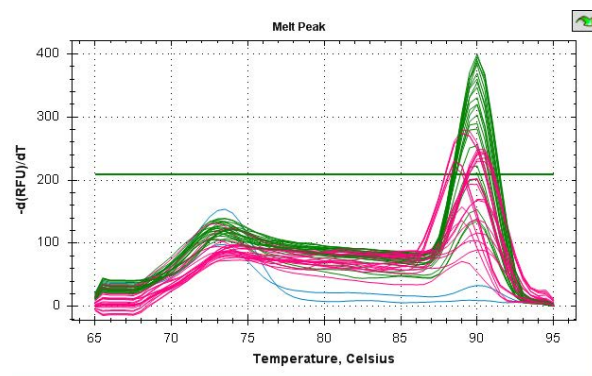


B



Courbes représentant la mesure de la fluorescence des échantillons pour chaque cycle (A) et création de la droite standard (B) Les courbes de la gamme étalon sont représentées en vert et celles des échantillons en rose.

C



Courbes de fusion. Les courbes de la gamme étalon sont représentées en vert et celles des échantillons en rose. ©