



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-theses-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>

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine
En Biologie Végétale et Forestière

Par

Aurélié DEROY

**Evolution et adaptation des champignons saprophytes : les systèmes
impliqués dans la dégradation du bois chez *Trametes versicolor***

Soutenance prévue le 06 novembre 2015

Membres du Jury :

<u>Rapporteurs :</u>	Tatjana STEVANOVIC Marie-Noëlle ROSSO	Professeur, Université Laval Quebec Directrice de recherche, INRA Aix- Marseille
<u>Examineurs :</u>	Francis MARTIN Daniel WIPF	Directeur de recherche, INRA Nancy Professeur, Université de Bourgogne
<u>Directeurs de thèse</u>	Eric GELHAYE Philippe GERARDIN	Professeur, Université de Lorraine Professeur, Université de Lorraine

Mes travaux de thèse se sont déroulés au sein de deux laboratoires de recherche :

- le laboratoire « Interactions Arbres-Microorganismes » sous la direction du Professeur Eric GELHAYE,



- le Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur le Matériau Bois sous la direction du Professeur Philippe GERARDIN,



Ces travaux ont été financés par le programme d'investissement d'Avenir,
Laboratoire d'Excellence ARBRE



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, Francis Martin, Marie-Noëlle Rosso, Tatjana Stevanovic et Daniel Wipf d'avoir accepté de lire ce manuscrit et d'évaluer mes travaux de thèse. J'adresse également un grand merci aux personnes qui ont collaboré avec moi, Stéphane Dumarcay, Zineb Kebbi-Benkader, Claude Didierjean, Frédérique Favier, Jean-Guy Berrin, David Navarro, Annegret Kohler, Emmanuelle Morin, Stéphane Uroz, Christophe Rose, Claire Fourrey, Pascal Frey et Marc Buée.

Mes plus sincères remerciements sont adressés à mes directeurs de thèse Eric Gelhaye et Philippe Gérardin qui m'ont permis de réaliser cette thèse dans de très bonnes conditions. Merci pour la confiance et la grande autonomie que vous m'avez accordées pour mener à bien ces travaux. Je vous remercie de m'avoir laissé la liberté de développer mes propres axes de recherche en m'apportant vos conseils. Merci également pour votre disponibilité. Je tiens à remercier tout particulièrement Éric, merci pour ton humanité, ton soutien et ton aide notamment lors de cette fin de thèse. Je n'oublis pas Mélanie Morel, merci pour ton aide, tes réponses à mes questions, et ta bonne humeur.

Je voudrais remercier mes collègues de ces trois dernières années : Tiphaine, Arnaud, Yann, Jérémie, Raphaël, Jean-Pierre, Jean-Michel, Rodnay, Nicolas, Fanny, Henri, Pierre-Alexandre, Jonathan, le second Nicolas et Thomas. Mention particulière à Arnaud, PA et Tiphaine qui ont rendu mes trois années de thèse plaisantes et ont fait passer le temps de la semaine rapidement en allant nous dépenser au badminton et reprendre nos calories lors de barbecues et de restos sushis. Clin d'œil à Arnaud et PA pour toutes les discussions autour de certains jeux qui nous ont bien occupées ; à Fanny et Tiphaine pour les bons moments passés lors de nos pauses canettes.

Je tiens également à remercier l'URVVC et particulièrement Christophe Clément, Richard, Sandrine, Maryline et Yann de m'avoir accueilli pour les deux derniers mois de ma thèse me permettant de finir ma rédaction et préparer mon oral dans la sérénité et la bonne humeur.

J'adresse un immense merci à mes parents qui m'ont soutenu tout au long de mes études.

Enfin mes derniers mots sont adressés à Baptiste, mon conjoint, pour son soutien pendant ces trois ans (et également ces treize dernières années passées ensemble). Merci de m'avoir épaulée et d'avoir su être patient même dans les périodes délicates. Un tout dernier merci à ma fille, Milla, qui après sa naissance, malgré le peu de sieste, a été sage et m'a permis de finir de rédiger. Pour tout votre amour, la joie et les encouragements que vous me donnez, je vous dédie cette thèse.

Abréviations

AA9 : Acitivité Auxilliare Famille 9
AAO :Aryl Alcool Oxydase
ABC : ATP Binding Cassette
ABTS: diammonium 2,2'-Azinobis-3-éthylBenzoThiazoline-6-Sulfonate
ACP : Analyse en Composante Principale
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNg : Acide DésoxyriboNucléique génomique
AOx : Aryl Alcool Déshydrogénase
ARN : Acide RiboNucléique
ATP : Adénosie Tri-Phosphate
BET : Bromure d'ETHidium
CAZy : Carbohydrate Active enZyme
CBH : CelloBioHydrolase
CBM : Carbohydrate Binding Module
CDH : Cellobioses DeHydrogénases
CDNB : 1,2-Chloro-4-DiNitroBenzène
CE : Carbohydrate esterase
CMFDA : 5 ChloroMéthylFluorescéine DiAcétate
CytP450 : Cytochrome P450 monooxygénases
DHA : DéHydroAscorbate
DMAB : Acide 3-DiMethylaminoBenzoïque
DMSO : DiméthylSulfoxyde
dNTP : désoxyriboNucléotides Tri-Phosphate
DO : Densité Optique
DTNB : 5,5'-DiThiobis-2-NitroBenzoïque
DTT : DiThioThreitol
EDTA : Éthylène Diamine Tétra Acétique
FOLy : Fungal Oxidative Lignin enzyme
GH : Glycoside Hydrolase
GHR : Glutathion Hydoquinone Réductase
GOx : Glyoxal Oxydase
GR : Glutathione Réductase
GSH : Glutathion réduit
GSSG : Glutathion oxydé
GST : Glutathion-S-Transférases ; Glutathion-Transférases
HED : Hydroxy-Ethyle Disulfide
HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance
IPTG : IsoPropyl β -D-1-ThioGalactopyranoside
ITS : Internal Transcript Spacer
JGI : Joint Genome Institute
KAc : Acétate de Potassium
LiP : Péroxydase à lignine
M-SG : Ménadione-SG
MAPEG : Membrane Associated Proteins in Eicosanoids an Glutathione metabolism
MBTH: 3-Methyl-2-BenzoThiazolinone hydrazone Hydrochloride
MDR: Multi-Drug Resistance
MEB : Microscope Electronique à Balayage

ML-SG : MénadioLe-SG
MnP : Péroxydase à Manganèse
MU : méthylUmbelliférone
MU-C : MU- β - D- Cellobioside
MU-G : MU- β - D- Glucopyranoside
MU-GU : MU- β - D- GlUcuronide hydrate
MU-X : MU- β - D- Xylopyranoside
NaAc : Acétate de Sodium
PAP-SG : PhénylAcétophénone-SG
PCR : Réaction en Chaîne de Polymérase
PDA : Potato Dextrose agar
PMO : Polysaccharides MonoOxygenases
POD : Pyranose-2-OxyDase
QR : Quinones Réductases
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
SSP : Small Secreted Protein (Petite Protéine Sécrétée)
T-SG : Tétratlone-SG
TCA : TriChloro acetic Acid
TM : Température d'hybridation
UV : Ultra Violet
VP : Péroxydase versatile

Table des matières

Remerciements.....	
Abréviations.....	p2
Table des matières.....	p4
Introduction	p10
Etat de l'art	p14
I. L'évolution et l'adaptation, deux grandes notions.....	p16
1) Quelques définitions.....	p16
2) Historique des théories.....	p16
3) Evolution des modes de vie des organismes fongiques : focus sur les écosystèmes forestiers et les saprophytes.....	p18
a. Les champignons pathogènes.....	p18
b. Les champignons mycorhiziens.....	p19
c. Les champignons saprophytes.....	p21
4) L'adaptation des champignons saprophytes.....	p24
II. Le bois et les champignons de pourritures blanches.....	p25
1) Le bois, un composé hétérogène.....	p25
a. Anatomie et organisation.....	p25
b. Composition chimique du bois.....	p28
i. Principaux polymères du bois.....	p28
ii. Les autres composés.....	p32
2) Les systèmes dégradation des agents de pourritures blanche.....	p33
a. Les systèmes de dégradation extracellulaires.....	p33
i. La dégradation de la cellulose.....	p34
ii. La dégradation des hémicelluloses.....	p38
iii. La dégradation de la lignine.....	p40
b. Les systèmes intracellulaires.....	p43
3) <i>Trametes versicolor</i>	p51
Objectifs	p54
Matériel et Méthodes	p58
I. Matériel biologique.....	p60
II. Conditions de culture.....	p61
1) Conservation des souches.....	p61
2) Milieux de culture pour les analyses.....	p61

	a. Les milieux gélosés classiques.....	p61
	b. Le milieu de culture pour l'extraction d'ADN génomique.....	p62
III.	Paramètres physiologiques et dégradation.....	p63
	1) Vitesse de croissance.....	p63
	2) Dégradation du bois et perte de masse.....	p63
IV.	Techniques de biologie moléculaire.....	p64
	1) ADN génomique.....	p64
	a. Extractions.....	p65
	b. Réaction en chaine de polymérase (PCR).....	p67
	c. Séquençage.....	p68
	2) ARN.....	p69
	a. Extraction.....	p69
	b. Purification et dosage.....	p70
	c. Transcriptomique.....	p70
	3) Protéines.....	p70
V.	Techniques de protéomique.....	p73
	1) Extraction des protéines.....	p73
	a. Les protéines de sécrétome.....	p73
	b. Les protéines de l'exsudat.....	p73
	2) Dosage protéique.....	p74
	3) Analyses LC/MS.....	p74
	4) Profil enzymatique.....	p76
	a. Précipitation des protéines.....	p76
	b. Gel d'électrophorèse (SDS-PAGE).....	p76
	c. Colorations.....	p77
VI.	Techniques biochimiques.....	p80
	1) Expression et purification de protéines.....	p80
	2) Activités enzymatiques.....	p86
	a. Les activités spécifiques des composants du bois.....	p86
	b. Fonction et paramètres catalytiques des protéines.....	p88
	i. Dosage des thiols.....	p88
	ii. Activité de déglutathionylation.....	p89
	iii. Activité de glutathionylation.....	p90

iv. Activité NADPH/GR.....	p91
3) Profil protéine-ligand.....	p92
a. Stabilité thermique.....	p92
b. Activité estérase.....	p94
4) Test de solubilité.....	p95
VII. Microscopie.....	p96
VIII. Cristallographie.....	p96
Résultats et discussion.....	p98
<u>Chapitre I : Analyse du polymorphisme du système de dégradation extracellulaire de</u> <u><i>Trametes versicolor</i> en présence de bois.....</u>	<u>p100</u>
I. Analyses du polymorphisme de <i>Trametes versicolor</i>	p100
1) Variabilité morphologique.....	p103
2) Variabilité de la vitesse de croissance.....	p105
II. Analyses du comportement des souches de <i>Trametes versicolor</i> lors de dégradation du bois par l'étude de la sécrétion d'enzymes extracellulaires.....	p107
1) Variabilité de l'activité enzymatique.....	p107
a. Etude de la dégradation du bois.....	p107
b. Etude des activités enzymatiques du sécrétome.....	p110
2) Variabilité du protéome.....	p112
III. Conclusion.....	p121
<u>Chapitre II : Analyse de la diversité des glutathion-S-transférases (GST) chez</u> <u><i>Trametes versicolor</i>.....</u>	<u>p126</u>
I. Phylogénie des GST.....	p127
II. Etude de l'extension de la classe de GST Oméga.....	p130
1) Caractérisation des GSTO de <i>Trametes versicolor</i>	p130
2) Interaction protéines-ligands.....	p134
III. Adaptation de la classe GHR.....	p140
IV. Conclusion.....	p147
<u>Chapitre III : Etude du phénomène d'exsudation chez une souche de <i>T. versicolor</i>...</u>	<u>p150</u>
I. Souche sécrétrice d'exsudat.....	p150
II. Caractérisation de l'exsudat.....	p153
III. Conclusion.....	p167

Conclusion générale et perspectives.....	p172
I. Adapataion de <i>T. versicolor</i> , caractéristiques d'un polymorphisme intraspécifique.....	p174
II. Evolution de <i>T. versicolor</i> , caractéristiques de deux classes de GST.....	p183
III. Perspectives appliquées à long terme.....	p187
Références bibliographiques.....	p192
Annexes.....	p212
Publications.....	p246
Résumé et abstract.....	

Introduction

Le bois représente une des ressources en polymère les plus abondantes de l'écosystème terrestre. Il est très utilisé comme matériau notamment pour ses propriétés mécaniques ainsi que calorifiques. Il est employé dans divers domaines tels que le bâtiment, l'industrie (papeterie, chimique...). Comme tout matériau naturel, il est soumis à des contraintes environnementales, stress abiotiques et biotiques. Parmi les organismes xylophages, les champignons dégradant la matière lignocellulosique jouent un rôle important dans le cycle du carbone. Les champignons saprophytes et notamment ceux de la classe des Agaricomycota sont particulièrement intéressants puisque certains comme *Trametes sp*, *Phanerochaete sp* ou encore *Coriolopsis sp* possèdent la capacité de dégrader la totalité des composés du bois grâce à un système enzymatique extracellulaire adapté (Guillén et al., 2005; Sánchez, 2009). Celui-ci confère à ces champignons un fort intérêt au niveau biotechnologique tel que la production d'enzymes pour la synthèse de bioéthanol ou encore le rôle qu'elles pourraient jouer dans l'industrie papetière par exemple. Ces champignons possèdent également un système intracellulaire de détoxification impliqué dans l'élimination des composés potentiellement toxiques générés lors de la dégradation du bois mais aussi tous autres composés xénobiotiques. Les enzymes impliquées dans la détoxification quant à elles présentent un grand intérêt en bioremédiation par exemple (Marco-Urrea et al., 2009; Zhang et al., 2013). En effet certains champignons comme *Cunninghamella bainieri*, possèdent la capacité de métaboliser des molécules toxiques comme l'anisole ou le naphthalène. Ces deux systèmes impliqués dans la dégradation du bois notamment chez les Agarycomycatina font de ces champignons des modèles d'étude intéressants pour comprendre l'adaptation de ces champignons à leur environnement.

Dans l'optique de comprendre l'évolution des organismes, il est important de pouvoir étudier ces systèmes tant d'un point de vue phénotypique que génotypique. L'organisation des génomes actuels est le résultat de l'accumulation d'événements qui se sont produits au cours de l'évolution. Les gènes impliqués dans la dégradation font partie de familles multigéniques de tailles variables résultant principalement d'évènements de duplication et de divergence à partir d'un gène ancestral (Lynch, 2000; Ohno, 1970). L'expansion de ces gènes a induit une augmentation du nombre d'enzymes impliquées dans les systèmes extracellulaires lignolytiques ou encore ceux de détoxification chez les champignons décomposeurs. L'évolution des génomes et donc

l'agrandissement des familles multigéniques semble jouer un rôle dans l'adaptation de ces organismes face à leur environnement et amène à la notion de néofonctionnalisation. En effet, les nouvelles copies de gènes engendrées par l'évolution peuvent être soumises à des mutations, celles-ci apportant de nouvelles fonctions. Cette grande diversité est également en corrélation directe avec la grande hétérogénéité du bois. Il n'est donc pas surprenant que les champignons décomposeurs du bois aient développé d'une part une palette très importante d'enzymes extracellulaires pour atteindre leur source de nutriments et d'autre part un très grand nombre d'enzymes intracellulaires de détoxification afin de palier au problème de toxicité de certaines molécules du bois. Dans le système de détoxification, les glutathion-transférases (GST) sont des enzymes multifonctionnelles ayant évoluées à partir d'un ancêtre commun. Les gènes codant les GST sont majoritairement regroupés en clusters suggérant des mécanismes évolutifs communs ayant conduit à une extension et à une variabilité de cette famille d'enzymes. Cette grande diversité pourrait rendre compte de l'adaptation des champignons à leur environnement. Mon travail avait pour but la compréhension de l'adaptation des champignons saprophytes à leur environnement par le biais de l'étude de leurs systèmes impliqués dans la dégradation du bois chez un représentant de la classe des Agaricomycota : *Trametes versicolor*.

Mes travaux de thèse s'inscrivent au sein du projet SYMWOOD, projet financé par le programme Investissement d'Avenir, laboratoire d'excellence ARBRE (ANR-11-LABX-0002-01). SYMWOOD a pour but d'étudier par génomique comparative et biochimie les mécanismes fongiques impliqués dans la symbiose mycorhizienne et les processus de décomposition du bois. Mon étude s'est déroulée au sein de deux unités : l'unité mixte UMR1136 « Interactions Arbres/Microorganismes » travaillant sur la compréhension du rôle des microorganismes au sein des écosystèmes forestiers, et l'unité UMR « Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur le Matériau Bois » étudiant le bois en tant que matériau, source d'énergie et matière première pour l'industrie chimique. Les différentes approches de génomique, de protéomique, de biochimie et de microbiologie mises en œuvre au sein de l'équipe « Réponse au stress et régulation redox » m'ont permis de mieux comprendre les facteurs impliqués dans l'adaptation du champignon à son environnement.

Etat de l'art

I. L'évolution et l'adaptation, deux grandes notions

1) Quelques définitions

L'adaptation se définit comme l'ensemble des modifications d'un organisme provoquées par un changement de son environnement. Les mots adaptation et évolution ne sont pas synonymes. Ce sont deux notions étroitement liées. L'adaptation dans l'une de ses définitions n'est pas forcément héréditaire et cela contrairement à l'évolution qui implique la notion de génétique, de transmission et cela dans des délais allant de quelques centaines à plusieurs milliers d'années. De plus l'évolution n'est pas forcément adaptative. En biologie évolutive, les termes adaptation et évolution se confondent. On utilise le mot adaptation pour parler d'un état nouveau, d'un caractère qui améliore la survie de l'individu et également celle de la population grâce à la reproduction et à la transmission des caractères héréditaires.

Tout au long de cette thèse, j'emploierai le mot adaptation pour parler d'évolution adaptative. La notion d'évolution adaptative signifie une modification du pool génétique d'une espèce au cours du temps liée aux pressions exercées par son milieu.

2) Historique et théories

L'évolution prend naissance à l'origine de la vie vers -3,8 milliards d'années. L'hypothèse posée est que les formes de vie se diversifient à partir d'un ancêtre commun universel. De tous temps, l'Homme recherche l'explication à la diversité du vivant. Les premières traces écrites sur ce sujet sont retrouvées dès l'antiquité avec les philosophes grecs comme Epicure, Lucrèce... (Carus and Creech, 1754; Grassé, 2012). Cependant à cette époque et durant de nombreuses années la théorie prédominante acceptée est le fixisme ou le créationnisme (Buican and Grimoult, 2011; Kupiec, 1999). Cette théorie est basée sur les pensées religieuses émettant l'hypothèse qu'il n'y a aucune transformation des espèces vivantes. Au XVIII^{ème} siècle, certains chercheurs émettent à nouveau l'hypothèse de l'évolution. C'est le cas de Pierre Louis Moreau de Maupertuis, précurseur

de la génétique qui s'intéresse fortement à l'hérédité (Ostoya, 1954). Il faudra néanmoins attendre le XIX^{ème} siècle pour que des théories sur l'évolution se développent et commencent à être acceptées. Le précurseur qui élabore des théories sur les êtres vivants a été Jean-Baptiste Lamarck (Burkhardt, 1972; Vandel, 1960). En 1859, le concept d'évolution est réellement introduit en biologie avec Charles Darwin et son livre « de l'origine des espèces » (Darwin, 1859). Il expose ainsi la théorie de l'évolution basée sur le mécanisme de la sélection naturelle (Williams, 2008). De là née la définition de l'adaptation où les espèces évoluent en permanence et transmettent à leurs descendances les caractères héréditaires nécessaires à la survie de l'espèce. Au début du XX^{ème} siècle, les travaux de génétique de Mendel (Bateson and Mendel, 1902) posent les principes de l'hérédité et viennent appuyer certaines théories de Darwin. En 1940, un lien est fait entre les deux théories, darwinienne et mendélienne, par Dobzhansky et Mayr (Dobzhansky, 1940; Mayr, 1970; Mayr and Dobzhansky, 1945) grâce notamment au progrès de la biologie moléculaire et la découverte de l'ADN (Morange, 2006). Celui-ci amène à une nouvelle théorie appelée théorie synthétique de l'évolution ou néodarwinisme. Elle se base sur le phénomène de sélection naturelle.

L'évolution des espèces est permise grâce à divers processus qui tendent à modifier les allèles au sein d'une population. Trois processus majeurs interviennent : la mutation, qui est une modification de l'information génétique au niveau de la séquence de l'Acide DésoxiriboNucléique (ADN) ; le flux de gènes, qui est un échange de gènes entre des populations apparentées ; et le brassage génétique, basé sur la recombinaison de gènes et la reproduction. Tous ces phénomènes sont à l'origine du polymorphisme, c'est à dire la coexistence de plusieurs allèles pour un gène dans au moins 1% des individus d'une même espèce. Comme toute théorie, bien que prédominante dans le monde de la biologie, la théorie de l'évolution connaît des controverses. Le débat se porte sur la notion de sélection naturelle et donc d'évolution dite adaptative. Des théories comme le neutralisme ont été également proposées (Huneman, 2006; Plutynski, 2004). Cette théorie voit le jour en 1970 par le généticien Crow qui émet l'hypothèse que l'évolution est une réponse autant due au hasard, dérive génétique, qu'à la sélection naturelle (Crow et al., 1970).

A l'heure actuelle le développement de nouvelles techniques permet de mieux comprendre les phénomènes d'adaptation, phénomènes qui restent néanmoins controversés de nos jours du fait de leur grande complexité.

3) Evolution des modes de vie des organismes fongiques : focus sur les écosystèmes forestiers et les saprophytes

L'évolution est un processus graduel chez tous les êtres vivants. L'hypothèse est que les organismes descendent du même ancêtre commun, être unicellulaire, qui a évolué avec le temps. Ils sont séparés en différents règnes (Bonnet and Lecointre, 2008; Woese and Fox, 1977) : les bactéries (procaryotes avec histones), les archaeobactéries (procaryotes sans histone), les protistes (eucaryotes unicellulaires), les mycètes (eucaryotes multicellulaires hétérotrophes), les végétaux et les animaux. Le règne des mycètes est très étendu avec environ 100000 représentants connus à l'heure actuelle. Il existe différentes classes, séparant les organismes selon différents critères : phénotypiquement grâce par exemple aux critères morphologiques et de plus en plus génétiquement grâce à l'évolution des techniques d'études de l'ADN.

Dans les écosystèmes, ensemble de communautés vivant en étroite relation au sein d'un même territoire comprenant arbres, plantes, animaux, insectes, champignons et bactéries (Van Dyne, 2012), la biodiversité est l'héritage de l'histoire évolutive. Ces réseaux complexes interagissent en permanence et impliquent donc l'adaptation des espèces vivantes au changement de leur environnement (Bengtsson et al., 2000; Jones et al., 1994). Chaque communauté vivant au sein de chaque écosystème forestier évolue en interdépendance avec les autres ce qui en fait un réseau très complexe. Les arbres s'adaptent aux changements biotiques et abiotiques impliquant ainsi l'adaptation des organismes les côtoyant et en particulier ceux ayant une relation directe comme les organismes fongiques. En fonction de l'évolution de leur mode de vie, nous distinguons trois grands groupes chez les organismes fongiques : les pathogènes, les mycorhiziens et les saprophytes.

a. Les champignons pathogènes

Les champignons pathogènes sont des organismes fongiques ayant la capacité à infecter un hôte et causer une maladie puis sa mort (Pariaud et al., 2009; Van der Plank, 1968). Trois groupes peuvent être distingués : les nécrotrophes, les biotrophes et les hémibiotrophes (Figure 1).

Les organismes nécrotrophes tel que l'esca de vigne sont des champignons qui, par la sécrétion d'enzymes et de toxines, vont dans un premier temps tuer les cellules de l'hôte puis exploiter les tissus morts pour leur développement (Tivoli et al., 2006).

Les biotrophes vont coloniser les cellules vivantes de l'hôte et détourner la machinerie cellulaire de la plante pour puiser les apports en carbone nécessaires à leur croissance. Ces champignons vont causer des maladies comme la rouille du peuplier (*Melampsora sp.*) (Rinaldi et al., 2007).

Les hémibiotrophes sont quant à eux des organismes à la frontière des nécrotrophes et des biotrophes. En effet, ils vont dans un premier temps coloniser et exploiter les cellules vivantes de l'hôte puis dans un second temps passer à une phase de nécrotrophie (Perfect and Green, 2001).



Figure 1 : Exemple de maladies fongiques causées par des champignons pathogènes.
(a) Esca de la vigne (<http://www.agrisalon.com>), (b) Rouille du peuplier (<https://www.flickr.com>)
et (c) Nécrose du collet du colza (<http://www7.inra.fr>).

b. Les champignons mycorhiziens

Les organismes fongiques mycorhiziens sont des organismes ayant établi une symbiose avec une plante, plus précisément ses racines. Ces champignons colonisent les plantes afin de pouvoir en tirer des bénéfices tels que la source carbonée pour leur nutrition. La plante quant à elle va aussi pouvoir tirer avantage de cette association grâce à l'apport par le champignon de nutriments comme le phosphore ou encore l'azote. Lors de l'établissement de la symbiose, de nombreux processus sont mis en place afin de ne pas induire les défenses de l'hôte et donc de pouvoir établir l'association (Kosuta et al., 2003; Martin et al., 1994). Les champignons mycorhiziens peuvent être

divisés en 3 grands groupes : les endomycorhiziens, les ectendomycorhiziens et les ectomycorhiziens. (Harley and Harley, 1987) (Figure 2).

Les endomycorhiziens représentent 90% des mycorhizes. Afin d'établir l'association avec l'hôte, le champignon va pénétrer dans les cellules racinaires de la plante hôte. Ils sont capables de coloniser des espèces ligneuses comme le peuplier ou encore l'eucalyptus. Des hyphes se développent à l'intérieur du cortex racinaire (Requena et al., 2007) permettant un échange entre les deux partenaires et également à l'extérieur pour explorer le sol.

Les ectendomycorhiziens sont assez rares et inconnus au niveau des arbres. Ils pénètrent à l'intérieur des cellules racinaires mais forment également un manchon périphérique autour de la racine comme les ectomycorhizes.

Les ectomycorhiziens sont des champignons établissant une symbiose avec des arbres comme le pin, le peuplier, le chêne... Ils ne pénètrent pas à l'intérieur de la cellule racinaire mais se développent autour des cellules végétales formant un manchon périphérique et entre les cellules formant un réseau appelé réseau de Hartig (Prévost and Pargney, 1995).

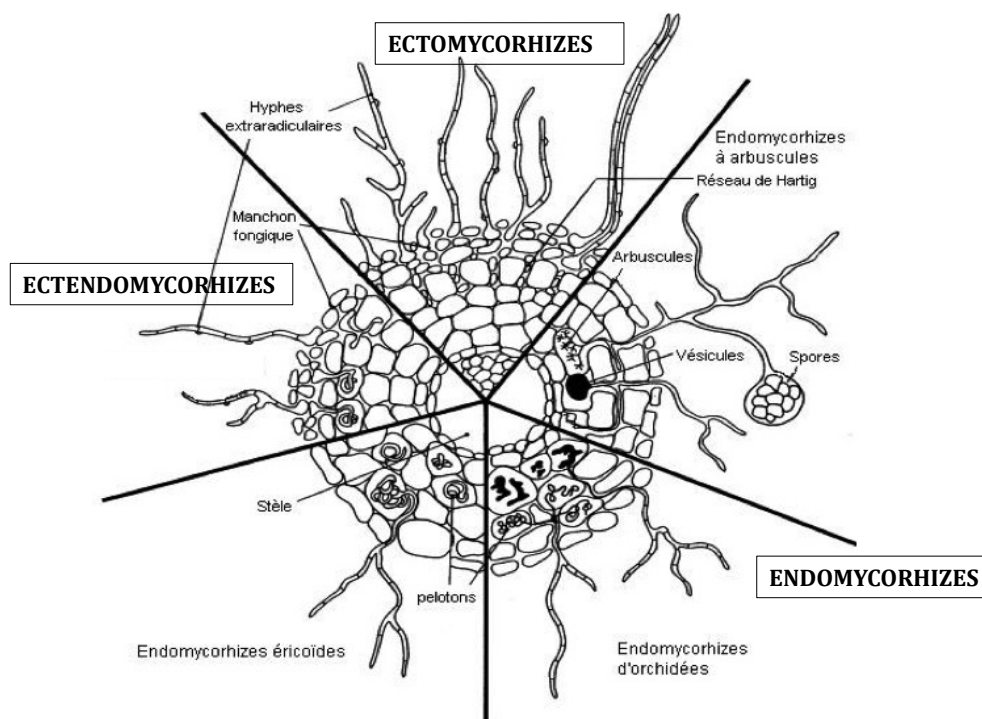


Figure 2 : Les différents types de mycorhizes Visualisation des ectomycorhizes formant un manchon autour des cellules végétales, des endomycorhizes à l'intérieur des cellules et des ectendomycorhizes pénétrant dans les cellules et formant également un manchon autour de celles-ci (Selosse and Le Tacon, 1998).

c. Les champignons saprophytes

Les organismes saprophytes sont par définition des organismes capables de se nourrir de matière organique non vivante en décomposition. Les champignons saprophytes sont les principaux décomposeurs microbiens du bois dans les écosystèmes forestiers et jouent de ce fait un rôle très important dans le cycle du carbone. Ils assurent leur nutrition par digestion des constituants du bois (Sánchez, 2009; Schmidt, 2006) aboutissant à la perte des propriétés mécaniques et esthétiques de celui-ci. Le mycélium des champignons se développe dans les vaisseaux du bois entraînant sa destruction. Ces champignons lignolytiques peuvent être divisés en trois groupes fonctionnels suivant leur mode de dégradation avec : les champignons de pourritures molles, de pourritures brunes et de pourritures blanches.

Les agents de pourritures molles appartiennent principalement à la famille des Ascomycètes et Deutéromycètes. Ces pourritures sont retrouvées généralement sur bois de feuillus humide. Ils dégradent la cellulose, les hémicelluloses et partiellement la lignine rendant le bois noirâtre et très friable (Eriksson et al., 1990). Deux types de pourriture molle sont distingués (Blanchette, 2000; Blanchette et al., 2004) : le type I formant des cavités cylindriques dans la paroi secondaire et le type II entraînant une érosion de la paroi secondaire (Figure 3).

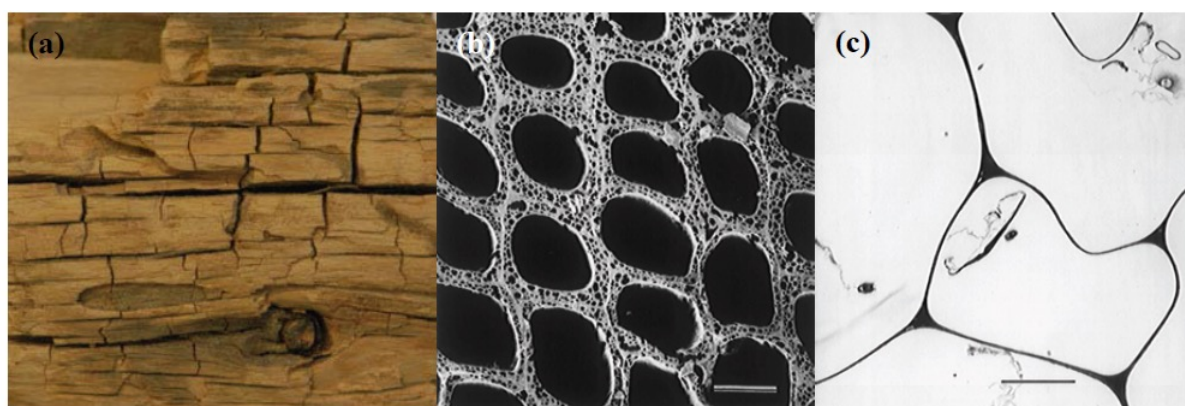


Figure 3 : Représentation du bois suite à l'attaque de pourriture molle à différentes échelles. (a) Vue macroscopique d'un morceau de bois attaqué par un agent de pourriture molle, (b) Vue microscopique de pourriture molle de type I montrant les cavités dans les parois secondaires des cellules du bois (barre = 50µm). (c) Vue microscopique de pourritures molles de type II ne laissant que la lamelle moyenne intacte par érosion de la paroi secondaire (barre = 5µm). (Blanchette, 2000).

Les agents de pourriture brune ou aussi appelés pourritures cubiques à cause de l'aspect du bois dégradé (Figure 4) sont majoritairement des Basidiomycètes et quelques Ascomycètes. Ils dégradent la cellulose et les hémicelluloses et sont retrouvés généralement sur les résineux (Schwarze et al., 2000). La lignine est partiellement modifiée par ces organismes. L'action de ces agents de dégradation confère au bois une couleur sombre (Kirk and Highley, 1973; Yelle et al., 2008).

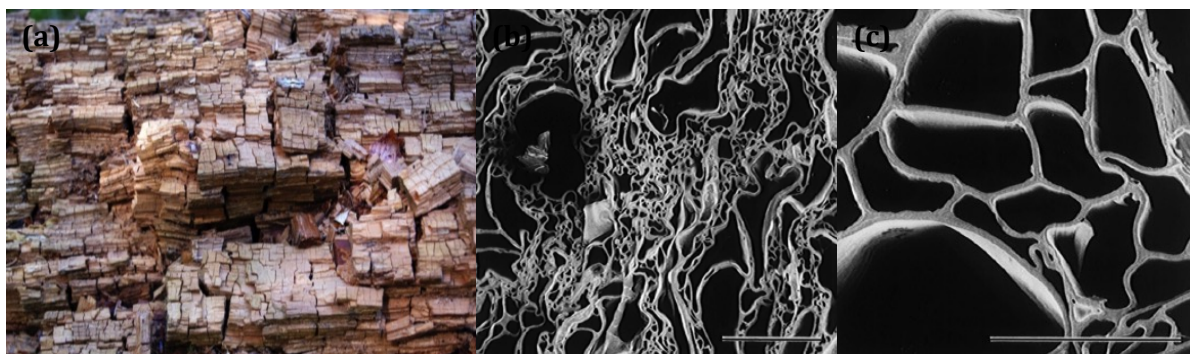


Figure 4 : Représentation du bois suite à l'attaque de pourriture brune à différentes échelles. (a) Vue macroscopique montrant l'aspect cubique de la dégradation d'un morceau de bois suite à l'attaque d'un agent de pourriture brune, (b) Vue microscopique, réseau résiduel de lignine suite à la dégradation de la cellulose (barre = 100µm). (c) Vue microscopique de la paroi poreuse. (Blanchette, 2000)

Les agents de pourritures blanches appartiennent à la famille des Basidiomycètes et sont les seuls microorganismes à posséder la capacité à dégrader la totalité des constituants du bois : la cellulose, les hémicelluloses et surtout le composé le plus récalcitrant, la lignine (Del Rio et al., 2002). Les hyphes de ces champignons envahissent rapidement la lumière des cellules du bois et causent l'érosion de la paroi cellulaire. Lors de sa dégradation, le bois va se ramollir et se décolorer progressivement pour laisser apparaître une couleur blanchâtre (Figure 5). La vitesse de dégradation varie selon les espèces et selon l'essence (Skyba et al., 2013). Selon la nature du polymère attaqué, deux types de dégradation peuvent être distingués (Kirk and Cullen, 1998) : la « dégradation simultanée » où la cellulose, les hémicelluloses et la lignine vont être dégradées en même temps (comme pour *Trametes versicolor*) et la « dégradation sélective » où les hémicelluloses et la lignine vont être dégradées en premier lieu provoquant un processus de délignification (comme pour *Ceriporiopsis subvermispora*). Il existe également des champignons comme *Heterobasidion annosum* capables de faire les deux types de dégradation.



Figure 5 : Représentation du bois suite à l'attaque de pourriture blanche à différentes échelles. (a) Vue macroscopique d'un morceau de bois présentant un aspect fibreux suite à l'attaque d'un agent de pourriture blanche, (b) Vue microscopique de la paroi, montrant une dégradation de tous les composants, érosion progressive à partir de la paroi secondaire (barre = 100µm). (Blanchette, 2000)

Le schéma évolutif de ces organismes fongiques montre que les trois grands groupes : pathogènes, mycorhiziens et saprophytes ont évolué les uns par rapport aux autres selon un continuum (Veneault-Fourrey and Martin, 2011) (Figure 6). Les organismes fongiques auraient évolués à partir d'un ancêtre commun, champignon de pourriture blanche. L'évolution aurait alors donnée naissance aux champignons de pourriture brune. Les mycorhiziens auraient perdu certaines capacités des champignons saprophytes au profit d'autres pour l'établissement de la symbiose. De là, serait ensuite apparu les pathogènes.

Ce schéma d'évolution pourrait même être en réalité une boucle et non un axe. Il est vrai que la frontière entre ces différents organismes n'est pas si évidente. Cependant certains de ces champignons ont gardé les capacités saprophytiques comme *Cortinarius sp.* (Lindahl and Tunlid, 2015). Dans l'autre sens évolutif, certaines mycorhiziens auraient évolué à partir de pathogènes tel que *H. oryzae* (Xu et al., 2014). Nous pouvons également considérer que certains pathogènes sont très proches du saprophytisme, cas des nécrotrophes tout particulièrement qui ont besoin de tuer les cellules vivantes de l'hôte pour se développer.

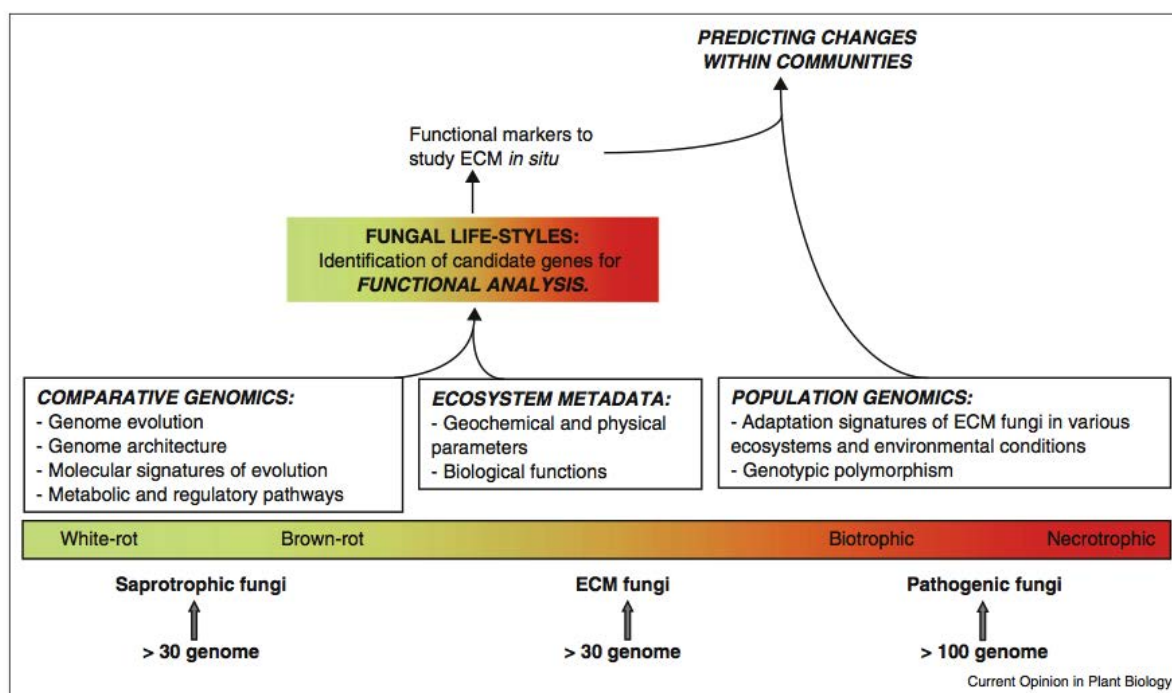


Figure 6 : Continuum évolutif des différents modes trophiques des organismes fongiques. (Veneault-Fourrey et Martin, 2011)

4) L'adaptation des champignons saprophytes

Les champignons saprophytes sont comme tous les êtres vivants adaptés à leur environnement (Giraud et al., 2010; Gladieux et al., 2015). Au niveau adaptation, nous pouvons distinguer deux grands types : l'adaptation interspécifique et l'adaptation intraspécifique.

L'adaptation interspécifique est définie comme l'adaptation de plusieurs organismes d'espèces différentes à un même environnement. Par exemple, *Phanerochaete chrysosporium* et *Trametes versicolor*, deux espèces de pourriture blanche ont la capacité de dégrader le hêtre (Valmaseda et al., 1990).

L'adaptation intraspécifique est définie quant à elle comme l'adaptation au sein d'une même espèce de plusieurs organismes à plusieurs environnements. Chez *Trametes versicolor*, des individus peuvent être trouvés sur plusieurs essences de bois différentes comme le chêne, le hêtre, le pommier... et également dans diverses zones géographiques telle que la Norvège, la France, le Japon...

L'environnement (source de carbone, température, ensoleillement...) influence les espèces et force donc celles-ci à s'adapter au sein de leur différentes classes mais également au sein d'une espèce spécifique. L'étude de ces adaptations est d'autant plus complexe que le nombre de facteurs à prendre en compte est important.

II. Le bois et les champignons de pourritures blanches

1) Le bois, un composé hétérogène

a. Anatomie et organisation

Le bois est un matériau naturel et constitue l'un des plus abondants biopolymères terrestres. Il est très apprécié dans divers domaines tels que le bâtiment, l'industrie (papeterie, chimie,...) et en tant que combustible. Le bois, aussi appelé xylème secondaire est un ensemble de tissus dont les parois se lignifient. Il est issu de la croissance du cambium périphérique qui induit le développement de l'arbre sous forme de cernes (Schweingruber, 1988) (Figure 7).

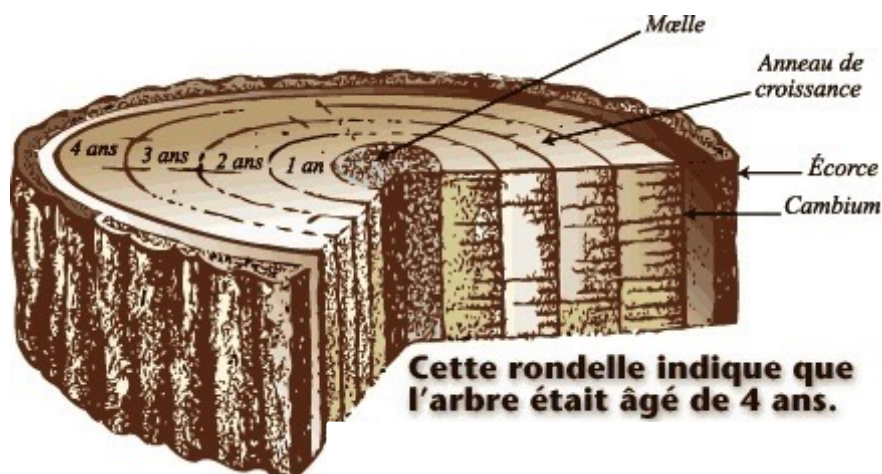


Figure 7 : Illustration de la structure macroscopique d'un arbre avec la croissance sous forme de cernes annuels. (<http://www.solifor.ca>).

Au niveau cellulaire, les cellules ligneuses possèdent une paroi primaire qui forme avec la lignine un réseau irrégulier aux propriétés élastiques et d'une paroi secondaire elle-même constituée de trois couches contenant chacune en proportion variable cellulose, hémicelluloses et lignine. Ces cellules ligneuses sont reliées entre elles par une lamelle moyenne ce qui permet leur assemblage en tissus (Figure 8).

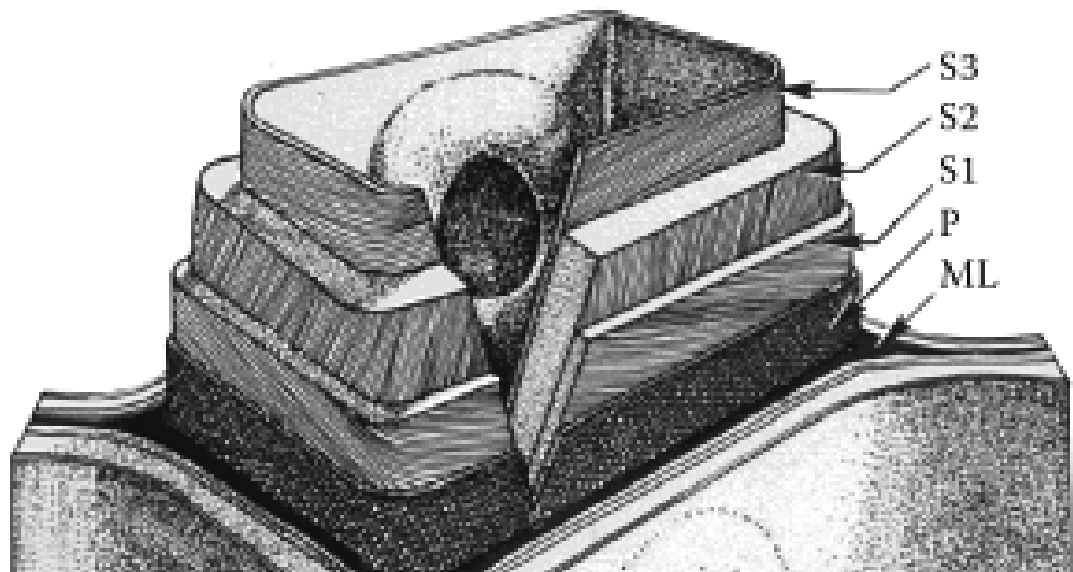


Figure 8 : Représentation schématique de l'organisation de la paroi de l'arbre.
ML = Lamelle moyenne, P = Paroi primaire et S1,S2,S3 = Couches formant la paroi secondaire.
(Rowell, 2012)

Les cellules s'organisent en microfibrilles reliées entre elles par les hémicelluloses *via* des liaisons hydrogène, elles-mêmes reliées à la lignine par des liaisons ester ou éther (Bidlack et al., 1992) (Figure 9).

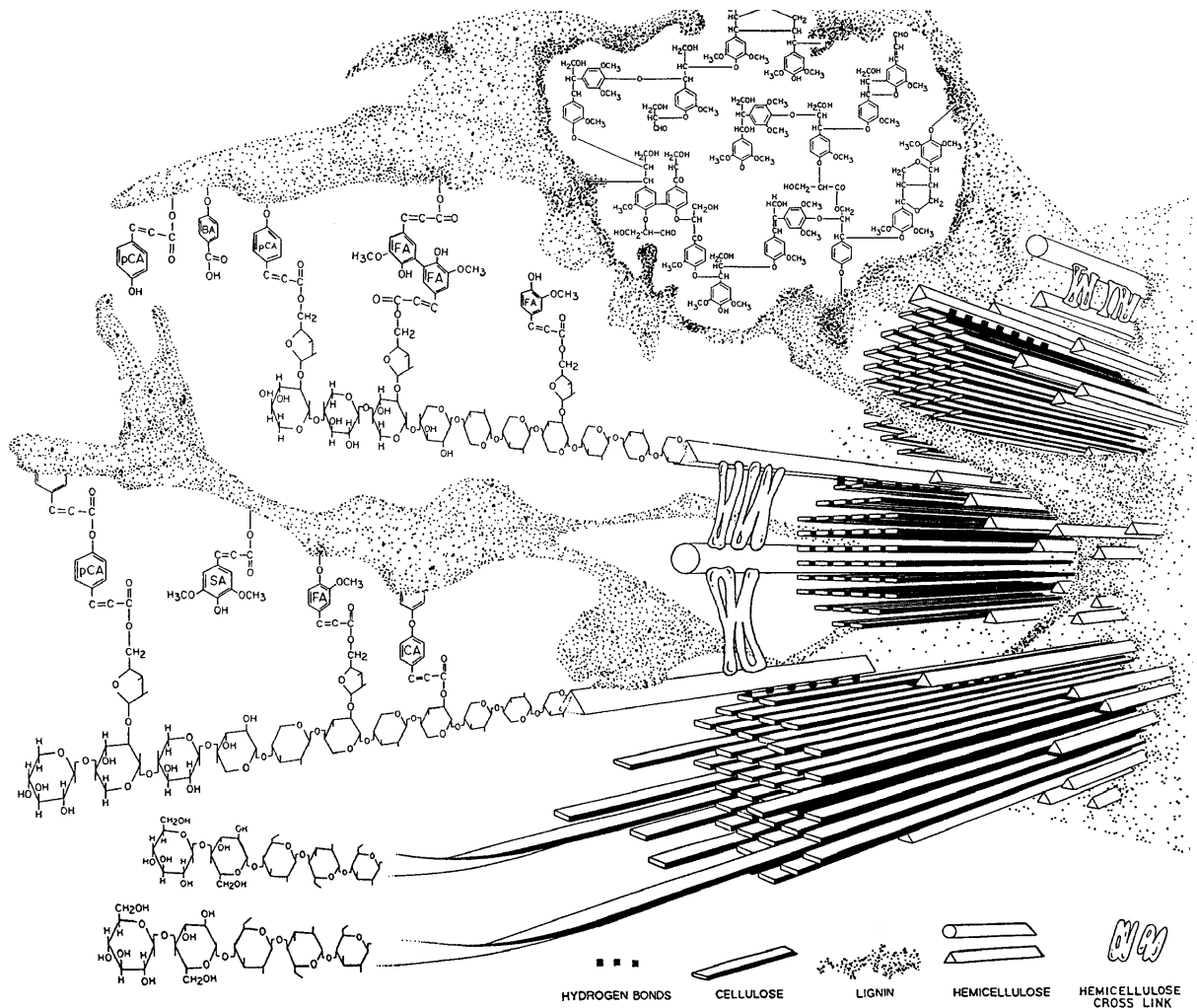


Figure 9 : Structure de la paroi secondaire des végétaux montrant l'organisation des différents constituants de la paroi, cellulose, hémicelluloses et lignine. (Bidlack et al., 1992)

Deux types d'essences forestières, feuillus et résineux, peuvent être définis grâce à leurs caractéristiques cellulaires au niveau microscopique.

b. Composition chimique du bois

La paroi des végétaux est constituée de trois polymères majeurs : la cellulose, les hémicelluloses et la lignine en quantité variable selon les essences : feuillus et résineux. Il existe d'autres polymères complexes tels que la pectine. Sont également présent des composés de faible masse moléculaire appelés extractibles (Kubicek, 2012; Pu et al., 2011) (Figure 10).

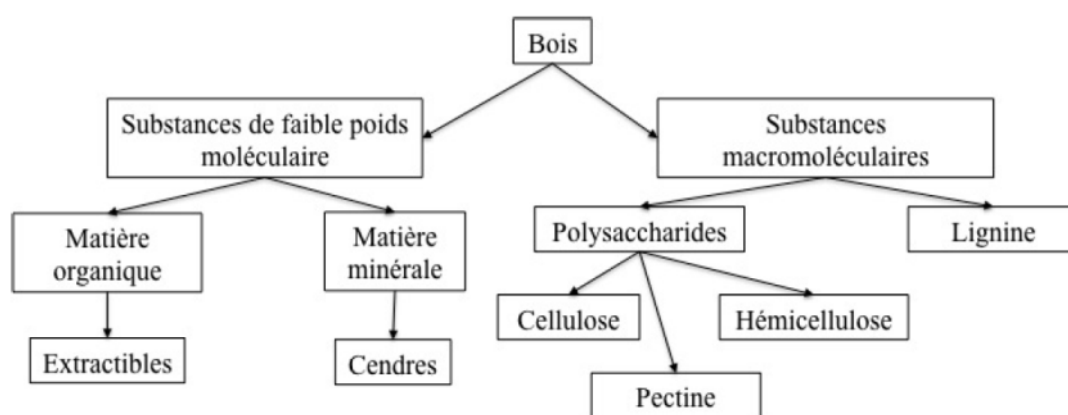


Figure 10 : Constituants chimiques du bois différenciés en fonction de leur taille : les molécules de faible masse moléculaire et les macromolécules (Pereira et al., 2009)

i. Principaux polymères du bois

La cellulose est le polysaccharide le plus abondant de l'écosystème représentant entre 40 et 55% de la matière sèche du bois. C'est un polymère linéaire (Figures 11 et 12) composé de résidus de β -D glucopyranosyl liés en β -(1,4), dont l'unité de base est la liaison de deux pyranes formant ainsi le cellobiose (Hallac and Ragauskas, 2011). Les chaînes de cellulose s'organisent en microfibrilles grâce à des liaisons hydrogène avec des zones ordonnées dites cristallines et des zones moins ordonnées dites amorphes (Festucci-Buselli et al., 2007).

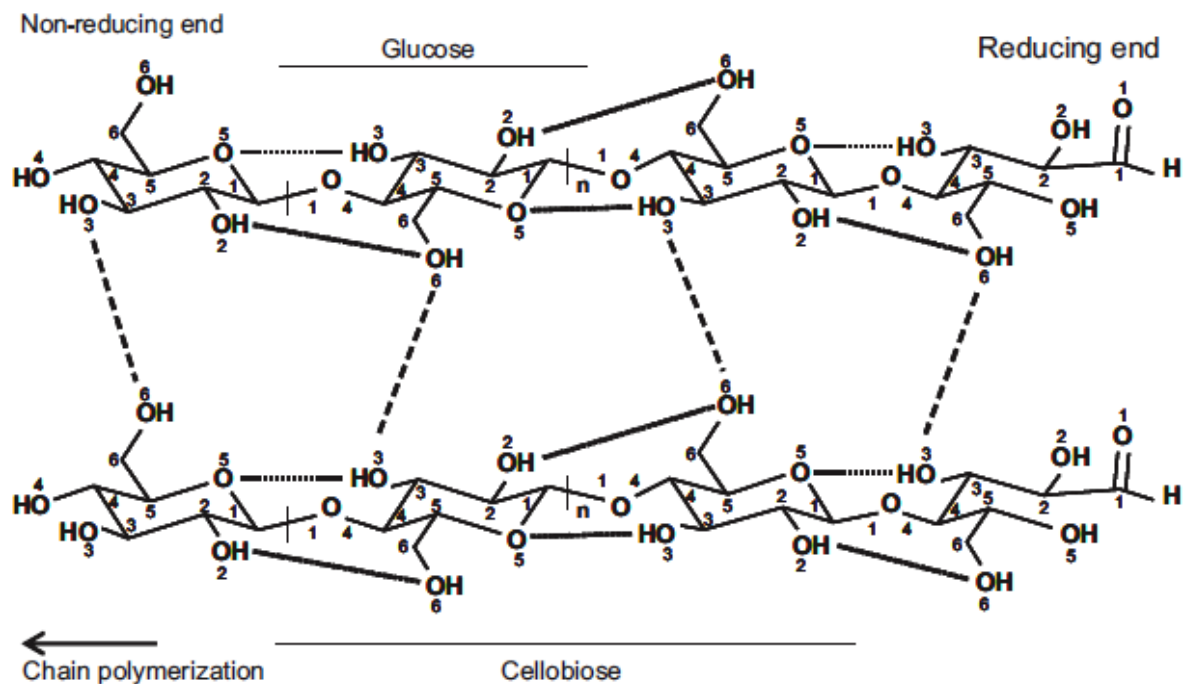


Figure 11 : Structure chimique de la cellulose. Monomères de glucose reliés par des liaisons β -(1,4) formant un polymère linéaire de cellulose. Ceux-ci sont reliés entre eux par des liaisons hydrogène formant ainsi la structure fibreuse de la cellulose.

Trait continu = liaison hydrogène intra-chaines. Trait pointillé = liaison hydrogène inter-chaines.
(Festucci-Buselli et al., 2007)

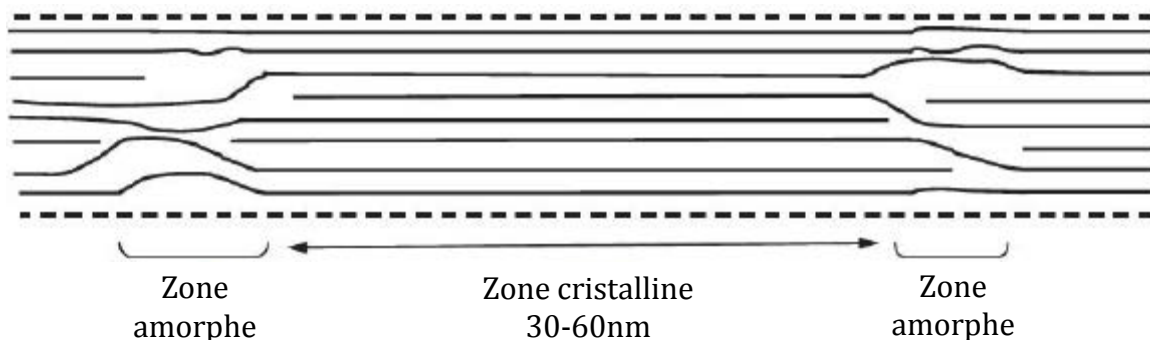
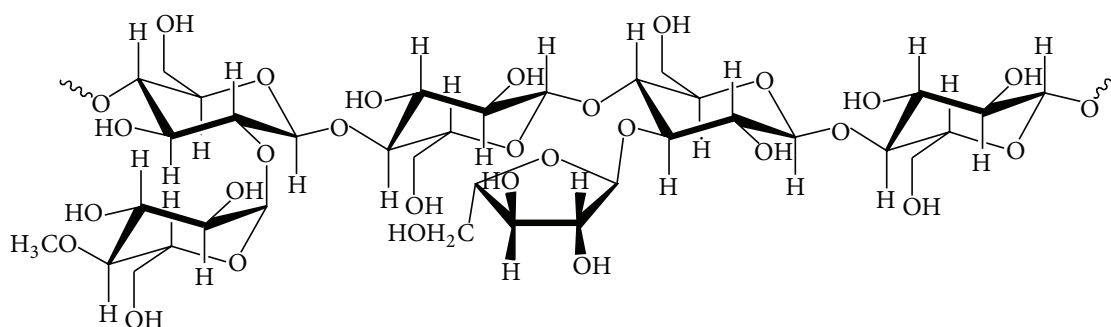


Figure 12 : Représentation schématique de l'organisation des régions cristallines et amorphes d'une microfibrille de cellulose. (Pereira, 2009)

Les hémicelluloses, hétéro-polysaccharides, présentent une chaîne principale d'oses de nature variée pouvant être ramifiés. La chaîne principale est généralement un homopolymère mais peut dans certains cas être un hétéropolymère. Les résineux et feuillus se distinguent entre eux notamment par leur composition et la nature de leurs hémicelluloses (Jeffries, 1994). En effet chez les feuillus, les osides types xylanes sont les plus représentés par contre les mannanes sont les plus présents chez les résineux. (Pandey, 1999) (Figure 13). Les hémicelluloses interagissent avec les différents composés de la paroi, par des liaisons hydrogène avec les microfibrilles de cellulose et des liaisons covalentes avec la lignine par exemple, ce qui leur confèrent une fonction importante au niveau de l'intégrité de la paroi.

(i) Xylan



(ii) Glucomannan

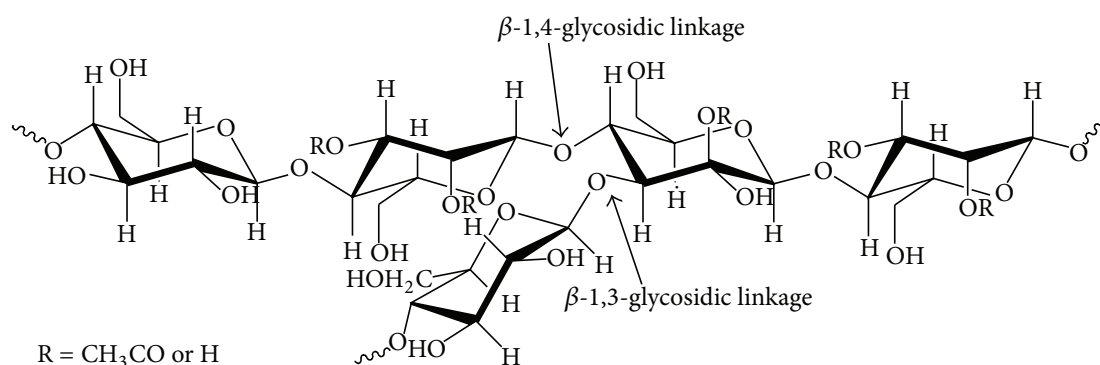


Figure 13 : Structure chimique des deux types d'hémicelluloses les plus abondantes.
(i) Type xylane plus présent chez les feuillus. (ii) Type mannane plus présent chez les résineux.
 (Lee et al., 2014)

La lignine est le troisième polymère principal du bois. C'est un polymère polyphénolique issu de trois précurseurs, l'alcool-p-coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique (Vanholme et al., 2010) dont les unités sont connues respectivement sous le nom de p-hydroxyphényle (H), guaiacyle (G) et syringyle (S) (Figures 14 et 15). La composition des différentes unités varie en fonction des essences. Les résineux sont principalement composés d'unité G avec un faible taux d'unités H alors que les feuillus sont plus hétérogènes (Wong, 2009). La lignine est un composant très résistant qui grâce à des interactions avec la cellulose et les hémicelluloses confère à la plante son port structural et une tolérance aux différents facteurs environnementaux biotiques ou abiotiques.

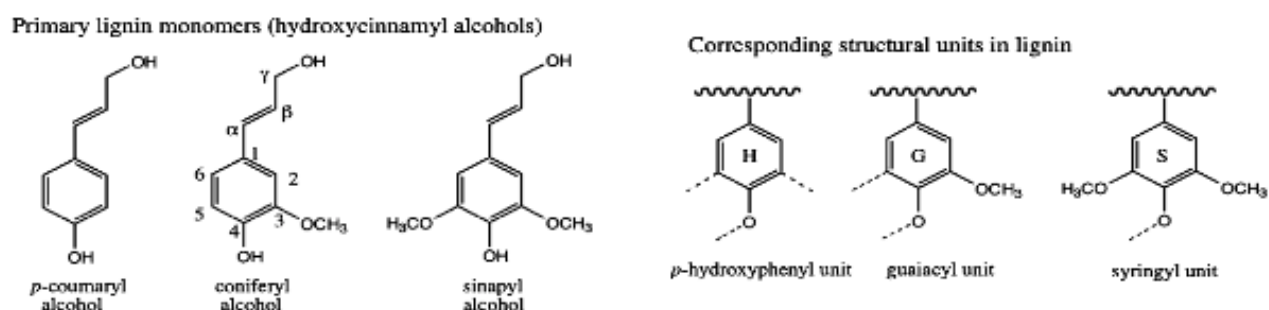


Figure 14 : Précurseur primaire de la lignine. (Wong, 2009)

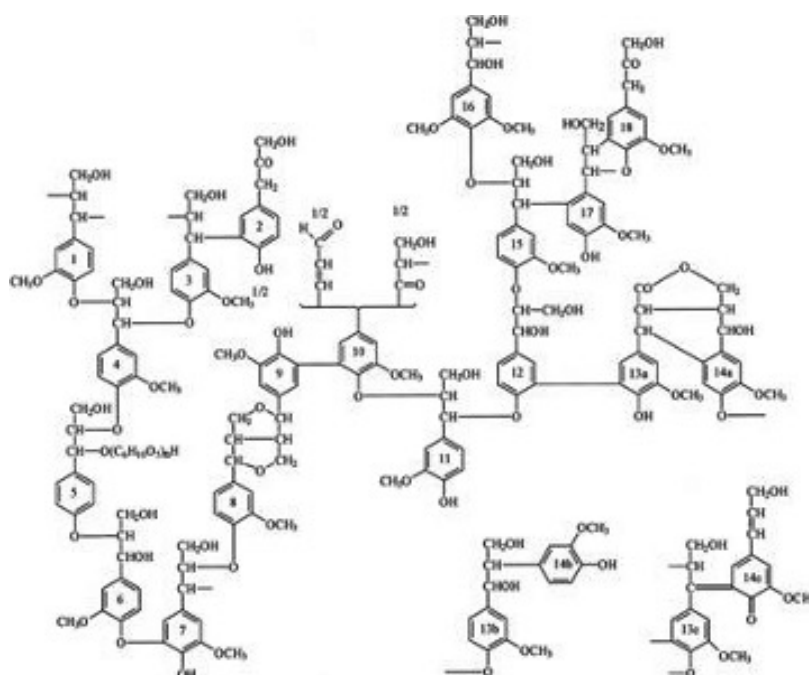


Figure 15 : Exemple d'une structure complexe de lignine. (Freudenberg et al., 1968)

ii. Les autres composés

En plus des trois composés majeurs, cellulose, hémicelluloses et lignine, le bois est constitué également d'autres composés de faible masse moléculaire. Les extractibles sont des molécules du bois pouvant être extrait du bois grâce à l'action de différents solvants. Ils représentent selon les essences, de 2% à 8% de la masse du bois. Malgré leur faible teneur, ces extractibles exercent des fonctions importantes. Ils confèrent aux arbres des traits distinctifs tels que leurs odeurs, couleurs, propriétés acoustiques et mécaniques. Les propriétés mécaniques définissent la durabilité naturelle du bois. Celle-ci est variable face aux agresseurs extérieurs (Guilley et al., 2004). Les extractibles peuvent être divisés en plusieurs familles : les terpènes constituant les majeurs de la résine des conifères (Gershenzon and Dudareva, 2007), les cires, les glucides, les composés phénoliques tels que les lignanes, les stilbènes, les flavonoïdes ou encore les tanins (Pereira et al., 2009) (Figure 16).

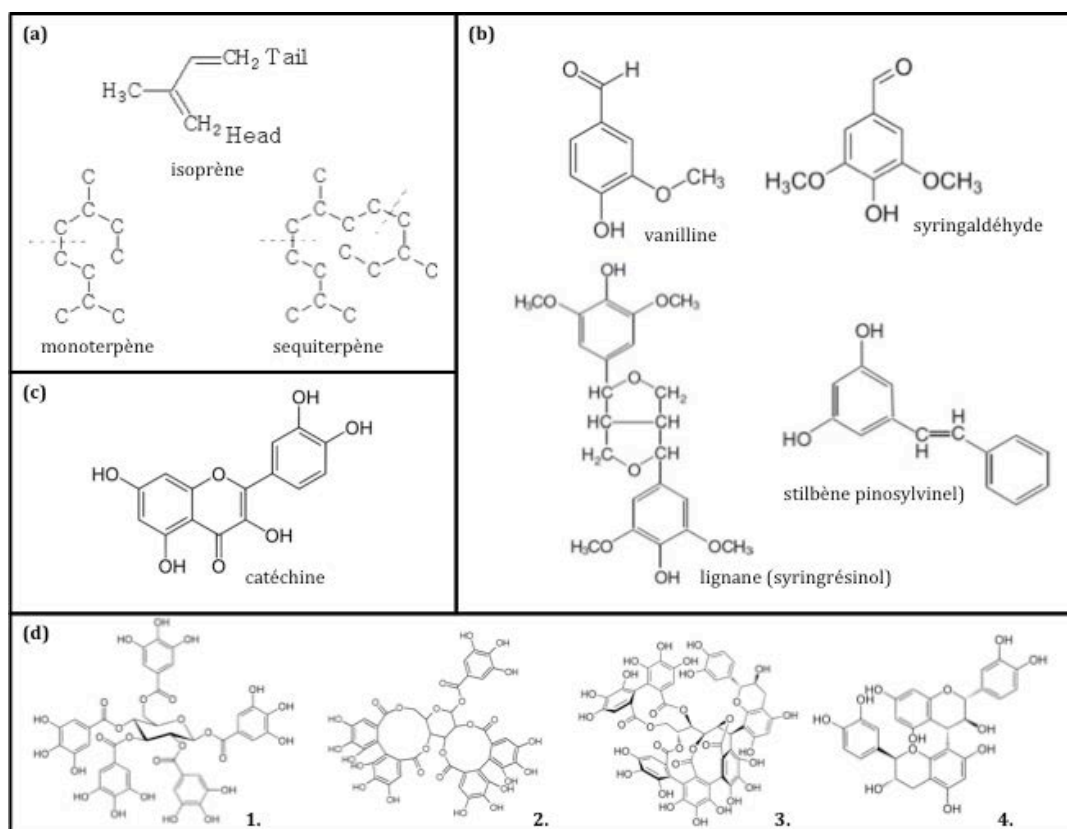


Figure 16 : Différentes familles d'extractibles présents dans le bois.

(a) Exemples de terpènes. (b) Exemples de composés phénoliques. (c) Exemple de flavonoïdes. (d) Les 4 familles de tanins, avec 1. Penta-O-galloyl-D-glucose, famille des gallotanins ; 2. Casuarictine, famille des ellagitanins ; 3. Acutissime, famille des tanins complexes et 4. Procyanidol B-3, famille des tanins condensés.

2) Les systèmes de dégradation des agents de pourritures blanches

Les systèmes impliqués dans la dégradation du bois sont très divers en adéquation avec sa grande hétérogénéité. Il existe des systèmes extracellulaires avec la production d'enzymes intervenant directement dans la dégradation des polymères du bois. Les champignons de pourriture blanche possèdent également des systèmes intracellulaires, intervenant dans la détoxification de molécules potentiellement toxiques libérées lors de la dégradation extracellulaire du bois.

a. Les systèmes de dégradation extracellulaires

Le développement des techniques, ces dernières années, pour la compréhension des mécanismes de dégradation extracellulaire a évolué grâce à l'apparition du séquençage, de la transcriptomique ou encore de l'analyse protéomique des sécrétomes (Abbas et al., 2005; Aro et al., 2005; Girard et al., 2013). Chez les champignons saprophytes, deux types d'activité de dégradation peuvent être distingués : une dégradation par des enzymes spécifiques telles que les cellulases, hémicellulases et une dégradation faisant appel à des processus oxydatifs enzymatiques ou non enzymatiques permettant la dégradation de polysaccharides et de la lignine. Ces deux systèmes impliquent des enzymes classées dans différentes bases de données en fonction de leurs actions : les enzymes actives sur les glucides appelées CaZymes comme les glycosides hydrolases (GH) et les carbohydrates esterases (CE) (Cantarel et al., 2009) et les enzymes actives sur la lignine appelées FoLys (Levasseur et al., 2008). Toutes ces enzymes sont extrêmement diverses et leur proportion chez les organismes est variable en fonction du type de pourriture rencontré et également en fonction de l'espèce au sein de la même famille fonctionnelle (Tableau 1). La dégradation de la cellulose fait appel aux deux systèmes, le système hydrolytique avec des cellulases par exemple et le système oxydatif avec notamment la réaction de Fenton et des enzymes monooxygénases de polysaccharides (LPMO).

Ecologie	Pourriture blanche										Pourriture brune							
Souche	Ha	Sh	Pu	Fm	Ad	Tv	Ds	Pc	Sc	Pp	Wc	Fp	Gt	Sl	Cp	Da		
Gènes	CAZymes																	
GH3	11	15	12	7	12	11	7	9	11	5	7	12	9	9	12	8		
GH5	7	6	6	6	8	5	5	5	3	5	4	5	5	8	8	5		
GH6	1	1	1	2	2	1	1	1	1	0	0	0	0	1	2	0		
GH7	1	3	5	2	6	4	4	8	2	0	0	0	0	0	2	0		
GH10	2	6	5	4	4	6	5	6	5	4	4	2	3	1	3	3		
GH11	0	1	1	0	3	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0		
GH12	4	5	2	3	1	5	3	2	1	2	2	2	2	1	4	1		
GH28	8	17	13	16	10	11	7	4	3	7	7	13	10	7	13	6		
GH61	10	16	14	13	19	18	15	15	22	2	2	4	4	5	10	0		
GH74	1	2	2	4	1	1	1	4	1	0	0	0	1	1	0	0		
GH43	4	10	7	6	26	3	7	4	12	1	1	7	5	1	6	5		
CE1	1	1	2	0	3	3	0	4	4	0	0	0	1	0	0	0		
CE16	5	10	8	6	29	7	10	2	10	5	5	11	6	3	6	4		
CE5	0	1	1	0	3	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0		
CE8	3	4	6	3	3	2	3	2	2	1	1	2	2	2	2	3		
CE12	2	3	0	2	1	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0		
CE15	1	1	2	1	6	2	2	2	2	1	1	1	1	0	0	1		
	0	1	2	5	10	15	20	25	30									

0 1 2 5 10 15 20 25 30

Tableau 1 :Tableau comparatif du nombre de copies de gènes codant des enzymes dégradant les liaisons glycosidiques (CAZymes) chez des pourritures blanches et des pourritures brunes.

(adapté de Floudas et al., 2012)

Ha : *Heterobasidion annosum* ; Sh : *Sterum hirsutum* ; Pu : *Punctularia strigosozonata* ;
 Fm : *Fomitiporia mediterranea* ; Ad : *Auricularia delicata* ; Tv : *Trametes versicolor* ;
 Ds : *Dichomitus squalens* ; Pc : *Phanerochaete chrysosporium* ; Sc : *Schizophyllum commune* ;
 Pp : *Postia placenta* ; Wc : *Wolfiporia cocos* ; Fp : *Fomitopsis picola* ; Gt : *Gloeophyllum trabeum* ;
 Sl : *Serpula lacrymans* ; Cp : *Coniophora puteana* et Da : *Dacryopinax sp.*
 GH : Glycosyl hydrolases et CE : Carbohydrate esterases

i. La dégradation de la cellulose

Les cellulases sont des enzymes capables d'hydrolyser les liaisons glycosidiques β 1-4 et sont divisées en trois grandes classes : les endoglucanases, les cellobiohydrolases et les β -glucosidases (Baldrian and Valášková, 2008; Mathew et al., 2008).

Les endoglucanases (EC 3.2.1.4) clivent les liaisons internes β 1-4 glycosidiques de la cellulose préférentiellement dans les régions amorphes libérant alors d'autres oligomères de cellulose plus courts.

Les cellobiohydrolases (CBH) (EC 3.2.1.91) sont quant à elles des enzymes monomériques qui agissent au niveau des zones cristallines à partir des extrémités des

chaines de cellulose. Elles libèrent soit du cellobiose, (diholoside formé de deux unités glucose) soit des celloextrins, polymères composés de plusieurs unités glycosyls. Enfin les β -glucosidases (EC 3.2.1.21) sont des enzymes structuralement très diverses qui vont cliver le cellobiose générant ainsi deux molécules de glucose. Ces trois classes d'enzymes vont agir en synergie sur la cellulose (Figure 17). De plus elles possèdent généralement un module de liaison à la cellulose (CBM) qui permet la reconnaissance et l'ancrage de l'enzyme à la cellulose, améliorant ainsi l'activité de l'enzyme grâce à une proximité spatiale avec son substrat (Boraston et al., 2004; Hervé et al., 2010).

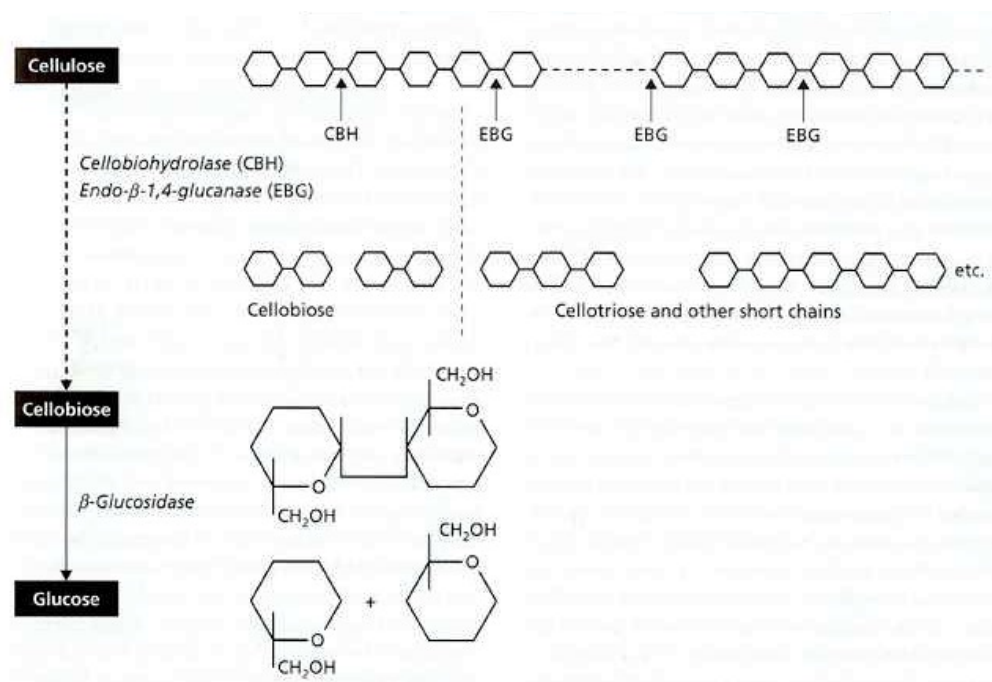
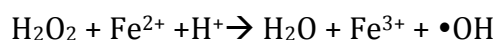


Figure 17 : Représentation schématique de l'hydrolyse de la cellulose par les 3 classes majeures de cellulases. Le polymère de cellulose est clivé par des endo- β -1,4-glucanase (EBG) et cellobiohydrolases (CBH) donnant naissance à des cellobioses. Les cellobioses sont clivés par des β -glucosidase engendrant des unités de glucoses (Deacon, 2009).

Pour la dégradation de la cellulose, il a été également montré que les systèmes oxydatifs pouvaient intervenir. Plusieurs systèmes oxydatifs intervenant sur la dégradation de la cellulose sont aujourd'hui connus : les réactions catalysées par les cellobiose deshydrogénases (CDH), le cycle redox de quinones, la production d' $\text{OH}^\bullet$ catalysée par des petits glycopeptides (Baldrian and Valášková, 2008).

Ils sont basés sur la réaction de Fenton (Halliwell, 1965; Koenigs, 1974) selon l'équation suivante :



Afin que cette réaction se réalise, les champignons de pourriture blanche produisent du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par l'action de diverses enzymes telles que les glyoxal oxydases (Kersten and Kirk, 1987), les glucoses oxydases (Kelley and Reddy, 1986) ou les aryl alcool oxydases (Guillén et al., 1992). Le fer sous forme Fe^{2+} est quant à lui fourni par la réduction du Fe^{3+} . Cette réaction, majoritairement trouvée dans les systèmes aérobies, est induite par l'action de petits peptides et de phénolates à fort pouvoir réducteur (Arantes et al., 2011).

Les CDH (EC 1.1.99.18) sont des enzymes extracellulaires produites principalement chez les champignons de pourriture blanche comme *Trametes versicolor* (Roy et al., 1996). Ce sont des enzymes monomériques de taille comprise entre 90 et 110KDa. Les CDH sont des oxydoreductases capables d'oxyder le cellobiose (Figure 18) mais aussi les cellodextrines, les mannodextrines et le lactose.

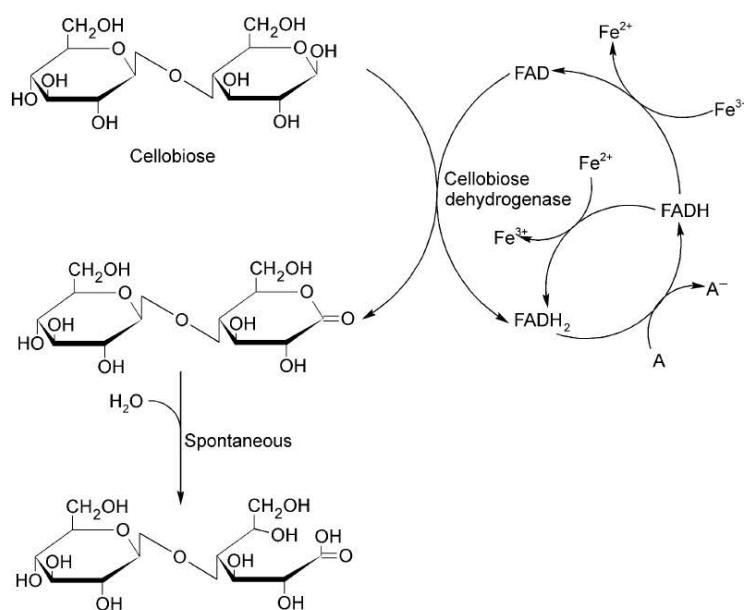


Figure 18 : Réaction catalysée par la cellobiose déshydrogénase. 'Fe' représente l'atome de fer lié à l'hème et 'A' représente l'accepteur d'électron. (Baldrian and Valášková, 2008)

Le deuxième système oxydatif faisant intervenir un radical $\text{OH}^\bullet$ est le cycle redox des quinones. Ce mécanisme est basé sur la réduction des quinones en hydroquinones générant alors un radical hydroperoxyde ($\text{OOH}^\bullet$), source de peroxyde d'hydrogène permettant ainsi un cycle complet de Fenton (Figure 19) (Kerem et al., 1999). Les champignons décomposeurs sont capables de sécréter des quinones extracellulaires.

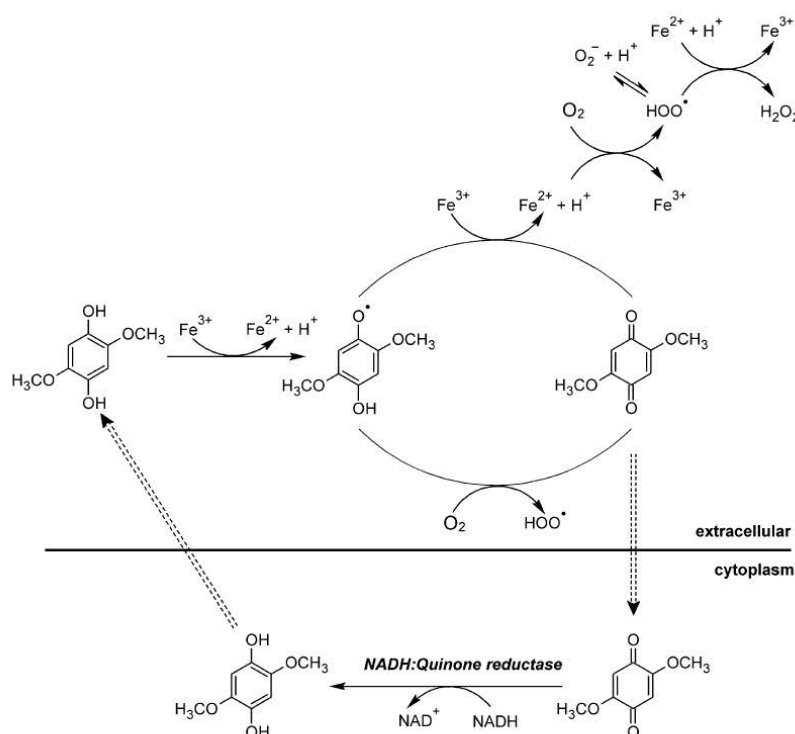


Figure 19 : Réaction catalysée par des quinones réductases. (Baldrian and Valášková, 2008)

Les glycopeptides catalysant la réaction de Fenton sont le dernier système oxydatif faisant intervenir un radical $\text{OH}^\bullet$. Ce sont des molécules de faible masse moléculaire comprise entre 1,5 et 14KDa. Ces glycopeptides ont notamment été mis en évidence chez *Trametes versicolor* et *Phanerochaete chrysosporium* (Tanaka et al., 2007). Ils sont capables de catalyser des réactions rédox entre un oxygène et des donneurs d'électrons pour produire des radicaux hydroxyles.

Un quatrième système récemment découvert, lui aussi oxydatif, fait appel aux PMOs (Phillips et al., 2011). Ce sont des enzymes très largement représentées chez les champignons décomposeurs mais également chez les pathogènes et symbiotiques. Ces enzymes appartiennent à la famille des GH61. Elles sont maintenant reclassées (base

CaZYM) dans la famille des enzymes aux Activités Auxiliaires n°9 (AA9). Leur mécanisme catalytique a permis de les identifier comme étant des monooxygénases de polysaccharides dépendantes du cuivre. Elles catalysent directement l'oxydation de la cellulose grâce à une molécule d'oxygène (Li et al., 2012; Quinlan et al., 2011). Les PMOs agissent en synergie avec les CDH (Bey et al., 2013; Hu et al., 2014) (Figure 20). Elles requièrent pour effectuer leur cycle catalytique de l'oxygène et le transfert de deux électrons provenant de l'hème d'une CDH (Žifčáková and Baldrian, 2012).

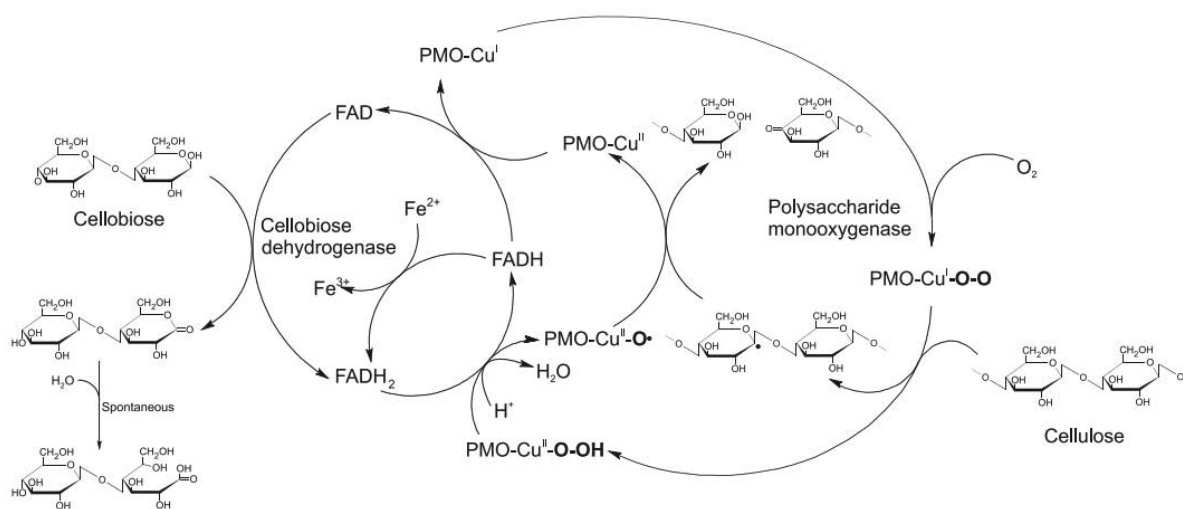


Figure 20 : Réaction catalysée par les PMO, coopération avec les CDH.
FAD = Flavine adénine dinucléotide.
(Žifčáková and Baldrian, 2012)

ii. La dégradation des hémicelluloses

Du fait de la grande hétérogénéité des hémicelluloses, leur dégradation nécessite un grand nombre d'enzymes spécifiques. Elles sont classées en fonction du substrat et de la nature de la liaison qu'elles hydrolysent. Elles peuvent être divisées en deux grandes catégories : les enzymes de dépolymérisation appartenant à seize familles différentes de GH et les enzymes de débranchement appartenant à six familles différentes de CE (Cantarel et al., 2009; Shallom and Shoham, 2003). Les enzymes de dépolymérisation hydrolysent les chaînes principales des hémicelluloses. Elles agissent soit au milieu du polymère et sont dites « endo » soit aux extrémités et sont alors dites « exo » comme les xylosidases (EC 3.2.1.37). Les enzymes de débranchement appelées

aussi enzymes « accessoires » ont la capacité de dépolymériser les ramifications qui constituent les polymères d'hémicelluloses. Elles peuvent être divisées en deux groupes selon leur action : soit sur les liaisons glycosidiques permettant alors l'hydrolyse des chaînes latérales de xylanes, soit sur les liaisons ester appelées estérases comme les acétyl-estérases (EC 3.1.16). Cette dernière action permet d'augmenter l'accessibilité aux enzymes dégradant le xylane ou encore aux féruloyl estérases (EC 3.1.12) qui affaiblissent les interactions lignine-hémicellulose. Ces deux types d'enzymes, de dépolymérisation et de débranchement agissent en synergie (Figure 21).

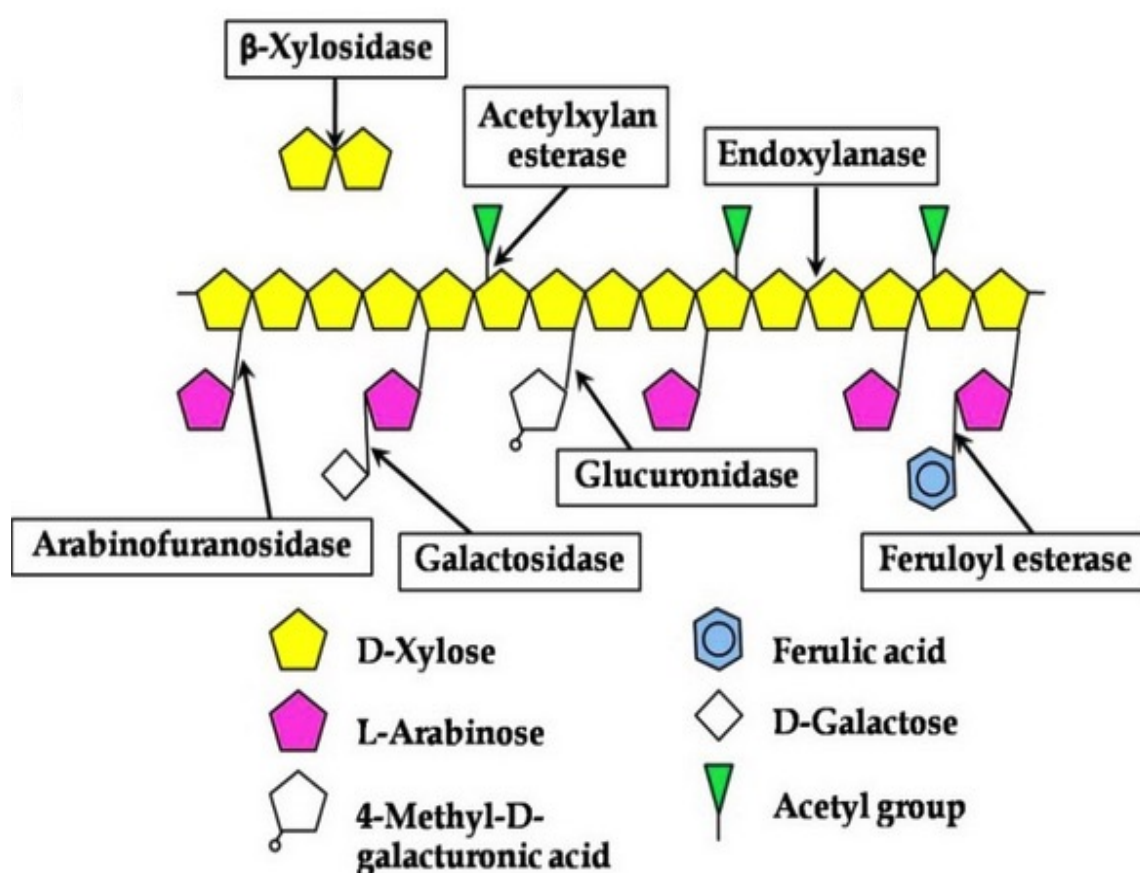


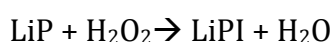
Figure 21 : Représentation schématique de la dégradation des hémicelluloses. Visualisation d'enzyme de dépolymérisation comme les xylosidases et les endoglucanases. Exemple également d'enzymes de débranchement comme les arabinofuranosidases, galactosidases, glucuronidases et feruloyl estérases. (Aro et al., 2005)

iii. La dégradation de la lignine

La lignine est formée de polymères compacts insolubles dans l'eau, aux liaisons non hydrolysables ce qui en fait un constituant de la paroi très récalcitrant à la dégradation par les champignons décomposeurs. Seuls les champignons de pourriture blanche sont capables de la dégrader et de la cataboliser par l'action de systèmes de dégradation extracellulaires oxydatifs (Hatakka and Hammel, 2011; Sánchez, 2009). Les enzymes oxydantes de types peroxydases et oxydases présentes dans ces organismes sont nombreuses et variées (Cullen and Kersten, 2004). Elles sont généralement divisées en quatre groupes : les peroxydases à lignines (LiP), les peroxydases à manganèse (MnP), les peroxydases versatiles (VP) et les laccases. Leur action est renforcée par d'autres enzymes dites auxiliaires.

Les LiP (EC 1.11.1.14) sont des peroxydases à hème glycosylées. Elles sont H₂O₂ dépendantes et vont être capables d'agir sur des substrats phénoliques aromatiques, non phénoliques ou encore sur certaines molécules comme l'alcool vératryl (Cameron et al., 2000; Wong, 2009). Ce dernier peut aussi servir de médiateur et agir comme oxydant lors de processus de transfert d'électrons (Harvey et al., 1986).

Le cycle catalytique peut être divisé en trois étapes (Figure 22). La première étape est une étape d'oxydation de la LiP par H₂O₂ au niveau du fer donnant naissance au complexe LiPI :



La seconde étape consiste à deux réductions consécutives par des substrats donneurs d'électrons. LiPI deviendra un complexe LiPII qui sera lui même réduit par un deuxième substrat pour régénérer l'enzyme dans son état native :



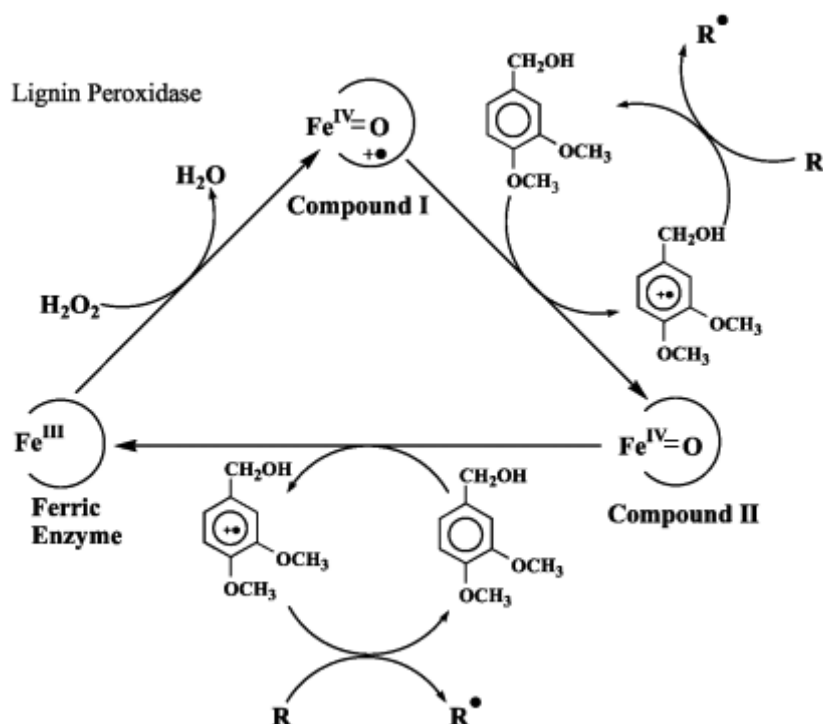
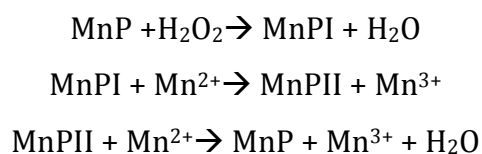


Figure 22 : Cycle catalytique des peroxydases à lignine. (Cameron et al., 2000)

Les MnP (EC 1.11.1.13) sont également des peroxydases à hème, de structure et aux fonctions similaires aux LiP (Jimenez-Tobon, 2003; Paice et al., 1993). De même que pour les LiP, les MnP sont H_2O_2 dépendantes et vont permettre l'oxydation d'un grand nombre de composés grâce à la présence de Mn^{3+} . Le cycle catalytique (Figure 23) des MnP se déroule en trois étapes (Hofrichter, 2002) :



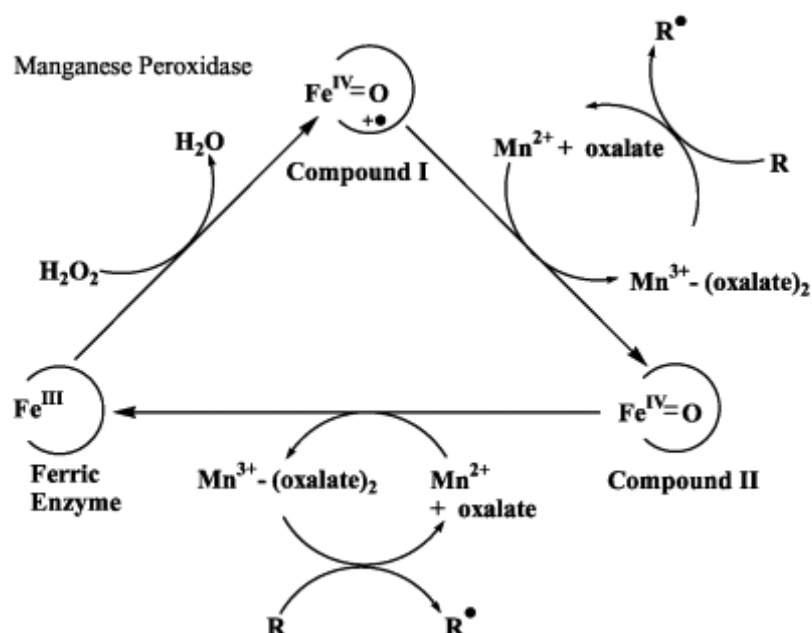


Figure 23 : Cycle catalytique des peroxydases à manganèse. (Cameron et al., 2000)

Les VP (EC 1.11.1.16) présentent des activités similaires aux LiP et MnP. Ce sont également des peroxydases à hème présentant un site de fixation du Mn²⁺. Elles permettent l'oxydation d'une grande variété de composés organiques aromatiques phénoliques. Le cycle catalytique des VP est une combinaison entre le cycle catalytique des LiP et celui des MnP (Figure 24) avec l'oxydation d'un substrat donnant naissance à un complexe VPI puis deux réductions consécutives en présence de Mn²⁺ formant ainsi un complexe VPII puis un retour à l'état natif de l'enzyme (Camarero et al., 1999).

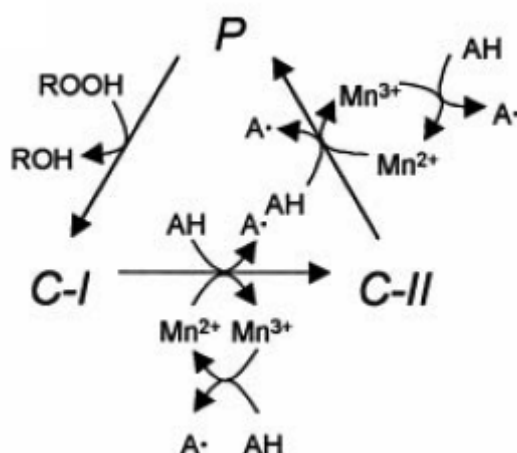
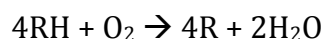


Figure 24 : Cycle catalytique des peroxydases versatiles. (Camarero et al., 1999)

Les laccases (EC 1.10.3.2) sont des enzymes très présentes chez les champignons de pourriture (Collins and Dobson, 1997). Elles agissent en synergie avec les peroxydases (Wong, 2009). Ce sont des enzymes monomériques ou dimériques. Les laccases catalysent des réactions selon l'équation suivante :



Il existe également d'autres enzymes dites auxiliaires. Ce sont des oxydases extracellulaires comme l'aryl alcool oxydase (AAO), la glyoxal oxydase (GOx), l'aryl alcool déshydrogénase (AOx), la pyranose-2-oxydase (POD) et les quinones réductases (QR). Les réactions d'oxydation successives vont générer de l' H_2O_2 qui sera alors utilisé par les LiP, MnP et VP (Shah and Nerud, 2002).

b. Les systèmes de dégradation intracellulaires

Lors de la dégradation des différents constituants du bois par les champignons décomposeurs de nombreux composés (aromatiques ou encore phénoliques) vont être générés. Ces composés peuvent être plus ou moins toxiques pour les organismes présents et vont pouvoir pénétrer dans leurs cellules. Une fois à l'intérieur de celles-ci, ils vont pouvoir être pris en charge par un système de détoxication (Dorado et al., 2000). Ce système de détoxication, aussi appelé xénome (Edwards et al., 2005), se décompose en trois étapes permettant la détection, le transport et l'élimination de la molécule potentiellement toxique (Morel et al., 2013) (Figure 25).

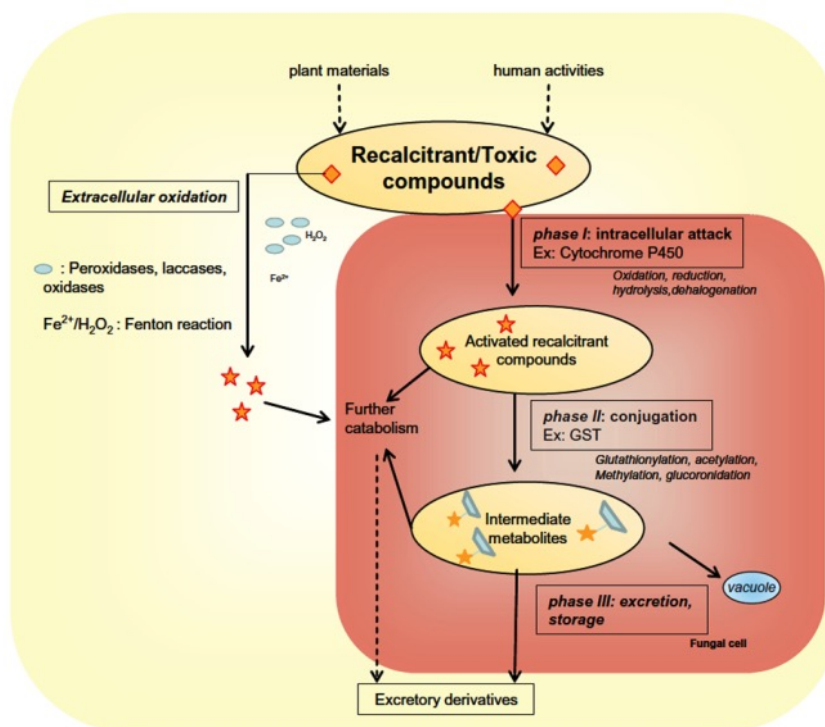
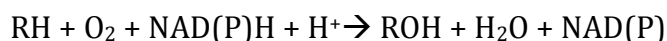


Figure 25 : Les différentes étapes impliquées dans la dégradation fongique : la phase extracellulaire et les trois phases de détoxification intracellulaire. (Morel et al., 2013)

La première phase, phase I, est une phase d'activation du composé. Elle est principalement réalisée par les cytochromes P450 monooxygénases (CytP450). Ils catalysent des réactions d'oxydoréduction afin généralement d'introduire un groupement hydroxyle sur le composé. De part leur grand nombre et leur grande diversité d'activité, la classification des CytP450 est régulièrement remaniée. Comptant quatre classes au départ, ils ont été divisés en dix classes (Hannemann et al., 2007) puis en seize classes (Park et al., 2008).

Les CytP450 catalysent généralement la réaction globale suivante :



Cette réaction est le fruit de sept étapes (Koop, 2006; Krest et al., 2013). La première étape consiste en une fixation du substrat sur le CytP450 induisant ainsi un changement structural. Une première réduction est ensuite réalisée puis un oxygène se fixe sur le fer pour donner naissance à un complexe superoxyde. Une seconde réduction se réalise faisant apparaître une espèce peroxyferrique suivie d'une double protonation donnant une espèce hydroperoxyferrique puis un autre complexe avec libération d'une molécule

d'eau. L'avant-dernière étape consiste en une soustraction d'un hydrogène au substrat. La dernière étape est une hydroxylation et libération du substrat et le retour à l'enzyme dans son état natif (Figure 26).

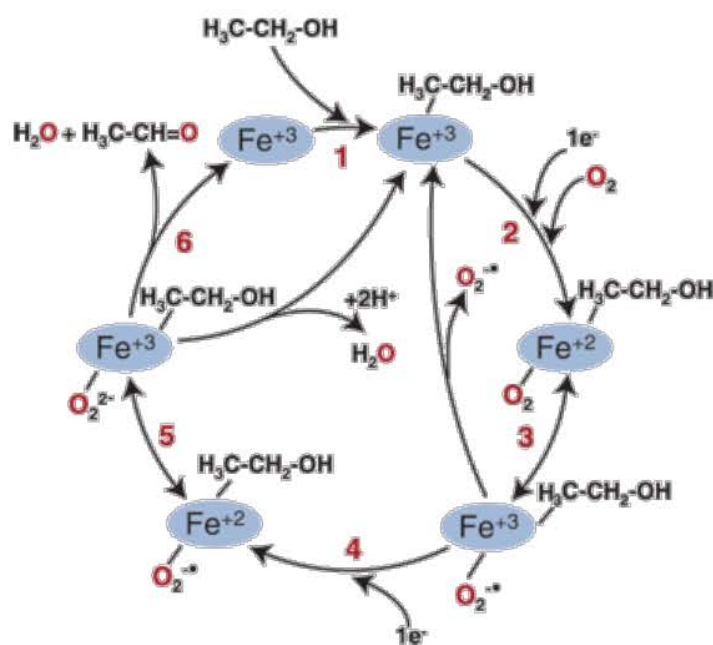


Figure 26 : Cycle catalytique des CytP450. (Koop, 2006)

Les CytP450 sont aussi capables de catalyser d'autres types de réaction (Črešnar and Petrič, 2011; Meunier et al., 2004) tels que l'époxydation, l'oxydation, la désalkylation (Poulos et al., 1985). Ils sont très représentés chez les champignons décomposeurs avec par exemple 154 gènes codant chez *Phanerochaete chrysosporium* et environ 290 gènes codant chez *Trametes versicolor*. Ces gènes codant les CytP450 émergent depuis différents gènes ancestraux grâce à des phénomènes de duplication et de recombinaison suggérant une adaptation des champignons à la dégradation du bois (Doddapaneni et al., 2005). Sous l'action des CytP450, la toxicité du substrat est alors modifiée, en donnant parfois un composé plus toxique. Celui-ci sera alors pris en charge par les transférases lors d'une deuxième phase.

La seconde phase, phase II, est une phase de conjugaison du composé issu de la phase I. Celui-ci est généralement rendu hydrophile par ajout d'un groupement qui peut être de différentes natures. Plusieurs types de réaction peuvent être distingués comme la glucuronidation (Bock et al., 1979), la méthylation (Häggbloom et al., 1988), la

sulfatation (Glatt, 2000), l'acétylation (Zhang et al., 1996) et enfin la glutathionylation. Cette dernière réaction se traduit par l'ajout d'un glutathion grâce à des glutathion-S-transférases (GST) (famille multigénique). La glutathionylation, réaction de la phase II, a lieu chez un grand nombre d'organismes et notamment chez les champignons (Sheehan et al., 2001). Les GST (EC 2.5.1.18) ont été découvertes en 1961 et nommées alors GSH S aryltransférases (Booth et al., 1961). En 1974, un substrat commun est découvert pour ces enzymes, le 1,2-chloro-4-dinitrobenzène (CDNB). De nombreuses protéines sont alors identifiées et regroupées par similitude de séquences. Elles prennent le nom de Glutathion-S-Transférases (GST) (Habig et al., 1974). Au cours des années suivantes, des réactions et fonctions autres que la conjugaison sont identifiées, comme des fonctions de déglutathionylation, des fonctions dans la biosynthèse ou encore dans le transport de molécules (ligandine) (Mathieu et al., 2012). La dénomination des enzymes passe de glutathion-S-transférases à glutathion-transférases tout en gardant l'acronyme de GST. Elles sont classées en trois groupes majeurs, chacun codé par des familles multigéniques distinctes. Le premier concerne les GST microsomales appelées aussi MAPEG pour « Membrane Associated Proteins in Eicosanoids an Glutathione metabolism ». Elles sont présentes dans la plupart des organismes vivants (Jakobsson et al., 1999). Elles permettent des réactions de conjugaison de composés halogénés et des réactions de réduction des hydroperoxydes (Andersson et al., 1994). Le deuxième groupe est celui des GST Kappa. Ces enzymes sont situées dans les mitochondries (Harris et al., 1991) mais elles peuvent également être retrouvées dans les peroxysomes (Morel et al., 2004). Elles catalysent des réactions de conjugaison. Enfin les GST cytosoliques, les plus abondantes sont ubiquitaires avec plusieurs dizaines de membres chez certaines espèces. Ces enzymes sont retrouvées dans le cytosol, cependant elles peuvent aussi être présentes dans le noyau, les mitochondries ou les péroxysomes. Renommées GST canoniques (Hayes et al., 2005; Pickett and Lu, 1989), elles sont divisées en vingt trois classes. Chaque taxon possède au moins une des classes ubiquitaires et des classes spécifiques (Tableau 2) (Board and Menon, 2013; Frova, 2006).

Classe commune	Classe spécifique	Taxon
Zêta		Mammifères, Plantes, Insectes, et Bactéries
Thêta		Mammifères, Plantes, Insectes, et Bactéries
Sigma		Mammifères, Insectes et algues (rouges et brunes)
Oméga		Mammifères, insectes et champignons
Ure2p		Champignons et bactéries
TCHQD		Plantes et bactéries
Phi		Plantes et champignons
	Alpha	
	Mu	Mammifères
	Pi	
	Bêta	
	Chi	Bactéries
	FuA	
	GHR	
	GTT 1	Champignons
	GTT 2	
	Delta	
	Epsilon	Insectes
	Lambda	
	Tau	Plantes
	DHAR	
	Nu	Nématodes

Tableau 2 : Répartition des différentes classes de GST canoniques au sein des différents taxons.
TCHQD = TetraChloroHydroQuinone Dehalogenase ; GHR = S-Glutathionyl Hydroquinone Reductase ; GTT = Glutathione Transferase ; DHAR = DésHydroAscorbate Réductases.
(adapté de Jacquot et al., 2013)

Les GST canoniques, les plus abondantes divergent toutes d'un ancêtre commun. Au sein du règne fongique, les gènes codant les diverses classes de GST canoniques s'organisent en clusters (Henderson et al., 1998). L'organisation de ceux-ci résulte d'événements de duplication de gènes augmentant leur nombre de copies. A la fin des années 90, le modèle d'évolution des GST était basé sur le fait que les GST provenaient d'une

amplification, puis d'une divergence des gènes amenant aussi à de nouvelles fonctions (Armstrong, 1997). Au début des années 2000, un nouveau modèle est apparu basé sur la présence ou non des GST au sein des taxons mais également sur les homologies de séquences dans les structures et fonctions biochimiques de ces enzymes (Frova, 2006). Les GST canoniques descendraient d'un ancêtre commun au motif thiorédoxine avec un domaine hélicoïdale en C-terminal faisant apparaître la classe Lambda et DHAR. Puis l'évolution des différentes classes s'est effectuée en trois étapes successives (Figure 27). Dans un premier temps, un phénomène de dimérisation s'est produit donnant naissance aux classes Oméga et Bêta. De là, une première substitution de la cystéine catalytique en serine accompagnée ou non d'un repositionnement du site actif, s'est effectuée faisant apparaître les classes Zêta, Phi, Tau... Cette substitution a permis l'arrivée d'une nouvelle fonction, la glutathionylation. Puis une seconde substitution de la sérine en tyrosine a eu lieu donnant naissance aux classes Sigma, Mu...

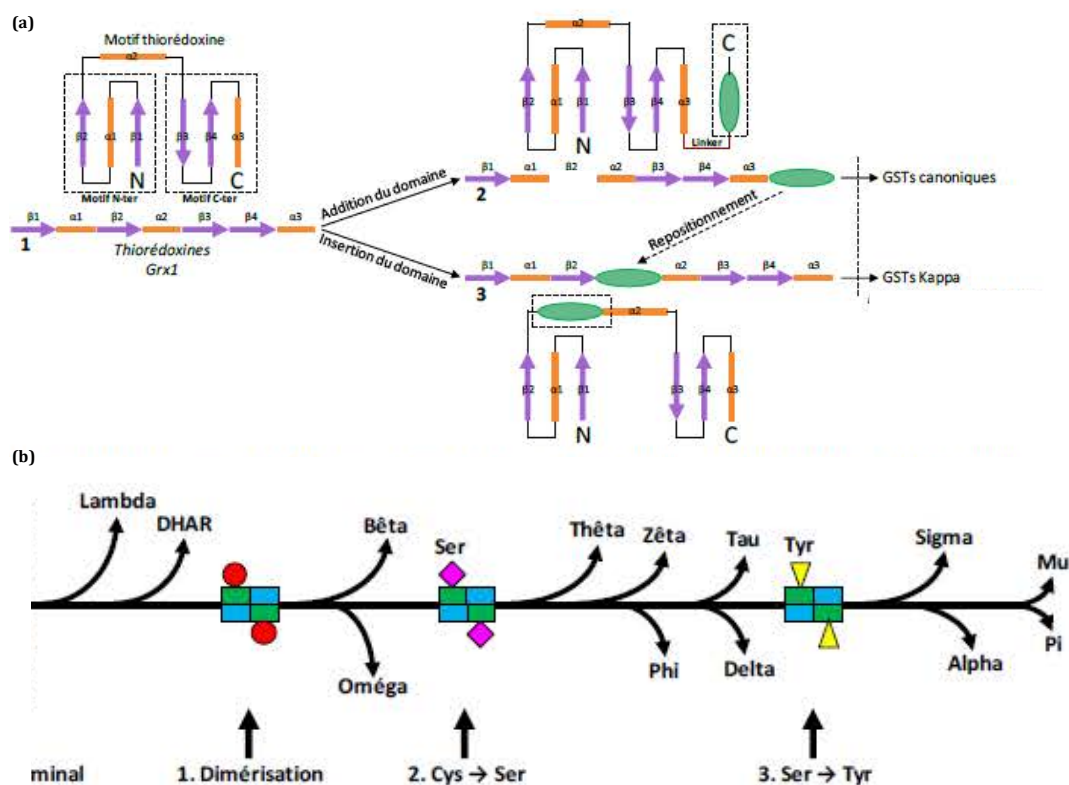


Figure 27 : Schéma évolutif des différentes GST (adapté de (Frova, 2006)).
(a) Émergence des GST canoniques à partir de l'ancêtre commun thiorédoxine. Ellipse verte = domaine hélicoïdal. **(b) Émergence des différentes classes de GST canonique, modèle évolutif.** Rond rouge = résidu catalytique, cystéine ; losange rose = résidu catalytique, sérine et triangle jaune = résidu catalytique, tyrosine.

Les GST s'organisent toutes de la même façon avec la présence de deux domaines bien distincts. Le domaine I est le domaine N-terminal au motif thiorédoxine (Atkinson and Babbitt, 2009; Oakley, 2011). C'est un domaine extrêmement conservé au sein des classes de GST. Il comprend le site G qui permet la fixation et la stabilisation du glutathion via des interactions avec le résidu catalytique (Armstrong, 1997). Ce résidu catalytique peut être une cystéine, sérine, thréonine voire une alanine (Andersson et al., 1994; Atkinson and Babbitt, 2009). Il détermine alors la fonction de la protéine vis-à-vis du glutathion réalisant soit des réactions d'oxydoréduction (comme la déglutathionylation) ou à l'inverse des réactions de conjugaison (Board and Menon, 2013). Le domaine II est le domaine C-terminal hélicoïdal formé d'hélices α . Contrairement au domaine I, celui-ci est très variable selon les classes. Il contient le site H responsable de la reconnaissance du substrat (Armstrong, 1997; Wilce and Parker, 1994). Les deux sites G et H forment le site catalytique d'une sous unité (Figure 29).

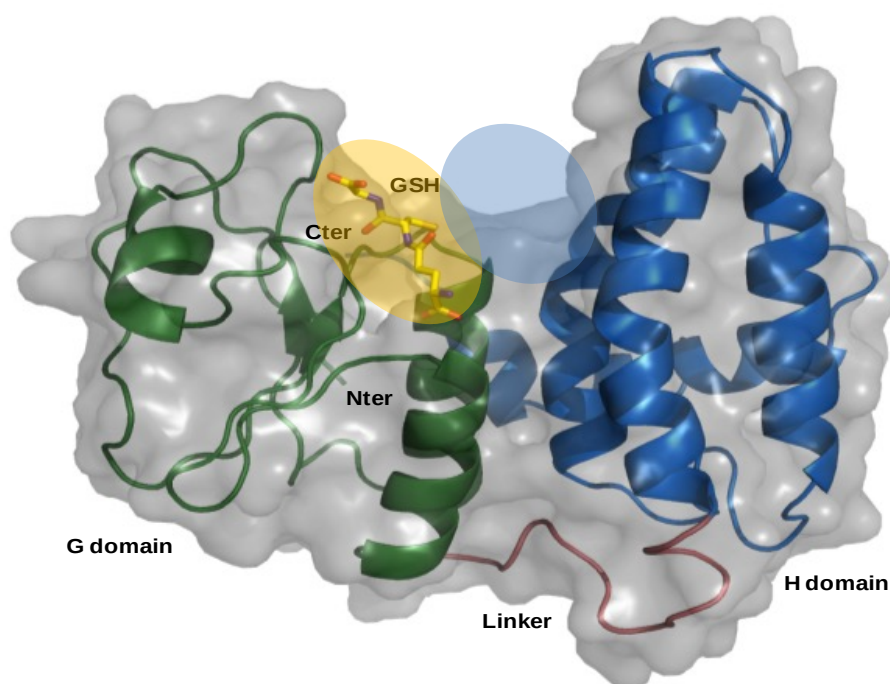


Figure 28 : Visualisation des domaines N- terminal et C-terminal composant chaque monomère de la GSTF1 du maïs. Le domaine I et II sont représentés respectivement en vert et en bleu. Le site G, surligné en jaune contient une molécule de glutathion formant une liaison covalente avec un substrat, situé au sein du site H surligné en bleu.

Les classes de GST sont majoritairement actives sous forme dimérique (Dixon et al., 2002; Hayes et al., 2005), sauf les lambda, enzymes uniquement trouvées sous forme monomérique. Elles présentent un repliement de type C2, le domaine I d'un monomère est en interaction avec le domaine II de l'autre monomère. Pour les glutathionyl hydroquinone réductases (GHR), la dimérisation est particulière (Mathieu et al., 2012; Meux et al., 2011), le domaine I d'un monomère est en interaction avec le domaine I de l'autre monomère conférant à ces protéines des caractéristiques biochimiques propres (Figure 29).

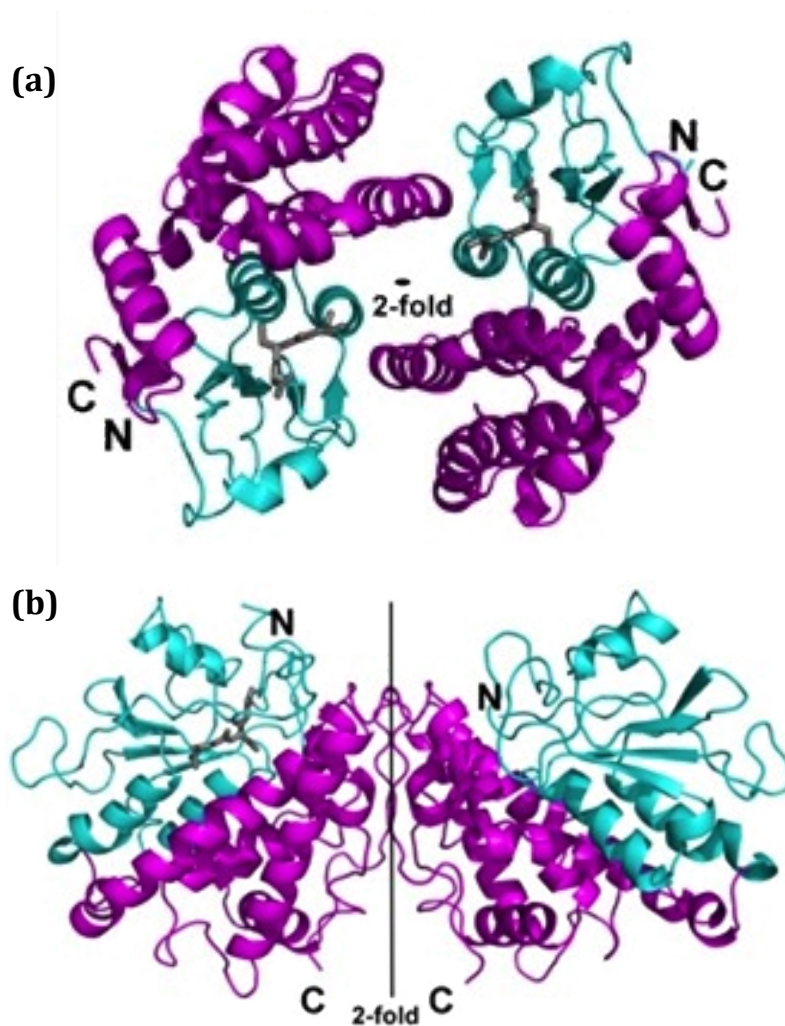


Figure 29 : Type de dimérisation des GST. (Meux et al., 2011)

(a) Repliement de type C2, GST canonique, exemple de GST oméga : GSTO1 de *P. chrysosporium*

(b) Repliement GST, exemple de GHR : GHR1 de *H. sapiens*.

Lors de cette deuxième phase, le composé va voir sa solubilité augmenter et sa toxicité à l'inverse diminuer. Il sera alors pris en charge par les enzymes de la troisième phase.

La troisième phase, phase III, est la phase d'élimination. Le composé hydrophile provenant de la phase II va être soit stocké dans la vacuole, soit excrété hors de la cellule via des transporteurs de type ABC (ATP Binding Cassette), des protéines membranaires pouvant jouer le rôle de transporteurs de type multi-drug résistance (MDR) ou encore par des pompes à glutathion (GS-X-pump) (Coleman et al., 1997; Harms et al., 2011; Ishikawa, 1992). Le composé peut également être catabolisé.

3) *Trametes versicolor*

Trametes versicolor, précédemment appelé *Coriolus versicolor* ou *Polyporus versicolor* est un champignon lignivore Basidiomycète de la famille des Polyporaceae. En 1886, le mycologue français Lucien Quélet plaça *T. versicolor* et certaines espèces similaires dans un genre qu'il nomma *Coriolus* (Quélet, 1888). Il porte le nom de versicolor du fait de sa capacité à produire des pigments comme la mélanine (Tudor et al., 2013). Ces pigments peuvent être observés soit dans la nature conférant aux polypores diverses couleurs, soit en milieu de culture isolé en laboratoire (Figure 30). Le polypore versicolor se développe en étages superposés de plusieurs individus semblant s'imbriquer les uns dans les autres. Son chapeau est de taille variable comprise entre 4 et 15 cm environ en forme de console se déployant en éventail. Il ne présente pas de lame mais des pores minuscules. Sa dureté est parfois telle qu'il a pu autrefois être utilisé comme bijou.



Figure 30 : Photographies de *Trametes versicolor*, différence de pigmentation.

<http://www.phytomania.com/trametes-coriolus-versicolor.htm> ;
<http://bmvgallery.com/tag/trametes-versicolor/> ; <http://www.greenoptimistic.com/trametes-versicolor-fuel-cell-catalyst-20081011/#.Ve6P8emRPv4>

C'est un champignon décomposeur primaire ubiquitaire à travers le monde. *T. versicolor* a été identifié à l'heure actuelle sur environ 295 espèces différentes de ligneux, majoritairement des feuillus comme *Betula sp.*, *Quercus sp.* ou encore *Fagus sp.* mais aussi sur quelques conifères comme *Pinus sp.* et *Larix sp.*

T. versicolor est un champignon de pourriture blanche fréquemment utilisé comme modèle d'étude. Il est connu pour sa grande capacité à produire des enzymes comme les laccases impliquées dans la dégradation du bois et notamment la lignine (Bourbonnais et al., 1995; Collins and Dobson, 1997). Son utilisation dans des processus de détoxification, de bioremédiation (Cerniglia, 1997; Hundt et al., 1999) et également en médecine, plus particulièrement en immuno-cancérologie (Donatini, 2010; Standish et al., 2008) a été étudiée.

Sa classification et sa détection ont été améliorées. En effet les critères uniquement morphologiques utilisés jusqu'alors n'étaient que très peu précis dû à une anatomie complexe de la classe (Figure 31) (Justo and Hibbett, 2011). Son génome a été totalement séquencé par le Joint Genome Institute (JGI) en 2010 (Floudas et al., 2012). Le génome a une taille de 44.79 Mpb comptant 14296 gènes répartis sur 283 scaffolds.

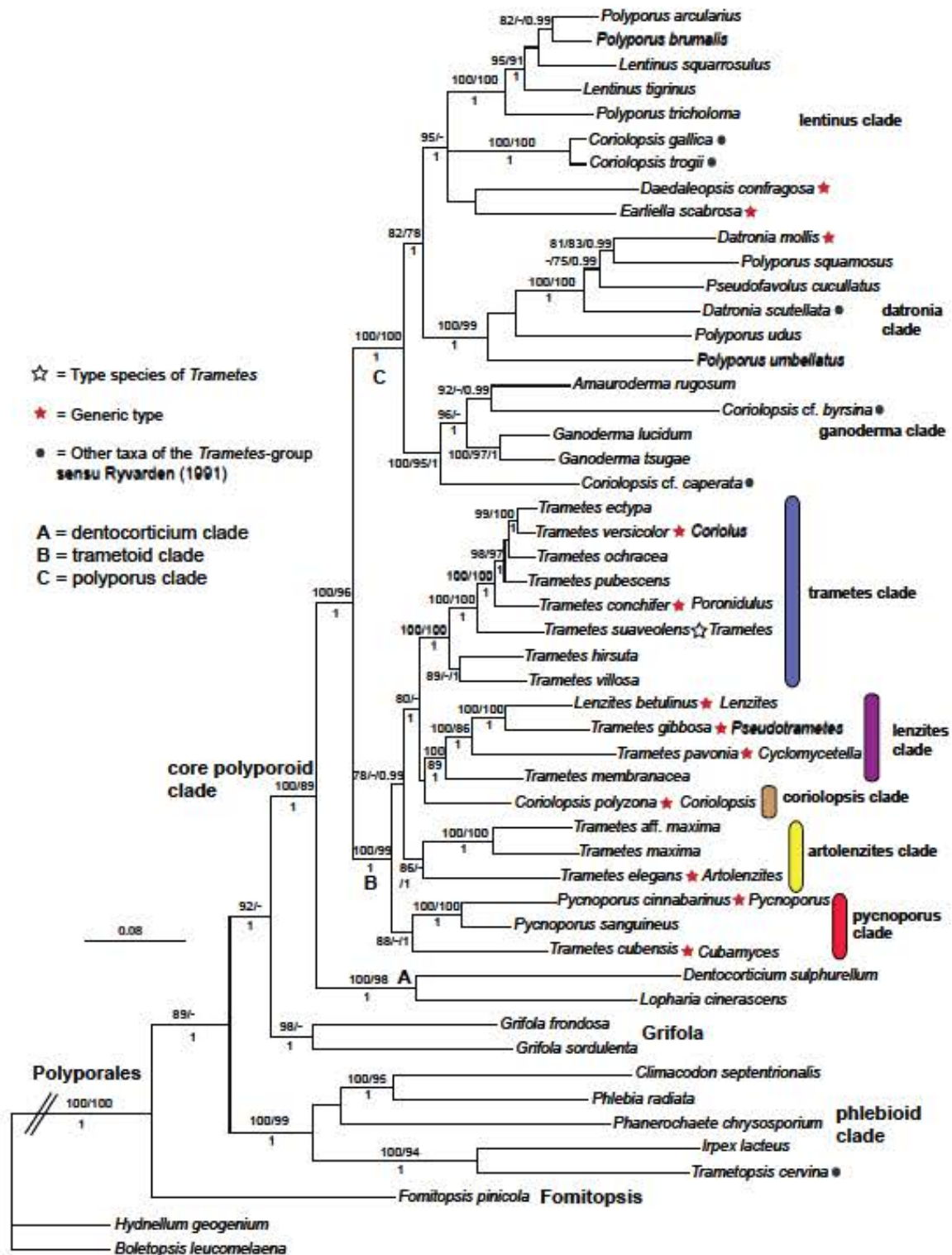


Figure 31 : Classification des *Trametes* basée sur l'identification de cinq marqueurs : des marqueurs ribosomaux nLSU (grande sous unité ribosome nucléaire) et ITS (espaceur intergénique transcrit) ; et des marqueurs correspondant à des gènes codant des protéines RPB1/RPB2 (RNase polymérase II) et TEF1 (facteur d'élongation) (Justo and Hibbett, 2011).

Objectifs

Les champignons saprophytes dégradant la lignocellulose jouent un rôle important dans le cycle du carbone. Ceux de la classe des Agaricomycota sont particulièrement intéressants puisque certains possèdent la capacité de dégrader la totalité des composés du bois ce qui en fait des organismes à fort intérêt biotechnologique. Ces champignons présentent en effet un arsenal très important d'enzymes extracellulaires mais également intracellulaires impliquées dans la dégradation du bois. *Trametes versicolor*, champignon de pourriture blanche, est le modèle d'étude choisi pour réaliser cette thèse.

Le but principal de cette thèse était d'étudier par des approches de génomique comparative et biochimique les mécanismes impliqués dans les processus de décomposition du bois. Nous avons émis l'hypothèse que l'essence de l'arbre est un des facteurs influençant l'adaptation de l'espèce de champignon qui s'y développe, dans notre étude *Trametes versicolor*. L'objectif était d'essayer de comprendre et d'identifier les facteurs moléculaires impliqués dans l'adaptation de *Trametes versicolor* à son environnement.

Les approches et la stratégie mises en place pour mener à bien ce projet étaient pluridisciplinaires (Figure 32). Différentes souches de *T. versicolor* ont été sélectionnées en fonction de leurs habitats d'origine (zone géographique et essence de l'arbre).

L'étude s'est appuyée dans un premier temps sur l'analyse de la diversité phénotypique du **système de dégradation extracellulaire** de *Trametes versicolor* en présence de bois. Une approche basée sur la caractérisation des différents isolats a été mise en place en deux temps. Afin de mieux comprendre les interactions environnementales, la capacité des souches à dégrader différentes essences de bois a été analysée. Puis des travaux de protéomique ont été entrepris par le biais de la caractérisation des protéines produites lors de la dégradation du bois (sécrétome) et la recherche de potentiels marqueurs d'adaptation. Ces travaux avaient pour but de mettre en évidence un polymorphisme phénotypique.

Dans un second temps, l'étude s'est attachée à l'analyse et la caractérisation du **système intracellulaire impliqué dans la détoxication**. Une approche fonctionnelle d'une

famille multigénique de protéines, les GST impliquées dans le système de détoxification a été réalisée. Une analyse phylogénétique de la diversité des GST chez Basidiomycètes a été effectuée. Des tests biochimiques avec la production, purification de neuf isoformes de GST oméga et deux de GHR de *T. versicolor* ainsi que la caractérisation de leurs activités ont été réalisés. Une étude sur la pression environnementale comme l'interaction des GST oméga avec des extraits de bois a été mise en place. Ces approches avaient pour but de mettre en évidence le phénomène adaptatif des souches grâce à ces familles multigéniques.

Une **analyse de génomique** par l'étude du polymorphisme nucléotidique (SNP) avait commencé à être réalisée afin de potentiellement pouvoir corréler un polymorphisme phénotypique avec le génotype.

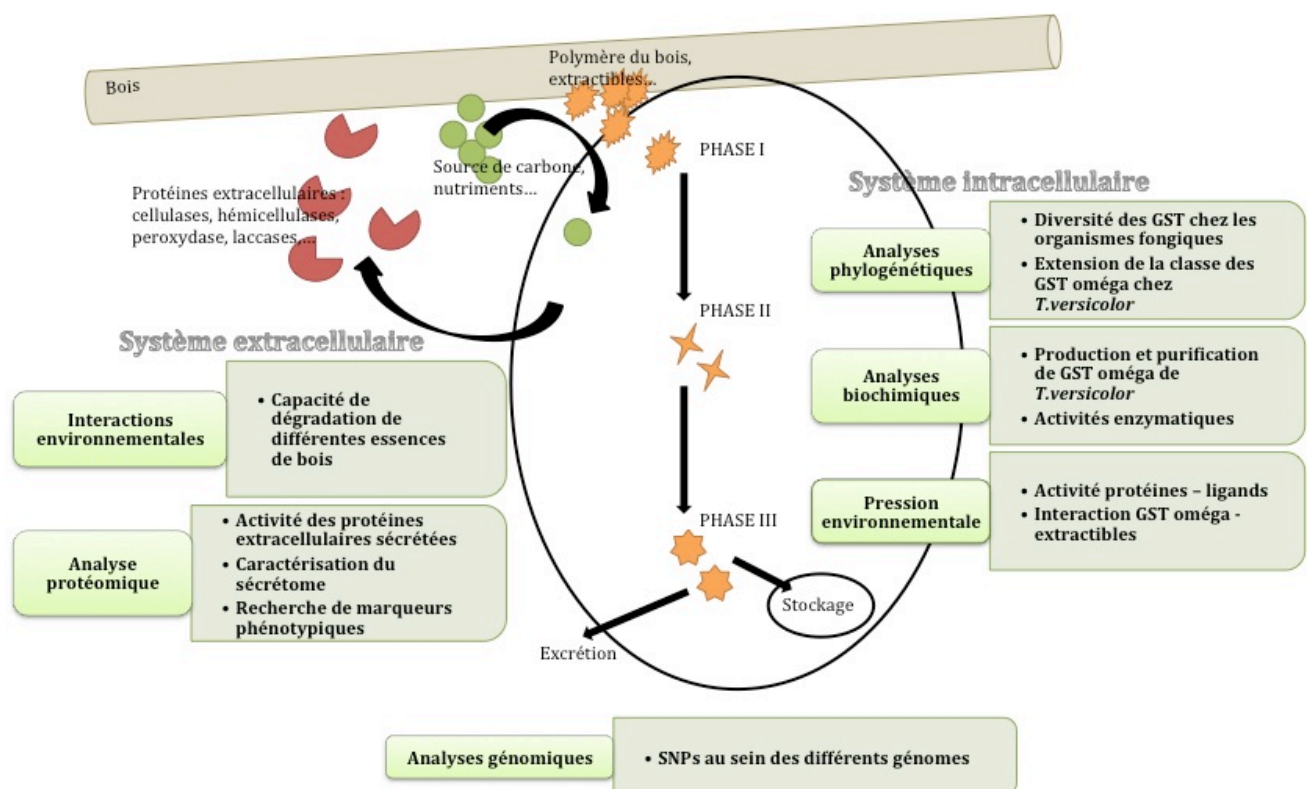


Figure 32 : Schéma représentatif des différentes approches abordées au cours de la thèse.

Matériel et Méthodes

I. Matériel biologique

Dans cette thèse, *Trametes versicolor*, champignon de pourriture blanche souvent utilisé comme modèle a été choisi comme notre matériel d'étude biologique.

Des souches, dix au total, ont été sélectionnées dans différents catalogues selon deux critères : leur essence d'origine (le hêtre ou le chêne, le bouleau ou l'aulne pour quelques une d'entre elles) et leur géographie (répartition aléatoire au niveau mondial). Le nom des souches, leurs origine (pays), les essences sur laquelle elles ont été isolées et leur numéro d'accession dans les différents catalogues sont répertoriés ci-dessous (Tableau 3).

NOM DE LA SOUCHE	SOUCHE	FAMILLE	CONTINENT	PAYS	ESSENCE	NUMERO D'ACCESSION
1218	<i>Trametes versicolor</i>	Polyporaceae	Europe	France	<i>Quercus sp.</i>	BRFM 1218
1219	<i>Trametes versicolor</i>	Polyporaceae	Europe	France	<i>Alnus sp.</i>	BRFM 1219
1532	<i>Trametes versicolor</i>	Polyporaceae	Europe	France	<i>Fagus sp.</i>	BRFM 1532
110.102	<i>Trametes versicolor</i>	Polyporaceae	Europe	France	-	
44889	<i>Trametes versicolor</i>	Polyporaceae	Europe	Belgique	<i>Fagus sp.</i>	MUCL 44889
1234	<i>Trametes versicolor</i>	Polyporaceae	Europe	Norvège	<i>Betula sp.</i>	1956-1234/1
1252	<i>Trametes versicolor</i>	Polyporaceae	Europe	Norvège	<i>Quercus sp.</i>	1956-1252/1
70	<i>Trametes versicolor</i>	Polyporaceae	Amérique	USA	<i>Fagus sp.</i>	ATCC 12679
71	<i>Trametes versicolor</i>	Polyporaceae	Amérique	Canada	<i>Quercus sp.</i>	MUCL 1011
15544	<i>Trametes versicolor</i>	Polyporaceae	Océanie	Nouvelle-Zélande	<i>Nothofagus</i>	ICMP 155544

Tableau 3 : Souches de *Trametes versicolor* sélectionnées pour les différentes études.

Catalogue CIRM pour les souche Tv1218, Tv1219 et Tv1532 ; catalogue BBCM pour la souche Tv44889 ; catalogue ATCC pour la souche 70 ; catalogue CABI pour la souche 71 et catalogue ICPM pour la souche 15544.

II. Conditions de culture

1) Conservation des souches

Afin de pouvoir réaliser toutes les études sur les souches de *Trametes versicolor*, celles-ci sont entretenues sur milieu gélosé et/ou conservées à basse température.

- Les différentes souches sont repiquées tous les deux mois sur boîte de Petri (80mm de diamètre) contenant un milieu de culture malt/agar à respectivement 40g/L et 20g/L. Elles sont conservées pour leur croissance à 25°C dans le noir.
- Une boîte de chaque souche est conservée à 4°C
- Afin d'optimiser et de garantir la conservation, plusieurs plugs de chaque souche développée sur milieu malt/agar, sont placés à -80°C individuellement en tubes Eppendorf de 1,5mL stériles contenant 500µL de glycérol 80%. Les cultures sont notées F0, correspondant à la première génération et utilisées pour les différentes études.

2) Milieux de culture pour les analyses

a. Les milieux gélosés classiques

Les souches sont cultivées sur différents milieux gélosés en fonction de l'analyse à réaliser. Les compositions de ces milieux sont décrites en détail dans le tableau 4.

TIEN AND KIRK	1 L	PDA MODIFIE	1 L	PACHLEWSKI MODIFIE	P5 _ 1L	P25 _ 1L
A AUTOCLAVER		A AUTOCLAVER		A AUTOCLAVER		
Glucose 20% (80g/400mL)	50mL	PDA	39g	Ammonium tartrate	500mg	3g
Acétate de sodium 100mm pH4.5 (5.44g/400mL)	50mL	Agar	20g	Potassium phosphate	1g	1g
Tween 1.8% (5.4mL/300mL)	25mL	Eau distillée qsp	998mL	Magnésium sulfate	500mg	500mg
Eau distillée qsp	787,5mL			Maltose	5g	5g
Tartrate d'ammonium (3.2g/200mL)	12,5mL	A FILTRER APRES AUTOCLAVE		Glucose	20g	20g
Agar	20g	Thiamine (2.5mg/25mL)	1mL	Agar	20g	20g
		Kanieltra (sol : 100mL/L)	1mL	Eau distillée qsp	996mL	996mL
A FILTRER APRES AUTOCLAVE		MALT AGAR	1 L	A FILTRER APRES AUTOCLAVE		
CaCl ₂ (1g/100mL)	10mL	A AUTOCLAVER		Thiamine (2.5mg/25mL)	2mL	2mL
KH ₂ PO ₄ et MgSO ₄ (20+5g/200mL)	20mL	Malt	40 g	Kanieltra (sol : 100mL/L)	2mL	2mL
Mélange d'éléments traces	35mL	Agar	20 g			
Thiamine (6mg/30mL)	5mL	Eau distillée qsp	1 L			
Alcool vératryl	70,2μL					
MnCl ₂ (445mg/50mL)	5mL					

MELANGE D'ELEMENTS TRACES	500mL
Nitritotriacetate	1,5g
mgSO ₄	3g
NaCl	1g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,1g
CoCl ₂	0,1g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,1g
CuCl ₂	0,1g
ALK	10mg
H ₃ BO ₃	10mg
NaMoO ₄ 2H ₂ O	10mg

KIANELTRA	50mL
FeSO ₄ 7H ₂ O	300mg
ZnSO ₄ 7H ₂ O	114mg
CuCl ₂	31mg
Mn	250mg
H ₃ BO ₃	422mg
NaMoO ₄ 2H ₂ O	35mg

Tableau 4 : Composition des différents milieux gélosés Tien & Kirk, malt agar, Pachlewski et PDA utilisés pour les analyses (Kirk et al., 1986; Martin et al., 1994).

b. Le milieu pour l'extraction d'ADN génomique

Les souches sélectionnées pour l'extraction d'ADN génomique (ADNg) sont cultivées en boîte de Pétri sur un milieu malt/agar 4% (décrit au dessus) avec ajout d'une feuille de cellophane. Celle-ci a été préalablement découpée, chauffée 20 min dans 1L d'eau ultra pure contenant 0,5g d'EDTA, rincée à l'eau ultra pure et autoclavée deux fois (la feuille de cellophane servant à faciliter la récupération du mycélium). Les souches sont placées à 25°C dans le noir jusqu'à croissance complète. Trente boîtes de chaque souche sont ensemencées afin d'obtenir une grande quantité de matériel.

III. Paramètres physiologiques et dégradation

1) Vitesse de croissance

Pour comparer les souches d'un point de vue phénotypique, autre que l'observation directe du mycélium et de la pigmentation, un test de croissance est réalisé.

Les souches sont mises en culture sur cinq milieux différents décrits précédemment : milieu malt/agar, milieu Tien and Kirk (Kirk et al., 1986), milieu Potato Dextrose Agar (PDA) modifié et deux milieux Pachlewski modifiés (Martin et al., 1994) notés P5 et P25. Un plug issu d'une boîte de génération F0 est découpé à l'aide d'un emporte pièce de 6mm de diamètre et placé au milieu de la boîte de Petri. Les boîtes sont ensuite placées à 25°C dans le noir et la vitesse de croissance du mycélium est mesurée en mm tous les deux jours. Pour cette étude des triplicats sont réalisés pour chaque souche. Des courbes permettant de visualiser la vitesse de croissance sont réalisées en incluant les écarts types.

2) Dégradation du bois et perte de masse

Dans le but d'étudier la capacité de dégradation des différentes souches sur différents bois et les systèmes, notamment la production d'enzymes extracellulaires, impliquées dans ce phénomène, deux tests ont été réalisés. Le premier est un test de perte de masse adapté de la norme NF EN 113 (ISSN 0335-3931). Cette norme décrit une méthode déterminant l'efficacité des produits de préservation du bois contre les champignons basidiomycètes lignivores. La résistance et la durabilité du bois sont ainsi déterminées. Le second est un test de dégradation permettant alors d'étudier spécifiquement les protéines impliquées dans la dégradation.

Mesure de la perte de masse. Les souches de *Trametes versicolor*, sont mises en culture sur boîte de Pétri contenant un milieu malt/agar 4% pendant deux semaines à 25°C dans le noir (cinq boîtes par souche et par essence). En conditions stériles, des pièces de bois, appelées éprouvettes à la dimension suivante : 25x15x5mm sont placées sur le mycélium interposé d'un fin grillage (trois éprouvettes par boîte). Les éprouvettes proviennent de bois de hêtre, de chêne (duramen et aubier) ou d'épicéa. Elles ont été préalablement séchées 48h à 103° et pesées afin d'obtenir leur poids anhydre avant dégradation (m_0). Les souches sont placées à 25°C, 70% d'humidité dans le noir. Après douze semaines, le champignon entourant les éprouvettes est éliminé à l'aide de pinces et celles-ci sont de nouveau séchées 48h à 103°C puis pesées afin d'obtenir leur poids anhydre après dégradation (m_1). Le pourcentage de perte de masse est ensuite calculé selon la formule suivante :

$$\Delta m = ((m_0 - m_1) / m_0) * 100$$

Test de dégradation. Les souches de *Trametes versicolor* sont mises en culture sur boîte de Pétri contenant un milieu malt/agar 4% pendant deux semaines à 25°C dans le noir. En condition stériles, des éprouvettes à la dimension suivante : 25x15x5mm sont placées sur le mycélium. Les éprouvettes provenant de bois de hêtre ou de chêne aubier ont été préalablement séchées 48h à 103°. Les souches sont placées à 25°C dans le noir. Après quatre semaines, le champignon entourant les éprouvettes est éliminé à l'aide de pinces et celles-ci sont soumises à une extraction de protéines décrite dans le paragraphe V.1)a.

IV. Techniques de biologie moléculaire

1) ADN génomique (ADNg)

L'étude de l'ADN permettra dans cette thèse de vérifier la validité des souches et d'étudier le génome complet des différentes souches.

a. Extractions

Dans le but d'étudier le génome entier de 10 souches différentes de *Trametes versicolor* et afin d'obtenir un ADNg de bonne qualité avec un rendement maximal (répondant aux demandes suivant l'utilisation faite) les extractions des différents ADNg sont réalisées en utilisant le kit de purification Qiagen® genomic-tip 100/G selon le protocole optimisé décrit ci-dessous.

Extraction d'ADNg pour séquençage. Pour réaliser l'extraction plusieurs tampons ont été préalablement réalisés et autoclavés (Tableau 5).

TAMPON A, pH 7,5	500 Ml eau ultra pure	TAMPON C	300 mL eau ultra pure
Sorbitol 0,35M	31.88g	Sarkosyl 5%	50mL
Tris 0,1M	8.56g		
EDTA 5mM	0.93g	SOLUTION KAc, pH7	250 mL eau ultra pure
		Potassium acétate 5M	72.67g
TAMPON B, pH7,5	500 mL eau ultra pure	SOLUTION NaAc, pH7,5-8	150 mL eau ultra pure
Chlorure de sodium 2M	58.44g	Sodium acétate 3M	36.91g
Tris 0,2M	17.12g		
EDTA 50mM	9.3g	SOLUTION QC pH7	500 mL eau ultra pure
CTAB 2% (hexadecyltrimethylammonium bromide)	0	Chlorure de sodium 1,35M	39.4g
		MOPS 50mM	5.23g
SOLUTION PVP	200 mL eau ultra pure		
Polyvinylpyrrolidone 1%	72.67g	<u>FILTRE</u>	
		Isopropanol 15%	75mL
SOLUTION QBT pH7	500 mL eau ultra pure	SOLUTION QF pH8,5	500 mL eau ultra pure
Chlorure de sodium 750mM	21.91g	Chlorure de sodium 1,25M	36.5g
MOPS 50mM	5.23g	Tris 50mM	3.05g
<u>FILTRE</u>		<u>FILTRE</u>	
Isopropanol 15%	75mL	Isopropanol 15%	75mL
Triton X 100 0,15%	0.75mL		

Tableau 5 : Composition des différents tampons pour l'extraction d'ADNg

Pour chaque souche, après culture sur milieu malt/agar 4% - cellophane, le mycélium de toutes les boîtes est prélevé et broyé dans l'azote liquide. 1g de poudre est ensuite transféré dans un tube Falcon de 50mL et le reste de poudre conservée à -80°C. Dans le Falcon contenant la poudre est ajouté 13mL de tampon A, 13mL de tampon B (préalablement incubé à 65°C), 5,2mL de tampon C, 3,5mL de solution PVP et 250µL de

protéinase K. Les tubes sont vigoureusement agités et incubés 45min à 65°C. Après incubation le volume total de chaque tube est séparé en deux dans deux autres Falcon de 50mL et auxquels sont ajoutés 5,75mL de solution KAc. Les tubes sont mélangés par retournement, incubés 30min sur glace puis centrifugés à 5000g à 4°C pendant 20min. A cette étape les tubes présentent 3 phases : une 1^{ère} supérieure contenant des protéines, une 2^{ème} contenant l'ADN et une 3^{ème} contenant les débris cellulaires. La première phase supérieure est éliminée à l'aide d'une pipette et la seconde phase est transférée dans un Falcon de 50mL. Un volume d'une solution chloroforme : isopropanol (24 :1) est ajouté puis les tubes sont centrifugés à 4000g à 4°C pendant 10min. La phase aqueuse (phase supérieure) est transférée dans un nouveau Falcon et 125µL de RNase A pour 15mL de volume sont ajoutés. Les tubes sont incubés 90 min à 37°C puis une nuit à -20°C. Le lendemain, 1/10^{ème} de volume de solution NaAc et 1 volume d'isopropanol sont ajoutés directement dans chaque tube encore congelé. Les tubes sont incubés à température ambiante jusqu'à décongélation totale puis centrifugés à 10000g à 4°C pendant 30min. Une fois le surnageant éliminé, le culot est lavé avec 2mL d'éthanol 70% et centrifugé à 10000g à 4°C pendant 10min. Le surnageant est de nouveau éliminé et le culot séché 5min à température ambiante. Chaque culot est repris dans 1ml de TE (solution de Tris 10mM, EDTA 1mM) préalablement incubé à 65°C. Deux culots du même ADN_g sont poolés et 4mL de Tampon QBT sont ajoutés. Les colonnes Genomic-tip sont placées sur des Falcon de 50mL neufs et équilibrés par ajout et passage de 4mL de tampon QBT. L'ADN_g est ensuite chargé sur la colonne. Une fois l'ADN chargé, les colonnes sont lavées deux fois avec 15mL de tampon QC. Pendant ce temps, dans des tubes à centrifuger sont ajoutés 600µL de solution NaAc et 5mL d'isopropanol. Ces tubes sont placés dans de la glace et les colonnes (une fois totalement lavées) sont ensuite placées au dessus des tubes à centrifuger. L'ADN est élué dans le mélange avec 5mL de tampon QF préalablement incubé à 50°C. Les tubes sont centrifugés à 10000g à 4°C pendant 20min. Le surnageant est éliminé, le culot resuspendu dans 1.5mL d'éthanol 70% et transféré dans un tube Eppendorf 2mL. Les tubes sont centrifugés à 10000g à 4°C pendant 5min. Le surnageant est éliminé, le culot est séché 5min à température ambiante puis resuspendu dans un volume de TE à 65°C variable en fonction de la taille du culot (entre 10µL et 50µL par culot). L'ADN_g est stocké a -20°C jusqu'à utilisation.

La concentration ainsi que les ratios 260/280 et 260/230 relatifs à la qualité sont mesurés à l'aide d'un NanoDrop.

Une électrophorèse en gel d'agarose 1% contenant du bromure d'ethidium (BET) permettant la révélation des acides nucléiques sous ultra-violet (UV) est réalisée. 1,2µL d'ADNg sont mélangés à 1,2µL de tampon de charge puis déposés sur gel. Après migration des échantillons 45min à 110V, la révélation de l'ADNg est effectuée sous lampe UV.

b. Réaction en chaîne de polymérase (PCR)

La PCR est une technique permettant d'amplifier une séquence connue à partir d'ADN et d'amorces spécifiques. Elle est basée sur un cycle répété n fois se déroulant en 3 étapes : une première phase de dénaturation des brins d'ADN, une seconde phase d'hybridation des amorces et une troisième phase d'élongation de la séquence voulue par une enzyme (Taq Polymérase). Dans notre étude la PCR va permettre d'amplifier des régions ITS, spécifiques de champignons, et alors de vérifier après séquence la validité de l'espèce des souches sélectionnées. Elle est réalisée à partir de l'ADNg extrait précédemment.

PCR pour amplification de régions ITS et clonage de protéine. L'enzyme utilisée est l'Herculase II Fusion (Agilent Technologie). Pour une PCR, 50µL d'un mélange réactionnel sont préparés selon les proportions suivantes : 10µL de tampon 10X Herculase II, 3µL de dNTP (25mM), 0,5µL d'amorces ITS1 (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) et ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (10µM), 0.5µL de Taq polymérase Herculase II fusion et 35µL d'eau ultra pure. 49,5µL de mix sont ajoutés dans un tube PCR 200µL contenant 0,5µL d'ADNg. Le cycle de PCR est programmé : 1min à 95°C ; puis 35 cycles de 20s à 95°C, 20s à TM-5°C (=50°C), 2min à 68°C ; puis une étape finale de 4min à 72°C. Une électrophorèse en gel d'agarose 1% contenant du BET est réalisée. 1,2µL de produit PCR sont mélangés à 1,2µL de tampon de charge puis déposés sur gel. Après migration des échantillons 45min à 110V, la révélation de l'ADNg est effectuée sous lampe UV.

PCR pour amplification de colonies bactériennes. L'enzyme utilisée est la Gotaq Flexi DNA polymerase (Promega). Pour une PCR, 20µL d'un mélange réactionnel sont préparés selon les proportions suivantes : 4µL de tampon 5X Green Gotaq Flexi, 1,2µL de MgCl₂ (25mM), 0,8µL de dNTP (25mM), 0,4µL d'amorces oligoFor et oligoRev (10µM), 0.05µL de Taq polymérase GoTaq flexi et 12,75µL d'eau ultra pure. Un clone est piqué directement sur boîte est mélangé au mix. Le cycle de PCR est programmé : 2min à 95°C ; puis 30 cycles de 30s à 95°C, 30s à TM-5°C (=50°C), 1min à 72°C ; puis une étape finale de 5min à 72°C. Une électrophorèse en gel d'agarose 1% contenant du BET est réalisée. 20µL de produit PCR sont mélangés à 5µL de tampon de charge puis déposés sur gel. Après migration des échantillons 45min à 110V, la révélation est effectuée sous lampe UV.

c. Séquençage

Les séquençages réalisés dans cette étude permettront dans un premier temps de valider que les souches sélectionnées. Dans un second temps un séquençage de génome entier permettra l'analyse fine de chaque souche.

Séquençage des régions ITS. Après extraction d'ADNg et PCR avec amplification des régions ITS, 15ng de produits PCR sont envoyés pour séquençage. Celui-ci est réalisé par EUROFINS® Genomics. Une fois les résultats obtenus, un BLAST est réalisé avec les séquences sur le site du JGI contre le génome de *Trametes versicolor*.

Séquençage du génome. Après extraction d'ADNg et dosage 5µg d'ADN concentré à minimum à 100ng/µL sont envoyés au séquençage. Celui-ci est réalisé par IGA Technology, séquençage illumina.

2) ARN

L'étude de l'acide ribonucléique (ARN), produit de transcription de l'ADN, permettra de faire des analyses de transcriptomique.

a. Extraction

Dans le but de réaliser une étude de transcriptomique les extractions des différents ARN sont réalisées en utilisant le kit de purification Qiagen® RNeasy plant mini kit selon les recommandations du fournisseur.

Le mycélium des différentes souches à étudier dans les différentes conditions souhaitées est broyé dans l'azote liquide. 100mg de poudre sont pesés dans un tube Eppendorf 1,5mL et 450µL de tampon RLT sont ajoutés. Les tubes sont vortexés et incubés 3min à 56°C. L'ensemble du contenu des tubes est transféré sur une colonne QIAshredder et centrifugé 2min à vitesse maximale. Le surnageant du filtrat est transféré dans un nouvel Eppendorf 1,5mL auquel est additionné 0,5 volume d'éthanol 100%. Les tubes sont immédiatement mélangés par pipetage et le tout est chargé sur une colonne RNeasy spin. Après centrifugation 30s à 8000g, le filtrat est éliminé. Les colonnes subissent un premier lavage par addition de 350µL de tampon RW1 et centrifugation 30s à 8000g. 10µL de DNase et 70µL de tampon RDD (Qiagen®) sont ajoutés aux colonnes. Après incubation 30min à température ambiante, 350µL de tampon RW1 sont additionnés et les colonnes sont centrifugées 30s à 8000g. Le filtrat est éliminé. Deux autres lavages successifs sont effectués par addition de 500µl de tampon RPE et centrifugation à 8000g pendant respectivement 30s et 2min. Les colonnes sont placées sur des tubes Eppendorf 1,5mL et les ARN sont élués avec 40µl d'eau RNase-free par centrifugation à 8000g pendant 1min. Les ARN sont par la suite purifiés et concentrés.

b. Purification et dosage

Une purification après extraction est effectuée dans le but d'avoir des ARN de qualité optimum. Elle est réalisée avec le kit Zymo Research® RNA Clean & Concentrator™-5 selon le protocole fourni à cet effet.

Aux ARN extraits, sont ajoutés dans un tube Eppendorf 1,5mL ,deux volumes de tampon RNA binding buffer et un volume équivalent au volume total d'éthanol 100%. Les tubes sont mélangés par retournement puis le contenu est transféré sur une colonne Zymo-Spin™ IC. Après centrifugation 30s à vitesse maximale, le filtrat est éliminé et 400µL de tampon RNE Pep sont ajoutés puis les colonnes sont de nouveau centrifugées 30s à vitesse maximale. Deux lavages successifs sont réalisés par addition de respectivement 700µL puis 400µL de tampon RNA Wash et centrifugation à vitesse maximale pendant 30s puis 2min. Les colonnes sont placées sur des tubes Eppendorf 1,5mL et les ARN sont élués avec 40µl d'eau RNase-free par centrifugation à vitesse maximale pendant 30s. Les ARN sont dosés au NanoDrop et conservés à -20°C.

c. Transcriptomique

La transcriptomique est l'étude de l'ensemble des ARN messagers produits lors du processus de transcription d'un génome. Elle permet d'avoir une indication relative du taux de transcription de différents gènes dans des conditions données.

Après extraction d'ARN et dosage 500ng d'ARN concentré au minimum à 10ng/µL sont envoyés au séquençage en plaque PCR 96 puits. Un séquençage Illumina Automated RNA seq est réalisé par Beckman Coulter Genomics.

3) Protéines

Dans le but de réaliser divers tests enzymatiques et de cristallographie, la production de protéines mutantes de GHR de *T. versicolor* est réalisée. Deux mutants de

la TvGHR1 sont réalisés : au niveau du site catalytique (CPWA) afin de muter la cystéine 56 en sérine et au niveau du site H pour muter la sérine 295 en histidine.

Six amorces sont dessinées afin de réaliser un clonage et d'obtenir deux protéines His-tag et mutées. Deux amorces externes pour l'amplification du gène dans sa totalité avec présence d'un His_tag en C-terminal dans le pET26b nommées respectivement OLIGO1 et OLIGO4 pour le 5' et le 3'. Et quatre amorces internes pour l'amplification du gène avec la mutation C56S nommées respectivement OLIGO3 et OLIGO2 pour le 5' et le 3' et l'amplification du gène avec la mutation S295H nommées respectivement OLIGO6 et OLIGO5 pour le 5' et le 3'.

Oligo externes:pET26B, sites de restriction NdeI/NotI

OLIGO1 For 5' = CATATGGCAGCCACACGCGAC
OLIGO4 Rev 3' = GCGGCCGCTCAATGGTGATGGTGATGGTGCAAAGGCAAGAT

Oligo internes mutation

OLIGO3 For 5' = TACGTCGCGTATTCC**TCC**CCGTGGGCGACGCGA
OLIGO2 Rev 3' = TCGCGTCGCCCACGG**GGAG**GGAATACGCGACGTA

OLIGO6 For 5' = GACCATATCAAGGCG**CAC**TATTACGCGCAGAAG
OLIGO5 Rev 3' = CTTCTGCGCGTAATA**GTG**CGCCTTGATATGGTC

Quatres PCR, avec les OLIGO1/OLIGO2, les OLIGO3/OLIGO4, les OLIGO1/OLIGO et les OLIGO6/OLIGO4 sont réalisées en parallèle comme décrit dans le chapitre IV.1)b. avec l'enzyme Herculase et 30 cycles. Un gel BET d'agarose est réalisé puis les bandes correspondant aux fragments amplifiés sont découpées. Les fragments sont purifiés à l'aide d'un kit Illustra GFX (GE healthcare). L'élution finale est réalisée avec 30µL d'eau ultra pure. Une troisième PCR est ensuite effectuée avec les deux fragments pour chaque mutation, sans oligo avec l'enzyme Herculase sur 10 cycles. Les OLIGO1/OLIGO4 sont ensuite ajoutés aux mélanges puis une dernière PCR est réalisée avec l'enzyme Herculase et 30 cycles. Un gel BET d'agarose est réalisé puis les bandes correspondantes aux fragments amplifiés sont découpées. Les fragments sont purifiés à l'aide d'un kit Illustra GFX (GE healthcare). L'élution finale est réalisée avec 80µL d'eau ultra pure. Une digestion des fragments est ensuite réalisée avec les 80µL élués, 9µL de tampon de

digestion et 1,5µL de chaque enzyme de restriction correspondantes au site NdeI et NotI pendant 1H à 37°C. Le fragment est purifié à l'aide d'un kit Illustra GFX (GE healthcare). L'élution finale est réalisée avec 30µL d'eau ultra pure. Pour la ligation, 15µL de fragment et 1,5µL de plasmide pET26b sont mélangés et chauffés 1min à 50°C. 2µL de tampon ligase et 2µL de ligase sont ensuite ajoutés au mélange plasmide/fragment et incubé 1 nuit à 4°C. Des souches d'*Escherichia coli* DH5α sont transformées avec le plasmide par choc thermique. 10µL de plasmide sont ajoutés à 40µL de bactéries compétentes et placé 30min dans la glace. Le mélange est ensuite chauffé 30s à 42°C puis placé à nouveau dans la glace 5min. 500µL de SOC (20g/L de bactotryptone, 5g/L d'extrait de levure, 0,5g/L de NaCl, 0,2g/L de KCl et 10mL/L d'une solution filtrée de MgSO₄ 1M, MgCl₂ 1M et 10mL/L de glucose 20%). Les bactéries sont incubées 1H à 37°C sous agitation 150rpm. Les tubes sont centrifugés 1min à 13000rpm, 300µL de surnageant est éliminé et le culot est repris avec le surnageant restant. Sous hotte stérile, sur une boîte de LB agar 35g/L sont étalés 50µg/mL de kanamycine (Ci = 50mg/mL) puis le culot bactérien préalablement repris. Les boîtes sont placées dans une étuve à 37°C à l'obscurité pendant une nuit. Le lendemain un clone est sélectionné pour servir à la production de plasmide. Une PCR sur colonie dans les conditions décrites dans le chapitre IV.1)b. avec l'enzyme GoTaq flexi est préalablement réalisée avant la production afin de vérifier que le clone soit positif. Une fois testé positif, la production de plasmide est réalisée. Un clone est piqué sur boîte et ajouté directement dans un milieu LB liquide (5mL) contenant 50µg/mL de kanamycine et incubé 1 nuit à 37°C sous agitation 150rpm. Le lendemain les plasmides produits sont purifiés à l'aide d'un kit PureYield™ Plasmid Miniprep system (Promega) selon les recommandations du fournisseur. Les 5 mL de culture sont centrifugés, le surnageant éliminé et le culot repris dans 600µL d'eau ultra pure. 100µL de tampon de lyse et 350µL de solution de neutralisation sont ajoutés et le tube est mélangé par retournement puis centrifugé 3min, vitesse maximum. Le surnageant est transféré sur une colonne PureYield™ Minicolumn et centrifugé 15s. 200µL de tampon REB sont ajoutés sur la colonne. Une centrifugation de 15s est de nouveau réalisée puis 400µL de solution de lavage CWC sont ajoutés sur la colonne et centrifugé 30s. La colonne est transférée sur un tube Eppendorf 1,5mL et les plasmides sont élués avec 30µL d'eau ultra pure. 15µL de plasmides sont envoyés au séquençage afin de vérifier l'exactitude de la séquence et la présence de la mutation au niveau du site catalytique C56S ou du site S295H.

Une fois la séquence vérifiée exacte la production de la protéine mutante par transformation de souche d'*Escherichia coli* Rosetta pLysS puis la purification de la protéine His-tag sont réalisées comme décrit dans le chapitre VI.1).

V. Techniques de protéomique

1) Extraction des protéines

a. Les protéines de sécrétome

Après culture des souches sur bois de hêtre ou chêne aubier comme décrit précédemment dans le paragraphe III.2), les protéines impliquées dans la dégradation du bois sont extraites. Le mélange obtenu est appelé sécrétome.

Les éprouvettes de bois dépourvues de champignon sont placées dans des Falcon de 50mL à raison de six par tube maximum. Un tampon acétate de sodium 0,1M pH4,5 est ajouté (5mL pour trois éprouvettes) et les tubes sont incubés couchés sous agitation pendant 2H à température ambiante. Les éprouvettes sont ensuite enlevées des tubes et ceux-ci sont centrifugés 10min à 10000g à température ambiante. Les surnageants sont récupérés et les même sécrétomes sont poolés. Les échantillons sont conservés à -20°C.

b. Les protéines de l'exsudat

Lors de la culture sur malt/agar 4% ou en présence de bois certaines souches produisaient un exsudat plus ou moins coloré. Afin de l'analyser, celui-ci a été directement prélevé à l'aide d'une pipette (en prenant soin de ne pas prélever de mycélium) et conservé à -80°C.

2) Dosage protéique

Un dosage protéique est réalisé sur les différents sécrétomes et exsudat de malt avec le kit Interchim® BCassay. Ce dosage est basé sur le principe de *BiCinchoninic acid Assay* (BCA) décrit pour la première fois en 1985 par Smith (Smith et al., 1985) reposant sur la réduction d'ion cuivrique.

Pour le dosage, 200µl de sécrétome ou exsudat sont précipités dans 1ml de mélange éthanol/TCA80% une nuit à -20°C. Les tubes sont centrifugés à 12000rpm à 4°C pendant 10min. Le surnageant est éliminé et les culots sont lavés deux fois avec de l'éthanol glacial. Les culots sont ensuite repris avec 50µL de sodium dodecyl sulfate (SDS) 0,2%. 1ml du réactif du kit préalablement préparé en additionnant 50 volumes de tampon A et 1 volume de tampon B est ajouté aux échantillons. Un blanc contenant 50µl de SDS 0,2% est également réalisé. Les échantillons sont incubés à 37°C pendant 30min puis 5min dans de la glace. Le dosage est effectué par spectrophotométrie. La densité optique (DO) de chaque échantillon à 562nm est relevée et la concentration en protéines est déterminée selon l'équation suivante :

$$y = 0,0161x$$

3) Analyses LC/MS

Pour une étude comparative des protéines présentes dans les différents sécrétomes une analyse de spectrométrie de masse est réalisée (Navarro et al., 2014), analyse réalisée en collaboration avec l'UMR de Biodiversité et Biotechnologie Fongiques, Marseille.

Une courte électrophorèse SDS-PAGE est réalisée avec des gels pré-coulés de gradient 4 à 12% Bis Tis (Mini Gels, Invitrogen, France). 10µg de sécrétome repris dans 15 µL de tampon de charge Laemmli (62,5mM de Tris pH6,8 ; 25% de glycérol ; 2% de SDS et 0,01% de bleu de bromophénol (Laemmli, 1970) sont déposés sur gel et une migration est effectuée à 100V pendant 5min. Les gels sont ensuite colorés au bleu de Coomassie (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). Chaque bande est découpée, placée

dans un tube avec 100µL d'eau ultra pure et envoyée en analyse. L'identification des protéines est réalisée sur la plateforme PAPPSO (Plateforme d'Analyse Protéomique se Paris Sud Ouest). Une digestion trypsique des bandes est réalisée selon le protocole standard. Les bandes sont lavées deux fois dans une solution d'acétonitrile 50% (v/v) et de carbonate d'ammonium 25mM et incubées 1h à 56°C en présence de 10mM de dithiothreitol (DTT). Après refroidissement, le surnageant est éliminé et les échantillons sont incubés dans 55mM d'iodoacétamide dans le noir à température ambiante. Les bandes sont de nouveau lavées avec de l'acétonitrile 100% puis lyophilisées (SpeedVac, Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France). Une digestion est ensuite réalisée à 37°C pendant 8H avec 200ng de trypsine modifiée (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) préalablement dissous dans 25mM de carbonate d'ammonium. Les peptides tryptiques sont extraites avec une solution d'acétonitrile 50% (v/v) et d'acide trifluoroactétique 0,5% (v/v) puis avec de l'acétonitrile pur. Les échantillons sont lyophilisés et repris dans 25µL d'une solution d'acétonitrile 2% (v/v), d'acide trifluoroactétique 0,05% (v/v) et d'acide formique 0,08% (v/v). Puis ils sont passés en chromatographie liquide haute performance, HPLC (NanoLC-UltraSystem, Eksigent, Les Ulis, France). Les produits de digestion sont alors concentrés et dessalés sur une pré-colonne Cartridge (PepMap 100 C₁₈, 0.3 × 5 mm, Dionex, Thermo Fisher Scientific) avec 0,1% de d'acide méthanoïque pendant 3min avec un débit de 7,5µL/min. Les peptides sont ensuite élués sur une colonne de séparation (C₁₈, 0,075 × 0,15 mm, Biosphere Nanoseparations, Nieuwkoop, The Netherlands) avec un gradient d'acétonitrile de 5 à 35% et 0,1% d'acide méthanoïque pendant 40min avec un débit de 300nl/min. Les échantillons sont par la suite passés sur un spectromètre de masse (Thermo Fisher Scientific, United States) et subissent une ionisation (1,8kV) avec un émetteur en acier inoxydable (30µm de diamètre, Thermo Electron, Villebon-sur-Yvette, France). Les ions peptidiques sont analysés en utilisant Xcalibur2.1 (Thermo Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) et les données sont converties au format mzXML à l'aide du logiciel ReAdW (SPC Proteomics Tools, Seattle, USA). Par comparaison des données MS/MS contre la base de données protéique UniProtKb de *Trametes versicolor*, les protéines présentes dans le sécrétome sont identifiées. Seules celles ayant au moins deux peptides uniques et un E-value inférieur à 1.10⁻⁸ sont validées pour analyse.

4) Profil enzymatique

a. Précipitation des protéines

Pour analyser les profils protéiques des sécrétomes et de l'exsudat deux précipitations éthanol/TCA sont réalisées. Soit 8µg ou 20µg de protéine sont précipités dans 1ml de mélange éthanol/TCA80% une nuit à -20°C. Les tubes sont centrifugés à 12000rpm à 4°C pendant 25min. Le surnageant est éliminé et les culots sont lavés deux fois avec de l'éthanol glacial. Les culots sont séchés à température ambiante puis repris dans 15µL de tampon de charge Laemmli contenant du β-mercaptoéthanol.

b. Gel d'électrophorèse (SDS-PAGE)

Le SDS-PAGE, électrophorèse en gel de polyacrylamide, est une technique permettant de séparer les protéines en fonctions de leur poids moléculaires (Dalglish, 1979; Neville Jr and Glossmann, 1974) et de les visualiser après colorations spécifiques.

Les gels d'acrylamide 15% divisés en deux parties, une partie inférieure appelée gel de séparation et une partie supérieure appelée gel de concentration (Tableau 6), sont placés dans une cuve d'électrophorèse (BioRad) contenant un tampon de migration 1X (tampon 10X : 30g de Tris, 144g de glycine et 10g de SDS qsp 1L d'eau ultra pure).

GEL DE SEPARATION 15%	2 GELS	GEL DE CONCENTRATION 5%	2 GELS
Tampon Tris-HCl pH 8.8 1.5M	1.875 mL	Tampon Tris-HCl pH 6.8 0.5M	0.5 mL
Eau distillée	2.680 mL	Eau distillée	1.180 mL
Acrylamide 40%	2.810 mL	Acrylamide 40%	266 µL
SDS 20%	37.5 µL	SDS 20%	10 µL
APS 10%	45 µL	APS 10%	18 µL
TEMED	11 µL	TEMED	3.32 µL

Tableau 6 : Composition des gels de polyacrylamide pour la réalisation d'électrophorèses.
 SDS = Sodium Dodecyl Sulfate ; APS = PerSulfate d'Amonium ,
 TEMED = TETraMéthylEthylèneDiamine

Les échantillons protéiques (15µL) repris dans du tampon de charge Laemmli (Laemmli, 1970) sont déposés sur gel avec 2µL d'un marqueur de taille précoloré (Prestained Protein Standards, BioRad). Une migration est effectuée pendant 1h30 à un voltage compris entre 130V et 180V. Différentes colorations sont ensuite réalisées.

c. Colorations

Pour visualiser les protéines après migration, les gels d'électrophorèse sont colorés. Dans notre étude trois colorations spécifiques sont utilisées en fonction de l'analyse à effectuer.

Coloration relative à la production et purification de protéine (chapitre VI.1). Les gels SDS-PAGE sont plongés dans une solution de bleu de Coomassie pendant 5-10min sous agitation puis décolorés dans une solution d'acide acétique/éthanol une nuit sous agitation (Tableau 7). Les gels sont ensuite conservés dans de l'eau.

SOLUTION DE BLEU DE COOMASSIE	1 L
Acide acétique	100 mL
Eau distillée	450 mL
etOH	450 mL
Coomassie blue R250	50 pelletiez

SOLUTION DE DECOLORATION	
Acide acétique	75mL
etOH	50mL

Tableau 7 : Composition de la solution de bleu de Coomassie et de la solution de décoloration pour la coloration de gels SDS-PAGE

Coloration au bleu relative à l'analyse de profils protéiques des sécrétomes. Les gels SDS-PAGE sont plongés dans une solution de fixation 30min sous agitation, lavés trois fois 10min avec de l'eau ultra pure puis colorés une nuit dans une solution de bleu Candiano (Tableau 8) sous agitation (Candiano et al., 2004). Les gels sont ensuite conservés dans de l'eau.

SOLUTION DE FIXATION	Pour 1 gel (50mL)	Concentration finale
Ethanol 100%	20mL	40% (v/v)
Acide acétique	5mL	10% (v/v)
Eau ultra pure qsp	50mL	

SOLUTION DE COLORATION	Pour 1 gel (50mL)	Concentration finale
Acide phosphorique 85%	5mL	10% (v/v)
Méthanol	5mL	10% (v/v)
Ethanol 100%	4mL	10% (v/v)
Sulfate d'ammonium	5g	10% (p/v)
Coomassie G-250	0.06g	0.12% (p/v)
Eau ultra pure qsp	50mL	

Tableau 8 : Composition des solutions pour la coloration au bleu de Candiano de gels SDS-PAGE.

Coloration au nitrate d'argent relative à l'analyse de profils protéiques des sécrétomes. Les gels SDS-PAGE sont plongés dans une solution de fixation 1 nuit sous agitation. Ils sont ensuite placés dans une solution de sensibilisation pendant 2h15 à l'obscurité sous agitation puis lavés trois fois 20min avec de l'eau ultra pure. Les gels subissent ensuite une étape de coloration pendant 30min puis un lavage de 30s dans de l'eau ultra pure. La coloration est ensuite révélée par une solution de développement entre 5 et 10min sous agitation. Celle-ci est stoppée par une solution d'arrêt (Tableau 9). Les gels sont laissés jusqu'à 3 jours dans cette solution puis sont conservés dans de l'eau.

SOLUTION DE FIXATION	Pour 1 gel (50mL)	Concentration finale
Ethanol 100%	15mL	30% (v/v)
Acide acétique	5mL	10% (v/v)
Eau ultra pure qsp	50mL	

SOLUTION DE SENSIBILISATION	Pour 1 gel (50mL)	Concentration finale
Ethanol 100%	10mL	20% (v/v)
Acétate de portassium	2,45g	0,5M
Potassium tétrathionate	0,15g	3g/L
Glutaraldéhyde 50%	0,5mL	0,5%)
Eau ultra pure qsp	50mL	

SOLUTION DE COLORATION	Pour 1 gel (50mL)	Concentration finale
Nitrate d'argent	0,1g	
Formaldéhyde 37%	35µL	
Eau ultra pure qsp	50mL	

SOLUTION DE DEVELOPPEMENT	Pour 1 gel (50mL)	Concentration finale
Carbonate de potassium	1,5g	30g/L
Formaldéhyde 37%	25µL	500µL/L
Na thiosulfate 5H ₂ O 2,48g/L	250µL	0,0124g/L
Eau ultra pure qsp	50mL	

SOLUTION D'ARRET	Pour 1 gel (50mL)	Concentration finale
Tris	2,5g	30g/L
Acide acétique	1,25mL	25mL/L
Eau ultra pure qsp	50mL	

Tableau 9 : Composition des solutions pour la coloration au nitrate d'argent de gels SDS-PAGE.

VI. Techniques biochimiques

1) Expression et purification de protéines

Quatorze GST de *T. versicolor* ont été choisies pour être produites, purifiées puis caractérisées : sept isoformes de la classe des GST oméga présentant une sérine catalytique (ID protéique sur le site JGI – 75639=GSTO-1S ; 56280=GSTO-2S ; 48691=GSTO-3S ; 65402=GSTO-4S ; 54358=GSTO-5S ; 23671=GSTO-6S et 71758=GSTO-7S), trois isoformes de la classe des GST oméga présentant une cystéine catalytique (ID protéique sur le site JGI – 157166=GSTO-1C ; 67635=GSTO-2C et 60698=GSTO-3C), trois de la classe des GHR (ID protéique sur le site JGI - 73942=GHR-1 ; 66368=GHR-2 et 50990=GHR-3) et une Ure2p (ID protéique sur le site JGI – 62807).

Pour la production, les séquences des différentes GST sélectionnées sont conçues à partir des séquences connues sur le site du JGI avec ajout d'un tag histidine en C-terminal excepté pour la GST Ure2p (Annexe 1). Des plasmides recombinants sont obtenus par synthèse des gènes synthétiques clonés entre les sites de restriction NdeI et NotI dans un plasmide pet26b (Genecust) (Annexe 2). Il est noté que pour les GST-1S le nucléotide 498 et GST-6S le nucléotide 99 ont été modifiés pour éviter d'avoir le site de restriction NdeI ou NotI dans la séquence. Des souches d'*Escherichia coli* Rosetta pLysS sont transformées avec les différents plasmides recombinants par choc thermique. 0,5µL de plasmide sont ajoutés à 40µL de bactéries compétentes et placés 30min dans la glace. Le mélange est ensuite chauffé 30s à 42°C puis placé à nouveau dans la glace 5min. 500µL de SOC (20g/L de bactotryptone, 5g/L d'extrait de levure, 0,5g/L de NaCl, 0,2g/L de KCl et 10mL/L d'une solution filtrée de MgSO₄ 1M, MgCl₂ 1M et 10mL/L de glucose 20%). Les bactéries sont incubées 1h à 37°C sous agitation 150rpm. Les tubes sont centrifugés 1min à 13000rpm, 300µL de surnageant sont éliminés et le culot est repris avec le surnageant restant. Sous hotte stérile, sur une boîte de LB agar 35g/L sont étalés 50µg/mL de chaque antibiotique chloramphénicol et kanamycine (Ci = 50mg/mL) puis le culot bactérien préalablement repris. Les boîtes sont placées dans une étuve à 37°C à l'obscurité pendant une nuit. Le lendemain un clone est sélectionné pour servir à la production de la protéine voulue. Dans un tube à essais contenant 3mL de LB à 20g/L 3µL de chaque antibiotique sont ajoutés, le clone est piqué à l'aide d'un cure-dent

préalablement autoclavé puis placé dans le tube. Celui-ci est placé une journée sous agitation à 37°C pour multiplication. Dans un Erlen contenant 200mL de LB 20g/L et 50µg/mL de chaque antibiotique, 1mL de bactéries transformées sont ajoutés puis placées une nuit à 37°C sous agitation 150rpm. Des Erlen contenant 1L de LB 20g/L et 50µg/mL de chaque antibiotique sontensemencés avec 50mL de bactéries incubées sur la nuit puis placés sous agitation 150rpm à 37°C jusqu'à attendre une $DO_{600nm} = 0,7$. 200µL sont prélevés pour servir de témoin négatif et 100µg/mL d'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) sont ajoutés pour induire la production de protéine. Les Erlen sont placés de nouveau à 37°C sous agitation pendant 4H. Les milieux contenant les bactéries et les protéines sont centrifugés 30min, 5000rpm à température ambiante. Les culots sont repris dans 15mL de tampon TE NaCl (30mM de Tris HCl pH8 1M, 1mM d'EDTA, 200mM de NaCl) et conservés à -20°C jusqu'à purification.

Purification des protéines His-tag. La purification des protéines His-tag se fait par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés, colonne IMAC. La technique est basée sur la liaison covalente de l'histidine à un métal sur une colonne (le nickel). Les culots obtenus lors de la production sont décongelés puis soniqués 4 fois 30s. 2µL, appelés Fraction Totale (FT), sont conservés dans un tube sur glace pour vérification sur gel SDS-PAGE, le reste est centrifugé à 4°C, 30min, 16000rpm. 5µL du surnageant, appelés Fraction Soluble (FS), sont conservés dans un tube sur glace. Le surnageant restant est récupéré dans un falcon auquel est additionné du tampon TE NaCl (Tableau 10) qsp 50mL. Le culot est repris dans 20 ml de tampon TE NaCl et 5µL, appelés Fraction Insoluble (FI), sont conservés dans un tube sur glace. La colonne IMAC est dans un premier temps équilibrée avec 75 mL de tampon Tris NaCl Imidazole 10mM (Tableau 10). Une fois équilibrée, les 50mL surnageant/tampon sont passés sur la colonne dans le but que la protéine His-tag s'accroche sur celle-ci. La fraction non retenue est collectée en sortie de colonne et 5µL, appelés fraction non retenue (FNR), sont conservés dans un tube sur glace. La colonne est ensuite lavée avec 75mL de tampon Tris NaCl Imidazole 10mM. Un scan entre 340-240nm au spectrophotomètre est effectué tous les 15mL afin de vérifier que la protéine ne se décroche pas et que tous autres contaminants soient éliminés en quasi-totalité. 5µL, appelé Fraction de Lavage (FL), sont conservés dans un tube sur glace. Une fois la colonne lavée, la protéine est

alors éluée à l'aide de 30mL de tampon Tris NaCl Imidazole 250mM (Tableau 10). 5µL, appelés Fraction d'Elution (FE), sont conservés dans un tube sur glace

TE NaCl pH8		1 L
Solution Tris HCl pH8 1M		30mL
EDTA 500mM		2mL
Eau distillée qsp		1 L
NaCl		11.7g

TRIS-50mM NaCl-300mM IMIDAZOLE-10 mM		1 L
Solution Tris HCl pH8 1M		50mL
NaCl 5M		60mL
IMIDAZOLE 1M		10mL
Eau ultra pure qsp		1 L

TRIS-50mM NaCl-300mM IMIDAZOLE-250 mM		1L
Solution Tris HCl pH8 1M		50mL
NaCl 5M		60mL
IMIDAZOLE 1M		250mL
Eau ultra pure qsp		1L

Tableau 10 : Composition des tampons pour la purification de protéines sur colonne IMAC.

Une mesure entre 340-240nm au spectrophotomètre est effectué tous les 10mL afin de vérifier que la protéine se décroche et que la totalité est éluée. Une DO de l'élution final est ensuite prise afin de calculer avec la formule suivante la quantité de protéine obtenue :

$$1\text{mg/mL} = x\text{DO (x, obtenue via ExPASy ProtParam avec la séquence protéique)}$$

$$\text{DOélution finale} = y \text{ mg/mL}$$

$$y \text{ mg/mL} * V_{\text{ef}} = \text{Quantité de protéine (V}_{\text{ef}} = \text{volume d'élution})$$

La colonne est ensuite rincée avec 50mL de tampon Tris NaCl Imidazole 250mM, puis 50mL de tampon Tris NaCl Imidazole 10mL, puis avec 100mL d'eau ultra pure et enfin 100mL d'éthanol 20% pour sa conservation à 4°C. Un gel SDS-PAGE comme décrit précédemment est réalisé et les différentes fractions préalablement reprises dans 15µL de Laemmli (Laemmli, 1970) et chauffées 10min à 95°C sont déposés puis colorées (Figure 33).

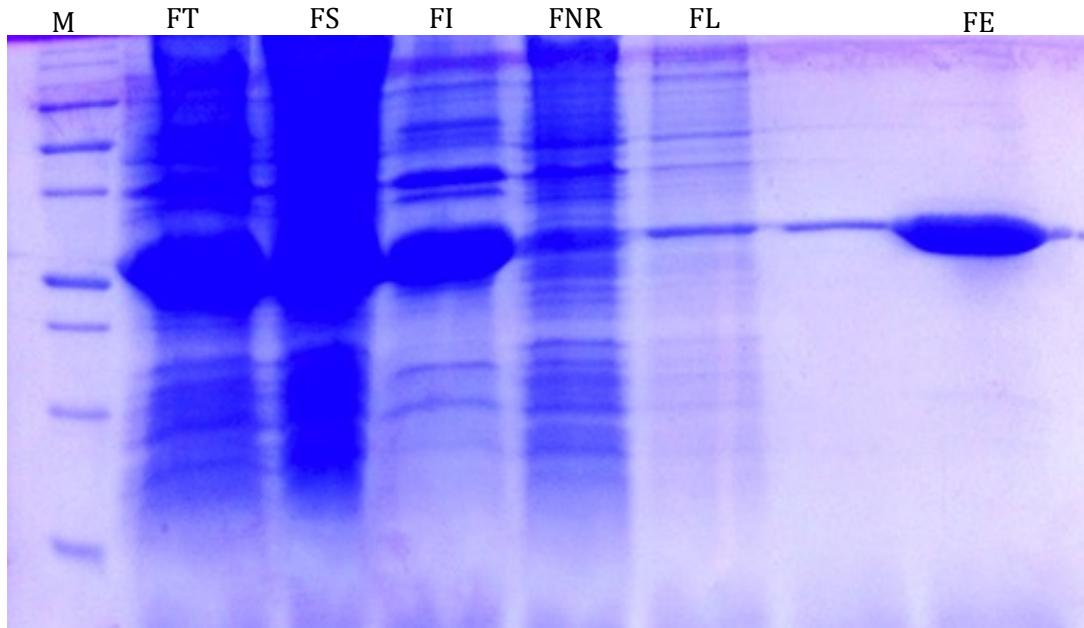


Figure 33 : Gel SDS-PAGE des différentes fractions de purification sur colonne IMAC.
M = marqueur de taille ; FT = fraction totale ; FS = fraction soluble ; FI = fraction insoluble ;
FNR = fraction non retenue ; FL = fraction de lavage et FE = fraction d'élution.

En parallèle de la réalisation du gel SDS-PAGE la protéine contenue dans la fraction d'élution est concentrée puis dialysée avec du tampon TE NaCl afin d'obtenir entre 1 à 2mL de protéine avec moins de 1mM d'Imidazole. Une DO à 280nm est mesurée puis la concentration de la protéine est calculée avec les formules suivantes :

$$1\text{mg/mL} = x\text{DO} \text{ (x, obtenue via ExPASy ProtParam avec la séquence protéique)}$$

$$\text{DO} \times \text{dilution} = y \text{ mg/mL} = \textbf{Concentration de protéine en mg/mL}$$

et

$$\text{DO} = \epsilon \text{LC} \text{ (}\epsilon, \text{obtenue via ExPASy ProtParam avec la séquence protéique)}$$

$$\text{C} = \textbf{Concentration de protéine en molaire}$$

La protéine est aliquotée en 150µL et conservée à -20°C.

Purification des protéines sans tag. La purification des protéines sans tag se fait par une double chromatographie, tout d'abord une chromatographie d'exclusion de taille suivie d'une chromatographie échangeuse d'ions. Les culots obtenus lors de la production sont décongelés puis soniqués 4 fois 30s. 2µL, appelés Fraction Totale (FT), sont conservés dans un tube sur glace pour vérification sur gel SDS-PAGE, le reste est centrifugé à 4°C, 30min, 15000rpm. 5µL du surnageant, appelés Fraction Soluble (FS), sont conservés dans un tube sur glace. Le culot est repris dans 20ml de tampon Te NaCl et 5µl, appelés Fraction Insoluble (FI), sont conservés dans un tube sur glace. Le volume du surnageant est mesuré à l'aide d'une éprouvette graduée et une précipitation à l'acétate de sodium est effectuée. Le volume est multiplié par 226 (Annexe 3) afin d'obtenir le poids en mg d'acétate de sodium à peser et mélanger au surnageant sur glace pour obtenir la fraction 0-40. Le mélange est alors centrifugé à 4°C, 30min, 15000rpm puis le volume du surnageant est mesuré à l'aide d'une éprouvette graduée et une nouvelle précipitation à l'acétate de sodium est effectuée. Le culot est repris dans 20 ml de tampon TENaCl et 5µl, appelés Fraction 0-40 (F0-40), sont conservés dans un tube sur glace. Le volume du surnageant est multiplié par 258 afin d'obtenir le poids en mg d'acétate de sodium à peser et mélanger au surnageant sur glace pour obtenir la fraction 40-80. Le mélange est alors centrifugé à 4°C, 30min, 15000rpm. Le surnageant est conservé, 5µL, appelés Fraction 80+ (F80+) sont prélevés et conservés dans un tube sur glace. Le culot est repris dans 20ml de tampon TENaCl et 5µl, appelés Fraction 40-80 (F40-80), sont conservés dans un tube sur glace. Un gel SDS-PAGE est réalisé pour visualiser les différentes fractions et sélectionner celles où se trouve la protéine d'intérêt. Pendant la migration du gel, une colonne d'exclusion ACA44 est équilibrée avec 50mL de tampon TENaCl pH8. Après révélation du gel, la fraction contenant la protéine est déposée sur la colonne. Le flux de tampon TENaCl pH8 est amorcé et différentes fractions sont collectées sur la nuit à 4°C. Le lendemain les fractions sont analysées par lecture de DO au spectrophotomètre à 280nm dans le but d'identifier celles contenant la protéine suite à la réalisation d'une courbe (Figure 34).

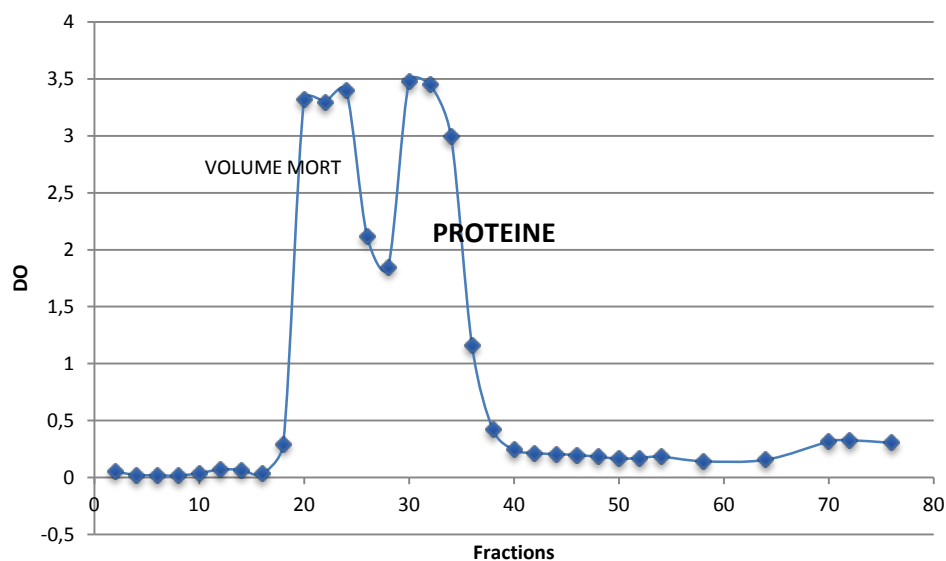


Figure 34 : Courbe de la DO à 280nm des différentes fractions obtenues lors de la purification de la protéine à la sortie de l'ACA44.

Les fractions contenant la protéine sont déposées sur gel SDS-PAGE puis poolées et concentrées pour descendre à 1mL de volume. Pendant la concentration, une colonne échangeuse d'anions DEAE est équilibrée avec 50mL de tampon TE ((30mM de Tris HCl pH8 1M, 1mM d'EDTA) pH8. A la protéine concentrée sont ajoutés 50mL de Tampon TE pH8 dans le but de diluer les sels ; le mélange est passé sur colonne DEAE et différentes fractions sont collectées. La colonne est lavée par le passage de 100mL de TE pH8. La protéine est concentrée. Une DO à 280nm est mesurée puis la concentration de la protéine est calculée avec les formules suivantes :

$$1\text{mg/mL} = x\text{DO} \quad (x, \text{obtenue via ExPASy ProtParam avec la séquence protéique})$$

$$\text{DO} \times \text{dilution} = y \text{ mg/mL} = \text{Concentration de protéine en mg/mL}$$

et

$$\text{DO} = \epsilon \text{LC} \quad (\epsilon, \text{obtenue via ExPASy ProtParam avec la séquence protéique})$$

$$C = \text{Concentration de protéine en Molaire}$$

La protéine est aliquotée en 150µL et conservée à -20°C.

2) Activités enzymatiques

a. Les activités spécifiques des composants du bois

Sept activités enzymatiques sont testées sur les sécrétomes de *Trametes versicolor*: quatre par mesure fluorométrie - l'activité glucosidase, xylosidase, glucuronidase, et cellobihydrolase et trois par mesure colorimétrique - laccases, peroxydases à lignines (LiP) et peroxydases à manganèse (MnP).

Mesure d'activité enzymatique par fluorométrie. Les activités sont mesurées grâce à la détection d'un composé fluorescent, la méthylumbelliférone (MU) (Sigma Aldrich), s'activant lors du clivage de la liaison sonde substrat en présence d'enzymes spécifiques. Quatre substrats sont testés : MU-β- D- glucopyranoside (MU-G) pour l'activité β-glucosidase (EC 3.2.1.3), MU-β- D- glucuronide hydrate (MU-GU) pour l'activité β-glucuronidase (EC 3.2.1.31), MU-β- D- xylopyranoside (MU-X) pour l'activité xyloosidase (EC 3.2.1.37), et MU-β- D- cellobioside (MU-C) pour l'activité cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91). Des solutions stock à 5mM sont préparées dans du méthoxyéthanol puis des dilutions sont réalisées afin de travailler avec une concentration finale de 500μM de MU-G, MU-GU et MU-X et 400μM de MU-C. une solution stock de MU pour la gamme étalon est réalisée à 2mM dans du méthoxyéthanol également. Les essais sont réalisés en plaques de 96 puits et l'activité est mesurée à l'aide d'un lecteur microplaques Victor³ microplate reader (Wallac Perkin Elmer Life Sciences) avec une longueur d'onde d'excitation de 360nm et d'émission de 450nm. Les plaques sont préparées de la manière suivante : 50μL de tampon acétate de sodium 0,1M pH4,5, 50μL de sécrétomes et 50μL de substrat ou 75μL de gamme étalon et 75μL de tampon acétate de sodium 0,1M pH4,5 pour un volume final de 150μL par puits. La fluorescence est mesurée toutes les minutes pendant 25min avec une agitation de la plaque avant chaque mesure. La concentration est calculée à partir des courbes de régression obtenues avec la gamme étalon. Les activités sont exprimées en nmol de substrat consommé min⁻¹.μL⁻¹ de sécrétome.

Mesure d'activité enzymatique par colorimétrie. Trois activités sont testées : l'activité laccases, LiP et Mnp. Tous les essais sont réalisés en plaques de 96 puits et l'activité est mesurée à l'aide d'un lecteur microplaques Victor³ microplate reader (Wallac Perkin Elmer Life Sciences).

Pour l'activité laccases une solution de diammonium 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate (ABTS) à 2mM est préparée dans du tampon acétate de sodium 0,1M pH4,5. Les essais sont réalisés de la manière suivante : 50µL de tampon acétate de sodium 0,1M pH4,5, 50µL de sécrétomes et 50µL d'ABTS pour un volume final de 150µL par puits. L'intensité colorimétrique est mesurée à 420nm toutes les 2min pendant 1H avec une agitation de la plaque avant chaque mesure. La concentration a été calculée à partir de l'équation suivante et les activités sont exprimées en nmol de substrat consommé min⁻¹.µL⁻¹ de sécrétome :

$$A = \epsilon LC$$

A= absorbance (pente) ; ϵ = coeff d'extinction molaire = 36000M⁻¹.cm⁻¹; L = hauteur liquide traversé par le faisceau ; C= concentration (en M).

Pour l'activité MnP une solution d'acide 3-diméthylaminobenzoïque (DMAB) à 50 mM est préparée dans de l'eau distillée et des solutions de 3-méthyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride (MBTH), MnSO₄, EDTA et H₂O₂ à 1 mM sont préparées dans de l'eau distillée. Deux tampons A et B sont ensuite réalisés de la manière suivante : le tampon A avec 10ml de tampon lactate-succinate 0,1M pH4,5, 1mL de DMAB, 1mL de MBTH et 2mL de MnSO₄ ; et le tampon B avec 10ml de tampon lactate-succinate 0,1M pH4,5, 1mL de DMAB, 1mL de MBTH et 2mL de EDTA. Les essais sont réalisés de la manière suivante : 50µL de sécrétomes, 140µL de tampon A ou B et 10µL d' H₂O₂ pour un volume final de 200µL par puits. L'intensité colorimétrique est mesurée à 590nm toutes les 600s pendant 2H avec une agitation de la plaque avant chaque mesure. Le tampon A permet de doser l'activité de toutes les peroxydases (y compris celle qui n'utilisent pas le manganèse comme cofacteur) tandis que le tampon B permet de doser uniquement les peroxydases sans manganèse. Ainsi en soustrayant les valeurs de B à celles de A on obtient l'activité des manganèses peroxydases uniquement.

La concentration est calculée à partir de l'équation suivante et les activités sont exprimées en nmol de substrat consommé $\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de sécrétome :

$$A = \epsilon LC$$

A= absorbance (delta de pente A-B) ; ϵ = coeff d'absorption molaire = $36000 \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; L = hauteur liquide traversé par le faisceau ; C= concentration (en M).

Pour l'activité LiP une solution d'AzureB à $640 \mu\text{M}$ est préparée dans de l'eau distillée et une solution H_2O_2 à 1 mM également dans de l'eau distillée. Les essais sont réalisés de la manière suivante : $50 \mu\text{L}$ de sécrétomes, $100 \mu\text{L}$ de tampon tartrate de sodium 0,1M pH4,5, $30 \mu\text{L}$ d'eau ultra pure, $10 \mu\text{L}$ d'AzureB et $10 \mu\text{L}$ d' H_2O_2 pour un volume final de $200 \mu\text{L}$ par puits. L'intensité colorimétrique est mesurée à 550nm toutes les 20min pendant 4H avec une agitation de la plaque avant chaque mesure. La concentration initiale en azure B est de $32 \mu\text{M}$, la diminution d'absorbance permet alors de déduire l'activité enzymatique résultante. Les activités sont exprimées en nmol de substrat consommé $\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de sécrétome.

b. Fonction et paramètre catalytique des protéines

i. Dosage des thiols

Le dosage des thiols libres permet de déterminer le nombre de cystéines présent dans chaque protéine. Ce dosage est réalisé avec l'acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque (DTNB) qui réagit avec la fonction thiol pour former du 2-nitro-5-thiobenzoate possédant un maximum d'absorption à 412nm.

Trois dosages en triplicat sont réalisés par protéine : avec la protéine native, la protéine dénaturée et la protéine dénaturée réduite. Pour chaque condition une mesure préalable à 280nm avec $30 \mu\text{M}$ de protéine dans $500 \mu\text{L}$ de TE est effectuée afin calculer la concentration exacte de protéine (noté [prot]) grâce à la formule suivante : $A = \epsilon LC$. Pour la protéine native une cinétique pendant 30min à une absorbance de 412nm est réalisée, 5min avec la protéine dans $500 \mu\text{L}$ de TE (utilisation de la même cuve que le scan

à 280nm) puis ajout de 100µM de DTNB. La DO 412nm est relevée à stabilisation de la pente. Pour la protéine native dénaturée et la protéine réduite (préalablement avec du DTT10X), la même procédure est réalisée en utilisant de la guanidine 6M à la place du TE. La concentration en thiol (noté [thiol]) est calculée avec la formule suivante : $A = \epsilon LC$ où $\epsilon_{DTNB}=13600$. Le nombre de thiols libres est ensuite déterminé par : $Nb_{thiols} = [thiol] / [prot]$.

ii. Activité de déglutathionylation

Certaines protéines présentent une activité de déglutathionylation qui est analysée par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Les paramètres catalytiques K_m (constante d'affinité) et k_{cat} (constante catalytique) sont également déterminés pour les enzymes présentant la capacité de déglutathionylation.

Mesure d'activité. Quatre substrats glutathionylés (au laboratoire, Annexe 4), la tétratlone-SG (T-SG), le phénylacétophénone-SG (PAP-SG), la ménadione-SG (M-SG) et la ménadiolé-SG (ML-SG) sont utilisés pour les tests avec les différentes GSTO et GHR. Les substrats T-SG, PAP-SG et M-SG sont préparés à 5mM dans du tampon TE pH8. Dans un volume final de 650µL (qsp TE pH8) sont incubés pendant 20min à température ambiante 1mM de GSH pH7-8, 0,2mM de substrat et 5µM d'enzyme à tester. Pour tester la ML-SG 1mM de Tétrahydruroborate de sodium ($NaBH_4$) est ajouté au mélange réactionnel contenant la M-SG. Pour arrêter la réaction 350µL d'éthanol sont ajoutés au milieu réactionnel. Celui-ci est vortexé puis centrifugé 15min à 14000g. 800µl sont ensuite transférés dans des piluliers adaptés pour le passage en HPLC et l'analyse est réalisée selon la méthode suivante : passage de l'échantillon sur colonne Gemini 5µ C18 110A (3 mm×150 mm) préalablement équilibrée avec une solution d'acide acétique 30mM (pH 4,16) et 10%(v/v) d'acétonitrile. Les produits sont élués (1 ml·min⁻¹) avec un gradient linéaire de 10 à 50% d'acétonitrile pendant 20min. Les pics sont analysés à une longueur d'onde de 254nm, 293nm ou 339nm respectivement pour T-SG, PAP-SG et M-SG/ML-SG. Un changement du temps de rétention est visualisable lors de la déglutathionylation du substrat par l'enzyme.

Mesure des paramètres catalytiques. Les substrats PAP-SG et M-SG sont préparés à 5mM dans du tampon TE pH8. Dans un volume final de 650 μ L (qsp TE pH8) sont incubés à température ambiante (temps de réaction à définir pour chaque enzyme, de 30s à 5min) 4mM de GSH pH7-8, 0,2mM de substrat. La réaction est amorcée par ajout de l'enzyme et arrêtée avec 350 μ L d'éthanol. Le milieu réactionnel est vortexé puis centrifugé 15min à 14000g. 800 μ L sont ensuite transférés dans des piluliers adaptés pour le passage en HPLC et l'analyse est réalisée selon la méthode décrite précédemment. La quantité de produits formés est calculée à l'aide de courbes d'étalonnage et les paramètres cinétiques sont déterminés après analyse de la courbe Micaëlis-Menten obtenue avec le logiciel Graphpad.

iii. Activité de glutathionylation

Certaines protéines présentent une activité de glutathionylation qui est analysée par spectrophotométrie grâce à la réaction de conjugaison entre le GSH et le 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) comme substrat. La conjugaison se fait par le biais du groupement thiol du glutathion. Le produit issu de cette réaction (GS – DNB) absorbe à 340 nm. L'augmentation de l'absorption est directement proportionnelle à l'activité GST de l'échantillon. Les paramètres catalytiques K_m (constante d'affinité) et k_{cat} (constante catalytique) sont également déterminés pour les enzymes présentant la capacité de glutathionylation.

Mesure d'activité. Dans un volume final de 500 μ L (qsp TE pH8) sont mélangés 1mM de GSH pH7-8, 1mM de CDBN. Une cinétique est réalisée à 340nm dans un premier temps pendant 5min sans enzyme puis 5 μ M d'enzyme à tester sont ajoutés. La variation d'absorbance permet alors de voir l'activité de glutathionylation des GST.

Mesure des paramètres catalytiques. Dans un premier temps la quantité d'enzyme à utiliser pour les mesures d'activité est déterminée. Dans un volume final de 500 μ L (qsp TE pH8) sont mélangés 1mM de GSH pH7-8, 1mM de CDBN. Une cinétique est réalisée à 340nm dans un premier temps pendant 5min sans enzyme puis l'enzyme à tester est ajoutée (de 0 μ M à 10 μ M). La droite de la pente est calculée par soustraction de

la pente de base à la pente obtenue avec protéine. Dans un second temps la K_m du GSH est déterminée. Dans un volume final de 500 μ L (qsp TE pH8) sont mélangés du GSH (de 0mM à 2mM) pH7-8, 5mM de CDNB. Une cinétique est réalisée à 340nm dans un premier temps pendant 5min sans enzyme puis l'enzyme est ajoutée (quantité déterminée précédemment : utilisation d'un volume pour lequel le point de la courbe est inférieur à 0,2DO). Le K_m est déterminé après analyse de la courbe Mickaëlis-Menten obtenue avec le logiciel Graphpad. Pour finir et connaître les paramètres catalytiques de l'enzyme le K_m et k_{cat} du CDNB sont alors calculés. Dans un volume final de 500 μ L (qsp TE pH8) sont mélangés du GSH (concentration 5 fois supérieur au K_m) pH7-8, du CDNB (volume variable). Une cinétique est réalisée à 340nm dans un premier temps pendant 5min sans enzyme puis l'enzyme est ajoutée (quantité déterminée précédemment). Le K_m et k_{cat} sont déterminés après analyse de la courbe Mickaëlis-Menten obtenue avec le logiciel Graphpad.

iv. Activité NADPH/GR

Le principe du dosage est basé sur la réduction du glutathion oxydé (GSSG) en GSH par le NADPH en présence de glutathione réductase (GR). L'activité est mesurée en suivant la baisse de l'absorbance à 340 nm.

Une solution mère de NADPH à 15mg/mL est préparée dans de l'eau ultra pure. Une cinétique est réalisée pendant 5min avec un volume final de 500 μ L (qsp tampon TE pH8), 5 μ L de NADPH et 0,3 μ L de GR sans enzyme puis 15 μ M d'enzyme à tester sont ajoutés et laissés en cinétique jusqu'à stabilisation de la pente. La différence de DO entre la pente de base et la pente après ajout de l'enzyme est calculée. La concentration en NADPH transformé est déterminée grâce à l'équation suivante $A = \epsilon LC$ puis celle en GSSG sachant que 1mol de NADPH correspond à 1mol de GSSG.

3) Profil protéine-ligand

a. Stabilité thermique, Thermofluor

Les essais sont réalisés en microplaques 96 puits (Harshell, Biorad) et les mesures sont prises avec un système de détection PCR en temps réel (96CFX tactile, Biorad). Trente substrats sont analysés sur les GST0 natives et réduites et GHR, ainsi que quatre-vingt seize extractibles de bois préalablement préparés à 10mg/mL dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) ont été utilisés. Cinq essences de conifère (*Abies alba* Mill., *Picea abies* (L.) Karst., *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, *Larix decidua* Mill et *Pinus sylvestris* L.) et sept essences de feuillus (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn, *Prunus avium* L., *Robinia pseudoacacia* L., *Carpinus betulus* L., *Fagus sylvatica* L., *Fraxinus excelsior* L. et *Quercus petraea* (Mattus.) Liebl) ont été sélectionnées (Tableau 11). Les dosages sont réalisés comme suit : 5µL de tampon TrisHCl 150mM pH8, 2µl de substrat, 2µL de protéines pour une concentration finale de 40µM dans le puits, 2µL de SYPRO orange (Sigma) préalablement dilué 62 fois et de l'eau ultra pure pour un volume total de 25µL par puits. La plaque est centrifugée 30s à 4000g. La fluorescence est mesurée à 485nm et 530nm chaque minute pendant la durée du programme : 3min à 5°C et augmentation des températures de 5°C à 95 ° C avec 1°C par minute. La température de fusion (T_m), qui correspond à la température à laquelle la protéine est dépliée de 50%, est mesurée en présence / absence de ligands potentiels. Les différences de températures de fusion (AT_m) sont calculées et normalisées.

Chêne vert nœuds morts acétone	Métaséquoïa nœuds vivants du milieu eau
Cèdre nœuds morts dichloro	Mélèze acétone
Cèdre duramen eau	Hêtre eau
Châtaigner duramen acétone	Merisier eau
Noyer aubier acétone	Epicéa acétone
Pin maritime duramen dichloro	Merisier dichloro
Métaséquoïa nœuds morts eau	Chêne vert duramen acétone
Métaséquoïa aubier acétone	Cèdre nœuds vivants du milieu acétone
Mélèze duramen eau	Châtaigner nœuds morts acétone
Hêtre aubier acétone	Noyer nœuds vivants du milieu acétone
Merisier aubier acétone	Pin maritime nœuds morts eau
Epicéa aubier dichloro	Pin maritime aubier acétone
Chêne vert nœuds morts eau	Métaséquoïa duramen dichloro
Cèdre nœuds morts acétone	Mélèze eau
Cèdre aubier dichloro	Hêtre acétone parallèle
Châtaigner duramen eau	Merisier acétone parallèle
Noyer aubier eau	Epicéa eau
Pin maritime duramen acétone	Mélèze aubier acétone
Métaséquoïa nœuds vivants du milieu dichloro	Chêne vert duramen eau
Métaséquoïa aubier eau	Cèdre nœuds vivants du milieu eau
Mélèze duramen acétone parallèle	Châtaigner nœuds morts eau
Hêtre aubier eau	Noyer nœuds vivants du milieu eau
Merisier aubier eau	Pin maritime nœuds vivants du milieu dichloro
Epicéa aubier acétone	Pin maritime aubier eau
Chêne vert nœuds vivant du milieu acétone	Métaséquoïa duramen acétone
Cèdre nœuds morts eau	Mélèze acétone parallèle
Cèdre aubier acétone	Hêtre duramen acétone
Châtaigner aubier acétone	Merisier duramen acétone
Pin maritime nœuds morts dichloro	Epicéa acétone parallèle
Pin maritime duramen eau	Mélèze aubier eau
Métaséquoïa nœuds vivants du milieu acétone	Chêne vert aubier acétone
Mélèze dichloro	Cèdre duramen dichloro
Hêtre acétone	Châtaigner nœuds vivants du milieu acétone
Merisier acétone**	Noyer duramen acétone
Epicéa dichloro	Pin maritime nœuds vivants du milieu acétone
Epicéa aubier eau	Métaséquoïa nœuds morts dichloro
Chêne vert nœuds vivant du milieu eau	Métaséquoïa duramen eau

Cèdre nœuds vivants du milieu dichloro	Mélèze duramen dichloro
Cèdre aubier eau	hêtre duramen eau
Châtaigner aubier eau	Merisier duramen eau
Pin maritime nœuds morts acétone	Epicéa duramen dichloro
Pin maritime aubier dichloro	Epicéa duramen eau
Métaséquoïa nœuds morts acétone	Chêne vert aubier eau
Métaséquoïa aubier dichloro	Cèdre duramen acétone
Mélèze duramen acétone	Châtaigner nœuds vivants du milieu eau
Hêtre duramen acétone parallèle	Noyer duramen eau
Merisier duramen acétone parallèle	Pin maritime nœuds vivants du milieu eau
Epicéa duramen acétone	Témoin DMSO

Tableau 11 : Tableau des différents extractibles testés pour les tests interactions protéine-ligands. (Kebbi-Benkeder et al., 2014)

b. Activité estérase

Les expériences de compétition sont basées sur l'activité estérase de la protéine utilisant le 5 chlorométhylfluorescéine diacétate (CMFDA) comme substrat fluorescent.

Ces essais sont réalisés en microplaques de 96 puits et les mesures sont effectuées dans un lecteur de microplaques victor3 (Wallac Parkin Elmer Life Sciences) avec une longueur d'onde d'émission à 535nm et d'excitation à 485nm. Une solution est préparée avec 21 ml de tampon TE 30mM (30mM TrisHCl pH8, EDTA 0,1mM), 10,5ml de CMFDA à 100µM, 210µL de GSH 100mM et 210µL de protéines (concentration optimale déterminée en pré-test). 199µL de la solution sont distribués dans chaque puits et des premières mesures sont effectuées pendant 10min à raison d'une mesure par minute. Puis 1µL de substrat (extractibles de bois, Cf. Tableau précédent) est ajouté dans chaque puits. De nouvelles mesures sont prises pendant 60min toutes les minutes. La différence de fluorescence entre la protéine seule et la protéine en présence de substrat est ensuite calculée et les données sont normalisées.

4) Test de solubilité

Des tests de solubilité sur des exsudats de la souche Tv1218 sont réalisés afin de déterminer un éventuel potentiel extracteur de ces exsudats. Ces analyses ont été réalisées en collaboration avec le Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur le Matériau Bois LERMAB, Université de Lorraine (EA 4370).

10mg de sciure de chêne sont incubées dans de 400 μ M d'eau, DMSO, acétone ou d'exsudat pendant 24H.

La chaîne UHPLC utilisée pour les analyses est une Shimadzu LCMS-8030 (Kyoto, Japon) munie d'un détecteur UV-vis à barrettes de diodes et d'un spectromètre de masse triple-quadrupôles. Elle est constituée d'un injecteur automatisé SIL-20A pour un volume d'injection de 2 μ L, de deux pompes LC-20AD pour le mélange des deux flux de solvants dégazés en ligne, d'un four CTO 20-A contenant une colonne C18 (Phenomenex[®] Luna 3u 150 x 3 mm) thermostatée à 40°C et d'un détecteur à barrettes de diodes SPD-M20A muni d'une diode en tungstène et une diode de deuterium enregistrant de 190 à 800 nm. L'éluant est constitué d'un mélange d'eau ultra-pure acidifiée à 0,1% d'acide formique (solvant A) et d'acétonitrile acidifié à 0,1% d'acide formique (solvant B) avec un débit total de 0.4mL/min. Sa composition évolue selon le gradient binaire suivant, avec une pression maximale de 4550 psi :

Proportion A/B	Temps (min)
95/5	0
95/5	1
50/50	9
95/5	10

Le spectromètre de masse a été utilisé en mode simple quadrupôle. Il est équipé d'un électroébuliseur (ESI) comme source d'ionisation et utilise de l'azote comme gaz de nébulisation (3,0L/min) et gaz de séchage (15,0L/min). Les températures de nébulisation et désolvatation sont respectivement 250 et 400 °C. Les potentiels d'ionisation sont de +4,5kV/-3,5kV. Les spectres de masse et chromatogrammes sont enregistrés en mode positif et en mode négatif avec une résolution de 15000 amu/sec dans la gamme m/z 100-2000.

Le logiciel utilisé pour piloter le matériel et retraiter les données d'acquisition est LabSolutions 5.4

VII. Microscopie

La souche Tv1218 sur MA après un mois de culture est observée au microscope électronique à balayage (MEB). Les observation au MEB on été réalisées sur la plateforme d'écologie fonctionnelle INRA-Lorraine, EEF-PTEF-Microscopie Electronique.

Des plugs sont découpés observé au MEB.

L'exsudat après ultracentrifugation est observé. 3mL d'exsudat sont ultracentrifugé pendant 1h à 133000g (Beckman L-80, rotor SW32). Le surnageant est éliminé et le culot stocké à 4°C jusqu'à analyse au MEB.

VIII. Cristallographie

Des études de cristallographie sont réalisées en collaboration avec le laboratoire de cristallographie, CRM2, Laboratoire de Cristallographie, Résonance Magnétique et Modélisations, UMR CNRS 7036, Université de Lorraine.

Les conditions initiales de cristallisation sont réalisées par la méthode de diffusion de vapeur avec un nanolitre dispensing Mosquito™ système (TTP Labtech). Les plaques de cristallisation sont stockées à 18°C dans un RockImager1000TM (FormulaTrix), système d'imagerie automatisée pour surveiller la croissance des cristaux. Une optimisation manuelle est réalisée dans des plaques à l'aide de la Limbro hangingdrop. Les données de diffraction des rayons X pour les GST cristallisées sont recueillies sur ligne de lumière BM14 au synchrotron. Les images de diffraction sont intégrées au programme XDS et les calculs cristallographiques sont réalisés avec les programmes de la suite du programme de CCP4. Les structures moléculaires des GST sont ensuite résolues et les données structurales sont générées avec PyMOL (<http://www.pymol.org>).

Résultats et discussion

Chapitre I :

Analyse du polymorphisme du système de dégradation extracellulaire de *Trametes versicolor* en présence de bois.

L'hypothèse principale de travail était que la diversité chimique et structurale du substrat lignocellulosique influence l'adaptation des champignons, en particulier la diversité des différents systèmes enzymatiques impliqués dans la dégradation du bois. Les travaux réalisés dans ce chapitre avaient pour but de caractériser un polymorphisme phénotypique intraspécifique chez *Trametes versicolor* lié ou non à son environnement.

I. Analyses du polymorphisme de *Trametes versicolor*

Pour notre étude sur le phénotype nous avons travaillé sur 10 souches de *T. versicolor* sélectionnées en catalogue. Pour faire le choix dans la sélection des souches, il était important de connaître l'essence de l'arbre sur laquelle avait été prélevée la souche et connaître le pays d'origine des souches. Avoir connaissance de l'essence de l'arbre d'origine était important puisque notre hypothèse de travail était que celle-ci influence l'espèce de champignon qui s'y développe. De plus, connaître le pays d'origine était également un critère d'intérêt. Dans le cas d'un polymorphisme phénotypique des souches, ce dernier critère pourrait aussi influencer l'adaptation des champignons. Ces souches provenaient de zones géographiques variées (France, Amérique, Nouvelle-Zélande, Norvège, Belgique) et ont été isolées sur différentes essences de bois de feuillus (chêne, hêtre, bouleau). Avant toute étude, nous avons réalisé un séquençage sur les régions ITS des différentes souches (Annexe 5) afin de vérifier si les souches étaient bien celles sélectionnées. Un blast des séquences obtenues dans la banque de données de référence, Mycosom JGI *Trametes versicolor* V1.0 a été effectué. Celui nous a permis de valider l'appartenance des souches au genre et espèce *T. versicolor* (Tableau 12). Un

alignement de séquences avec d'autres souches identifiées comme *T. versicolor* et d'autres séquences appartenant à des organismes d'espèces différentes a été effectué dans le but de réaliser un arbre phylogénétique (Figure 35). Sur cet arbre, trois groupes peuvent être distingués avec des bootstraps robustes. Les bootstraps permettent d'estimer la robustesse de la phylogénie. Une valeur en dessous de 70 ne sera généralement pas prise en compte, considérée comme non crédible. Le premier groupe réunit les deux souches de genres différents aux *Trametes* : *Coniophora puteana* et *Stereum hirsutum*. Cette branche indique un bootstrap de 99, confirmant bien les différences de genre de ses organismes. De plus une distinction peut également être faite entre les espèces. L'arbre phylogénétique présente un bootstrap de 85 entre les souches de *T. versicolor* et les autres espèces de *Trametes sp.* Les souches de notre étude sont validées comme appartenant au genre *Trametes* et espèce *versicolor*.

Hsp	% Hsp Identité	Nom de la souche	Organisme
Trave1 scaffold_24:1350-1860:1	99.74%	Tv110102	Trametes versicolor v1.0
Trave1 scaffold_24:1350-1860:2	100.00%	Tv110102	Trametes versicolor v1.0
Trave1 scaffold_24:1293-1834:1	100.00%	Tv1218	Trametes versicolor v1.0
Trave1 scaffold_24:1293-1834:2	100.00%	Tv1218	Trametes versicolor v1.0
Trave1 scaffold_24:1287-1856:1	99.47%	Tv1219	Trametes versicolor v1.0
Trave1 scaffold_24:1289-1860:1	99.48%	Tv1252	Trametes versicolor v1.0
Trave1 scaffold_9:2288437-2288914:1	100.00%	Tv1252	Trametes versicolor v1.0
Trave1 scaffold_24:1289-1860:1	99.74%	Tv15544	Trametes versicolor v1.0
Trave1 scaffold_24:1289-1860:2	99.44%	Tv15544	Trametes versicolor v1.0
Trave1 scaffold_24:1303-1880:1	99.74%	Tv44889	Trametes versicolor v1.0
Trave1 scaffold_24:1303-1880:2	95.76%	Tv44889	Trametes versicolor v1.0
Trave1 scaffold_24:1303-1880:3	97.50%	Tv44889	Trametes versicolor v1.0
Trave1 scaffold_24:1303-1880:4	100.00%	Tv44889	Trametes versicolor v1.0
Trave1 scaffold_24:1289-1860:1	99.83%	Tv70	Trametes versicolor v1.0
Trave1 scaffold_9:2288437-2288914:1	100.00%	Tv70	Trametes versicolor v1.0
Trave1 scaffold_24:1303-1876:1	99.74%	Tv71	Trametes versicolor v1.0
Trave1 scaffold_24:1303-1876:2	96.97%	Tv71	Trametes versicolor v1.0
Trave1 scaffold_24:1303-1876:3	100.00%	Tv71	Trametes versicolor v1.0
Trave1 scaffold_24:1303-1876:4	100.00%	Tv71	Trametes versicolor v1.0

Tableau 12 : Tableau issu du blast entre les séquences des souches sélectionnées après amplification des régions ITS avec le génome de référence de *Trametes versicolor* du JGI.

**Hsp= séquence de l'organisme avec lequel la séquence de la souche sélectionnée a été blastée ;
% Hsp d'identité= pourcentage d'identité entre la séquence de l'organisme blasté et la séquence**

de la souche sélectionnée ; Nom de la souche = souche sélectionnée au laboratoire ;
Organisme = Genre et espèce à laquelle la souche séquencée appartient.

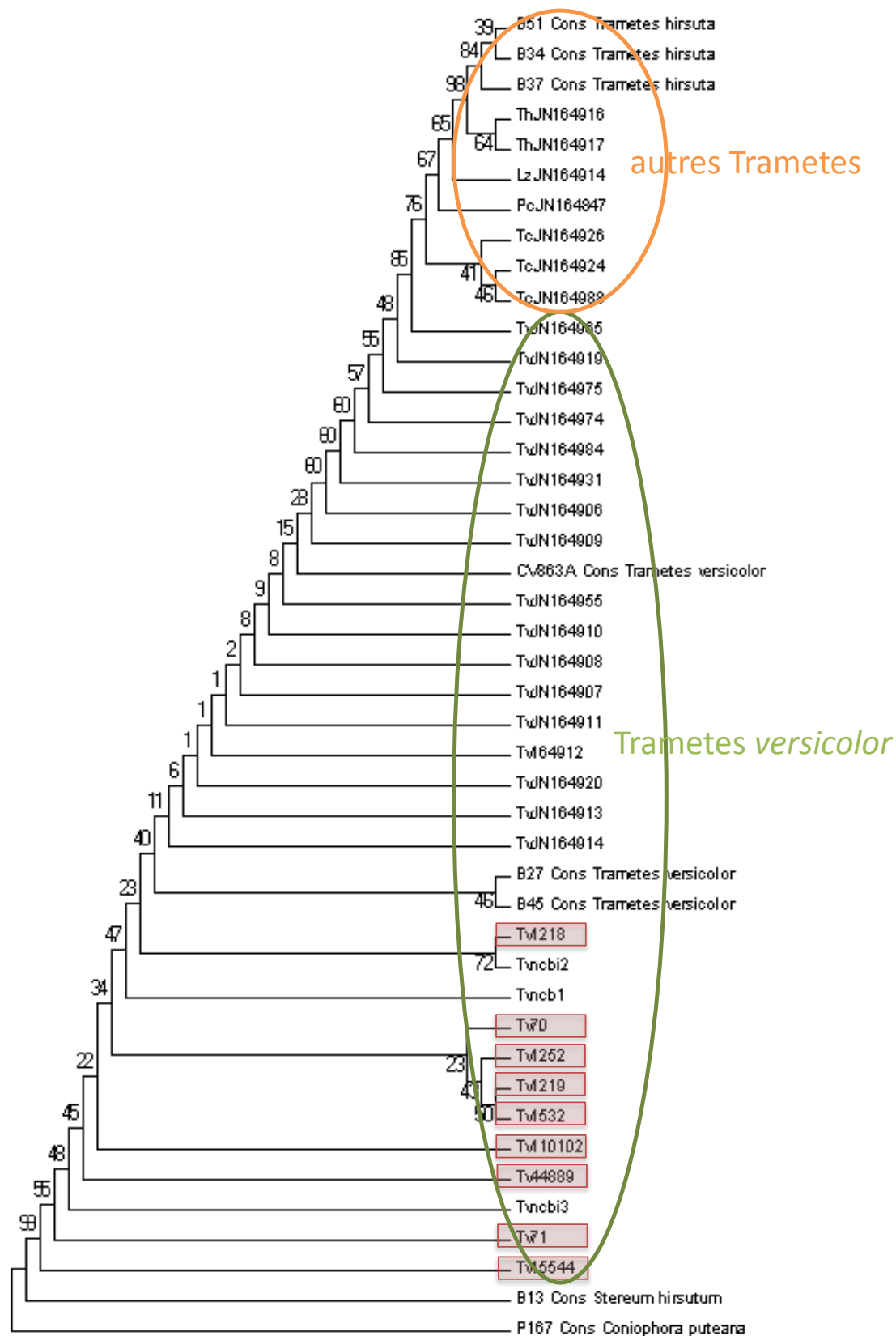


Figure 35 : Arbre phylogénétique après séquençage des régions ITS de souches de *Trametes versicolor* et alignement avec d'autres séquences issues de Judo, et al. 2011.

(Th : *Trametes hirsuta* ; Lz : *Lenzite betulinus* ; Pc : *Pycnoporus cinnaberinus* ; Tc : *Trametes cubensis* et Tv : *Trametes versicolor* ; encadré rouge = souches utilisées au laboratoire)

Nous avons basé notre analyse phénotypique dans un premier temps sur l'observation macroscopique et la mesure de la vitesse de croissance des souches sur différents milieux de culture.

1) Variabilité morphologique

L'observation morphologique des souches de *T.versicolor* a été effectuée à 15 jours de croissance sur plusieurs milieux nutritifs, pauvres ou riches. Sur les différents milieux riches comme le malt ou le PDA, toutes les souches présentaient le même aspect morphologique (Figure 36). Le mycélium était blanc, relativement épais. Les boîtes avaient un aspect uniforme avec un mycélium recouvrant la totalité de celles-ci de façon homogène.

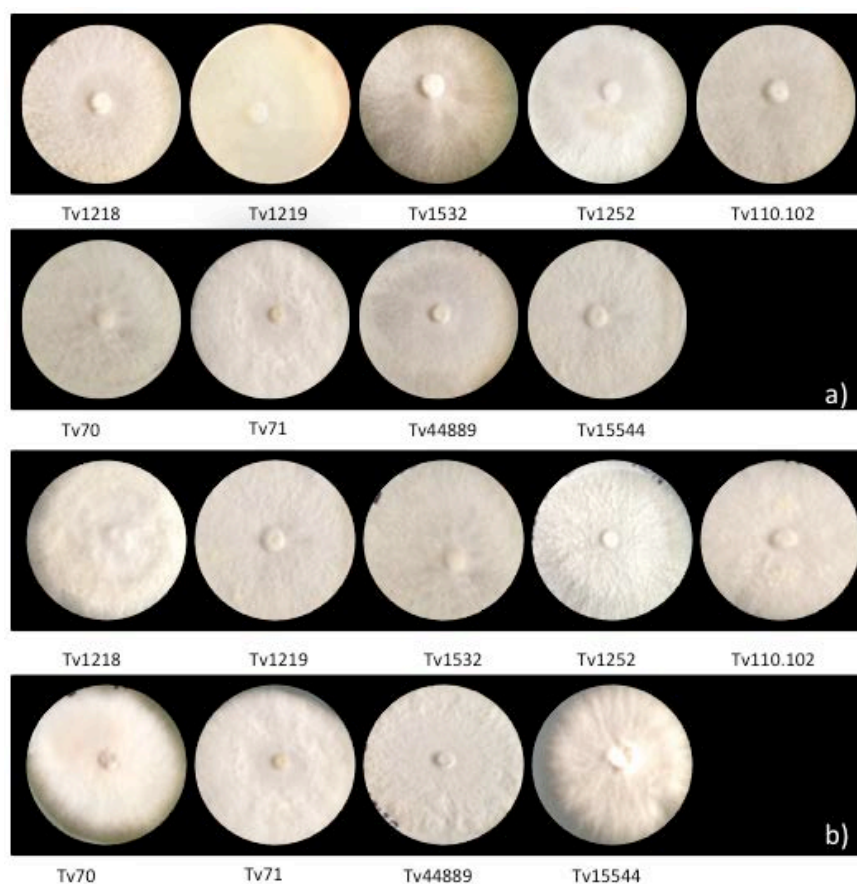


Figure 36 : Photos de différentes souches de *T.versicolor* à 15 jours de croissance.
a) sur MA et b) sur PDA.

Sur d'autres milieux riches comme le P25 (Figure 37) ou milieu pauvre comme le TK (Figure 38), les souches présentaient des différences morphologiques entre elles. Sur P25 le mycélium ne recouvrait pas la totalité de la boîte de manière homogène. Certaines croissances avait un aspect concentrique avec alternance de mycélium plus ou moins dense comme pour Tv1252 ou encore Tv15544. Certaines souches présentaient une pigmentation brune au niveau du mycélium qui se retrouve également dans le milieu gélosé. Sur milieu nutritif minimum TK, le mycélium de toutes les souches était très fin et une pigmentation brune apparaissait également pour certaines souches comme Tv1218 ou Tv44889.

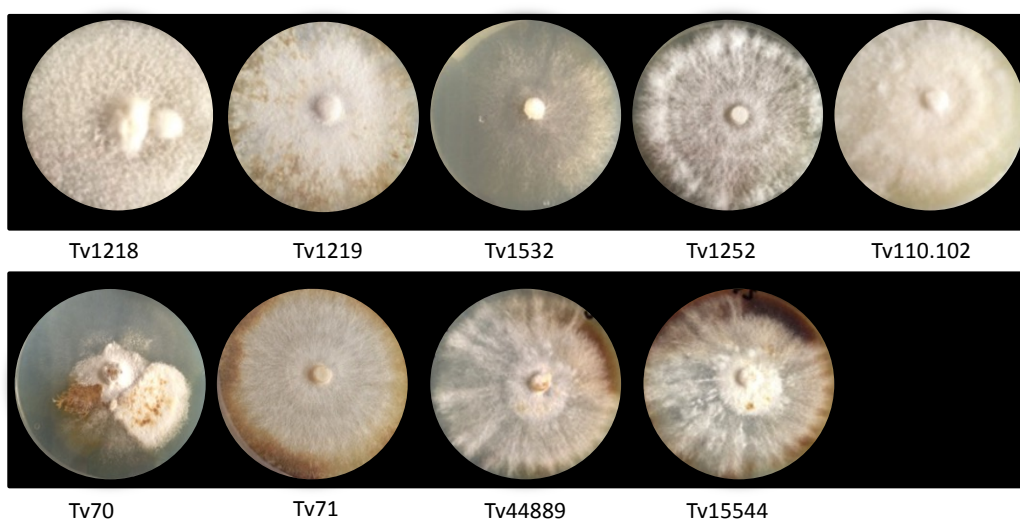


Figure 37 : Photos de différentes souches de *T. versicolor* à 15 jours de croissance sur P25.

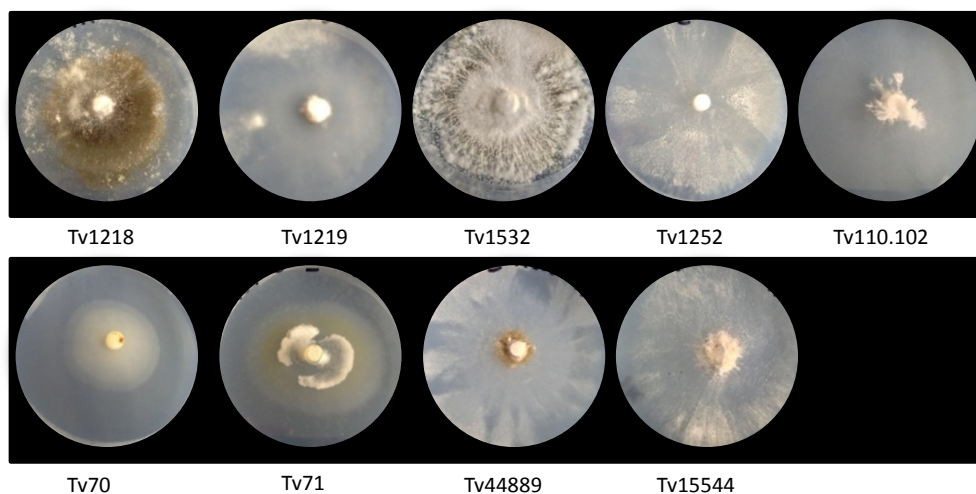


Figure 38 : Photos de différentes souches de *T. versicolor* à 15 jours de croissance sur TK.

Les champignons sont connus pour produire des pigments. Ces pigments sont des métabolites secondaires jouant des rôles variés. Certains champignons vont en sécréter dans un but de compétition avec d'autres champignons présents dans l'environnement. Par exemple, lors de la colonisation d'un milieu *X. ganodermophthora* produit des pigments jaunes inhibant la croissance de *G. lucidum*. (Kang et al., 2010). Les pigments sont également connus pour avoir un rôle antioxydant et antibactérien (Jůzlová et al., 1996). Dans notre étude, nous avons observé notamment sur milieu pauvre l'apparition de pigments foncés. Ces pigments très colorés pourraient être apparentés à de la mélanine fongique. Il a été montré que la production de mélanine est une réaction à des conditions de vie non optimales pour le champignon (Campbell, 1934; Henson et al., 1999). La croissance sur milieu pauvre comme TK pourrait s'apparenter à des conditions difficiles de croissance pour le champignon contrairement à un milieu riche comme le MA où nous n'avons pas observé de pigmentation. Le mycélium moins dense et une croissance plus faible des souches sur ces milieux pauvres sont en adéquation avec d'autres études associant la formation de pigments à une croissance ralentie (Bell and Wheeler, 1986).

2) Variabilité de la vitesse de croissance

Une étude de la vitesse de croissance des souches Tv1218, Tv1219, Tv1532, Tv70, Tv71, Tv1252, Tv110102, Tv44889 et Tv15544 a été réalisée sur différents milieux : MA et TK (Figure 39). Sur milieu riche MA, nous observons une croissance relativement similaire entre les souches. La boîte était totalement recouverte (diamètre correspondant à 85mm) après environ une semaine pour toutes les souches excepté pour Tv1218 et Tv71. Le mycélium de celles-ci ne recouvrait la boîte qu'à respectivement 12 et 16 jours de culture. La vitesse de croissance était comprise entre 10 et 15mm/jour. Tv1218 avait une croissance lente d'environ 6mm/jour. La souche Tv71 quant à elle présentait une vitesse de croissance similaire aux autres souches. Néanmoins elle ne recouvrait la totalité de la boîte qu'après 15 jours, cela pouvant s'expliquer par un temps de latence de sept jours avant le début de la croissance. Sur milieu minimum TK, la croissance des souches était plus hétérogène. Trois souches, Tv110102, Tv44889 et Tv15544 avaient une vitesse de croissance quasi similaire à celle

observée sur MA, environ 10mm/jour et recouvraient entièrement la boîte également au bout d'une semaine. La vitesse des souches Tv1219, Tv1532, Tv1252 et Tv71 était d'environ 5mm/jour. Les souches Tv1218 et TV70 avaient une croissance plus lente (3mm/jour). Comme sur milieu MA la souche Tv71 présentait également un temps de latence assez important, neuf jours.

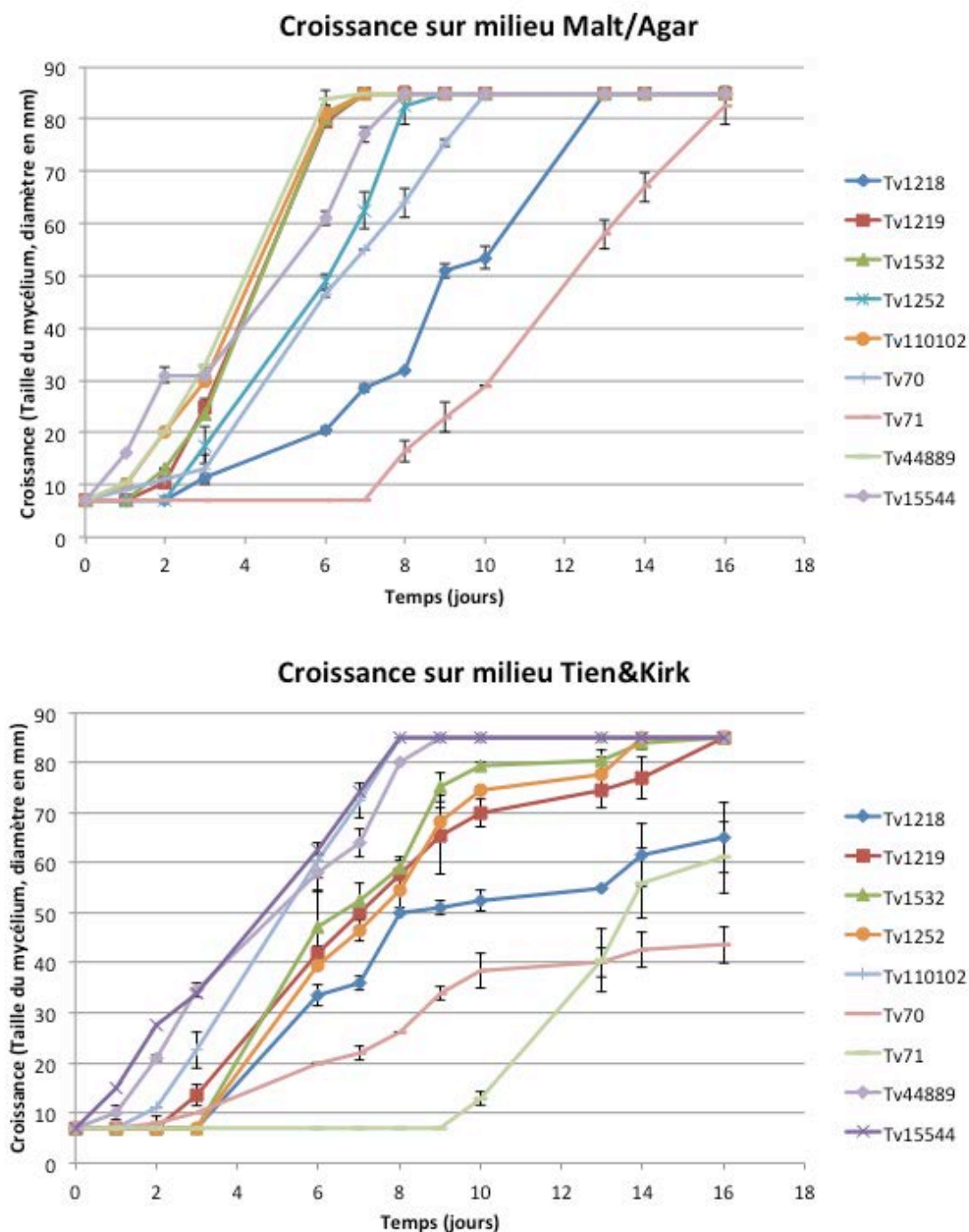


Figure 39 : Graphiques représentant les vitesses de croissance en mm des différentes souches de *T. versicolor* sur milieu riche MA et milieu minimum TK en fonction du temps.

Phénotypiquement les souches de *T. versicolor* présentaient des différences. La morphologie et la vitesse de croissance sont donc souches dépendantes. De plus une même souche pouvait présenter des différences en fonction du milieu sur lequel elle était cultivée, vitesse de croissance, densité du mycélium et coloration variables. Ces différences phénotypiques peuvent s'expliquer par divers facteurs, tels que le pH du milieu (Tudor et al., 2013), la source de carbone, d'azote...(Mert and Dizbay, 1977).

Afin d'étudier plus en détail la diversité phénotypique de *T. versicolor* les analyses suivantes s'axeront sur le système de dégradation extracellulaire impliqué dans la dégradation du bois.

II. Analyses du comportement des souches de *Trametes versicolor* lors de la dégradation du bois par l'étude de la sécrétion d'enzymes extracellulaires

1) Variabilité de l'activité enzymatique

a. Etude de la dégradation du bois

Afin d'étudier la variabilité du système extracellulaire impliqué dans la dégradation du bois chez *T. versicolor*, une première étude de la capacité des différentes souches à dégrader différents types de bois a été réalisée. Cette étude a été adaptée de la norme EN113 qui permet de déterminer le seuil d'efficacité des produits de préservation du bois contre la dégradation due au champignon basidiomycètes lignivores. Trois essences ont été sélectionnées : le hêtre, le chêne et l'épicéa. Le hêtre et le chêne ont été choisis afin de voir le comportement des souches face à deux bois de feuillus de durabilité différente (peu durable pour le hêtre et très durable pour le chêne). En ce qui concerne le chêne, le duramen et l'aubier ont été utilisés pour l'étude. Le duramen, bois de cœur est naturellement plus résistant que l'aubier (bois périphérique). L'épicéa a été choisi pour tester les souches sur un bois de conifère, en sachant que *T. versicolor* ne se développe généralement pas sur ceux-ci. Après trois mois

de mise en contact du champignon et de différents essences, nous avons observé des différences de dégradation à la fois en fonction des essences et également en fonction des souches (Figure 40). Le hêtre était l'essence de bois la plus dégradée avec en moyenne entre 30% à 50% de dégradation pour chaque souche. Pour le chêne, la dégradation était beaucoup plus faible et variable en fonction de la provenance : duramen ou aubier. En effet quelque soit la souche de *T. versicolor*, le chêne duramen était très peu dégradé (10% de perte de masse). Le chêne aubier, quant à lui présentait plus ou moins de dégradation par les souches. Les souches Tv1219, Tv1532, Tv44889 et Tv15544 dégradaient fortement le chêne aubier, avec une perte de masse d'environ 30%, comparativement aux souches Tv1252 et Tv71 avec 10% de perte de masse. Des études précédentes ont montré que *T. versicolor*, comme beaucoup de champignons de pourritures blanches dégradent plus naturellement les feuillus que les conifères, cela validant les faibles pertes de masse de l'épicéa après trois mois de contact avec ce champignon (Highley, 1982; Reid and Paice, 1994).

Après analyse de la dégradation de chaque éprouvette de bois (Figure 41), une grande hétérogénéité est observée au sein même du bois provenant du même arbre, de la même planche.

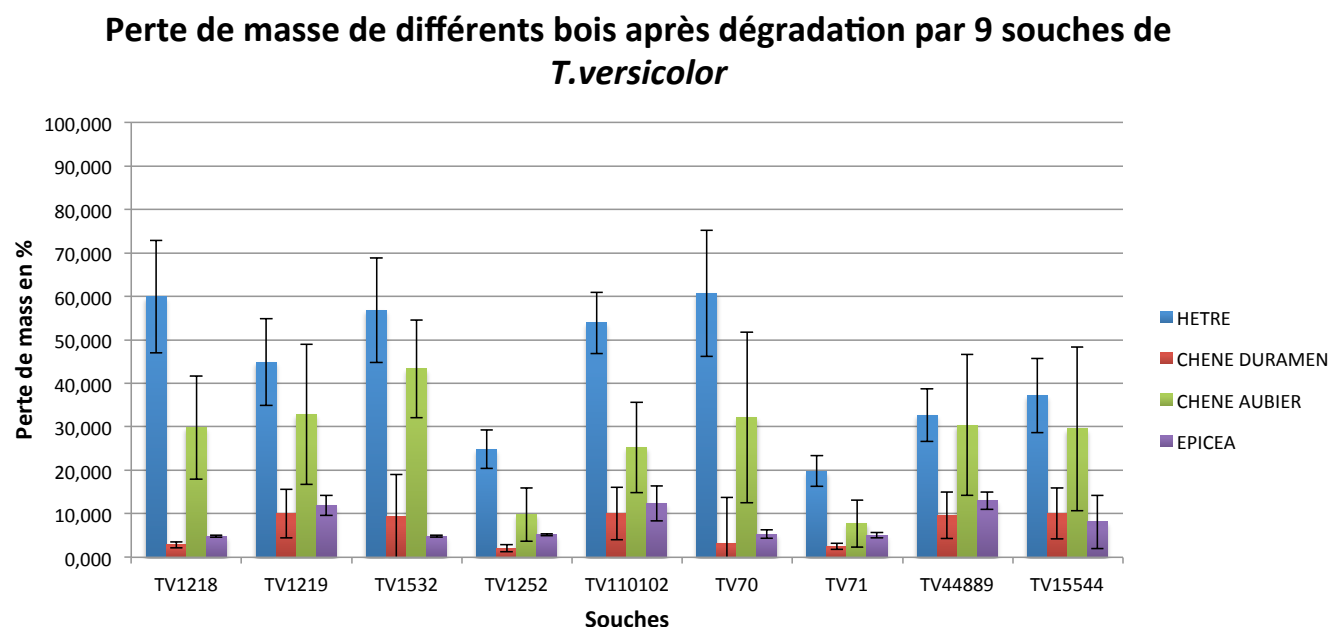


Figure 40 : Graphiques représentant le pourcentage de perte de masse du bois de hêtre, chêne duramen, chêne aubier et épicéa après 3 mois d'exposition avec les souches de *T. versicolor*.

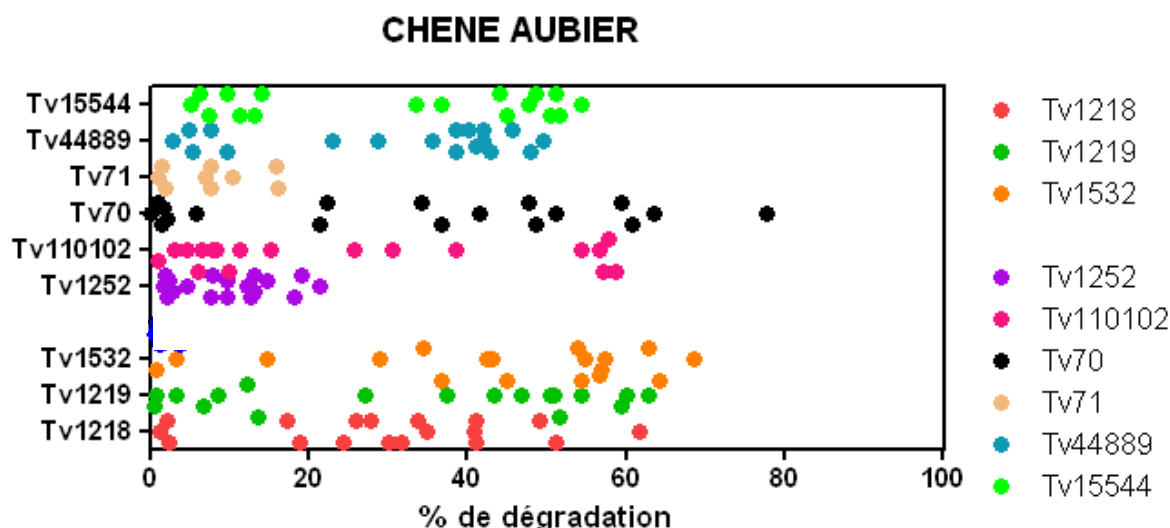


Figure 41 : Représentation du % de perte de masse des éprouvettes du chêne aubier pour chaque souche de *T. versicolor*. Chaque point représente une éprouvette de bois de chêne aubier et chaque couleur une souche de *T. versicolor*. Cette représentation permet de montrer la grande hétérogénéité de dégradation du même bois pour une même souche.

Le hêtre, essence peu durable, est fortement dégradée contrairement au chêne, bois durable. Les essence de hêtre et de chêne, toutes les deux bois de feuillus ont des compositions différentes en lignine, cellulose, hémicelluloses et minéraux (Barbaroux et al., 2003; Penninckx et al., 2001). Au sein même du chêne le duramen et l'aubier ne présentent pas les mêmes caractéristiques (Guilley et al., 2004; Kirker et al., 2013; Penninckx et al., 2001) avec une différence de composition, plus particulièrement en extractibles (Kebbi-Benkeder et al., 2014). Ces différences peuvent en partie expliquer la différence de dégradation des souches vis à vis des différents types de bois. Pour le bois d'épicéa, le faible taux de dégradation n'est pas surprenant puisque *T. versicolor* est un champignon trouvé quasi exclusivement sur bois de feuillus. La dégradation est essence dépendante, voire même éprouvette dépendante due à la grande hétérogénéité du bois compliquant alors l'analyse (Kebbi-Benkeder et al., 2014).

Pour aller plus loin dans l'analyse de la diversité intraspécifique, du système extracellulaire de dégradation, cette étude a été poursuivie par l'analyse du sécrétome.

b. Etude des activités enzymatiques du sécrétome

Nous avons défini dans cette étude comme étant le sécrétome, l'ensemble des protéines extracellulaires sécrétées lors de la dégradation du bois par un champignon.

Pour l'étude de la diversité des systèmes extracellulaires de *T. versicolor* plusieurs tests ont été mis en place à travers l'étude des enzymes présentes dans le sécrétome. Deux sécrétomes : un issu de la dégradation du chêne aubier (appelé « sécrétome chêne aubier » pour notre étude) et un issu de la dégradation du hêtre (appelé « sécrétome hêtre ») ont été analysés par la mesure d'activités enzymatiques.

Au niveau activité enzymatique, ont été étudiés les activités liées à la dégradation de la cellulose avec les β -glucosidases et les β -cellobiohydrolases, à la dégradation des hémicelluloses avec les β -glucuronidases et β -xylosidases et à la dégradation de la lignine avec les peroxydases à lignine, peroxydases à manganèses et laccases.

Dans les sécrétomes chêne aubier (Figure 42), a été observée une forte activité liée à la dégradation de la cellulose. L'activité glucosidase présentait une forte variabilité en fonction des souches avec des activités comprises entre 2 et 7nmol de substrat consommées par minute. L'activité cellobiohydrolase était également comprise entre 0,5 et 2,5nmol de substrat consommées par minute. Les activités liées à la dégradation des hémicelluloses étaient quant à elles beaucoup plus faibles par rapport aux activités liées à la dégradation de la cellulose. Les activités glucuronidase et xylosidase était relativement similaires d'une souche à l'autre et inférieures à 1nmol de substrat consommée par minute par μ L d'extrait enzymatique. Les activités laccases étaient très faibles, en dessous de 0,1nmol de substrat consommée par minute en moyenne. Nous n'avons pas pu observer d'activités peroxydases à lignine et peroxydases à manganèses. En ce qui concerne les sécrétomes hêtre les résultats montraient les mêmes similarités que pour les sécrétomes chêne aubier (Figure 43). En effet nous avons pu observer une forte activité liée à la dégradation de la cellulose : glucosidases et cellobiohydrolases. Ces deux activités étaient relativement variables selon les souches. Comprises entre 0,7 et 1,4nmol de substrats consommées par minute sont observables pour l'activité glucosidase et entre 0,3 et 0,6nmol de substrats consommées par minute pour l'activité cellobiohydrolase. Les activités liées à la dégradation des hémicelluloses étaient faibles

avec des valeurs inférieures à 0,2nmol de substrat consommées par minutes. L'activité laccase était également très faible.

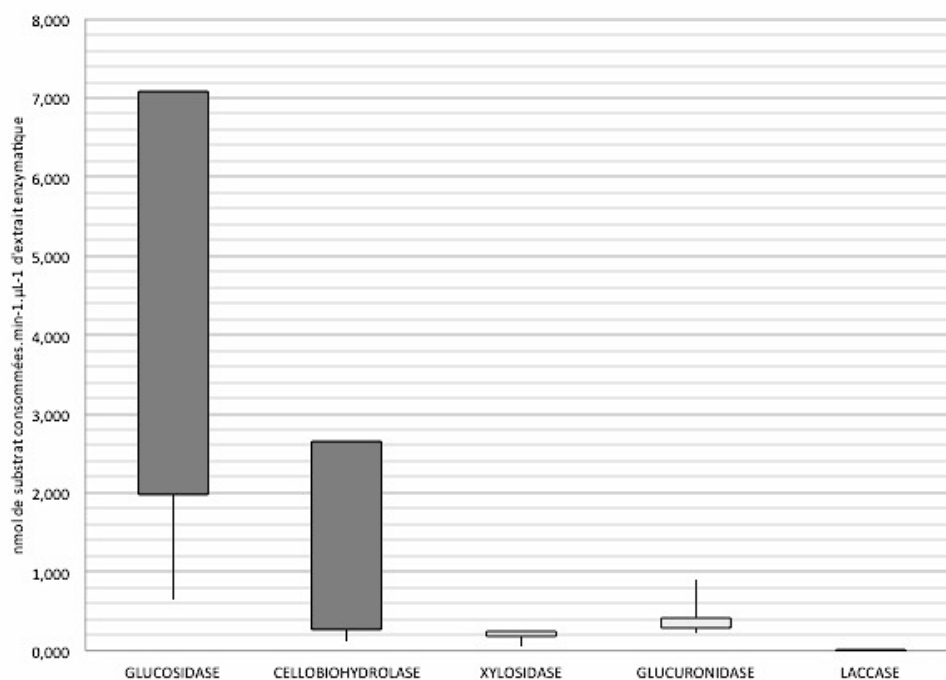


Figure 42 : Graphique représentant les maxima et minima en nmol de substrat consommés par minute par µL d'extrait enzymatique des différentes activités glucosidases, cellobiohydrolases, glucuronidase, xylosidases et laccases pour les secrétomes chêne aubier des différentes souches de *T. versicolor*.

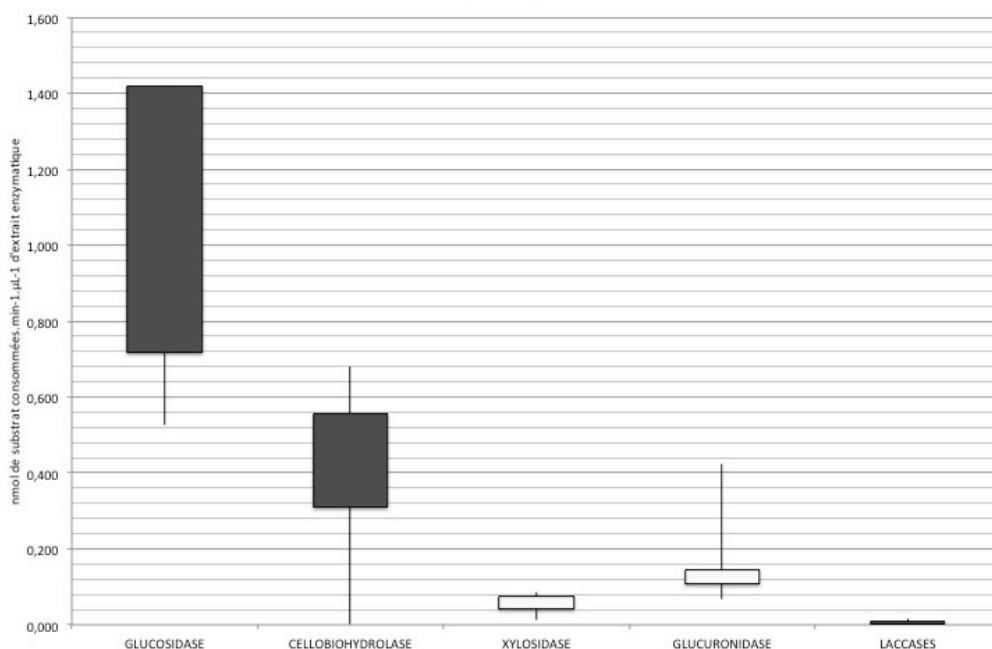


Figure 43 : Graphique représentant les maxima et minima en nmol de substrat consommés par minute par µL d'extrait enzymatique des différentes activités glucosidases, cellobiohydrolases, glucuronidase, xylosidases et laccases pour les secrétomes hêtre des différentes souches de *T. versicolor*.

2) Variabilité du protéome

Avant de commencer l'analyse des travaux réalisés dans cette partie du chapitre I deux termes sont à définir :

- le terme « essence d'origine » sera utilisé pour parler de l'essence de l'arbre sur laquelle la souche de *T. versicolor* a été isolée.
- le terme « essence de dégradation » sera employé pour parler de l'essence de l'arbre sur laquelle *T. versicolor* est cultivé au laboratoire et de laquelle est issu les sécrétomes.

Afin d'observer ou non un potentiel polymorphisme phénotypique des souches par l'analyse des sécrétomes, des gels d'électrophorèses ont été réalisés. Ils avaient pour but dans un premier temps d'obtenir une visualisation rapide des protéines contenues dans les sécrétomes chêne aubier et les sécrétome hêtre. Nous avons pu observer des profils protéiques très différents que ce soit entre les sécrétomes chêne aubier (Figure 44a) ou les sécrétomes hêtre (Figure 44b) entre les différentes souches et également entre les différents sécrétomes.

Pour les sécrétomes de chêne aubier une bande majoritaire apparaissait pour les souches Tv1219, Tv1532, Tv110102, Tv70, Tv44889 et Tv15544. L'analyse de cette bande par LC/MS-MS a permis d'identifier une petite protéine sécrétée (SSP 136431) d'une taille de 17,1kDa et de rôle inconnu. L'origine des souches étant connue pour cette étude, nous avons pu observer que cette SSP était uniquement présente chez les ayant la même essence d'origine, le hêtre.

En ce qui concerne les sécrétomes hêtre, les profils étaient beaucoup moins nets, aucune bande correspondante à cette SSP 136431 n'était visible et aucun profil ne se distinguait d'un autre.

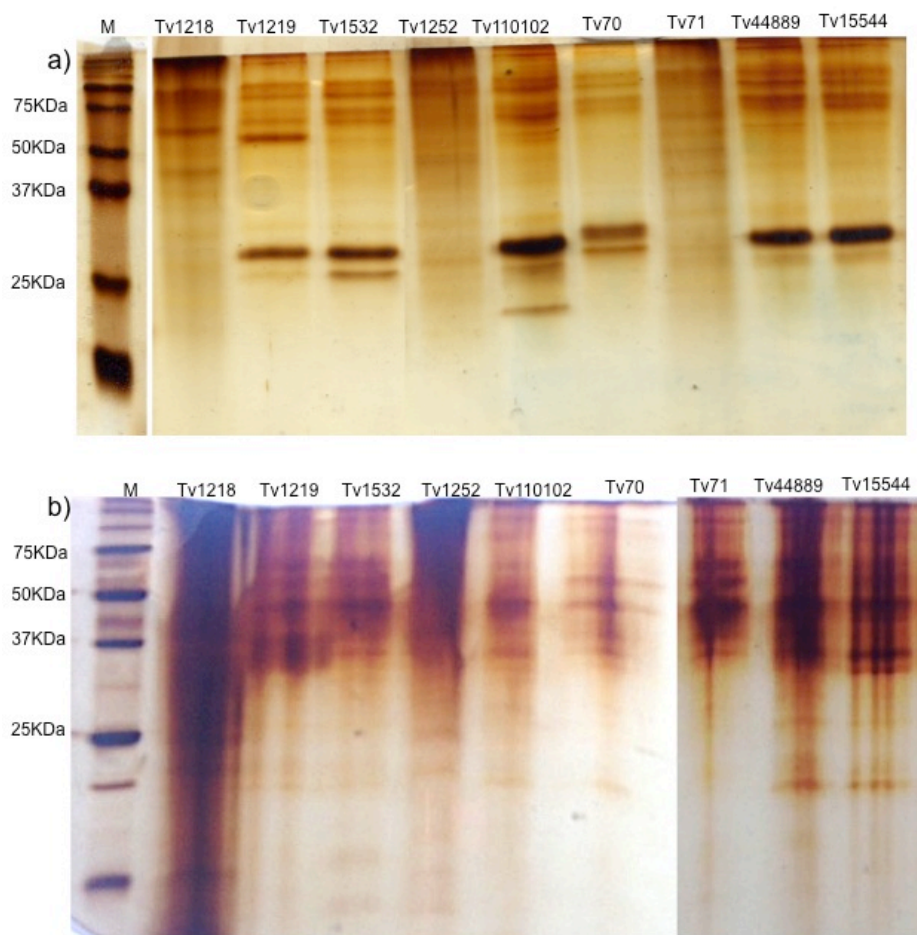


Figure 44 : SDS-PAGE, coloration au nitrate d'argent. Profil protéique des sécrétomes de *Trametes versicolor* sur chêne aubier (a) et sur hêtre (b),

Après analyse visuelle sur gel, une analyse plus fine des sécrétomes en spectrométrie de masse nous avait permis d'identifier les protéines contenues dans ceux-ci. Pour les sécrétome chêne aubier entre 250 et 300 protéines (Annexe 6) et entre 300 et 350 protéines pour les sécrétomes hêtre (Annexe 7) ont été identifiées. Nous avons retrouvé pour l'ensemble des sécrétomes une grande diversité de protéines. La première analyse a été effectuée sur la somme des PAI (abondance relative qui tient compte de la taille de la protéine) de chaque protéines des neufs sécrétomes chêne aubier ou sécrétome hêtre (Figure 45).

Pour les sécrétomes chêne aubier, les différentes protéines étaient pour la majorité des classes regroupant des protéines impliquées dans la dégradation extracellulaire. La famille la plus abondante, plus de 50% des protéines totales, était celle des hydrolases avec beaucoup de glycosides hydrolases (GH) ainsi que des peptidases. Les glycosides hydrolases représentaient 77% des hydrolases dans le sécrétome chêne aubier. Ces

enzymes permettent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques (Davies and Henrissat, 1995). La famille de GH la plus représentée était la famille des GH7 (17%) suivie ensuite des GH5 (glucanases) et des GH10 (xylanases) présentes respectivement à hauteur de 11% et 8%. Nous avons aussi pu noter la présence de la famille AA9. Les enzymes de la cette famille sont des enzymes d'activité auxiliaire. Les AA9 sont des monooxygénases permettant le clivage de chaînes de cellulose. Les peptidases représentaient 23% des hydrolases. Ce sont des enzymes protéolytiques. Différentes familles ont été retrouvées comme des aminopeptidases, metallopeptidases, carboxypeptidases... Nous avons observé également un grand nombre d'oxydo-réductases (18%) comprenant des peroxydases comme les LiP, MnP et des oxydases comme les laccases. 16% des protéines contenues dans les sécrétomes ont été identifiées comme des petites protéines de rôle encore incertain, les SSP. Elles ont été mises en évidence chez les champignons pathogènes où elles jouent un rôle dans l'infection (Rep, 2003). Chez les champignons mycorrhiziens, elles jouent un rôle dans la mise en place de la symbiose avec l'hôte (Kloppholz, 2011). En revanche chez les saprophytes leur rôle reste encore inconnu. Leur importante présence dans le sécrétome chêne aubier peut laisser supposer une implication lors de la dégradation du bois.

Pour les sécrétomes hêtre, les protéines les plus représentées sont impliquées dans la dégradation extracellulaire. La famille la plus abondante, environ 60% était celle des hydrolases avec des glycosides hydrolases. Elles représentaient 77% des hydrolases dans le sécrétome hêtre. Les deux familles de GH les plus représentées sont les familles des GH5 et des GH7. Les GH10 représentaient 13% des protéines appartenant à la famille des GH. Les GH10 sont connues pour être des glucanases. Les peptidases représentaient quant à elles 23% des hydrolases. Nous avons observé également un grand nombre d'oxydo-réductases, 20%, comprenant des peroxydases comme les LiP et des oxydases comme les laccases. En revanche en comparaison avec les sécrétomes chêne aubier, les sécrétomes hêtre comportaient beaucoup moins de petites protéines, SSP, avec seulement 3% contre 16% sur chêne aubier.

La comparaison des sécrétomes dans leur intégralité ne permettait pas de faire de différence significative entre les deux et aucun effet « essence de dégradation » ne peut être observé. En effet les proportions respectives de chaque enzyme étaient similaires d'un sécrétome à un autre avec une majorité d'hydrolases (plus de 50%). Elles étaient

dans les deux cas représentées par des glycosides hydrolases et des peptidases respectivement à 77% et 23%. Les oxydoreductases étaient également fortement sécrétées et représentaient environ 20% des protéines totales des sécrétomes.

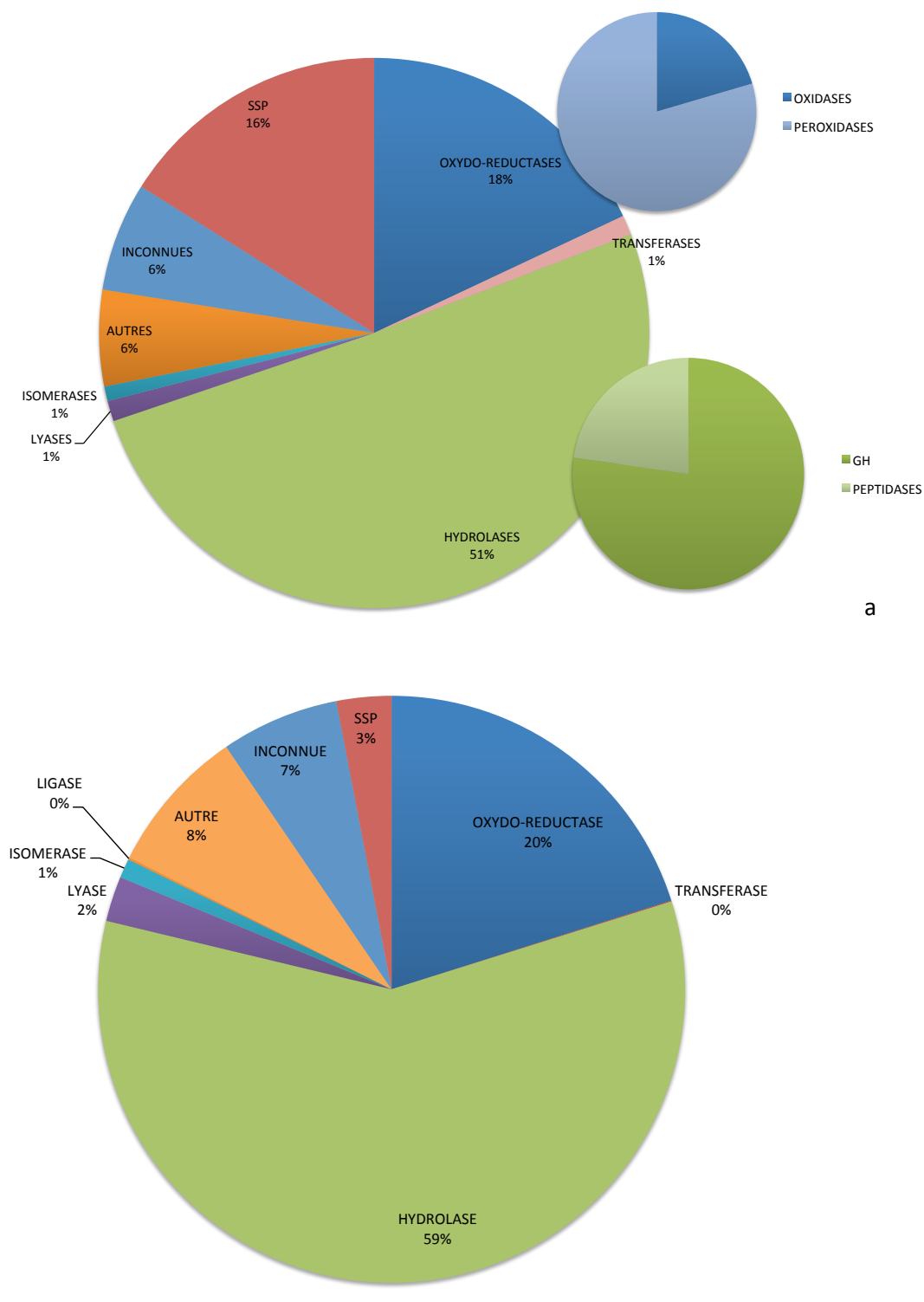


Figure 45 : Secteur représentant les différentes familles de protéines retrouvées dans les sécrétomes chêne Aubier (a) et les sécrétomes hêtre (b)

Par la suite nous avons regardé la répartition des différentes classes d'enzymes présentes dans chaque sécrétome pour chaque souche de *T. versicolor* (Figure 46). Nous n'avons pas observé de différences significatives entre les souches que ce soit dans les sécrétomes chêne aubier ou sécrétome hêtre. En effet le nombre très important de protéines contenues dans les sécrétomes ne nous permet pas d'obtenir des indications sur les différents phénotypes des souches et de visualiser un potentiel effet « essence d'origine ».

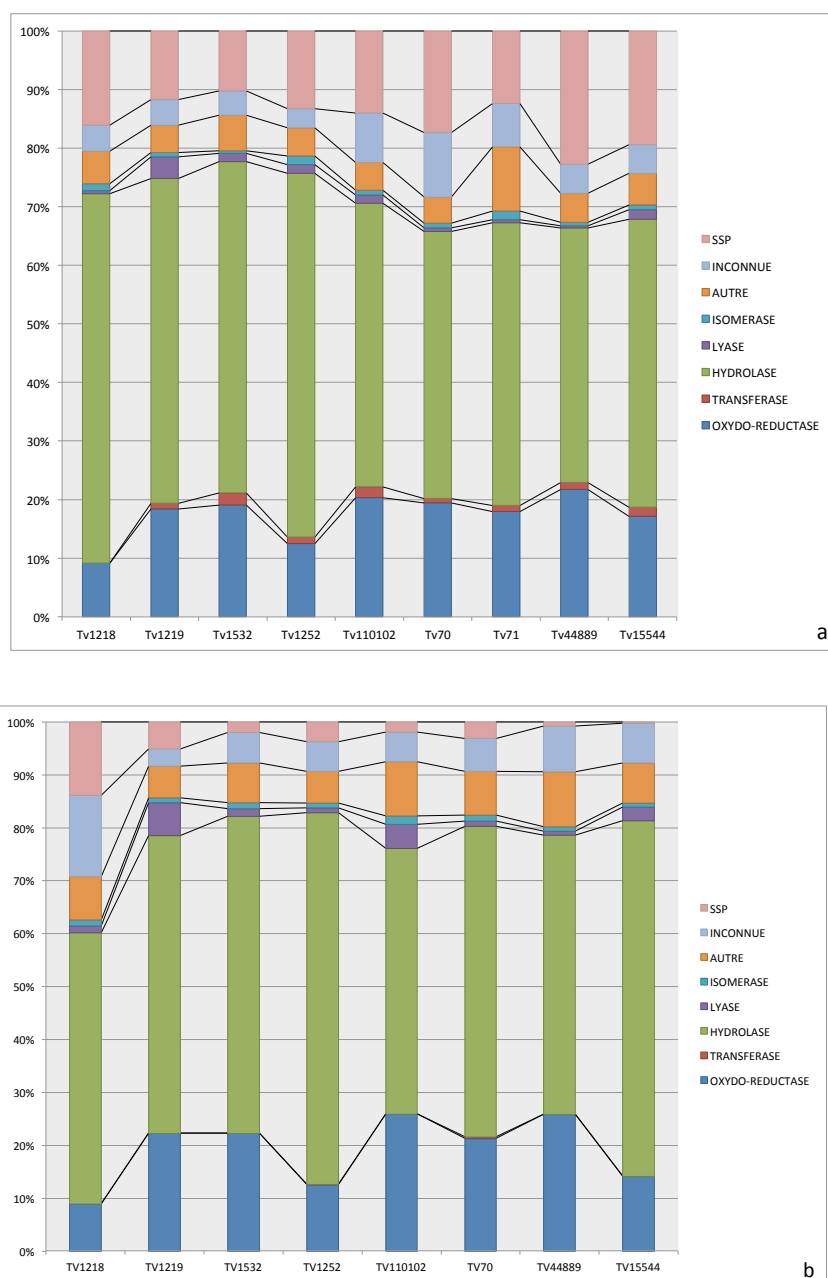


Figure 46 : Histogrammes empilés 100% des différentes classes enzymatiques retrouvées pour chaque souche de *T. versicolor* dans chaque sécrétome : (a) chêne aubier et (b) hêtre.

Pour la suite de l'étude nous avons décidé de travailler sur les 25 protéines les plus abondantes dans les sécrétomes chêne aubier et les sécrétomes hêtre. Le nombre très important de protéines contenues dans ceux ci ne nous permettait pas de dégager des informations sur les souches. C'est pourquoi le choix a été fait de réduire le nombre de protéines à 25. L'abondance des protéines est basé sur les PAI (abondance relative qui tient compte de la taille de la protéine) après analyse en spectrométrie de masse. Les 25 protéines les plus abondantes sont basées sur la somme des PAI de chaque protéine pour les neuf souches de *T. versicolor*.

Dans le sécrétome chêne aubier (Tableau 13), les 25 protéines les plus abondantes étaient représentées par les SSP (4), les GH (9 dont 3 GH7) et les LiP (6). La protéine la plus abondante retrouvée était une SSP, ID 136431. Cette SSP correspond à la protéine la plus abondante retrouvée en SDS-PAGE. Nous avons pu observer que cette protéine n'était présente de manière abondante que chez les souches Tv1219, Tv1532, Tv110102, Tv70, Tv44889 et Tv15544, tout comme les résultats obtenus préalablement sur gel. Statistiquement cette protéine permet de différencier les souches Tv1219, Tv1532, Tv110102, Tv70, Tv44889 et Tv15544 des souches Tv1218, Tv71 et Tv1252 ($p < 0,006$). En se basant sur les deux groupes que forment par la présence de la SSP d'autres protéines permettaient également de différencier les souches Tv1219, Tv1532, Tv110102, Tv70, Tv44889 et Tv15544 des souches Tv1218, Tv71 et Tv1252 : les GH7 (112163, 125941), les LiP (43578, 43477, 33731 et 52333) ou encore la peptidase S10 (159926). Toutes ces protéines permettent d'observer un effet « essence d'origine » chez les souches en séparant alors les *T. versicolor* d'origine chêne d'un côté et d'origine hêtre de l'autre.

Dans le sécrétome hêtre (Tableau 14) la SSP136431, protéine la plus abondante dans le sécrétome chêne aubier, n'est pas présente. Une analyse du sécrétome entier place celle-ci en 53^{ème} position des protéines. Cela corrobore le profil protéique du gel SDS-PAGE différent de celui du sécrétome chêne aubier où la bande représentant cette SSP n'était pas visible. Nous avons retrouvé tout de même des protéines communes, seize au total, entre les deux sécrétomes : des GH (38102, 37024, 33056, 63826, 112163, 12594), une protéine inconnue 30879, une peptidase 159926, une perméase 152976 et des peroxydases (48870, 112835, 114941, 133731, 43477, 43578 et 52333). En se basant

sur les même groupes générer par la présence de la SSP136431 dans les sécrétomes chêne aubier, nous avons réalisé un test statistique ANOVA afin de voir si également dans les sécrétomes hêtre certaines protéines présentaient un intérêt en séparant les souche Tv1218, Tv1252 et Tv71 des autres souches. Dix protéines étaient statistiquement différentes d'un groupe à l'autre telle que les GH7 et GH35 (112163, 37024), les LiP (52333, 48870, 133731, 43477, 112835), une protéine inconnue 89076, une estérase 109109 et une lipase 138138. Parmi ces protéines trois étaient communes avec les sécrétomes sur chêne aubier, la GH7 112163 et les LiP 52333 et LiP43777.

	TV1218	TV1219	TV1532	TV1252	TV110102	TV70	TV71	TV44889	TV15544
SSP 136431	1,00	11,00	8,00	1,00	18,00	26,00	1,00	35,00	30,00
GH7 112163	2,36	3,82	5,00	4,73	4,91	7,00	2,18	6,18	6,45
PEROXYDASE Fungal lignin peroxidase 43578	0,40	3,60	3,40	0,40	8,00	4,80	1,20	8,20	6,00
Inconnu 30879	2,00	3,00	2,00	5,00	3,00	6,00	3,00	4,00	4,00
SSP 28848	0,00	0,00	1,00	2,50	2,50	6,50	6,50	9,00	0,50
GH6 63826	5,67	2,00	2,08	3,25	2,25	2,50	1,58	2,42	2,33
GH5 33056	3,25	2,75	2,00	1,75	3,25	3,00	0,75	3,25	2,25
SSP 28335	6,00	1,00	0,00	3,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
PEROXIDASE Fungal lignin peroxidase 43477	0,08	1,50	2,42	0,83	2,67	3,75	0,83	4,17	3,00
GH7 124366	3,15	1,77	1,85	2,38	1,77	1,38	1,92	1,85	1,85
SSP116268	7,00	1,00	1,00	2,00	2,00	0,00	4,00	0,00	2,00
PEROXIDASE Fungal lignin peroxidase 112835	0,00	2,43	1,71	0,71	3,43	2,86	1,00	4,14	2,14
GH7 125941	2,53	1,80	1,40	2,47	1,73	2,00	1,13	1,93	1,87
GH10 38102	1,70	1,90	1,80	3,00	1,20	2,50	2,00	1,50	1,60
PEROXIDASE Dyp-type peroxidase 48870	3,05	0,80	1,60	0,45	3,50	1,65	2,90	2,60	0,80
GH35 37024	1,27	2,54	1,31	0,88	1,69	2,77	1,04	3,12	2,00
Peptidase S10 159926	0,17	1,58	1,75	1,50	2,00	3,00	1,17	2,50	2,75
PEROXIDASE Fungal lignin peroxidase 133731	0,00	1,33	1,33	1,00	2,33	4,17	1,00	2,83	2,00
PEROXIDASE Fungal lignin peroxidase 52333	0,00	1,50	1,50	1,17	2,50	4,50	0,67	2,50	1,67
PERMESASE Purine nucleoside permease 52976	0,00	1,33	2,33	0,83	3,17	1,33	1,33	2,33	2,67
PEROXIDASE Fungal lignin peroxidase 114944	0,00	1,33	1,33	0,83	2,33	4,17	0,83	2,83	2,00
ARABINOFURA NOSIDASE 59914	1,29	1,35	1,29	0,82	1,82	1,71	1,18	2,41	2,24
GH28 141321	1,40	1,40	1,60	1,60	1,80	1,20	0,60	2,20	1,60
GH15 37357	1,57	1,57	1,29	1,00	1,57	1,00	1,86	1,71	1,86
NHL repeat 73474	0,64	1,55	1,91	1,27	2,00	1,73	0,64	2,18	1,82

Tableau 13 : Tableau des 25 protéines les plus abondantes pour les différents sécrétomes de *Trametes versicolor* sur chêne aubier. En première colonne est indiqué le nom des protéines ainsi que le numéro d'accèsion sur la base du JGI. L'abondance des protéines est basé sur les PAI après analyse en spectrométrie de masse.

	TV1218	TV1219	TV1532	TV1252	TV110102	TV70	TV44889	TV15544
GH7 112163	1,64	8,09	14,18	7,82	10,18	8,36	4,36	10,27
Inconnue 30879	3,00	3,00	6,00	5,00	4,00	6,00	8,00	7,00
GH5 33056	3,75	8,25	3,75	6,50	6,00	3,75	1,25	1,50
PEROXIDASE Fungal lignin peroxidase 43578	0,00	7,60	5,80	0,80	14,40	4,00	3,80	1,40
DECARBOXYLASE Phosphatidylserin e decarboxylase- related 54134	1,00	13,27	2,91	0,73	12,36	2,18	0,18	4,27
GH10 33948	0,13	5,63	2,75	7,00	1,88	11,00	0,75	1,50
PERMESASE Purine nucleoside permease 52976	0,50	1,67	5,00	1,33	10,83	4,50	2,33	2,83
PEROXIDASE Fungal lignin peroxidase 114944	0,67	4,83	4,17	2,67	6,17	6,67	2,83	1,00
PEROXIDASE Fungal lignin peroxidase 52333	0,17	4,50	4,67	3,33	5,83	5,50	3,00	1,67
PEROXIDASE Dyp- type peroxidase 48870	1,10	1,45	5,25	0,55	7,40	5,95	5,15	1,25
Autres 89076	1,00	3,50	2,50	2,00	6,00	6,00	5,50	2,00
GH6 63826	1,25	2,25	4,58	2,92	3,25	2,33	2,42	4,50
PEROXIDASE Fungal lignin peroxidase 133731	0,67	4,33	4,17	2,50	6,17	5,83	2,83	1,00
GH10 38102	2,10	4,00	3,80	5,00	2,90	4,30	0,90	2,50
HYDROLASE Cellulose-binding region 141077	0,00	2,50	3,00	8,50	2,50	3,50	0,00	1,50
ESTERASE Carbohydrate Esterase Family 15 112899	1,17	3,17	2,83	2,92	2,75	4,08	2,50	2,33
PEROXIDASE Fungal lignin peroxidase 43477	0,17	3,08	3,33	0,42	4,75	1,75	5,50	3,25
GH7 125941	0,40	2,73	3,40	3,87	3,33	2,73	1,13	2,67
PEROXIDASE Fungal lignin peroxidase 112835	0,00	3,71	2,86	1,14	5,71	3,86	2,29	1,57
Esterase 43877	0,67	3,33	2,00	5,67	1,67	5,67	0,33	1,33
ESTERASE Carboxylesterase 109109	0,67	1,72	3,33	0,61	3,78	2,44	4,11	3,72
GH35 37024	0,65	2,04	2,42	1,04	1,96	2,81	5,15	3,12
Peptidase S10 159926	0,33	0,33	3,33	0,42	1,25	1,42	6,50	6,08
Lipase 138138	0,27	1,45	3,00	1,55	2,73	3,36	2,64	4,18
Glucanase 134721	2,80	1,80	2,00	2,80	2,60	3,80	0,00	1,40

Tableau 14 : Tableau des 25 protéines les plus abondantes pour les différents sécrétomes de *Trametes versicolor* sur hêtre. En première colonne est indiqué le nom des protéines ainsi que le numéro d'accèsion sur la base du JGI. L'abondance des protéines est basé sur les PAI après analyse en spectrométrie de masse.

III. Conclusion

Dans ce premier chapitre nous avons étudié le polymorphisme phénotypique de *T. versicolor* à travers l'étude du système extracellulaire de ce champignon décomposeur. Nous étions partis de l'hypothèse que l'essence de bois sur laquelle se développe le champignon influence celui-ci et donc que le champignon s'adapte à la nature chimique du substrat (Eslyn et al., 1975; Gottlieb et al., 1950; Morin et al., 2012). De plus nous avons supposé que cette adaptation était conservée et pouvait être mise en évidence par le biais de différents essais au laboratoire. Divers essais ont été mis en place dans le but de caractériser un polymorphisme intraspécifique par l'analyse phénotypique de neuf souches de *T. versicolor* provenant de bois de hêtre, chêne et aulne.

Dans un premier temps, nous avons pu observer un polymorphisme morphologique entre les souches sur milieu de culture. Il a été observé notamment des différences entre culture sur milieu pauvre et milieu riche. Une même souche pouvait présenter des dissemblances marquées selon la nature du substrat sur laquelle elle se développait. L'apparition notamment de pigments était une des grandes différences morphologiques observables pouvant correspondre à l'adaptation du champignon à son environnement (Campbell, 1934 ; Wheeler, 1986 et 1988). Au niveau environnemental, l'observation de *T. versicolor* montre également un polymorphisme de ce champignon par la présence de pigments variés en fonction des souches. Une étude sur le polymorphisme lié à la pigmentation pourrait être mise en place dans le but de corroborer ou non un lien éventuel avec la nature chimique du substrat sur laquelle le champignon se développe (Temp, 2008). Grâce à l'étude du comportement des souches de *T. versicolor* face à la dégradation du bois, nous avons observé des différences statistiquement significatives entre celles-ci. La dégradation et l'analyse de la perte de masse ont révélé une grande hétérogénéité des souches entre elles et face aux différentes essences auxquelles elles sont confrontées. Les deux essences de feuillus, le hêtre et le chêne, n'étaient pas soumis à la même dégradation de la part des différentes souches. Le hêtre bois peu durable, avait montré une forte dégradation contrairement au chêne, caractérisé comme fortement durable. De plus des différences significatives de dégradation ont été également observées au sein de la même essence entre le chêne aubier et le chêne duramen. Cette

variabilité de dégradation est directement liée à la nature chimique du bois. Celle-ci est variable entre deux essences de bois mais également différente au sein du même arbre (Guilley et al., 2004; Kebbi-Benkeder et al., 2014). En ce qui concerne le très faible taux de dégradation de l'épicéa, des études ont montré que *T. versicolor* comme beaucoup de champignons de pourriture blanche dégradent plus les feuillus que les conifères (Highley, 1982; Reid and Paice, 1994). La différence d'efficacité de dégradation entre bois de feuillus et conifère serait notamment due à la composition en lignine (Skyba et al., 2013). Nous avons retrouvé également un polymorphisme entre les souches vis à vis de la même essence. L'étude des sécrétomes chêne aubier et des sécrétomes hêtre a permis d'observer et d'appuyer les différences entre les souches et entre les deux essences étudiées. Les activités enzymatiques classiques liées à la dégradation de la cellulose étaient en corrélation avec l'étude de protéomique par spectrométrie de masse des sécrétomes. En effet, nous avons observé une forte activité liée à la dégradation de la cellulose et la protéomique avait montré une grande quantité d'enzymes impliquées dans ce mécanisme. Plus de 50% des enzymes des sécrétomes ont été identifiées comme étant des hydrolases et plus particulièrement des glycosides hydrolases. Ces GH sont très fortement représentées par la famille GH7 connues pour leur rôle de cellobiohydrolases. Les activités liées à la cellulose étaient chez les deux sécrétomes, les activités les plus importantes comparativement à celles liées aux hémicelluloses et lignine. Il est important de noter que les enzymes impliquées dans la dégradation de la lignine, MnP – LiP et laccases étaient présentes dans les sécrétomes malgré une absence de dosage. La présence de ces enzymes est en adéquation avec la littérature où il a été montré que les champignons de pourriture blanche comme *T. versicolor* avaient la capacité à dégrader la totalité des composés du bois y compris la lignine (Camarero et al., 1999). Les oxydoréductases représentent environ 20% du sécrétome total et les LiP sont fortement représentées avec 6 LiP sur les 25 protéines les plus abondantes. L'analyse des 25 protéines les plus abondantes retrouvées dans les neuf sécrétomes chêne aubier et le profil protéique, nous a également permis de mettre en évidence la présence de protéines spécifiques à certaines souches. La plus abondante, SSP136431, n'a été observée que sur six souches, Tv1219, Tv1532, Tv110102, Tv70, Tv44889 et Tv15544. Ces résultats laissent à penser que la présence de cette SSP136431 est induite lors de la dégradation du chêne aubier. D'autres protéines étaient également présentes

dans ce sécrétome et notamment des SSP. Il serait de ce fait intéressant d'étudier le ou les rôles de celles-ci encore inconnus.

Deux analyses en composantes principales (ACP) ont été effectuées avec l'ensemble des tests mis en place pour l'étude de la diversité phénotypique des systèmes extracellulaires impliqués dans la dégradation du bois chez *T.versicolor*: la perte de masse de chêne aubier ou de hêtre avec les différentes souches, les activités enzymatiques et les 25 protéines les plus abondantes pour chacun des sécrétomes (Annexe 8).

L'ACP des sécrétomes chêne aubier (Figure 47) montre la répartition des souches selon deux axes F1 et F2 (68%, expliquant la diversité). Selon l'axe F1 nous observons un regroupement des souches Tv1219, Tv1532, Tv110102, Tv70, Tv44889 et Tv15544, les trois autres souches, Tv 1218, Tv1252 et Tv71 étant plus dispersées de l'autre côté de l'axe. Nous observons que la répartition des souches forme deux groupes, groupes pouvant être reliés à l'essence d'origine de l'arbre. Un test ANOVA réalisé sur les coordonnées de l'axe F1 a permis de valider statistiquement ces deux groupes avec $p < 0,003$.

Une ACP des sécrétomes hêtre a été également réalisée (Figure 48) en parallèle. Nous observons une répartition plus hétérogène des souches que sur les sécrétomes chêne aubier. En effet les souches se répartissent selon l'axe F1 mais de façon moins nette. Néanmoins la tendance du regroupement des souches selon l'origine de l'arbre est tout de même notée. Un test ANOVA réalisé sur les coordonnées des axes F1 et F2 de cette ACP, valide statistiquement les deux groupes : Tv1218 et Tv1252 d'un côté et les autres souches de l'autre avec $p < 0,002$.

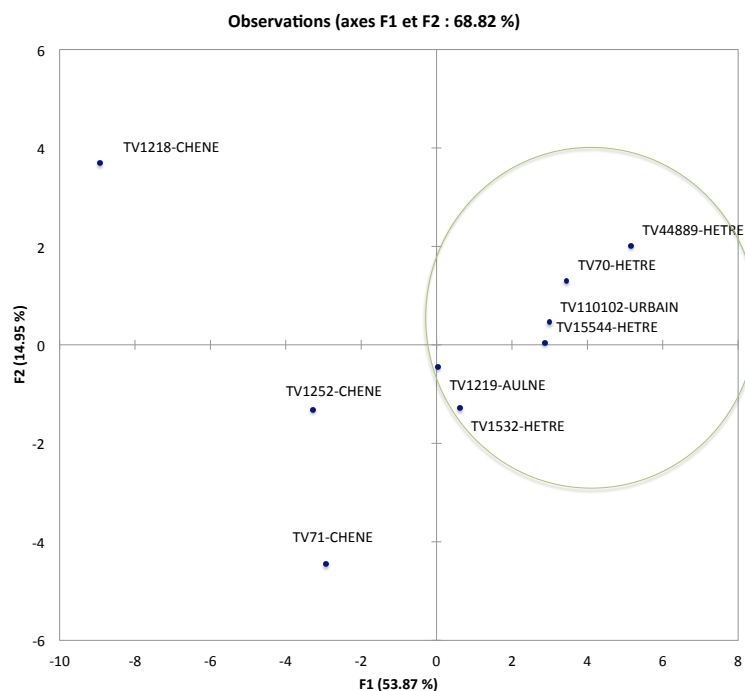


Figure 47 : ACP montrant la répartition des souches de *T. versicolor* après analyse des perte de masse, des activités enzymatiques et des 25 protéines les plus abondantes des sécrétomes chêne aubier pour les souches Tv1218, Tv1252, Tv71, Tv70, Tv110102, Tv44889, Tv15544, Tv1219 et Tv1532. Deux groupes apparaissent en fonction de l'axe (cercle vert).

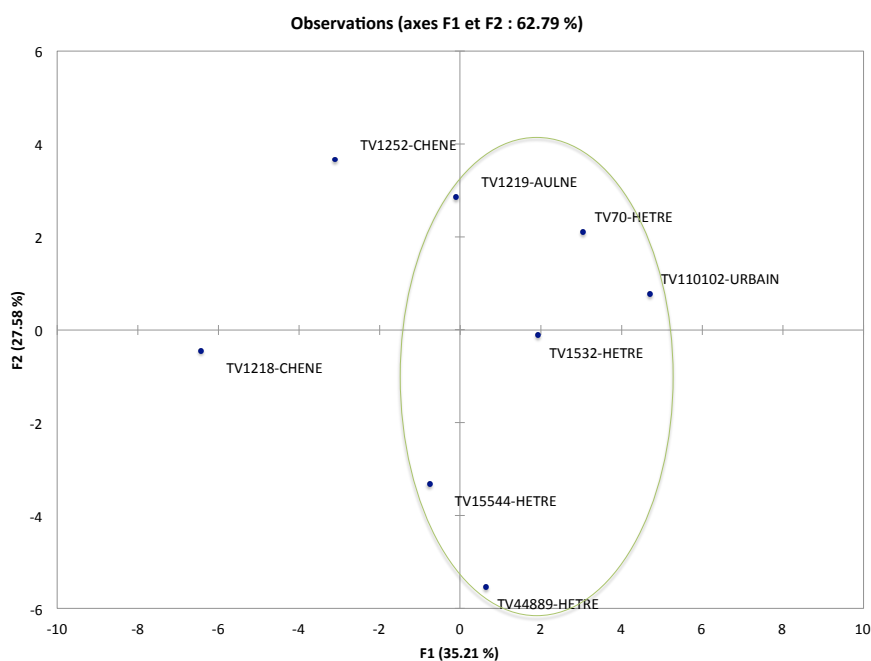


Figure 48 : ACP montrant la répartition des souches de *T. versicolor* après analyse des perte de masse, des activités enzymatiques et des 25 protéines les plus abondantes des sécrétomes hêtre pour les souches Tv1218, Tv1252, Tv70, Tv110102, Tv44889, Tv15544, Tv1219 et Tv1532. Deux groupes apparaissent en fonction de l'axe (cercle vert).

Grâce à l'étude du système extracellulaire, nous avons pu commencer à vérifier l'hypothèse que l'essence de l'arbre influence l'espèce de champignon qui s'y développe. A travers l'étude des sécrétomes de *T. versicolor* nous pouvons supposer que certaines souches développent la capacité à induire des protéines spécifiques impliquées dans la dégradation, protéines potentiellement marqueurs de l'essence d'origine et donc de l'adaptation de ces champignons décomposeurs à différents types de bois. Afin de confirmer ou non les résultats obtenus et notamment les ACP montrant la répartition des souches selon leur habitat d'origine, il serait nécessaire dans un premier temps d'augmenter le nombre de souches issues de hêtre et de chêne, de travailler également avec des souches directement isolées de l'environnement et dans un second temps d'augmenter le nombre d'essences étudiées. L'augmentation du nombre de souches nous permettrait de valider notre hypothèse de départ. Quant à l'augmentation de la diversité des essences, elle pourrait permettre de trouver des corrélations entre les natures chimiques des substrats et donc peut être déterminer certains facteurs du bois influençant l'adaptation des champignons à leur environnement.

Après l'étude du système extracellulaire, nous avons pour ces travaux de thèse réalisé une analyse d'une partie du système intracellulaire de détoxification impliqué lors de la dégradation du bois chez *T. versicolor*.

Chapitre II :

Analyse de la diversité des glutathion-S-transferases chez *Trametes versicolor*

Le système de détoxification, aussi appelé xénome, se décompose en trois étapes : une phase d'activation du composé pénétrant dans la cellule, réaction réalisée notamment par les CytP450 ; une phase de conjugaison avec par exemple les GST ; et une phase sécrétion ou de stockage du composé (Morel et al., 2013). Les familles de gènes codant pour les CytP450 et GST sont très étendues chez les champignons dégradeurs du bois en comparaison avec les autres types trophiques de champignons (Figure 49). L'extension de ces familles de gènes pourrait rendre compte de l'adaptation des champignons à leur environnement.

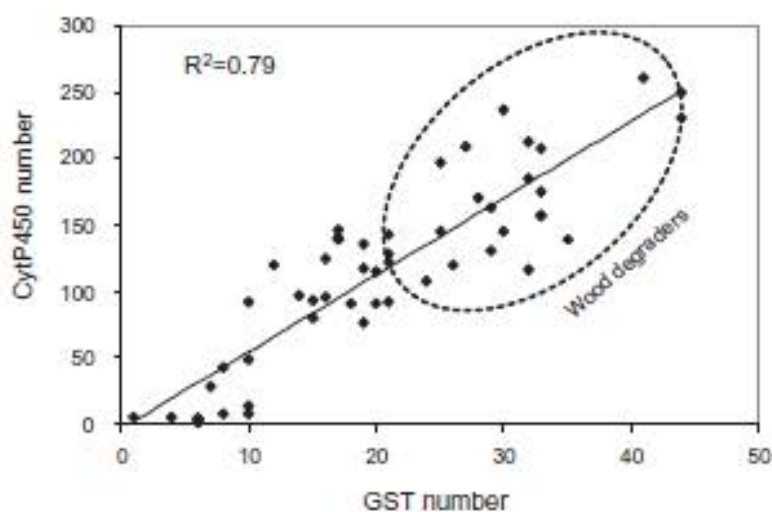


Figure 49 : Relation nombre de gènes codant pour les CytP450 et le nombre de gène codant les GST chez les Agaricomycotina. (Morel et al., 2013)

Chez *T. versicolor*, environ 290 gènes ont été identifiés codant pour des cytP450. En ce qui concerne les GST, 43 répartis en 6 classes sont à l'heure actuelle connus (Annexe 9).

Notre étude a porté sur les enzymes de la phase II du cycle de détoxification et plus particulièrement sur les GST de *Trametes versicolor*.

I. Phylogénie des GST

Utilisant une démarche de génomique comparative, Morel en 2013 (Morel et al., 2013) (Figure 50) a montré que les champignons de pourritures blanches et brunes possèdent un grand nombre de gènes codant pour des GSTs en comparaison avec d'autres basidiomycètes possédant un autre mode de vie (symbiotique ou pathogène). Par exemple 38 gènes codant pour des GST sont détectés dans le génome de la pourriture blanche *Fomitiporia mediterranea*. De même, le génome de la pourriture brune *Postia placenta* renferme 44 gènes codant pour des GST. Dans les deux cas, ces gènes peuvent être répartis en 7 classes phylogénétiques. Chez le champignon symbiotique *L. bicolor* ou le pathogène opportuniste *Cryptococcus neoformans*, seulement 17 et 6 GST ont été reportées respectivement, ces dernières étant regroupées en 7 et 4 classes phylogénétiques.

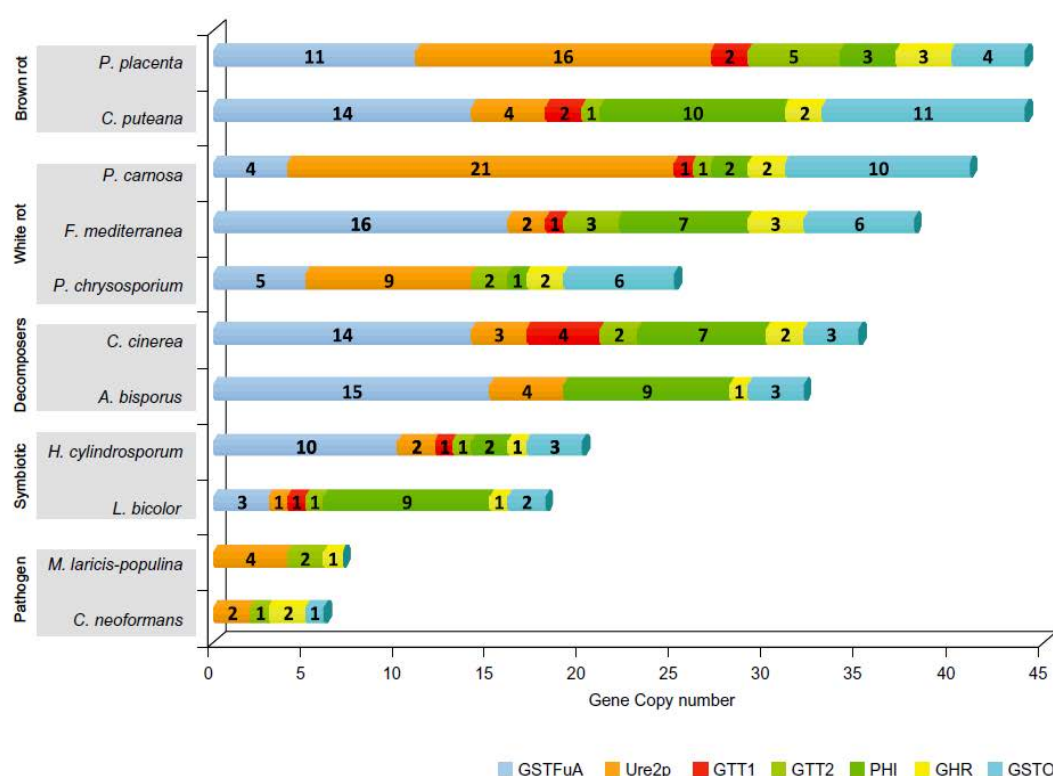


Figure 50 : Organisation du GSTome montrant le nombre d'isoformes de GST présentes dans chaque classe chez quelques champignons. (Morel et al., 2013)

Chez les basidiomycètes, les gènes codant pour des GSTs peuvent être regroupés en sept classes phylogénétiques: GTT1, GTT2, GSTF, GSTFuA, Ure2p, GSTO et GHR (Figure 51), certaines d'entre elles étant spécifiques des champignons.

Les GTT ont été identifiées pour la première fois chez *Saccharomyces cerevisiae* (Choi et al., 1998), les isoformes caractérisées possédant une activité de glutathionylation envers le CDNB (Morel et al., 2009). Les GST Phi sont des GST possédant une similarité de séquence avec les GST Phi des plantes. Chez les plantes, cette classe de GSTs est impliquée dans la défense et plus particulièrement dans la régulation et le transport de composés potentiellement toxiques (Dixon, 2011). Les GSTFuA sont spécifiques des champignons. En dehors d'une activité de glutathionylation « classique », les différentes isoformes caractérisées jusqu'alors possèdent une activité ligandine liée à leur site de fixation du glutathion (site G) (Mathieu et al., 2013). Les Ure2p peuvent être divisées en deux sous-classes, A et B. La sous-classe A, spécifique des champignons, est étendue chez les dégradeurs du bois. Ces enzymes en dehors de présenter diverses activités de glutathionylation et de déglutathionylation, ont comme caractéristique de posséder un site de fixation pour le glutathion oxydé (Thuillier et al., 2011, 2013). Les GSTO quant à elles contiennent majoritairement une cystéine catalytique. Celle-ci est essentielle dans l'activité de déglutathionylation mise en évidence chez ces enzymes. Quand ce résidu cystéinyl est remplacé par un résidu serinyl chez une isoforme de *Phanerochaete chrysosporium*, cette dernière présente une activité de glutathionylation (Meux et al., 2011). Enfin, les GHR, présentes chez les bactéries, les champignons et les plantes contiennent une cystéine catalysant la réaction de glutathionylation d'hydroquinones (Lallement et al., 2014; Meux et al., 2011; Xun et al., 2010).

Chez *T. versicolor* sont dénombrés trois GTT1, une GTT2, six GSTFuA, dix Ure2p, seize GSTO, trois GRH et quatre Phi.

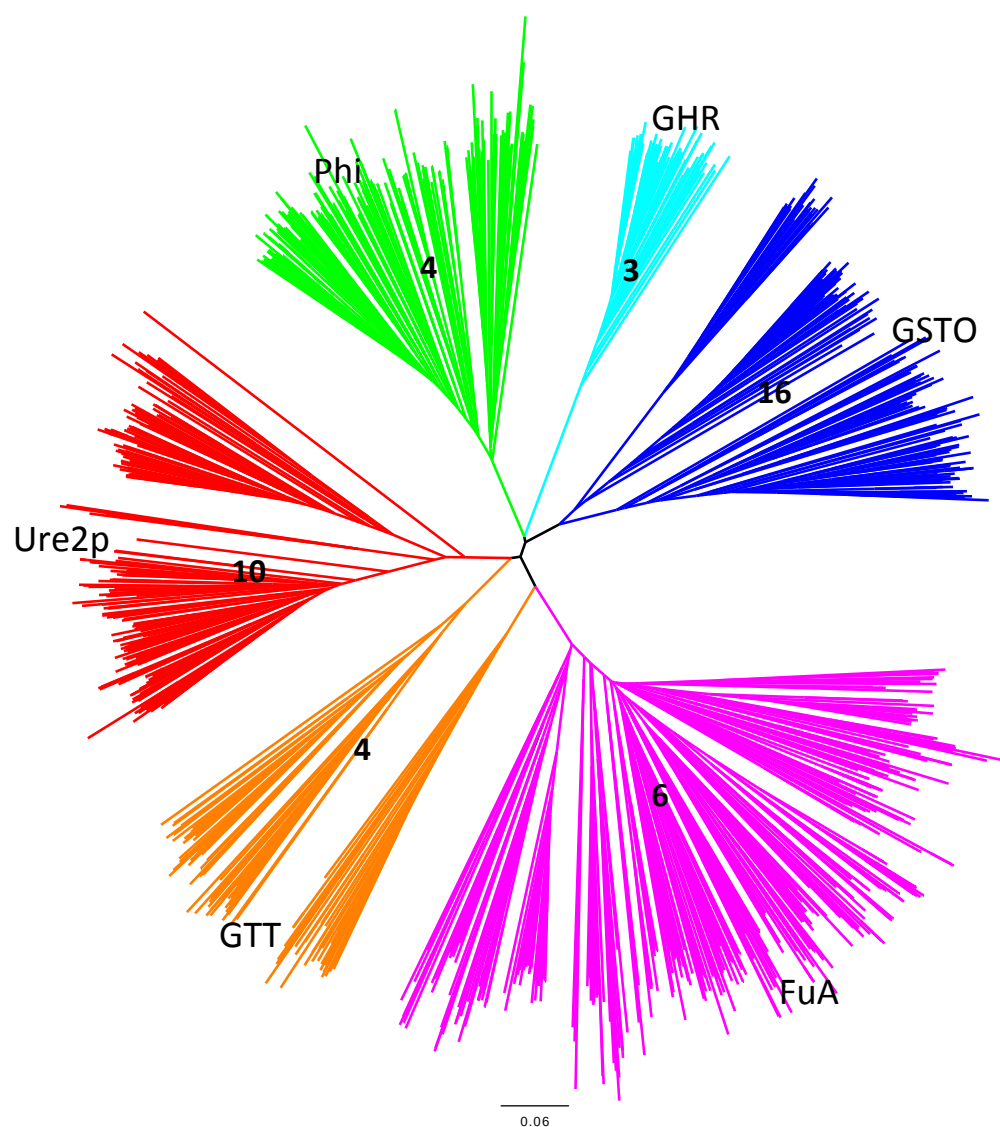


Figure 51 : Arbre phylogénétique des différentes classes GST des Basidiomycète Agaricomycotina : Ure2p, Phi, GHR, GSTO, GTT et FuA. Le nombre de représentants chez *T. versicolor* est indiqué sur chaque branche soit 10 Ure2p, 3 GHR, 16 GSTO, 4 GTT, 6 FuA et 4 Phi.

Pour ces travaux de thèse sur le système de détoxification de *T. versicolor*, notre étude a été axée sur la classe des GST Oméga, famille étendue chez les *Trametes* et les GHR.

II. Etude de l'extension de la classe de GST Oméga

1) Caractérisation des GSTO de *Trametes versicolor*

Les GSTO sont notamment caractérisées par la présence d'une cystéine au niveau du site catalytique et se retrouvent sous forme de dimère (Frova, 2006). Chez *T. versicolor*, nous avons identifié seize GSTO et trois GHR (Figure 52). L'alignement des séquences primaires a montré que douze des seize GSTO possédaient une sérine comme résidu catalytique suggérant une activité de glutathionylation chez ces isoformes.

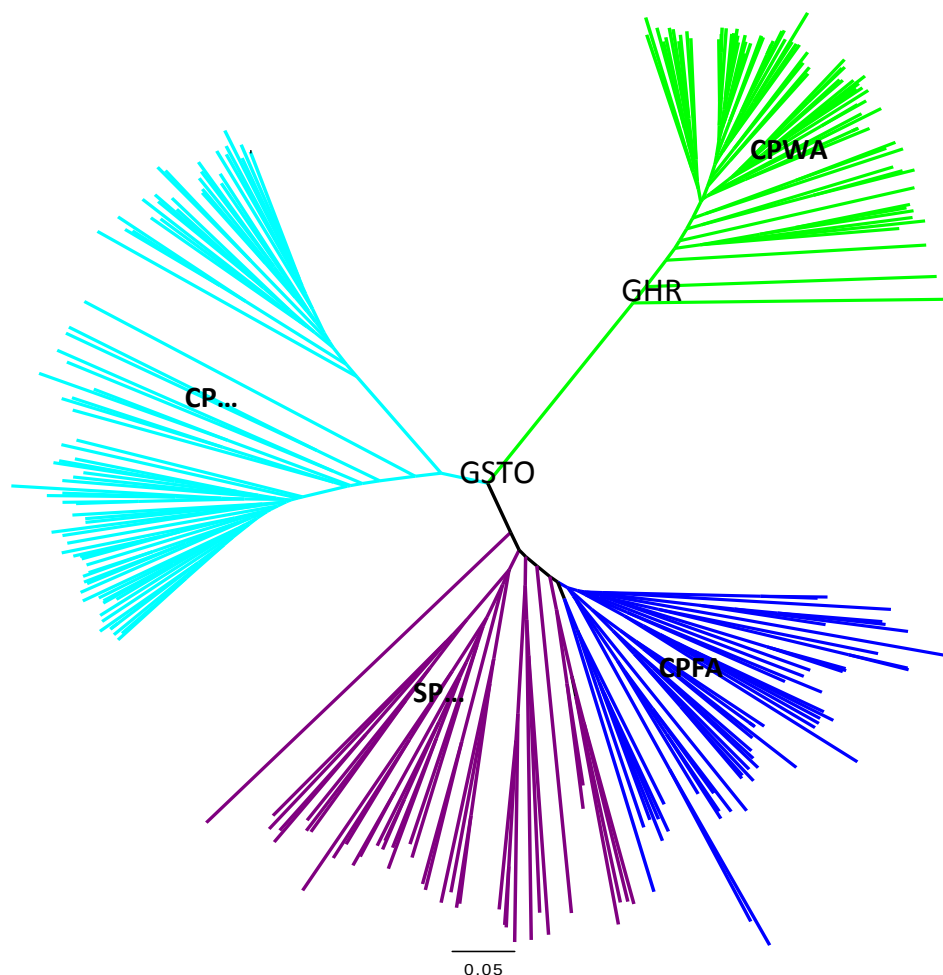


Figure 52 : Arbre phylogénétique des classes de GSTO et GHR des Basidiomycète Agaricomycotina. Les GHR en vert avec un site catalytique CPWA (cystéine, proline, tryptophane, alanine). Les GSTO divisées en 3 avec en bleu clair les GSTO possédant un site catalytique CP (cystéine, proline) ; en bleu foncé un site catalytique CPFA (cystéine, proline, phénylalanine, alanine) et en violet un site catalytique SP (sérine, proline).

L'étude de la synténie, présence simultanée sur le même chromosome de deux ou plusieurs loci indépendamment de leur liaison génétique, de ces différents gènes (Figure 53) montre la répartition de ces GSTO sur les différents scaffolds. Ces seize GSTO sont réparties sur huit scaffolds différents. Nous avons observé la présence d'une seule GSTO à sérine sur les scaffolds 1, 5, 11 et 12 (GST 41340, 71758, 60698 et 23671). Certains scaffolds présentent deux gènes codant pour des GSTO à sérine ou à cystéine, (scaffold 2, 7 et 9). Le scaffold 17 quant à lui montre la présence de six gènes codant pour des GST à sérine et à cystéine. La présence de plusieurs gènes sur le même scaffold nous permet d'émettre l'hypothèse de la duplication de gène, c'est à dire la présence d'une nouvelle copie du gène engendrée par l'évolution pouvant faire l'objet de mutation et amenant alors à la notion de néo-fonctionalisation. Une analyse phylogénétique réalisée uniquement avec les GSTO et GHR de *T. versicolor* (Figure 54) indique que les GSTO possédant un site catalytique CPFA seraient liées aux GSTO contenant une sérine catalytique. Les GSTO à cystéines 67635 et 157166 se trouvant sur le scaffold 17 présentent une très forte homologie de séquence (78% d'homologie). De la même manière, une forte homologie est trouvée entre les GSTO à sérine 54345 et 75639 (86 % d'homologie) présentes également sur le scaffold 17. De plus l'alignement de toutes ces GSTO permettent de valider l'appartenance de ces GST contenant une sérine comme résidu catalytique à la classe des GST oméga connue pour la présence d'une cystéine catalytique.

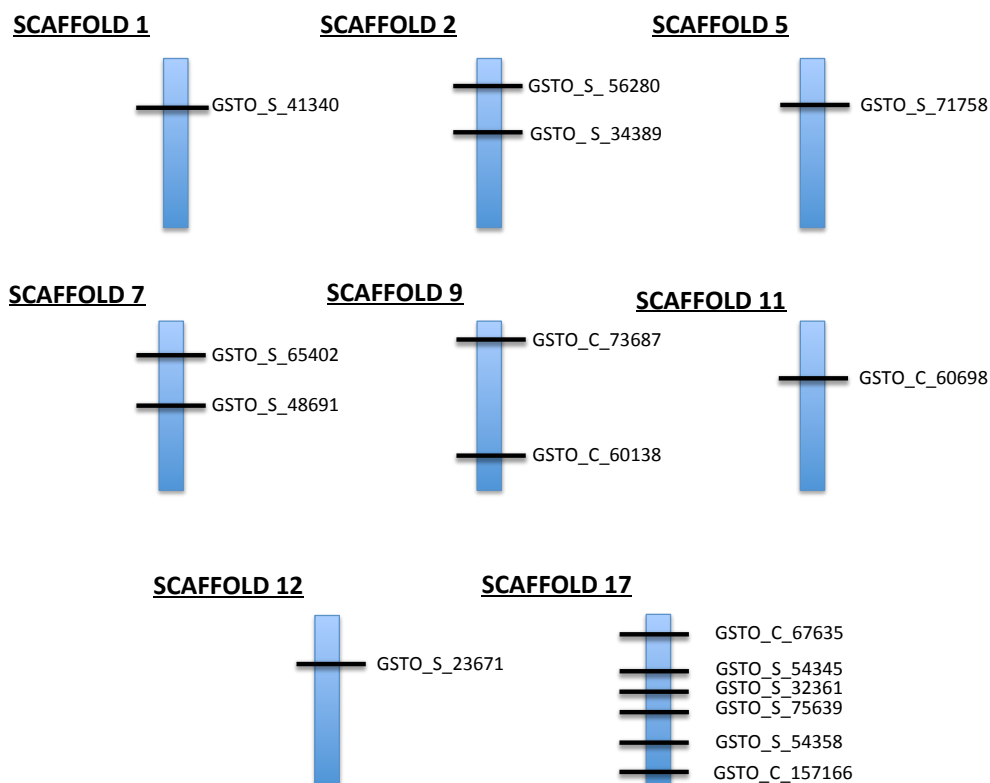


Figure 53 : Synténie des gènes codant les différentes GSTO de *T. versicolor*.

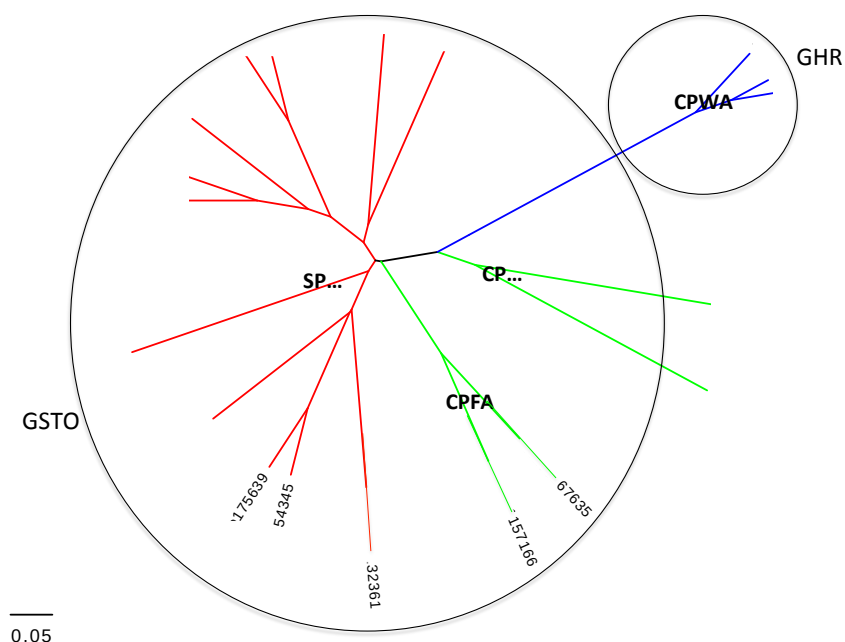


Figure 54 : Arbre phylogénétique des GST de la classe Oméga et GHR de *T. versicolor*. En bleu la branche de la famille des GHR, en rouge celle des GSTO à sérine et en vert celle des GSTO à cystéine. Sont notés les noms des GST 75639/54345 et 67635/157166, GST présentant respectivement de fort % d'homologie entre elles.

Afin d'étudier les différentes caractéristiques de ces GST de la classe oméga de *T. versicolor*, neuf représentants ont été produits et purifiés : trois contenant une cystéine comme résidu catalytique, GSTO 157166, 67635 et 60698 nommées respectivement GSTO-1C, GSTO-2C et GSTO-3C et six avec une sérine GSTO 75639, 56280, 48691, 65402, 54358 et 23671 nommées respectivement de GSTO-1S à GSTO-6S. Cinq substrats, la 3,4-Dihydro-1(2*H*)-naphthalenone glutathionylée (tétralone glutathionylée), le phénylacétophénone glutathionylé (PAP-SG), la 2-méthyl-1,4-naphalène-1,4-dione glutathionylé (ménadione glutathionylée), la 2-méthyl-1,4-naphalène-1,4-diole glutathionylé (ménadiolé glutathionylée) et le chlorodinitrobenzène (CDNB) ont été testés avec les différentes GSTO produites (Tableau 15). Ces tests enzymologiques ont permis de mettre en évidence la capacité de déglutathionylation des GSTO à cystéine et de glutathionylation des GSTO à sérine. Les différentes GSTO-C ont la capacité à déglutathionyler la tétralone-SG et le PAP-SG mais pas la ménadione-SG ou encore la ménadiolé-SG. L'affinité (K_m) et l'activité catalytique (k_{cat}) des GSTO-1C, 2C et 3C vis à vis du PAP-SG sont du même ordre de grandeur. Les différentes GSTO-S ont quant à elles la capacité à glutathionyler le CDBN. Les GSTO-1S, 4S, 5S et 6S présentent une affinité (K_m) quasi similaire vis à vis du CDBN avec en revanche des activités catalytiques (k_{cat}) différentes. Les GSTO-4S et 5S sembleraient moins efficaces (k_{cat}/K_m) que les GSTO-1S et 6S. Les GSTO-2S et 3S montrent une affinité face au CDBN équivalente mais un k_{cat} variant d'un facteur 100 (6min^{-1} pour la GSTO-2S et 522min^{-1} pour la GSTO-3S).

Ces activités sont des activités classiques de GSTO reflétant les différences observées au niveau de leurs résidus catalytiques (cystéinyl ou serinyl).

	TETRALONE-SG				PAP-SG			
	Activité	kcat	Km	kcat/Km	Activité	kcat	Km	kcat/Km
GSTO-1S	-				-			
GSTO-2S	-				-			
GSTO-3S	-				-			
GSTO-4S	-				-			
GSTO-5S	-				-			
GSTO-6S	-				-			
GSTO-1C	+	ND	ND	ND	+	420 min ⁻¹ ±23,54	305,3 µM ±51,98	1,377 min ⁻¹ *µM ⁻¹ ±0,077
GSTO-2C	+	ND	ND	ND	+	1833 min ⁻¹ ±195,7	817,9 µM ±179,1	3,922 min ⁻¹ *µM ⁻¹ ±0,233
GSTO-3C	+	ND	ND	ND	+	920 min ⁻¹ ±31	365,8 µM ±169	2,518 min ⁻¹ *µM ⁻¹ ±0,325

	CDNB			
	Activité	kcat	Km	kcat/Km
GSTO-1S	+	747,94 min ⁻¹ ±57,51	1735 µM ±277,9	0,43 min ⁻¹ *µM ⁻¹ ±0,03
GSTO-2S	+	5,99 min ⁻¹ ±0,70	545,4 µM ±146,3	0,011 min ⁻¹ *µM ⁻¹ ±0,0013
GSTO-3S	+	522,4 min ⁻¹ ±31,37	596,6 µM ±102	0,75 min ⁻¹ *µM ⁻¹ ±0,05
GSTO-4S	+	543 min ⁻¹ ±103	4709 µM ±1336	0,083 min ⁻¹ *µM ⁻¹ ±0,01
GSTO-5S	+	51,52 min ⁻¹ ±11,94	5045 µM ±1753	0,0102 min ⁻¹ *µM ⁻¹ ±0,002
GSTO-6S	+	3513 min ⁻¹ ±1096	6179 µM ±2730	0,56 min ⁻¹ *µM ⁻¹ ±0,177
GSTO-1C	-			
GSTO-2C	-			
GSTO-3C	-			

Tableau 15 : Tableau des différents paramètres cinétiques des différentes GSTO de *T. versicolor*. Le Km et kcat valeurs apparentes ont été calculées par régression non linéaire en utilisant l'équation de Michaelis -Menten . ND , non déterminée.

2) Interaction protéines-ligands

Lors de la dégradation du bois, les champignons décomposeurs vont interagir avec des composants du bois, les extractibles. Postulant que le GSTome des champignons de pourriture blanche pourrait rendre compte de leur adaptation aux différentes essences de bois, nous avons étudié les interactions entre deux classes de GST (GSTO et Ure2p) étendues chez deux champignons de pourriture blanche: *T. versicolor* et *P. chrysosporium* et différents extraits de bois.

Les GST fongiques sont capables d'afficher deux types d'activités : catalytique et ligandine (capacité de se lier / d'interagir avec des ligands). Pour étudier de potentielles activités ligandine des GST, nous avons utilisé une approche basée sur la stabilité thermique (FTS) grâce à la détection de fluorescence du SYPRO Orange (fluorophore). Cette méthode a été largement utilisée pour identifier des ligands de protéines. Les GST sont connues pour posséder différents domaines impliqués dans la liaison : au

glutathion (site G), aux substrats (site H) et aussi aux ligands (site L). Un test enzymatique utilisant un substrat (CMFDA) a été réalisé pour compléter le test FTS. Le test FTS et les expériences de compétition utilisant le CMFDA ont été utilisés pour étudier les interactions entre les GST étudiés et soixante extraits de bois. Une analyse en composantes principales (ACP) des données obtenues a été effectuée (Figure 55). Les protéines testées sont réparties selon l'axe F1 et F2. Les deux approches FTS et CE groupent certaines protéines telles que TvGSTO2S, TvGSTO4S ou PcUre2pA8. En revanche, les deux méthodes ont donné des résultats différents pour d'autres comme PcUre2pB1 et TvGSTO6S par exemple, ce qui suggère que dans ce cas le domaine ligandine et le domaine catalytique sont nettement différents. Ces données confirment que les approches FTS et CE sont complémentaires et leur combinaison pourrait être un moyen d'étudier la relation entre la diversité des GST fongiques et la variabilité des extraits de bois.

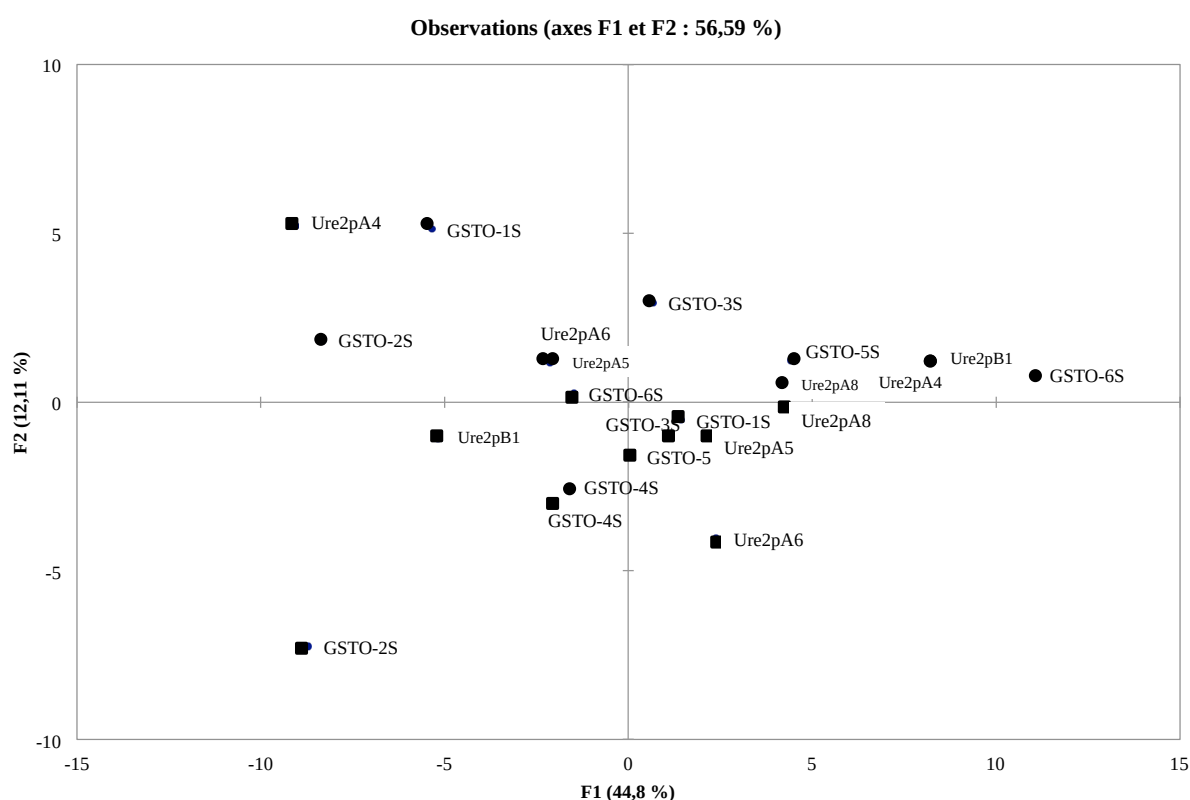


Figure 55 : ACP représentant la répartition de six GSTO-S de *T. versicolor* et dix Ure2p de *P. chrysosporium* après étude d'interactions mesurées en utilisant la stabilité thermique, test basé sur la fluorescence (FST = carrés) et d'expériences de compétition (CE = cercle), entre 60 extraits de bois et ces GST. (Deroy et al., 2015)

Alors que l'écologie de *P.chrysosporium* reste incertaine, *T. versicolor* est un champignon très répandu et trouvé majoritairement sur des bois de feuillus. Les interactions entre les six TvGSTO étudiés et des extraits acétonique de plusieurs feuillus et mélèze ont été plus particulièrement étudiées. Les extraits de mélèze ont été intégrés dans cette étude puisque ce bois présente une composition semblable à celle trouvée dans les bois de feuillus (Kebbi-Benkeder et al., 2014). La composition chimique relative de ces extraits a été déterminée par GC-MS (Tableau 16). Ils contiennent différentes classes de molécules comme des glucides, des terpènes, des lignanes ou des flavonoïdes ainsi qu'une fraction non caractérisée plus ou moins importante. Une ACP sur les données obtenues après les expériences de FTS et CE réalisées avec les GSTO à sérine de *T. versicolor* et les différents extraits a été effectuée (Figure 56). La distribution observée en trois groupes est statistiquement significative comme le montre l'analyse de variance effectuée sur les coordonnées obtenues ($p < 0,05$). Le premier groupe (A) contient les extraits de châtaigniers, de nœuds morts de chêne, de nœuds vivants de chêne ainsi que les extraits de duramen de noyer et de chêne. Ces extraits sont principalement caractérisés par la présence de catéchine dans la famille des flavonoïdes et de l'acide gallique. Le second groupe (B) est caractérisé par la présence d'extraits de bois présentant un fort taux de flavonoïdes, d'acide gallique et pour certains des lignanes. En effet les extraits de duramen et de nœuds de mélèze contiennent une grande partie des flavonoïdes non caractérisés. Cette composition chimique est similaire à celle observée dans un des extraits de merisier (duramen et nœuds) et pourrait expliquer leur distribution similaire. Néanmoins, il est important de mentionner que l'aubier de noyer ne contient pas de flavonoïdes mais se retrouve néanmoins dans ce groupe B. Une explication possible pourrait être la présence de produits chimiques également détectés dans le duramen, mais pas complètement identifiés. Enfin, le dernier groupe (C) contient des extraits d'aubier de la plupart des espèces d'arbres testés (la seule exception étant l'aubier de noyer) et tous les extraits de hêtre. Ces extraits sont caractérisés par l'absence (ou une concentration relative très faible) de flavonoïdes, d'acide gallique et de lignanes à l'exception de l'extrait d'aubier de merisier. Ce dernier contient une proportion relativement élevée de flavonoïdes non caractérisés et appartient toutefois à ce dernier groupe. L'analyse de la composition chimique a permis de mettre en évidence des différences significatives entre les extraits appartenant aux différents groupes. La présence/absence de l'acide gallique (analyse Fisher, $p < 0,0001$) et la présence/absence

de flavonoïdes (analyse Fisher, $p < 0,005$) pourraient en effet expliquer au moins partiellement la distribution observée au niveau de l'ACP. De nos résultats, il semblerait que l'étude des interactions biochimiques entre les GST et les extraits de bois pourrait être un moyen de discrimination entre ces derniers. Cette discrimination est en grande partie liée à la composition chimique du bois.

	Acides gras	Acide gallique	Resines	Sucres	Autres	Flavonoïdes Non identifiées	Catechine	Taxifoline	Sakuranine	Naringénine	Dihydrochrysine	Lignanes	Secoisolariciresinol	Matairesinol	Inconnus
Hêtre duramen	6.3														93.7
Hêtre aubier	29.9				16.9										53.2
Hêtre acétone				73.4	0.7		2.0								23.9
Hêtre acétone parallèle	11.2			63.3	5.2										20.3
Merisier duramen					4.9	18.8			24.3		29				23.0
Merisier duramen acétone parallèle			2.7	1.8	4.0	22.7	2.9		12.5	40.7					12.7
Merisier aubier	5.7		8.5			12.1	51.8								21.9
Merisier acétone				8.3		26.6	47.5								17.6
Merisier acétone parallèle				6.6	0.2	30.7	33.6								28.9
châtaigner duramen		60.5		24.7	6.4	1.6									6.8
châtaigner aubier	0.8			94.3	4.3										0.6
châtaigner noeuds morts		20.8		79.2											
châtaigner noeuds vivant		56.3		43.7											
Chêne vert duramen				83.9			13.2								2.9
Chêne vert aubier				97.1			2.9								
Chêne vert noeuds morts	6.9	10.5		16.1	5.6		52								8.9
Chêne vert noeuds vivants				74.4			24.2								1.4
Mélèze duramen					4.5	37.6									57.9
Mélèze duramen acétone parallèle	1.3		15.5	5.3	1.2	60.9									15.8
Mélèze aubier	14.4		59.3		6.6										19.7
Mélèze acétone				4.0	1.2	4.2		45.3				14	22.5		8.8
Mélèze acétone parallèle			7.7					38				5.4	30.3	11	7.6
Noyer duramen		2.9		55.2	22.5		19.4								
Noyer aubier				90.1	9.9										
Noyer noeuds vivants				96.4	2.3										1.3

Tableau 16 : Composition chimique relative des extraits acétoniques de différents feuillus et de mélèze déterminé par GC-MS.
a) moyenne globale ; b) noeuds mixtes signifie que les noeuds de vivant et morts ont été mélangés.
(Deroy et al., 2015)

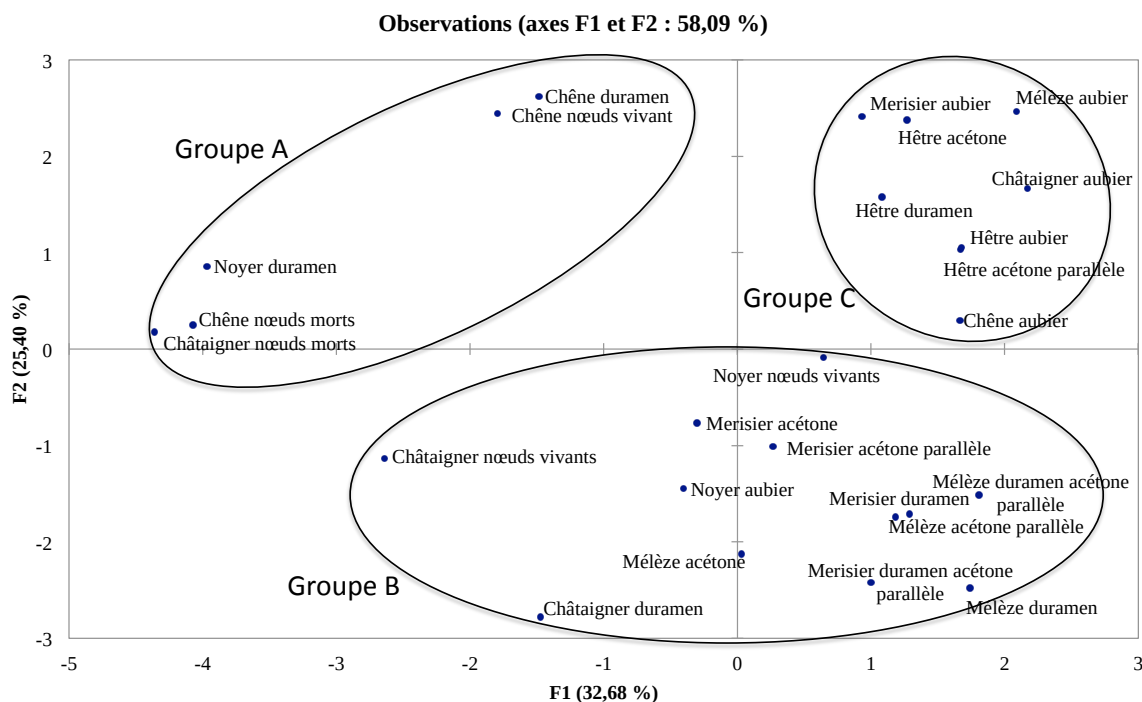


Figure 56 : ACP montrant la distribution des différents extraits acétoniques de bois après interaction (FST et CE) avec les GSTO à sérine de *T. versicolor*. (Deroy et al., 2015)

Afin d'obtenir une différenciation plus précise des extraits appartenant au groupe B décrit précédemment, une autre ACP a été réalisée avec les données obtenues en utilisant les approches FTS et CE à la fois avec les GSTO à sérine de *T. versicolor* et les Ure2p de *P. chrysosporium* (Figure 57). Nous observons trois sous-groupes distincts sur le plan statistique (analyse sur les coordonnées de Fisher, $p < 0,0001$). La présence de sakuranine dans les extraits de merisier duramen (ANOVA réalisée sur la composition chimique, $p < 0,0001$), et plus globalement la différence de composition des flavonoïdes pourraient expliquer cette répartition. Selon l'analyse précédente, la présence d'acide gallique pourrait être liée à la distribution observée des extraits de châtaigniers ($p < 0,01$). Pour confirmer que les TvGSTOs et PcUre2ps pourraient en effet interagir avec l'acide gallique et des flavonoïdes, nous avons testé les effets de composés purs (l'acide gallique et deux flavonoïdes, l'épicatéchine et la quercétine) sur la stabilité thermique et l'activité estérase des différentes protéines testées. Les résultats obtenus démontrent que les GSTO à sérine de *T. versicolor* et les Ure2p de *P. chrysosporium* peuvent interagir avec ces composés (modification de la stabilité thermique et inhibition de l'activité estérase) sans toutefois présenter une différence significative entre eux.

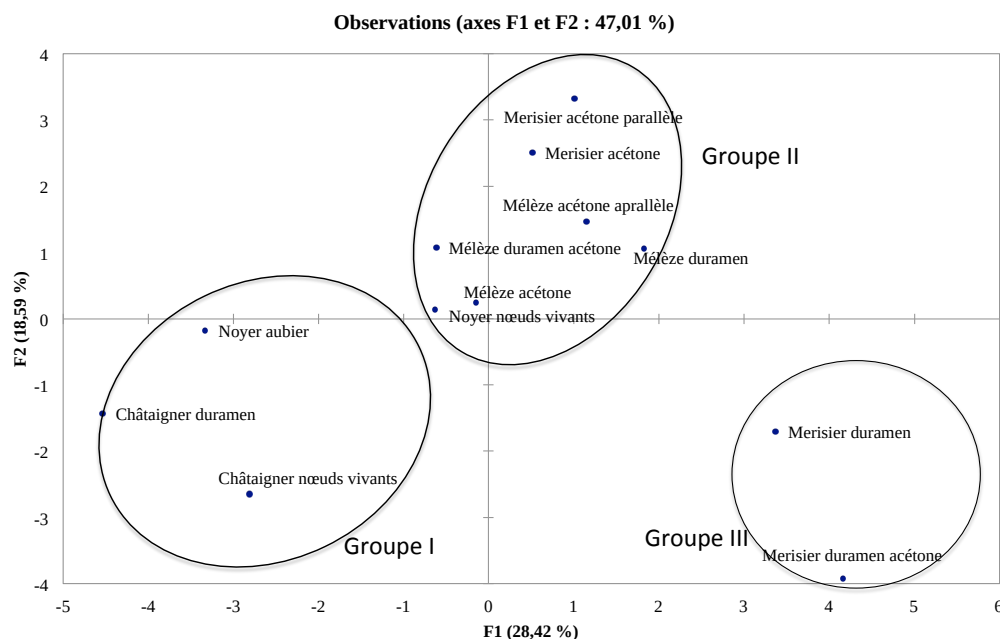


Figure 57 : ACP montrant la distribution des extraits de bois du groupe B après interaction avec les GSTO à sérine de *T. versicolor* et les Ure2p de *P. chrysosporium*. (Deroy et al., 2015)

Les champignons décomposeurs de bois ont développé un réseau complexe de GST, enzymes impliquées dans les processus de détoxification. La faible spécificité de ces enzymes suggère qu'ils sont capables d'interagir avec un grand nombre de substrats/ligands. Un facteur majeur impliqué dans la durabilité naturelle du bois est la présence d'extractibles, qui sont potentiellement toxiques pour les microorganismes. L'étude des interactions biochimiques entre GST et extraits de bois pourrait être un moyen d'accéder à la diversité de ces derniers. Ces interactions sont en effet étroitement liées à la composition chimique des extraits de bois et pourraient refléter dans certains cas l'origine (espèces d'arbres et localisation en bois) de ces extraits. A partir de ces données, il apparaît que le réseau de GST trouvé chez les pourritures blanches pourrait en effet donner des indications sur leur adaptation aux différentes essences de bois et aussi sur leur environnement chimique.

III. Adaptation de la classe GHR

Les études du système intracellulaire de *T. versicolor* se sont également portées sur la classe des GST appelée GHR. Les GHR sont des GST contenant une cystéine comme résidu catalytique (Meux et al., 2011). Chez *T. versicolor*, trois isoformes de GHR ont été identifiées TvGHR-73942, TvGHR-66368 et TvGHR-50990 nommées respectivement TvGHR1, TvGHR2 et TvGHR3. Ces GHR sont très proches avec 80% d'homologie constatée après alignement des séquences et présentent un site catalytique conservé de type CPWA (Figure 58).

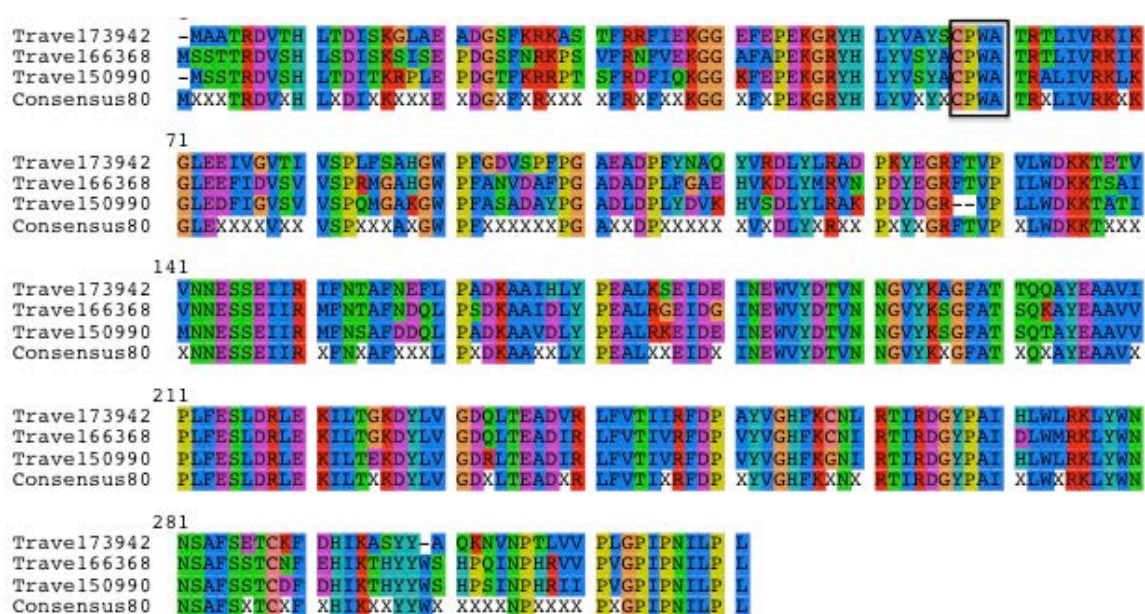


Figure 58 : Alignement des séquences des isoformes de GHR de *T. versicolor*. Les couleurs correspondent aux acides aminés identiques ; encadré en noir = site catalytique.

La production et la purification des différentes GHR de *T. versicolor* ont été entreprises afin d'étudier les interactions entre ces GST et différents substrats comme le PAP-SG, la tétralone-SG, la ménadione-SG et le CDNB (Tableau 17). Il a été mis en évidence que les GHR testées ne présentaient pas d'activité de glutathionylation, ces résultats étant en adéquation avec la littérature (McGoldrich, 2005 ; Garcera 2006). En revanche ces enzymes possédaient une activité de déglutathionylation de la ménadione-SG avec une efficacité catalytique (k_{cat}/K_m) du même ordre de grandeur, d'environ $2 \text{ min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$. Cette activité est associée au résidu catalytique cystéinyl des GHR. Des tests réalisés sur le mutant TvGHR1 C56S où la cystéine catalytique a été remplacée par une sérine ont

montré une perte de la fonction de déglutathionylation. Cette perte de fonction a été observée sur les profils HPLC (Figure 59). Le profil ménandione-SG incubée avec la TvGHR1 montrait une déglutathionylation du produit avec une sortie de pic au même temps de rétention que le témoin positif. Après incubation de la ménadione-SG avec le mutant TvGHR1 il a été observé un pic similaire à celui du produit seul, indiquant bien de ce fait une absence de déglutathionylation. Ces tests confirmaient donc l'implication de la cystéine catalytique dans ce rôle.

	TETRALONE-SG			
	Activité	KCAT	KM	KCAT/KM
TvGHR-1	+	ND	ND	ND
TvGHR-2	-			
	MENADIONE-SG			
	Activité	KCAT	KM	KCAT/KM
TvGHR-1	+	5619 min ⁻¹ ±361	2509µM ±257	2,240 min ⁻¹ *µM ⁻¹ ±0,143
TvGHR-2	+	1966 min ⁻¹ ±201	921µM ±200	2,196 min ⁻¹ *µM ⁻¹ ±0,198
	PAP-SG			
	Activité	KCAT	KM	KCAT/KM
TvGHR-1	+	252,3 min ⁻¹ ±31	364,6µM ±108,1	1,097 min ⁻¹ *µM ⁻¹ ±0,51
TvGHR-2	-			
	CDNB			
	Activité	KCAT	KM	KCAT/KM
TvGHR-1	-			
TvGHR-2	-			

Tableau 17 : Tableau des différents paramètres cinétiques des différentes GHR de *T. versicolor*. Les Km et kcat apparents ont été calculés par régression non linéaire en utilisant l'équation de Michaelis -Menten . ND , non déterminées

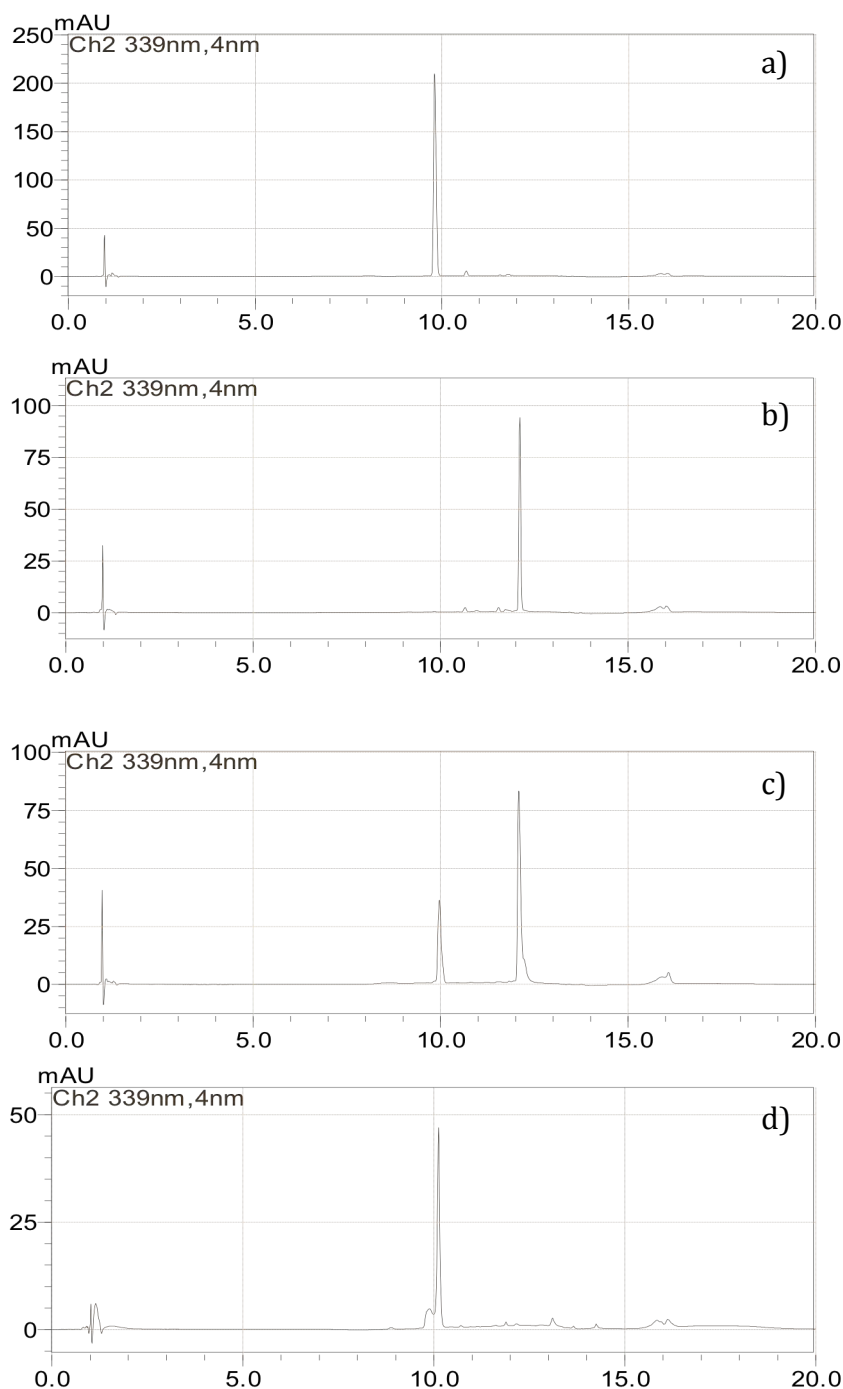


Figure 59 : Profils HPLC de l'activité de glutathionylation de la GHR1 et de la perte de fonction du mutant sur le substrat ménadione-SG.

a) substrat seul ménadione-SG ; b) témoin positif, TvGHR1 ; c) TvGHR1 avec cystéine catalytique CPWA et d) TvGHR1 mutant C56S avec sérine catalytique SPWA.

Nous avons également pu observer une particularité chez la TvGHR1. Celle-ci présentait une activité de déglutathionylation avec le substrat PAP-SG et tétralone-SG. Les paramètres catalytiques ont pu être déterminés avec un K_m de l'ordre de $364 \mu M$, un k_{cat} égale à 252 min^{-1} et l'efficacité de l'enzyme calculée, k_{cat}/K_m de $1,1 \text{ min}^{-1} \cdot \mu M^{-1}$ pour le substrat PAP-SG. En comparaison avec les GSTO à cystéine qui réalisent également la

réaction du déglutathionylation avec le PAP-SG, la TvGHR1 présentait une affinité similaire (K_m) pour ce substrat que la GSTO-1C ainsi que la même efficacité de réaction (k_{cat}/K_m). Comme pour les activités observées sur la ménadione-SG et ménadiolé-SG, nous avons observé une perte de fonction de déglutathionylation avec le mutant TvGHR1 C56S (Figure 60).

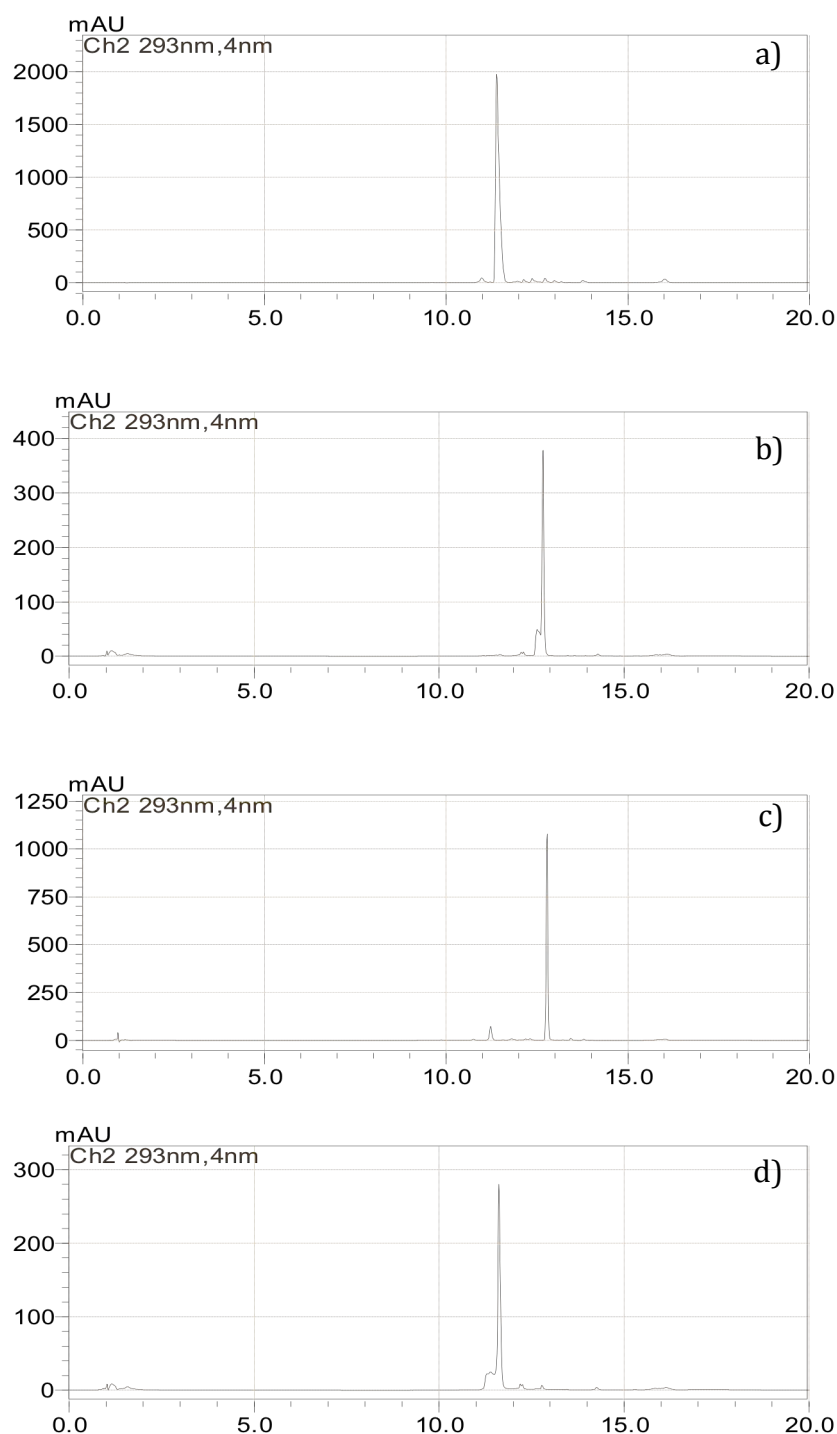


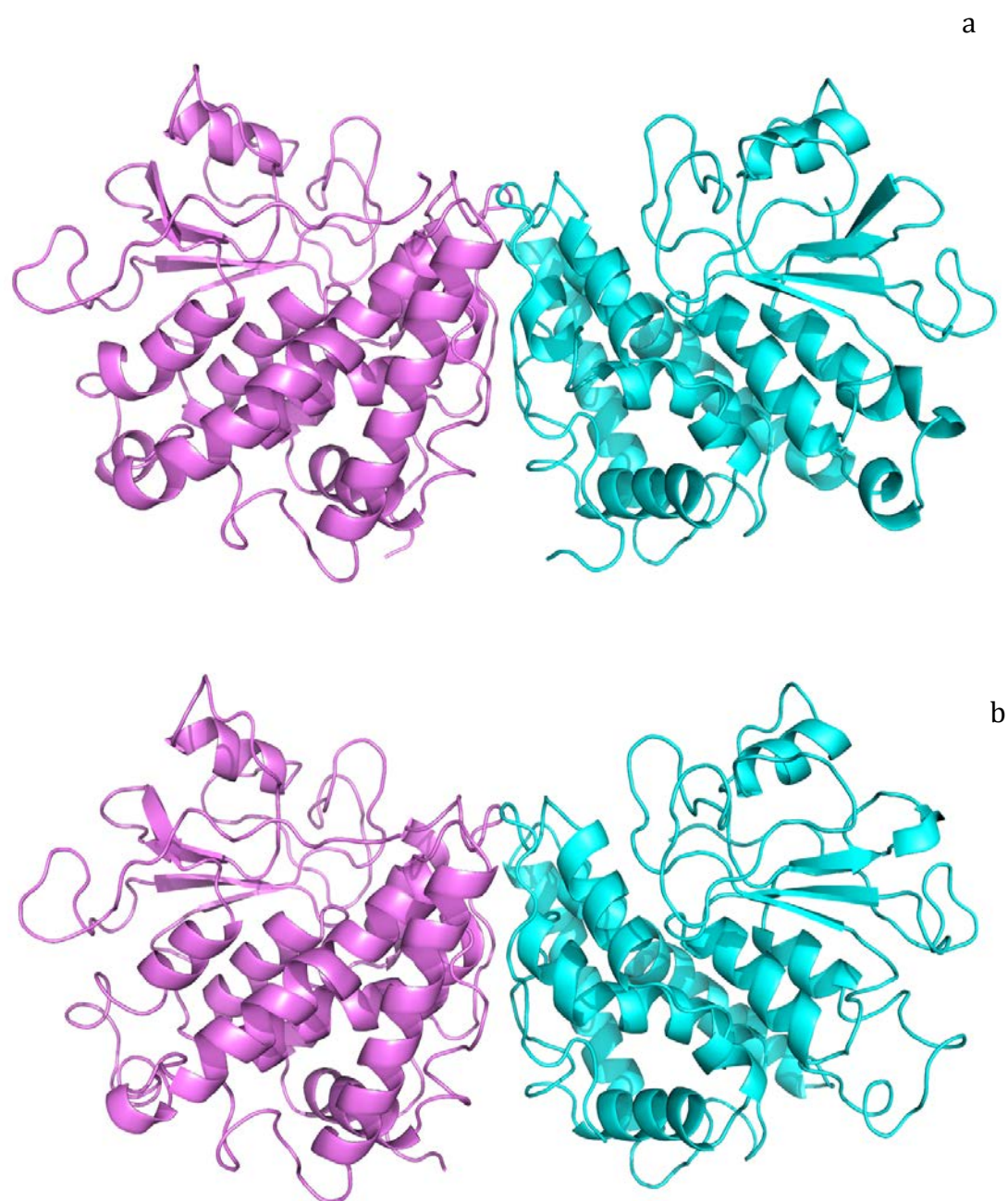
Figure 60 Profils HPLC de l'activité de la GHR1 et mutant sur le substrat PAP-SG.
a) substrat seul ménadione-SG ; b) témoin positif, GSTO-1C de *T. versicolor*; c) TvGHR1 avec cystéine catalytique CPWA et d) TvGHR1 mutant C56S avec sérine catalytique SPWA.

Une étude cristallographique, réalisée en collaboration avec le Laboratoire de Cristallographie, Résonance Magnétique et Modélisations (CRM2), a été mise en place sur les deux isoformes de GHR de *T. versicolor* TvGHR1 et TvGHR2 (Figure 61). Nous avons pu observer pour chaque domaine des GHR une structure classique à cette classe avec la présence d'un domaine N-terminal type thioredoxine et un domaine C-terminal en hélice α .

La structure de la protéine TvGHR1 a été résolue à 2,8 Å en dénombrant 325 résidus. Le cristal de TvGHR1 appartient au groupe d'espace C2, et l'unité asymétrique contient la forme physiologique de l'enzyme qui est un dimère. Les deux monomères sont reliés par un axe de symétrie non cristallographique d'ordre 2. Au niveau C-terminal les résidus non modélisés correspondent à une partie du tag poly-histidine. En présence de GSH, la densité électronique observée près du site actif a permis d'identifier comme attendu le glutathion au niveau du site G dans les deux monomères.

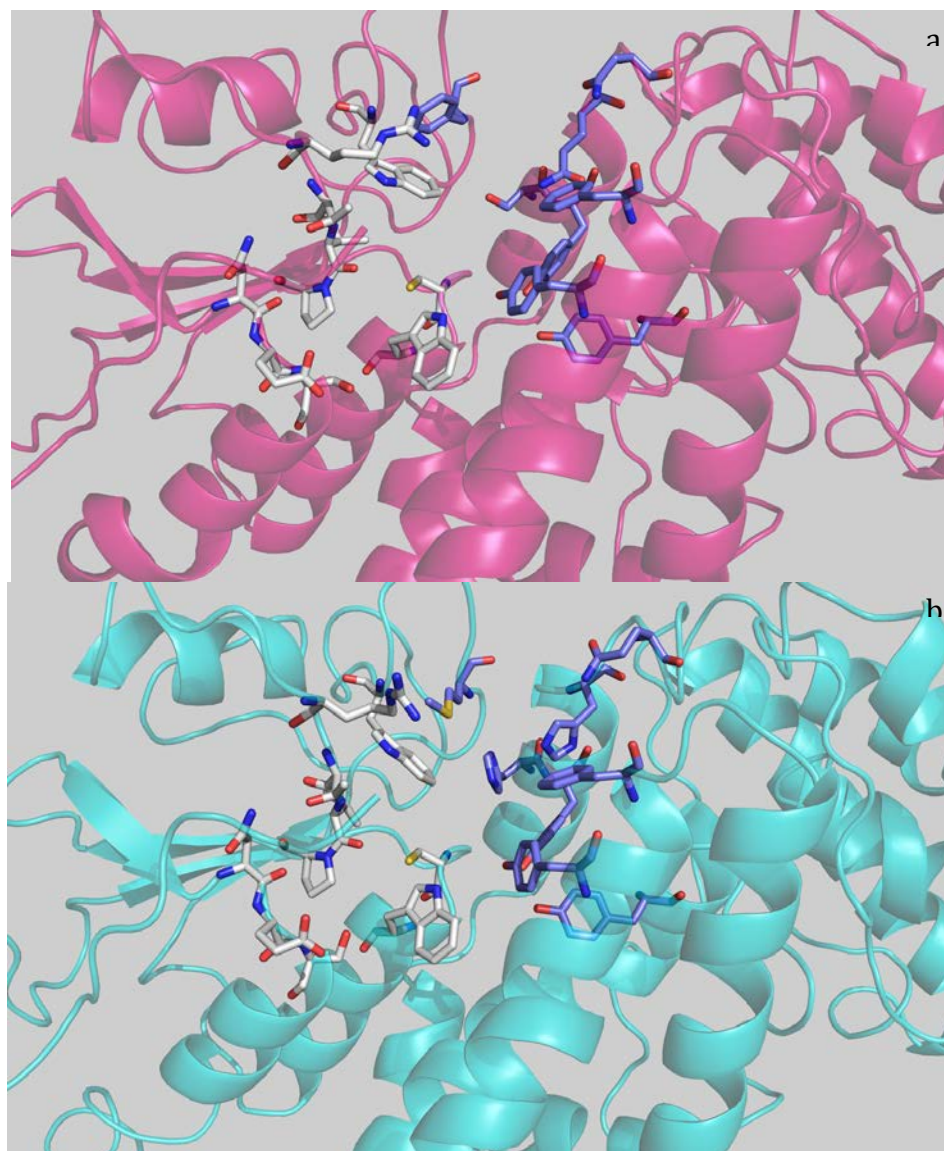
La structure de TvGHR2 a pu être résolue à 3.29 Å de résolution. Sa forte identité de séquence avec TvGHR1 (75 %) avait facilité la reconstruction. De manière similaire à TvGHR1, l'unité asymétrique est composée de deux monomères reliés par un axe d'ordre 2.

Ces enzymes présentaient une dimérisation type des GHR où le domaine I d'un monomère est en interaction avec le domaine I de l'autre monomère. Les structures tridimensionnelles des TvGHR présentaient des caractéristiques remarquables par rapport aux GST typiques : d'une part un dimère original où seuls les domaines tout hélice stabilisent l'assemblage et d'autre part un monomère possédant une longue extrémité N-terminale d'environ 50 résidus, une boucle reliant $\beta 2$ à $\alpha 2$ allongée par environ 30 résidus et une extrémité C-terminale étendue comprenant une 9ème hélice α et une boucle d'environ 20 résidus. Il a été observé au niveau de l'extrémité C-terminale 5 proline conservées dans les deux TvGHR.



**Figure 61 : Structure cristallographique des GHR de *T. versicolor*.
Violet = monomère A et Bleu = monomère B
a) TvGHR1 et b) TvGHR2**

En ce qui concerne la GHR1, le site G représenté en blanc (Figure 62) impliqué dans l'interaction du glutathion est identique chez les deux GHR de *T. versicolor* ainsi que chez la GHR de *P. chrysosporium*. Le site H de la TvGHR2 est similaire à celui de PcGHR1. En revanche, le site H de TvGHR1 contient une sérine²⁹⁵ et une glutamine²⁹⁹, à la place des deux histidines présentes chez la TvGHR2 et PcGHR1. De plus, la dernière hélice qui porte la sérine 295 et la glutamine²⁹⁹ du site H est raccourcie d'un résidu chez TvGHR1 (observation d'un gap sur l'alignement des deux séquences), ce qui aménage un canal entre cette hélice et la boucle qui est juste à côté (boucle beta2- alpha2). La poche de TvGHR1 est donc plus étendue que celle observée chez TvGHR2. Cela pourrait expliquer la particularité de la GHR1 à pouvoir déglutathionyler le PAP-SG.



**Figure 62 : Structure cristallographique des sites actifs GHR de *T.versicolor*.
Blanc = site G et Bleu = site H
a) TvGHR1 et b) TvGHR2**

IV. Conclusion

Afin d'essayer de répondre à l'hypothèse de départ que le système intracellulaire des champignons décomposeurs pourrait refléter leur adaptation à l'environnement l'étude de famille multigéniques de GST a été entreprise. Les différents résultats obtenus ont permis de mettre en évidence plusieurs particularités du GSTome de *Trametes versicolor*. La classe des GST oméga est particulièrement étendue chez ce champignon, cette extension étant liée à la présence de GSTO à sérine. Cette caractéristique est peu répandue chez les basidiomycètes ; par exemple *P. chrysosporium*, autre champignon de pourriture blanche, ne compte qu'une GSTO à sérine. Il a été observé une activité classique des GSTO à cystéine, activité de déglutathionylation (Meux et al., 2013). En revanche les GSTO présentant une sérine catalytique ont révélé avoir une activité de glutathionylation. L'extension de la classe des GST oméga chez *T. versicolor* pourrait lui permettre alors d'augmenter sa diversité d'activité face à différents substrats. De plus l'étude des interactions protéine/ligands a permis de mettre en évidence un nombre élevé de substrats reconnus par les différentes GSTO. Ces interactions sont directement liées à la composition chimique des extraits de bois. Les données obtenues indiquent que les GSTO étudiées de *T. versicolor* pourraient être utilisés comme outils enzymatiques pour discriminer les extraits de bois contenant des molécules comme l'acide gallique ou les flavonoïdes. La présence de GSTO avec une sérine catalytique nous amène à penser à une évolution, plus particulièrement à une duplication de gène amenant une néofonctionnalisation, donc à l'émergence de fonctions nouvelles, susceptibles par la suite d'être sélectionnées.

La seconde classe étudiée de GST chez *T. versicolor*, les GHR, nous a également permis de mettre en évidence une différence structurale de certaines d'entre elles. Malgré une dimérisation classique, le changement de quelques acides aminés au niveau de leur site H, acceptant le substrat, leur confère des caractéristiques particulières. En effet chez la TvGHR1, les travaux réalisés ont permis de mettre en évidence une reconnaissance de cette GST à un plus grand nombre de substrat. De plus, le mutant TvGHR1 C56S a montré la capacité à glutathionyler.

Les champignons décomposeurs ont développé un réseau complexe de GST, enzymes impliquées dans processus de détoxification. La faible spécificité de ces enzymes suggère qu'elles sont capables d'interagir avec un grand nombre de substrats. D'autre part, un

facteur majeur impliqué dans durabilité naturelle du bois est la présence d'extractibles potentiellement toxiques pour les micro-organismes. Nous rapportons ici que l'étude des interactions biochimiques entre GST et extraits de bois pourrait être un moyen d'accéder à la diversité de ces derniers. Ces interactions sont en effet étroitement liées à la composition chimique du bois et pourrait refléter dans certains cas, l'origine (espèces d'arbres et de localisation en bois) de ces extraits.

L'extension des classes des GST et leurs différences structurales trouvées chez les pourritures blanches comme *T. versicolor* pourraient donner un aperçu sur leur adaptation aux différentes essences de bois et aussi de leur environnement chimique.

Chapitre III :

Etude du phénomène d'exsudation chez une souche de *T. versicolor*

Ce troisième chapitre porte sur une particularité observée lors de tests sur les souches de *T. versicolor*, la sécrétion d'exsudat. Pendant leurs croissances au sein de leur habitat naturel certaines espèces de champignons comme *Laetiporus conifericola*, champignon saprophyte, *Penicillium sp.*, pathogène, ou encore *Suillus bovinus*, mycorhizien, produisent un exsudat (Saueracker, 2013; Sun et al., 1999). Chez les mycorhiziens, cet exsudat jouerait un rôle dans le chimiotactisme (Frey-Klett, 1997). Nous avons observé la sécrétion d'exsudat des souches de *T. versicolor* en présence de bois. De plus, une des souches étudiées présentait la particularité de sécréter de l'exsudat également en absence de bois. Les travaux du chapitre III de cette thèse était de comprendre et caractériser le rôle de cet exsudat chez *T. versicolor*.

I. Souche sécrétrice d'exsudat

Un test de dégradation du bois effectué selon la norme NF113 a été mis en place dans le but de pouvoir comparer le comportement des différentes souches de *T. versicolor* face à la dégradation de plusieurs essences de bois. Lors de ce test, la première observation du phénomène d'exsudation des souches de *T. versicolor* a été faite (Figure 63). A partir de 8 semaines nous avons observé la présence d'un liquide accumulé à proximité du bois. Sur le bois de hêtre quelques souches présentaient cette caractéristique comme Tv44889. En revanche sur bois de chêne aubier et duramen nous avons visualisé cet exsudat chez la quasi totalité des souches en plus ou moins grande quantité, de quelques gouttes chez la souche Tv70 sur chêne aubier, Tv1532 sur chêne duramen à plusieurs μL chez les souches Tv110102 ou encore Tv1218 sur chêne duramen. En fonction de l'essence de bois utilisée lors du test de dégradation, la couleur des gouttelettes était variable allant du brun/caramel comme chez Tv1252 sur chêne

aubier au noir comme chez Tv1218 sur chêne duramen. Aucun exsudat n'a été observé lors de la dégradation sur épicéa.



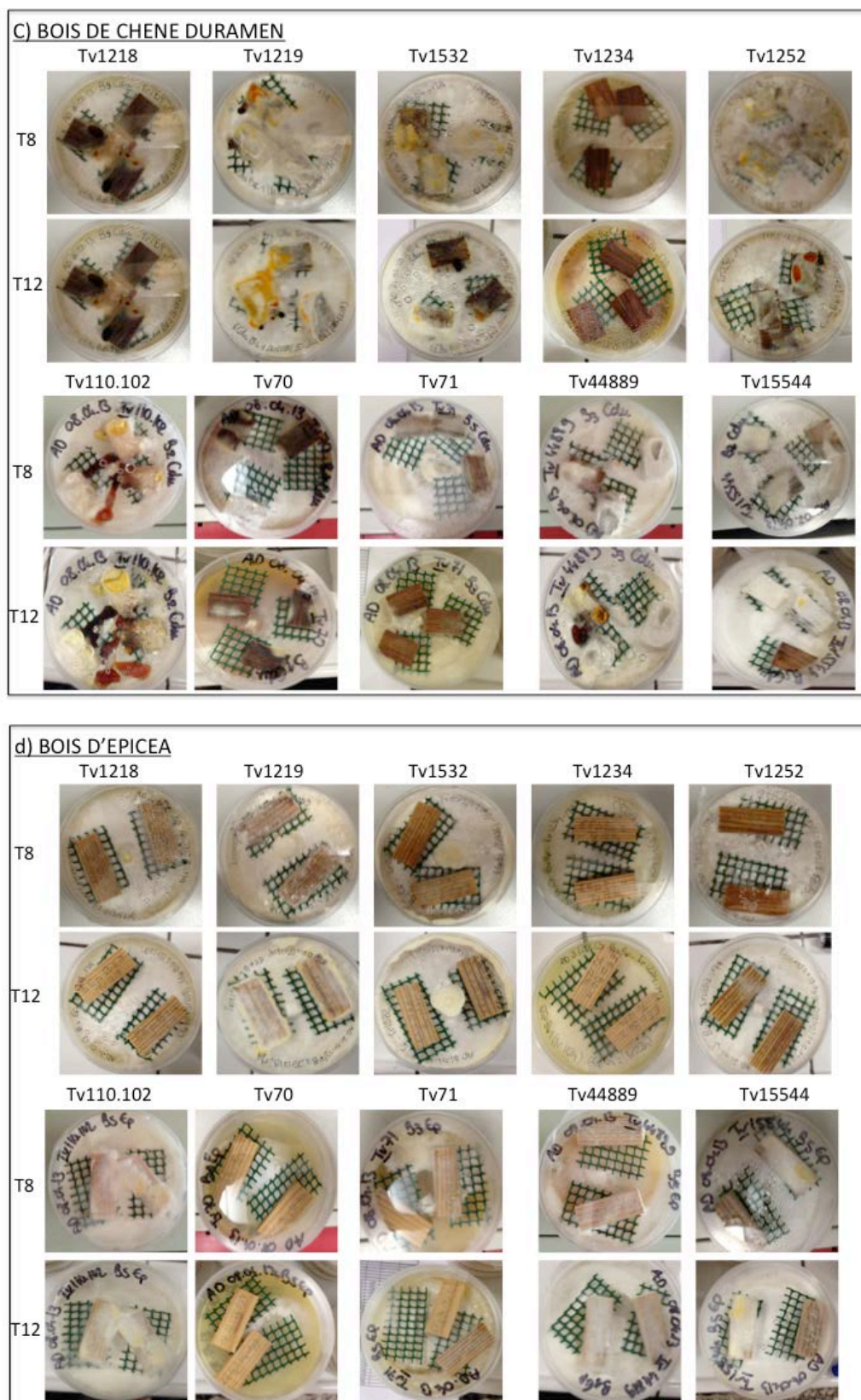
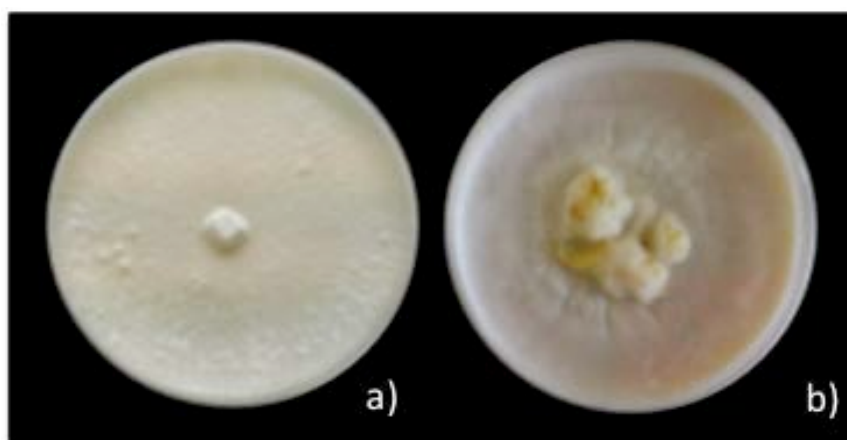


Figure 63 : Photos du phénomène d'exsudation des différentes souches de *T. versicolor* visualisable lors du test de perte de masse à 8 semaines (T8) et 12 semaines (T12) de croissance sur différentes essences de bois.

a) croissance sur bois de hêtre ; b) croissance sur bois de chêne aubier ; c) croissance sur bois de chêne duramen et d) croissance sur bois d'épicéa.

Ce phénomène observé lors de la présence de bois avec les différentes souches testées de *T. versicolor* a été également remarqué lors de la croissance sur malt-agar pour une souche : Tv1218 (Figure 64). Seule cette souche en comparaison avec les autres présentait la caractéristique de produire un exsudat en abondance en absence de bois. Ce liquide de couleur jaune pâle est observable à partir de la 4^{ème} semaine de croissance. La figure 64 montre la présence et la couleur de l'exsudat produit par la souche Tv1218 à quatre semaines de croissance sur malt agar en comparaison avec une souche moins productrice Tv1252.



**Figure 64 : Photo des souches de *T. versicolor* productrice et non productrice d'exsudat sur malt-agar à 4 semaines de croissance.
a) Tv1252 ; b) Tv1218**

Nos investigations se sont alors portées sur la caractérisation de l'exsudat à travers l'étude de la souche Tv1218, souche « hyper-sécrétrice ».

II. Caractérisation de l'exsudat

Nous avons dans un premier temps observé et comparé les souches Tv1218, souche hypersécrétrice et Tv1252, souche témoin à la loupe binoculaire puis au microscope électronique à balayage (MEB).

A la loupe binoculaire (Figure 65), les mycéliums des deux souches apparaissaient denses. Il a été observé pour la souche Tv1218 la présence de gouttes de tailles

variables. Pour la souche Tv1252 utilisée comme souche de comparaison avec Tv1218 nous avons observé néanmoins des gouttelettes de très petites tailles à certains endroits de la boîte.

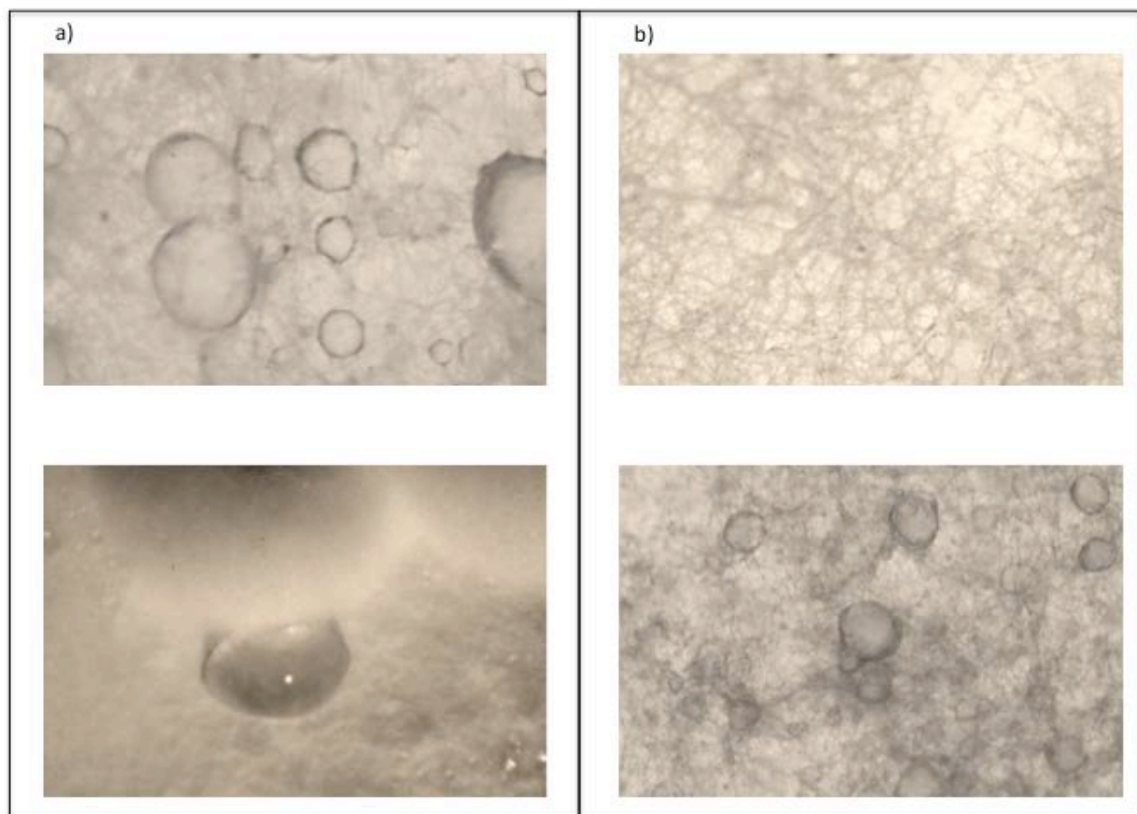


Figure 65 : Image de souches de *T. versicolor* à la loupe binoculaire à T4 semaines de croissance.

- a) souche Tv1218, souche hyper sécrétrice avec visualisation de gouttes d'exsudat de taille importantes**
b) souche Tv1252, souche témoin avec visualisation de quelques gouttelettes.

Au MEB, deux structures totalement différentes ont été remarquées pour la souche Tv1218, considérée comme hyper-sécrétrice, et la souche Tv1252, considérée comme faiblement sécrétrice. Les deux souches à 4 semaines de croissance sur malt agar présentaient un réseau dense de mycélium. Pour la souche Tv1218 (Figure 66), nous avons observé une structure particulièrement intéressante au niveau de l'exsudat. L'observation au MEB indiquait que cette production d'exsudat était associée à une structure fongique particulière avec un réseau d'hyphes structuré. Le mycélium apparaissait comme formant un « manchon » autour de la goutte. Cette structure se retrouvait partout lors de la présence d'exsudat. La goutte, quant à elle, apparaissait moins organisée. Une analyse chimique a été réalisée pendant les observations au MEB ;

nous avons pu constater une forte concentration en chlore, sodium, potassium et phosphore au niveau de la zone avec l'exsudat en comparaison avec la zone de mycélium (Figure 67). Après visualisation au MEB, nous avons émis l'hypothèse de présence de vésicule au niveau de l'exsudat. Dans le but de valider ou non cette hypothèse, une ultracentrifugation a été réalisée. Après ultracentrifugation de l'exsudat et nouvelle analyse au MEB, aucune structure n'a pu être observée.

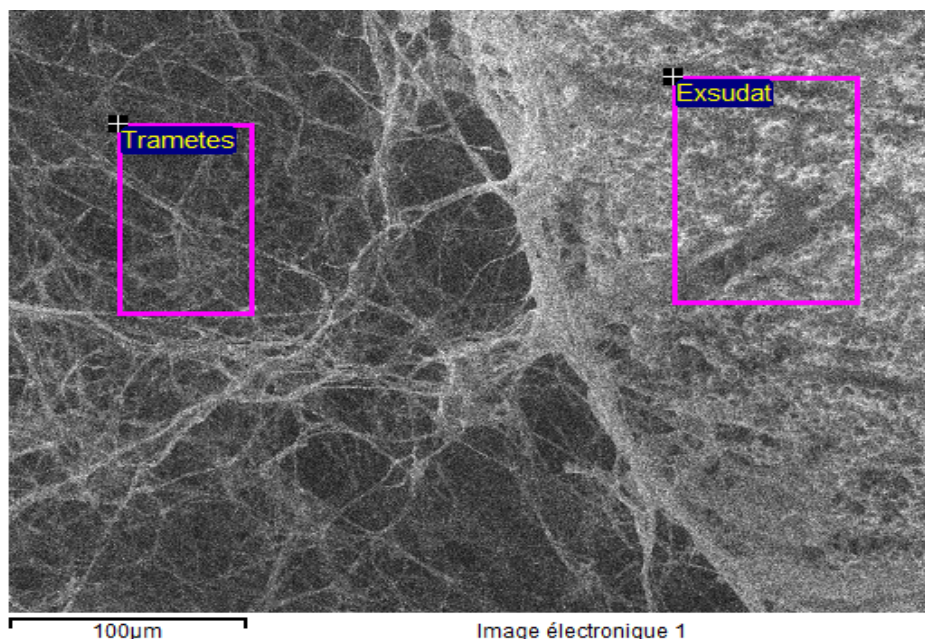


Figure 66 : Photo prise en microscopie à pression contrôlée 80Pa, de la souche Tv1218 hypersécrétrice d'exsudat, grossissement 1200X. Visualisation de l'interface mycélium et exsudat avec structure particulière au niveau de la goutte.

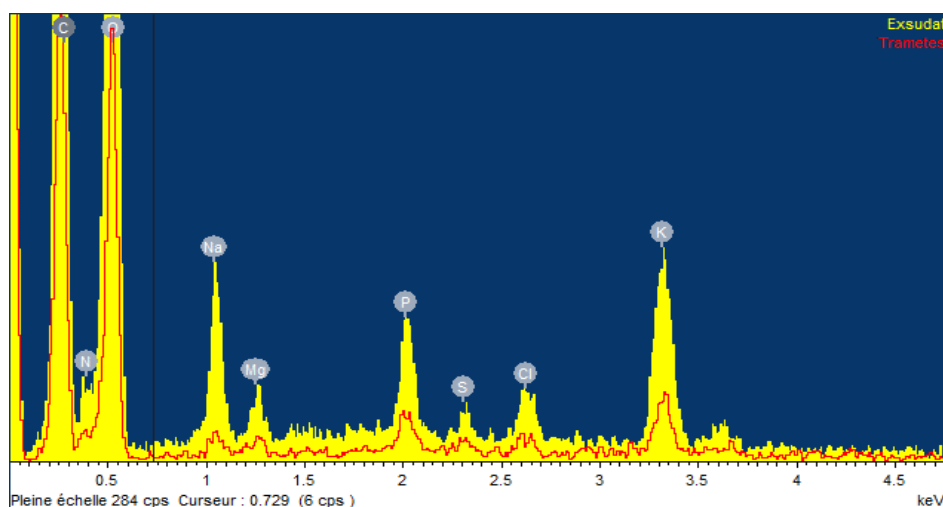


Figure 67 : Analyse de la composition chimique au niveau du mycélium de *T. versicolor* et de l'exsudat pour la souche Tv1218.
Courbe rouge : composition chimique du mycélium hors exsudat. Courbe jaune : composition chimique de la goutte d'exsudat avec forte présence de potassium, phosphore et chlore.

Dans un second temps, notre analyse s'est portée sur les activités enzymatiques potentiellement contenues dans cet exsudat et la composition protéique de celui-ci.

Un test d'activité enzymatique (Figure 68) a été réalisé pour étudier les activités liées à la dégradation de la cellulose (β -glucosidases et β -cellobiohydrolases), à la dégradation des hémicelluloses (β -glucuronidases et β -xylosidases) et à la dégradation de la lignine (LiP, MnP et laccases). Une activité glucosidase importante a été observée de l'ordre de $0,330 \pm 0,02$ nmol de substrat consommées par minute et par μ g de protéines totales dans l'exsudat. Les activités glucuronidase et laccases étaient également élevées par rapport au activité cellobiohydrolases, xylosidases, LiP et MnP avec respectivement $0,240 \pm 0,015$ et $0,165 \pm 0,007$ nmol de substrat consommées par minute et par μ g de protéines totales dans l'exsudat. De faibles activités cellobiohydrolase, xylosidase et peroxydases à lignine ont été mesurées avec moins de 0,002 nmol de substrat consommées par minute et par μ g de protéines totales dans l'exsudat. Aucune activité MnP n'a pu être dosée.

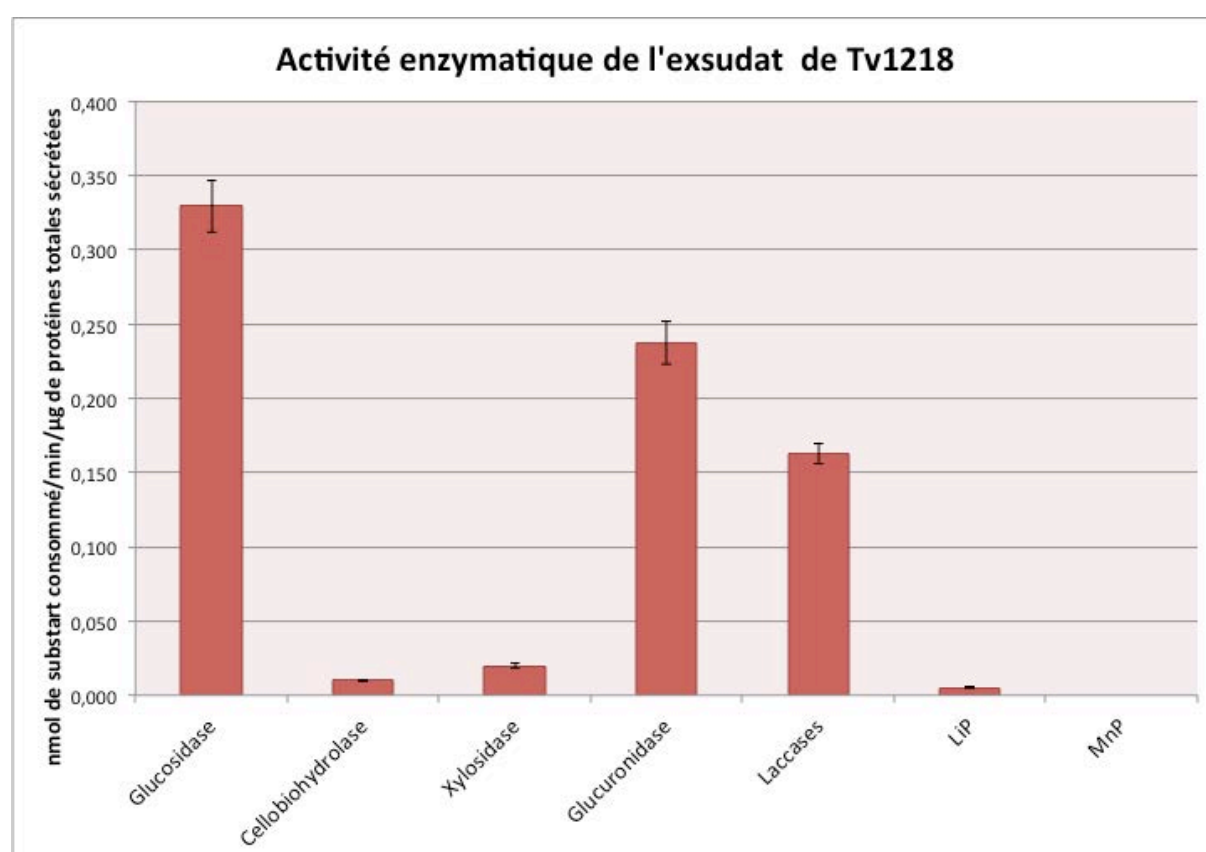


Figure 68 : Graphique en barre représentant les activités en nmol de substrats consommées par min et par μ g de protéines totales sécrétées de différentes activités glucosidases, cellobiohydrolases, glucuronidase, xylosidases, LiP : Peroxydases à lignines, MnP : Peroxydases à manganèses et laccases pour l'exsudat de Tv1218 sur malt.

Une analyse protéomique a été réalisée sur l'exsudat produit par la souche Tv1218 lors de sa croissance sur malt agar. Plus de 300 protéines ont été identifiées (Annexe 10). Les protéines présentes dans l'exsudat (Figure 69) appartiennent à des classes regroupant des protéines impliquées dans la dégradation du bois mais également dans celle de la paroi fongique et dans la détoxification. La famille la plus abondante, 33%, est celle des hydrolases avec beaucoup de glycosides hydrolases (GH) ainsi que des peptidases. Elles sont généralement les protéines les plus abondantes retrouvées lors de la dégradation du bois. Nous avons observé également un grand nombre d'oxydo-réductases, 21%, comprenant des peroxydases comme les LiP, MnP et des oxydases comme les laccases et de petites protéines de rôle encore incertain, les SSP 23%. Des enzymes impliquées dans le système de détoxification étaient également présentes, des GST.

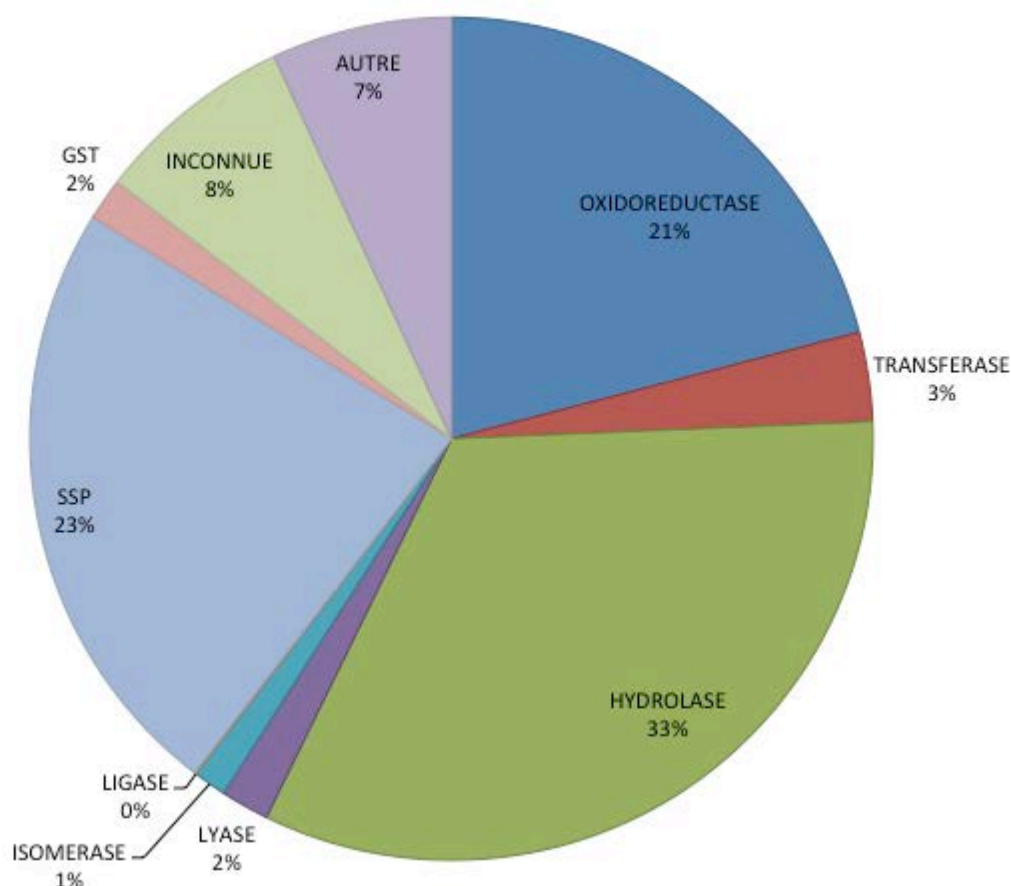


Figure 69 : Secteur représentant les différentes familles de protéines retrouvées dans l'exsudat sur malt de la souche Tv1218 après analyse par LCMS/MS.

Une analyse plus fine des 50 protéines les plus abondantes dans l'exsudat a été par la suite réalisée et comparée avec les 50 protéines les plus abondantes contenues dans les sécrétomes chêne aubier et sécrétome hêtre pour la souche Tv1218 (Tableau 18). Les protéines contenues dans les différents sécrétomes étaient très majoritairement sécrétées. Le sécrétome chêne aubier possédait 100% de protéine contenant un peptide signal de sécrétion et 92% de protéine pour le sécrétome hêtre. En revanche au niveau de l'exsudat, sur les 50 protéines les plus abondantes seulement 68% protéines contiennent un peptide signal. Sur les 50 protéines les plus abondantes dans l'exsudat, 42 étaient communes entre l'exsudat, le sécrétome chêne et/ou le sécrétome hêtre (Figure 70). 28 protéines, soit 56%, se sont avérées communes entre l'exsudat, le sécrétome chêne aubier et le sécrétome hêtre. Dans ces 28 protéines, nous avons retrouvé 12 GH (environ 43%) ayant un rôle dans la dégradation du bois et également 3 peroxydases dont une MnP. 8 protéines (16%) ont été respectivement dénombrées comme communes entre l'exsudat et le sécrétome chêne aubier et l'exsudat et le sécrétome hêtre. A ce niveau d'analyse, la composition de l'exsudat était similaire à la composition protéique des sécrétomes.

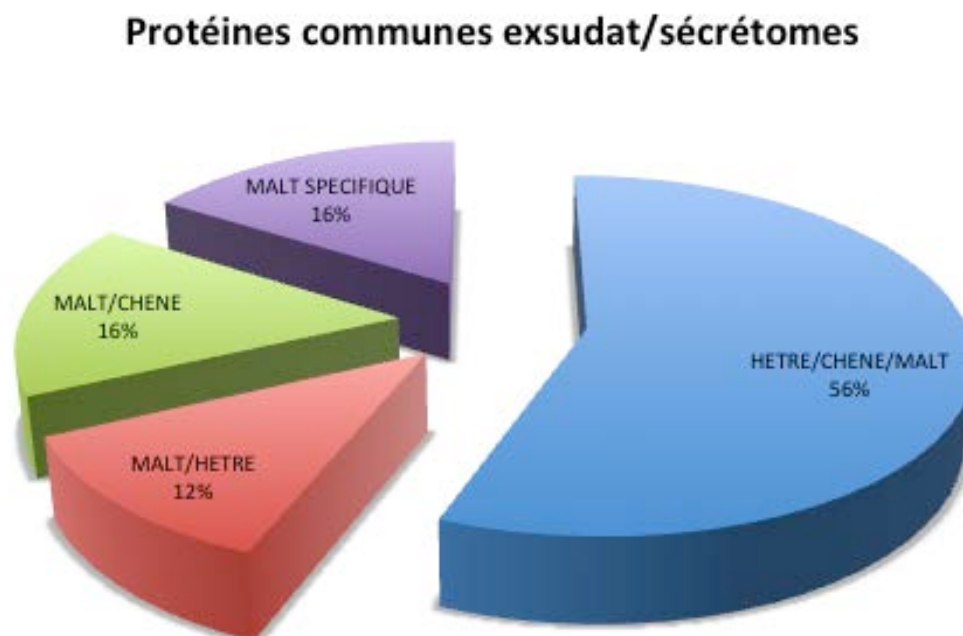


Figure 70 : Pourcentage des protéines communes entre l'exsudat/sécrétome chêne/sécrétome hêtre ; l'exsudat/sécrétome chêne ; l'exsudat/sécrétome hêtre et pourcentage des protéines spécifiques à l'exsudat pour les 50 protéines les plus abondantes de l'exsudat sur malt de la souche Tv1218.

a)

NUMERO PROTEIQUE ET NOM DU GENE	H1218	FONCTION	PEPTIDE SIGNAL
jgi Trave1 62539 estExt_fgenes1_pg.C_2_t10059	7,00	Inconnue	SP
jgi Trave1 33056 fgenes1_pm.1_#_400	3,75	CBM1-GH5	SP
jgi Trave1 29435 fgenes1_kg.7_#_92_#_isotig09910	2,50	cerato-platanin-like protéine	SP
jgi Trave1 162601 estExt_Genewise1Plus.C_3_t20245	1,86	GH61	SP
jgi Trave1 40186 fgenes1_pm.12_#_249	1,38	Peptidase A1	SP
jgi Trave1 136117 e_gw1.14.279.1	1,25	GH12	SP
jgi Trave1 45192 gm1.4076_g	1,13	GH61	SP
jgi Trave1 143379 estExt_Genewise1.C_3_t20476	1,00	GH61	SP
jgi Trave1 136431 e_gw1.15.102.1	1,00	Inconnue	SP
jgi Trave1 54134 gm1.13018_g	1,00	Phosphatidylserine decarboxylase-	Non
jgi Trave1 89076 gw1.3.1186.1	1,00	Phosphatidylethanolamine-binding protéine	Non
jgi Trave1 150608 estExt_Genewise1.C_7_t40230	0,75	CBM1-GH5_5	SP
jgi Trave1 133420 e_gw1.12.444.1	0,67	Carbohydrate-Binding Module 1 protéine	SP
jgi Trave1 43877 gm1.2761_g	0,67	CBM1-CE1	SP
jgi Trave1 114944 e_gw1.2.1056.1	0,67	LiP12	SP
jgi Trave1 47480 gm1.6364_g	0,60	Putative isomerase YbhE	SP
jgi Trave1 46975 gm1.5859_g	0,57	GH131-CBM1	SP
jgi Trave1 166188 estExt_Genewise1Plus.C_4_t50484	1,08	Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin, sedolisin	SP
jgi Trave1 112163 e_gw1.1.1465.1	1,64	GH7	SP
jgi Trave1 66957 estExt_fgenes1_pg.C_120133	0,71	GH30	SP
jgi Trave1 124366 e_gw1.6.717.1	0,62	GH7	SP
jgi Trave1 133731 e_gw1.12.519.1	0,67	LiP8	SP
jgi Trave1 75025 estExt_Genemark1.C_13_t10207	0,60	SSP	SP
jgi Trave1 109109 e_gw1.1.2102.1	0,67	Carboxylesterase, type B	SP
jgi Trave1 173904 estExt_Genewise1Plus.C_12_t10152	2,15	Ferritin/ribonucleotide reductase-like	SP
jgi Trave1 38102 fgenes1_pm.7_#_405	2,10	CBM1-GH10	SP
jgi Trave1 110790 e_gw1.1.1440.1	0,96	GH7	SP
jgi Trave1 32323 fgenes1_kg.16_#_106_#_isotig03621	1,67	SSP	SP
jgi Trave1 147958 estExt_Genewise1.C_5_t40227	0,74	Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin, sedolisin	SP
jgi Trave1 175614 estExt_Genewise1Plus.C_14_t20113	1,00	GH131	SP
jgi Trave1 112899 e_gw1.2.1846.1	1,17	Zinc finger, RING-type	SP
jgi Trave1 154147 estExt_Genewise1.C_11_t20144	0,56	GH10	SP
jgi Trave1 70662 estExt_Genemark1.C_4_t10231	1,17	CE16	SP
jgi Trave1 39965 fgenes1_pm.12_#_28	0,58	Endonuclease/exonuclease/phosphatase	Non
jgi Trave1 30524 fgenes1_kg.9_#_230_#_isotig05488	0,70	GH13_32-CBM20	SP
jgi Trave1 28848 fgenes1_kg.5_#_434_#_isotig03352	1,00	SSP	SP
jgi Trave1 63826 estExt_fgenes1_pg.C_4_t10147	1,25	CBM1-GH6	SP
jgi Trave1 64339 estExt_fgenes1_pg.C_5_t10057	0,67	Peptidase A1	Non
jgi Trave1 144893 estExt_Genewise1.C_3_t70138	0,64	CBM1-GH10	SP
jgi Trave1 37024 fgenes1_pm.5_#_453	0,65	GH35	SP
jgi Trave1 29347 fgenes1_kg.7_#_4_#_isotig01747	0,60	C-type lectin	SP
jgi Trave1 134721 e_gw1.13.1089.1	2,80	GH16	SP
jgi Trave1 25402 fgenes1_kg.1_#_223_#_isotig01416	1,17	GH5	SP
jgi Trave1 62730 estExt_fgenes1_pg.C_2_t10361	1,50	GH	SP
jgi Trave1 31361 fgenes1_kg.11_#_234_#_isotig06870	1,33	Thaumatococcus-like protéine 2 OS=Prunus persica PE=2 SV=1	SP
jgi Trave1 30879 fgenes1_kg.10_#_131_#_isotig01075	3,00	Inconnue	SP
jgi Trave1 103761 gw1.18.126.1	2,50	Inconnue	SP
jgi Trave1 28335 fgenes1_kg.4_#_615_#_isotig10902	1,00	Barwin-related endoglucanase	SP
jgi Trave1 48870 gm1.7754_g	1,10	Dyp-type peroxidase	SP
jgi Trave1 116268 e_gw1.3.2123.1	3,00	Barwin-related endoglucanase	SP

b)

NUMERO PROTEIQUE ET NOM DU GENE	C1218	FONCTION	PEPTIDE SIGNAL
jgi Trave1 141077 estExt_Genewise1.C_2_t10400	2,00	CBM1-CE1	SP
jgi Trave1 115295 e_gw1.3.986.1	1,60	TvLac4	SP
jgi Trave1 161949 estExt_Genewise1Plus.C_2_t60062	1,25	CBM1-CE1	SP
jgi Trave1 141321 estExt_Genewise1.C_2_t20384	1,40	GH28	SP
jgi Trave1 168018 estExt_Genewise1Plus.C_6_t20304	2,50	GH45	SP
jgi Trave1 39742 fgenes1_pm.11_#_121	1,50	CBM1-CE16	SP
jgi Trave1 161823 estExt_Genewise1Plus.C_2_t50365	1,25	CBM1-GH5_7	SP
jgi Trave1 151848 estExt_Genewise1.C_9_t10184	1,00	CBM1-GH5_5	SP
jgi Trave1 46975 gm1.5859_g	1,43	GH131-CBM1	SP
jgi Trave1 133420 e_gw1.12.444.1	1,00	Carbohydrate-Binding Module 1 protéine	SP
jgi Trave1 150608 estExt_Genewise1.C_7_t40230	2,00	CBM1-GH5_5	SP
jgi Trave1 143379 estExt_Genewise1.C_3_t20476	3,50	GH61	SP
jgi Trave1 136431 e_gw1.15.102.1	1,00	Inconnue	SP
jgi Trave1 45192 gm1.4076_g	1,25	GH61	SP
jgi Trave1 162601 estExt_Genewise1Plus.C_3_t20245	1,57	GH61	SP
jgi Trave1 29435 fgenes1_kg.7_#_92_#_isotig09910	2,00	cerato-platanin-like secreted protéine	SP
jgi Trave1 33056 fgenes1_pm.1_#_400	3,25	CBM1-GH5	SP
jgi Trave1 125941 e_gw1.7.676.1	2,53	GH7	SP
jgi Trave1 166188 estExt_Genewise1Plus.C_4_t50484	1,77	Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin, sedolisin	SP
jgi Trave1 112163 e_gw1.1.1465.1	2,36	GH7	SP
jgi Trave1 66957 estExt_fgenes1_pg.C_120133	1,29	GH30	SP
jgi Trave1 124366 e_gw1.6.717.1	3,15	GH7	SP
jgi Trave1 138261 estExt_Genewise1.C_1_t20010	1,33	TvLac3	SP
jgi Trave1 38102 fgenes1_pm.7_#_405	1,70	CBM1-GH10	SP
jgi Trave1 110790 e_gw1.1.1440.1	3,83	GH7	SP
jgi Trave1 58222 estExt_fgenes1_pm.C_5_t10200	1,67	GH43	SP
jgi Trave1 32323 fgenes1_kg.16_#_106_#_isotig03621	1,00	SSP	SP
jgi Trave1 59914 estExt_fgenes1_pm.C_9_t10159	1,29	GH51	SP
jgi Trave1 70662 estExt_Genemark1.C_4_t10231	1,17	CE16	SP
jgi Trave1 30524 fgenes1_kg.9_#_230_#_isotig05488	1,10	GH13_32-CBM20	SP
jgi Trave1 54963 estExt_fgenes1_pm.C_1_t10075	1,29	GH15-CBM20	SP
jgi Trave1 145953 estExt_Genewise1.C_4_t30357	1,10	GH43-CBM35	SP
jgi Trave1 63826 estExt_fgenes1_pg.C_4_t10147	5,67	CBM1-GH6	SP
jgi Trave1 37357 fgenes1_pm.6_#_209	1,57	GH15-CBM20	SP
jgi Trave1 172472 estExt_Genewise1Plus.C_10_t10367	1,32	Peptidase S41	SP
jgi Trave1 159574 estExt_Genewise1Plus.C_1_t60393	1,10	GH27	SP
jgi Trave1 69085 estExt_Genemark1.C_2_t10406	1,00	Ricin B lectin	SP
jgi Trave1 37024 fgenes1_pm.5_#_453	1,27	GH35	SP
jgi Trave1 29347 fgenes1_kg.7_#_4_#_isotig01747	1,20	C-type lectin	SP
jgi Trave1 134721 e_gw1.13.1089.1	2,60	GH16	SP
jgi Trave1 25402 fgenes1_kg.1_#_223_#_isotig01416	1,00	GH5	SP
jgi Trave1 62730 estExt_fgenes1_pg.C_2_t10361	1,25	GH	SP
jgi Trave1 58033 estExt_fgenes1_pm.C_4_t20333	1,15	GH31	SP
jgi Trave1 31361 fgenes1_kg.11_#_234_#_isotig06870	3,67	Thaumatococcus-like protéine 2 OS=Prunus persica PE=2 SV=1	SP
jgi Trave1 31823 fgenes1_kg.13_#_82_#_isotig10799	2,00	Inconnue	SP
jgi Trave1 30879 fgenes1_kg.10_#_131_#_isotig01075	2,00	Inconnue	SP
jgi Trave1 103761 gw1.18.126.1	2,00	Inconnue	SP
jgi Trave1 28335 fgenes1_kg.4_#_615_#_isotig10902	6,00	Barwin-related endoglucanase	SP
jgi Trave1 48870 gm1.7754_g	3,05	Dyp-type peroxidase	SP
jgi Trave1 116268 e_gw1.3.2123.1	7,00	Barwin-related endoglucanase	SP

c)

NUMERO PROTEIQUE ET NOM DU GENE	1218Malt	FONCTION	PEPTIDE SIGNAL
jgi Trave1 116268 e_gw1.3.2123.1	23,00	Barwin-related endoglucanase	SP
jgi Trave1 48870 gm1.7754_g	15,65	Dyp-type peroxidase	SP
jgi Trave1 28335 fgenes1_kg.4_#_615_#_isotig10902	13,00	Barwin-related endoglucanase	SP
jgi Trave1 103761 gw1.18.126.1	9,00	Inconnue	SP
jgi Trave1 31823 fgenes1_kg.13_#_82_#_isotig10799	6,00	Inconnue	SP
jgi Trave1 30879 fgenes1_kg.10_#_131_#_isotig01075	6,00	Inconnue	SP
jgi Trave1 31361 fgenes1_kg.11_#_234_#_isotig06870	4,67	Thaumatococcus-like protéine 2 OS=Prunus persica PE=2 SV=1	SP
jgi Trave1 58033 estExt_fgenes1_pm.C_4_t20333	3,74	GH31 (probable æ-glucosidase)	SP
jgi Trave1 62730 estExt_fgenes1_pg.C_2_t10361	3,50	GH17	SP
jgi Trave1 25402 fgenes1_kg.1_#_223_#_isotig01416	3,17	GH5	SP
jgi Trave1 74079 estExt_Genemark1.C_10_t20059	2,75	Inconnue (autophagy à vérifier)	Non
jgi Trave1 51375 gm1.10259_g	2,71	MnP1s	SP
jgi Trave1 134721 e_gw1.13.1089.1	2,60	GH16	SP
jgi Trave1 29347 fgenes1_kg.7_#_4_#_isotig01747	2,20	Inconnue	SP
jgi Trave1 56391 estExt_fgenes1_pm.C_2_t20087	2,16	Formate/glycerate dehydrogenase catalytic domain-like	Non
jgi Trave1 27040 fgenes1_kg.3_#_189_#_isotig03458	2,14	Class I glutamine amidotransferase (ortholog glyoxalase III)	SP
jgi Trave1 37024 fgenes1_pm.5_#_453	2,12	GH35	SP
jgi Trave1 110860 e_gw1.1.2477.1	2,08	GH31	SP
jgi Trave1 144610 estExt_Genewise1.C_3_t60182	2,06	Glucose-methanol-choline oxidoreductase	Non
jgi Trave1 69085 estExt_Genemark1.C_2_t10406	2,00	Ricin B lectin	SP
jgi Trave1 104903 gw1.1.3860.1	2,00	Ubiquitin	SP
jgi Trave1 157325 estExt_Genewise1.C_180040	1,90	Peptidase (Arginase)	SP
jgi Trave1 159574 estExt_Genewise1Plus.C_1_t60393	1,90	GH27	SP
jgi Trave1 144893 estExt_Genewise1.C_3_t70138	1,79	CBM1-GH10	SP
jgi Trave1 28124 fgenes1_kg.4_#_404_#_isotig03566	1,75	Nucleoside diphosphate kinase	Non
jgi Trave1 30997 fgenes1_kg.10_#_249_#_isotig11576	1,75	Inconnue	Non
jgi Trave1 156281 estExt_Genewise1.C_14_t10086	1,71	Uricase	Non
jgi Trave1 170938 estExt_Genewise1Plus.C_8_t30423	1,67	Glycoside hydrolase, 3 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase,	SP
jgi Trave1 23498 fgenes1_pg.11_#_397	1,67	SSP Thaumatococcus	SP
jgi Trave1 64339 estExt_fgenes1_pg.C_5_t10057	1,67	Peptidase A1	Non
jgi Trave1 141481 estExt_Genewise1.C_2_t30165	1,55	GH32	SP
jgi Trave1 62807 estExt_fgenes1_pg.C_2_t10480	1,50	GST	Non
jgi Trave1 42128 gm1.1012_g	1,50	Dienelactone hydrolase	Non
jgi Trave1 173225 estExt_Genewise1Plus.C_11_t10166	1,50	Histidine acid phosphatase	Non
jgi Trave1 26239 fgenes1_kg.2_#_49_#_isotig06902	1,50	VP2 versatile peroxidase	SP
jgi Trave1 172472 estExt_Genewise1Plus.C_10_t10367	1,47	Peptidase S41	SP
jgi Trave1 152398 estExt_Genewise1.C_9_t20486	1,45	Catalase	Non
jgi Trave1 37357 fgenes1_pm.6_#_209	1,43	GH15-CBM20	SP
jgi Trave1 52130 gm1.11014_g	1,40	Osmotin thaumatococcus-like protéine	SP
jgi Trave1 44897 gm1.3781_g	1,36	MnP10s	SP
jgi Trave1 130108 e_gw1.9.1262.1	1,29	Alkyl hydroperoxide reductase/peroxiredoxin	Non
jgi Trave1 151588 estExt_Genewise1.C_8_t30469	1,29	Glycoside Hydrolase 3 protéine	Non
jgi Trave1 130496 e_gw1.10.609.1	1,27	GH3	SP
jgi Trave1 131080 e_gw1.10.521.1	1,27	MnP3s	SP
jgi Trave1 151784 estExt_Genewise1.C_9_t10108	1,19	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	Non
jgi Trave1 28580 fgenes1_kg.5_#_166_#_isotig01255	1,18	GH15-CBM20	SP
jgi Trave1 144202 estExt_Genewise1.C_3_t50086	1,18	Peptidase A1	SP
jgi Trave1 52976 gm1.11860_g	1,17	Purine nucleoside permease	SP
jgi Trave1 63826 estExt_fgenes1_pg.C_4_t10147	1,17	CBM1-GH6	SP
jgi Trave1 174166 estExt_Genewise1Plus.C_12_t20028	1,12	FAD linked oxidase, N-terminal	SP

Tableau 18 Tableaux des 50 protéines les plus abondantes
(a) dans le sécrétome chêne aubier ; (b) dans les sécrétome hêtre ; (c) dans l'exsudat sur malt
pour la souche Tv1218.

L'analyse de ces 50 protéines les plus abondantes a révélé que la composition de l'exsudat était caractérisée par la présence d'enzymes impliquées dans l'oxydation et la détoxification de molécules aromatiques (12/50) et un grand nombre de CAZymes (19/50) dont certaines impliquées dans la dégradation de la paroi fongique (Figure 71). En ce qui concerne les enzymes impliquées dans l'oxydation et la détoxification nous avons retrouvé par exemple quatre MnP (Tv131080, Tv130496, Tv44897 et Tv51375), une Dyp-type peroxydase (Tv48870) ou encore une peroxydase versatile (Tv26239). Pour les CAZymes impliquées dans la dégradation de la paroi fongique ont été retrouvées des GH endo ou exo β 1-3 (Tv62730, Tv25402), une transférase (Tv170938) et des protéines thaumatine (Tv23498; TV31361). D'autres CAZymes ont été également connues pour avoir un rôle important dans la dégradation de la cellulose comme la GH6 Tv63826 ou dans la dégradation des hémicelluloses GH10 Tv144893.

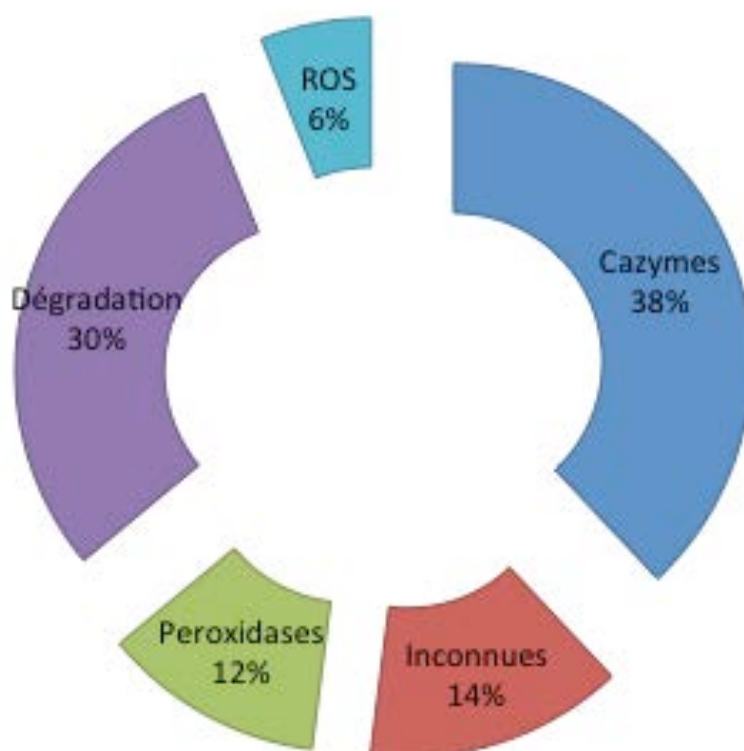


Figure 71 : Répartition des différentes enzymes en fonction de leur famille.

Une ACP a été réalisée avec l'approche de protéomique préalablement effectuée sur les 50 protéines les plus abondantes dans les sécrétomes chêne aubier et les sécrétomes de hêtre en y incluant l'exsudat sur malt (Annexe 11). Cette ACP a permis de montrer que l'exsudat sécrété par Tv1218 sur malt était étroitement lié avec les sécrétomes de chêne aubier (Figure 72).

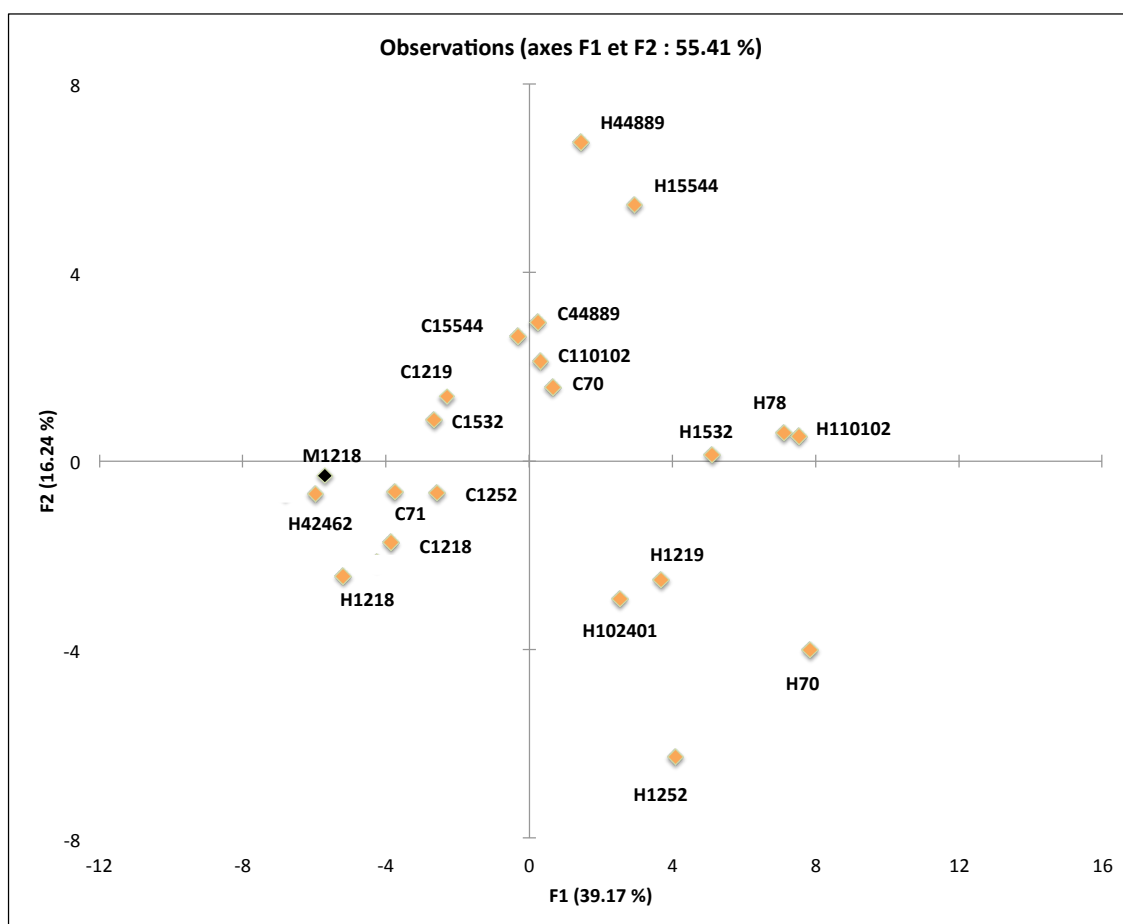


Figure 72 : ACP réalisée sur les protéines les plus abondantes dans les sécrétomes chêne aubier, sécrétomes hêtre et l'exsudat sur malt.

C = sécrétome chêne aubier ; H = sécrétome hêtre ; M = exsudat sur malt agar

A 2 semaines de croissance des différences significatives entre les deux souches ont été observées. 243 gènes étaient 5 fois plus induits ($p < 0,05$) chez Tv1218 par rapport à Tv1252 (Annexe 12). 25% des transcrits induits chez la souche Tv1218 codaient des protéines sécrétées en comparaison avec Tv1252 où seulement 5% de transcrits induits codant des protéines sécrétées (Figure 74a). A 4 semaines (Figure 74b), les résultats étaient similaires avec la présence de protéines sécrétées beaucoup plus importante chez Tv1218 que chez Tv1252.

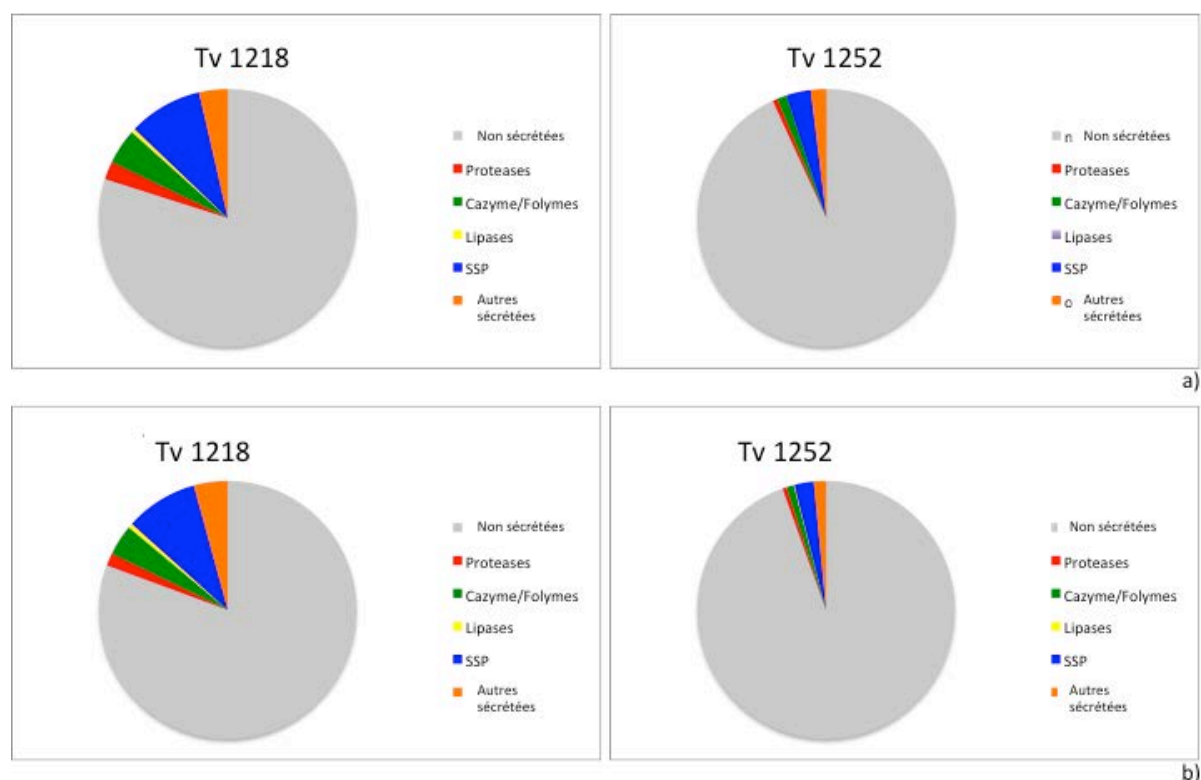


Figure 74 : Graphiques représentant les transcrits induits chez les souches Tv1218 et Tv1252. a) à 2 semaines de croissance, b) à 4 semaines de croissance.

Parmi les gènes régulés à la hausse chez la souche Tv1218, 9 codaient pour des protéines, qui appartiennent aux 50 protéines les plus abondantes identifiées dans l'exsudat par l'approche protéomique. Parmi ces gènes ont été retrouvées : 2 endoglucanases (Tv116268, Tv28335), 1 thaumatine (Tv31361), 1 arginase impliquée dans la dégradation (Tv157325), 1 peroxydase impliquée dans la détoxification (Tv48870) et 4 protéines de fonction inconnue (Tv74079, Tv103761, Tv30997 et Tv31823). Après analyses, il a été observé que toutes ces protéines possédaient un peptide signal. Selon la base de donnée du JGI, les deux endoglucanases appartiendrait à la super-famille des cerato-platanin. Les protéines appartenant à cette famille ont été mises en évidence chez un champignon pathogène *Ceratocystis Platani* ayant un rôle dans l'infection de l'hôte. De récentes études ont montré que cette famille de protéines pourrait être impliquée dans la reconnaissance de polysaccharides (de Oliveira et al., 2011). Elles pourraient donc avoir un rôle proche des expansines en permettant de structurer la cellulose laissant alors la place à d'autres enzymes pour la dégradation (Pazzagli et al., 2014). Le rôle de la thaumatine est relativement connu chez les champignons pathogènes, ayant une implication dans l'infection. Hors chez les champignons de type pourriture, celui-ci reste encore à définir. Des études aurait montré une activité 1,3- β -glucanase (Osmond et al., 2001; Upadhyay et al., 2009). La peroxydase identifiée quant à elle appartient à la famille des Dyp-type peroxydases. Parmi les 50 gènes les plus régulés (Annexe 13), 11 gènes (23%) ont été identifiés comme probablement impliqués dans le turn-over de la paroi cellulaire fongique (Figure 75). En particulier, 3 gènes codant des chitinases (Tv37625, Tv127472, Tv131793) et 2 gènes impliqués dans le catabolisme de la paroi cellulaire (Tv46204, Tv60093) ont été détecté. 8 gènes (16%) avaient un rôle dans la dégradation et la détoxification avec notamment 2 gènes codant des CytP450 (Tv51436, Tv51437) et en conformité avec les données de protéomique, le gène codant pour la Dyp type peroxydase (Tv48870). Les DyP-type peroxydases sont des peroxydases à hème outre une fonction de peroxydase classique pourraient également avoir des rôles d'hydrolase et oxydase. Malgré un rôle encore mal défini, elles pourraient être impliquées dans la décomposition extracellulaire de composés xénobiotiques toxiques pour la cellule (Colpa et al., 2014; Sugano, 2009).

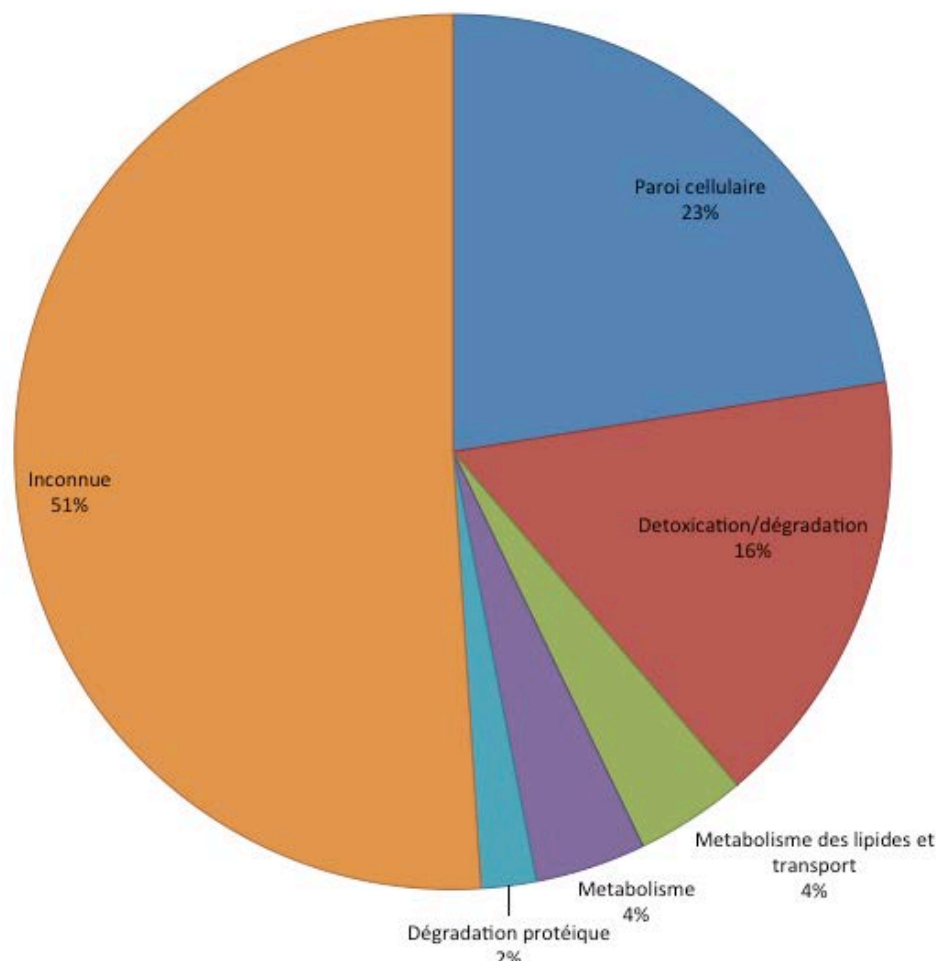


Figure 75 : Répartition en différentes classes des 50 gènes les plus régulés chez la souche Tv1218 par rapport à la souche Tv1252

III. Conclusion

La sécrétion d'exsudat a été décrite chez un certain nombre de champignons et notamment chez les mycorhiziens avec une fonction potentielle associée à la perception de l'environnement (Sun et al., 1999). Ce phénomène d'exsudation reste peu étudié. En 2013, Saueracker observait au niveau environnemental la sécrétion d'exsudats par divers champignons y compris des champignons de pourriture blanche (Saueracker, *et al.* 2013). Cette exsudation pourrait être impliquée dans le piégeage d'insectes (apport nutritionnel) ou la protection de spores... Concernant ce phénomène chez les champignons de pourriture, il a émis l'hypothèse que l'hypothèse serait liée à la dégradation de la lignocellulose.

Le chapitre III de cette thèse décrit ce phénomène de sécrétion d'exsudat chez *T. versicolor* lors de la dégradation et tente de comprendre son rôle chez le champignon. Au cours de cette étude, nous avons montré que ce phénomène est retrouvé chez l'ensemble des souches étudiées et est relié principalement à leurs développements au contact du bois et plus particulièrement au contact du chêne. En effet, la production d'exsudat au contact du bois de hêtre semble être beaucoup plus restreinte. Une explication plausible à ce phénomène pourrait être l'induction d'un tel processus par un mécanisme de stress lié à la présence d'extractibles. Il est en effet bien connu que le chêne renferme une plus grande quantité d'extractibles que le hêtre, notamment des tanins et que ces derniers possèdent des activités antifongiques (Kebbi-Benkeder et al., 2014). La présence au sein de l'exsudat de nombreuses enzymes impliquées dans l'oxydation de composés aromatiques (en particulier la Dyp Peroxydase) et dans la détoxification est en faveur d'une telle hypothèse. La souche Tv1218 présente la particularité de produire un tel exsudat en absence de bois. La composition protéique de ce dernier est fortement similaire au contenu des sécrétomes des différentes souches cultivées sur chêne. Cette similitude de composition renforce l'hypothèse de l'implication de l'exsudation dans la tolérance/l'utilisation des extractibles chez/par *Trametes versicolor*. Sur malt agar, cette production a lieu après deux à quatre semaines de culture. Cette sécrétion pourrait donc être liée à un stress carboné chez cette souche hyper-sécrétrice. La couleur de l'exsudat produit sur malt agar est jaunâtre alors que sur bois, les couleurs observées passent du rouge au brun foncé en adéquation avec la présence de composés oxydés par l'action enzymatique des peroxydases et autres oxydases retrouvées dans l'exsudat.

La production d'exsudat sur malt-agar chez la souche Tv1218 semble être liée à une forte augmentation de la respiration mitochondriale comme en témoignent les études transcriptomiques réalisées par comparaison à la souche témoin Tv1252. En effet, on observe une très forte induction de différents gènes impliqués dans la synthèse du complexe IV de la chaîne respiratoire (Cytochrome c oxydase). La chaîne respiratoire serait principalement alimentée à travers le cycle du glyoxalate comme en témoignent la forte induction des gènes codant pour l'isocitrate deshydrogénase et la malate deshydrogénase. Cette forte activité mitochondriale entraîne obligatoirement un stress oxydatif qui pourrait expliquer également l'induction d'un certain nombre d'enzymes impliquées dans les systèmes antioxydants comme l'alternative oxydase (Gelhaye et al.,

2004; Navrot et al., 2007). Une telle induction a été récemment observée chez *Phlebiopsis gigantea* lors de sa culture en présence d'extractibles de conifères (Hori et al., 2014).

Au niveau protéomique, une des caractéristiques de l'exsudat produit sur malt agar par la souche Tv1218 est la présence d'enzymes impliquées dans la détoxification et en particulier la présence de GSTs. Il faut noter que ces enzymes ne sont pas retrouvées de façon abondante dans les sécrétomes issus de cultures sur bois suggérant leur présence au niveau du mycelium constituant le manchon entourant les gouttelettes. Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'interactions directes entre les deux GST étudiées (GST1-C et l'ure2p Tv62807) comme dans le cas de deux isoformes présentes chez *P. chrysosporium* (Thuillier et al., 2011). Néanmoins, leur forte présence au sein de l'exsudat étudié pourrait suggérer la mise en place (l'induction) d'un système de détoxification dans le mycélium entourant l'exsudat. Une autre hypothèse, toujours reliée à une fonction de l'exsudat dans la détoxification, serait que ces GSTs soient impliquées dans la translocation de molécules. En effet, les GSTs, *via* leur activité ligandine, pourraient être impliquées dans le transport de molécules et éventuellement dans leur sécrétion au sein de l'exsudat (Mathieu et al., 2013).

A ce stade, on peut émettre l'hypothèse que la production d'exsudat par les différentes souches de *Trametes versicolor* est à une adaptation de ce dernier à son mode de vie et en particulier à sa capacité à dégrader du bois renfermant de nombreuses molécules potentiellement toxiques. Cette production semble être liée à une structuration particulière du mycélium, les gouttelettes d'exsudat étant entourées d'un « manchon mycélien ». La formation de cette structure particulière est à corrélérer avec la forte induction de gènes codant pour des enzymes impliquées dans le turn-over/remodelage de la paroi fongique, enzymes également retrouvées lors de l'approche protéomique. Savoir si la production d'exsudat est liée à un phénomène d'autophagie reste à ce stade une question ouverte. L'organisation et l'apparition des structures observées restent donc à être étudiées plus en détail.

Comme la présence de systèmes étendus, extracellulaires de dégradation et intracellulaire de détoxification, la production d'exsudat lors de la dégradation du bois pourrait donc être une autre forme d'adaptation des champignons xylophages, et en particulier *Trametes versicolor*, à leur mode de vie.

Il a été également montré que des champignons pouvaient prendre en charge des polluants se trouvant dans l'environnement. Certaines bactéries proches de ceux-ci utiliseraient l'exsudat autour des mycéliums afin de récupérer les polluants et les dégrader. L'exsudat pourrait alors jouer dans la détoxification de molécules potentiellement toxiques.

Conclusions et perspectives

Les travaux réalisés au cours de ces trois années de thèse s'inscrivent dans un projet Labex ARBRE, SYMWOOD. Ce projet avait pour but de caractériser par génomique comparative et biochimiquement les mécanismes fongiques impliqués dans la dégradation du bois. Cette étude questionne le processus fondamental de l'évolution adaptative des champignons face à leur environnement. Pour essayer de comprendre et caractériser ces processus, mon étude s'est portée sur deux systèmes impliqués dans la dégradation du bois chez un champignon saprophyte modèle *T. versicolor* : le système extracellulaire lignolytique et le système intracellulaire impliqué dans la détoxification. Il est très important de rappeler notre hypothèse majeure lors de cette étude qui était que l'essence du bois sur laquelle se développe le champignon influence celui-ci et donc que le champignon s'adapte à la nature chimique du substrat.

I. Adaptation de *T. versicolor*, caractéristique d'un polymorphisme intraspécifique

L'étude du comportement de plusieurs souches de *T. versicolor* lors de la dégradation du bois a permis dans un premier temps de mettre en évidence un polymorphisme phénotypique.

Il a été observé des différences morphologiques entre les souches avec des vitesses de croissance variables. En présence de bois, les travaux effectués lors de cette thèse ont révélé une grande hétérogénéité comportementale des souches face aux différentes essences. En effet, les bois de feuillus (chêne et hêtre) se sont révélés plus sensibles à la dégradation que les bois de conifère (épicéa). En se focalisant sur les bois de feuillus, hêtre et chêne, il a été observé une différence de dégradation des souches vis à vis de ces deux essences. Cette différence s'explique par la durabilité du bois. Le bois de chêne est comparativement au bois de hêtre considéré comme plus durable (Guilley et al., 2004), cette durabilité est notamment liée à sa composition du bois en extractibles (Aloui et al., 2004) et sa densité (Humar et al., 2008). Ayant connaissance de ces données, un polymorphisme des souches, dans notre étude *T. versicolor*, n'est pas surprenant. En effet nous pouvons supposer que le champignon s'adapte à son substrat,

adaptation observable par des différences phénotypiques des souches entre elles. Nous avons pu montrer des différences significatives de dégradation des souches sur le même substrat. D'après les études réalisées au cours de cette thèse sur les sécrétomes de *T. versicolor* : activités enzymatiques et protéomique, complétant le test de dégradation, il a été mis en évidence de réelles différences entre les souches face au bois. Les analyses en composante principale (ACP) réalisées (dans le chapitre I) respectivement sur les données des sécrétomes chêne aubier et des sécrétomes hêtre mettent en évidence une répartition des souches selon leur habitat d'origine (répartition statistiquement significative). Une ACP finale avec toutes les données obtenues sur bois de hêtre et chêne aubier a été réalisée (Figure 76). La répartition des souches est plus hétérogène. Néanmoins en partant de notre hypothèse et réalisant un test de statistiques sur les coordonnées de l'axe F1, générant deux groupes, nous pouvons regrouper les souches de *T. versicolor* Tv1219, Tv70, Tv1532, Tv110102, Tv15544 et Tv44889. Ce groupe ainsi constitué est significativement différents ($p < 0,002$) de celui constitué des souches Tv1218 et Tv1252 et semble corroborer notre hypothèse. Grâce à ces travaux réalisés sur les différents sécrétomes, nous avons pu mettre en évidence un effet « essence d'origine ». En effet l'ensemble des résultats obtenus permettent bien de séparer les souches en fonction de l'essence de l'arbre sur laquelle elles ont été isolées.

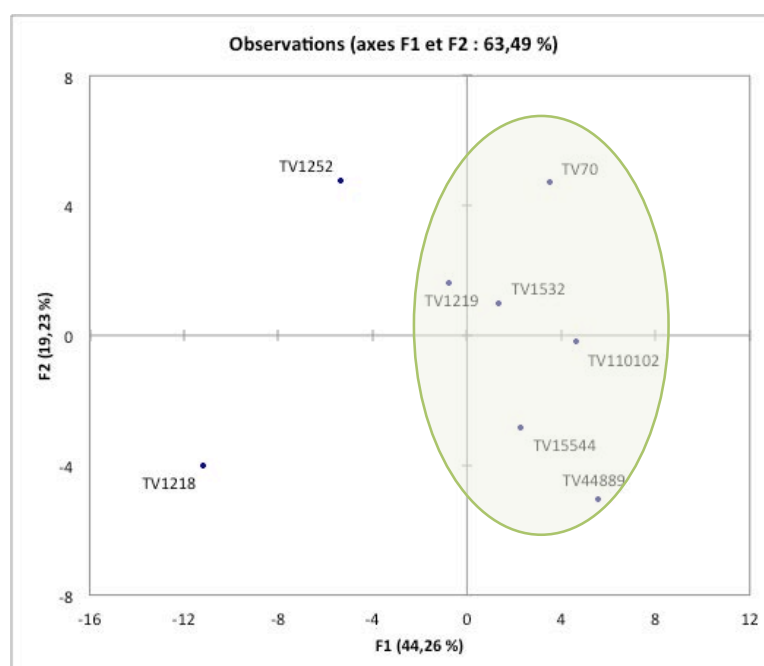


Figure 76 : ACP réalisée sur plusieurs souches de *T. versicolor* avec les données de dégradation du bois, les activités enzymatiques et de protéomique pour les sécrétome chêne aubier et hêtre

Beaucoup d'études sont entreprises dans le but de déterminer les facteurs influençant l'adaptation des organismes et donnant naissance au polymorphisme intraspécifique. Cette notion de polymorphisme est observable chez de nombreuses espèces du monde vivant. Un grand nombre de facteurs peuvent être responsables de ce polymorphisme phénotypique (Schmidt, 2006). Il a été montré que l'habitat a une influence très forte sur le phénotype des espèces. Chez les poissons, il a été observé que selon l'habitat une même espèce ne présentait pas le même phénotype du à la nature des ressources en nutriments disponibles. Chez les Cichlidés, par exemple, certains individus peuvent être végétariens et d'autres manger des escargots ayant de ce fait des mâchoires et dents morphologiquement différentes bien que faisant parti de la même espèce (Kornfield et al., 1982). Ici l'habitat et plus particulièrement les ressources nutritives influence l'adaptation des individus, appelé polymorphisme de ressources. Ce même constat est observé chez les amphibiens (Collins and Holomuzki, 1984). D'autres facteurs, toujours liés à l'habitat peuvent influencer l'adaptation comme la prédation (Nevo, 1973). Chez les champignons, en 1977 et 1978 Rayner (Rayner and Todd, 1977, 1978) démontrait la présence de champignon de la même espèce mais de phénotypes différents sur le même arbre, supposant une adaptation au substrat. De récentes études ont permis de démontrer l'hétérogénéité du bois au sein du même arbre (Bouriaud et al., 2004; Lamloom and Savidge, 2003) corroborant alors la présence de phénotypes donc l'apparition d'un polymorphisme lié à la nature du substrat. Ces données appuieraient donc nos début de conclusion à l'issue des différentes études effectuées lors de cette thèse. Dans le but de confirmer l'hypothèse formulée quant à l'origine du polymorphisme phénotypique intraspécifique influencé par l'essence de l'arbre, il serait nécessaire d'augmenter le nombre de souches à étudier.

Comme évoqué dans le chapitre I, nous avons remarqué la présence d'une petite protéine, SSP136431, uniquement lors de la croissance des souches sur chêne aubier et chez celles ayant pour habitat d'origine le hêtre. Il semblerait avoir une spécificité d'induction de cette protéine en fonction de la composition du bois. Des études préalables sur *P. chrysosporium* avaient mis en évidence l'induction de gène codant des SSP en réponse à des extraits de bois. Chez les champignons pathogènes et mycorrhiziens, le rôle de ces petites protéines comme effecteurs dans la signalisation est bien connu alors que chez les champignons lignolytiques celui reste encore inconnu (Hacquard et al., 2012; Kemen et al., 2005; Plett et al., 2011). Il serait alors intéressant

de travailler sur une population plus importante issue directement de l'environnement. Divers tests pour mettre en évidence un polymorphisme intraspécifique lié à l'essence de l'arbre pourraient être entrepris et l'étude de cette petite protéine comme potentiel marqueur pourrait s'avérer intéressante. Il serait important de comprendre son rôle lors de la dégradation du bois.

Outre la présence de la SSP, les travaux réalisés dans le cadre de l'étude de l'exsudat nous ont permis de mettre en évidence également un effet « essence de dégradation ». (Figure 77 et Figure 78). Les deux ACP ont été réalisés avec les 50 protéines les plus abondantes respectivement des sécrétomes chêne aubier et des sécrétomes hêtre. Avec l'ACP généré sur les protéines des sécrétomes chêne aubier la répartition des souches apparaîtrait être liée à l'essence d'origine de celles-ci (répartition selon l'axe F1). Deux groupes apparaissent distincts avec les souches Tv1218, Tv1252 et Tv71 d'un côté et Tv70, Tv1219, Tv110102, Tv1532, Tv44889 et Tv15544 de l'autre. En revanche la répartition des souches avec l'ACP généré grâce aux protéines des sécrétomes hêtre est très hétérogène. Les souche Tv1218, Tv78 et Tv1252 d'origine chêne se mélange aux souches d'origine hêtre. Il semblerait que lors de la croissance sur chêne aubier et avec l'étude des sécrétomes issus de celle-ci l'essence d'origine pourrait être mise en évidence. Dans ce dernier cas, nous pouvons alors noter l'effet « essence de dégradation ». Le chêne apparaîtrait comme une bonne « essence marqueur » afin de pouvoir identifier l'habitat d'origine des différentes souches.

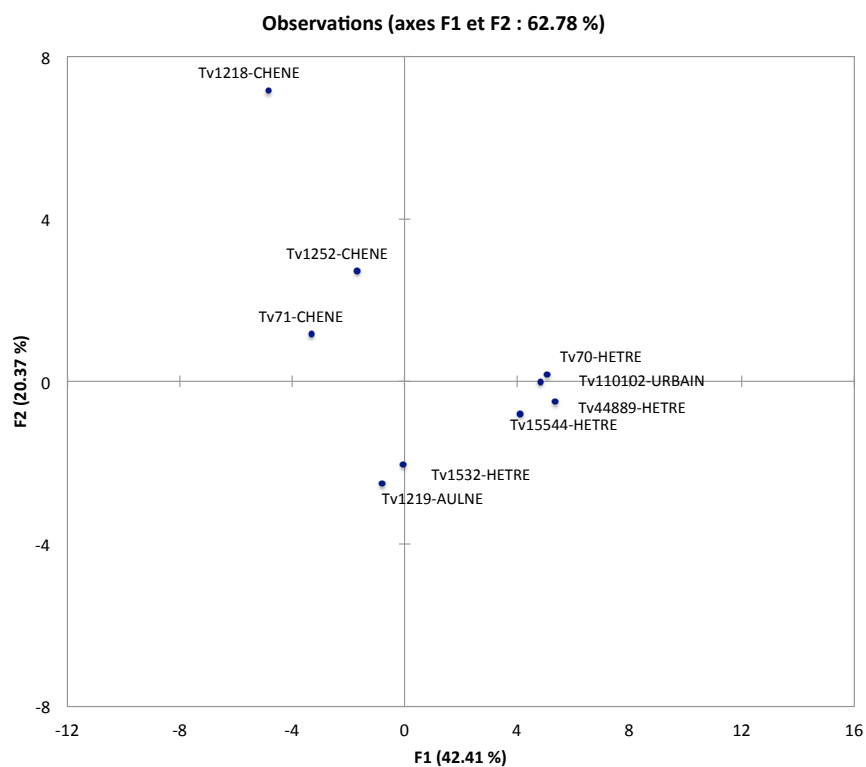


Figure 77 : ACP montrant la répartition des souches de *T.versicolor* généré grâce au 50 protéines les plus abondantes issues des sécrétomes chêne aubier.

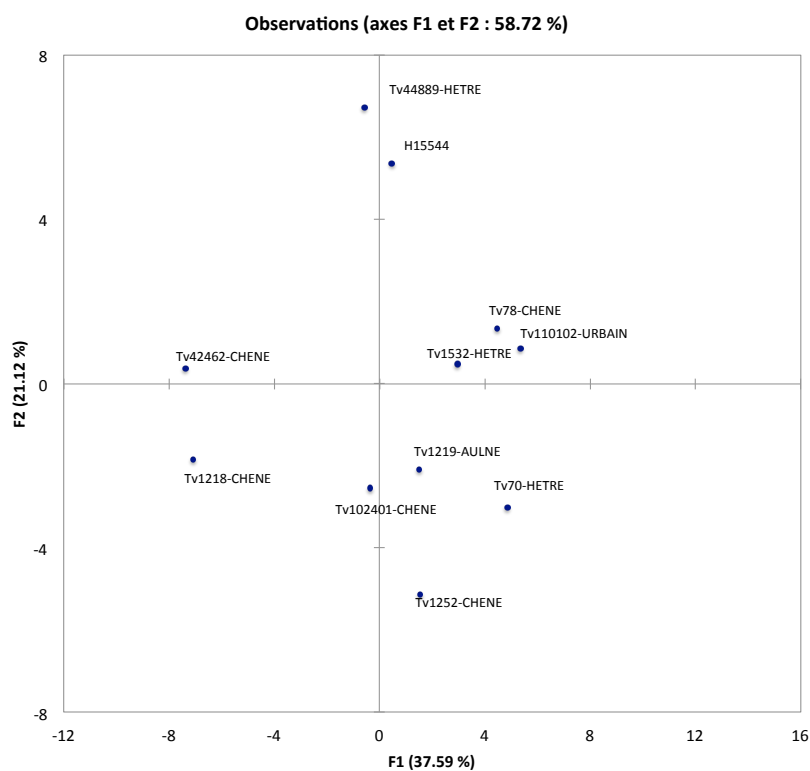


Figure 78 : ACP montrant la répartition des souches de *T.versicolor* généré grâce au 50 protéines les plus abondantes issues des sécrétomes hêtre.

Dans le but d'aller plus loin dans la notion d'adaptation, une étude génomique a été entreprise. Depuis environ une dizaine d'années les avancées technologiques ont permis de séquencer de nombreuses espèces et donnent aujourd'hui l'opportunité de séquencer des isolats d'une même espèce de façon routinière. Ce séquençage de génome à haut débit permet plus facilement la mise en place d'études de génomique comparative. Dans le but d'appréhender l'évolution et l'adaptation des groupes fongiques, plus particulièrement dans notre cas des saprophytes de manière intraspécifique, un reséquençage de dix souches de *T. versicolore* a été effectué. Ce séquençage avait pour but l'étude du polymorphisme des nucléotides (SNP). En génétique, les SNPs sont définis comme étant la variation d'une seule paire de base du génome entre individus d'une même espèce. Ces SNPs peuvent être présents dans des régions codantes ou non au sein du génome. Le nombre de SNP a été déterminé pour chaque souche de *T. versicolor* et en comparaison avec le génome déjà connu de la souche de référence du JGI. Les SNP présentent un réel intérêt pour l'étude du polymorphisme (Ganal et al., 2009) et pourraient permettre d'identifier des marqueurs d'adaptation. Par exemple l'étude des SNP chez *Neurospora* a permis d'identifier une adaptation liée à la température (Ellison et al., 2011). Les premiers résultats obtenus sur les génomes entiers ont permis d'identifier un grand nombre de SNP par souche (Tableau 19). En comparaison avec des résultats obtenus chez d'autres champignons comme *Tuber melanosporum*, *Rhizoctonia solani* ou *Puccinia graminis* avec respectivement 3540, 14005 et 1843 SNP, le nombre de trouvées chez les génome de *T. versicolor* est très important, environ 800000 SNP (Payen et al., 2015). Une ACP réalisée sur les 100 gènes contenant le plus de SNP par rapport à la souche de référence n'indique pas, contrairement à l'étude phénotypique, un regroupement des souches par rapport à leur habitat d'origine (Figure 79). De même le nombre de SNP dtrouvé au niveau des gènes codant pour les protéines les plus abondantes dans les secrétomes issus de chêne aubier ne permet pas de différencier les souches les unes par rapport aux autres.

SOUCHE	TOTAL SNP	SNP/Mbp
Tv1218	825191	18424
Tv1219	807413	18027
Tv1252	694001	15495
Tv15545	764401	17066
Tv44889	800750	17878
Tv110102	802437	17916
Tv1532	802561	17918
Tv70	721011	16098
Tv71	793348	17713
TOTAL	1632115	36439

Tableau 19 : Nombre de SNP totaux et SNp/Mbp présents dans chaque souche de *T. versicolor* après comparaison au génome de référence de la base de donnée du JGI.

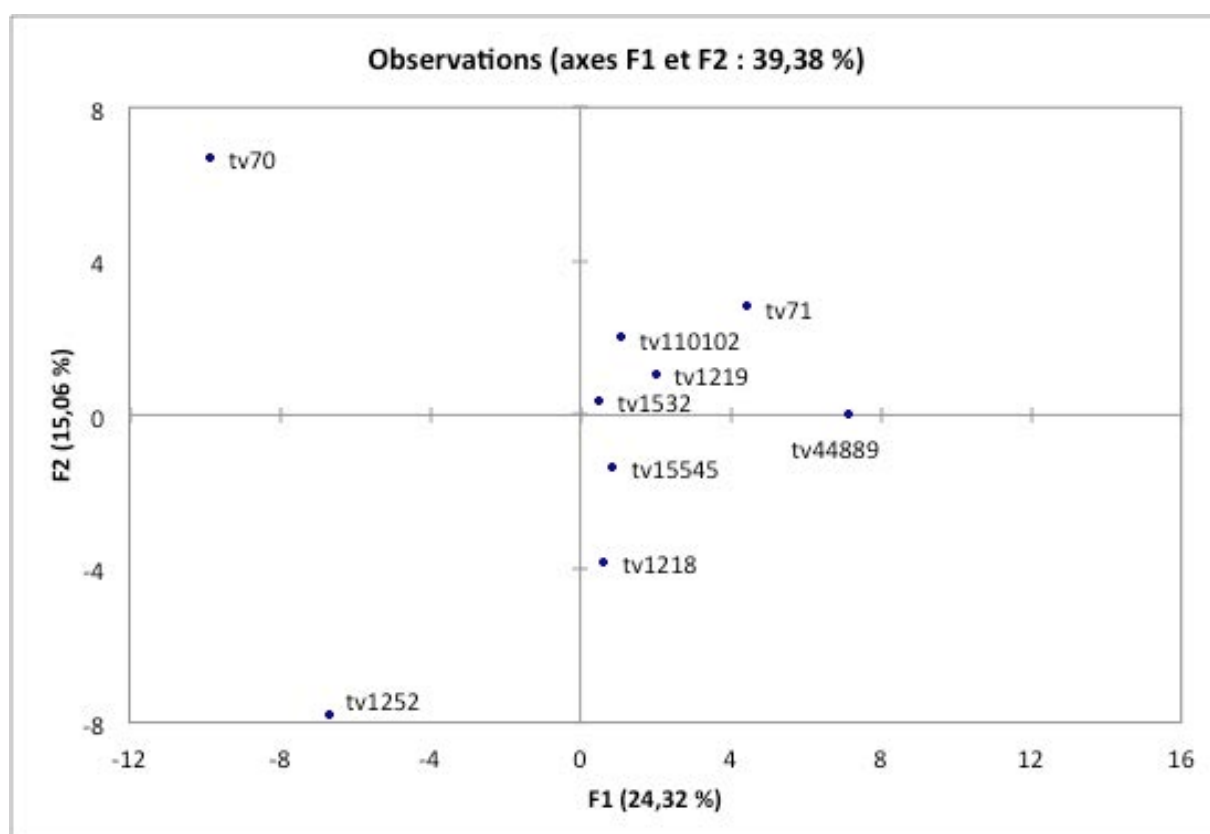


Figure 79 : ACP réalisée sur les 100 gènes contenant le plus de SNP chez 9 souches de *T. versicolor*.

L'étude plus poussée de ces génomes doit être mise en place dans le but de pouvoir identifier ou non des différences génomiques pouvant être corrélées avec le polymorphisme phénotypique déjà observé et alors identifier de potentiels SNP marqueurs d'adaptation.

À ce stade de l'étude, une adaptation intraspécifique de *T. versicolor* à son environnement fortement liée à la nature du substrat peut être fortement supposée suite aux résultats obtenus sur les analyses phénotypiques. Les premières analyses génomiques ne permettent pas de corréler ce polymorphisme phénotypique avec un polymorphisme génotypique.

Pour la suite de ces travaux, il sera nécessaire d'analyser une population plus importante de *T. versicolor* après isolement de souches environnementales et d'approfondir l'analyse du génome. Dans un premier temps, l'identification des SNP générée par le programme CLC Workbench pourra être complétée par un autre logiciel comme BWA/SAMtools afin de ne retenir les SNP communes aux deux méthodes (Payen et al., 2015). Le niveau de polymorphisme pourra alors être étudié sur une population par l'évaluation de l'indice π ainsi que le Tajima's D. Le calcul de ratios tel que mutations non synonymes par sites non synonymes (PN), mutations synonymes par sites synonymes (PS) et le ratio PN/PS pourrait alors permettre d'identifier des modèles de gènes candidats soumis à la sélection. Il sera alors possible soit d'identifier des gènes marqueur d'adaptation, soit en absence de polymorphisme génotypique émettre l'hypothèse d'épigénétisme.

L'épigénétisme est l'étude du changement de l'activité des génomes sans modification de la séquence d'ADN. Il s'agit de l'expression du même code génétique, mais avec la présence de facteurs environnementaux, la nature du substrat par exemple dans notre cas, qui sélectionnent une expression plutôt qu'une autre (Martienssen, 2001; Wolffe, 1999). La notion d'épigénétisme apparaît dans les années 40 avec Conrad Hal Waddington (Baedke, 2013; Waddington, 1948). Son but était d'étudier le système gène et environnement donnant naissance à un phénotype non expliqué au niveau génomique (West-Eberhard, 1989). Il faudra attendre les années 90 et le séquençage des génomes pour que réellement la notion d'épigénétisme prenne un sens (Hurd and Nelson, 2009). Dans les années 2000, les recherches sur ce point vont encore

plus loin avec l'étude de la possibilité de transmission des caractères acquis et donc la notion de marqueurs épigénétiques. De nombreuses études sur ce sujet évoquent une empreinte parentale liée au degré de méthylation de l'ADN différent entre les individus d'une même espèce sans modification du génome (Bird, 2002; Weaver et al., 2004). Chez les champignons filamenteux comme chez les plantes, la méthylation est limitée aux transposons et autres séquences répétées (Colot and Rossignol, 1999; Martienssen, 2001). Cambareri en 1996 met en évidence chez *Neurospora crassa* des phénotypes liés à la méthylation de l'ADN (Cambareri et al., 1996). L'étude de marqueurs épigénétiques comme par exemple la 5-méthylcytosine (Iyer et al., 2009) peut s'avérer intéressante. Chez les champignons, l'association transposon et gène TET/JBP est susceptible de jouer un rôle dans l'évolution et la régulation épigénétique comme décrit chez *Coprinopsis* et *Laccaria* (Iyer et al., 2014; Freedman and Pukkila, 1993). Leurs études pourraient être mises en place chez *T. versicolor* dans le but d'identifier une potentielle régulation liée à un phénomène d'épigénétisme (Rountree and Selker, 2010; Yi et al., 2010).

Pour finir, des recherches tendent à montrer que certains organismes comme les champignons utilisent l'épigénétisme afin de réguler la biosynthèse de métabolites naturels (Fisch et al., 2009). Cette régulation présente un intérêt non négligeable pour une recherche appliquée. En effet grâce à différents traitements de champignons par des modificateurs épigénétiques chimiques (Fisch et al., 2009; Khaldi et al., 2010; Palmer and Keller, 2010; Williams et al., 2008) ou naturels (Bayram et al., 2008) une production de métabolites d'intérêts économiques pourrait être induite (Figure 80).

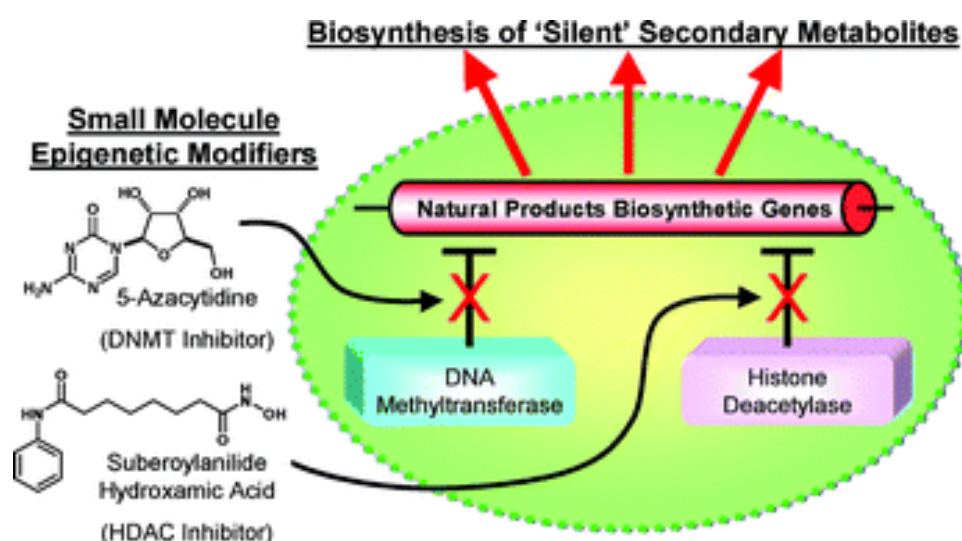


Figure 80 : Schéma montrant l'induction de métabolites secondaires « silencieux » par des divers molécules appelées modificateurs épigénétiques (Williams et al., 2008).

II. Evolution de *T. versicolor*, caractéristiques de deux classes de glutathion transférases (GST)

Les champignons, au cours de l'évolution, se sont adaptés à leur environnement. Ils sont exposés à une grande hétérogénéité de substrats auxquels ils s'adaptent afin de les dégrader. Pour les champignons basidiomycètes, l'efficacité de dégradation est liée à leur capacité de résister au stress. Lors de la dégradation du bois, des molécules potentiellement toxiques comme les extractibles vont être générées. Les organismes fongiques sont à l'heure actuelle de plus en plus exposés à des polluants d'origines anthropiques (Berteigne et al., 1988). Afin de contourner la toxicité de ces nombreuses molécules, les champignons décomposeurs possèdent deux systèmes de dégradation de ces molécules complexes : un système enzymatique et oxydant et un système intracellulaire de détoxification (Edwards et al., 2005; Morel et al., 2013). Ce dernier est divisé en trois phases : I, phase d'activation ; II, phase de conjugaison et III, phase d'excrétion ou de stockage. Les travaux d'une partie de cette thèse se sont portés sur l'étude d'enzymes impliquées dans la phase II de détoxification, les GST.

L'étude phylogénétique des GST des basidiomycètes réalisée préalablement à ma thèse avait permis d'identifier de nombreux gènes codant des GST. Pour *T. versicolor* 41 gènes codant des GST ont été identifiés. Chez de nombreux champignons de la classe des Agaricomycotina, les classes de GST les plus variables, en terme du nombre d'isoformes, seraient les Ure2p et les FuA (Tableau 20). Par exemple, chez *B. adusta* ou *P. carnosa* respectivement 18 et 21 GST Ure2p sont dénombrées et chez *C. cinerea* ou *F. mediterranea* 16 GST FuA sont identifiées. Il a été observé une extension particulière de la classe des omégas chez *T. versicolor*. *T. versicolor* est à l'heure actuelle le champignon basidiomycète possédant le nombre le plus important d'isoforme de GST de la classe oméga, 16.

Espèce de Basidiomycète	GTT	Ure2p	Oméga	GHR	FuA	Phi
<i>Agaricus bisporus</i>	0	4	3	1	15	9
<i>Bjerkandera adusta</i>	3	18	3	1	6	1
<i>Coprinopsis cinerea</i>	8	3	3	2	16	7
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	2	1	2	0	0
<i>Dichomitus squalens</i>	2	8	10	2	6	5
<i>Fomitiporia mediterranea</i>	3	2	6	3	16	7
<i>Gymnopus luxurians</i>	4	3	5	1	10	2
<i>Phanerochate carnosa</i>	2	21	10	2	5	1
<i>Phanerochate chrysosporium</i>	2	9	6	2	5	1
<i>Trametes versicolor</i>	6	10	16	3	6	0
<i>Wolfiporia cocos</i>	3	9	4	2	5	2

Nombre d'isoforme = 0

Nombre d'isoforme entre 6 et 10

Nombre d'isoforme supérieur à 16

Nombre d'isoforme entre 1 et 5

Nombre d'isoforme entre 11 et 15

Tableau 20 : Tableau montrant le nombre d'isoforme des différentes de GST pour 11 champignons Basidiomycètes. Données issues de (Morel et al., 2013). Les couleurs correspondent au nombre étendu ou non des isoformes.

Pour cette thèse deux classes de GST ont été sélectionnées, la classe des GST oméga (GSTO) étendues chez *T. versicolor* et la classe des GHR, présentant le même résidu catalytique que les oméga. Les GSTO ont été décrites comme des GST possédant une cystéine catalytique. Après analyse des séquences, il a été observé que 3 oméga possédaient une cystéine catalytique et 13 quant à elles une sérine catalytique. La cystéine catalytique permet de réaliser des réactions de déglutathionylation. La présence d'une sérine en tant que résidu catalytique modifie le profil de réactivité de ces enzymes qui réalisent de ce fait des réactions de conjugaison classiques.

La présence d'une sérine catalytique chez les GSTO de *T. versicolor* est importante, 13 GSTO sur 16. D'autres champignons Basidiomycètes possèdent également des GSTO à sérine comme *D. squalens*, *P. carnosa* ou encore *C. puteana* avec respectivement 4, 5 et 7 isoformes dénombrées. Suite à nos analyses, nous pouvons confirmer chez les champignons saprophytes la présence de gènes codant des isoformes de GST oméga pour lesquels la cystéine catalytique est remplacée par une sérine. Cependant cette caractéristique est peu étendue chez les basidiomycètes. Cette sérine amène alors de nouvelles fonctions pour cette classe de GST, nous pouvons parler de

néofonctionalisation. Ce changement de résidus catalytique permettrait alors à *T. versicolor* d'augmenter sa diversité d'activité face à différents substrats. Les différentes études ont permis de mettre en évidence un nombre élevé de substrats reconnus par les différentes GSTO, interactions étant liées à la composition chimique des extraits de bois. Identifier et caractériser toutes les GST oméga de *T. versicolor* ainsi isoformes provenant d'autres champignons permettrait de mieux comprendre les processus de néofonctionalisation. Séparer les différents métabolites contenus dans les extraits des essences de bois testées ayant réagi positivement avec les différentes GSTO permettrait d'identifier les substrats physiologiques de celles-ci.

Grâce à l'étude réalisée sur les GHR de *T. versicolor*, nous avons également pu mettre en évidence un processus de néofonctionalisation au sein de cette classe. Les GHR ont été décrites comme enzymes capables de déglutathionyler des conjugués d'hydroquinone (Belchik and Xun, 2011; Meux et al., 2011). La GHR1 de *P. chrysosporium*, par exemple, a la capacité de déglutathionyler la ménadione-SG mais pas le PAP-SG. Sur les trois GHR identifiées chez *T. versicolor* nos différents tests ont révélé qu'une de celles-ci la GHR1 possédait la capacité à déglutathionyler un plus grand nombre de substrats et notamment le PAP-SG. L'analyse cristallographique a montré une dimérisation classiquement connue aux GHR. Toutefois chez *T. versicolor*, la GHR1, nous avons pu grâce à la structure résolue remarquer une différence de taille du site H pouvant accueillir plus de substrats ainsi qu'une modification d'un acide animé par rapport aux autres GHR de *T. versicolor* et *P. chrysosporium*. La mise en évidence de l'activité de la GHR1 contre la PAP-SG, activité caractéristique des GSTO pourrait laisser supposer à une convergence fonctionnelle. En effet les GHR présenteraient des activités similaires que les GSTO mais appartenant tout de même à deux classes structurales différentes. Deux isoformes GHR ont été étudiées, la GHR1 et la GHR2. Afin de savoir si la GHR1 de *T. versicolor* est une exception, en ce qui concerne la structure et la reconnaissance de substrat, il serait nécessaire : dans un premier temps d'étudier divers mutants notamment du site H de la GHR1 de *T. versicolor* et *P. chrysosporium* ; dans un second temps d'étudier la dernière isoforme des GHR de *T. versicolor* ainsi que d'autres présentes chez d'autre basidiomycètes.

Frova en 2006 présentait un modèle d'évolution des GST (Figure 81a) en indiquant que la classe de la mutation de la cystéine en sérine avait eu lieu après l'apparition des GST oméga. Des données récentes ont permis d'actualiser le modèle d'évolution des GST chez les plantes (Lallement et al., 2014). Nos travaux ont permis également de valider ce nouveau modèle d'évolution (Figure 81b).

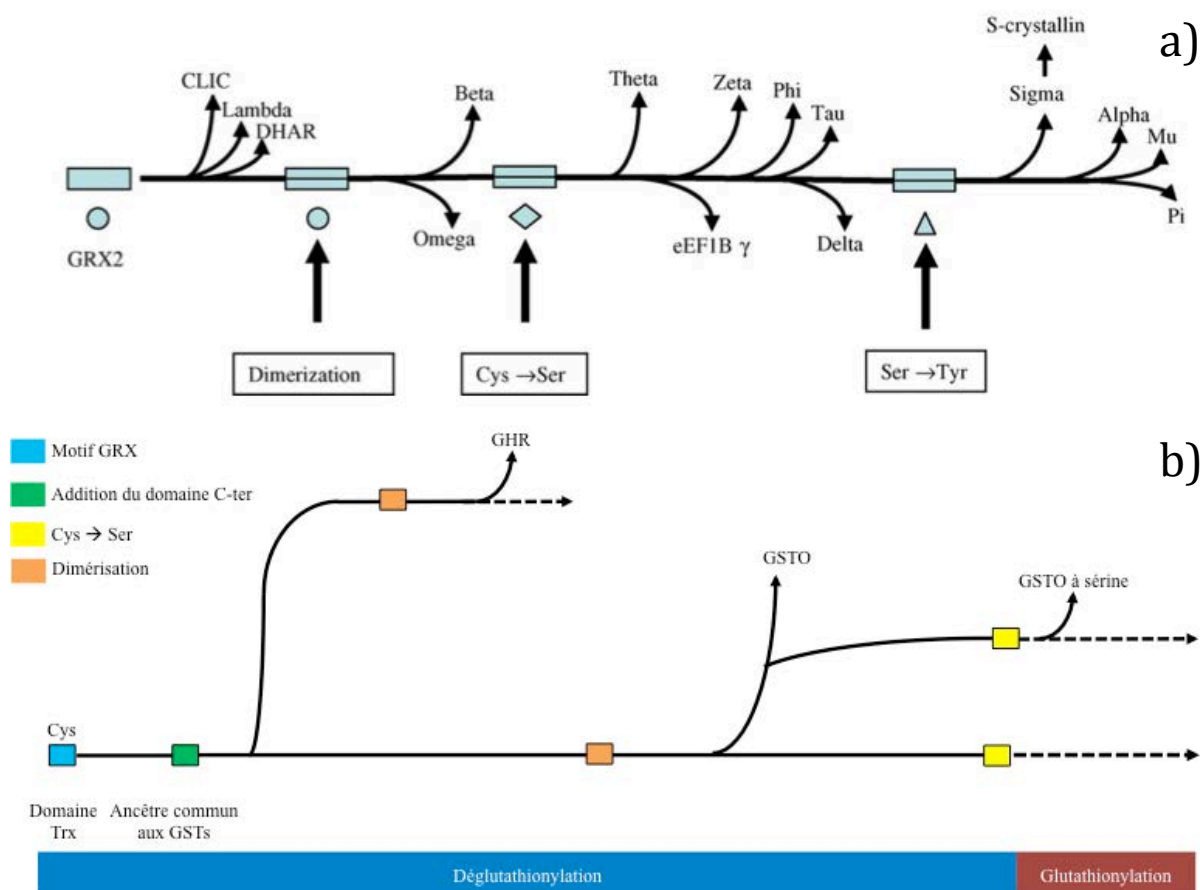


Figure 81 : Schéma de l'évolution des classes de GST a) décrit par Fova en 2006 et des GST oméga et GHR avec les données obtenues dans cette thèse.

a) Le schéma d'évolution de Fova un phénomène de dimérisation à partir de l'ancêtre commun donnant naissance à la classe des GST oméga puis des phénomènes de mutation successifs des résidu catalytique ; de cystéine en sérine puis de sérine en tyrosine. b) schéma d'évolution adapter montrant une mutation du site catalytique des GST oméga de cystéine en sérine faisant apparaître la fonction de glutathionylation chez cette classe de GST.

III. Perspectives appliquées à long terme

Le système extracellulaire des champignons ligninolytiques pourrait avoir un grand intérêt pour son potentiel en matière de biotechnologie. Depuis plusieurs années, de nombreuses études ont été mise en place afin de mieux comprendre ces systèmes extracellulaires. A l'heure actuelle, l'utilisation des enzymes impliquées dans ces systèmes connaît un développement exponentiel. En effet, la diversité et actions des enzymes présentent chez les champignons décomposeurs permettrait aujourd'hui de répondre à plusieurs attentes actuelles notamment en terme de développement durable. Grâce à ces enzymes les champignons et particulièrement ceux de pourriture blanche pourraient avoir des applications en bioremédiation et plus particulièrement un rôle dans la dépollution des sols (Cerniglia, 1997; Morgan et al., 1993) ou dans la réduction de la toxicité de déchets industriels (Dorado et al., 2000). La capacité de ces champignons à produire un grand nombre d'enzymes est une piste pour leurs utilisations biotechnologiquement comme la production de bioethanol, la réduction de l'utilisation de produits chimiques et la chimie verte (Dinis et al., 2009; Sun and Cheng, 2002). Des recherches récentes et le développement de la technologie de séquençage ont amélioré notre connaissance. Ils nous aident à identifier un large panel de gènes des protéines impliquées dans la dégradation de la biomasse (Navarro et al., 2014) telles que les enzymes oxydatives de lignine (Foly), les oxydases (CAZy) (Cantarel et al., 2009; Levasseur et al., 2008), les protéases ou aussi des petites protéines sécrétées (SSP) pouvant alors servir à ces diverses applications.

Le dernier chapitre de cette thèse portait sur la caractérisation d'un liquide, exsudat, produit par une des souches de *T. versicolor*. Le phénomène d'exsudation et son rôle chez les champignons notamment chez les saprophytes reste encore mal connu. Chez *T. versicolor*, les différents travaux ont pu mettre en évidence la présence d'exsudat lors de la croissance des différentes souches sur bois. Les analyses mises en place ont permis d'observer une structuration particulière des gouttes, et la présence d'un grand nombre de protéines dont certaines étaient impliquées dans diverses activités enzymatiques liées à la dégradation du bois et d'autres liées au système de détoxification.

L'exsudat pourrait avoir divers applications : un rôle dans la bioremédiation afin de pouvoir détoxifier l'environnement et donc d'éliminer les molécules potentiellement toxiques et/ou dans l'extraction de molécules. En ce qui concerne le rôle dans la bioremédiation, il a été montré que des champignons pouvaient prendre en charge des polluants présent dans l'environnement (Banitz et al., 2013). Certaines bactéries proches de ceux-ci utiliseraient l'exsudat autour des mycéliums afin de se déplacer appelé « autouroute fongique ». Le mycélium pourrait quant à lui permettre la translocation des polluants augmentant ainsi la biodisponibilité de ceux ci pour les bactéries, appelé « pipeline fongique ». Les bactéries prendraient alors en charge les polluants dans le but de les dégrader (Furuno et al., 2012; Jacobs et al., 2004). De plus l'exsudat pourrait directement intervenir dans la détoxification des polluants. En effet, lors de l'analyse protéomique nous avons observé la présence de certaines protéines impliquées dans le système de détoxification dans l'exsudat. Une glutathion-S-transférase (Tv62807) et une peroxiredoxine (Tv130108), des protéines impliquées dans les systèmes anti-oxydant / détoxification à base de thiol sont retrouvées parmi les protéines les plus abondantes. Sont retrouvées également une glutathion réductase (Tv36446), une réductase NADPH thiorédoxine (Tv156571), une autre peroxiredoxine (Tv60144). Parmi les protéines les plus abondantes, ce système anti-oxydant est complété par la présence d'une catalase (Tv152398) et une superoxyde dismutase de manganèse / fer (Tv175708). Outre les protéines les plus abondantes, parmi les 300 présentes dans l'exsudat plusieurs isoformes de GST sont également retrouvées : une GST oméga Tv157166, et une GHR Tv73942 (respectivement GST-1C et GHR1 décrites dans le chapitre II) ainsi que 4 autres GST Tv168632, Tv117926, Tv72991 et Tv75639 ; Étant donné que ces enzymes antioxydantes et de détoxification sont connues comme protéines intracellulaires, ces protéines étaient probablement situées dans le mycélium entourant les gouttelettes observées et / ou sur les mycéliums déconstruits présents dans les gouttelettes. La GST Tv62807 appartient à la classe des Ure2pA, classe étendue chez les Agaricomycetes (Morel et al., 2013). Nous avons alors supposé la présence d'un système REDOX dans cet exsudat. Afin de vérifier cela, les protéines correspondantes ont été produites. Divers tests d'interactions avec différents extraits de bois devront être mis en place afin de vérifier de potentiels interactions des protéines entre elles et avec des extraits de bois.

La seconde perspective envisagée quant au rôle de cet exsudat serait une utilisation dans le cadre d'une chimie durable. L'exsudat pourrait servir d'extracteur naturel de molécules d'intérêts encore à l'heure actuelle extraites chimiquement ou synthétisées. Il aurait alors le rôle de solvant vert (Dai et al., 2013). Pour essayer de répondre à cette dernière application, un test de solubilisation a de ce fait été mis en place (Figure 82). Plusieurs sciures d'essence de bois tropicaux ont été incubés dans de l'eau, l'exsudat ou divers solvants. Nous avons pu dans ce pré-test observer que l'exsudat permettrait bien d'extraire certaines molécules.

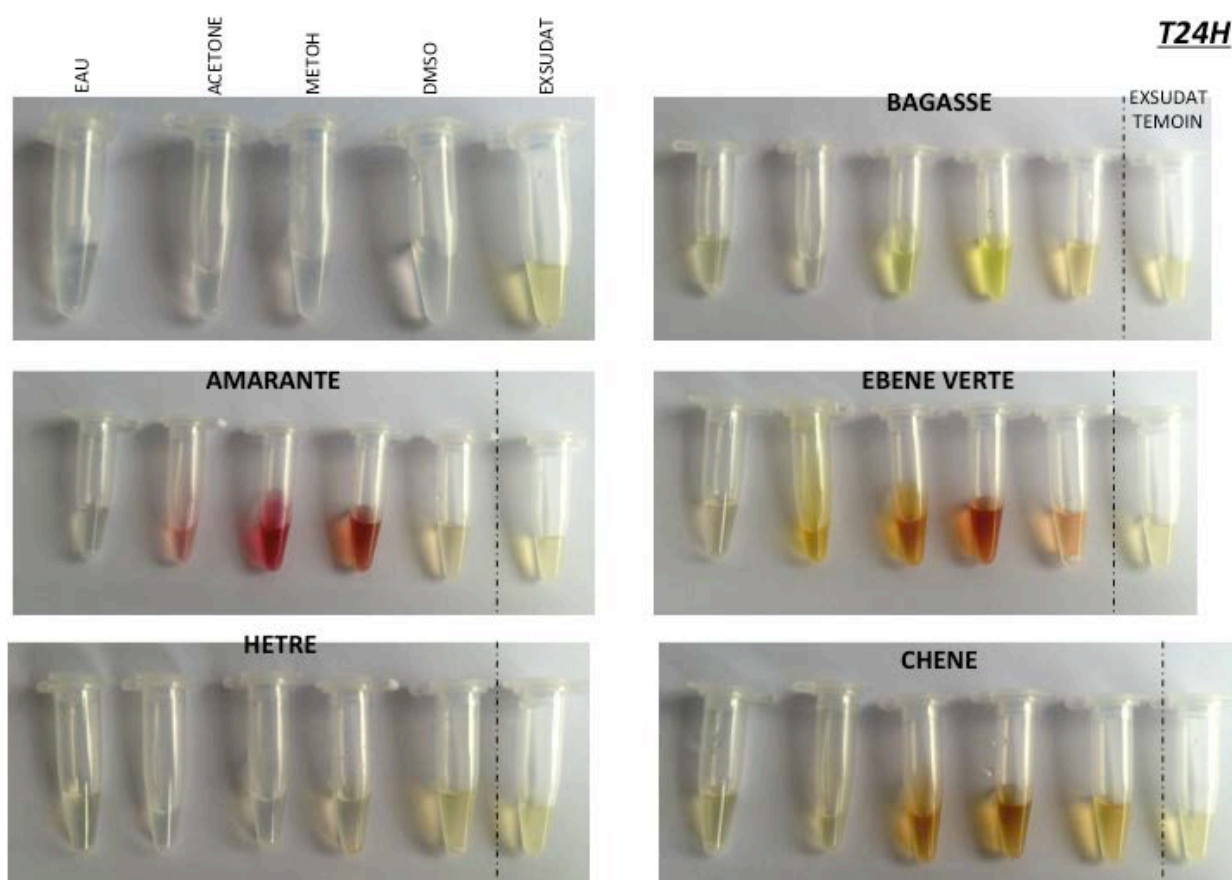


Figure 82 : Photos du test de solubilisation réalisé avec l'exsudat, différents solvants (acétone, méthoxyéthanol et DMSO) et de l'eau utilisée comme témoin sur différents bois (bagasse, amarante, ébène verte, hêtre et chêne).

À travers les différentes analyses mises en place lors de cette thèse, nous avons pu commencer à confirmer notre hypothèse de départ. L'essence de l'arbre influencerait l'espèce de champignons qui s'y développe. Nous avons commencé à mettre en évidence un polymorphisme intraspécifique de *T. versicolor* qui semblerait être lié à la nature chimique du substrat. De plus, l'explosion des classes de GST ainsi que l'apparition de nouvelles fonctions, néofonctionalisation démontrent bien le phénomène évolutif et adaptatif des organismes à l'environnement. Comprendre les mécanismes impliqués dans les processus adaptatifs s'avère être très intéressant tant au niveau fondamental qu'au point de vu appliqué, engendrant alors des enjeux économiques non négligeables

Références bibliographiques

Abbas, A., Koc, H., Liu, F., and Tien, M. (2005). Fungal degradation of wood: initial proteomic analysis of extracellular proteins of *Phanerochaete chrysosporium* grown on oak substrate. *Current Genetics* 47, 49–56.

Aloui, F., Ayadi, N., Charrier, F., and Charrier, B. (2004). Durability of European oak (*Quercus petraea* and *Quercus robur*) against white rot fungi (*Coriolus versicolor*): relations with phenol extractives. *Holz Als Roh- Und Werkstoff* 62, 286–290.

Andersson, C., Mosialou, E., Weinander, R., and Morgenstern, R. (1994). Enzymology of microsomal glutathione S-transferase. *Advances in Pharmacology* 27, 19–35.

Arantes, V., Milagres, A.M.F., Filley, T.R., and Goodell, B. (2011). Lignocellulosic polysaccharides and lignin degradation by wood decay fungi: the relevance of nonenzymatic Fenton-based reactions. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38, 541–555.

Armstrong, R.N. (1997). Structure, Catalytic Mechanism, and Evolution of the Glutathione Transferases. *Chemical Research in Toxicology* 10, 2–18.

Aro, N., Pakula, T., and Penttilä, M. (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 719–739.

Atkinson, H.J., and Babbitt, P.C. (2009). An Atlas of the Thioredoxin Fold Class Reveals the Complexity of Function-Enabling Adaptations. *PLoS Computational Biology* 5, e1000541.

Baedke, J. (2013). The epigenetic landscape in the course of time: Conrad Hal Waddington's methodological impact on the life sciences. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences* 44, 756–773.

Baldrian, P., and Valášková, V. (2008). Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi: Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiology Reviews* 32, 501–521.

Banitz, T., Johst, K., Wick, L.Y., Schamfuß, S., Harms, H., and Frank, K. (2013). Highways versus pipelines: contributions of two fungal transport mechanisms to efficient bioremediation: Fungal transport mechanisms enhance bioremediation. *Environmental Microbiology Reports* 5, 211–218.

Barbaroux, C., Bréda, N., and Dufrêne, E. (2003). Distribution of above-ground and below-ground carbohydrate reserves in adult trees of two contrasting broad-leaved species (*Quercus petraea* and *Fagus sylvatica*). *New Phytologist* 157, 605–615.

Bateson, W., and Mendel, G. (1902). *Mendel's principles of heredity* (Courier Dover Publications).

Bayram, O., Krappmann, S., Ni, M., Bok, J.W., Helmstaedt, K., Valerius, O., Braus-Stromeier, S., Kwon, N.-J., Keller, N.P., Yu, J.-H., et al. (2008). VelB/VeA/LaeA complex

coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* 320, 1504–1506.

Belchik, S.M., and Xun, L. (2011). S-glutathionyl-(chloro) hydroquinone reductases: a new class of glutathione transferases functioning as oxidoreductases. *Drug Metabolism Reviews* 43, 307–316.

Bell, A.A., and Wheeler, M.H. (1986). Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annual Review of Phytopathology* 24, 411–451.

Bengtsson, J., Nilsson, S.G., Franc, A., and Menozzi, P. (2000). Biodiversity, disturbances, ecosystem function and management of European forests. *Forest Ecology and Management* 132, 39–50.

Berteigne, M., Lefevre, Y., and Rose, C. (1988). Accumulation de polluants organiques (H.P.A.) dans les horizons humifères des sols.: Relations possibles avec le dépérissement des forêts. *Forest Pathology* 18, 310–318.

Bey, M., Zhou, S., Poidevin, L., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Berrin, J.-G., and Sigoillot, J.-C. (2013). Cello-Oligosaccharide Oxidation Reveals Differences between Two Lytic Polysaccharide Monooxygenases (Family GH61) from *Podospora anserina*. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 488–496.

Bidlack, J., Malone, M., and Benson, R. (1992). Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. In *Proc. Okla. Acad. Sci.*, pp. 51–56.

Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development* 16, 6–21.

Blanchette, R.A. (2000). A review of microbial deterioration found in archaeological wood from different environments. *International Biodeterioration & Biodegradation* 46, 189–204.

Blanchette, R.A., Held, B.W., Jurgens, J.A., McNew, D.L., Harrington, T.C., Duncan, S.M., and Farrell, R.L. (2004). Wood-Destroying Soft Rot Fungi in the Historic Expedition Huts of Antarctica. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 1328–1335.

Board, P.G., and Menon, D. (2013). Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830, 3267–3288.

Bock, K.W., Josting, D., Lilienblum, W., and Pfeil, H. (1979). Purification of Rat-Liver Microsomal UDP-glucuronyltransferase. *European Journal of Biochemistry* 98, 19–26.

Bonnet, M.-L., and Lecointre, G. (2008). Comprendre et enseigner la classification du vivant.

Booth, J., Boyland, E., Sims, and P (1961). An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. *Biochemical Journal* 79, 516.

Boraston, A.B., Bolam, D.N., Gilbert, H.J., and Davies, G.J. (2004). Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochemical Journal* 382, 769.

Bourbonnais, R., Paice, M., Reid, I., Lanthier, P., and Yaguchi, M. (1995). Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2, 2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1876–1880.

Bouriaud, O., Bréda, N., Le Moguédec, G., and Nepveu, G. (2004). Modelling variability of wood density in beech as affected by ring age, radial growth and climate. *Trees* 18, 264–276.

Buican, D., and Grimoult, C. (2011). L'Evolution: Histoire et controverse (CNRS).

Burkhardt, R.W. (1972). The inspiration of Lamarck's belief in evolution. *Journal of the History of Biology* 5, 413–438.

Camarero, S., Sarkar, S., Ruiz-Duenas, F.J., Martinez, M.J., and Martinez, A.T. (1999). Description of a Versatile Peroxidase Involved in the Natural Degradation of Lignin That Has Both Manganese Peroxidase and Lignin Peroxidase Substrate Interaction Sites. *Journal of Biological Chemistry* 274, 10324–10330.

Cambareri, E.B., Foss, H.M., Rowtree, M.R., Selker, E.U., and Kinsey, J.A. (1996). Epigenetic control of a transposon-inactivated gene in *Neurospora* is dependent on DNA methylation. *Genetics* 143, 137–146.

Cameron, M., Timofeevski, S., and Aust, S. (2000). Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54, 751–758.

Campbell, A. (1934). Zone Lines in Plant Tissues: II. The Black Lines Formed by *Armillaria Mellea* (Vahl) Quel. *Annals of Applied Biology* 21, 1–22.

Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G.M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., and Righetti, P.G. (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25, 1327–1333.

Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., and Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research* 37, D233–D238.

Carus, T.L., and Creech, T. (1754). *De rerum natura*.

Cerniglia, C.E. (1997). Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 19, 324–333.

Choi, J.H., Lou, W., and Vancura, A. (1998). A Novel Membrane-bound Glutathione S-Transferase Functions in the Stationary Phase of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

Journal of Biological Chemistry 273, 29915–29922.

Coleman, J., Blake-Kalff, M., and Davies, E. (1997). Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Science* 2, 144–151.

Collins, J.P., and Holomuzki, J.R. (1984). Intraspecific variation in diet within and between trophic morphs in larval tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum nebulosum*). *Canadian Journal of Zoology* 62, 168–174.

Collins, P.J., and Dobson, A. (1997). Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3444–3450.

Colot, V., and Rossignol, J.-L. (1999). Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. *BioEssays* 21, 402–411.

Colpa, D.I., Fraaije, M.W., and van Bloois, E. (2014). DyP-type peroxidases: a promising and versatile class of enzymes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 41, 1–7.

Črešnar, B., and Petrič, Š. (2011). Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1814, 29–35.

Crow, J.F., Motoo Kimura, and others (1970). An introduction to population genetics theory. *An Introduction to Population Genetics Theory*.

Cullen, D., and Kersten, P. (2004). Enzymology and molecular biology of lignin degradation. In *Biochemistry and Molecular Biology*, (Springer), pp. 249–273.

Dai, Y., Witkamp, G.-J., Verpoorte, R., and Choi, Y.H. (2013). Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in *Carthamus tinctorius* L. *Analytical Chemistry* 85, 6272–6278.

Dalgleish, D.G. (1979). Proteolysis and aggregation of casein micelles treated with immobilized or soluble chymosin. *Journal of Dairy Research* 46, 653–661.

Darwin, C. (1859). *L'origine des espèces* (Seuil).

Davies, G., and Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3, 853–859.

Deacon, J.W. (2009). *Fungal biology* (John Wiley & Sons).

Dinis, M.J., Bezerra, R.M., Nunes, F., Dias, A.A., Guedes, C.V., Ferreira, L.M., Cone, J.W., Marques, G.S., Barros, A.R., and Rodrigues, M.A. (2009). Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white-rot fungi. *Bioresource Technology* 100, 4829–4835.

Dixon, D.P., Davis, B.G., and Edwards, R. (2002). Functional Divergence in the

Glutathione Transferase Superfamily in Plants. Identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 30859–30869.

Dobzhansky, T. (1940). Speciation as a stage in evolutionary divergence. *American Naturalist* 312–321.

Doddapaneni, H., Chakraborty, R., and Yadav, J.S. (2005). Genome-wide structural and evolutionary analysis of the P450 monooxygenase genes (P450ome) in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: evidence for gene duplications and extensive gene clustering. *BMC Genomics* 6, 92.

Donatini, B. (2010). Le *Coriolus versicolor*: le plus puissant immunostimulant connu. Utilisation en cancérologie, contre les virus et pour toute stimulation immunitaire. *Phytothérapie* 8, 255–258.

Dorado, J., Claassen, F.W., van Beek, T.A., Lenon, G., Wijnberg, J.B., and Sierra-Alvarez, R. (2000). Elimination and detoxification of softwood extractives by white-rot fungi. *Journal of Biotechnology* 80, 231–240.

Van Dyne, G. (2012). The ecosystem concept in natural resource management (Elsevier).

Edwards, R., Buono, D.D., Fordham, M., Skipsey, M., Brazier, M., Dixon, D.P., and Cummins, I. (2005). Differential induction of glutathione transferases and glucosyltransferases in wheat, maize and *Arabidopsis thaliana* by herbicide safeners. *Zeitschrift Für Naturforschung C* 60, 307–316.

Ellison, C.E., Hall, C., Kowbel, D., Welch, J., Brem, R.B., Glass, N., and Taylor, J.W. (2011). Population genomics and local adaptation in wild isolates of a model microbial eukaryote. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 2831–2836.

Eriksson, K.-E., Blanchette, R.A., and Ander, P. (1990). Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components (Berlin; New York: Springer-Verlag).

Eslyn, W., Kirk, T., and Effland, M. (1975). Changes in the chemical composition of wood caused by six soft-rot fungi. *Phytopathology* 65, 473–476.

Festucci-Buselli, R.A., Otoni, W.C., and Joshi, C.P. (2007). Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 19, 1–13.

Fisch, K.M., Gillaspay, A.F., Gipson, M., Henrikson, J.C., Hoover, A.R., Jackson, L., Najar, F.Z., Wägele, H., and Cichewicz, R.H. (2009). Chemical induction of silent biosynthetic pathway transcription in *Aspergillus niger*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 36, 1199–1213.

Floudas, D., Binder, M., Riley, R., Barry, K., Blanchette, R.A., Henrissat, B., Martinez, A.T., Otillar, R., Spatafora, J.W., Yadav, J.S., et al. (2012). The Paleozoic Origin of Enzymatic Lignin Decomposition Reconstructed from 31 Fungal Genomes. *Science* 336, 1715–1719.

Freedman, T., and Pukkila, P.J. (1993). De novo methylation of repeated sequences in *Coprinus cinereus*. *Genetics* 135, 357–366.

Freudenberg, K., Neish, A.C., and others (1968). Constitution and biosynthesis of lignin. *Constitution and Biosynthesis of Lignin*.

Frova, C. (2006). Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives. *Biomolecular Engineering* 23, 149–169.

Furuno, S., Foss, S., Wild, E., Jones, K.C., Semple, K.T., Harms, H., and Wick, L.Y. (2012). Mycelia Promote Active Transport and Spatial Dispersion of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environmental Science & Technology* 46, 5463–5470.

Ganal, M.W., Altmann, T., and Röder, M.S. (2009). SNP identification in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 211–217.

Gelhay, E., Rouhier, N., Gérard, J., Jolivet, Y., Gualberto, J., Navrot, N., Ohlsson, P.-I., Wingsle, G., Hirasawa, M., Knaff, D.B., et al. (2004). A specific form of thioredoxin h occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 14545–14550.

Gershenzon, J., and Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology* 3, 408–414.

Girard, V., Dieryckx, C., Job, C., and Job, D. (2013). Secretomes: The fungal strike force. *Proteomics* 13, 597–608.

Giraud, T., Gladieux, P., and Gavrillets, S. (2010). Linking the emergence of fungal plant diseases with ecological speciation. *Trends in Ecology & Evolution* 25, 387–395.

Gladieux, P., Feurtey, A., Hood, M.E., Snirc, A., Clavel, J., Dutech, C., Roy, M., and Giraud, T. (2015). The population biology of fungal invasions. *Molecular Ecology* n/a – n/a.

Glatt, H. (2000). Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics. *Chemico-Biological Interactions* 129, 141–170.

Gottlieb, S., Day, W., Pelczar, M., and others (1950). The biological degradation of lignin. II. The adaptation of white-rot fungi to growth on lignin media. *Phytopathology* 40, 926–935.

Grassé, P.-P. (2012). *L'évolution du vivant* (Albin Michel).

Guillén, F., MARTÍNEZ, A.T., and MARTÍNEZ, M.J. (1992). Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *European Journal of Biochemistry* 209, 603–611.

Guillén, F., Martínez, M.J., Gutiérrez, A., and Del Río, J. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol* 8, 187204Minami.

- Guilley, E., Charpentier, J.P., Ayadi, N., Snakkers, G., Nepveu, G., and Charrier, B. (2004). Decay resistance against *Coriolus versicolor* in Sessile oak (*Quercus petraea* Liebl.): analysis of the between-tree variability and correlations with extractives, tree growth and other basic wood properties. *Wood Science and Technology* 38, 539–554.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Fleischner, G., Gatmaitan, Z., Arias, I.M., and Jakoby, W.B. (1974). The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 71, 3879–3882.
- Hacquard, S., Joly, D.L., Lin, Y.-C., Tisserant, E., Feau, N., Delaruelle, C., Legué, V., Kohler, A., Tanguay, P., Petre, B., et al. (2012). A comprehensive analysis of genes encoding small secreted proteins identifies candidate effectors in *Melampsora larici-populina* (poplar leaf rust). *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25, 279–293.
- Häggblom, M., Nohynek, L., and Salkinoja-Salonen, M. (1988). Degradation and O-methylation of chlorinated phenolic compounds by *Rhodococcus* and *Mycobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 3043–3052.
- Hallac, B.B., and Ragauskas, A.J. (2011). Analyzing cellulose degree of polymerization and its relevancy to cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 5, 215–225.
- Halliwel, G. (1965). Catalytic decomposition of cellulose under biological conditions. *Biochem. J* 95, 35–40.
- Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K.M., and Bernhardt, R. (2007). Cytochrome P450 systems—biological variations of electron transport chains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1770, 330–344.
- Harley, J.L., and Harley, E. (1987). A check-list of mycorrhiza in the British flora. *New Phytologist* 1–102.
- Harms, H., Schlosser, D., and Wick, L.Y. (2011). Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nature Reviews Microbiology* 9, 177–192.
- Harris, J.M., Meyer, D.J., Coles, B., and Ketterer, B. (1991). A novel glutathione transferase (13-13) isolated from the matrix of rat liver mitochondria having structural similarity to class theta enzymes. *Biochem. J* 278, 137–141.
- Harvey, P.J., Schoemaker, H.E., and Palmer, J.M. (1986). Veratryl alcohol as a mediator and the role of radical cations in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters* 195, 242–246.
- Hatakka, A., and Hammel, K.E. (2011). Fungal biodegradation of lignocelluloses. In *Industrial Applications*, (Springer), pp. 319–340.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., and Jowsey, I.R. (2005). Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45, 51–88.
- Henderson, C.J., McLaren, A.W., Moffat, G.J., Bacon, E.J., and Wolf, C.R. (1998). Pi-class

glutathione S-transferase: regulation and function. *Chemico-Biological Interactions* 111-112, 69–82.

Henson, J.M., Butler, M.J., and Day, A.W. (1999). The dark side of the mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 37, 447–471.

Hervé, C., Rogowski, A., Blake, A.W., Marcus, S.E., Gilbert, H.J., and Knox, J.P. (2010). Carbohydrate-binding modules promote the enzymatic deconstruction of intact plant cell walls by targeting and proximity effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 15293–15298.

Highley, T.L. (1982). Influence of type and amount of lignin on decay by *Coriolus versicolor*. *Canadian Journal of Forest Research* 12, 435–438.

Hofrichter, M. (2002). Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology* 30, 454–466.

Hori, C., Ishida, T., Igarashi, K., Samejima, M., Suzuki, H., Master, E., Ferreira, P., Ruiz-Dueñas, F.J., Held, B., Canessa, P., et al. (2014). Analysis of the *Phlebiopsis gigantea* genome, transcriptome and secretome provides insight into its pioneer colonization strategies of wood. *PLoS Genetics* 10, e1004759.

Hu, J., Arantes, V., Pribovo, A., Gourlay, K., and Saddler, J.N. (2014). Substrate factors that influence the synergistic interaction of AA9 and cellulases during the enzymatic hydrolysis of biomass. *Energy & Environmental Science* 7, 2308.

Humar, M., Fabčič, B., Zupančič, M., Pohleven, F., and Oven, P. (2008). Influence of xylem growth ring width and wood density on durability of oak heartwood. *International Biodeterioration & Biodegradation* 62, 368–371.

Hundt, K., Jonas, U., Hammer, E., and Schauer, F. (1999). Transformation of diphenyl ethers by *Trametes versicolor* and characterization of ring cleavage products. *Biodegradation* 10, 279–286.

Huneman, P. (2006). Mutations et neutralisme: les vies successives du darwinisme. *Critique* 504–515.

Hurd, P.J., and Nelson, C.J. (2009). Advantages of next-generation sequencing versus the microarray in epigenetic research. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 8, 174–183.

Ishikawa, T. (1992). The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends in Biochemical Sciences* 17, 463–468.

Iyer, L.M., Tahiliani, M., Rao, A., and Aravind, L. (2009). Prediction of novel families of enzymes involved in oxidative and other complex modifications of bases in nucleic acids. *Cell Cycle* 8, 1698–1710.

Iyer, L.M., Zhang, D., de Souza, R.F., Pukkila, P.J., Rao, A., and Aravind, L. (2014). Lineage-

specific expansions of TET/JBP genes and a new class of DNA transposons shape fungal genomic and epigenetic landscapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 1676–1683.

Jacobs, H., Boswell, G.P., Scrimgeour, C.M., Davidson, F.A., Gadd, G.M., and Ritz, K. (2004). Translocation of carbon by *Rhizoctonia solani* in nutritionally-heterogeneous microcosms. *Mycological Research* **108**, 453–462.

Jacquot, J.P., Dietz, K.-J., Rouhier, N., Meux, E., Lallement, P., Selles, B., and Hecker, A. (2013). Redox regulation in plants: glutathione and “redoxin” related families. In *Oxidative Stress and Redox Regulation*, (Springer), pp. 213–231.

Jakobsson, P.-J., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A., and Persson, B. (1999). Common structural features of MAPEG—a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Science* **8**, 689–692.

Jeffries, T.W. (1994). Biodegradation of lignin and hemicelluloses. In *Biochemistry of Microbial Degradation*, (Springer), pp. 233–277.

Jimenez-Tobon, G. (2003). In situ localization of manganese peroxidase production in mycelial pellets of *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiology* **149**, 3121–3127.

Jones, C.G., Lawton, J.H., and Shachak, M. (1994). Organisms as Ecosystem Engineers. In *Ecosystem Management*, (New York, NY: Springer New York), pp. 130–147.

Justo, A., and Hibbett, D.S. (2011). Phylogenetic classification of *Trametes* (Basidiomycota, Polyporales) based on a five-marker dataset. *Taxon* **60**, 1567–1583.

Jůzlová, P., Martinkova, L., and Křen, V. (1996). Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review. *Journal of Industrial Microbiology* **16**, 163–170.

Kang, H.-J., Sigler, L., Lee, J., Gibas, C.F.C., Yun, S.-H., and Lee, Y.-W. (2010). *Xylogone ganodermorphthora* sp. nov., an ascomycetous pathogen causing yellow rot on cultivated mushroom *Ganoderma lucidum* in Korea. *Mycologia* **102**, 1167–1184.

Kebbi-Benkeder, Z., Colin, F., Dumarçay, S., and Gérardin, P. (2014). Quantification and characterization of knotwood extractives of 12 European softwood and hardwood species. *Annals of Forest Science* 1–8.

Kelley, R., and Reddy, C.A. (1986). Identification of glucose oxidase activity as the primary source of hydrogen peroxide production in ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Microbiology* **144**, 248–253.

Kemen, E., Kemen, A.C., Rafiqi, M., Hempel, U., Mendgen, K., Hahn, M., and Voegelé, R.T. (2005). Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**, 1130–1139.

Kerem, Z., Jensen, K.A., and Hammel, K.E. (1999). Biodegradative mechanism of the

brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*: evidence for an extracellular hydroquinone-driven fenton reaction. *FEBS Letters* 446, 49–54.

Kersten, P.J., and Kirk, T.K. (1987). Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology* 169, 2195–2201.

Khalidi, N., Seifuddin, F.T., Turner, G., Haft, D., Nierman, W.C., Wolfe, K.H., and Fedorova, N.D. (2010). SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal Genetics and Biology* 47, 736–741.

Kirk, T., and Highley, T. (1973). Quantitative changes in structural components of conifer woods during decay by white-and brown-rot fungi. *Phytopathology* 63, 1338–1342.

Kirk, T.K., and Cullen, D. (1998). Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry*. Wiley, New York 273–307.

Kirk, T.K., Croan, S., Tien, M., Murtagh, K.E., and Farrell, R.L. (1986). Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. *Enzyme and Microbial Technology* 8, 27–32.

Kirker, G., Blodgett, A., Arango, R., Lebow, P., and Clausen, C. (2013). The role of extractives in naturally durable wood species. *International Biodeterioration & Biodegradation* 82, 53–58.

Koenigs, J.W. (1974). Hydrogen peroxide and iron: a proposed system for decomposition of wood by brown-rot basidiomycetes. *Wood and Fiber Science* 6, 66–80.

Koop, D.R. (2006). Alcohol metabolism's damaging effects on the cell. *Alcohol Res Health* 29, 274–280.

Kornfield, I., Smith, D.C., Gagnon, P., and Taylor, J.N. (1982). The cichlid fish of Cuatro Ciénegas, Mexico: direct evidence of conspecificity among distinct trophic morphs. *Evolution* 658–664.

Kosuta, S., Chabaud, M., Loughon, G., Gough, C., Dénarié, J., Barker, D.G., and Bécard, G. (2003). A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 131, 952–962.

Krest, C.M., Onderko, E.L., Yosca, T.H., Calixto, J.C., Karp, R.F., Livada, J., Rittle, J., and Green, M.T. (2013). Reactive Intermediates in Cytochrome P450 Catalysis. *Journal of Biological Chemistry* 288, 17074–17081.

Kubicek, C.P. (2012). *Fungi and lignocellulosic biomass* (John Wiley & Sons).

Kupiec, J.-J. (1999). L'influence de la philosophie d'Aristote sur l'élaboration de la théorie de l'évolution et sur la génétique. *Revue Européenne Des Sciences Sociales* 89–116.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

Lallement, P.-A., Edgar, M., Jose, M.G., Pascalita, P., Claude, D., Frederick, S., Ahmed, H., Nicolas, R., and Arnaud, H. (2014). Structural and enzymatic insights into Lambda glutathione transferases from *Populus trichocarpa*, monomeric enzymes constituting an early divergent class specific to terrestrial plants. *Biochemical Journal*.

Lamlom, S., and Savidge, R. (2003). A reassessment of carbon content in wood: variation within and between 41 North American species. *Biomass and Bioenergy* 25, 381–388.

Lee, H., Hamid, S., and Zain, S. (2014). Conversion of Lignocellulosic Biomass to Nanocellulose: Structure and Chemical Process. *The Scientific World Journal* 2014.

Levasseur, A., Piumi, F., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Asther, M., Delattre, M., Henrissat, B., Pontarotti, P., Asther, M., and Record, E. (2008). FOLy: an integrated database for the classification and functional annotation of fungal oxidoreductases potentially involved in the degradation of lignin and related aromatic compounds. *Fungal Genetics and Biology* 45, 638–645.

Li, X., Beeson, W.T., Phillips, C.M., Marletta, M.A., and Cate, J.H.D. (2012). Structural Basis for Substrate Targeting and Catalysis by Fungal Polysaccharide Monooxygenases. *Structure* 20, 1051–1061.

Lindahl, B.D., and Tunlid, A. (2015). Ectomycorrhizal fungi - potential organic matter decomposers, yet not saprotrophs. *New Phytologist* 205, 1443–1447.

Lynch, M. (2000). The Evolutionary Fate and Consequences of Duplicate Genes. *Science* 290, 1151–1155.

Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Vicent, T., and Caminal, G. (2009). Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 74, 765–772.

Martienssen, R.A. (2001). DNA Methylation and Epigenetic Inheritance in Plants and Filamentous Fungi. *Science* 293, 1070–1074.

Martin, F., Rubini, P., Kottke, I., and Côté, R. (1994). Aluminium polyphosphate complexes in the mycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*: A ²⁷Al-nuclear magnetic resonance study. *Planta* 194.

Mathew, G.M., Sukumaran, R.K., Singhanian, R.R., and Pandey, A. (2008). Progress in research on fungal cellulases for lignocellulose degradation. *Journal of Scientific and Industrial Research* 67, 898.

Mathieu, Y., Prosper, P., Buee, M., Dumarcay, S., Favier, F., Gelhaye, E., Gerardin, P., Harvengt, L., Jacquot, J.-P., Lamant, T., et al. (2012). Characterization of a *Phanerochaete chrysosporium* Glutathione Transferase Reveals a Novel Structural and Functional Class with Ligandin Properties. *Journal of Biological Chemistry* 287, 39001–39011.

Mathieu, Y., Prosper, P., Favier, F., Harvengt, L., Didierjean, C., Jacquot, J.-P., Morel-Rouhier, M., and Gelhaye, E. (2013). Diversification of fungal specific class a glutathione transferases in saprotrophic fungi.

Mayr, E. (1970). Populations, species, and evolution: an abridgment of animal species and evolution (Harvard University Press).

Mayr, E., and Dobzhansky, T. (1945). Experiments on Sexual Isolation in *Drosophila*: IV. Modification of the Degree of Isolation Between *Drosophila Pseudoobscura* and *Drosophila Persimilis* and Sexual Preferences in *Drosophila Prosoltans*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 31, 75.

Mert, H.H., and Dizbay, M. (1977). The effect of osmotic pressure and salinity of the medium on the growth and sporulation of *Aspergillus niger* and *Paecilomyces lilacinum* species. Mycopathologia 61, 125–127.

Meunier, B., De Visser, S.P., and Shaik, S. (2004). Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. Chemical Reviews 104, 3947–3980.

Meux, E., Prosper, P., Ngadin, A., Didierjean, C., Morel, M., Dumarcay, S., Lamant, T., Jacquot, J.-P., Favier, F., and Gelhaye, E. (2011). Glutathione Transferases of *Phanerochaete chrysosporium*: s-glutathionyl-p-hydroquinone reductase belongs to a new structural class. Journal of Biological Chemistry 286, 9162–9173.

Meux, E., Morel, M., Lamant, T., Gérardin, P., Jacquot, J.-P., Dumarçay, S., and Gelhaye, E. (2013). New substrates and activity of *Phanerochaete chrysosporium* Omega glutathione transferases. Biochimie 95, 336–346.

Morange, M. (2006). Les gènes s'identifient à l'ADN. La Recherche 82–83.

Morel, F., Rauch, C., Petit, E., Piton, A., Theret, N., Coles, B., and Guillouzo, A. (2004). Gene and Protein Characterization of the Human Glutathione S-Transferase Kappa and Evidence for a Peroxisomal Localization. Journal of Biological Chemistry 279, 16246–16253.

Morel, M., Ngadin, A.A., Droux, M., Jacquot, J.-P., and Gelhaye, E. (2009). The fungal glutathione S-transferase system. Evidence of new classes in the wood-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Cellular and Molecular Life Sciences 66, 3711–3725.

Morel, M., Meux, E., Mathieu, Y., Thuillier, A., Chibani, K., Harvengt, L., Jacquot, J.-P., and Gelhaye, E. (2013). Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi. Microbial Biotechnology 6, 248–263.

Morgan, P., Lee, S.A., Lewis, S.T., Sheppard, A.N., and Watkinson, R.J. (1993). Growth and biodegradation by white-rot fungi inoculated into soil. Soil Biology and Biochemistry 25, 279–287.

Morin, E., Kohler, A., Baker, A.R., Foulongne-Oriol, M., Lombard, V., Nagye, L.G., Ohm, R.A.,

Patyshakuliyeva, A., Brun, A., Aerts, A.L., et al. (2012). Genome sequence of the button mushroom *Agaricus bisporus* reveals mechanisms governing adaptation to a humic-rich ecological niche. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 17501–17506.

Navarro, D., Rosso, M.-N., Haon, M., Olivé, C., Bonnin, E., Lesage-Meessen, L., Chevret, D., Coutinho, P.M., Henrissat, B., Berrin, J.-G., et al. (2014). Fast solubilization of recalcitrant cellulosic biomass by the basidiomycete fungus *Laetisaria arvalis* involves successive secretion of oxidative and hydrolytic enzymes. *Biotechnology for Biofuels* 7, 143.

Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E., and Jacquot, J.-P. (2007). Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum* 129, 185–195.

Neville Jr, D.M., and Glossmann, H. (1974). [9] Molecular weight determination of membrane protein and glycoprotein subunits by discontinuous gel electrophoresis in dodecyl sulfate. *Methods in Enzymology* 32, 92–102.

Nevo, E. (1973). Adaptive color polymorphism in cricket frogs. *Evolution* 353–367.

Oakley, A. (2011). Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metabolism Reviews* 43, 138–151.

Ohno, S. (1970). *Evolution by gene and genome duplication* (Springer, Berlin).

De Oliveira, A.L., Gallo, M., Pazzagli, L., Benedetti, C.E., Cappugi, G., Scala, A., Pantera, B., Spisni, A., Pertinhez, T.A., and Cicero, D.O. (2011). The Structure of the Elicitor Cerato-platanin (CP), the First Member of the CP Fungal Protein Family, Reveals a Double - Barrel Fold and Carbohydrate Binding. *Journal of Biological Chemistry* 286, 17560–17568.

Osmond, R.I.W., Hrmova, M., Fontaine, F., Imberty, A., and Fincher, G.B. (2001). Binding interactions between barley thaumatin-like proteins and (1,3)- β -D-glucans: Kinetics, specificity, structural analysis and biological implications. *European Journal of Biochemistry* 268, 4190–4199.

Ostoya, P. (1954). Maupertuis et la biologie. *Revue d'histoire des sciences et de leurs applications* 7, 60–78.

Paice, M., Reid, I., Bourbonnais, R., Archibald, F., and Jurasek, L. (1993). Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies kraft pulp. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 260–265.

Palmer, J.M., and Keller, N.P. (2010). Secondary metabolism in fungi: does chromosomal location matter? *Current Opinion in Microbiology* 13, 431–436.

Pandey, K.K. (1999). A study of chemical structure of soft and hardwood and wood polymers by FTIR spectroscopy. *Journal of Applied Polymer Science* 71, 1969–1975.

Pariaud, B., Ravigné, V., Halkett, F., Goyeau, H., Carlier, J., and Lannou, C. (2009).

Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathology* 58, 409–424.

Park, J., Lee, S., Choi, J., Ahn, K., Park, B., Park, J., Kang, S., and Lee, Y.-H. (2008). Fungal cytochrome P450 database. *BMC Genomics* 9, 402.

Payen, T., Murat, C., Gigant, A., Morin, E., De Mita, S., and Martin, F. (2015). A survey of genome-wide single nucleotide polymorphisms through genome resequencing in the Périgord black truffle (*Tuber melanosporum* Vittad.). *Molecular Ecology Resources*.

Pazzagli, L., Seidl-Seiboth, V., Barsottini, M., Vargas, W.A., Scala, A., and Mukherjee, P.K. (2014). Cerato-platanins: Elicitors and effectors. *Plant Science* 228, 79–87.

Penninckx, V., Glineur, S., Gruber, W., Herbauts, J., and Meerts, P. (2001). Radial variations in wood mineral element concentrations: a comparison of beech and pedunculate oak from the Belgian Ardennes. *Annals of Forest Science* 58, 253–260.

Pereira, H., Graca, J., and Rodrigues, J.C. (2009). 3 Wood chemistry in relation to quality. *Wood Quality and Its Biological Basis* 53.

Perfect, S.E., and Green, J.R. (2001). Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. *Molecular Plant Pathology* 2, 101–108.

Phillips, C.M., Beeson IV, W.T., Cate, J.H., and Marletta, M.A. (2011). Cellobiose dehydrogenase and a copper-dependent polysaccharide monooxygenase potentiate cellulose degradation by *Neurospora crassa*. *ACS Chemical Biology* 6, 1399–1406.

Pickett, C.B., and Lu, A.Y. (1989). Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function. *Annual Review of Biochemistry* 58, 743–764.

Van der Plank, J. (1968). *Disease Resistance in Plants* Academic Press. New York, London.

Plett, J.M., Kemppainen, M., Kale, S.D., Kohler, A., Legué, V., Brun, A., Tyler, B.M., Pardo, A.G., and Martin, F. (2011). A Secreted Effector Protein of *Laccaria bicolor* Is Required for Symbiosis Development. *Current Biology* 21, 1197–1203.

Plutynski, A. (2004). *Neutralism*.

Poulos, T.L., Finzel, B., Gunsalus, I., Wagner, G.C., and Kraut, J. (1985). The 2.6-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *Journal of Biological Chemistry* 260, 16122–16130.

Prévost, A., and Pargney, J. (1995). Comparaison des ectomycorhizes naturelles entre le hêtre (*Fagus sylvatica*) et 2 lactaires (*Lactarius blennius* var *viridis* et *Lactarius subdulcis*). I. Caractéristiques morphologiques et cytologiques. *Annales Des Sciences Forestières* 52, 131–146.

Pu, Y., Kosa, M., Kalluri, U.C., Tuskan, G.A., and Ragauskas, A.J. (2011). Challenges of the utilization of wood polymers: how can they be overcome? *Applied Microbiology and*

Biotechnology 91, 1525–1536.

Quélet, L. (1888). Flore mycologique de la France et des pays limitrophes.

Quinlan, R.J., Sweeney, M.D., Lo Leggio, L., Otten, H., Poulsen, J.-C.N., Johansen, K.S., Krogh, K.B.R.M., Jorgensen, C.I., Tovborg, M., Anthonsen, A., et al. (2011). Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 15079–15084.

Rayner, Adm., and Todd, N. (1977). Intraspecific antagonism in natural populations of wood-decaying basidiomycetes. *Journal of General Microbiology* 103, 85–90.

Rayner, A.D.M., and Todd, N.K. (1978). Polymorphism in *Coriolus versicolor* and its relation to interfertility and intraspecific antagonism. *Transactions of the British Mycological Society* 71, 99–106.

Reid, I.D., and Paice, M.G. (1994). Effect of residual lignin type and amount on bleaching of kraft pulp by *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 1395–1400.

Requena, N., Serrano, E., Ocón, A., and Breuninger, M. (2007). Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry* 68, 33–40.

Rinaldi, C., Kohler, A., Frey, P., Duchaussoy, F., Ningre, N., Couloux, A., Wincker, P., Le Thiec, D., Fluch, S., Martin, F., et al. (2007). Transcript profiling of poplar leaves upon infection with compatible and incompatible strains of the foliar rust *Melampsora larici-populina*. *Plant Physiology* 144, 347–366.

Del Rio, J., Speranza, M., Gutiérrez, A., Martínez, M., and Martínez, A. (2002). Lignin attack during eucalypt wood decay by selected basidiomycetes: a Py-GC/MS study. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 64, 421–431.

Rountree, M.R., and Selker, E.U. (2010). DNA methylation and the formation of heterochromatin in *Neurospora crassa*. *Heredity* 105, 38–44.

Rowell, R.M. (2012). *Handbook of wood chemistry and wood composites* (CRC press).

Roy, B., Dumonceaux, T., Koukoulas, A., and Archibald, F. (1996). Purification and Characterization of Cellobiose Dehydrogenases from the White Rot Fungus *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 4417–4427.

Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* 27, 185–194.

Saueracker, G. (2013). On the exudates of polypore fungi.

Schmidt, O. (2006). Wood and tree fungi: biology, damage, protection, and use.

Schwarze, F.W., Engels, J., and Mattheck, C. (2000). Fungal strategies of wood decay in

trees.

Schweingruber, F.H. (1988). Tree rings: basics and applications of dendrochronology (Dordrecht ; Boston : Norwell, MA, U.S.A: D. Reidel Pub. Co. ; Sold and distributed in the U.S.A. and Canada by Kluwer Academic Publishers).

Selosse, M.-A., and Le Tacon, F. (1998). The land flora: a phototroph-fungus partnership? *Trends in Ecology & Evolution* 13, 15–20.

Shah, V., and Nerud, F. (2002). Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. *Canadian Journal of Microbiology* 48, 857–870.

Shallom, D., and Shoham, Y. (2003). Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology* 6, 219–228.

Sheehan, D., MEADE, G., Foley, V., and Dowd, C. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J* 360, 1–16.

Skyba, O., Douglas, C.J., and Mansfield, S.D. (2013). Syringyl-Rich Lignin Renders Poplars More Resistant to Degradation by Wood Decay Fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 2560–2571.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150, 76–85.

Standish, L.J., Wenner, C.A., Sweet, E.S., Bridge, C., Nelson, A., Martzen, M., Novack, J., and Torkelson, C. (2008). *Trametes versicolor* mushroom immune therapy in breast cancer. *Journal of the Society for Integrative Oncology* 6, 122.

Sugano, Y. (2009). DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66, 1387–1403.

Sun, Y., and Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 83, 1–11.

Sun, Y.-P., Unestam, T., Lucas, S.D., Johanson, K.J., Kenne, L., and Finlay, R. (1999). Exudation-reabsorption in a mycorrhizal fungus, the dynamic interface for interaction with soil and soil microorganisms. *Mycorrhiza* 9, 137–144.

Tanaka, H., Yoshida, G., Baba, Y., Matsumura, K., Wasada, H., Murata, J., Agawa, M., Itakura, S., and Enoki, A. (2007). Characterization of a hydroxyl-radical-producing glycoprotein and its presumptive genes from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biotechnology* 128, 500–511.

Thuillier, A., Ngadin, A.A., Thion, C., Billard, P., Jacquot, J.-P., Gelhaye, E., and Morel, M. (2011). Functional Diversification of Fungal Glutathione Transferases from the Ure2p Class. *International Journal of Evolutionary Biology* 2011, 1–9.

- Thuillier, A., Roret, T., Favier, F., Gelhaye, E., Jacquot, J.-P., Didierjean, C., and Morel-Rouhier, M. (2013). Atypical features of a Ure2p glutathione transferase from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters* 587, 2125–2130.
- Tivoli, B., Baranger, A., Avila, C.M., Banniza, S., Barbetti, M., Chen, W., Davidson, J., Lindeck, K., Kharrat, M., Rubiales, D., et al. (2006). Screening techniques and sources of resistance to foliar diseases caused by major necrotrophic fungi in grain legumes. *Euphytica* 147, 223–253.
- Tudor, D., Robinson, S.C., and Cooper, P.A. (2013). The influence of pH on pigment formation by lignicolous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* 80, 22–28.
- Upadhyay, S.K., Mahajan, L., Ramjee, S., Singh, Y., Basir, S.F., and Madan, T. (2009). Identification and characterization of a laminin-binding protein of *Aspergillus fumigatus*: extracellular thaumatin domain protein (AfCalAp). *Journal of Medical Microbiology* 58, 714–722.
- Valmaseda, M., Almendros, G., and Martinez, A. (1990). Substrate-dependent degradation patterns in the decay of wheat straw and beech wood by ligninolytic fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 33.
- Vandel, A. (1960). Lamarck et Darwin. *Revue d'histoire des sciences et de leurs applications* 13, 59–72.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., and Boerjan, W. (2010). Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology* 153, 895–905.
- Veneault-Fourrey, C., and Martin, F. (2011). Mutualistic interactions on a knife-edge between saprotrophy and pathogenesis. *Current Opinion in Plant Biology* 14, 444–450.
- Waddington, C.H. (1948). The genetic control of development. In *Symp. Soc. Exp. Biol.*, pp. 145–154.
- Weaver, I.C.G., Cervoni, N., Champagne, F.A., D'Alessio, A.C., Sharma, S., Seckl, J.R., Dymov, S., Szyf, M., and Meaney, M.J. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature Neuroscience* 7, 847–854.
- West-Eberhard, M.J. (1989). Phenotypic plasticity and the origins of diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics* 249–278.
- Wilce, M.C.J., and Parker, M.W. (1994). Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1205, 1–18.
- Williams, G.C. (2008). *Adaptation and natural selection: a critique of some current evolutionary thought* (Princeton University Press).
- Williams, R.B., Henrikson, J.C., Hoover, A.R., Lee, A.E., and Cichewicz, R.H. (2008).

Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. *Organic & Biomolecular Chemistry* 6, 1895.

Woese, C.R., and Fox, G.E. (1977). The concept of cellular evolution. *Journal of Molecular Evolution* 10, 1–6.

Wolffe, A.P. (1999). Epigenetics: Regulation Through Repression. *Science* 286, 481–486.

Wong, D.W.S. (2009). Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 157, 174–209.

Xu, X.-H., Su, Z.-Z., Wang, C., Kubicek, C.P., Feng, X.-X., Mao, L.-J., Wang, J.-Y., Chen, C., Lin, F.-C., and Zhang, C.-L. (2014). The rice endophyte *Harpophora oryzae* genome reveals evolution from a pathogen to a mutualistic endophyte. *Scientific Reports* 4.

Xun, L., Belchik, S.M., Xun, R., Huang, Y., Zhou, H., Sanchez, E., Kang, C., and Board, P.G. (2010). S-Glutathionyl-(chloro)hydroquinone reductases: a novel class of glutathione transferases. *Biochemical Journal* 428, 419–427.

Yelle, D.J., Ralph, J., Lu, F., and Hammel, K.E. (2008). Evidence for cleavage of lignin by a brown rot basidiomycete. *Environmental Microbiology* 10, 1844–1849.

Yi, C., Zhang, S., Liu, X., Bui, H.T., and Hong, Y. (2010). Does epigenetic polymorphism contribute to phenotypic variances in *Jatropha curcas* L.? *BMC Plant Biology* 10, 259.

Zhang, D., Yang, Y., Leakey, J.E., and Cerniglia, C.E. (1996). Phase I and phase II enzymes produced by *Cunninghamella elegans* for the metabolism of xenobiotics. *FEMS Microbiology Letters* 138, 221–226.

Zhang, W., Yin, K., Li, B., and Chen, L. (2013). A glutathione S-transferase from *Proteus mirabilis* involved in heavy metal resistance and its potential application in removal of Hg²⁺. *Journal of Hazardous Materials* 261, 646–652.

Žifčáková, L., and Baldrian, P. (2012). Fungal polysaccharide monooxygenases: new players in the decomposition of cellulose. *Fungal Ecology* 5, 481–489.

Annexes

Annexe 1 : séquences des GST oméga, GHR et Ure2p de *Trametes versicolor* pour la synthèse de gènes synthétiques.

Sites de restriction en bleu ; His-tag en rouge et modification nucléotidique en vert.

```
>Trave|157166 = GSTO-1C
```

CATATGCTGAGAGGATTACACTTTACACCGCCAAGATCTGCCCTTCGCACAGAGGGCAGAAATCGCTCTCGCA
GAGGCGAAGGCGGAGTTCACCCCTTTCCAGATCGACCTCTCGAAACAAGCCGGAATGGTACGCCCTTAAGGTGAAC
CCCGCCAGCAAGGTCCCCGCAATCGCCTACGGCGGCCCCGAGGTCCCCCAGACCAGCCCTCGCCCGAGTCCGTC
AAGCTCGCCGAGTCGCTCGTGCTCGTTCGTCGCGGACCTCTTCCCAACTCCGGCATCTCTCCTCCGAC
CCCGTCACGCGCGCCAGACGCGCTTCTTCATCGAGGGCGTCTCGAGCAAGCTCATCCCCGCGTGGTACGCGTAC
TTCCTCCGCGGGGCGTCCGTCGACGACCTTACACCGCAGCCGAGTACGTGCAGTCGCTCCTGCCGCGGAGGGC
TTCGCGGTGGGCAAGTTCTCGGCCGCGGACATCGCGATCGCGCCGTTCTTGCGCGGGGCGCGGTGTCGCTCGTG
AACGAAATTGGGAAGTACCCGGAGGGCGACGGCAAGAAGGTCTGGGCGGCGCTTACTTCGGGCAAGTTTGC GCGT
CTTGGCAAGTACGCGGAGGACCTTTCGCGCGCGAGAGCTTCTCGTCTACCTTCGATGAGGATTATGTCACGAAG
GCGTTCAGCGCGCGTTTTCGCGGACCTCCGCAGCAAGCACCATCACCATCACCATTGACGGCCGC

```
>Trave|67635 = GSTO-2C
```

CATATGCCCCGAGAGAATCACCCCTCTACACTGCCAAGATCTGCCCTTCGCCCAGAGGGTTGAGATCGCGCTCCAT
GAGGCCAAGGCCACCATAATGTCGAGCAGTTCCAGATCGACCTCCAGAACAAGCCTGAGTGGTACGCGCCCAAG
GTCAACCCGGCGAGCAAGGTCCCCGCCATCGCCTACGGCGGCCCGCACGTACCCCCGGACCAGCCCTCCCCGAG
TCCATAAAGCTCGCCGAGTCGCTCATCCTCGTCGAGTTCGTCGCGGACCTCTTCCCGCACTCGCACCTCCTCCCG
CACGACCCCGTGAAGCGCGCTCAGGCGCGCTTCTTCATCGACGGCGTCTCGACCAAGTTTCATCCCCGCCTGGCAC
GCGTTCTCGCAGGGCAAGTCGTCGAGGAGGACTTCTTCACGGCCGTCGAGCACCTCCAGGCGCTCCTGCCCGAG
AGCGGGTTTCGCGGTTGGGGCGTACTCGATCGCGGACGTCGCGCTCACGCCGTTCTTCGACGCGCGCGGGTGACG
CTCAAGGAGGACTTGGGGCGGTACCCGAGGGGCGAGGGGCCGCGTGTGCTGGCGGTGCTTACTTCGGGCACCGGC
CGGCTGGCGCGCTTTGGCAAGTATGCCCAGGACCTGCTCGCCCGCGAGAGTTTCCAGGCTACGTTTCGATGAGGCC
TACATCACCGAGAGGTACAAGGCGCGCTTCGCTGACTTGCGCAAGCACCATCACCATCACCATTAAGCGGCCGC

>Trave|60698 = GSTO-3C

CATATGAGCAACGACGGA¹AACTATATCCATTCCCATGCAACC²GGGTTGGCGGCGAAGACCGTGGAGCAGCACCAA
GCTCCG³CAGGATCTTGCTTATACGCGGGATGGTTCTGCCATACGTGCAGCGCTCTTGATATCCCTTGAGGAG
AAGGGGATCCCGTACCAGTACAAGGAAGTCAACCCGTACAAGAAGGAGCAACACTTCCTTGACATCAACCCCAAG
GGCCTCGTCCCCGCCATCGAGTACAAGGGCAAGGCCATGTACGAGTCGCTCATCCTCTGCGAGTTCTTCGAGGGAC
GCCTTCCC⁴GGAACACACCCCGCACCTCCTCACCACCGACCCCTTCGACC⁵CGCGGTACGTGCGCCTCTGGGTCGAC
CACGTCTCGAAGCAGATCGTGCCGACGTT⁶CATGCGGCTCGTCCTGGCGCAGGAGCCGGAGAAGCAACAGGAGCAC
CTCGCGGACTTCTACAAGGGCTGCGCACGCTGACCGACAAGGT⁷CAGGGGGCCCGTACTTCCTCGGGGCGCAGTTCT
AGCCTGGT⁸CGACATCGCGCTCGCGCCGTGGGTGCTGCGCGACTACATCCTCGCGGAGAACC⁹CGGGGTACGAGAGG
GAGGCGCGGGAGTGCCTGGGTGTCGTACGCGAAGGCCCTGCTGACAGCGCGCAGAGCGTGTCTCCGGAACCCAGAGT
GACAAAGAGCATTACGCGCAGATATACGCGCGATACCTCGCTAAGCAGGCGACAGAGCGAGGCAAGCGCGATC
AGGGCTGGCAAACCGTTCCACCATCACCATCACCATTGAGCGGCCGC

```
>Trave|75639 = GSTO-1S
```

CATATGCTCTGAATCCAAGAGGATCACGCTCTATGCGGCACCTGAATCGCCGTACCCCCACAGGGTTCGTTTGGA
CTCGAGGAGGCGAAAGCCAACTACGATGTCATCTGGATCGATCTGGTAGACAAGCCAGAGTGGTATGCGCAGAAG
GTCAACACCGAGGGCGGTAAAGTCCCCACCTCGTCTACGGCGGACCCAAGCTGGAGCCGGGAGACGCGCTCTCC
GGTGACGCCGTTGGGATCCCAGAGTCTCTGGTCATCCTAGAGTTCATCGCCGACATCTTCCCAGACGCCACCTC
CTCCGGCGGACCCGACGCTCCGCGCCCGCGCGCGGCTCTTCTACAGCTCGCTCGACGCGGGGCTGTCCAAGGGC
TTTGTCGGCTTTCTTTCATGGGGATGCCCCGAAGGATCTTCTCGCAGGCCTGGACGACATTACAGGGCAGACTC
CCGCCACGGGCTTCGCCGCGGGCGAGTGGTCTATCGCCGACGCGGACGCTTCTCTACCTTGCTTCGTTTGCAA
CTTGCCTCAAAGACGGCATCGGCTTGTGCAAACCCGAGGATTTGAAGGAAGCTTATGAAGTTGTCTTCGAGTCC
CGGAAGTACGCGCGGCTCCGTAGTATCGACGACAACTTCGCGGCCCTAACGTG6CCAAGGTCTTGGGACCCG
CCTGCGACAGGCGAAGTTTGAGTACGCTATCAGAATTCCTGCTGCGATGGATCCTACAGCGACTCGCATCCCG
GCGCACATATATAGCCAGCCTCACCATTACCATTACCATTGAGCGGCGCG

>Trave|56280 = GSTO-2S

CATATGCCTTGCACCGAGCAGATCACCTTGTATACGACCACGTTCTCGCCGTACGGCCATCGGGCGCATATTGCT
CTCGAAGAGGCGGGCGCGGAGTACACCCTCTGCCAAATAAACGTCCATCGCGACAAGCCGGAATGGTACAAGCGT
GTCAATCCGCTCGGAAAGGTCCCCGCCATCACTTTTCGGAGGTCCACAGGTCCCGCCGACGAGCCCTCCCCGGAG
TCCGAGAAGCTCGTAGAGTCACTCGCGCTGCTCGAGTTCTGTCGCCGACGTCTTCCAGAAAGCAAAGCTCCTCCCC
GCATCCCCCGTCCAGCGCGCCCCGCGCCCGCGCGTTTCATCGCCATCTACCAGAACTACCTGCACGACCAAGTTCGCG
GACGCGTTCTTCCGCGGAGAGCCGGTTCGGGCCCTTCTCCAGGCGCTCGAGACGCTGCAGAGCGCGCTGCCGCC
GCGGGATTTCGCGGTGGGCGAGTGGTTCGCTCGCGGAGGCGGCGGTTCGCGCCGTTCTCGCGCGCATGATGTTGTAT
CTTGACGCGGGGCTGGGAAGTACAGCGAGGCGGACGGGGAGACCATGCGGGCGGCGCTGGCGAGCGAGCGGTTT
GCGCGCATTAGTCAGTATGTGCGGGATATACGTGCGCGCGCGAGTTTCGTGAAGTCGTGGGGCGGGGATGATGTG
CAACTCGAGGCGGCGAAGGCTATCCCGATGCTGCGACGACCGGCGCACCATCACCATCACCATTGAGCGGCCGC

>Trave|48691 = GSTO-3S

CATATGTCTTCTACCAAACAGATCACCTCTACACAGCCACGTTCTCCCCGTATGCCACAGGGTTTGAATTGCC
CTCGAGGAAGCAGGTGCGGAGTACACCACCTATGATGTAGACATCCTGCGGAACATGCCGGAAGTGGTTCCCTCTA
GTCAACCCGCTCAAGAAGATCCCTGCGATGACCTTCGGCGGACCAGAGGTGCCTCCCGACCAAGCTCCTCCCC
TCTGCGAAGATCGCCGAGTTCGCTCGCCATGCTCGAGTTTCATCGCCGACCTCTTCCCGATGCCAAGCTCCTCCCC
ACAGACCCTGTCTCCGCGCCCCGCGCCCGCACCTTCATGGCGCTCTACGAGAACTACGTGAACGGCCAGTTTCAGG
GACGTGTGGTTCTTCGCGACCCCCGCGGACCCCCCTCTGCAGGCGCTCGAGATGCTCCAGGGCGCGTTACCCCC
GATGGGGGATTTCGCCGCTGGGGAGTGGTCCATCGCGGACGCGGCGGTTCATCCCATTCCTCGCGCGCATGTTCCCG
TACCTGGAGGCGGGACTTGGGCTGTACAGCAAGGAAGATGGGGTGAAGATGCGCAAGGCGATGGCGAGCGAGCGG
TTTGCGCGCATTCGCCAGTACGTGCGGGACTGCCGCGCTCGTCCGAGCTTTGCGAACACCTGGGCTGGTGATGCT
GAGCAAGTCGAGGCGAGCAAGACGTTCCGATGCTGCGGGTAGGGGAGCACCATCACCATCACCATTGAGCGGCC
GC

>Trave|65402 = GSTO-4S

CATATGGGCCCCACCGAGCAGTTGACGTTCTATACCGCCGCTACTCTCCGTACTCCCAGAGGGTGCACATCGCC
CTCGAGGAGGCGAGCGTAAAGTACACCATGTGGGAGTTTGAGACAGGGGTTCGGGCGAGTAAACCTGAGTGGTAC
TACCAGATCAATCCCTTGGGAAGATCCCCGCACTTACCTTCGGAGGACCCGAAGTGCCGCCAGACCAAGCCCTCT
CCCGAGTCCGCGAAGCTCGCGAGTTCGATGGCGATCCTCGAGTTCTTCGCCGACATCTTCCCGACGCGCCCTC
CTGCCGCGAGACCCGCTCCTCCGCGCCAAGGCGCGCACCTTCACCGAGATCTTCCGCAACTACGTCTCCGACGAG
TTCCGCGGCGCCTTCTTCTCGGCAAGCCCGTTCGAGGCGCTCTGCAGGCGCTCGAGAAGCTGCAGGCCGCGCTG
CCTCAGACTGGCTTTGCCGCGGGCGAATGGTTCGATCGCGGAGGCGCGGTTCGCGCCATTTCATCAGCGCCTCTTC
CTCTTTGTGCGCGTAGGCCTTGGGTCGTACACGAGGAGAACTGGTGTATGCTGCGGGATGCATTGGAGGGCGAG
CGGTTTCGCGCGTATCAGGAAGTACGTGCAGGACATTACAGAGCGGCCAAGTTTCAAGAAGACGTGGGGCGACGAC
GCCAGGCAAGTCGAATCTGGAAGAATCATCCGGGTCTCCGCCGAGAGCTGAGCCGATTGCGCAGCCGCCGCGC
CACCATCACCATCACCATTGAGCGGCCGC

>Trave|54358 = GSTO-5S

CATATGTTTCAGCCCGGCCAGATCACCTTCTACACTCATGTGTACTCTCCTTACTGTACCCGTGTCCATATCGCC
CTCGAGGAGGCCAAGGCCGAATATACCCCTGCAGCGTCAACCTCATGGACAGGCCCTCCCTGGTATAAACACCAAG
GTGAACCCTGCCGGAAGATCCCCGCCATCACCTACGGCGGCCCCAAGCATGCCCGGAGGACCCCTCCCCGGAG
GCCGCGAAGATCAACGAGTCGACCGTCATCCTCGAGTTCTCGCGGACATCTTCCCGAAGCGAAGCTGCTCCCC
GCCGACCCCGTGCAGCGTTCGCGAGGCGCGCCTCGTGATCGCCACCTGGGAGGCGAAGGGCTTCGAGGGCTTCAAG
GACTTCTTCTTCATGTACGCGCAGGCCACGAGCCCGGAGAAGACACTCCTCGACGGGCTCGACGCGTTCCAGGCG
CGCCTCCCGGCTACTGGGTTTCGCGGTTCGGGAATGGTTCGAACGCGGACTCTGCTGTGGCCCCGTTCTTGCTTCGC
GCGGAGCTTCTGCTGAAGAACGACCTTGGGACGTACCCGGTTGGCGAAGGCAAGAGGTCTACGAGGTCTTGCGAG
GGCCCGGATTTCGCCGCGCTCAGGAAGTATCTCGAGGACGTCAAGGAACACCCGACCATTAAGACCACTTGGGAC
GAGGCTCTCAATTCGGCATTTCGAGCCAGAACCAGATGTTCAAGCGCGCCACCATCACCATCACCATTGAGCGC
GCCG

>Trave|23671 = GSTO-6S

CATATGTCTGCGCAGAAGAGAATCACACTCTACATGGCTTCGGCCTCGCCGTTCCCGCACCGTGTTCGGCTGGCT
TTAGAAGAGGCTCACGCTACATACGAGATGATACATATTTCCCTCGTAGACAAGCAAGACTGGTACCAGAAGAAA
GTCTACCCAGACCGCGCGCAGGTCCCCTACCTCATCTATGGCGGGCCCGAGCTGCACCCCGACGAGGCGCCCTCG
CCCGACGCCGCAAGATCCCCGAATCGCTCGTCATCCTCGAGTTCTTCGCCGACCTCTTCCCGCCGCGCACCTC
CTCCCTCCGACCCCGTGTCTCCGCGCCCGCGCACGCTCTTACCACCGCCGTCGAGACCGAGCTGCTCCCGCG
CAAAAGGCGTTCTTCTCATGGGTGGGCCCCCGGACGCCATGCTCGCCGCGCTCGACGCGCTCCAGGCGCGGCTC
CCGCCGCGGGCGGCTTCGCGGGCGGGCCCGAGTGGTTCGATCGCGGACGCCGCGGTGATGCCCATCTGTCTCCGC
CTGCGCATGTCCGTACGCTCGAGGTTCGGGTTCTTCGCGCCCGGGGCGCGCCGGTGGTGCGCGCCGCGCTCGAG
TCGCCGCGGTTTCGCGCGTCTGCAGCGGTACATTGCGGACAATGTTGCGCGCCCGAGCATGGCGGCGACGTGGGAC
GAGGCTGCTGTCAAGGCAGAGTTTGTGGGGCGCTTCGAGAAGTTACGCAGCTTGAAGGCTGCCAGCACCATCAC
CATCACCATTGAGCGGCCGC

>Travel|71758 = GSTO-7S

CATATGCCCCCTGTGGAACAGATCACCTCTACACCTCCACGTA CTCTCCATTCTCCCAGAGGGTGCATATTGCC
CTCGAAGAGGCGAAAGCCAAATACAACGTATGGGAGTTCGAAACCAAAGGTC CCGGACGCAAGCCGGAGTGGTAC
TACCAGATCAACACGTTGGCCAAGATCCCCGCAATCACTGTTGGGGGACCCGAAGTACCACCCGACCAACCCCTCG
CCTGAGTCCGCAAACTCGCAGAGTCGATGGTGATCCTCGAGTTTCTCGCCGAACCTCTTCCCCGACGCGCCCTC
CTGCCCCGCGGACCCCTTTCTCCGCGCCAAGGCCCGCACGTTTCGTGAGATCTACCGTAATTATGTCTCGAGCGAG
TATCTCGGCGCGTTCTTCTCGGGAAGCCTATCGAGGGCGTCCTGAAGGCGCTTGAAACGCTGCAGGCCGCGCTC
CCGCCAGACGGCGGTTTCGCCGACGGCAGTGGTGATCGCAGAAGCCGCGGTGGCGCCATTATCGCCCCGCTC
TTCCTCTTTTCTCGCGTCGGGCTTGGGTGATACACCGAGGAGCAGGGACAGACGCTGCGGGACACGCTGGCGAGC
CCGAGGTTTCGCTCGGCTCACGCACTGGGTGAAAGACGTACACGAGCCGCCAGCTTCCAGAAGACGTGGGTTAGC
GATGACCGCCAAGTGGAAGTGTGGAAGAATCATCCCGGCTTCCGTGCAAGGTTGTTGAGCCCACTCAGCCG**CAC**
GCGCACCATACCATACCATTGAGCGGCCGC

>Travel|73942 = GHR-1

CATATGGACGCCACACGCGACGTACCCACCTACCGACATCAGCAAGGGCCTCGCGGAGGCGGACGGCTCGTTT
AAGCGCAAAGCGTCGACCTTCCGCGAGTTTCATCGAGAAGGGCGGCGAGTTCGAGCCTGAGAAAGGCCGGTACCAT
CTCTACGTGCGTATTCTGCCCCGTGGGCGACGCGAACTCTGATCGTGCGGAAGATTAAGGGCCTCGAAGAGATC
GTAGGGGTACCATCGTGTCTCCGCTGTTTCAGCGCGCATGGGTGGCCGTTTCGGGGACGTTCTCGCCCTTCCCTGGT
GCCGAAGCCGACCCCTTCTACAACGCCAGTACGTACGGGATCTGTATCTCCGCGCGGACCCCAAATACGAGGGC
CGCTTACCCTGCTCTGGGATAAGAAGACGGAGACGGTGGTGAACAACGAGAGCTCGGAGATCATCCGC
ATCTTCAACACCGCCTTCAACGAGTTCTGCCCCGACGACAAAGCTGCGATCCACCTCTACCCGGAGGCTCTCAAG
AGTGAGATCGACGAGATTAACGAGTGGGTGTACGATACCGTGAACAATGGTGTATACAAGGCCGGGTTTGCGACG
ACTCAGCAGGCGTACGAAGCGGCGGTTCATCCCGCTCTTCGAGTCGCTCGACCGCCTCGAGAAGATTCTCACTGGC
AAGGATTACCTGGTCGGAGATCAGCTTACCAGGCGACGTCGGCTCTTCGTGACGATCATACGTTTCGATCCG
GCGTACGTGCGACACTTCAAGTGCAACCTTCGCACTATCCGCGACGGGTACCCTGCGATCCACCTATGGTCCGC
AAGCTGTACTGGAACAACCTCGGCATTCTCGGAGACGTGCAAGTTTGACCATATCAAGGCGAGCTATTACGCGCAG
AAGAATGTCAACCCTACCCTGGTTGTCCCTTTGGGTCCCATCCCGAACATCTTGCCCTTTG**CACCATACCATCAC**
CATTGAGCGGCCGC

>Travel|66368 = GHR-2

CATATGAGCTCTACTACGCGGACGTCTCGCACTTGTCGACATCTCCAAGAGCATCTCTGAGCCAGACGGCTCG
TTCAACCGCAAGCCCTCCGTGTTTCAGGAACCTTCGTGAAAAAGGGCGGCGCTTCGCGCCCGAGAAGGGCCGGTAC
CACCTCTATGTGTCTACGCATGCCCTGGGCGACGCGCACGCTCATCGTGCGCAAGATCAAGGGCCTCGAGGAG
TTCATAGACGTTAGCGTCGTCTCGCCGCGCATGGGCGCGCACGGCTGGCCGTTTGCGAACGTCGACGCGTTCCCC
GGCGCCGACGCGGACCCCTCTTCGGCGCGGAGCACGTCAAAGATTTGTACATGCGCGTGAACCCCGACTACGAG
GGCCGCTTCACGTTTCTATCTCTGGGACAAGAAGACCTCGGCGATCGTGAACAACGAGAGCTCGGAGATCATC
CGGATGTTCAACACCGCGTTCAATGACCAGTCCCTCGGACAAGGCCGCGATCGACCTCTACCCGGAGGCGCTC
CGCGGGGAGATCGACGGGATTAACGAGTGGGTGTACGACACCGTCAACAACGGCGTGTACAAGTCCGGCTTCGCG
ACATCACAGAAGGCATACGAGGCCGCGGTGTCCTCCCTGTTTCGAGTCGCTCGACCGGCTCGAGAAGATCCTCACT
GGCAAGGACTACCTCGTCGGCGACAGCTCACAGAGGCGAGATATTGCGCTCTTTGTGACCATCGTGCGCTTCGAC
CCCGTCTACGTGCGCCACTTCAAGTGCAACATCCGCACCATCCGCGATGGCTACCCTGCGATTGACCTGTGGATG
CGGAAGCTGTACTGGAACAACCTCCGCGTTCTCGTCGACGTGCAACTTTGAGCACATCAAGACGCATTACTACTGG
TCGCATCCCCAGATTAACCCGCACCGCGTCTGCCCCGTGGGCCCGATCCCGAACATTCTTCTCTG**CACCATCAC**
CATCACCATTAGCGGCCGC

>Travel|50990 = GHR-3

CATATGAGTTCTACTCGCGACGTCTCGCACTTGACCGACATCACCAAGCGCCCTCTGGAGCCGGATGGCACGTTT
AAGCGGCGCCCTACGTGTTTCAGGGACTTCATCCAGAAGGGCGGCAAGTTCGAGCCCGAGAAAGGCCGTTACCAC
CTCTACGTTTCTACGCGTGTCCCTGGGCTACTCGCGCGCTCATCGTCCGCAAACTGAAGGGTCTCGAAGACTTC
ATCGGCGTCAGCGTCGTGTCCCCGAGATGGGCGCGAAGGGCTGGCCGTTTCGCGAGCGCGGATGCATACCCCGGG
GCCGACCTGGACCCGCTGTACGATGTCAAGCACGTACGCGATCTCTACCTGCGCGCGAAGCCGGATTATGACGGC
CGCGTGCCACTTCTTTGGGATAAGAAGACTGCGACAATTATGAACAACGAGAGTTTCGGAGATTATCCGGATGTTT
AACAGCGCGTTTCGACGACAGCTTCCCGCCGACAAGGCAGCGGTCGACTTGATCCGGAGGCGCTCCGCAAGGAG
ATTGACGAGATCAACGAGTGGGTCTACGACACCGTCAACAACGGCGTGTACAAGTCTGGGTTTCGCGACATCGCAG
ACGGCGTACGAGGCGCGGTGGTGCCGCTCTTCGAATCGCTCGACGACTCGAGAAGATCCTTACCAGAAAGGAT
TACCTGGTGGGCGATCGTTGACGGAGGCGGATATTCGTCTCTTCGTGACCATTTGTGCGCTTTGACCCCGTATAT
GTCGGGCACTTCAAAGGCAACATCCGAACCATCCGGGACGGGTACCCCGCCATTCACTTGTGGCTCCGCAAGCTG
TACTGGAATAACTCCGCACTTCTCGTCGACGTGCGACTTCGACCATATCAAGACGCATTACTATTGGTGCATCCT
AGCATCAACCCCCACCGTATCATCCCTGTGCGGCCCTATCCCGAACATCCTTCCGCTA**CACCATCACCATCACCAT**
TAAGCGGCCGC

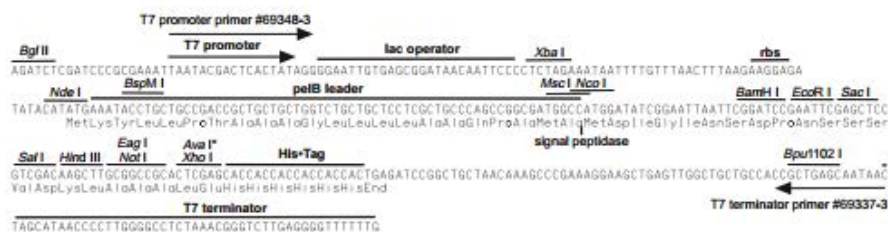
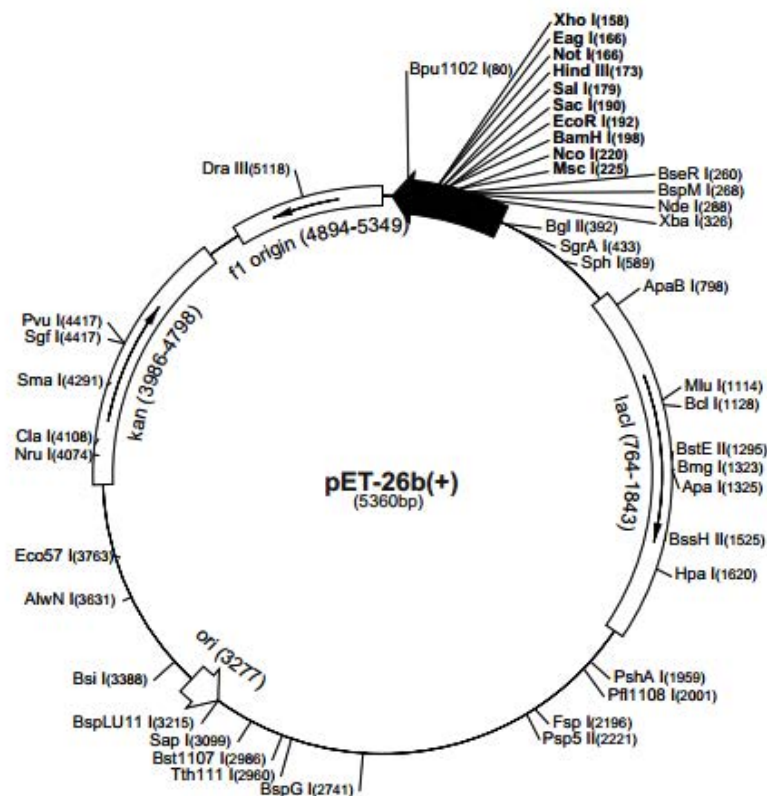
>Travel62807= Ure2p

[CATATG](#)TCGCACGGCAAGCAGTTCACCCCTTTACACCCACAACGGTGGCCCCAACGGCTGGAAGGTCGCGTTCGCG
CTCGAGGAGCTCGGCTTGACGTACGAGAGCAAGTACCTCGACTTCGCCAAGGGCGAGCAGAAGAGCGCGGAGCAC
ACCGCGCTGAACCCGAACGGGCGCATCCCGACGCTCGTGGACCACAAGAACAACGACTTCACGGTGTGGGAGTCG
AACGCGATCCTGCTCTACCTCGTCGACCGCTACGACCCGGAGCACAAGCTCAGCGTCACGGACGAGAAGGACAAG
TACGCGCTCCTGCAGTGGCTCTTCTTCCAGGCGTCCGGCCAGGGCCCGTACTTCGGCCAGGCGTTCTGGTTCTTG
AAGTACCATTTCGGAGAAGATCCCGAGCGCGTTGAGCGCTACCAGAACGAGGCGAAGCGCGTGTTACCGTGCTC
GACGGCGTGCTTGCGAAGCAGGGGTGGCTCGTCGGCGGCAAGCCCACGATCGCGGACATCTCGTTCATCACCTGG
AACC GCGCCGCGCATCTACGTATCTTCCAGGGCACAGACGTCAACCCCGAGAAGGACTTCCCCGCGGTCTGGAAG
TGGCAACAGGCACTCGAGGCGCGCCCGGCTGTGCGGAAGGTGCTCGCGATCCAGGCGGCCAGGCTAGGGCAG[GCG](#)
[GCCGC](#)

Annexe 2 : carte de restriction du plasmide pET26b

pET-26b(+) sequence landmarks

T7 promoter	361-377
T7 transcription start	360
<i>pelB</i> coding sequence	224-289
Multiple cloning sites (<i>Nco</i> I - <i>Xho</i> I)	158-225
His*Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	764-1843
pBR322 origin	3277
Kan coding sequence	3986-4798
<i>f1</i> origin	4894-5349



pET-26b(+) cloning/expression region

Annexe 3 : Tableau de conversion pour la précipitation de protéines au sulfate d'ammonium

% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C																	% saturation initiale en sulfate d'ammonium (à 0°C)
20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																	
106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697	0
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	5
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627	10
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	15
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	20
	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	25
		0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	30
			0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	35
				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	40
					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	45
						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	50
							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	55
								0	31	62	95	129	164	201	239	279	60
									0	31	63	97	132	168	205	244	65
										0	32	65	99	134	171	209	70
											0	32	66	101	137	174	75
												0	33	67	103	139	80
													0	34	68	105	85
														0	34	70	90
															0	35	95
																0	100

Annexe 4 : Protocoles de préparation de substrats glutathionylés

PAP-SG

Une solution de 2mmol de 2-bromo-4'phénylacétophénone est préparée dans 15ml d'éthanol ainsi qu'une solution de glutathion réduit (GSH) de 2mmol pH10 dans 10ml d'eau ultra pure. Les deux solutions sont mélangées et incubées 3H à température ambiante sous agitation. Le pH est ajusté à 3,5 avec de l'HCL puis le mélange est de nouveau incubé 1 nuit à 4°C. Le lendemain la solution précipitée est filtrée sur membrane de cellulose 0,2µm (Whatman®) puis lavée à l'eau ultra pure froide et séchée à 60°C. La poudre de PAP-SG obtenue d'une masse moléculaire de 501,6 est conservée à 4°C.

M-SG

Une solution mère de 20mM de ménadione est préparée dans 15ml d'éthanol ainsi qu'une solution de GSH de 20mM pH10 dans 10ml d'eau ultra pure. Deux tiers de la solution de ménadione et un tier de la solution de GSH sont mélangées et incubées 24H à 4°C. Le lendemain la solution précipitée est filtrée sur membrane de cellulose 0,2µm (Whatman®) puis lavée à l'eau ultra pure froide et séchée à 60°C. La poudre de M-SG obtenue d'une masse moléculaire de 477,5 est conservée à 4°C.

Annexe 5 : Séquence des différentes souches sélectionnées pour l'étude obtenues après amplification et séquençage des région ITS avec les amorces ITS1 (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) et ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC)

>Tv1219

TTTGACGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACCCCTGTGCACTTACTGT
AGGTTGGCGTGGGCTCCTTAACGGGAGCATTCTGCCGGCCTATGTATACTACAAACACTTTAAAGTATCAGAATG
TAAACGCGTCTAACGCATCTATAATACAACCTTTTAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGG
TATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATGGAATTCTCAACTTATAAATCCTTGTGATCTATAAGCTTGGAC
TTGGAGGCTTGCTGGCCCTTGCGGTGCGCTCCTCTTGAATGCATTAGCTCGATTCCGTACGGATCGGCTCTCAGT
GTGATAATTGTCTACGCTGTGACCGTGAAGTGTTTTGGCGAGCTTCTAACCGTCCATTAGGACAACTTTTAAACA
TCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCCG

>Tv110102

TTTGACGAGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCTCTGCTCATCCACTCTACCCCTGTGCACTTACTGT
AGGTTGGCGTGGGCTCCTTAACGGGAGCATTCTGCCGGCCTATGTATACTACAAACACTTTAAAGTATCAGAATG
TAAACGCGTCTAACGCATCTATAATACAACCTTTTAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGG
TATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATGGAATTCTCAACTTATAAATCCTTGTGATCTATAAGCTTGGAC
TTGGAGGCTTGCTGGCCCTTGTTGGTGGCTCCTCTTGAATGCATTAGCTCGATTCCGTACGGATCGGCTCTCAG
TGTGATAATTGTCTACGCTGTGACCGTGAAGTGTTTTGGCGAGCTTCTAACCGTCCATTAGGACAATTTTTTTTA
ACCTC

>Tv1532

TTTGACGGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACCCCTGTGCACTTACTGT
AGGTTGGCGTGGGCTCCTTAACGGGAGCATTCTGCCGGCCTATGTATACTACAAACACTTTAAAGTATCAGAATG
TAAACGCGTCTAACGCATCTATAATACAACCTTTTAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGG
TATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATGGAATTCTCAACTTATAAATCCTTGTGATCTATAAGCTTGGAC
TTGGAGGCTTGCTGGCCCTTGTTGGTGGCT

>Tv15544

TTTACGAGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCTCTGCTCATCCACTCTACCCCTGTGCACTTACTGTA
GGTTGGCGTGGGCTCCTTAACGGGAGCATTCTGCCGGCCTATGTATACTACAAACACTTTAAAGTATCAGAATGT
AAACGCGTCTAACGCATCTATAATACAACCTTTTAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGC
GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGT
ATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATGGAATTCTCAACTTATAAATCCTTGTGATCTATAAGCTTGGACT
TGGAGGCTTGCTGGCCCTCGTTGGTGGCTCCTCTTGAATGCATTAGCTCGATTCCGTACGGATCGGCTCTCAGT
GTGATAATTGTCTACGCTGTGACCGTGAAGTGTTTTGGCGAGCTTCTAACCGTCCATTAGGACAATTTTTTAACA
TCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAACTC

>Tv70

TTTGACGAGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCTCTGCTCATCCACTCTACCCCTGTGCACTTACTGT
AGGTTGGCGTGGGCTCCTTAACGGGAGCATTCTGCCGGCCTATGTATACTACAAACACTTTAAAGTATCAGAATG
TAAACGCGTCTAACGCATCTATAATACAACCTTTTAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGG
TATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATGGAATTCTCAACTTATAAATCCTTGTGATCTATAAGCTTGGAC
TTGGAGGCTTGCTGGCCCTTGCGGTGCGCTCCTCTTGAATGCATTAGCTCGATTCCGTACGGATCGGCTCTCAGT
GTGATAATTGTCTACGCTGTGACCGTGAAGTGTTTTGGCGAGCTTCTAACCGTCCATTAGGACAACTTTTTAACA
TCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAA

>Tv1218

TTTGAACGAGCTGTAGCTGGCTTCCGAGGATGTGCACGCTCTGCTCATCCACTCTACCCCTGTGCACTTACTGTA
GGTTGGCGTGGGCTCCTTAACGGGAGCATTCTGCCGGCCTATGTATACTACAAACACTTTAAAGTATCAGAATGT
AAACGCGTCTAACGCATCTATAATAACAACCTTTAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGC
GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGT
ATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGATGGAATTCTCAACTTATAAATCCTTGTGATCTATAAGCTTGGACT
TGGAGGCTTGTGCGCCCTTGTGGTCGGCTCCTCTTGAATGCATTAGCTCGATTCCGTACGGATCGGCTCTCAGT
GTGATAATTGTCTACGCTGTGACCGTGAAGTGTTTTGGCGAGCTTCTAACCGTCCATTAGGACAACTTTTTAACA
TCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCA

>Tv1252

TTTGACGAGGTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCCCTGCTCATCCACTCTACCCCTGTGCACTTACTGT
AGGTTGGCGTGGGCTCCTTAACGGGAGCATTCTGCCGGCCTATGTATACTACAAACACTTTAAAGTATCAGAATG
TAAACGCGTCTAACGCATCTATAATAACAACCTTTAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAG
CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGG
TATTCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGATGGAATTCTCAACTTATAAATCCTTGTGATCTATAAGCTTGGAC
TTGGAGGCTTGTGCGCCCTTGCCTCGGCTCCTCTTGAATGCATTAGCTCGATTCCGTACGGATCGGCTCTCAGT
GTGATAATTGTCTACGCTGTGACCGTGAAGTGTTTTGGCGAGCTTCTAACCGTCCATTAGGACAACTTTTTAACA
TCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAA

>Tv71

TTGACGAGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCTCTGCTCATCCACTCTACCCCTGTGCACTTACTGTA
GGTTGGCGTGGGCTCCTTAACGGGAGCATTCTGCCGGCCTATGTATACTACAAACACTTTAAAGTATCAGAATGT
AAACGCGTCTAACGCATCTATAATAACAACCTTTAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGC
GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGT
ATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGATGGAATTCTCAACTTATAAATCCTTGTGATCTATAAGCTTGGACT
TGGAGGCTTGTGCGCCCTCGTTGGTCGGCTCCTCTTGAATGCATTAACTCGATTCCGCACGGATCGGCTCTCAGT
GTGAGAATTGTCTACACTGTGACCGTGAAGTGTTTTGGCGAGCTTCTAACCGTCAATTAGGACAACTTTTTAACA
TCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTTCCATATCTTAACTAAGGAAAAAGGAAAAATTAACGAGT
TTTGAAACGAGTTGTAGCTGGCTTCCGAGGCATGTGCACGCTCTGCTCATCCACTCTACC

>Tv44889

TTGACGAGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCTCTGCTCATCCACTCTACCCCTGTGCACTTACTGTA
GGTTGGCGTGGGCTCCTTAACGGGAGCATTCTGCCGGCCTATGTATACTACAAACACTTTAAAGTATCAGAATGT
AAACGCGTCTAACGCATCTATAATAACAACCTTTAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGC
GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGT
ATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGATGGAATTCTCAACTTATAAATCCTTGTGATCTATAAGCTTGGACT
TGGAGGCTTGTGCGCCCTTGTGGTCGGCTCCTCTTGAATGCATTAGCTCGATTCCGCACGGATCGGCTCTCAGT
GTGAGAATTGTCTACACTGTGACCGTGAAGTGTTTTGGCGAGCTGCTAAACGTCAATTAGGACAACTTTTTAAAA
TCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTTTCATATCAATCACTAGGAGAAAAAGATCATTAACGAGT
TTTGAAACGAGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCTCTGCTCATCCACTCTACC

Annexe 6 : Tableau protéiques des différents secrétomes de *Trametes versicolor* obtenus sur chêne aubier après analyse LCMS/MS

ID protéique et numéro du gène	Nom des souches								
	Tv1218	Tv1219	Tv1532	Tv1252	Tv110102	Tv70	Tv71	Tv44889	Tv15544
igi Trave1 136431 e_gw1.15.102.1	1,00	11,00	8,00	1,00	18,00	26,00	1,00	35,00	30,00
igi Trave1 28848 fgenes1_kg.5_#_434_#_isotig03352	0,00	0,00	1,00	2,50	2,50	6,50	6,50	9,00	0,50
igi Trave1 43578 gm1.2462_g	0,40	3,60	3,40	0,40	8,00	4,80	1,20	8,20	6,00
igi Trave1 112163 e_gw1.1.1465.1	2,36	3,82	5,00	4,73	4,91	7,00	2,18	6,18	6,45
igi Trave1 43477 gm1.2361_g	0,08	1,50	2,42	0,83	2,67	3,75	0,83	4,17	3,00
igi Trave1 112835 e_gw1.2.1070.1	0,00	2,43	1,71	0,71	3,43	2,86	1,00	4,14	2,14
igi Trave1 30879 fgenes1_kg.10_#_131_#_isotig01075	2,00	3,00	2,00	5,00	3,00	6,00	3,00	4,00	4,00
igi Trave1 33056 fgenes1_pm.1_#_400	3,25	2,75	2,00	1,75	3,25	3,00	0,75	3,25	2,25
igi Trave1 37024 fgenes1_pm.5_#_453	1,27	2,54	1,31	0,88	1,69	2,77	1,04	3,12	2,00
igi Trave1 133731 e_gw1.12.519.1	0,00	1,33	1,33	1,00	2,33	4,17	1,00	2,83	2,00
igi Trave1 114944 e_gw1.2.1056.1	0,00	1,33	1,33	0,83	2,33	4,17	0,83	2,83	2,00
igi Trave1 52416 gm1.11300_g	0,40	0,80	1,80	1,00	1,70	0,80	0,90	2,70	1,50
igi Trave1 48870 gm1.7754_g	3,05	0,80	1,60	0,45	3,50	1,65	2,90	2,60	0,80
igi Trave1 52333 gm1.11217_g	0,00	1,50	1,50	1,17	2,50	4,50	0,67	2,50	1,67
igi Trave1 159926 estExt_Genewise1Plus.C_1_t70416	0,17	1,58	1,75	1,50	2,00	3,00	1,17	2,50	2,75
igi Trave1 63826 estExt_fgenes1_pg.C_4_t10147	5,67	2,00	2,08	3,25	2,25	2,50	1,58	2,42	2,33
igi Trave1 59914 estExt_fgenes1_pm.C_9_t10159	1,29	1,35	1,29	0,82	1,82	1,71	1,18	2,41	2,24
igi Trave1 52976 gm1.11860_g	0,00	1,33	2,33	0,83	3,17	1,33	1,33	2,33	2,67
igi Trave1 68175 estExt_Genemark1.C_1_t20147	0,75	1,00	1,25	1,00	2,50	1,00	1,25	2,25	2,00
igi Trave1 36998 fgenes1_pm.5_#_427	0,25	1,50	1,75	1,50	1,00	1,25	0,25	2,25	1,50
igi Trave1 141321 estExt_Genewise1.C_2_t20384	1,40	1,40	1,60	1,60	1,80	1,20	0,60	2,20	1,60
igi Trave1 73474 estExt_Genemark1.C_9_t10209	0,64	1,55	1,91	1,27	2,00	1,73	0,64	2,18	1,82
igi Trave1 109109 e_gw1.1.2102.1	0,28	1,44	0,89	0,39	3,11	2,22	0,67	2,17	2,39
igi Trave1 28335 fgenes1_kg.4_#_615_#_isotig10902	6,00	1,00	0,00	3,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
igi Trave1 125941 e_gw1.7.676.1	2,53	1,80	1,40	2,47	1,73	2,00	1,13	1,93	1,87
igi Trave1 124366 e_gw1.6.717.1	3,15	1,77	1,85	2,38	1,77	1,38	1,92	1,85	1,85
igi Trave1 37357 fgenes1_pm.6_#_209	1,57	1,57	1,29	1,00	1,57	1,00	1,86	1,71	1,86
igi Trave1 66957 estExt_fgenes1_pg.C_120133	1,29	1,14	1,43	0,86	1,14	1,29	0,71	1,71	1,57
igi Trave1 38102 fgenes1_pm.7_#_405	1,70	1,90	1,80	3,00	1,20	2,50	2,00	1,50	1,60
igi Trave1 168018 estExt_Genewise1Plus.C_6_t20304	2,50	0,75	1,00	0,75	0,75	0,00	0,25	1,50	1,00
igi Trave1 51004 gm1.9888_g	0,25	1,00	0,75	1,00	1,50	0,75	0,50	1,50	1,50
igi Trave1 131080 e_gw1.10.521.1	0,00	0,82	0,64	0,55	0,91	0,09	0,64	1,45	0,91
igi Trave1 130496 e_gw1.10.609.1	0,00	0,91	0,64	0,64	0,91	0,18	0,64	1,36	1,09
igi Trave1 118266 e_gw1.3.999.1	0,07	0,67	0,73	0,33	1,13	1,13	0,33	1,33	1,00
igi Trave1 168624 estExt_Genewise1Plus.C_6_t40123	0,44	1,22	1,00	0,89	1,11	1,00	0,56	1,33	1,56
igi Trave1 133420 e_gw1.12.444.1	1,00	1,33	1,33	1,33	1,00	1,33	1,00	1,33	1,00
igi Trave1 61229 estExt_fgenes1_pm.C_130277	0,23	0,54	0,31	1,31	0,77	0,38	0,69	1,31	1,23
igi Trave1 161823 estExt_Genewise1Plus.C_2_t50365	1,25	0,75	0,50	0,25	1,75	1,25	0,50	1,25	0,75
igi Trave1 75494 estExt_Genemark1.C_150200	0,94	1,00	0,39	1,00	1,17	1,39	1,11	1,22	1,17
igi Trave1 72935 estExt_Genemark1.C_8_t10021	0,60	0,80	1,20	1,00	0,80	0,60	0,60	1,20	1,20
igi Trave1 70662 estExt_Genemark1.C_4_t10231	1,17	0,67	1,33	1,50	2,00	2,17	1,17	1,17	2,50
igi Trave1 51455 gm1.10339_g	0,00	0,50	0,20	0,40	0,70	0,20	0,40	1,10	0,70
igi Trave1 159574 estExt_Genewise1Plus.C_1_t60393	1,10	0,80	0,90	1,80	1,60	1,40	1,10	1,10	1,10
igi Trave1 138138 estExt_Genewise1.C_1_t10292	0,82	1,00	0,91	1,09	2,18	2,64	0,91	1,09	1,73
igi Trave1 110860 e_gw1.1.2477.1	0,71	1,08	0,46	1,04	1,63	0,67	0,38	1,08	1,42
igi Trave1 51457 gm1.10341_g	0,00	0,58	0,25	0,50	0,67	0,25	0,42	1,00	0,50
igi Trave1 134226 e_gw1.12.502.1	0,20	0,40	0,30	0,00	0,80	0,30	0,30	1,00	0,70
igi Trave1 133918 e_gw1.12.575.1	0,00	0,29	0,43	0,14	0,71	1,86	0,29	1,00	0,29
igi Trave1 33948 fgenes1_pm.2_#_34	0,00	0,38	0,75	1,25	0,75	3,00	2,13	1,00	0,50
igi Trave1 112899 e_gw1.2.1846.1	0,92	0,75	0,83	0,92	1,08	0,92	0,58	1,00	0,58
igi Trave1 50621 gm1.9505_g	0,20	1,00	0,80	0,90	0,90	1,50	0,90	1,00	0,90
igi Trave1 125858 e_gw1.7.1123.1	0,00	0,31	0,77	0,31	0,69	0,92	0,08	1,00	0,85
igi Trave1 40186 fgenes1_pm.12_#_249	0,38	0,88	0,38	0,88	1,75	1,38	1,00	1,00	0,63
igi Trave1 67924 estExt_Genemark1.C_1_t10308	0,00	0,67	0,67	0,67	0,83	1,00	0,83	1,00	1,00
igi Trave1 29347 fgenes1_kg.7_#_4_#_isotig01747	1,20	0,00	0,00	1,00	1,00	0,60	0,00	1,00	1,00
igi Trave1 150608 estExt_Genewise1.C_7_t40230	2,00	0,25	0,75	0,50	0,25	0,50	0,50	1,00	0,25
igi Trave1 174721 estExt_Genewise1Plus.C_13_t10247	0,08	1,48	1,00	0,92	1,00	0,80	0,36	0,92	2,20
igi Trave1 39965 fgenes1_pm.12_#_28	0,25	1,08	0,75	1,08	2,08	2,08	0,92	0,92	1,58
igi Trave1 147958 estExt_Genewise1.C_5_t40227	0,78	0,74	0,74	1,00	1,00	1,48	0,78	0,91	1,13
igi Trave1 133326 e_gw1.12.644.1	0,00	0,22	0,56	0,22	0,78	1,67	0,33	0,89	0,44
igi Trave1 66045 estExt_fgenes1_pg.C_9_t10199	0,78	0,67	0,33	0,56	0,89	0,78	0,56	0,89	0,89
igi Trave1 174308 estExt_Genewise1Plus.C_12_t20231	0,44	1,38	0,63	0,19	0,94	1,69	0,56	0,88	0,75
igi Trave1 144865 estExt_Genewise1.C_3_t70105	0,40	0,53	0,60	0,60	0,67	1,80	0,73	0,87	0,67
igi Trave1 54963 estExt_fgenes1_pm.C_1_t10075	1,29	0,86	0,57	0,86	0,86	0,57	1,29	0,86	1,29
igi Trave1 166188 estExt_Genewise1Plus.C_4_t50484	1,77	0,54	0,46	0,92	1,00	0,62	1,00	0,85	0,85
igi Trave1 39070 fgenes1_pm.9_#_368	0,38	0,46	0,38	0,69	1,08	0,46	0,38	0,85	0,77
igi Trave1 75025 estExt_Genemark1.C_13_t10207	0,00	0,00	0,60	1,20	0,00	0,40	0,60	0,80	0,00
igi Trave1 72294 estExt_Genemark1.C_6_t20231	0,14	1,93	0,93	0,64	1,29	0,93	0,21	0,79	1,29
igi Trave1 116129 e_gw1.3.1154.1	0,21	0,64	0,29	0,57	0,64	0,50	0,43	0,79	0,86
igi Trave1 117805 e_gw1.3.1288.1	0,00	0,50	0,38	0,31	0,44	0,50	0,31	0,75	0,63
igi Trave1 26239 fgenes1_kg.2_#_49_#_isotig06902	0,50	1,00	0,00	0,25	0,50	0,00	1,00	0,75	0,25
igi Trave1 67879 estExt_Genemark1.C_1_t10245	0,14	0,71	0,33	0,71	1,00	0,86	0,33	0,71	1,00
igi Trave1 113847 e_gw1.2.1539.1	0,14	0,50	0,71	0,71	0,57	0,79	0,71	0,71	0,71
igi Trave1 69348 estExt_Genemark1.C_2_t20327	0,86	0,71	0,57	0,86	0,71	0,86	1,29	0,71	0,86
igi Trave1 129038 e_gw1.9.245.1	0,29	0,43	0,57	0,57	0,43	1,00	0,57	0,71	0,57
igi Trave1 45345 gm1.4229_g	0,00	0,60	0,40	0,20	0,80	0,60	0,30	0,70	0,90

igi Trave1 43576 gm1.2460_g	0,11	0,22	0,22	0,00	0,56	0,22	0,22	0,67	0,56
igi Trave1 31361 fgenes1_kg.11_#_234_#_isotig06870	3,67	0,67	0,67	1,67	0,67	0,33	1,00	0,67	0,67
igi Trave1 23498 fgenes1_pg.11_#_397	0,67	1,33	0,33	2,67	0,67	0,00	1,00	0,67	0,67
igi Trave1 25402 fgenes1_kg.1_#_223_#_isotig01416	1,00	0,33	0,17	1,00	0,67	0,83	1,00	0,67	0,67
igi Trave1 58222 estExt_fgenes1_pm.C_5_t10200	1,67	0,33	0,33	0,00	1,33	0,00	0,00	0,67	1,33
igi Trave1 43877 gm1.2761_g	0,33	0,67	0,00	0,67	0,67	0,33	0,67	0,67	0,33
igi Trave1 57337 estExt_fgenes1_pm.C_3_t20445	0,17	0,17	0,17	0,00	0,33	0,67	0,00	0,67	0,83
igi Trave1 56779 estExt_fgenes1_pm.C_3_t10267	0,00	0,00	0,00	1,33	0,33	0,00	0,67	0,67	0,00
igi Trave1 60477 estExt_fgenes1_pm.C_100376	0,29	0,57	0,36	0,43	1,07	0,86	0,29	0,64	0,43
igi Trave1 120979 e_gw1.4.2579.1	0,77	0,31	0,31	0,54	0,77	0,77	1,08	0,62	0,46
igi Trave1 36519 fgenes1_pm.4_#_808	0,08	0,46	0,46	0,31	0,92	0,46	0,31	0,62	0,62
igi Trave1 134721 e_gw1.13.1089.1	2,60	1,00	0,40	0,60	1,20	1,20	1,00	0,60	1,80
igi Trave1 27303 fgenes1_kg.3_#_452_#_isotig06758	0,00	0,30	0,30	0,40	0,80	0,60	0,20	0,60	0,80
igi Trave1 42899 gm1.1783_g	0,00	0,60	0,60	0,80	1,20	1,00	0,40	0,60	1,20
igi Trave1 151848 estExt_Genewise1.C_9_t10184	1,00	0,60	0,40	0,40	0,80	0,60	0,40	0,60	0,40
igi Trave1 47351 gm1.6235_g	0,08	0,33	0,42	0,17	0,67	0,42	0,08	0,58	0,33
igi Trave1 115416 e_gw1.3.1132.1	0,42	0,25	0,00	0,25	0,42	0,25	0,17	0,58	0,50
igi Trave1 161547 estExt_Genewise1Plus.C_2_t40498	0,37	0,42	0,21	0,26	0,42	0,37	0,32	0,58	0,37
igi Trave1 130597 e_gw1.10.798.1	0,43	0,61	0,52	0,61	0,65	0,39	0,48	0,57	0,65
igi Trave1 49304 gm1.8188_g	0,13	0,59	0,28	0,47	0,69	0,69	0,06	0,56	0,59
igi Trave1 118183 e_gw1.3.1061.1	0,89	0,00	0,00	1,00	0,22	0,33	0,67	0,56	0,44
igi Trave1 41392 gm1.276_g	0,14	0,45	0,09	0,23	0,45	0,50	0,09	0,55	0,64
igi Trave1 48950 gm1.7834_g	0,00	0,09	0,27	0,36	0,45	0,18	0,36	0,55	0,36
igi Trave1 135882 e_gw1.14.38.1	0,00	0,15	0,15	0,38	0,23	0,54	0,08	0,54	0,31
igi Trave1 75316 estExt_Genemark1.C_140165	0,40	0,40	0,24	0,28	0,36	0,32	0,12	0,52	0,48
igi Trave1 48030 gm1.6914_g	0,14	0,57	0,57	0,50	1,00	0,86	0,21	0,50	0,43
igi Trave1 114132 e_gw1.2.351.1	0,50	0,25	0,25	0,50	0,75	0,83	0,75	0,50	0,75
igi Trave1 40812 fgenes1_pm.15_#_59	0,20	0,40	0,20	0,10	0,70	0,60	0,40	0,50	0,30
igi Trave1 62730 estExt_fgenes1_pg.C_2_t10361	1,25	0,00	0,00	1,00	0,50	0,25	1,50	0,50	0,50
igi Trave1 39742 fgenes1_pm.11_#_121	1,50	0,75	0,50	1,25	1,00	0,75	0,00	0,50	0,75
igi Trave1 143379 estExt_Genewise1.C_3_t20476	3,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
igi Trave1 112170 e_gw1.1.1491.1	0,00	0,17	0,33	0,83	0,50	0,00	0,33	0,50	0,00
igi Trave1 24113 fgenes1_pg.13_#_104	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,00	0,50	1,00
igi Trave1 129575 e_gw1.9.943.1	0,00	0,24	0,21	0,21	0,17	0,28	0,03	0,48	0,59
igi Trave1 48874 gm1.7758_g	0,18	1,12	0,35	0,24	1,41	0,71	0,47	0,47	0,47
igi Trave1 48717 gm1.7601_g	0,31	0,38	0,38	0,46	0,31	0,31	0,85	0,46	0,46
igi Trave1 122574 e_gw1.5.622.1	0,62	0,31	0,23	0,31	0,54	0,38	0,38	0,46	0,46
igi Trave1 34683 fgenes1_pm.2_#_769	0,09	0,27	0,27	0,55	0,27	0,82	0,18	0,45	0,27
igi Trave1 26555 fgenes1_kg.2_#_365_#_isotig06618	0,18	0,09	0,18	0,00	0,27	0,64	0,18	0,45	0,36
igi Trave1 43566 gm1.2450_g	0,00	0,44	0,50	0,00	0,63	1,31	0,25	0,44	0,69
igi Trave1 51375 gm1.10259_g	0,00	0,29	0,14	0,14	0,29	0,00	0,71	0,43	0,29
igi Trave1 134657 e_gw1.13.390.1	0,14	0,29	0,29	0,29	0,57	1,71	0,57	0,43	0,29
igi Trave1 46975 gm1.5859_g	1,43	0,29	0,29	0,71	0,57	0,43	0,71	0,43	0,71
igi Trave1 131501 e_gw1.10.272.1	0,47	0,26	0,32	0,79	0,79	1,00	0,79	0,42	0,53
igi Trave1 55703 estExt_fgenes1_pm.C_1_t20467	0,26	0,21	0,21	0,11	0,37	0,21	0,16	0,42	0,32
igi Trave1 132011 e_gw1.11.1579.1	0,18	0,59	0,18	0,53	0,71	0,71	0,29	0,41	0,71
igi Trave1 47993 gm1.6877_g	0,07	0,73	0,47	0,47	0,60	0,80	0,07	0,40	0,47
igi Trave1 175022 estExt_Genewise1Plus.C_13_t20247	0,07	0,33	0,33	0,27	0,47	0,33	0,27	0,40	0,47
igi Trave1 145953 estExt_Genewise1.C_4_t30357	1,10	0,70	0,60	0,10	0,70	0,90	0,40	0,40	0,40
igi Trave1 68341 estExt_Genemark1.C_1_t20348	0,50	0,30	0,40	0,80	0,70	0,90	0,50	0,40	0,90
igi Trave1 30524 fgenes1_kg.9_#_230_#_isotig05488	1,10	0,50	0,40	1,10	0,50	0,00	0,70	0,40	0,20
igi Trave1 61724 estExt_fgenes1_pg.C_1_t10096	0,00	0,27	0,07	0,07	0,27	0,60	0,00	0,40	0,33
igi Trave1 74031 estExt_Genemark1.C_10_t10443	0,20	0,30	0,10	0,00	0,40	0,20	0,20	0,40	0,10
igi Trave1 68557 estExt_Genemark1.C_1_t30140	0,33	0,48	0,38	0,29	0,29	0,29	0,00	0,38	0,24
igi Trave1 35444 fgenes1_pm.3_#_734	0,68	0,16	0,26	0,11	0,26	0,00	0,21	0,37	0,26
igi Trave1 126828 e_gw1.7.1253.1	0,00	0,29	0,14	0,50	0,29	0,29	0,00	0,36	0,29
igi Trave1 40820 fgenes1_pm.15_#_67	0,39	0,56	0,44	0,44	0,78	0,67	0,39	0,33	0,61
igi Trave1 138261 estExt_Genewise1.C_1_t20010	1,33	0,22	0,11	0,56	0,44	0,89	0,78	0,33	0,44
igi Trave1 37188 fgenes1_pm.6_#_40	0,58	0,42	0,50	1,00	0,33	1,42	0,92	0,33	0,00
igi Trave1 39578 fgenes1_pm.10_#_363	0,00	0,33	0,33	0,29	0,43	0,38	0,33	0,33	0,43
igi Trave1 70471 estExt_Genemark1.C_3_t30242	0,15	0,22	0,15	0,19	0,33	0,30	0,07	0,33	0,30
igi Trave1 32323 fgenes1_kg.16_#_106_#_isotig03621	1,00	0,33	0,33	0,33	1,67	1,33	1,00	0,33	0,33
igi Trave1 62247 estExt_fgenes1_pg.C_1_t20248	0,33	0,17	0,33	0,17	0,33	0,17	0,00	0,33	0,17
igi Trave1 56791 estExt_fgenes1_pm.C_3_t10281	0,00	0,33	0,00	0,67	0,00	1,00	0,00	0,33	1,00
igi Trave1 127701 e_gw1.8.1775.1	0,00	0,00	0,33	0,67	0,67	0,67	0,00	0,33	0,33
igi Trave1 141168 estExt_Genewise1.C_2_t20063	0,00	0,44	0,31	0,38	0,31	0,25	0,19	0,31	0,50
igi Trave1 110790 e_gw1.1.1440.1	3,83	0,39	0,26	1,00	0,22	0,22	0,83	0,30	0,26
igi Trave1 143650 estExt_Genewise1.C_3_t30348	0,70	0,30	0,20	0,10	0,40	0,30	0,00	0,30	0,40
igi Trave1 133552 e_gw1.12.147.1	0,06	0,35	0,06	0,00	0,24	0,24	0,12	0,29	0,41
igi Trave1 174508 estExt_Genewise1Plus.C_12_t30127	0,41	0,24	0,12	0,24	0,35	0,24	0,29	0,29	0,24
igi Trave1 35683 fgenes1_pm.3_#_973	0,21	0,21	0,29	0,21	0,14	0,64	0,21	0,29	0,14
igi Trave1 162601 estExt_Genewise1Plus.C_3_t20245	1,57	0,43	0,43	0,71	0,14	0,00	0,43	0,29	0,14
igi Trave1 51497 gm1.10381_g	0,18	0,27	0,24	0,21	0,45	0,33	0,15	0,27	0,27
igi Trave1 51358 gm1.10242_g	0,00	0,27	0,27	0,09	0,00	0,27	0,00	0,27	0,27
igi Trave1 140830 estExt_Genewise1.C_1_t90040	0,38	0,00	0,08	0,19	0,15	0,46	0,31	0,27	0,31
igi Trave1 147020 estExt_Genewise1.C_5_t10234	0,33	0,27	0,40	1,13	0,67	0,60	0,67	0,27	0,60
igi Trave1 47228 gm1.6112_g	0,00	0,00	0,02	0,09	0,09	0,20	0,16	0,27	0,02
igi Trave1 111754 e_gw1.1.4181.1	0,37	0,26	0,37	0,42	0,32	0,11	0,37	0,26	0,32

igi Trave1 47232 gm1.6116_g	0,13	0,00	0,00	0,25	2,13	0,13	0,63	0,25	0,38
igi Trave1 40281 fgenes1_pm.13_#_9	0,25	0,00	0,25	0,25	0,50	0,50	0,25	0,25	1,00
igi Trave1 32193 fgenes1_kg.15_#_35_#_isotig06120	0,13	0,13	0,13	0,13	0,38	0,38	0,00	0,25	0,25
igi Trave1 145154 estExt_Genewise1.C_4_t10306	0,00	0,24	0,10	0,14	0,24	0,10	0,00	0,24	0,29
igi Trave1 72567 estExt_Genemark1.C_7_t10350	0,23	0,23	0,15	0,08	0,15	0,23	0,15	0,23	0,08
igi Trave1 154147 estExt_Genewise1.C_11_t20144	0,22	0,22	0,22	0,22	0,33	0,22	0,44	0,22	0,22
igi Trave1 74666 estExt_Genemark1.C_12_t10146	0,11	0,44	0,33	0,78	0,33	1,00	0,44	0,22	0,56
igi Trave1 27131 fgenes1_kg.3_#_280_#_isotig05719	0,43	0,29	0,07	0,36	0,21	0,21	0,21	0,21	0,14
igi Trave1 131837 e_gw1.11.1493.1	0,00	0,21	0,14	0,07	0,21	0,29	0,00	0,21	0,29
igi Trave1 52130 gm1.11014_g	0,40	0,20	0,20	1,20	0,20	0,00	0,60	0,20	0,20
igi Trave1 24492 fgenes1_pg.14_#_47	0,13	0,13	0,13	0,00	0,13	0,13	0,13	0,20	0,13
igi Trave1 104903 gw1.1.3860.1	0,60	0,00	0,00	1,40	0,60	0,60	1,20	0,20	0,20
igi Trave1 47480 gm1.6364_g	0,00	0,10	0,10	0,90	0,30	0,60	0,50	0,20	0,20
igi Trave1 70376 estExt_Genemark1.C_3_t30099	0,10	0,00	0,00	0,10	0,10	0,10	0,20	0,20	0,10
igi Trave1 60827 estExt_fgenes1_pm.C_120112	0,00	0,40	0,00	0,60	0,40	0,40	0,20	0,20	0,40
igi Trave1 165641 estExt_Genewise1Plus.C_4_t40235	0,00	0,00	0,20	0,20	0,20	0,40	0,20	0,20	0,20
igi Trave1 151588 estExt_Genewise1.C_8_t30469	0,33	0,48	0,14	0,48	0,19	0,38	0,43	0,19	0,19
igi Trave1 168678 estExt_Genewise1Plus.C_6_t40235	0,00	0,09	0,00	0,27	0,27	0,27	0,27	0,18	0,00
igi Trave1 54134 gm1.13018_g	0,36	4,55	1,00	0,73	2,27	0,45	0,09	0,18	2,73
igi Trave1 113984 e_gw1.2.1553.1	0,09	0,00	0,09	0,00	0,18	0,18	0,09	0,18	0,09
igi Trave1 144202 estExt_Genewise1.C_3_t50086	0,88	0,24	0,18	0,53	0,24	0,00	0,88	0,18	0,47
igi Trave1 68104 estExt_Genemark1.C_1_t20057	0,00	0,13	0,00	0,04	0,22	0,17	0,00	0,17	0,22
igi Trave1 175557 estExt_Genewise1Plus.C_14_t20039	0,17	0,00	0,00	0,17	0,06	0,22	0,11	0,17	0,11
igi Trave1 169734 estExt_Genewise1Plus.C_7_t30340	0,25	0,00	0,00	0,33	0,17	0,00	0,33	0,17	0,17
igi Trave1 125526 e_gw1.7.457.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	0,17	0,00	0,17	0,33
igi Trave1 151427 estExt_Genewise1.C_8_t30108	0,23	0,08	0,00	0,08	0,15	0,15	0,00	0,15	0,23
igi Trave1 170938 estExt_Genewise1Plus.C_8_t30423	0,52	0,26	0,15	0,56	0,15	0,59	0,63	0,15	0,33
igi Trave1 138540 estExt_Genewise1.C_1_t20386	0,14	0,00	0,00	0,43	0,14	0,00	0,21	0,14	0,14
igi Trave1 127754 e_gw1.8.467.1	0,71	0,14	0,00	0,29	0,00	0,14	0,57	0,14	0,00
igi Trave1 44509 gm1.3393_g	0,00	0,13	0,27	0,00	0,27	0,07	0,00	0,13	0,13
igi Trave1 135976 e_gw1.14.417.1	0,00	0,07	0,07	0,13	0,13	0,20	0,00	0,13	0,07
igi Trave1 127171 e_gw1.8.879.1	0,46	0,17	0,04	0,25	0,13	0,29	0,21	0,13	0,13
igi Trave1 175614 estExt_Genewise1Plus.C_14_t20113	0,63	0,25	0,13	0,25	0,25	0,13	0,38	0,13	0,00
igi Trave1 71601 estExt_Genemark1.C_5_t20032	0,00	0,06	0,00	0,13	0,06	0,06	0,06	0,13	0,13
igi Trave1 69742 estExt_Genemark1.C_3_t10234	0,35	0,00	0,18	0,18	0,06	0,12	0,41	0,12	0,06
igi Trave1 51451 gm1.10335_g	0,00	0,11	0,00	0,11	0,56	0,44	0,11	0,11	0,89
igi Trave1 60488 estExt_fgenes1_pm.C_100389	0,00	0,06	0,06	0,06	0,00	0,00	0,00	0,11	0,00
igi Trave1 172472 estExt_Genewise1Plus.C_10_t10367	1,32	0,16	0,05	0,05	0,16	0,11	0,37	0,11	0,05
igi Trave1 46679 gm1.5563_g	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	0,00	0,37	0,11	0,42
igi Trave1 115295 e_gw1.3.986.1	1,60	0,10	0,00	0,10	0,00	0,10	0,10	0,10	0,00
igi Trave1 42128 gm1.1012_g	0,20	0,00	0,00	0,10	0,00	0,10	0,20	0,10	0,30
igi Trave1 133452 e_gw1.12.1049.1	0,00	0,10	0,10	0,05	0,10	0,10	0,00	0,10	0,05
igi Trave1 28580 fgenes1_kg.5_#_166_#_isotig01255	0,91	0,27	0,09	0,27	0,18	0,09	0,18	0,09	0,27
igi Trave1 171861 estExt_Genewise1Plus.C_9_t30158	0,00	0,00	0,09	0,00	0,09	0,00	0,00	0,09	0,00
igi Trave1 69055 estExt_Genemark1.C_2_t10356	0,45	0,09	0,09	0,18	0,09	0,09	0,27	0,09	0,18
igi Trave1 160067 estExt_Genewise1Plus.C_1_t80156	0,12	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,18	0,09	0,06
igi Trave1 73047 estExt_Genemark1.C_8_t10202	0,11	0,06	0,06	0,03	0,06	0,09	0,03	0,09	0,11
igi Trave1 175476 estExt_Genewise1Plus.C_14_t10418	0,08	0,17	0,17	0,00	0,25	0,17	0,00	0,08	0,17
igi Trave1 146232 estExt_Genewise1.C_4_t40247	0,46	0,00	0,00	0,08	0,00	0,08	0,08	0,08	0,00
igi Trave1 148659 estExt_Genewise1.C_6_t20358	0,08	0,08	0,00	0,08	0,08	0,38	0,23	0,08	0,08
igi Trave1 68023 estExt_Genemark1.C_1_t10451	0,57	0,00	0,00	0,07	0,00	0,07	0,64	0,07	0,00
igi Trave1 164970 estExt_Genewise1Plus.C_4_t20342	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,57	0,00	0,07	0,00
igi Trave1 176097 estExt_Genewise1Plus.C_170004	0,28	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,22	0,06	0,06
igi Trave1 152398 estExt_Genewise1.C_9_t20486	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,60	0,05	0,00
igi Trave1 49760 gm1.8644_g	0,20	0,08	0,08	0,20	0,00	0,12	0,16	0,04	0,04
igi Trave1 154838 estExt_Genewise1.C_12_t20026	0,11	0,29	0,14	0,50	0,46	0,36	0,36	0,04	0,54
igi Trave1 58033 estExt_fgenes1_pm.C_4_t20333	1,15	0,00	0,00	0,26	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00
igi Trave1 144610 estExt_Genewise1.C_3_t60182	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,97	0,00	0,00
igi Trave1 47314 gm1.6198_g	0,12	0,06	0,06	0,29	0,06	0,29	0,18	0,00	0,00
igi Trave1 116268 e_gw1.3.2123.1	7,00	1,00	1,00	2,00	2,00	0,00	4,00	0,00	2,00
igi Trave1 56391 estExt_fgenes1_pm.C_2_t20087	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,53	0,00	0,00
igi Trave1 144893 estExt_Genewise1.C_3_t70138	0,93	0,07	0,00	0,57	0,00	0,00	0,14	0,00	0,14
igi Trave1 173225 estExt_Genewise1Plus.C_11_t10166	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,35	0,00	0,00
igi Trave1 156281 estExt_Genewise1.C_14_t10086	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00
igi Trave1 53846 gm1.12730_g	0,35	0,06	0,00	0,00	0,06	0,00	0,53	0,00	0,00
igi Trave1 174166 estExt_Genewise1Plus.C_12_t20028	0,41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	0,00	0,00
igi Trave1 68124 estExt_Genemark1.C_1_t20080	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,44	0,00	0,00
igi Trave1 141481 estExt_Genewise1.C_2_t30165	0,55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,18	0,00	0,00
igi Trave1 151784 estExt_Genewise1.C_9_t10108	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00
igi Trave1 110969 e_gw1.1.2278.1	0,24	0,00	0,00	0,06	0,00	0,12	0,12	0,00	0,18
igi Trave1 26150 fgenes1_kg.1_#_971_#_isotig00463	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39	0,00	0,00
igi Trave1 27783 fgenes1_kg.4_#_63_#_isotig00747	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,22	0,00	0,00
igi Trave1 170635 estExt_Genewise1Plus.C_8_t20346	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,00	0,00
igi Trave1 119097 e_gw1.4.411.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,24	0,00	0,00
igi Trave1 44897 gm1.3781_g	0,14	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 74595 estExt_Genemark1.C_12_t10028	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 141077 estExt_Genewise1.C_2_t10400	2,00	0,00	0,50	1,50	0,50	1,00	0,50	0,00	0,00
igi Trave1 64339 estExt_fgenes1_pg.C_5_t10057	0,00	1,00	0,67	0,67	1,33	0,67	1,00	0,00	1,00

igi Trave1 136429 e_gw1.15.80.1	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	10,50	0,00	0,00	0,50
igi Trave1 74079 estExt_Genemark1.C_10_t20059	0,25	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00
igi Trave1 45192 gm1.4076_g	1,25	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 27040 fgenesht1_kg.3_#_189_#_isotig03458	0,00	0,00	0,00	0,00	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 45058 gm1.3942_g	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	0,33	0,11	0,00	0,11
igi Trave1 28124 fgenesht1_kg.4_#_404_#_isotig03566	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,63	0,00	0,00
igi Trave1 103761 gw1.18.126.1	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 19288 fgenesht1_pg.4_#_488	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,29	0,00	0,00
igi Trave1 161508 estExt_Genewise1Plus.C_2_t40454	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00
igi Trave1 45289 gm1.4173_g	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 62807 estExt_fgenesht1_pg.C_2_t10480	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,00
igi Trave1 133945 e_gw1.12.36.1	0,38	0,00	0,00	0,08	0,15	0,00	0,31	0,00	0,00
igi Trave1 41806 gm1.690_g	0,00	0,00	0,00	0,30	0,40	0,40	0,50	0,00	0,00
igi Trave1 68145 estExt_Genemark1.C_1_t20110	0,50	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,13	0,00	0,13
igi Trave1 31823 fgenesht1_kg.13_#_82_#_isotig10799	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 138905 estExt_Genewise1.C_1_t30353	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 126658 e_gw1.7.252.1	0,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,18	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 42042 gm1.926_g	0,00	1,00	0,00	0,33	0,67	0,00	0,00	0,00	3,00
igi Trave1 157166 estExt_Genewise1.C_170104	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 69085 estExt_Genemark1.C_2_t10406	1,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,50	1,00	0,00	0,00
igi Trave1 156677 estExt_Genewise1.C_150137	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00
igi Trave1 158002 estExt_Genewise1Plus.C_1_t20352	0,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,27	0,00	0,00
igi Trave1 72991 estExt_Genemark1.C_8_t10130	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00
igi Trave1 146818 estExt_Genewise1.C_4_t60065	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00
igi Trave1 27714 fgenesht1_kg.3_#_863_#_isotig07051	0,75	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00
igi Trave1 175105 estExt_Genewise1Plus.C_13_t20389	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 30997 fgenesht1_kg.10_#_249_#_isotig11576	0,25	0,00	0,00	0,25	0,00	0,00	0,25	0,00	0,00
igi Trave1 173904 estExt_Genewise1Plus.C_12_t10152	0,69	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 42584 gm1.1468_g	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,22	0,00	0,11
igi Trave1 111924 e_gw1.1.4263.1	0,43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00	0,00
igi Trave1 69811 estExt_Genemark1.C_3_t10326	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00
igi Trave1 116333 e_gw1.3.1585.1	0,00	0,00	0,00	0,05	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 158931 estExt_Genewise1Plus.C_1_t50029	0,14	0,00	0,00	0,14	0,00	0,14	0,14	0,00	0,14
igi Trave1 53150 gm1.12034_g	0,00	0,00	0,00	0,00	7,00	1,00	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 30460 fgenesht1_kg.9_#_166_#_isotig06581	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 171442 estExt_Genewise1Plus.C_9_t20034	0,25	0,00	0,00	0,25	0,25	0,00	0,00	0,00	0,25
igi Trave1 57902 estExt_fgenesht1_pm.C_4_t20166	0,42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,17	0,00	0,00
igi Trave1 164045 estExt_Genewise1Plus.C_3_t60177	0,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 161949 estExt_Genewise1Plus.C_2_t60062	1,25	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00
igi Trave1 30435 fgenesht1_kg.9_#_141_#_isotig00819	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00
igi Trave1 130108 e_gw1.9.1262.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14
igi Trave1 126064 e_gw1.7.306.1	0,00	0,00	0,22	0,00	0,00	0,33	0,22	0,00	0,00
igi Trave1 46654 gm1.5538_g	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,50	0,50	0,00	1,00
igi Trave1 24301 fgenesht1_pg.13_#_292	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,44	0,00	0,00
igi Trave1 128133 e_gw1.8.988.1	0,00	0,00	0,14	0,29	0,43	0,29	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 61500 estExt_fgenesht1_pm.C_160091	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	0,00	0,00
igi Trave1 42264 gm1.1148_g	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39	0,00	0,00
igi Trave1 168111 estExt_Genewise1Plus.C_6_t20430	0,00	0,00	0,00	0,10	0,10	0,00	0,10	0,00	0,10
igi Trave1 121791 e_gw1.5.2133.1	0,22	0,00	0,00	0,00	0,11	0,00	0,33	0,00	0,00
igi Trave1 163607 estExt_Genewise1Plus.C_3_t50048	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,25	0,75	0,00	0,25
igi Trave1 52551 gm1.11435_g	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00
igi Trave1 52556 gm1.11440_g	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00
igi Trave1 18717 fgenesht1_pg.3_#_776	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,43	0,00	0,00
igi Trave1 47584 gm1.6468_g	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14	0,07	0,00	0,00	0,14
igi Trave1 170534 estExt_Genewise1Plus.C_8_t20222	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00
igi Trave1 166451 estExt_Genewise1Plus.C_5_t10275	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,11	0,22	0,00	0,00
igi Trave1 119513 e_gw1.4.1479.1	0,14	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00	0,00	0,00	0,14
igi Trave1 142126 estExt_Genewise1.C_2_t50082	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 171831 estExt_Genewise1Plus.C_9_t30082	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	0,00	0,00
igi Trave1 136662 e_gw1.16.103.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,00
igi Trave1 47923 gm1.6807_g	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00	0,57	0,00	0,14
igi Trave1 26323 fgenesht1_kg.2_#_133_#_isotig04234	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 40829 fgenesht1_pm.16_#_8	0,20	0,00	0,00	0,20	0,00	0,20	0,40	0,00	0,00
igi Trave1 74521 estExt_Genemark1.C_11_t20129	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,08
igi Trave1 110730 e_gw1.1.3283.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,53	0,00	0,00
igi Trave1 53143 gm1.12027_g	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 31449 fgenesht1_kg.12_#_18_#_isotig10537	0,00	0,00	0,00	0,67	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00
igi Trave1 25792 fgenesht1_kg.1_#_613_#_isotig08611	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,46	0,00	0,00
igi Trave1 117926 e_gw1.3.2466.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	0,00	0,00
igi Trave1 58816 estExt_fgenesht1_pm.C_6_t10374	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,29	0,00	0,00
igi Trave1 148125 estExt_Genewise1.C_6_t10018	0,36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,55	0,00	0,00
igi Trave1 169226 estExt_Genewise1Plus.C_7_t20172	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 41997 gm1.881_g	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,47	0,00	0,00
igi Trave1 144293 estExt_Genewise1.C_3_t50225	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00	0,00
igi Trave1 171840 estExt_Genewise1Plus.C_9_t30095	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00
igi Trave1 130016 e_gw1.9.688.1	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 138745 estExt_Genewise1.C_1_t30150	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,19	0,00	0,00
igi Trave1 31157 fgenesht1_kg.11_#_30_#_isotig04635	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00	0,00

igi Trave1 111649 e_gw1.1.599.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,27	0,00	0,00
igi Trave1 29435 fgenes1_kg.7_#_92_#_isotig09910	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 121678 e_gw1.5.1521.1	0,00	0,14	0,00	0,43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 75646 estExt_Genemark1.C_170034	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,17	0,00	0,00
igi Trave1 43337 gm1.2221_g	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00
igi Trave1 33707 fgenes1_pm.1_#_1051	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 110699 e_gw1.1.2529.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00	0,00
igi Trave1 55634 estExt_fgenes1_pm.C_1_t20391	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,11	0,00	0,00
igi Trave1 131096 e_gw1.10.355.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00	0,00
igi Trave1 59071 estExt_fgenes1_pm.C_7_t10148	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00
igi Trave1 113884 e_gw1.2.151.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	0,00	0,00
igi Trave1 162729 estExt_Genewise1Plus.C_3_t20390	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 56085 estExt_fgenes1_pm.C_2_t10207	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 144781 estExt_Genewise1.C_3_t60458	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,27	0,00	0,00
igi Trave1 91869 gw1.4.1328.1	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00
igi Trave1 37373 fgenes1_pm.6_#_225	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,25	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 131341 e_gw1.10.230.1	0,00	0,00	0,00	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 129640 e_gw1.9.870.1	0,00	0,00	0,00	0,14	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 31564 fgenes1_kg.12_#_133_#_isotig01259	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,23	0,00	0,00
igi Trave1 22021 fgenes1_pg.9_#_44	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,00
igi Trave1 60757 estExt_fgenes1_pm.C_120031	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	0,27	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 124955 e_gw1.7.312.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00
igi Trave1 170137 estExt_Genewise1Plus.C_8_t10036	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,21	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 110377 e_gw1.1.1709.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00
igi Trave1 70933 estExt_Genemark1.C_4_t20115	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00
igi Trave1 27130 fgenes1_kg.3_#_279_#_isotig00243	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00	0,00
igi Trave1 140767 estExt_Genewise1.C_1_t80470	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,40	0,00	0,00
igi Trave1 43358 gm1.2242_g	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,43	0,00	0,00
igi Trave1 116287 e_gw1.3.501.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00	0,00
igi Trave1 169073 estExt_Genewise1Plus.C_7_t10481	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 63130 estExt_fgenes1_pg.C_3_t10106	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,00	0,00
igi Trave1 55174 estExt_fgenes1_pm.C_1_t10330	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 127573 e_gw1.8.397.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,31	0,00	0,00
igi Trave1 73333 estExt_Genemark1.C_8_t20307	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00
igi Trave1 116906 e_gw1.3.205.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,00
igi Trave1 29283 fgenes1_kg.6_#_423_#_isotig04132	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00
igi Trave1 159946 estExt_Genewise1Plus.C_1_t70452	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00	0,00
igi Trave1 147827 estExt_Genewise1.C_5_t40020	0,40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 28406 fgenes1_kg.4_#_686_#_isotig06876	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,21	0,00	0,00
igi Trave1 43289 gm1.2173_g	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
igi Trave1 153507 estExt_Genewise1.C_10_t30033	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Annexe 7 : Tableau protéiques des différents secrétomes de *Trametes versicolor* obtenus sur hêtre après analyse LCMS/MS

ID protéique et numéro du gène	Nom des souches							
	TV1218	TV1219	TV1532	TV1252	TV110102	TV70	TV44889	TV15544
lgi Trave1 112163 e_gw1.1.1465.1	1,64	8,09	14,18	7,82	10,18	8,36	4,36	10,27
lgi Trave1 30879 fgenes1_kg.10_#_131_#_isotig01075	3,00	3,00	6,00	5,00	4,00	6,00	8,00	7,00
lgi Trave1 33056 fgenes1_pm.1_#_400	3,75	8,25	3,75	6,50	6,00	3,75	1,25	1,50
lgi Trave1 43578 gm1.2462_g	0,00	7,60	5,80	0,80	14,40	4,00	3,80	1,40
lgi Trave1 54134 gm1.13018_g	1,00	13,27	2,91	0,73	12,36	2,18	0,18	4,27
lgi Trave1 33948 fgenes1_pm.2_#_34	0,13	5,63	2,75	7,00	1,88	11,00	0,75	1,50
lgi Trave1 52976 gm1.11860_g	0,50	1,67	5,00	1,33	10,83	4,50	2,33	2,83
lgi Trave1 114944 e_gw1.2.1056.1	0,67	4,83	4,17	2,67	6,17	6,67	2,83	1,00
lgi Trave1 52333 gm1.11217_g	0,17	4,50	4,67	3,33	5,83	5,50	3,00	1,67
lgi Trave1 48870 gm1.7754_g	1,10	1,45	5,25	0,55	7,40	5,95	5,15	1,25
lgi Trave1 89076 gw1.3.1186.1	1,00	3,50	2,50	2,00	6,00	6,00	5,50	2,00
lgi Trave1 63826 estExt_fgenes1_pg.C_4_t10147	1,25	2,25	4,58	2,92	3,25	2,33	2,42	4,50
lgi Trave1 133731 e_gw1.12.519.1	0,67	4,33	4,17	2,50	6,17	5,83	2,83	1,00
lgi Trave1 38102 fgenes1_pm.7_#_405	2,10	4,00	3,80	5,00	2,90	4,30	0,90	2,50
lgi Trave1 141077 estExt_Genewise1.C_2_t10400	0,00	2,50	3,00	8,50	2,50	3,50	0,00	1,50
lgi Trave1 112899 e_gw1.2.1846.1	1,17	3,17	2,83	2,92	2,75	4,08	2,50	2,33
lgi Trave1 43477 gm1.2361_g	0,17	3,08	3,33	0,42	4,75	1,75	5,50	3,25
lgi Trave1 125941 e_gw1.7.676.1	0,40	2,73	3,40	3,87	3,33	2,73	1,13	2,67
lgi Trave1 112835 e_gw1.2.1070.1	0,00	3,71	2,86	1,14	5,71	3,86	2,29	1,57
lgi Trave1 43877 gm1.2761_g	0,67	3,33	2,00	5,67	1,67	5,67	0,33	1,33
lgi Trave1 109109 e_gw1.1.2102.1	0,67	1,72	3,33	0,61	3,78	2,44	4,11	3,72
lgi Trave1 37024 fgenes1_pm.5_#_453	0,65	2,04	2,42	1,04	1,96	2,81	5,15	3,12
lgi Trave1 159926 estExt_Genewise1Plus.C_1_t70416	0,33	0,33	3,33	0,42	1,25	1,42	6,50	6,08
lgi Trave1 138138 estExt_Genewise1.C_1_t10292	0,27	1,45	3,00	1,55	2,73	3,36	2,64	4,18
lgi Trave1 134721 e_gw1.13.1089.1	2,80	1,80	2,00	2,80	2,60	3,80	0,00	1,40
lgi Trave1 39965 fgenes1_pm.12_#_28	0,58	2,00	2,50	1,67	5,75	4,17	0,75	1,33
lgi Trave1 62730 estExt_fgenes1_pg.C_2_t10361	1,50	2,50	1,00	3,25	5,50	3,50	0,75	0,50
lgi Trave1 159574 estExt_Genewise1Plus.C_1_t60393	0,50	1,00	2,80	2,10	4,10	1,80	3,20	2,60
lgi Trave1 66957 estExt_fgenes1_pg.C_120133	0,71	1,57	3,29	2,43	3,29	1,71	1,00	2,14
lgi Trave1 150608 estExt_Genewise1.C_7_t40230	0,75	2,75	1,75	4,00	2,00	2,75	0,25	1,25
lgi Trave1 70662 estExt_Genemark1.C_4_t10231	1,17	1,00	3,50	3,50	1,50	3,00	0,67	2,33
lgi Trave1 68175 estExt_Genemark1.C_1_t20147	0,00	2,50	1,25	3,00	3,75	2,75	0,50	1,00
lgi Trave1 25402 fgenes1_kg.1_#_223_#_isotig01416	1,17	1,17	0,33	3,00	2,33	4,00	0,83	0,67
lgi Trave1 174721 estExt_Genewise1Plus.C_13_t10247	0,16	1,16	0,80	0,88	1,64	1,84	3,44	4,24
lgi Trave1 73474 estExt_Genemark1.C_9_t10209	0,00	0,55	1,36	0,27	1,36	1,00	4,36	4,91
lgi Trave1 36519 fgenes1_pm.4_#_808	0,54	1,62	1,54	0,54	3,23	4,00	0,92	0,85
lgi Trave1 161823 estExt_Genewise1Plus.C_2_t50365	0,25	1,50	1,00	1,00	2,50	2,25	1,75	1,75
lgi Trave1 134657 e_gw1.13.390.1	0,29	2,57	1,71	2,00	2,29	3,14	1,00	0,43
lgi Trave1 48874 gm1.7758_g	0,00	2,06	1,88	0,47	3,06	2,12	1,76	1,47
lgi Trave1 168624 estExt_Genewise1Plus.C_6_t40123	0,33	2,00	1,89	1,00	1,56	2,11	1,22	1,89
lgi Trave1 124366 e_gw1.6.717.1	0,62	1,08	1,92	3,31	0,92	1,15	0,77	1,15
lgi Trave1 110860 e_gw1.1.2477.1	0,04	0,88	1,25	0,75	2,25	0,83	2,92	2,46
lgi Trave1 141321 estExt_Genewise1.C_2_t20384	0,20	2,00	2,80	3,00	0,60	0,60	0,60	1,40
lgi Trave1 64339 estExt_fgenes1_pg.C_5_t10057	0,67	0,67	2,00	1,33	0,67	3,33	0,67	1,67
lgi Trave1 147958 estExt_Genewise1.C_5_t40227	0,74	1,26	1,78	2,22	0,48	2,91	0,57	1,09
lgi Trave1 133326 e_gw1.12.644.1	0,22	2,22	1,44	1,56	2,33	2,56	0,89	0,33
lgi Trave1 151848 estExt_Genewise1.C_9_t10184	0,40	1,60	1,60	1,40	2,60	1,00	0,00	0,40
lgi Trave1 69348 estExt_Genemark1.C_2_t20327	0,14	0,43	1,43	2,14	0,14	4,29	1,29	0,86
lgi Trave1 59914 estExt_fgenes1_pm.C_9_t10159	0,12	0,71	0,76	0,24	1,18	1,24	2,00	4,00
lgi Trave1 66045 estExt_fgenes1_pg.C_9_t10199	0,33	0,67	1,67	0,44	2,89	1,33	1,22	1,00
lgi Trave1 52416 gm1.11300_g	0,00	1,40	2,70	2,30	1,40	0,70	0,60	1,10
lgi Trave1 26239 fgenes1_kg.2_#_49_#_isotig06902	0,50	1,00	0,75	0,50	1,00	1,75	1,25	0,50
lgi Trave1 136431 e_gw1.15.102.1	1,00	3,00	2,00	0,00	3,00	1,00	0,00	0,00
lgi Trave1 37357 fgenes1_pm.6_#_209	0,43	0,43	1,14	0,86	1,43	0,57	2,14	2,00
lgi Trave1 29347 fgenes1_kg.7_#_4_#_isotig01747	0,60	0,40	1,00	1,60	0,80	1,80	0,40	1,20
lgi Trave1 72294 estExt_Genemark1.C_6_t20231	0,00	2,71	1,00	0,14	1,50	0,36	1,86	2,21
lgi Trave1 50621 gm1.9505_g	0,10	0,80	1,60	0,90	1,40	1,10	2,00	1,70
lgi Trave1 72935 estExt_Genemark1.C_8_t10021	0,20	2,00	2,00	1,40	0,60	0,80	0,60	0,20
lgi Trave1 133420 e_gw1.12.444.1	0,67	2,00	1,00	1,33	1,00	1,33	0,33	0,67
lgi Trave1 145953 estExt_Genewise1.C_4_t30357	0,10	1,20	1,90	0,50	1,30	1,50	0,70	1,10
lgi Trave1 118266 e_gw1.3.999.1	0,20	0,47	1,13	0,40	1,20	1,20	2,53	1,73
lgi Trave1 54963 estExt_fgenes1_pm.C_1_t10075	0,14	0,14	1,14	1,00	1,71	1,00	2,29	1,43
lgi Trave1 28848 fgenes1_kg.5_#_434_#_isotig03352	1,00	1,00	1,00	1,50	1,00	1,50	0,50	0,50
lgi Trave1 39742 fgenes1_pm.11_#_121	0,25	1,25	1,00	2,25	1,25	0,75	0,00	1,00
lgi Trave1 40186 fgenes1_pm.12_#_249	1,38	1,25	1,13	1,88	0,25	2,25	0,25	0,38
lgi Trave1 46975 gm1.5859_g	0,57	1,29	0,71	2,14	0,71	1,00	0,00	0,57
lgi Trave1 175022 estExt_Genewise1Plus.C_13_t20247	0,20	0,93	0,87	1,07	2,07	1,87	0,53	0,87
lgi Trave1 127701 e_gw1.8.1775.1	0,00	0,67	0,33	1,33	1,67	1,33	1,33	1,33

jgi Trave1 110790 e_gw1.1.1440.1	0,96	0,09	0,17	1,48	0,13	2,04	0,09	0,43
jgi Trave1 60477 estExt_fgenes1_pm.C_100376	0,29	1,21	0,93	0,21	0,93	1,50	2,07	1,14
jgi Trave1 147020 estExt_Genewise1.C_5_t10234	0,13	0,73	0,80	1,47	1,73	1,07	0,87	1,00
jgi Trave1 61229 estExt_fgenes1_pm.C_130277	0,08	0,46	0,38	0,85	0,69	1,38	0,85	2,77
jgi Trave1 75494 estExt_Genemark1.C_150200	0,00	0,28	0,17	0,33	0,89	0,78	1,22	4,44
jgi Trave1 136117 e_gw1.14.279.1	1,25	2,50	0,00	0,75	0,75	0,75	0,00	1,00
jgi Trave1 175614 estExt_Genewise1Plus.C_14_t20113	1,00	1,38	1,00	1,00	1,25	0,75	0,88	0,13
jgi Trave1 27303 fgenes1_kg_3_#_452_#_isotig06758	0,20	0,70	0,70	1,80	0,10	2,70	0,50	0,70
jgi Trave1 116129 e_gw1.3.1154.1	0,07	0,50	0,50	0,14	1,00	0,71	3,14	1,29
jgi Trave1 45345 gm1.4229_g	0,00	0,90	1,40	0,80	1,00	0,70	0,90	1,70
jgi Trave1 144865 estExt_Genewise1.C_3_t70105	0,13	0,53	1,00	0,40	0,67	1,20	2,07	1,13
jgi Trave1 125858 e_gw1.7.1123.1	0,00	1,38	1,46	1,00	0,92	0,15	0,92	1,23
jgi Trave1 56791 estExt_fgenes1_pm.C_3_t10281	0,00	1,00	1,33	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
jgi Trave1 51004 gm1.9888_g	0,00	2,00	0,00	3,25	0,25	0,75	0,00	0,50
jgi Trave1 116268 e_gw1.3.2123.1	3,00	1,00	0,00	1,00	0,00	2,00	0,00	0,00
jgi Trave1 62539 estExt_fgenes1_pg.C_2_t10059	7,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
jgi Trave1 58222 estExt_fgenes1_pm.C_5_t10200	0,33	1,33	1,00	0,33	1,33	0,33	0,00	0,67
jgi Trave1 131501 e_gw1.10.272.1	0,16	0,32	0,63	0,42	0,53	1,47	1,74	1,68
jgi Trave1 166188 estExt_Genewise1Plus.C_4_t50484	1,08	0,54	0,69	1,38	0,23	1,77	0,38	0,23
jgi Trave1 32323 fgenes1_kg_16_#_106_#_isotig03621	1,67	1,00	0,00	1,33	0,33	2,00	0,00	0,00
jgi Trave1 31361 fgenes1_kg_11_#_234_#_isotig06870	1,33	1,33	0,00	0,67	0,00	0,33	0,00	0,00
jgi Trave1 30524 fgenes1_kg_9_#_230_#_isotig05488	0,70	0,20	1,00	0,30	1,10	0,20	1,30	0,50
jgi Trave1 42899 gm1.1783_g	0,00	1,80	1,80	1,20	0,40	1,40	0,00	0,00
jgi Trave1 67924 estExt_Genemark1.C_1_t10308	0,50	0,83	0,33	1,17	0,67	2,00	0,17	0,83
jgi Trave1 130496 e_gw1.10.609.1	0,09	0,82	0,64	1,00	0,91	0,91	0,55	0,18
jgi Trave1 48030 gm1.6914_g	0,29	1,14	0,57	0,50	0,50	0,50	1,21	1,36
jgi Trave1 174308 estExt_Genewise1Plus.C_12_t20231	0,06	0,81	0,63	0,06	0,44	0,38	1,75	1,69
jgi Trave1 68341 estExt_Genemark1.C_1_t20348	0,00	0,40	0,20	0,40	1,10	0,70	1,00	1,50
jgi Trave1 48717 gm1.7601_g	0,31	0,54	0,46	1,23	0,46	0,85	0,23	0,38
jgi Trave1 131080 e_gw1.10.521.1	0,09	0,73	0,73	0,82	0,91	0,82	0,55	0,09
jgi Trave1 144893 estExt_Genewise1.C_3_t70138	0,64	0,21	0,29	0,79	0,43	1,43	0,00	0,43
jgi Trave1 48950 gm1.7834_g	0,00	0,27	0,36	0,36	1,82	1,18	0,64	0,45
jgi Trave1 154147 estExt_Genewise1.C_11_t20144	0,56	0,78	0,56	0,56	0,78	0,78	0,11	0,22
jgi Trave1 117805 e_gw1.3.1288.1	0,19	0,38	0,63	0,19	0,69	0,63	1,50	1,19
jgi Trave1 115416 e_gw1.3.1132.1	0,00	0,25	0,17	0,17	0,50	0,17	1,92	2,08
jgi Trave1 49304 gm1.8188_g	0,00	0,31	0,41	0,19	0,84	0,44	0,69	2,31
jgi Trave1 39578 fgenes1_pm.10_#_363	0,05	0,57	0,52	0,43	1,00	0,62	0,67	1,14
jgi Trave1 162601 estExt_Genewise1Plus.C_3_t20245	1,86	0,29	0,00	0,71	0,00	0,00	0,00	0,00
jgi Trave1 53150 gm1.12034_g	0,00	0,00	0,00	0,00	5,00	0,00	0,00	0,00
jgi Trave1 144202 estExt_Genewise1.C_3_t50086	0,29	0,65	0,35	0,71	0,82	0,88	0,18	0,24
jgi Trave1 143379 estExt_Genewise1.C_3_t20476	1,00	0,50	0,50	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00
jgi Trave1 111754 e_gw1.1.4181.1	0,16	0,32	0,16	0,53	0,37	0,32	0,84	0,95
jgi Trave1 51442 gm1.10326_g	0,00	0,75	0,88	0,50	0,88	0,75	0,38	0,13
jgi Trave1 43576 gm1.2460_g	0,00	0,67	0,89	0,56	1,33	0,89	0,33	0,11
jgi Trave1 39070 fgenes1_pm.9_#_368	0,00	0,15	0,23	0,31	0,85	0,38	0,69	2,15
jgi Trave1 23498 fgenes1_pg.11_#_397	0,33	1,33	0,00	1,33	0,00	0,33	0,00	0,00
jgi Trave1 113847 e_gw1.2.1539.1	0,14	0,50	0,64	1,14	0,29	1,21	0,14	0,36
jgi Trave1 122574 e_gw1.5.622.1	0,00	0,54	0,15	0,54	1,00	0,69	0,92	0,77
jgi Trave1 51455 gm1.10339_g	0,00	0,60	0,60	0,50	0,80	0,70	0,40	0,20
jgi Trave1 47480 gm1.6364_g	0,60	0,60	0,50	0,80	0,60	0,70	0,30	0,50
jgi Trave1 40820 fgenes1_pm.15_#_67	0,00	0,11	0,44	0,11	0,67	0,22	0,94	2,06
jgi Trave1 40812 fgenes1_pm.15_#_59	0,20	0,50	0,20	0,60	0,60	2,00	0,00	0,00
jgi Trave1 130750 e_gw1.10.598.1	0,07	0,29	0,43	0,14	0,43	0,36	1,71	0,86
jgi Trave1 51457 gm1.10341_g	0,08	0,67	0,75	0,67	0,58	0,50	0,17	0,17
jgi Trave1 67879 estExt_Genemark1.C_1_t10245	0,00	0,38	0,19	0,10	0,90	0,14	0,81	1,86
jgi Trave1 69055 estExt_Genemark1.C_2_t10356	0,09	0,27	0,36	1,91	0,00	1,45	0,00	0,27
jgi Trave1 126828 e_gw1.7.1253.1	0,14	0,43	0,43	0,21	0,57	0,79	0,57	1,21
jgi Trave1 130597 e_gw1.10.798.1	0,09	0,57	0,48	0,26	0,30	0,35	0,52	1,17
jgi Trave1 47993 gm1.6877_g	0,00	1,00	0,53	0,13	0,87	0,40	0,53	0,87
jgi Trave1 175557 estExt_Genewise1Plus.C_14_t20039	0,33	0,28	0,06	0,06	1,11	0,56	0,39	1,22
jgi Trave1 41806 gm1.690_g	0,00	0,00	0,30	0,80	1,20	0,80	0,20	0,20
jgi Trave1 154838 estExt_Genewise1.C_12_t20026	0,07	0,61	0,32	0,61	1,11	0,64	0,00	0,18
jgi Trave1 141168 estExt_Genewise1.C_2_t20063	0,06	0,50	0,25	0,13	0,69	0,81	0,63	0,88
jgi Trave1 112170 e_gw1.1.1491.1	0,50	0,83	0,50	0,67	0,67	0,33	0,17	0,17
jgi Trave1 161547 estExt_Genewise1Plus.C_2_t40498	0,16	0,47	0,47	0,53	0,47	0,16	0,74	0,42
jgi Trave1 51375 gm1.10259_g	0,00	0,43	0,00	0,29	0,43	0,43	0,14	0,00
jgi Trave1 41392 gm1.276_g	0,00	0,36	0,50	0,14	0,55	0,68	0,68	0,64
jgi Trave1 134226 e_gw1.12.502.1	0,00	0,70	0,60	0,20	1,10	0,40	0,40	0,10
jgi Trave1 75316 estExt_Genemark1.C_140165	0,08	0,04	0,48	0,04	0,40	0,48	0,60	1,32
jgi Trave1 135882 e_gw1.14.38.1	0,15	0,15	0,62	0,77	0,15	0,77	0,69	0,15

jgi Trave1 164970 estExt_Genewise1Plus.C_4_t20342	0,00	0,29	0,21	0,14	0,00	0,79	0,00	0,00
jgi Trave1 129038 e_gw1.9.245.1	0,29	0,29	0,00	0,29	0,00	0,57	0,00	0,00
jgi Trave1 70471 estExt_Genemark1.C_3_t30242	0,00	0,11	0,00	0,00	0,26	0,15	0,15	0,67
jgi Trave1 41997 gm1.881_g	0,00	0,00	0,00	0,60	0,07	0,07	0,07	0,07
jgi Trave1 75025 estExt_Genemark1.C_13_t10207	0,60	0,00	0,00	0,40	0,00	0,40	0,00	0,00
jgi Trave1 127171 e_gw1.8.879.1	0,00	0,13	0,08	0,08	0,21	0,08	0,25	0,38
jgi Trave1 27714 fgenes1_kg.3_#_863_#_isotig07051	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00
jgi Trave1 34910 fgenes1_pm.3_#_200	0,00	0,00	0,21	0,07	0,36	0,00	0,43	0,29
jgi Trave1 136392 e_gw1.15.283.1	0,00	0,33	0,33	0,17	0,33	0,17	0,00	0,00
jgi Trave1 35444 fgenes1_pm.3_#_734	0,00	0,05	0,11	0,00	0,11	0,05	0,53	0,47
jgi Trave1 126771 e_gw1.7.1565.1	0,00	0,00	0,15	0,08	0,15	0,31	0,38	0,23
jgi Trave1 60715 estExt_fgenes1_pm.C_110287	0,00	0,18	0,09	0,00	0,09	0,55	0,36	0,00
jgi Trave1 168678 estExt_Genewise1Plus.C_6_t40235	0,00	0,18	0,00	0,27	0,00	0,27	0,27	0,27
jgi Trave1 68896 estExt_Genemark1.C_2_t10061	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,36	0,45
jgi Trave1 32193 fgenes1_kg.15_#_35_#_isotig06120	0,00	0,25	0,13	0,13	0,25	0,13	0,13	0,25
jgi Trave1 168018 estExt_Genewise1Plus.C_6_t20304	0,25	0,25	0,00	0,25	0,00	0,25	0,00	0,00
jgi Trave1 46679 gm1.5563_g	0,05	0,00	0,11	0,63	0,00	0,26	0,00	0,11
jgi Trave1 25453 fgenes1_kg.1_#_274_#_isotig06624	0,00	0,00	0,00	0,20	0,20	0,60	0,00	0,00
jgi Trave1 74179 estExt_Genemark1.C_10_t20225	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,80	0,00	0,00
jgi Trave1 145154 estExt_Genewise1.C_4_t10306	0,00	0,10	0,10	0,00	0,29	0,00	0,29	0,43
jgi Trave1 43289 gm1.2173_g	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,17	0,00	0,00
jgi Trave1 37373 fgenes1_pm.6_#_225	0,00	0,25	0,00	0,00	0,13	0,75	0,00	0,00
jgi Trave1 34231 fgenes1_pm.2_#_317	0,00	0,13	0,13	0,50	0,13	0,25	0,00	0,00
jgi Trave1 68145 estExt_Genemark1.C_1_t20110	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,13
jgi Trave1 138261 estExt_Genewise1.C_1_t20010	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,22
jgi Trave1 133945 e_gw1.12.36.1	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,23	0,08
jgi Trave1 156706 estExt_Genewise1.C_150231	0,00	0,00	0,00	0,00	0,67	0,33	0,00	0,00
jgi Trave1 111924 e_gw1.1.4263.1	0,00	0,14	0,00	0,14	0,29	0,43	0,00	0,00
jgi Trave1 47923 gm1.6807_g	0,00	0,00	0,00	0,43	0,00	0,57	0,00	0,00
jgi Trave1 28335 fgenes1_kg.4_#_615_#_isotig10902	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
jgi Trave1 131759 e_gw1.10.1524.1	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00
jgi Trave1 50178 gm1.9062_g	0,00	0,00	0,00	0,67	0,00	0,33	0,00	0,00
jgi Trave1 18717 fgenes1_pg.3_#_776	0,00	0,00	0,00	0,07	0,14	0,00	0,14	0,29
jgi Trave1 45058 gm1.3942_g	0,00	0,00	0,33	0,00	0,22	0,00	0,00	0,44
jgi Trave1 68104 estExt_Genemark1.C_1_t20057	0,00	0,00	0,00	0,00	0,22	0,09	0,04	0,61
jgi Trave1 49760 gm1.8644_g	0,00	0,12	0,00	0,08	0,16	0,04	0,16	0,32
jgi Trave1 169734 estExt_Genewise1Plus.C_7_t30340	0,00	0,08	0,25	0,08	0,25	0,00	0,08	0,17
jgi Trave1 70376 estExt_Genemark1.C_3_t30099	0,00	0,00	0,30	0,00	0,10	0,00	0,20	0,30
jgi Trave1 65907 estExt_fgenes1_pg.C_9_t10022	0,00	0,00	0,00	0,29	0,00	0,57	0,00	0,00
jgi Trave1 121678 e_gw1.5.1521.1	0,14	0,14	0,00	0,29	0,00	0,29	0,00	0,00
jgi Trave1 165881 estExt_Genewise1Plus.C_4_t50040	0,00	0,00	0,00	0,43	0,00	0,29	0,00	0,00
jgi Trave1 74575 estExt_Genemark1.C_11_t20222	0,00	0,38	0,08	0,08	0,15	0,08	0,00	0,08
jgi Trave1 30590 fgenes1_kg.9_#_296_#_isotig07013	0,00	0,00	0,08	0,00	0,54	0,08	0,15	0,00
jgi Trave1 69240 estExt_Genemark1.C_2_t20148	0,00	0,00	0,00	0,00	0,11	0,00	0,11	0,33
jgi Trave1 58033 estExt_fgenes1_pm.C_4_t20333	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
jgi Trave1 61500 estExt_fgenes1_pm.C_160091	0,05	0,00	0,00	0,14	0,10	0,00	0,10	0,10
jgi Trave1 126658 e_gw1.7.252.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,18
jgi Trave1 119513 e_gw1.4.1479.1	0,00	0,00	0,14	0,07	0,14	0,29	0,00	0,07
jgi Trave1 128133 e_gw1.8.988.1	0,14	0,43	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00	0,00
jgi Trave1 127754 e_gw1.8.467.1	0,29	0,00	0,00	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00
jgi Trave1 110969 e_gw1.1.2278.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,18	0,24	0,29
jgi Trave1 56391 estExt_fgenes1_pm.C_2_t20087	0,11	0,00	0,00	0,00	0,05	0,05	0,00	0,00
jgi Trave1 74788 estExt_Genemark1.C_12_t10317	0,00	0,04	0,04	0,00	0,13	0,08	0,08	0,29
jgi Trave1 65977 estExt_fgenes1_pg.C_9_t10111	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,67
jgi Trave1 47247 gm1.6131_g	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,67	0,00	0,00
jgi Trave1 45408 gm1.4292_g	0,00	0,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
jgi Trave1 68533 estExt_Genemark1.C_1_t30109	0,00	0,00	0,00	0,13	0,13	0,13	0,00	0,00
jgi Trave1 68124 estExt_Genemark1.C_1_t20080	0,00	0,06	0,06	0,25	0,00	0,25	0,00	0,00
jgi Trave1 30435 fgenes1_kg.9_#_141_#_isotig00819	0,06	0,00	0,00	0,06	0,00	0,19	0,06	0,00
jgi Trave1 173244 estExt_Genewise1Plus.C_11_t10188	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,08	0,38
jgi Trave1 60488 estExt_fgenes1_pm.C_100389	0,00	0,00	0,06	0,00	0,06	0,00	0,50	0,00
jgi Trave1 135976 e_gw1.14.417.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,20	0,27
jgi Trave1 73047 estExt_Genemark1.C_8_t10202	0,00	0,00	0,03	0,00	0,06	0,00	0,06	0,26
jgi Trave1 27783 fgenes1_kg.4_#_63_#_isotig00747	0,09	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,04	0,04
jgi Trave1 173225 estExt_Genewise1Plus.C_11_t10166	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,30
jgi Trave1 116333 e_gw1.3.1585.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,50
jgi Trave1 131278 e_gw1.10.1235.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,17	0,17
jgi Trave1 43004 gm1.1888_g	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,00
jgi Trave1 40281 fgenes1_pm.13_#_9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00
jgi Trave1 110377 e_gw1.1.1709.1	0,00	0,00	0,06	0,31	0,00	0,06	0,00	0,06

jgi Trave1 30460 fgenes1_kg.9_#_166_#_isotig06581	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00
jgi Trave1 136429 e_gw1.15.80.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00
jgi Trave1 27121 fgenes1_kg.3_#_270_#_isotig04279	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	0,17
jgi Trave1 175484 estExt_Genewise1Plus.C_14_t10432	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00
jgi Trave1 150955 estExt_Genewise1.C_8_t10299	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	0,35
jgi Trave1 63629 estExt_fgenes1_pg.C_3_t20238	0,00	0,00	0,09	0,00	0,09	0,00	0,00	0,27
jgi Trave1 121791 e_gw1.5.2133.1	0,11	0,11	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00	0,11
jgi Trave1 73596 estExt_Genemark1.C_9_t10406	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,44
jgi Trave1 158931 estExt_Genewise1Plus.C_1_t50029	0,00	0,00	0,00	0,29	0,00	0,14	0,00	0,00
jgi Trave1 130108 e_gw1.9.1262.1	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00	0,29	0,00	0,00
jgi Trave1 26449 fgenes1_kg.2_#_259_#_isotig05725	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00	0,00
jgi Trave1 30062 fgenes1_kg.8_#_166_#_isotig00201	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00
jgi Trave1 53846 gm1.12730_g	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
jgi Trave1 34378 fgenes1_pm.2_#_464	0,00	0,00	0,00	0,30	0,00	0,10	0,00	0,00
jgi Trave1 42128 gm1.1012_g	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,10
jgi Trave1 171483 estExt_Genewise1Plus.C_9_t20086	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00
jgi Trave1 140767 estExt_Genewise1.C_1_t80470	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
jgi Trave1 50307 gm1.9191_g	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,40	0,00	0,00
jgi Trave1 128509 e_gw1.8.900.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,17	0,00	0,00
jgi Trave1 141481 estExt_Genewise1.C_2_t30165	0,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
jgi Trave1 147373 estExt_Genewise1.C_5_t20314	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,36	0,00	0,00
jgi Trave1 57215 estExt_fgenes1_pm.C_3_t20298	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
jgi Trave1 130016 e_gw1.9.688.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,27
jgi Trave1 47584 gm1.6468_g	0,00	0,00	0,07	0,00	0,21	0,00	0,00	0,07
jgi Trave1 39220 fgenes1_pm.10_#_5	0,00	0,07	0,00	0,07	0,14	0,07	0,00	0,00
jgi Trave1 129640 e_gw1.9.870.1	0,00	0,00	0,14	0,07	0,00	0,14	0,00	0,00
jgi Trave1 34877 fgenes1_pm.3_#_167	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,07	0,00	0,00
jgi Trave1 138745 estExt_Genewise1.C_1_t30150	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00
jgi Trave1 160067 estExt_Genewise1Plus.C_1_t80156	0,12	0,00	0,00	0,00	0,03	0,09	0,00	0,09
jgi Trave1 125375 e_gw1.7.179.1	0,00	0,00	0,00	0,08	0,17	0,08	0,00	0,00
jgi Trave1 19288 fgenes1_pg.4_#_488	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
jgi Trave1 157166 estExt_Genewise1.C_170104	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00
jgi Trave1 112178 e_gw1.1.192.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,21
jgi Trave1 44509 gm1.3393_g	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00	0,20	0,00	0,00
jgi Trave1 125526 e_gw1.7.457.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	0,00	0,00
jgi Trave1 74521 estExt_Genemark1.C_11_t20129	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,08
jgi Trave1 170635 estExt_Genewise1Plus.C_8_t20346	0,08	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,04	0,04
jgi Trave1 29992 fgenes1_kg.8_#_96_#_isotig03561	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
jgi Trave1 47314 gm1.6198_g	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,06	0,12	0,06
jgi Trave1 31157 fgenes1_kg.11_#_30_#_isotig04635	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,19
jgi Trave1 74595 estExt_Genemark1.C_12_t10028	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,07	0,07	0,00
jgi Trave1 128410 e_gw1.8.1803.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00	0,14
jgi Trave1 27040 fgenes1_kg.3_#_189_#_isotig03458	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00	0,00
jgi Trave1 126897 e_gw1.8.1134.1	0,00	0,00	0,00	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00
jgi Trave1 60144 estExt_fgenes1_pm.C_9_t10458	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,29	0,00	0,00
jgi Trave1 60757 estExt_fgenes1_pm.C_120031	0,00	0,00	0,00	0,18	0,00	0,09	0,00	0,00
jgi Trave1 148125 estExt_Genewise1.C_6_t10018	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
jgi Trave1 144293 estExt_Genewise1.C_3_t50225	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,07	0,00	0,00
jgi Trave1 56085 estExt_fgenes1_pm.C_2_t10207	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,08	0,00	0,00
jgi Trave1 160111 estExt_Genewise1Plus.C_1_t80216	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,17	0,00	0,08
jgi Trave1 27130 fgenes1_kg.3_#_279_#_isotig00243	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,07
jgi Trave1 138209 estExt_Genewise1.C_1_t10414	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00
jgi Trave1 57263 estExt_fgenes1_pm.C_3_t20360	0,00	0,00	0,00	0,09	0,00	0,09	0,00	0,00
jgi Trave1 54983 estExt_fgenes1_pm.C_1_t10098	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00
jgi Trave1 45669 gm1.4553_g	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,06	0,00
jgi Trave1 137261 e_gw1.18.72.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00	0,00
jgi Trave1 140063 estExt_Genewise1.C_1_t60377	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00
jgi Trave1 144781 estExt_Genewise1.C_3_t60458	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00
jgi Trave1 59069 estExt_fgenes1_pm.C_7_t10146	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13
jgi Trave1 135924 e_gw1.14.49.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13
jgi Trave1 22021 fgenes1_pg.9_#_44	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13
jgi Trave1 91869 gw1.4.1328.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00
jgi Trave1 168632 estExt_Genewise1Plus.C_6_t40143	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00
jgi Trave1 118084 e_gw1.3.1661.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,03	0,06	0,00
jgi Trave1 42105 gm1.989_g	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12
jgi Trave1 72991 estExt_Genemark1.C_8_t10130	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00
jgi Trave1 173663 estExt_Genewise1Plus.C_11_t30031	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00
jgi Trave1 136662 e_gw1.16.103.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04
jgi Trave1 67635 estExt_fgenes1_pg.C_170004	0,00	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00
jgi Trave1 139175 estExt_Genewise1.C_1_t40224	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,05

jgi Trave1 62807 estExt_fgenes1_pg.C_2_t10480	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00
jgi Trave1 58816 estExt_fgenes1_pm.C_6_t10374	0,04	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00
jgi Trave1 119195 e_gw1.4.992.1	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00
jgi Trave1 64103 estExt_fgenes1_pg.C_4_t10493	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08
jgi Trave1 27411 fgenes1_kg.3_#_560_#_isotig03860	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00
jgi Trave1 68951 estExt_Genemark1.C_2_t10147	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00
jgi Trave1 175399 estExt_Genewise1Plus.C_14_t10299	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06
jgi Trave1 126792 e_gw1.7.651.1	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00

Annexe 8 : Tableau des données normalisées ayant permis de réaliser les analyses en composante principale

SECRETOMES CHENE AUBIER										
		TV1218-CHENE	TV1219-AULNE	TV1532-HETRE	TV1252-CHENE	TV110102-URBAIN	TV70-HETRE	TV71-CHENE	TV44889-HETRE	TV15544-HETRE
Activités enzymatiques	LACCASE	1,80	0,59	0,49	0,70	0,22	0,57	0,53	0,19	0,24
	GLUCOSIDASE	10,00	3,36	2,80	4,00	1,24	3,24	3,05	1,06	1,37
	CELLOBIOHYDROLASE	3,85	1,26	1,05	1,50	0,46	1,22	1,14	0,40	0,51
	XYLOSIDASE	0,25	0,08	0,07	0,10	0,03	0,08	0,08	0,03	0,03
	GLUCURONIDASE	0,42	0,14	0,12	0,16	0,05	0,13	0,13	0,04	0,06
Protéine des sécrétomes	1	0,29	3,14	2,29	0,29	5,14	7,43	0,29	10,00	8,57
	2	0,68	1,09	1,43	1,35	1,40	2,00	0,62	1,77	1,84
	3	0,11	1,03	0,97	0,11	2,29	1,37	0,34	2,34	1,71
	4	0,57	0,86	0,57	1,43	0,86	1,71	0,86	1,14	1,14
	5	0,00	0,00	0,29	0,71	0,71	1,86	1,86	2,57	0,14
	6	1,62	0,57	0,60	0,93	0,64	0,71	0,45	0,69	0,67
	7	0,93	0,79	0,57	0,50	0,93	0,86	0,21	0,93	0,64
	8	1,71	0,29	0,00	0,86	0,57	0,57	0,57	0,57	0,57
	9	0,02	0,43	0,69	0,24	0,76	1,07	0,24	1,19	0,86
	10	0,90	0,51	0,53	0,68	0,51	0,40	0,55	0,53	0,53
	11	2,00	0,29	0,29	0,57	0,57	0,00	1,14	0,00	0,57
	12	0,00	0,69	0,49	0,20	0,98	0,82	0,29	1,18	0,61
	13	0,72	0,51	0,40	0,70	0,50	0,57	0,32	0,55	0,53
	14	0,49	0,54	0,51	0,86	0,34	0,71	0,57	0,43	0,46
	15	0,87	0,23	0,46	0,13	1,00	0,47	0,83	0,74	0,23
	16	0,36	0,73	0,37	0,25	0,48	0,79	0,30	0,89	0,57
	17	0,05	0,45	0,50	0,43	0,57	0,86	0,33	0,71	0,79
	18	0,00	0,38	0,38	0,29	0,67	1,19	0,29	0,81	0,57
	19	0,00	0,43	0,43	0,33	0,71	1,29	0,19	0,71	0,48
	20	0,00	0,38	0,67	0,24	0,90	0,38	0,38	0,67	0,76
	21	0,00	0,38	0,38	0,24	0,67	1,19	0,24	0,81	0,57
	22	0,37	0,39	0,37	0,24	0,52	0,49	0,34	0,69	0,64
	23	0,40	0,40	0,46	0,46	0,51	0,34	0,17	0,63	0,46
	24	0,45	0,45	0,37	0,29	0,45	0,29	0,53	0,49	0,53
	25	0,18	0,44	0,55	0,36	0,57	0,49	0,18	0,62	0,52
Perte de masse	CHENE AUBIER	6,88	7,58	10,00	2,26	5,82	7,42	1,79	7,02	6,81
	CHENE DURAMEN	0,48	1,65	1,54	0,35	1,66	0,54	0,29	1,59	1,66

SECRETOMES HETRE									
		TV1218-CHENE	TV1219-AULNE	TV1532-HETRE	TV1252-CHENE	TV110102-URBAIN	TV70-HETRE	TV44889-HE	TV15544-HETRE
Activités enzymatiques	LACCASE	0,050	0,054	0,058	0,110	0,023	0,080	0,090	0,013
	GLUCOSIDASE	10,000	8,313	6,218	7,635	3,795	3,716	3,840	5,069
	CELLOBIOHYDROLASE	3,927	4,382	2,754	4,803	0,884	0,857	0,002	2,180
	XYLOSIDASE	0,282	0,593	0,414	0,272	0,552	0,193	0,093	0,541
	GLUCURONIDASE	0,763	1,738	2,974	0,476	1,545	2,495	1,691	1,016
Protéine des sécrétomes	1	1,15	5,71	10,00	5,51	7,18	5,90	3,08	7,24
	2	2,12	2,12	4,23	3,53	2,82	4,23	5,64	4,94
	3	2,64	5,82	2,64	4,58	4,23	2,64	0,88	1,06
	4	0,00	5,36	4,09	0,56	10,15	2,82	2,68	0,99
	5	0,71	9,36	2,05	0,51	8,72	1,54	0,13	3,01
	6	0,09	3,97	1,94	4,94	1,32	7,76	0,53	1,06
	7	0,35	1,18	3,53	0,94	7,64	3,17	1,65	2,00
	8	0,47	3,41	2,94	1,88	4,35	4,70	2,00	0,71
	9	0,12	3,17	3,29	2,35	4,11	3,88	2,12	1,18
	10	0,78	1,02	3,70	0,39	5,22	4,20	3,63	0,88
	11	0,71	2,47	1,76	1,41	4,23	4,23	3,88	1,41
	12	0,88	1,59	3,23	2,06	2,29	1,65	1,70	3,17
	13	0,47	3,06	2,94	1,76	4,35	4,11	2,00	0,71
	14	1,48	2,82	2,68	3,53	2,04	3,03	0,63	1,76
	15	0,00	1,76	2,12	5,99	1,76	2,47	0,00	1,06
	16	0,82	2,23	2,00	2,06	1,94	2,88	1,76	1,65
	17	0,12	2,17	2,35	0,29	3,35	1,23	3,88	2,29
	18	0,28	1,93	2,40	2,73	2,35	1,93	0,80	1,88
	19	0,00	2,62	2,01	0,81	4,03	2,72	1,61	1,11
	20	0,47	2,35	1,41	4,00	1,18	4,00	0,24	0,94
	21	0,47	1,21	2,35	0,43	2,66	1,72	2,90	2,62
	22	0,46	1,44	1,71	0,73	1,38	1,98	3,63	2,20
	23	0,24	0,24	2,35	0,29	0,88	1,00	4,58	4,29
	24	0,19	1,03	2,12	1,09	1,92	2,37	1,86	2,95
	25	1,97	1,27	1,41	1,97	1,83	2,68	0,00	0,99
Perte de masse	HETRE	9,87	7,40	9,36	4,09	8,88	10,00	5,38	6,13

Annexe 9 : Tableau des différentes classes des GST chez *T. versicolor* avec l'ID protéique correspondant selon la base de donnée du JGI

CLASSE	ID PROTEIQUE	CLASSE	ID PROTEIQUE
FuA	64328	GHR	50990
	124779		66368
	147690		73942
	148196	Ure2p	28656
	158141		46821
	38891		49950
GSTO	60698		62807
	54358		114024
	157166		129631
	48691		121251
	56280		43025
	65402		166275
	71758		117926
	67635	Phi	1686321
	23671		1235721
	75639		1229791
	73687		1246251
	60138	GTT	33495
	34389		42031
	32361		65402
	54345		73357
	41340		

Annexe 10 : Tableau protéiques de l'exsudat de *Trametes versicolor* obtenus malt après analyse LCMS/MS

ID proteique et nom du gène	Tv1218Exsudat	ID proteique et nom du gène	Tv1218Exsudat
jgi Trave1 116268 e_gw1.3.2123.1	23,00	jgi Trave1 154147 estExt_Genewise1.C_11_t20144	0,44
jgi Trave1 48870 gm1.7754_g	15,65	jgi Trave1 175557 estExt_Genewise1Plus.C_14_t20039	0,44
jgi Trave1 28335 fgenes1_kg.4_#_615_#_isotig109	13,00	jgi Trave1 48305 gm1.7189_g	0,44
jgi Trave1 103761 gw1.18.126.1	9,00	jgi Trave1 175105 estExt_Genewise1Plus.C_13_t20389	0,44
jgi Trave1 30879 fgenes1_kg.10_#_131_#_isotig01	6,00	jgi Trave1 110904 e_gw1.1.4141.1	0,44
jgi Trave1 31823 fgenes1_kg.13_#_82_#_isotig107	6,00	jgi Trave1 27783 fgenes1_kg.4_#_63_#_isotig00747	0,43
jgi Trave1 31361 fgenes1_kg.11_#_234_#_isotig06	4,67	jgi Trave1 155564 estExt_Genewise1.C_13_t20002	0,43
jgi Trave1 58033 estExt_fgenes1_pm.C_4_t20333	3,74	jgi Trave1 55703 estExt_fgenes1_pm.C_1_t20467	0,42
jgi Trave1 62730 estExt_fgenes1_pg.C_2_t10361	3,50	jgi Trave1 112899 e_gw1.2.1846.1	0,42
jgi Trave1 25402 fgenes1_kg.1_#_223_#_isotig014	3,17	jgi Trave1 110969 e_gw1.1.2278.1	0,41
jgi Trave1 74079 estExt_Genemark1.C_10_t20059	2,75	jgi Trave1 25565 fgenes1_kg.1_#_386_#_isotig04155	0,41
jgi Trave1 51375 gm1.10259_g	2,71	jgi Trave1 143650 estExt_Genewise1.C_3_t30348	0,40
jgi Trave1 134721 e_gw1.13.1089.1	2,60	jgi Trave1 127854 e_gw1.8.1662.1	0,40
jgi Trave1 29347 fgenes1_kg.7_#_4_#_isotig01747	2,20	jgi Trave1 48947 gm1.7831_g	0,40
jgi Trave1 56391 estExt_fgenes1_pm.C_2_t20087	2,16	jgi Trave1 42584 gm1.1468_g	0,39
jgi Trave1 27040 fgenes1_kg.3_#_189_#_isotig034	2,14	jgi Trave1 39070 fgenes1_pm.9_#_368	0,38
jgi Trave1 37024 fgenes1_pm.5_#_453	2,12	jgi Trave1 72991 estExt_Genemark1.C_8_t10130	0,38
jgi Trave1 110860 e_gw1.1.2477.1	2,08	jgi Trave1 69261 estExt_Genemark1.C_2_t20184	0,38
jgi Trave1 144610 estExt_Genewise1.C_3_t60182	2,06	jgi Trave1 57372 estExt_fgenes1_pm.C_3_t30001	0,38
jgi Trave1 104903 gw1.1.3860.1	2,00	jgi Trave1 121275 e_gw1.5.1957.1	0,38
jgi Trave1 69085 estExt_Genemark1.C_2_t10406	2,00	jgi Trave1 175614 estExt_Genewise1Plus.C_14_t20113	0,38
jgi Trave1 159574 estExt_Genewise1Plus.C_1_t6039	1,90	jgi Trave1 68145 estExt_Genemark1.C_1_t20110	0,38
jgi Trave1 157325 estExt_Genewise1.C_180040	1,90	jgi Trave1 27714 fgenes1_kg.3_#_863_#_isotig07051	0,38
jgi Trave1 144893 estExt_Genewise1.C_3_t70138	1,79	jgi Trave1 66190 estExt_fgenes1_pg.C_9_t10443	0,38
jgi Trave1 28124 fgenes1_kg.4_#_404_#_isotig035	1,75	jgi Trave1 26923 fgenes1_kg.3_#_72_#_isotig06134	0,38
jgi Trave1 30997 fgenes1_kg.10_#_249_#_isotig11	1,75	jgi Trave1 22021 fgenes1_pg.9_#_44	0,38
jgi Trave1 156281 estExt_Genewise1.C_14_t10086	1,71	jgi Trave1 109828 e_gw1.1.453.1	0,38
jgi Trave1 170938 estExt_Genewise1Plus.C_8_t3042	1,67	jgi Trave1 26323 fgenes1_kg.2_#_133_#_isotig04234	0,37
jgi Trave1 23498 fgenes1_pg.11_#_397	1,67	jgi Trave1 41392 gm1.276_g	0,36
jgi Trave1 64339 estExt_fgenes1_pg.C_5_t10057	1,67	jgi Trave1 130016 e_gw1.9.688.1	0,36
jgi Trave1 141481 estExt_Genewise1.C_2_t30165	1,55	jgi Trave1 60477 estExt_fgenes1_pm.C_100376	0,36
jgi Trave1 173225 estExt_Genewise1Plus.C_11_t101	1,50	jgi Trave1 134358 e_gw1.12.282.1	0,36
jgi Trave1 42128 gm1.1012_g	1,50	jgi Trave1 142126 estExt_Genewise1.C_2_t50082	0,35
jgi Trave1 26239 fgenes1_kg.2_#_49_#_isotig0690	1,50	jgi Trave1 116333 e_gw1.3.1585.1	0,35
jgi Trave1 62807 estExt_fgenes1_pg.C_2_t10480	1,50	jgi Trave1 147958 estExt_Genewise1.C_5_t40227	0,35
jgi Trave1 172472 estExt_Genewise1Plus.C_10_t103	1,47	jgi Trave1 26150 fgenes1_kg.1_#_971_#_isotig00463	0,35
jgi Trave1 152398 estExt_Genewise1.C_9_t20486	1,45	jgi Trave1 172835 estExt_Genewise1Plus.C_10_t20482	0,35
jgi Trave1 37357 fgenes1_pm.6_#_209	1,43	jgi Trave1 69811 estExt_Genemark1.C_3_t10326	0,33
jgi Trave1 52130 gm1.11014_g	1,40	jgi Trave1 139375 estExt_Genewise1.C_1_t40470	0,33
jgi Trave1 44897 gm1.3781_g	1,36	jgi Trave1 33707 fgenes1_pm.1_#_1051	0,33
jgi Trave1 151588 estExt_Genewise1.C_8_t30469	1,29	jgi Trave1 50235 gm1.9119_g	0,33
jgi Trave1 130108 e_gw1.9.1262.1	1,29	jgi Trave1 59269 estExt_fgenes1_pm.C_7_t10377	0,33
jgi Trave1 130496 e_gw1.10.609.1	1,27	jgi Trave1 51570 gm1.10454_g	0,33
jgi Trave1 131080 e_gw1.10.521.1	1,27	jgi Trave1 110875 e_gw1.1.2830.1	0,33
jgi Trave1 151784 estExt_Genewise1.C_9_t10108	1,19	jgi Trave1 155533 estExt_Genewise1.C_13_t10445	0,33
jgi Trave1 28580 fgenes1_kg.5_#_166_#_isotig012	1,18	jgi Trave1 38959 fgenes1_pm.9_#_257	0,33
jgi Trave1 144202 estExt_Genewise1.C_3_t50086	1,18	jgi Trave1 174721 estExt_Genewise1Plus.C_13_t10247	0,32
jgi Trave1 63826 estExt_fgenes1_pg.C_4_t10147	1,17	jgi Trave1 171787 estExt_Genewise1Plus.C_9_t30024	0,31
jgi Trave1 52976 gm1.11860_g	1,17	jgi Trave1 27763 fgenes1_kg.4_#_43_#_isotig06664	0,31
jgi Trave1 174166 estExt_Genewise1Plus.C_12_t200	1,12	jgi Trave1 169226 estExt_Genewise1Plus.C_7_t20172	0,31
jgi Trave1 175547 estExt_Genewise1Plus.C_14_t200	1,11	jgi Trave1 40964 fgenes1_pm.17_#_12	0,31
jgi Trave1 145953 estExt_Genewise1.C_4_t30357	1,10	jgi Trave1 43259 gm1.2143_g	0,31
jgi Trave1 140830 estExt_Genewise1.C_1_t90040	1,08	jgi Trave1 30590 fgenes1_kg.9_#_296_#_isotig07013	0,31
jgi Trave1 111754 e_gw1.1.4181.1	1,05	jgi Trave1 110790 e_gw1.1.1440.1	0,30
jgi Trave1 127790 e_gw1.8.1782.1	1,05	jgi Trave1 160067 estExt_Genewise1Plus.C_1_t80156	0,30
jgi Trave1 75494 estExt_Genemark1.C_150200	1,00	jgi Trave1 175079 estExt_Genewise1Plus.C_13_t20329	0,30
jgi Trave1 138138 estExt_Genewise1.C_1_t10292	1,00	jgi Trave1 38102 fgenes1_pm.7_#_405	0,30
jgi Trave1 61229 estExt_fgenes1_pm.C_130277	1,00	jgi Trave1 168111 estExt_Genewise1Plus.C_6_t20430	0,30
jgi Trave1 131501 e_gw1.10.272.1	1,00	jgi Trave1 168897 estExt_Genewise1Plus.C_7_t10249	0,30
jgi Trave1 28848 fgenes1_kg.5_#_434_#_isotig033	1,00	jgi Trave1 48030 gm1.6914_g	0,29
jgi Trave1 66045 estExt_fgenes1_pg.C_9_t10199	1,00	jgi Trave1 35683 fgenes1_pm.3_#_973	0,29
jgi Trave1 56791 estExt_fgenes1_pm.C_3_t10281	1,00	jgi Trave1 128133 e_gw1.8.988.1	0,29
jgi Trave1 175708 estExt_Genewise1Plus.C_150177	1,00	jgi Trave1 30566 fgenes1_kg.9_#_272_#_isotig09705	0,29
jgi Trave1 30460 fgenes1_kg.9_#_166_#_isotig065	1,00	jgi Trave1 176097 estExt_Genewise1Plus.C_170004	0,28
jgi Trave1 60144 estExt_fgenes1_pm.C_9_t10458	1,00	jgi Trave1 56488 estExt_fgenes1_pm.C_2_t20208	0,27
jgi Trave1 131793 e_gw1.11.119.1	1,00	jgi Trave1 174863 estExt_Genewise1Plus.C_13_t10483	0,27
jgi Trave1 48874 gm1.7758_g	0,94	jgi Trave1 152169 estExt_Genewise1.C_9_t20142	0,27

jgi Trave1 174308 estExt_Genewise1Plus.C_12_t202	0,94	jgi Trave1 147020 estExt_Genewise1.C_5_t10234	0,27
jgi Trave1 37734 fgenes1_pm.7_#_37	0,92	jgi Trave1 44509 gm1.3393_g	0,27
jgi Trave1 138905 estExt_Genewise1.C_1_t30353	0,92	jgi Trave1 68720 estExt_Genemark1.C_1_t30386	0,27
jgi Trave1 51455 gm1.10339_g	0,90	jgi Trave1 35444 fgenes1_pm.3_#_734	0,26
jgi Trave1 161547 estExt_Genewise1Plus.C_2_t4049	0,89	jgi Trave1 176228 estExt_Genewise1Plus.C_170163	0,26
jgi Trave1 127171 e_gw1.8.879.1	0,88	jgi Trave1 160573 estExt_Genewise1Plus.C_2_t10478	0,25
jgi Trave1 54963 estExt_fgenes1_pm.C_1_t10075	0,86	jgi Trave1 60665 estExt_fgenes1_pm.C_110224	0,25
jgi Trave1 129038 e_gw1.9.245.1	0,86	jgi Trave1 42276 gm1.1160_g	0,25
jgi Trave1 172435 estExt_Genewise1Plus.C_10_t103	0,86	jgi Trave1 40418 fgenes1_pm.13_#_146	0,24
jgi Trave1 138540 estExt_Genewise1.C_1_t20386	0,86	jgi Trave1 111474 e_gw1.1.1728.1	0,24
jgi Trave1 157166 estExt_Genewise1.C_170104	0,83	jgi Trave1 73942 estExt_Genemark1.C_10_t10261	0,24
jgi Trave1 117177 e_gw1.3.2644.1	0,82	jgi Trave1 173904 estExt_Genewise1Plus.C_12_t10152	0,23
jgi Trave1 73474 estExt_Genemark1.C_9_t10209	0,82	jgi Trave1 172066 estExt_Genewise1Plus.C_9_t30487	0,23
jgi Trave1 48950 gm1.7834_g	0,82	jgi Trave1 175503 estExt_Genewise1Plus.C_14_t10452	0,23
jgi Trave1 35090 fgenes1_pm.3_#_380	0,80	jgi Trave1 175639 estExt_Genemark1.C_170026	0,23
jgi Trave1 33990 fgenes1_pm.2_#_76	0,80	jgi Trave1 67804 estExt_Genemark1.C_1_t10124	0,23
jgi Trave1 28155 fgenes1_kg.4_#_435_#_isotig020	0,79	jgi Trave1 163322 estExt_Genewise1Plus.C_3_t40163	0,23
jgi Trave1 53846 gm1.12730_g	0,76	jgi Trave1 149654 estExt_Genewise1.C_7_t10425	0,23
jgi Trave1 36446 fgenes1_pm.4_#_735	0,76	jgi Trave1 146818 estExt_Genewise1.C_4_t60065	0,23
jgi Trave1 75316 estExt_Genemark1.C_140165	0,76	jgi Trave1 71035 estExt_Genemark1.C_4_t20244	0,23
jgi Trave1 37188 fgenes1_pm.6_#_40	0,75	jgi Trave1 109109 e_gw1.1.2102.1	0,22
jgi Trave1 68175 estExt_Genemark1.C_1_t20147	0,75	jgi Trave1 138261 estExt_Genewise1.C_1_t20010	0,22
jgi Trave1 115416 e_gw1.3.1132.1	0,75	jgi Trave1 126064 e_gw1.7.306.1	0,22
jgi Trave1 68124 estExt_Genemark1.C_1_t20080	0,75	jgi Trave1 43893 gm1.2777_g	0,22
jgi Trave1 167196 estExt_Genewise1Plus.C_5_t3045	0,75	jgi Trave1 53125 gm1.12009_g	0,22
jgi Trave1 171442 estExt_Genewise1Plus.C_9_t2003	0,75	jgi Trave1 27762 fgenes1_kg.4_#_42_#_isotig09499	0,22
jgi Trave1 34683 fgenes1_pm.2_#_769	0,73	jgi Trave1 74595 estExt_Genemark1.C_12_t10028	0,21
jgi Trave1 126658 e_gw1.7.252.1	0,73	jgi Trave1 111373 e_gw1.1.1674.1	0,21
jgi Trave1 112835 e_gw1.2.1070.1	0,71	jgi Trave1 111781 e_gw1.1.120.1	0,21
jgi Trave1 111924 e_gw1.1.4263.1	0,71	jgi Trave1 128860 e_gw1.9.427.1	0,21
jgi Trave1 158931 estExt_Genewise1Plus.C_1_t5002	0,71	jgi Trave1 51497 gm1.10381_g	0,21
jgi Trave1 83701 gw1.54.1.1	0,71	jgi Trave1 47257 gm1.6141_g	0,21
jgi Trave1 145964 estExt_Genewise1.C_4_t30369	0,71	jgi Trave1 145091 estExt_Genewise1.C_4_t10229	0,21
jgi Trave1 115186 e_gw1.2.1594.1	0,71	jgi Trave1 73047 estExt_Genemark1.C_8_t10202	0,20
jgi Trave1 50621 gm1.9505_g	0,70	jgi Trave1 52416 gm1.11300_g	0,20
jgi Trave1 30524 fgenes1_kg.9_#_230_#_isotig054	0,70	jgi Trave1 135976 e_gw1.14.417.1	0,20
jgi Trave1 30435 fgenes1_kg.9_#_141_#_isotig008	0,69	jgi Trave1 164045 estExt_Genewise1Plus.C_3_t60177	0,20
jgi Trave1 51457 gm1.10341_g	0,67	jgi Trave1 52556 gm1.11440_g	0,20
jgi Trave1 67879 estExt_Genemark1.C_1_t10245	0,67	jgi Trave1 29674 fgenes1_kg.7_#_331_#_isotig02356	0,20
jgi Trave1 39965 fgenes1_pm.12_#_28	0,67	jgi Trave1 46546 gm1.5430_g	0,19
jgi Trave1 70662 estExt_Genemark1.C_4_t10231	0,67	jgi Trave1 173713 estExt_Genewise1Plus.C_11_t30121	0,19
jgi Trave1 67924 estExt_Genemark1.C_1_t10308	0,67	jgi Trave1 171861 estExt_Genewise1Plus.C_9_t30158	0,18
jgi Trave1 156677 estExt_Genewise1.C_150137	0,67	jgi Trave1 50343 gm1.9227_g	0,18
jgi Trave1 149895 estExt_Genewise1.C_7_t20225	0,67	jgi Trave1 142800 estExt_Genewise1.C_3_t10247	0,18
jgi Trave1 27785 fgenes1_kg.4_#_65_#_isotig0794	0,67	jgi Trave1 49236 gm1.8120_g	0,18
jgi Trave1 173910 estExt_Genewise1Plus.C_12_t101	0,67	jgi Trave1 31466 fgenes1_kg.12_#_35_#_isotig05200	0,17
jgi Trave1 25580 fgenes1_kg.1_#_401_#_isotig101	0,67	jgi Trave1 154039 estExt_Genewise1.C_11_t10423	0,17
jgi Trave1 131341 e_gw1.10.230.1	0,67	jgi Trave1 43477 gm1.2361_g	0,17
jgi Trave1 134738 e_gw1.13.550.1	0,67	jgi Trave1 109115 e_gw1.1.409.1	0,17
jgi Trave1 168632 estExt_Genewise1Plus.C_6_t4014	0,63	jgi Trave1 160111 estExt_Genewise1Plus.C_1_t80216	0,17
jgi Trave1 120979 e_gw1.4.2579.1	0,62	jgi Trave1 162659 estExt_Genewise1Plus.C_3_t20312	0,16
jgi Trave1 49760 gm1.8644_g	0,60	jgi Trave1 171831 estExt_Genewise1Plus.C_9_t30082	0,16
jgi Trave1 144865 estExt_Genewise1.C_3_t70105	0,60	jgi Trave1 63467 estExt_fgenes1_pg.C_3_t20025	0,16
jgi Trave1 56726 estExt_fgenes1_pm.C_3_t10209	0,60	jgi Trave1 67419 estExt_fgenes1_pg.C_140106	0,16
jgi Trave1 59914 estExt_fgenes1_pm.C_9_t10159	0,59	jgi Trave1 124366 e_gw1.6.717.1	0,15
jgi Trave1 132011 e_gw1.11.1579.1	0,59	jgi Trave1 35262 fgenes1_pm.3_#_552	0,15
jgi Trave1 115397 e_gw1.3.3224.1	0,59	jgi Trave1 33277 fgenes1_pm.1_#_621	0,15
jgi Trave1 46261 gm1.5145_g	0,58	jgi Trave1 122117 e_gw1.5.263.1	0,15
jgi Trave1 30712 fgenes1_kg.9_#_418_#_isotig085	0,58	jgi Trave1 38622 fgenes1_pm.8_#_298	0,15
jgi Trave1 156571 estExt_Genewise1.C_14_t20108	0,58	jgi Trave1 160258 estExt_Genewise1Plus.C_1_t80400	0,15
jgi Trave1 127754 e_gw1.8.467.1	0,57	jgi Trave1 71369 estExt_Genemark1.C_5_t10174	0,15
jgi Trave1 29244 fgenes1_kg.6_#_384_#_isotig029	0,57	jgi Trave1 70704 estExt_Genemark1.C_4_t10284	0,15
jgi Trave1 40820 fgenes1_pm.15_#_67	0,56	jgi Trave1 171539 estExt_Genewise1Plus.C_9_t20161	0,14
jgi Trave1 73456 estExt_Genemark1.C_9_t10181	0,56	jgi Trave1 24492 fgenes1_pg.14_#_47	0,13
jgi Trave1 117926 e_gw1.3.2466.1	0,56	jgi Trave1 170534 estExt_Genewise1Plus.C_8_t20222	0,13
jgi Trave1 158002 estExt_Genewise1Plus.C_1_t2035	0,55	jgi Trave1 117138 e_gw1.3.62.1	0,13
jgi Trave1 109956 e_gw1.1.420.1	0,55	jgi Trave1 164678 estExt_Genewise1Plus.C_4_t10450	0,13
jgi Trave1 122574 e_gw1.5.622.1	0,54	jgi Trave1 157716 estExt_Genewise1Plus.C_1_t10468	0,13

jgi Trave1 34882 fgenes1_pm.3_#_172	0,54	jgi Trave1 156126 estExt_Genewise1.C_140296	0,13
jgi Trave1 52212 gm1.11096_g	0,53	jgi Trave1 160627 estExt_Genewise1Plus.C_2_t20058	0,12
jgi Trave1 158425 estExt_Genewise1Plus.C_1_t3040	0,53	jgi Trave1 162206 estExt_Genewise1Plus.C_3_t10207	0,12
jgi Trave1 68834 estExt_Genemark1.C_1_t40099	0,53	jgi Trave1 70471 estExt_Genemark1.C_3_t30242	0,11
jgi Trave1 45289 gm1.4173_g	0,53	jgi Trave1 154838 estExt_Genewise1.C_12_t20026	0,11
jgi Trave1 159926 estExt_Genewise1Plus.C_1_t7041	0,50	jgi Trave1 159259 estExt_Genewise1Plus.C_1_t50449	0,11
jgi Trave1 68341 estExt_Genemark1.C_1_t20348	0,50	jgi Trave1 174561 estExt_Genewise1Plus.C_12_t30255	0,10
jgi Trave1 40812 fgenes1_pm.15_#_59	0,50	jgi Trave1 28847 fgenes1_kg.5_#_433_#_isotig04458	0,10
jgi Trave1 74732 estExt_Genemark1.C_12_t10225	0,50	jgi Trave1 31087 fgenes1_kg.10_#_339_#_isotig02342	0,10
jgi Trave1 27966 fgenes1_kg.4_#_246_#_isotig068	0,50	jgi Trave1 74496 estExt_Genemark1.C_11_t20089	0,10
jgi Trave1 29538 fgenes1_kg.7_#_195_#_isotig019	0,50	jgi Trave1 37162 fgenes1_pm.6_#_14	0,10
jgi Trave1 40216 fgenes1_pm.12_#_279	0,50	jgi Trave1 31157 fgenes1_kg.11_#_30_#_isotig04635	0,10
jgi Trave1 19453 fgenes1_pg.4_#_653	0,50	jgi Trave1 176367 estExt_Genewise1Plus.C_180083	0,10
jgi Trave1 114667 e_gw1.2.1097.1	0,50	jgi Trave1 170391 estExt_Genewise1Plus.C_8_t10403	0,10
jgi Trave1 110183 e_gw1.1.926.1	0,50	jgi Trave1 27280 fgenes1_kg.3_#_429_#_isotig05141	0,10
jgi Trave1 153771 estExt_Genewise1.C_10_t30447	0,50	jgi Trave1 52921 gm1.11805_g	0,10
jgi Trave1 173513 estExt_Genewise1Plus.C_11_t202	0,50	jgi Trave1 38763 fgenes1_pm.9_#_61	0,10
jgi Trave1 158451 estExt_Genewise1Plus.C_1_t3043	0,50	jgi Trave1 53623 gm1.12507_g	0,09
jgi Trave1 72201 estExt_Genemark1.C_6_t20093	0,49	jgi Trave1 130597 e_gw1.10.798.1	0,09
jgi Trave1 171192 estExt_Genewise1Plus.C_9_t1017	0,48	jgi Trave1 170635 estExt_Genewise1Plus.C_8_t20346	0,08
jgi Trave1 151427 estExt_Genewise1.C_8_t30108	0,46	jgi Trave1 160326 estExt_Genewise1Plus.C_2_t10018	0,07
jgi Trave1 140546 estExt_Genewise1.C_1_t80172	0,45	jgi Trave1 52551 gm1.11435_g	0,06
jgi Trave1 159764 estExt_Genewise1Plus.C_1_t7020	0,45	jgi Trave1 30268 fgenes1_kg.8_#_372_#_isotig04140	0,06
jgi Trave1 161508 estExt_Genewise1Plus.C_2_t4045	0,45	jgi Trave1 36361 fgenes1_pm.4_#_650	0,05

Annexe 11 : Tableau des différents gènes transcrits présentant une induction 5 fois plus importante chez Tv1218 vs Tv1252 à t2 semaines de croissance sur MA.

NUMERO DE GENE	ID PROTEINE	1218 t2Semaines	1218 t4Semaines	1252 t2Semaines	1252 t4Semaines	1218/1252 t4Semaines	1218/1252 t2Semaines	ROLE DE LA PROTEINE	Peptide signal	Classe
[g] Travel1 139645	139375	334,30	513,60	22,72	9,55	53,77	14,71	GH 16	Non	Paroi
[g] Travel1 142007	141737	14916,87	11709,06	14,71	66,44	176,23	1014,11	Expansin	Oui	Paroi
[g] Travel1 171303	171033	4722,82	3793,22	7,71	15,21	249,39	612,32	Expansin	Oui	Paroi
[g] Travel1 37895	37625	7406,16	3819,15	28,59	185,44	20,59	259,05	GH 18, chitinase	Oui	Paroi
[g] Travel1 33977	33707	1016,52	266,24	18,82	29,64	8,98	54,02	GH 16	Oui	Paroi
[g] Travel1 127742	127472	172,69	12,66	3,94	6,76	1,87	43,87	GH 18, chitinase	Oui	Paroi
[g] Travel1 132063	131793	673,33	431,37	19,71	25,43	16,97	34,17	GH 18, chitinase	Oui	Paroi
[g] Travel1 73268	72998	193,62	94,27	7,44	12,10	7,79	26,03	GH 79, endo-beta-N-glucuronidase, heparanase	Oui	Paroi
[g] Travel1 116872	116602	232,66	80,41	12,94	22,96	3,50	17,99	Expansin	Oui	Paroi
[g] Travel1 27329	27059	300,66	250,39	18,02	27,63	9,06	16,68	GH 79, endo-beta-N-glucuronidase, heparanase	Oui	Paroi
[g] Travel1 61586	61316	147,63	141,73	9,15	15,08	9,40	16,14	GH 12, beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase	Oui	Paroi
[g] Travel1 30712	30442	5620,92	13403,05	353,14	406,29	32,99	15,92	Hydrophobine	Oui	Paroi
[g] Travel1 153777	153507	760,50	467,34	97,49	14,19	32,94	7,80	Chitinase	Oui	Paroi
[g] Travel1 75242	74972	442,60	1073,72	72,87	370,10	2,90	6,07	beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase	Oui	Paroi
[g] Travel1 69450	69180	104,03	102,82	18,04	22,76	4,52	5,77	Expansin	Oui	Paroi
[g] Travel1 52383	52113	108,49	115,99	19,62	15,60	7,43	5,53	Glycosyltransferase 8	Oui	Paroi
[g] Travel1 95395	95125	541,92	588,34	101,93	75,30	7,81	5,32	Polysaccharide Lyase 14	Oui	Paroi
[g] Travel1 74123	73853	185,74	200,55	35,92	60,51	3,31	5,17	beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase	Oui	Paroi
[g] Travel1 89677	89407	107,06	176,20	21,29	29,82	5,91	5,03	Beta-2-glycoproteine I	Oui	Paroi
[g] Travel1 46474	46204	698,05	586,58	9,80	5,17	113,42	71,20	Polysaccharide Lyase	Oui	Paroi
[g] Travel1 60363	60093	367,62	61,08	5,22	9,33	6,54	70,41	Peptidoglycane	Oui	Catabolisme de la paroi
[g] Travel1 129899	129629	117,61	26,34	2,41	4,82	5,46	48,71	Peptidoglycane	Oui	Catabolisme de la paroi
[g] Travel1 60067	59797	233,44	300,78	30,84	43,01	6,99	7,57	GH 16	Oui	Catabolisme de la paroi
[g] Travel1 30244	29974	203,82	115,90	27,54	27,33	4,24	7,40	GH 79, endo-beta-N-glucuronidase, heparanase	Oui	Catabolisme de la paroi
[g] Travel1 138479	138209	398,96	560,57	56,02	62,71	8,94	7,12	GH	Oui	Catabolisme de la paroi
[g] Travel1 30243	29973	162,21	103,76	25,36	26,40	3,93	6,40	GH 79, endo-beta-N-glucuronidase, heparanase	Oui	Catabolisme de la paroi
[g] Travel1 142394	142124	331,56	334,14	64,39	66,04	5,06	5,15	GH 23	Oui	Catabolisme de la paroi
[g] Travel1 144439	144169	831,19	701,71	20,88	55,90	12,55	39,81	CE 4	Oui	Paroi, chitine deacetylase ?
[g] Travel1 168381	168111	194,61	252,30	15,62	6,58	38,33	12,46	CE 4	Oui	Paroi, chitine deacetylase ?
[g] Travel1 64798	64528	121,22	68,67	16,34	12,11	5,67	7,42	beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase	Oui	Paroi, chitine deacetylase ?
[g] Travel1 73716	73446	126,80	236,60	4,51	7,90	29,96	28,11	Chitinase	Oui	Paroi, chitine degradation
[g] Travel1 74223	73953	512,16	734,39	13,81	30,32	24,22	37,08	beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase	Oui	Paroi, chitine synthesis ??
[g] Travel1 71657	71387	207,70	159,28	11,72	16,00	9,96	17,72	Chromatine complexe proteine	Non	Structure chromatine
[g] Travel1 19558	19288	187,69	226,81	6,74	13,52	16,78	27,84	Chromatine complexe proteine	Oui	Structure chromatine
[g] Travel1 74967	74697	358,88	428,22	59,01	62,90	6,81	6,08	Chromatine complexe proteine	Oui	Structure chromatine
[g] Travel1 51707	51437	333,63	93,79	10,22	31,42	2,98	32,64	Cytochrome P450	Non	Detoxication
[g] Travel1 60538	60268	216,21	227,56	7,19	26,03	8,74	30,06	Aldo/keto reductase	Non	Detoxication
[g] Travel1 142067	141797	334,33	36,50	18,44	15,82	2,31	18,13	Glycosyltransferase 1	Non	Detoxication
[g] Travel1 173933	173663	388,95	181,97	56,96	64,69	2,81	6,83	HSP70	Non	Detoxication
[g] Travel1 61192	60922	162,06	286,86	24,70	53,09	5,40	6,56	Proteine Heat shock	Non	Detoxication
[g] Travel1 68665	68395	490,53	77,47	5,91	11,94	6,49	82,95	RTA1 /Detoxication	Oui	Detoxication
[g] Travel1 49140	48870	1198,30	437,49	25,00	58,64	7,46	47,94	Dyp-type peroxidase, DyP1	Oui	Detoxication
[g] Travel1 51706	51436	239,98	40,33	6,36	15,39	2,62	37,76	Cytochrome P450	Oui	Detoxication
[g] Travel1 139912	139642	313,90	170,80	14,38	26,04	6,56	21,82	RTA1	Oui	Detoxication
[g] Travel1 55305	55035	292,09	195,81	16,03	52,84	3,71	18,22	MAPEG	Oui	Detoxication
[g] Travel1 144361	144091	389,61	687,73	34,70	27,97	24,59	11,23	Cytochrome P450	Oui	Detoxication
[g] Travel1 38191	37921	782,13	332,04	71,14	46,03	7,21	10,99	Aldehyde dehydrogenase	Oui	Detoxication
[g] Travel1 75330	75060	152,65	117,24	4,31	9,64	12,16	35,43	Reductase SDR	Non	Detoxication/degradation
[g] Travel1 115071	114801	267,11	81,92	9,50	13,75	5,96	28,11	Reductase SDR	Non	Detoxication/degradation
[g] Travel1 176006	175736	150,84	11,65	6,13	24,41	0,48	24,63	Kynurenine 3-monooxygenase	Non	Detoxication/degradation
[g] Travel1 147709	147439	415,93	529,41	23,06	25,35	20,89	18,04	HGG motif-containing thioesterase	Non	Detoxication/degradation
[g] Travel1 111757	111487	144,34	84,42	13,43	20,94	4,03	10,75	PDR1-15	Non	Detoxication/degradation
[g] Travel1 161839	161569	205,48	306,32	29,77	26,14	11,72	6,90	Aldo/keto reductase	Non	Detoxication/degradation
[g] Travel1 130608	130338	112,68	26,28	16,46	19,82	1,33	6,85	Cytochrome P450	Non	Detoxication/degradation
[g] Travel1 61522	61252	281,05	209,49	45,01	44,99	4,66	6,24	Cpn60/Hsp60p	Non	Detoxication/degradation
[g] Travel1 49217	48947	172,95	478,46	3,43	3,33	143,88	50,41	Kynurenine 3-monooxygenase	Oui	Detoxication/degradation
[g] Travel1 56598	56328	362,05	165,88	25,70	61,90	2,68	14,09	Reductase SDR	Oui	Detoxication/degradation
[g] Travel1 75738	75468	174,87	50,69	19,56	120,43	0,42	8,94	Kynurenine 3-monooxygenase	Oui	Detoxication/degradation
[g] Travel1 31029	30759	301,12	71,86	34,98	58,01	1,24	8,61	Reductase SDR	Oui	Detoxication/degradation
[g] Travel1 38953	38683	200,57	111,66	27,48	36,38	3,07	7,20	Aldehyde dehydrogenase	Oui	Detoxication/degradation
[g] Travel1 150116	149846	447,55	485,03	61,53	73,32	6,62	7,27	Cytochrome P450	Oui	Detoxication/degradation
[g] Travel1 30929	30659	131,33	79,36	18,62	25,51	3,11	7,05	RTA1 Detoxication	Oui	Detoxication/degradation
[g] Travel1 151000	150730	1216,69	1597,63	199,73	199,71	8,00	6,09	Lipase	Oui	Detoxication/degradation
[g] Travel1 19526	19256	788,97	771,15	137,43	134,52	5,73	5,74	Aldehyde dehydrogenase	Oui	Detoxication/degradation membrane
[g] Travel1 167159	166889	417,42	632,57	8,96	14,63	43,25	46,56	Hsp20	Non	Detoxication/stress
[g] Travel1 25502	25232	292,32	318,38	6,25	15,14	21,03	46,77	Facteur Von Willebrand	Non	Detoxication/stress
[g] Travel1 62440	62170	486,31	578,62	16,68	25,60	22,61	29,16	Facteur Von Willebrand	Non	Detoxication/stress
[g] Travel1 149556	149286	544,53	550,56	18,65	27,81	19,80	29,20		Oui	Transport
[g] Travel1 126857	126587	171,85	152,74	0,90	2,20	69,34	191,72	Sphingolipid hydroxylase	Non	Transport et métabolisme des lipides
[g] Travel1 27192	26922	174,77	172,07	3,48	6,36	27,05	50,19	Acyl-CoA N-acyltransferases (Nat)	Non	Transport et métabolisme des lipides
[g] Travel1 32223	31953	3091,25	4447,52	137,59	100,55	44,23	22,47	Methylsterol monooxygenase	Non	Transport et métabolisme des lipides
[g] Travel1 28733	28463	1597,44	1808,85	118,50	74,28	24,35	13,48	Desaturase d'acide gras, type 1	Non	Transport et métabolisme des lipides
[g] Travel1 130025	129755	1653,75	1265,41	152,60	97,42	12,99	10,84	Desaturase d'acide gras (cytochrome b5)	Non	Transport et métabolisme des lipides
[g] Travel1 152143	151873	352,75	669,33	38,07	41,97	15,95	9,27	Sphingolipid hydroxylase	Non	Transport et métabolisme des lipides
[g] Travel1 60136	59866	147,98	231,01	16,98	22,64	10,20	8,72	Dihydroceramide delta-4-desaturase	Non	Transport et métabolisme des lipides
[g] Travel1 65031	64761	197,02	175,04	36,56	34,93	5,01	5,39	Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipide synthase	Non	Transport et métabolisme des lipides
[g] Travel1 32111	31841	218,91	229,73	24,06	25,10	9,15	9,10	Monooxygenase	Oui	Transport et métabolisme des lipides
[g] Travel1 114196	113926	140,47	73,36	16,88	28,59	2,57	8,32	Lipase	Oui	Transport et métabolisme des lipides
[g] Travel1 30051	29781	117,48	103,64	14,12	18,99	5,46	8,32	Lipase	Oui	Transport et métabolisme des lipides
[g] Travel1 31463	31193	107,53	200,83	15,11	23,02	8,72	7,11	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	Oui	Transport et métabolisme des lipides
[g] Travel1 130132	129862	112,78	55,56	20,92	16,59	3,35	5,39	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase	Oui	Transport et métabolisme des lipides
[g] Travel1 143987	143717	516,83	309,06	3,57	29,99	10,31	144,87	Glycolate oxidase	Non	Metabolisme
[g] Travel1 58362	58092	111,45	45,81	5,29	7,19	6,37	21,05	2-oxoglutarate dehydrogenase	Non	Metabolisme
[g] Travel1 70827	70557	632,01	325,04	50,88	66,63	4,88	12,42	Succinyl-CoA:alpha-ketoacid-CoA transferase	Non	Metabolisme
[g] Travel1 69551	69281	1427,69	901,96	231,08	361,27	2,50	6,18	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	Non	Metabolisme
[g] Travel1 64534	64264	164,68	134,92	29,69	23,29	5,79	5,55	Facteur eIF-3a	Non	Metabolisme
[g] Travel1 154584	154314	127,85	129,52	23,11	28,12	4,61	5,53	Translocase, TIM22	Non	Metabolisme
[g] Travel1 139480	139210	320,13	383,62	62,60	75,99	5,05	5,11	Dihydrolipoamide acetyltransferase	Non	Metabolisme
[g] Travel1 64399	64129	251,03	346,12	6,60	7,80	44,36	38,03	Ribosomal proteine S16	Oui	Metabolisme
[g] Travel1 126221	125951	122,64	125,13	7,30	17,11	7,31	29,14	60S ribosomal proteine L22	Oui	Metabolisme
[g] Travel1 54443	54173	564,18	784,20	39,65	49,87	15,72	14,23	Glycogen synthase kinase-3	Oui	Metabolisme
[g] Travel1 142929	142659	103,97	111,16	7,69	19,74	5,63	13,52	Succinic semialdehyde dehydrogenase	Oui	Metabolisme
[g] Travel1 56919	56649	387,64	233,47	31,17	31,83	7,34	12,44	Isomerase	Oui	Metabolisme
[g] Travel1 42267	41997	4822,38	4688,53	856,05	1007,57	4,65	5,63	Mitochondrial ADP/ATP proteine	Oui	Metabolisme
[g] Travel1 29384	29114	1338,30	1638,70	249,89	207,63	7,89	5,36	GH 16	Oui	Metabolisme cazy
[g] Travel1 30530	30260	189,18	503,96	35,82	49,29	10,22	5,28	GH 13	Oui	Metabolisme cazy
[g] Travel1 176367	176097	123,40	38,07	10,41	8,19	4,65	11,86	Peptidase M36	Non	Degradation protéique
[g] Travel1 121765	121495	498,83	227,61	51,27	62,40	3,65	9,73	Oxidase	Non	Metabolisme, Transport d'électrons
[g] Travel1 38868	38598	155,25	97,61	20,15	26,39	3,70	7,70	Mitochondrial oxodicarboxylate	Non	Metabolisme, Transport d'électrons
[g] Travel1 133327	133057</									

NUMERO DE GENE	ID PROTEINE	1218 t2Semaines	1218 t4Semaines	1252 t2Semaines	1252 t4Semaines	1218/1252 t4semaines	1218/1252 t2semaines	ROLE DE LA PROTEINE	Peptide signal	Classe
g l Trave1 75499	75229	3009,05	5025,42	243,16	280,76	17,90	12,38	Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit VIc	Oui	Metabolisme, Transport d'électrons
g l Trave1 37993	37723	2081,12	1139,93	261,70	459,00	2,48	7,95	Cytochrome c, class IA/ IB	Oui	Metabolisme, Transport d'électrons
g l Trave1 27566	27286	163,55	183,24	25,50	30,94	5,92	6,41	Cytochrome oxidase COX15	Oui	Metabolisme, Transport d'électrons
g l Trave1 61770	61500	1611,39	1228,13	258,06	269,70	4,55	6,24	F0F1-type ATP synthase	Oui	Metabolisme, Transport d'électrons
g l Trave1 42018	41748	368,71	230,86	51,95	56,72	4,07	7,10	Succinyl-CoA ligase	Non	Metabolisme, TCA
g l Trave1 145051	144781	743,79	840,75	147,89	133,62	6,29	5,03	NAD-dependent malate dehydrogenase	Non	Metabolisme, TCA
g l Trave1 118482	118212	520,68	291,08	69,51	72,49	4,02	7,49	Isocitrate dehydrogenase	Oui	Metabolisme, TCA
g l Trave1 147858	147588	1189,36	1402,71	63,64	41,21	34,04	18,69		Oui	Metabolismet
g l Trave1 166513	166243	1399,50	1596,70	56,13	125,71	12,70	24,93	Lyase	Non	Metabolisme, glyoxalate
g l Trave1 173372	173102	107,03	83,79	5,05	55,26	1,52	21,21	Reductase	Non	Metabolisme, glyoxalate
g l Trave1 138353	138083	125,88	56,23	9,18	10,24	5,49	13,71		Non	Metabolisme, glyoxalate
g l Trave1 124953	124683	167,17	124,59	13,22	17,49	7,12	12,65	Bifunctional GTP cyclohydrolase	Oui	Metabolisme, riboflavin
g l Trave1 109385	109115	689,91	523,15	128,03	92,53	5,65	5,39	Aspartate aminotransferase	Non	Degradation de protéines
g l Trave1 63174	62904	172,03	27,03	4,13	3,59	7,53	41,62	Peptidase S8 and S53	Oui	Degradation de protéines
g l Trave1 31274	31004	531,16	431,58	16,48	67,35	6,41	32,23	Peptidase S8 and S53	Oui	Degradation de protéines
g l Trave1 166458	166188	562,13	67,67	18,34	21,88	3,09	30,65	Peptidase S8 and S53	Oui	Degradation de protéines
g l Trave1 69630	69360	157,45	125,08	5,61	4,73	26,47	28,07	Protease	Oui	Degradation de protéines
g l Trave1 66460	66190	128,55	102,62	4,63	5,89	17,42	27,79	Peptidase S10	Oui	Degradation de protéines
g l Trave1 163562	163292	101,12	16,41	4,43	2,12	7,76	22,82	Metalloproteases	Oui	Degradation de protéines
g l Trave1 69325	69055	410,42	30,94	24,66	29,40	1,05	16,65	Peptidase A1	Oui	Degradation de protéines
g l Trave1 152880	152610	252,82	468,76	16,90	28,28	16,57	14,96	Peptidase S8 and S53	Oui	Degradation de protéines
g l Trave1 156976	156706	725,46	726,78	61,84	30,86	23,55	11,73	Peptidase A1	Oui	Degradation de protéines
g l Trave1 40551	40281	129,12	55,33	13,27	25,94	2,13	9,73	Protease	Oui	Degradation de protéines
g l Trave1 158272	158002	128,51	20,18	22,25	15,64	1,29	5,78	Endopeptidase	Oui	Degradation de protéines
g l Trave1 157595	157325	109,45	133,09	19,49	23,12	5,76	5,62	Arginase	Oui	Degradation de protéines
g l Trave1 69618	69348	149,54	163,02	29,38	35,78	4,56	5,09	Protease	Oui	Degradation de protéines
g l Trave1 27190	26920	179,25	101,18	5,84	9,19	11,01	30,69	Ribonucleoproteine	Non	
g l Trave1 155309	155039	213,72	137,70	13,32	12,23	11,26	16,04	Synthetase	Non	Metabolisme
g l Trave1 125200	124930	204,15	83,39	33,20	41,59	2,00	6,15	Terpene synthase	Oui	Metabolisme
g l Trave1 140263	139993	113,90	43,10	18,91	20,12	2,14	6,02	Kinase	Non	Signal transduction
g l Trave1 16709	16439	159,99	251,02	14,84	33,75	7,44	10,78	Lectin C	Oui	Signal transduction
g l Trave1 72194	71924	163,63	238,05	10,07	12,86	18,51	16,25	GRB7, GRB10, GRB14	Non	Signal
g l Trave1 109473	109203	259,15	439,60	45,41	120,88	3,64	5,71	SKI/SNO	Non	Transcription
g l Trave1 115656	115386	245,85	116,25	9,58	8,18	14,20	25,67	Synaptique transporteur	Non	Transport
g l Trave1 31580	31310	196,20	137,38	22,03	55,36	2,48	8,90		Non	Transport
g l Trave1 43705	43435	105,38	29,92	12,90	14,06	2,13	8,17	Synaptique transporteur	Non	Transport
g l Trave1 140131	139861	200,89	268,42	30,18	38,95	6,89	6,66	Transporteur acide aminé	Non	Transport
g l Trave1 66539	66269	241,76	208,29	44,87	27,12	7,68	5,39	Transporteurs	Non	Transport
g l Trave1 162677	162407	258,47	290,42	48,14	49,70	5,84	5,37	Transporteurs	Non	Transport
g l Trave1 127916	127646	216,51	72,84	7,07	9,35	7,79	30,60	Transporteurs	Oui	Transport
g l Trave1 20403	20133	201,01	242,39	24,90	33,75	7,18	8,07	Transporteur acide aminé	Oui	Transport
g l Trave1 72832	72562	122,52	139,34	15,21	25,74	5,41	8,06	Transporteurs	Oui	Transport
g l Trave1 152715	152445	136,74	164,62	21,44	22,47	7,33	6,38	Permease	Oui	Transport
g l Trave1 154996	154726	1712,41	1756,98	278,49	264,41	6,64	6,15	Reductase	Non	Transport ion inorganique
g l Trave1 25565	25295	204,30	192,18	36,18	46,26	4,15	5,65		Oui	Transport ion inorganique
g l Trave1 53078	52808	411,41	394,67	0,01	0,00	#DIV/0!	31615,78	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 52683	52413	270,03	191,79	0,08	0,18	1073,98	3481,25	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 31267	30997	5062,11	3920,59	17,67	86,13	45,52	286,42	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 48954	48684	140,07	192,82	2,12	1,85	104,29	65,96	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 74349	74079	4358,22	3107,86	86,05	145,39	21,38	50,65	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 23466	23196	101,76	1882,63	2,09	3,43	549,64	48,63	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 28565	28295	2954,03	2170,91	81,58	84,18	25,79	36,21	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 122700	122430	469,53	299,92	14,62	34,22	8,77	32,11	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 126479	126209	188,61	82,32	6,23	6,01	13,69	30,27	Isomérase	Non	Inconnue
g l Trave1 73828	73558	141,29	234,30	4,97	20,49	11,43	28,42	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 50514	50244	427,83	510,65	15,94	24,68	20,69	26,84	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 30102	29832	329,00	305,78	14,61	17,31	17,66	22,52	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 128024	127754	397,11	66,46	18,22	25,52	2,60	21,80	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 52828	52558	467,18	766,09	24,07	30,95	24,75	19,41	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 73832	73562	132,21	28,59	6,82	12,50	2,29	19,40	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 68423	68153	649,91	550,54	37,39	49,20	11,19	17,38	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 19493	19223	299,24	133,70	22,76	26,68	5,01	13,15	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 69360	69090	205,43	309,40	16,81	25,97	11,92	12,22	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 169032	168762	349,12	286,21	30,76	65,88	4,34	11,35	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 29955	29685	1847,94	3899,69	169,25	1985,77	1,96	10,92	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 29890	29620	133,85	67,56	13,19	26,09	2,59	10,15	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 28553	28283	1669,76	949,35	164,84	135,68	7,00	10,13	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 45033	44763	142,66	1115,26	14,50	19,77	56,42	9,84	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 42677	42407	127,78	288,40	14,47	58,24	4,95	8,83	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 157196	156926	110,54	255,73	12,66	23,98	10,66	8,73	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 101701	101431	218,55	236,54	28,28	54,29	4,36	7,73	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 172195	171925	230,13	142,95	30,15	56,33	2,54	7,63	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 87696	87426	309,52	777,46	46,01	48,24	16,12	6,73	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 31432	31162	1244,90	886,40	205,32	364,89	2,43	6,06	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 26662	26392	482,27	784,91	81,42	76,35	10,28	5,92	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 139983	139713	918,00	1576,04	157,89	381,29	4,13	5,81	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 176100	175830	289,54	352,42	50,45	48,84	7,22	5,74	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 45383	45113	116,04	51,21	20,60	30,24	1,69	5,63	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 71396	71126	346,34	459,18	67,30	180,93	2,54	5,15	Inconnue	Non	Inconnue
g l Trave1 32093	31823	2557,04	1165,92	2,37	4,44	262,71	1078,51	Inconnue	Oui	Inconnue
g l Trave1 173783	173513	110,46	48,41	0,15	0,36	135,79	714,51	Inconnue	Oui	Inconnue
g l Trave1 104031	103761	433,85	10,10	0,72	6,30	1,60	604,07	Inconnue	Oui	Inconnue
g l Trave1 61687	61417	266,11	513,07	0,49	10,52	48,76	546,24	Inconnue	Oui	Inconnue
g l Trave1 55215	54945	921,30	967,47	3,79	9,17	105,46	243,12	Inconnue	Oui	Inconnue
g l Trave1 52288	52018	131,62	63,32	0,58	0,75	84,01	225,64	Inconnue	Oui	Inconnue
g l Trave1 27805	27535	511,51	608,95	2,32	2,93	207,53	220,63	Inconnue	Oui	Inconnue
g l Trave1 70871	70601	1798,81	414,01	11,86	19,61	21,11	151,67	Inconnue	Oui	Inconnue
g l Trave1 116538	116268	963,55	585,79	6,73	11,99	48,85	143,23	Endoglucanase	Oui	Inconnue
g l Trave1 60359	60089	131,18	123,40	0,92	3,79	32,52	142,49	Inconnue	Oui	Inconnue
g l Trave1 40917	40647	2874,72	778,75	25,23	42,32	18,40	113,94	Inconnue	Oui	Inconnue
g l Trave1 94120	93850	225,40	412,02	2,97	14,68	28,07	75,91	Inconnue	Oui	Inconnue
g l Trave1 45458	45188	100,84	26,35	1,71	1,93	13,64	59,09	Inconnue	Oui	Inconnue
g l Trave1 32101	31831	155,14	66,73	2,93	3,45	19,36	52,93	Inconnue	Oui	Inconnue
g l Trave1 150850	150580	4981,84	6552,39	137,54	92,95	70,49	36,22	C-type lectin	Oui	Inconnue
g l Trave1 75762	75492	948,07	1268,58	32,20	67,50	18,79	29,44	Inconnue	Oui	Inconnue
g l Trave1 28747	28477	187,95	107,64	6,75	18,52	5,81	27,83	Inconnue	Oui	Inconnue
g l Trave1 75295	75025	377,14	175,09	13,92	85,17	2,06	27,09	Inconnue	Oui	Inconnue
g l Trave1 132312	132042	1340,29	329,78	50,53	124,51	2,65	26,53	Inconnue	Oui	Inconnue
g l Trave1 137471	137201	309,98	39,58	12,09	13,84	2,86	25,64	Inconnue	Oui	Inconnue
g l Trave1 36476	36206	257,40	493,47	12,08	22,34	22,09	21,31	Endoglucanase	Oui	Inconnue
g l Trave1 49456	49186	189,85	18,85	8,94	11,28	1,67	21,23	Inconnue	Oui	Inconnue
g l Trave1 39277	39007	245,41	456,34	11,57	17,18	26,57	21,21	Inconnue	Oui	Inconnue

NUMERO DE GENE	ID PROTEINE	1218 t2Semaines	1218 t4Semaines	1252 t2Semaines	1252 t4Semaines	1218/1252 t4Semaines	1218/1252 t2Semaines	ROLE DE LA PROTEINE	Peptide signal	Classe
[g] Trave1 28216	27946	243,20	88,27	11,53	19,51	4,52	21,10	Inconnue	Oui	Inconnue
[g] Trave1 56186	55916	368,03	609,75	19,43	46,85	13,01	18,94	Inconnue	Oui	Inconnue
[g] Trave1 73924	73654	363,67	616,81	22,66	41,28	14,94	16,05	Inconnue	Oui	Inconnue
[g] Trave1 38208	37938	165,57	228,72	12,14	22,36	10,23	13,64	Inconnue	Oui	Inconnue
[g] Trave1 31631	31361	141,33	49,72	11,14	25,81	1,93	12,69	Thaumatine	Oui	Inconnue
[g] Trave1 28605	28335	197,01	188,04	15,95	21,63	8,69	12,35	Endoglucanase	Oui	Inconnue
[g] Trave1 48474	48204	329,14	125,11	27,61	31,48	3,97	11,92	Inconnue	Oui	Inconnue
[g] Trave1 70672	70402	209,59	91,46	19,43	17,06	5,36	10,78	Endoglucanase	Oui	Inconnue
[g] Trave1 152443	152173	3316,32	2151,14	335,30	184,88	11,64	9,89	Inconnue	Oui	Inconnue
[g] Trave1 132250	131980	112,60	10,47	12,07	15,73	0,67	9,33	Inconnue	Oui	Inconnue
[g] Trave1 152808	152538	163,50	155,14	17,74	19,76	7,85	9,21	Inconnue	Oui	Inconnue
[g] Trave1 23062	22792	264,34	24,12	31,56	41,27	0,58	8,37	Inconnue	Oui	Inconnue
[g] Trave1 29118	28848	156,62	60,06	19,28	81,26	0,74	8,12	Inconnue	Oui	Inconnue
[g] Trave1 72343	72073	1988,04	1859,81	287,91	208,81	8,91	6,91	Inconnue	Oui	Inconnue
[g] Trave1 41651	41381	7022,58	15013,16	1146,53	735,96	20,40	6,13	Inconnue	Oui	Inconnue
[g] Trave1 133504	133234	253,59	350,26	43,77	51,86	6,75	5,79	Inconnue	Oui	Inconnue
[g] Trave1 66626	66356	281,78	124,66	48,88	114,77	1,09	5,76	Inconnue	Oui	Inconnue
[g] Trave1 32058	31788	285,10	382,74	56,50	87,54	4,37	5,05	C-type lectin	Oui	Inconnue
[g] Trave1 71241	70971	227,27	327,77	45,22	33,44	9,80	5,03	Inconnue	Oui	Inconnue
[g] Trave1 172764	172494	190,51	164,70	4,37	7,87	20,93	43,55		Non	Metabolisme
[g] Trave1 150993	150723	160,82	21,82	5,57	9,04	2,42	28,87	Inconnue (membrane)	Non	Inconnue (membrane)
[g] Trave1 57458	57188	392,74	495,84	13,63	36,91	13,43	28,81	Inconnue (membrane)	Non	Inconnue (membrane)
[g] Trave1 176581	176311	150,80	112,81	20,51	40,01	2,82	7,35	Inconnue (membrane)	Non	Inconnue (membrane)
[g] Trave1 167068	166798	174,37	199,97	31,68	34,96	5,72	5,50	Inconnue (membrane)	Non	Inconnue (membrane)
[g] Trave1 73097	72827	207,25	163,19	5,11	8,96	18,22	40,52	Inconnue (membrane)	Oui	Inconnue (membrane)
[g] Trave1 35544	35274	539,17	651,68	15,55	14,91	43,71	34,67	Inconnue (membrane)	Oui	Inconnue (membrane)
[g] Trave1 50539	50269	127,15	101,05	5,16	6,07	16,64	24,62	Inconnue (membrane)	Oui	Inconnue (membrane)
[g] Trave1 65951	65681	107,64	11,00	4,44	4,79	2,30	24,25	Inconnue (membrane)	Oui	Inconnue (membrane)
[g] Trave1 57568	57298	693,79	1032,50	35,03	21,38	48,30	19,80	Inconnue (membrane)	Oui	Inconnue (membrane)
[g] Trave1 59201	58931	207,60	392,23	10,63	12,28	31,94	19,52	Inconnue (membrane)	Oui	Inconnue (membrane)
[g] Trave1 30810	30540	229,44	156,96	18,73	18,65	8,41	12,25	Inconnue (membrane)	Oui	Inconnue (membrane)
[g] Trave1 117644	117374	180,33	136,90	15,05	10,70	12,80	11,98	Inconnue (membrane)	Oui	Inconnue (membrane)
[g] Trave1 74460	74190	115,80	69,41	9,91	18,99	3,66	11,68	Inconnue (membrane)	Oui	Inconnue (membrane)
[g] Trave1 171918	171648	101,37	99,90	9,00	7,23	13,81	11,27	Inconnue (membrane)	Oui	Inconnue (membrane)
[g] Trave1 65751	65481	188,47	114,91	17,38	27,93	4,11	10,84	Inconnue (membrane)	Oui	Inconnue (membrane)
[g] Trave1 30774	30504	354,46	213,88	38,05	35,14	6,09	9,32	Inconnue (membrane)	Oui	Inconnue (membrane)
[g] Trave1 39421	39151	118,24	124,51	14,10	17,99	6,92	8,38	Inconnue (membrane)	Oui	Inconnue (membrane)
[g] Trave1 139175	138905	222,82	315,81	26,90	29,29	10,78	8,28	Inconnue (membrane)	Oui	Inconnue (membrane)
[g] Trave1 163962	163692	128,94	136,15	22,32	35,55	3,83	5,78	Inconnue (membrane)	Oui	Inconnue (membrane)

**Annexe 12 : Tableau protéiques des 50 protéines les plus abondante présentent dans les
sécrétomes de chêne aubier, sécrétome de hêtre et exsudat**

	C1218	C1219	C1532	C1234	C1252	C110102	C70
jgi Trave1 136431 e_gw1.15.102.1	1,00	11,00	8,00	0,00	1,00	18,00	26,00
jgi Trave1 112163 e_gw1.1.1465.1	2,36	3,82	5,00	0,82	4,73	4,91	7,00
jgi Trave1 30879 fgenes1_kg.10_#_131_#_isotig01075	2,00	3,00	2,00	0,00	5,00	3,00	6,00
jgi Trave1 43578 gm1.2462_g	0,40	3,60	3,40	0,20	0,40	8,00	4,80
jgi Trave1 28848 fgenes1_kg.5_#_434_#_isotig03352	0,00	0,00	1,00	0,00	2,50	2,50	6,50
jgi Trave1 48870 gm1.7754_g	3,05	0,80	1,60	0,20	0,45	3,50	1,65
jgi Trave1 33056 fgenes1_pm.1_#_400	3,25	2,75	2,00	0,75	1,75	3,25	3,00
jgi Trave1 63826 estExt_fgenes1_pg.C_4_t10147	5,67	2,00	2,08	1,50	3,25	2,25	2,50
jgi Trave1 54134 gm1.13018_g	0,36	4,55	1,00	0,18	0,73	2,27	0,45
jgi Trave1 52976 gm1.11860_g	0,00	1,33	2,33	0,50	0,83	3,17	1,33
jgi Trave1 38102 fgenes1_pm.7_#_405	1,70	1,90	1,80	0,50	3,00	1,20	2,50
jgi Trave1 114944 e_gw1.2.1056.1	0,00	1,33	1,33	0,17	0,83	2,33	4,17
jgi Trave1 116268 e_gw1.3.2123.1	7,00	1,00	1,00	0,00	2,00	2,00	0,00
jgi Trave1 52333 gm1.11217_g	0,00	1,50	1,50	0,17	1,17	2,50	4,50
jgi Trave1 133731 e_gw1.12.519.1	0,00	1,33	1,33	0,17	1,00	2,33	4,17
jgi Trave1 112835 e_gw1.2.1070.1	0,00	2,43	1,71	0,29	0,71	3,43	2,86
jgi Trave1 33948 fgenes1_pm.2_#_34	0,00	0,38	0,75	0,25	1,25	0,75	3,00
jgi Trave1 43477 gm1.2361_g	0,08	1,50	2,42	0,33	0,83	2,67	3,75
jgi Trave1 125941 e_gw1.7.676.1	2,53	1,80	1,40	0,87	2,47	1,73	2,00
jgi Trave1 37024 fgenes1_pm.5_#_453	1,27	2,54	1,31	0,69	0,88	1,69	2,77
jgi Trave1 138138 estExt_Genewise1.C_1_t10292	0,82	1,00	0,91	0,36	1,09	2,18	2,64
jgi Trave1 66957 estExt_fgenes1_pg.C_120133	1,29	1,14	1,43	0,43	0,86	1,14	1,29
jgi Trave1 159926 estExt_Genewise1Plus.C_1_t70416	0,17	1,58	1,75	0,42	1,50	2,00	3,00
jgi Trave1 109109 e_gw1.1.2102.1	0,28	1,44	0,89	0,00	0,39	3,11	2,22
jgi Trave1 39965 fgenes1_pm.12_#_28	0,25	1,08	0,75	0,17	1,08	2,08	2,08
jgi Trave1 159574 estExt_Genewise1Plus.C_1_t60393	1,10	0,80	0,90	0,60	1,80	1,60	1,40
jgi Trave1 134721 e_gw1.13.1089.1	2,60	1,00	0,40	0,00	0,60	1,20	1,20
jgi Trave1 70662 estExt_Genemark1.C_4_t10231	1,17	0,67	1,33	0,00	1,50	2,00	2,17
jgi Trave1 112899 e_gw1.2.1846.1	0,92	0,75	0,83	0,17	0,92	1,08	0,92
jgi Trave1 28335 fgenes1_kg.4_#_615_#_isotig10902	6,00	1,00	0,00	0,00	3,00	2,00	2,00
jgi Trave1 124366 e_gw1.6.717.1	3,15	1,77	1,85	1,15	2,38	1,77	1,38
jgi Trave1 62730 estExt_fgenes1_pg.C_2_t10361	1,25	0,00	0,00	0,00	1,00	0,50	0,25
jgi Trave1 68175 estExt_Genemark1.C_1_t20147	0,75	1,00	1,25	0,25	1,00	2,50	1,00
jgi Trave1 141077 estExt_Genewise1.C_2_t10400	2,00	0,00	0,50	0,00	1,50	0,50	1,00
jgi Trave1 73474 estExt_Genemark1.C_9_t10209	0,64	1,55	1,91	0,27	1,27	2,00	1,73
jgi Trave1 25402 fgenes1_kg.1_#_223_#_isotig01416	1,00	0,33	0,17	0,00	1,00	0,67	0,83
jgi Trave1 89076 gw1.3.1186.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
jgi Trave1 43877 gm1.2761_g	0,33	0,67	0,00	0,00	0,67	0,67	0,33
jgi Trave1 141321 estExt_Genewise1.C_2_t20384	1,40	1,40	1,60	1,00	1,60	1,80	1,20
jgi Trave1 59914 estExt_fgenes1_pm.C_9_t10159	1,29	1,35	1,29	0,47	0,82	1,82	1,71
jgi Trave1 37357 fgenes1_pm.6_#_209	1,57	1,57	1,29	0,71	1,00	1,57	1,00
jgi Trave1 150608 estExt_Genewise1.C_7_t40230	2,00	0,25	0,75	0,25	0,50	0,25	0,50
jgi Trave1 174721 estExt_Genewise1Plus.C_13_t10247	0,08	1,48	1,00	0,08	0,92	1,00	0,80
jgi Trave1 147958 estExt_Genewise1.C_5_t40227	0,78	0,74	0,74	0,26	1,00	1,00	1,48
jgi Trave1 161823 estExt_Genewise1Plus.C_2_t50365	1,25	0,75	0,50	0,50	0,25	1,75	1,25
jgi Trave1 52416 gm1.11300_g	0,40	0,80	1,80	0,30	1,00	1,70	0,80
jgi Trave1 110860 e_gw1.1.2477.1	0,71	1,08	0,46	0,21	1,04	1,63	0,67
jgi Trave1 64339 estExt_fgenes1_pg.C_5_t10057	0,00	1,00	0,67	0,33	0,67	1,33	0,67
jgi Trave1 168624 estExt_Genewise1Plus.C_6_t40123	0,44	1,22	1,00	0,00	0,89	1,11	1,00
jgi Trave1 69348 estExt_Genemark1.C_2_t20327	0,86	0,71	0,57	0,14	0,86	0,71	0,86

	C71	C44889	C15544	M1218	H1218	H1219	H1532
jgi Trave1 136431 e_gw1.15.102.1	1,00	35,00	30,00	0,00	1,00	3,00	2,00
jgi Trave1 112163 e_gw1.1.1465.1	2,18	6,18	6,45	0,09	1,64	8,09	14,18
jgi Trave1 30879 fgenes1_kg.10_#_131_#_isotig01075	3,00	4,00	4,00	6,00	3,00	3,00	6,00
jgi Trave1 43578 gm1.2462_g	1,20	8,20	6,00	0,00	0,00	7,60	5,80
jgi Trave1 28848 fgenes1_kg.5_#_434_#_isotig03352	6,50	9,00	0,50	1,00	1,00	1,00	1,00
jgi Trave1 48870 gm1.7754_g	2,90	2,60	0,80	15,65	1,10	1,45	5,25
jgi Trave1 33056 fgenes1_pm.1_#_400	0,75	3,25	2,25	0,00	3,75	8,25	3,75
jgi Trave1 63826 estExt_fgenes1_pg.C_4_t10147	1,58	2,42	2,33	1,17	1,25	2,25	4,58
jgi Trave1 54134 gm1.13018_g	0,09	0,18	2,73	0,00	1,00	13,27	2,91
jgi Trave1 52976 gm1.11860_g	1,33	2,33	2,67	1,17	0,50	1,67	5,00
jgi Trave1 38102 fgenes1_pm.7_#_405	2,00	1,50	1,60	0,30	2,10	4,00	3,80
jgi Trave1 114944 e_gw1.2.1056.1	0,83	2,83	2,00	0,00	0,67	4,83	4,17
jgi Trave1 116268 e_gw1.3.2123.1	4,00	0,00	2,00	23,00	3,00	1,00	0,00
jgi Trave1 52333 gm1.11217_g	0,67	2,50	1,67	0,00	0,17	4,50	4,67
jgi Trave1 133731 e_gw1.12.519.1	1,00	2,83	2,00	0,17	0,67	4,33	4,17
jgi Trave1 112835 e_gw1.2.1070.1	1,00	4,14	2,14	0,71	0,00	3,71	2,86
jgi Trave1 33948 fgenes1_pm.2_#_34	2,13	1,00	0,50	0,00	0,13	5,63	2,75
jgi Trave1 43477 gm1.2361_g	0,83	4,17	3,00	0,17	0,17	3,08	3,33
jgi Trave1 125941 e_gw1.7.676.1	1,13	1,93	1,87	0,07	0,40	2,73	3,40
jgi Trave1 37024 fgenes1_pm.5_#_453	1,04	3,12	2,00	2,12	0,65	2,04	2,42
jgi Trave1 138138 estExt_Genewise1.C_1_t10292	0,91	1,09	1,73	1,00	0,27	1,45	3,00
jgi Trave1 66957 estExt_fgenes1_pg.C_120133	0,71	1,71	1,57	0,14	0,71	1,57	3,29
jgi Trave1 159926 estExt_Genewise1Plus.C_1_t70416	1,17	2,50	2,75	0,50	0,33	0,33	3,33
jgi Trave1 109109 e_gw1.1.2102.1	0,67	2,17	2,39	0,22	0,67	1,72	3,33
jgi Trave1 39965 fgenes1_pm.12_#_28	0,92	0,92	1,58	0,67	0,58	2,00	2,50
jgi Trave1 159574 estExt_Genewise1Plus.C_1_t60393	1,10	1,10	1,10	1,90	0,50	1,00	2,80
jgi Trave1 134721 e_gw1.13.1089.1	1,00	0,60	1,80	2,60	2,80	1,80	2,00
jgi Trave1 70662 estExt_Genemark1.C_4_t10231	1,17	1,17	2,50	0,67	1,17	1,00	3,50
jgi Trave1 112899 e_gw1.2.1846.1	0,58	1,00	0,58	0,42	1,17	3,17	2,83
jgi Trave1 28335 fgenes1_kg.4_#_615_#_isotig10902	2,00	2,00	2,00	13,00	1,00	0,00	0,00
jgi Trave1 124366 e_gw1.6.717.1	1,92	1,85	1,85	0,15	0,62	1,08	1,92
jgi Trave1 62730 estExt_fgenes1_pg.C_2_t10361	1,50	0,50	0,50	3,50	1,50	2,50	1,00
jgi Trave1 68175 estExt_Genemark1.C_1_t20147	1,25	2,25	2,00	0,75	0,00	2,50	1,25
jgi Trave1 141077 estExt_Genewise1.C_2_t10400	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	2,50	3,00
jgi Trave1 73474 estExt_Genemark1.C_9_t10209	0,64	2,18	1,82	0,82	0,00	0,55	1,36
jgi Trave1 25402 fgenes1_kg.1_#_223_#_isotig01416	1,00	0,67	0,67	3,17	1,17	1,17	0,33
jgi Trave1 89076 gw1.3.1186.1	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	3,50	2,50
jgi Trave1 43877 gm1.2761_g	0,67	0,67	0,33	0,00	0,67	3,33	2,00
jgi Trave1 141321 estExt_Genewise1.C_2_t20384	0,60	2,20	1,60	0,00	0,20	2,00	2,80
jgi Trave1 59914 estExt_fgenes1_pm.C_9_t10159	1,18	2,41	2,24	0,59	0,12	0,71	0,76
jgi Trave1 37357 fgenes1_pm.6_#_209	1,86	1,71	1,86	1,43	0,43	0,43	1,14
jgi Trave1 150608 estExt_Genewise1.C_7_t40230	0,50	1,00	0,25	0,00	0,75	2,75	1,75
jgi Trave1 174721 estExt_Genewise1Plus.C_13_t10247	0,36	0,92	2,20	0,32	0,16	1,16	0,80
jgi Trave1 147958 estExt_Genewise1.C_5_t40227	0,78	0,91	1,13	0,35	0,74	1,26	1,78
jgi Trave1 161823 estExt_Genewise1Plus.C_2_t50365	0,50	1,25	0,75	0,00	0,25	1,50	1,00
jgi Trave1 52416 gm1.11300_g	0,90	2,70	1,50	0,20	0,00	1,40	2,70
jgi Trave1 110860 e_gw1.1.2477.1	0,38	1,08	1,42	2,08	0,04	0,88	1,25
jgi Trave1 64339 estExt_fgenes1_pg.C_5_t10057	1,00	0,00	1,00	1,67	0,67	0,67	2,00
jgi Trave1 168624 estExt_Genewise1Plus.C_6_t40123	0,56	1,33	1,56	0,00	0,33	2,00	1,89
jgi Trave1 69348 estExt_Genemark1.C_2_t20327	1,29	0,71	0,86	0,00	0,14	0,43	1,43

	H1234	H1252	H110102	H70	H44889	H15544
jgi Trave1 136431 e_gw1.15.102.1	0,00	0,00	3,00	1,00	0,00	0,00
jgi Trave1 112163 e_gw1.1.1465.1	0,55	7,82	10,18	8,36	4,36	10,27
jgi Trave1 30879 fgenes1_kg.10_#_131_#_isotig01075	0,00	5,00	4,00	6,00	8,00	7,00
jgi Trave1 43578 gm1.2462_g	0,60	0,80	14,40	4,00	3,80	1,40
jgi Trave1 28848 fgenes1_kg.5_#_434_#_isotig03352	1,00	1,50	1,00	1,50	0,50	0,50
jgi Trave1 48870 gm1.7754_g	0,50	0,55	7,40	5,95	5,15	1,25
jgi Trave1 33056 fgenes1_pm.1_#_400	4,50	6,50	6,00	3,75	1,25	1,50
jgi Trave1 63826 estExt_fgenes1_pg.C_4_t10147	4,42	2,92	3,25	2,33	2,42	4,50
jgi Trave1 54134 gm1.13018_g	0,73	0,73	12,36	2,18	0,18	4,27
jgi Trave1 52976 gm1.11860_g	0,17	1,33	10,83	4,50	2,33	2,83
jgi Trave1 38102 fgenes1_pm.7_#_405	1,10	5,00	2,90	4,30	0,90	2,50
jgi Trave1 114944 e_gw1.2.1056.1	0,00	2,67	6,17	6,67	2,83	1,00
jgi Trave1 116268 e_gw1.3.2123.1	0,00	1,00	0,00	2,00	0,00	0,00
jgi Trave1 52333 gm1.11217_g	0,00	3,33	5,83	5,50	3,00	1,67
jgi Trave1 133731 e_gw1.12.519.1	0,00	2,50	6,17	5,83	2,83	1,00
jgi Trave1 112835 e_gw1.2.1070.1	0,71	1,14	5,71	3,86	2,29	1,57
jgi Trave1 33948 fgenes1_pm.2_#_34	0,50	7,00	1,88	11,00	0,75	1,50
jgi Trave1 43477 gm1.2361_g	0,25	0,42	4,75	1,75	5,50	3,25
jgi Trave1 125941 e_gw1.7.676.1	1,60	3,87	3,33	2,73	1,13	2,67
jgi Trave1 37024 fgenes1_pm.5_#_453	1,38	1,04	1,96	2,81	5,15	3,12
jgi Trave1 138138 estExt_Genewise1.C_1_t10292	0,55	1,55	2,73	3,36	2,64	4,18
jgi Trave1 66957 estExt_fgenes1_pg.C_120133	2,14	2,43	3,29	1,71	1,00	2,14
jgi Trave1 159926 estExt_Genewise1Plus.C_1_t70416	0,17	0,42	1,25	1,42	6,50	6,08
jgi Trave1 109109 e_gw1.1.2102.1	0,56	0,61	3,78	2,44	4,11	3,72
jgi Trave1 39965 fgenes1_pm.12_#_28	0,83	1,67	5,75	4,17	0,75	1,33
jgi Trave1 159574 estExt_Genewise1Plus.C_1_t60393	0,50	2,10	4,10	1,80	3,20	2,60
jgi Trave1 134721 e_gw1.13.1089.1	2,40	2,80	2,60	3,80	0,00	1,40
jgi Trave1 70662 estExt_Genemark1.C_4_t10231	0,83	3,50	1,50	3,00	0,67	2,33
jgi Trave1 112899 e_gw1.2.1846.1	0,92	2,92	2,75	4,08	2,50	2,33
jgi Trave1 28335 fgenes1_kg.4_#_615_#_isotig10902	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
jgi Trave1 124366 e_gw1.6.717.1	1,15	3,31	0,92	1,15	0,77	1,15
jgi Trave1 62730 estExt_fgenes1_pg.C_2_t10361	1,00	3,25	5,50	3,50	0,75	0,50
jgi Trave1 68175 estExt_Genemark1.C_1_t20147	0,25	3,00	3,75	2,75	0,50	1,00
jgi Trave1 141077 estExt_Genewise1.C_2_t10400	1,50	8,50	2,50	3,50	0,00	1,50
jgi Trave1 73474 estExt_Genemark1.C_9_t10209	0,27	0,27	1,36	1,00	4,36	4,91
jgi Trave1 25402 fgenes1_kg.1_#_223_#_isotig01416	1,17	3,00	2,33	4,00	0,83	0,67
jgi Trave1 89076 gw1.3.1186.1	0,00	2,00	6,00	6,00	5,50	2,00
jgi Trave1 43877 gm1.2761_g	0,33	5,67	1,67	5,67	0,33	1,33
jgi Trave1 141321 estExt_Genewise1.C_2_t20384	0,60	3,00	0,60	0,60	0,60	1,40
jgi Trave1 59914 estExt_fgenes1_pm.C_9_t10159	0,29	0,24	1,18	1,24	2,00	4,00
jgi Trave1 37357 fgenes1_pm.6_#_209	1,00	0,86	1,43	0,57	2,14	2,00
jgi Trave1 150608 estExt_Genewise1.C_7_t40230	2,50	4,00	2,00	2,75	0,25	1,25
jgi Trave1 174721 estExt_Genewise1Plus.C_13_t10247	0,00	0,88	1,64	1,84	3,44	4,24
jgi Trave1 147958 estExt_Genewise1.C_5_t40227	0,61	2,22	0,48	2,91	0,57	1,09
jgi Trave1 161823 estExt_Genewise1Plus.C_2_t50365	1,50	1,00	2,50	2,25	1,75	1,75
jgi Trave1 52416 gm1.11300_g	0,20	2,30	1,40	0,70	0,60	1,10
jgi Trave1 110860 e_gw1.1.2477.1	0,54	0,75	2,25	0,83	2,92	2,46
jgi Trave1 64339 estExt_fgenes1_pg.C_5_t10057	0,67	1,33	0,67	3,33	0,67	1,67
jgi Trave1 168624 estExt_Genewise1Plus.C_6_t40123	0,22	1,00	1,56	2,11	1,22	1,89
jgi Trave1 69348 estExt_Genemark1.C_2_t20327	0,14	2,14	0,14	4,29	1,29	0,86

Annexe 13 : Tableau des 50 gènes les plus régulés chez la souches Tv1218 par rapport à la souche Tv1252

ID PROTEIQUE	1218/1252 T4SEMAINES	1218/1252 T2SEMAINES	FONCTION	PEPTIDE SIGNAL	CLASSE
141737	176,2338279	1014,106489	Expansine	Oui	Paroi cellulaire
171033	249,3856826	612,3224083	Expansine	Oui	Paroi cellulaire
37625	20,59465105	259,0490445	Glycoside Hydrolase 18 , chitinase	Oui	Paroi cellulaire
33707	8,983828208	54,02390466	Glycoside Hydrolase 16	Oui	Paroi cellulaire
127472	1,871631168	43,87413461	Glycoside Hydrolase 18 , chitinase	Oui	Paroi cellulaire
131793	16,96569246	34,165304	Glycoside Hydrolase 18 , chitinase	Oui	Paroi cellulaire
46204	113,4156659	71,19816039	Polysaccharide Lyase 14 _PL14_4, rhamnogalacturonan lyase	Oui	Paroi cellulaire
60093	6,543267383	70,40636787	Peptidoglycan-binding LysM	Oui	Paroi cellulaire
129629	5,463311216	48,70584655	Peptidoglycan-binding LysM	Oui	Paroi cellulaire
144169	12,55308512	39,8090724	Carbohydrate Esterase 4	Oui	Paroi cellulaire,
73953	24,22249493	37,07704503	beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase, contains WSC domain	Oui	Paroi cellulaire
68395	6,486668327	82,94728783	RTA1 like (membrane) stress	Oui	detoxication/dégradation
48870	7,460682703	47,93676673	Dyp-type peroxidase, DyP1	Oui	detoxication/dégradation
51436	2,620174067	37,75633516	Cytochrome P450	Oui	detoxication/dégradation
51437	2,984760608	32,63682686	Cytochrome P450	Non	detoxication/dégradation
48947	143,8773995	50,41243396	Kynurenine 3-monoxygenase et related flavo monoxygenases	Oui	detoxication/dégradation
75060	12,1575331	35,43147262	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR	Non	detoxication/dégradation
25232	21,02819825	46,76814349	von Willebret factor et related coagulation s	Oui	detoxication/dégradation
166889	43,24622336	46,56338338	Heat shock Hsp20	Non	detoxication/dégradation
126587	69,33763704	191,7153294	Sphingolipid hydroxylase (membrane)	Non	Metabolisme des lipides et transport
26922	27,05193043	50,18833942	Acyl-CoA N-acyltransferases (Nat)	Non	Metabolisme des lipides et transport
143717	10,30567465	144,8698369	FMN-dependent alpha-hydroxy acid dehydrogenase, glycolate oxidase	Non	Metabolism
64129	44,36204182	38,03179732	Ribosomal S16	Oui	Metabolism
62904	7,531500146	41,62055577	Peptidase S8 et S53	Oui	Dégradation protéique
52808	#DIV/0!	31615,78431	Inconnue	Non	Inconnue
52413	1073,983563	3481,249789	Inconnue	Non	Inconnue
31823	262,7118348	1078,512241	Inconnue	Oui	Inconnue
173513	135,7925824	714,5096108	Inconnue	Oui	Inconnue
103761	1,603301898	604,0695488	Inconnue	Oui	Inconnue
61417	48,76433587	546,2448412	Inconnue	Oui	Inconnue
30997	45,51993405	286,4248453	Inconnue	Non	Inconnue
54945	105,4649213	243,1167028	Inconnue	Oui	Inconnue
52018	84,00979471	225,6439812	Inconnue	Oui	Inconnue
27535	207,5268055	220,6325634	Inconnue	Oui	Inconnue
70601	21,10936171	151,6734073	Inconnue	Oui	Inconnue
116268	48,84634364	143,2329943	Barwin-related endoglucanase	Oui	Inconnue
60089	32,5204706	142,4885185	Inconnue	Oui	Inconnue
40647	18,4013874	113,944731	Inconnue	Oui	Inconnue
93850	28,07327188	75,91173005	Inconnue	Oui	Inconnue
48684	104,2938479	65,9580077	Inconnue	Non	Inconnue
45188	13,64202344	59,0935362	Inconnue	Oui	Inconnue
31831	19,36023521	52,93173989	Inconnue	Oui	Inconnue
74079	21,37658523	50,64514726	Inconnue	Non	Inconnue
23196	549,6448651	48,62856927	Inconnue	Non	Inconnue
150580	70,49218051	36,21997523	C-type lectin	Oui	Inconnue
28295	25,78832688	36,21008901	Inconnue	Non	Inconnue
172494	20,92859452	43,54916153	Inconnue (membrane)	Non	Inconnue
72827	18,2234641	40,51996264	Inconnue (membrane)	Oui	Inconnue
35274	43,71064636	34,66931281	Inconnue (membrane)	Oui	Inconnue

Publications

Anne Thuillier, Kamel Chibani, Gemma Belli, Enrique Herrero, Stéphane Dumarçay, Philippe Gérardin, Annegret Kohler, **Aurélie Deroy**, Tiphaine Dhalleine, Raphael Bchini, Jean-Pierre Jacquot, Eric Gelhaye and Mélanie Morel-Rouhier 2014. Transcriptomic Responses of *Phanerochaete chrysosporium* to Oak Acetonic Extracts: Focus on a New Glutathione Transferase *Applied and Environmental Microbiology*, **Appl. Environ. Microbiol.** **2014**, **80(20):6316**. DOI: **10.1128/AEM.02103-14.**, <http://aem.asm.org/content/80/20/6316#ref-list-1>

The GSTome reflects the chemical environment of white-rot fungi 2

Aurélie Deroy, Fanny Saiag, Zineb Kebbi-Benkeder, Nassim Touahric, Arnaud Hecker, Mélanie Morel-Rouhier, Francis Colind, Stéphane Dumarçay, Philippe Gérardin, Eric Gelhaye.

→ ACCEPTED PLOS ONE

Exudate production: a detoxification strategy of wood decaying fungi

A. Deroy, J.G. Berrin, S. Dumarçay, P. Gérardin, A. Kohler, M. Morel-Rouhier, D. Navarro, C. Rose, R. Sormani, and E. Gelhaye

→ IN REDACTION

Résumé : Le bois représente une des ressources en polymères les plus abondantes de l'écosystème terrestre. Les champignons dégradant la matière lignocellulosique jouent un rôle important dans le cycle du carbone. Ils présentent un fort intérêt au niveau biotechnologique en particulier pour la production d'enzymes. Parmi les champignons saprophytes, ceux de la classe des Agaricomycota sont particulièrement intéressants puisqu'ils possèdent la capacité de dégrader les différents composés du bois : cellulose, hémicelluloses et lignine. De plus, ces champignons ont développé un système de détoxification impliquant des enzymes telles que les glutathion transférases (GST). Celles-ci sont impliquées dans la dégradation de composés potentiellement toxiques générés lors de la dégradation du bois mais également la dégradation de xénobiotiques. L'étude des systèmes extracellulaires et intracellulaires de *Trametes versicolor* impliqués dans les processus de décomposition du bois, décrite dans ce manuscrit, avait pour objectif d'identifier les facteurs moléculaires impliqués dans l'adaptation des champignons à leur environnement. Les approches pluridisciplinaires mises en œuvre lors de cette thèse ont permis d'identifier une variabilité phénotypique intraspécifique chez une dizaine de souches de *T. versicolor*, cette variabilité semblant être liée à la nature de l'essence ligneuse d'origine de ces souches. De plus, les travaux réalisés sur les GSTs appartenant aux classes oméga et GHR ont contribué à améliorer nos connaissances sur l'implication de cette famille multigénique dans l'adaptation des champignons xylophages à leur mode de vie.

Mots clés : *Trametes versicolor*, bois, système extracellulaire, glutathion transférase, adaptation.

Abstract: Wood is one of the most abundant polymer resources of the Earth's ecosystem. Wood decaying fungi play an important role in the carbon cycle. They have a strong interest in biotechnology level in particular for the production of enzymes. Among the saprophytic fungi, those of the class of agaricomycota are particularly studied since they possess the ability to degrade various compounds from wood : cellulose, hemicelluloses and lignin. In addition, these fungi have developed a detoxification system involving enzymes such as glutathione transferases (GST). These latter are involved in degradation of wood but also in the degradation of xenobiotics. In this manuscript, the study of extracellular and intracellular system from *Trametes versicolor*, involved in wood decay process is described, the main goal being to identify the molecular factors involved in adaptation of the to their environment. Multidisciplinary approaches used in this PhD led to identification of an intraspecific phenotypic variability among ten strains of *T. versicolor*, this variability appearing to be related to the tree species where these strains have been isolated. Moreover, the work done on GSTs belonging to GHR and omega classes have improved our knowledge of the involvement of this gene family in adapting the wood decayers to their lifestyle.

Keywords: *Trametes versicolor*, wood, extracellular system, glutathione transferase, adaptation.