

Présentée pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université Louis Pasteur  
Strasbourg I

Discipline  
Sciences du Vivant – Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie.

Par

Didier HATSCH

***Interaction hôte/pathogène : étude du modèle Humulus lupulus / Fusarium graminearum. Identification, génomique et transcriptomique du pathogène.***

Soutenue publiquement le 14 décembre 2004

Membres du Jury

*Directeur de thèse :*

M. Jean-Marc JELTSCH, Professeur, Université Louis Pasteur, UMR 7100.

*Rapporteur Interne :*

M. Jean-Luc SOUCIET, Professeur, Université Louis Pasteur, Institut de Botanique.

*Rapporteurs Externes :*

Mme. Marie-Thérèse ESQUERRE-TUGAYE, Professeur, Université P. Sabatier, UMR 5546.

M. Keith KLEIN, Professeur, Minnesota State University.

*Examineurs :*

Mme. Martine BOCCARA, Professeur, Université Pierre et Marie Curie, PARIS VI.

M. Vincent PHALIP, Maître de Conférence, Université Louis Pasteur, UMR 7100.

*à mes parents, Angèle et Jean-Paul, qui m'ont toujours soutenu*

---

Je tiens à exprimer un très grand

*Merci*

à tous ceux qui m'ont aidé, guidé et soutenu lors de ma thèse.

Je leur présente ici toute ma gratitude ainsi que mon amitié.

---

## TABLES DES MATIERES

<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>10</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>11</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>12</b>
<b>CHAPITRE I – DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES ET PRESENTATION DU SUJET</b> .....	<b>14</b>
I. 1. LE MODELE D’ETUDE .....	15
I. 1. 1. <i>La plante modèle : Humulus lupulus, L.</i> .....	15
I. 1. 1. 1. Biologie du houblon .....	15
I. 1. 1. 2. Culture du houblon .....	18
I. 1. 1. 3. Utilisations du houblon.....	20
I. 1. 1. 3. 1. Utilisation brassicole .....	20
I. 1. 1. 3. 2. Utilisation en herboristerie .....	21
I. 1. 1. 3. 3. Utilisation culinaire .....	21
I. 1. 1. 4. Pathologies fongiques du houblon.....	21
I. 1. 1. 4. 1. Mildiou du houblon .....	21
I. 1. 1. 4. 2. Oïdium du houblon.....	23
I. 1. 1. 4. 3. Verticilliose .....	24
I. 1. 1. 4. 5. Autres maladies d’origine fongique .....	25
I. 1. 1. 4. 5. 1. <i>Phytophthora citricola</i> .....	25
I. 1. 1. 4. 5. 2. <i>Botrytis cinerea</i> .....	25
I. 1. 1. 4. 5. 3. <i>Alternaria alternata</i> .....	25
I. 1. 1. 4. 5. 4. <i>Cladosporium</i> .....	25
I. 1. 1. 4. 5. 5. <i>Fusarium sambucinum</i> et <i>F. avenaceum</i> .....	26
I. 1. 2. <i>Le champignon modèle : Fusarium graminearum</i> .....	26
I. 1. 2. 1. Biologie du champignon.....	26
I. 1. 2. 1. 1. Position taxonomique .....	27
I. 1. 2. 1. 2. Cycle sexuel de <i>Gibberella zeae</i> .....	28

I. 1. 2. 1. 3. Spores de <i>Fusarium graminearum</i> .....	29
I. 1. 2. 2. Identification.....	30
I. 1. 2. 3. Pathogénicité de <i>F. graminearum</i> .....	31
I. 1. 2. 3. 1. Cycle infectieux de <i>Fusarium graminearum</i> .....	32
I. 1. 2. 3. 2. Production de toxines .....	34
I. 1. 2. 3. 3. Pouvoir pathogène de <i>Fusarium graminearum</i> .....	35
I. 1. 2. 4. Moyens de lutte contre <i>Fusarium</i> .....	36
I. 1. 2. 4. 1. Pratiques culturales.....	36
I. 1. 2. 4. 2. Utilisation de fongicides.....	37
I. 1. 2. 4. 3. Moyens de lutte biologique .....	37
I. 2. INTERACTION HOTE-PATHOGENE : LA DEGRADATION DE LA PAROI VEGETALE.....	37
I. 2. 1. <i>Paroi végétale</i> .....	38
I. 2. 1. 1. Cellulose .....	38
I. 2. 1. 2. Hémicellulose .....	39
I. 2. 1. 3. Acide pectique et la pectine.....	40
I. 2. 1. 4. Glycoprotéines.....	41
I. 2. 1. 5. Lignine.....	41
I. 2. 2. <i>CWDE</i> .....	43
I. 2. 2. 1. Cellulases.....	43
I. 2. 2. 2. Pectinases .....	44
I. 2. 2. 3. Xylanases.....	44
I. 2. 2. 4. Protéases .....	45
I. 3. X-OMIQUE.....	46
I. 3. 1. <i>Outils bio-informatiques</i> .....	46
I. 3. 1. 1. Logiciels .....	46
I. 3. 1. 1. 1. Alignements de séquences.....	46
I. 3. 1. 1. 2. Traitement de séquences.....	47
I. 3. 1. 1. 3. Analyses phylogénétiques .....	47
I. 3. 1. 2. Langages de programmation .....	48
I. 3. 1. 3. Gestion des ressources bio-informatiques .....	48
I. 3. 2. <i>Génomique</i> .....	49
I. 3. 2. 1. Génomes de champignons filamenteux séquencés.....	49
I. 3. 2. 2. Génome de <i>F. graminearum</i> .....	50
I. 3. 3. <i>Transcriptomique</i> .....	52

I. 3. 2. 1. RT-PCR quantitative .....	52
I. 3. 2. 2. Banques d'EST .....	52
I. 3. 2. 1. 1. Banques classiques .....	52
I. 3. 2. 1. 2. Banques suppressives .....	53
I. 3. 2. 3. Microarrays.....	54
I. 4. NOTRE PROJET DE RECHERCHE.....	55
<b>CHAPITRE II – IDENTIFICATION ET MARQUEURS PHYLOGENETIQUES</b>	
<b>DU GENRE <i>FUSARIUM</i>.....</b>	<b>58</b>
II. 1. IDENTIFICATION DES ESPECES DU GENRE <i>FUSARIUM</i> .....	59
II. 1. 1. <i>Problématique</i> .....	59
II. 1. 2. <i>Article 1 - Development of a bipartite method for Fusarium identification based on cellobiohydrolase-C: CAPS and Western blot analysis, Hatsch D., Phalip V., Jeltsch J.-M., FEMS Microbiology Letters, 2002</i> .....	60
II. 1. 3. <i>Extension du travail</i> .....	66
II. 1. 4. <i>Conclusions et perspectives</i> .....	67
II. 2. VALIDATION DE MARQUEURS PHYLOGENETIQUES .....	68
II. 2. 1. <i>Problématique</i> .....	68
II. 2. 2. <i>Article 2 - Use of genes encoding cellobiohydrolase-C and topoisomerase II as targets for phylogenetic analysis and identification of Fusarium, Hatsch D., Phalip V., Jeltsch J.-M., Research in Microbiology, 2004</i> .....	69
II. 2. 3. <i>Extension du travail</i> .....	70
II. 2. 4. <i>Conclusions et perspectives</i> .....	70
<b>CHAPITRE III – GENOMIQUE APPLIQUEE DU CHAMPIGNON <i>FUSARIUM</i></b>	
<b><i>GRAMINEARUM</i> .....</b>	<b>70</b>
III. 1. PROBLEMATIQUE.....	70
III. 2. PREDICTION DE GENES.....	70
III. 2. 1. <i>Mise en place des outils d'analyse</i> .....	70
III. 2. 2. <i>Application des outils</i> .....	70
III. 3. VALIDATION DES PREDICTIONS .....	70
III. 3. 1. <i>Clonage et séquençage</i> .....	70
III. 3. 2. <i>Analyse des séquences</i> .....	70
III. 4. PREDICTION DE STRUCTURES.....	70
III. 4. 1. <i>Détermination des modèles</i> .....	70

III. 4. 2. <i>Application à l'amélioration enzymatique</i> .....	70
III. 5. CONCLUSIONS ET PERSPETIVES .....	70
<b>CHAPITRE IV – TRANSCRIPTOMIQUE DU CHAMPIGNON <i>FUSARIUM</i></b>	
<b><i>GRAMINEARUM</i> .....</b>	<b>70</b>
IV. 1. SUIVI DE L'EXPRESSION DES XYLANASES .....	70
IV. 1. 1. <i>Problématique</i> .....	70
IV. 1. 2. <i>Détermination du niveau d'expression des xylanases</i> .....	70
IV. 1. 2. 1. Méthode de détermination .....	70
IV. 1. 2. 1. 1. Descriptif de la méthode.....	70
IV. 1. 2. 1. 2. Validation .....	70
IV. 1. 2. 2. Quantification par Q-RT-PCR.....	70
IV. 1. 2. 2. 1. Les xylanases induites par les parois.....	70
IV. 1. 2. 2. 2. Les xylanases induites par les parois et le xylane .....	70
IV. 1. 2. 2. 3. Les xylanases induites par les parois et la CMC .....	70
IV. 1. 2. 2. 4. Les xylanases induites par les parois, le xylane et le xylose ....	70
IV. 1. 2. 2. 6. Les xylanases non induites .....	70
IV. 1. 2. 2. 7. Réinvestigation des résultats obtenus sur M3-parois .....	70
IV. 1. 3. <i>Discussion</i> .....	70
IV. 1. 4. <i>Conclusions et perspectives</i> .....	70
IV. 2. ETUDE SPECIFIQUE DU TRANSCRIPTOME PAR APPROCHE SOUSTRACTIVE.....	70
IV. 2. 1. <i>Problématique</i> .....	70
IV. 2. 2. <i>Article 3 - The transcriptome of Fusarium graminearum grown on plant cell walls reveals several families of pathology-related genes, HATSCH D., PHALIP V., PETKOVSKI E., JELTSCH J.M., soumis dans Fungal Genetics and Biology</i> .....	70
IV. 2. 3. <i>Extension du travail</i> .....	70
IV. 2. 4. <i>Conclusions et perspectives</i> .....	70
<b>CHAPITRE V – CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>70</b>
V. 1. IDENTIFICATION ET MARQUEURS PHYLOGENETIQUES .....	70
V. 2. GENOMIQUE DU CHAMPIGNON <i>FUSARIUM GRAMINEARUM</i> .....	70
V. 3. TRANSCRIPTOMIQUE DU CHAMPIGNON <i>FUSARIUM GRAMINEARUM</i> .....	70
V. 4. MODELE D'ETUDE <i>HUMULUS LUPULUS / FUSARIUM GRAMINEARUM</i> .....	70
<b>CHAPITRE VI – MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>70</b>

VI. 1. MATERIEL BIOLOGIQUE .....	70
<i>VI. 1. 1. Souche de F. graminearum</i> .....	70
VI . 1. 1. 1. Description de la souche.....	70
VI. 1. 1. 2. Conditions de culture.....	70
VI. 1. 1. 3. Conservation des spores .....	70
<i>VI. 1. 2. Souche bactérienne</i> .....	70
VI. 2. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE .....	70
<i>VI. 2. 1. Extraction d'acides nucléiques</i> .....	70
VI. 2. 1. 1. Extraction d'ADN plasmidique .....	70
VI. 2. 1. 2. Extraction d'ARN total.....	70
VI. 2. 1. 3. Extraction d'ARN polyA+.....	70
<i>VI. 2. 2. Southern blot</i> .....	70
VI. 2. 2. 1. Préparation de la membrane .....	70
VI. 2. 2. 2. Préparation de la sonde.....	70
VI. 2. 2. 3. Hybridation et détection .....	70
<i>VI. 2. 3. Rétrotranscription et synthèse d'ADN complémentaire</i> .....	70
<i>VI. 2. 4. Amplification d'acides nucléiques</i> .....	70
VI. 2. 4. 1. PCR.....	70
VI. 2. 4. 2. Q-RT-PCR.....	70
<i>VI. 2. 5. Clonage</i> .....	70
VI. 2. 5. 1. Clonage rapide.....	70
VI. 2. 5. 2. Clonage des EST .....	70
<i>VI. 2. 6. Mise en évidence de protéines</i> .....	70
VI. 3. BIO-INFORMATIQUE .....	70
<i>VI. 3. 1. Analyses de séquences</i> .....	70
<i>VI. 3. 2. Analyses phylogénétiques</i> .....	70
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>70</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>70</b>
<b>ANNEXE 1 – MILIEUX DE CULTURE .....</b>	<b>70</b>
<b>ANNEXE 2 – FAMILLE DE FONGICIDES ET LEUR CIBLES.....</b>	<b>70</b>
<b>ANNEXE 3 - LISTE DES AMORCES .....</b>	<b>70</b>



---

<b>ANNEXE 4 – DIAGRAMME DE RAMACHANDRAN.....</b>	<b>70</b>
<b>ANNEXE 5 - CALCUL DE Q-RT-PCR RELATIVE .....</b>	<b>70</b>
<b>ANNEXE 6 – LISTE DES 537 EST DE LA BANQUE SUPPRESSIVE SOUSTRACTIVE .....</b>	<b>70</b>
<b>POSTER 1 : Identification et caractérisation des <i>Fusarium</i> isolés sur des plants de Houblon en dépérissement – IVème rencontres de phytopathologie / mycologie , Aussois (FR) 2002.....</b>	<b>188</b>
<b>POSTER 2 : Data mining : finding specific genes in a phytopathogenic fungus.A case study : <i>Fusarium graminearum</i>'s xylanases – 4th Colmar scientific symposium : Biology in the post genomic era, Colmar (FR) 2003. ....</b>	<b>189</b>
<b>COMMUNICATION ORALE : The genes encoding cellobiohydrolase-C and topoisomerase II used as targets for phylogenetic analysis and identification of <i>Fusarium</i> at a species level. Journée du Réseau de Mycologie, Nancy (FR) 2003 .....</b>	<b>190</b>

---

## Liste des figures

Fig. 1. Liane de Houblon.....	16
Fig. 2. Fleur mâle du houblon. ....	16
Fig. 3. Fleur femelle du houblon. ....	17
Fig. 4. Exemple hermaphrodite. ....	18
Fig. 5. La culture du houblon en Alsace. ....	19
Fig. 6. Houblonnières alsaciennes.....	20
Fig. 7. Feuille de houblon infectée par <i>Pseudoperonospora humuli</i> . ....	22
Fig. 8. Feuille de houblon infectée par <i>Sphaerotheca humuli</i> .....	23
Fig. 9. Feuille de houblon infectée par <i>Verticillium albo-atrum</i> .....	24
Fig. 10. Apparence de <i>Fusarium graminearum</i> en culture in vitro.....	27
Fig. 11. Différentes lignées de <i>Gibberella zeae</i> , leur localisation et migration géographique.....	28
Fig. 12. Différents type de spore de <i>Fusarium graminearum</i> . ....	29
Fig. 13. Représentation d'une unité d'ADN ribosomique. ....	31
Fig. 14. Cycle infectieux de <i>Fusarium graminearum</i> sur les céréales.....	32
Fig. 15. Fusarioses provoquées par <i>Fusarium graminearum</i> sur différents hôtes.....	33
Fig. 16. Grains infectés par <i>Fusarium graminearum</i> . ....	33
Fig. 17. Structure chimique des principales mycotoxines de <i>Fusarium graminearum</i> .....	35
Fig. 18. Mode d'entrée du champignon dans la plante. ....	35
Fig. 19. Structure de la cellulose et formation de pont hydrogène.....	39
Fig. 20. Structure du xylan et site d'attaque des xylanases.....	40
Fig. 21. Structure de l'acide pectique avec la formation de ponts ioniques et acide galacturonique méthylé. ....	41
Fig. 22. Synthèse de monolignols. ....	42
Fig. 23. Polymère de lignine : différentes liaisons possibles entre les différents monolignols.....	43
Fig. 24. Structure des différentes familles de Xylanases. ....	45
Fig. 25. Schéma explicatif de la méthode d'hybridation suppressive soustractive.....	54
Fig. 26. Principe de l'analyse du transcriptome par microarray. ....	55
Fig. 27. Différents symptômes observés sur le houblon. ....	56
Fig. 28. Southern blot révélant la présence des gènes de la topoisomérase II (topII) et cellobiohydrolase-C (cbh-C) en copie unique.....	77

---

Fig. 29. Alignement des séquences de xylanases 15 et 24 avec leur plus proche homologue.	87
Fig. 30. Diagramme de Ramachandran pour la xylanase 15 et sa matrice 1XND.....	89
Fig. 31. Diagramme de Ramachandran pour la xylanase 24 et sa matrice 1TUX.....	90
Fig. 32. Modèle de structure de la xylanase 15.....	91
Fig. 33. Modèle de structure de la xylanase 24.....	92
Fig. 34. Modèle de structure de la xylanase 15 et de la xylanase 15 - N81D.....	93
Fig. 35. Validation de l'efficacité d'amplification pour les amorces de la xylanase 16.....	98
Fig. 36. Profil du niveau d'expression des gènes des xylanases 9, 14 et 25.....	99
Fig. 37. Profil du niveau d'expression du gène de la xylanase 13.....	100
Fig. 38. Profil du niveau d'expression des gènes des xylanases 7, 18, 26 et 28.....	100
Fig. 39. Profil du niveau d'expression des gènes des xylanases 2, 15, 17, 24, 32, 33, 34, 35.....	101
Fig. 40. Profil du niveau d'expression des gènes des xylanases 19, 21, et 27.....	102
Fig. 41. Profil du niveau d'expression des gènes des xylanases 1 et 3.....	103
Fig. 42. Quantification de l'expression des xylanases sur milieu paroi par rapport au niveau du transcrit de la xylanase 01.....	104
Fig. 43. Structure chimique de la Digoxigénine et de DIG-Dutp.....	143
Fig. 44. Déroulement de la synthèse d'ADNc par la technique SMART™.....	145
Fig. 45. Principe du vecteur activité du kit TOPO TA cloning.....	147

---

## Liste des Tableaux

Tableau. 1. Liste des champignons dont le génome est séquencé.....	50
Tableau. 2. Répartition des pourcentages de genes, introns, exons et séquences non-géniques en fonction de leur taille.....	51
Tableau 3. Taille des fragments obtenus par l'analyse CAPS .....	66
Tableau 4. Prédiction des xylanases dans le génome.....	83
Tableau 5. Liste des xylanases putatives dont les séquences codantes des cDNA ont été clonées et séquencées.....	84
Tableau 6. Détermination de l'appartenance aux familles de glycoside hydrolases.....	85
Tableau 7. Caractéristiques des xylanases 15 et 24 .....	87
Tableau 8. Différentes sources de carbone ajoutées au milieu minimum M3 pour le suivi de la transcription des gènes prédits .....	96
Tableau 9. Profil d'expression des xylanases prédites sur les différents milieux de culture .	105

---

## Liste des abréviations

BLAST : Basic Local Alignment Sequence Tool

CAPS : Cleaved Amplified Polymorphic Sequence

CMC : CarboxyMéthyl-Cellulose

CWDE : Cell Wall Degrading Enzymes

DACS : Discriminative Analysis of Clone Signatures

DIG : DIGoxigénine

DON : DeOxyNivalenol

ELISA : Enzymes Linked Immonosorbent Assay

EMBOSS : European Molecular Biology Open Software Suit

EST : Expressed Sequence Tag

ETS : Externally Transcribed Spacer

IGS : InterGenic Spacer

ITS : Internally Transcribed Spacer

MIPS : Munich Information center for Protein Sequences

MMLV-RT : Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase

NIV : NIValenol

ORF : Open Reading Frame

PERL : Pratical Extraction and Report Language

PG : PolyGalacturonase

PHRAP : PHRagment Assembly Program

PHYLIP : PHYLogeny Inference Package

PL : Pectate Lyase

Q-RT-PCR : Quantitative – Retro Transcription – Polymerase Chain Reaction

RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

SSH : Suppressive Subtractive Hybridisation

ZEN : Zéaralénone

## **Introduction générale**

*Fusarium graminearum* (téléomorphe *Gibberella zeae*) est un ascomycète de l'ordre des Hypocréales. Ce champignon filamenteux est réputé pour provoquer de nombreuses pathologies notamment dans les grandes cultures céréalières (blé, orge). En plus des pertes occasionnées par une diminution de rendement, la production de mycotoxines rend certaines récoltes impropres à la consommation humaine ou animale. Deux types de toxines majeures sont produits : le DeOxyNivalenol (DON ou Vomitoxine) et les Trichothécènes.

Le houblon, *Humulus lupulus* L., est une plante dioïque de la famille des Cannabinacées comportant deux genres : *Cannabis* et *Humulus*. Le plant femelle est cultivé pour ses inflorescences (cônes), qui sont l'épice par excellence des brasseurs. 80% de la production française est localisée en Alsace, où une variété locale, le Strisselspalt, est cultivée en majorité. La culture du houblon est une activité traditionnelle soutenue par les instances politiques régionales.

Les cultures de houblons présentent régulièrement des épisodes pathologiques. Ces événements se traduisent en particulier par un dépérissement des lianes. Des prélèvements sont réalisés par le laboratoire de Phytopathologie de l'UMR 7100 depuis 1997 et les champignons filamenteux présents sont identifiés. Le genre *Fusarium* est régulièrement retrouvé parmi les différents isolats. Certaines espèces de *Fusarium* ont été reconnues comme pathogène du houblon, mais on retrouve également l'espèce *graminearum* connue comme pathogène des céréales.

Le premier chapitre sera consacré à la description des données bibliographiques relatives à *F. graminearum* et *H. lupulus* permettant d'appréhender le thème de recherche. Le deuxième chapitre se focalisera sur le développement d'une méthode d'identification des membres du genre *Fusarium* ainsi qu'à la validation de marqueurs moléculaires menant à l'étude phylogénique du genre. Le troisième chapitre traitera de la génomique du champignon au travers de la mise en place d'une analyse du génome puis de son application aux xylanases. Le quatrième chapitre relatera l'étude transcriptomique du champignon par le suivi d'expression des xylanases ainsi que par l'analyse d'une banque différentielle d'EST (Expressed Sequence Tag). Le cinquième chapitre rassemblera les conclusions et mettra en évidence les perspectives de recherche. Le dernier chapitre exposera le matériel et les méthodes employés dans la réalisation du travail.

## **Chapitre I – Données bibliographiques et présentation du sujet**



## ***I. 1. Le modèle d'étude***

Les plantes chlorophylliennes sont des eucaryotes supérieurs. Elles tirent leur énergie de la lumière et sont donc dites phototrophes. Elles sont capables de synthétiser leurs propres composés organiques à partir du dioxyde de carbone atmosphérique et sont de ce fait qualifiées d'autotrophes. Cette aptitude les place tout naturellement au début de la chaîne alimentaire.

De nombreuses maladies, certaines létales, affectent les plantes. Les agents pathogènes qui en sont responsables se caractérisent non seulement par leur nature (virus, bactérie, champignon), leur mode d'action mais aussi par les effets qu'ils provoquent. Les champignons filamenteux sont les pathogènes les plus importants des plantes devant les virus et bactéries (Lepoivre, 2003).

Le laboratoire de phytopathologie de l'UMR 7100 étudie comme modèle les deux partenaires du couple *Humulus lupulus* et *Fusarium graminearum*.

### ***I. 1. 1. La plante modèle : Humulus lupulus, L.***

#### ***I. 1. 1. 1. Biologie du houblon***

Le houblon, *Humulus lupulus* L., fait partie de la famille des Cannabinacées, laquelle comporte deux genres : *Cannabis* et *Humulus*. Les membres de cette famille sont des plantes dioïques. Plants mâles et des plants femelles sont donc nécessaires à la fécondation et à la production de graines. Le genre *Cannabis* comporte une seule espèce *C. sativa*. Le genre *Humulus* compte trois espèces : *lupulus*, *japonicus* et *scandens*. *H. japonicus*, plus connu sous le nom de houblon doré et *H. scandens* sont commercialisés à des fins ornementales. *H. lupulus* est cultivé pour ses inflorescences femelles considérées comme l'épice des brasseurs.

Le houblon fait partie de la flore spontanée européenne. Cette plante est pérenne, elle est constituée d'une souche souterraine formant un rhizome ayant une durée de vie entre 20 et 30 ans. La partie aérienne de la plante constituée par des lianes dotées de crochets, est annuelle. Ces lianes s'enroulent sur les supports disponibles et peuvent atteindre des hauteurs de 7 à 10m (Fig. 1). Seuls les plants femelles sont cultivés pour leurs fleurs. Contrairement aux plantes de grande culture, aucune lignée de houblon n'est disponible. La création variétale vise à sélectionner des plantes F1 issues de la fécondation de fleurs femelles de variétés répertoriées et déjà cultivées par des pollens de mâles choisis principalement dans des

collections de plants sauvages. La multiplication par propagation végétative s'applique ensuite aux variétés sélectionnées pour générer les milliers de plantes nécessaires à la création des houblonnières.



*Fig. 1. Liane de Houblon.*

*Source : Laboratoire de Phytopathologie – UMR 7100.*

Les plants mâles présentent des inflorescences comportant chacune quelques dizaines de fleurs (Fig. 2). La production de pollen est conséquente et sa dissémination est majoritairement effectuée par le vent (Neve, 1991). Les plants mâles sont indésirables à



*Fig. 2. Fleur mâle du houblon.*

*Source : Laboratoire de Phytopathologie – UMR 7100.*

proximité des houblonnières car la présence de graines dans les fleurs femelles pénalise fortement la valeur de la production.

Les fleurs femelles matures sont appelées cônes ou strobiles. Elles sont formées d'un rachis sur lequel sont liées des bractées (Fig. 3). Elles sont le siège d'un métabolisme secondaire intense. Plus précisément, ce métabolisme est actif dans les glandes à lupuline situées en majorité à la base des bractées. Ces glandes produisent une poudre dorée, appelée lupuline. La lupuline est un ensemble d'huiles et de résines. Parmi les résines, on distingue les résines dures et les résines molles. Les résines molles se composent des  $\alpha$ -acides et des  $\beta$ -acides qui contiennent respectivement de l'humulone et de la lupulone. Ce sont les  $\alpha$ -acides qui sont recherchés dans le processus brassicole pour donner l'amertume et les arômes à la bière.

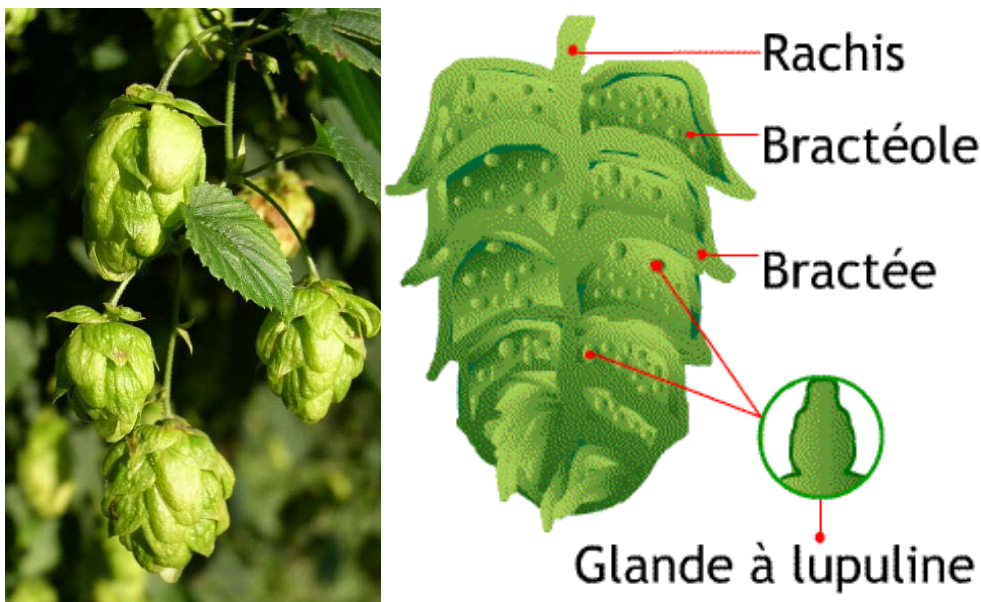


Fig. 3. Fleur femelle du houblon.

Source : Laboratoire de Phytopathologie – UMR 7100.

Des plants hermaphrodites sont rarement décrits dans le milieu naturel (Neve, 1991). Ces plants présentent alors aussi bien des inflorescences mâles que femelles. De tels plants peuvent apparaître spontanément (Fig. 4).





*Fig. 4. Exemple hermaphrodite présentant les deux types d'inflorescences sur la même liane. **A** fleurs femelles **B** fleurs mâles.  
Source : Laboratoire de Phytopathologie – UMR 7100.*

### ***1. 1. 1. 2. Culture du houblon***

En 2003, environ 54 000 hectares sont cultivés à travers le monde. L'Allemagne se place comme le premier producteur mondial avec 18 000 ha suivi par les Etats-Unis, 12 000 ha. La France avec 817 ha cultivés se place comme onzième producteur en surface. Les surfaces cultivées en France sont réparties entre le Nord (31 ha) et l'Alsace (786 ha). La culture du houblon se trouve majoritairement concentrée dans le Bas-Rhin (Fig. 5). Les 110 planteurs alsaciens se sont regroupés en une coopérative : la coopérative des houblonniers d'Alsace (COPHOUDAL). Il existe deux caractéristiques majeures des variétés cultivées : les houblons amers et les houblons aromatiques. Parmi les houblons aromatiques, une variété spécifique au terroir alsacien est cultivée : le Strisselspalt, qui tire son nom de la forme en bouquet de ses inflorescences. Le Strisselspalt est une variété aromatique étudiée préférentiellement au laboratoire.

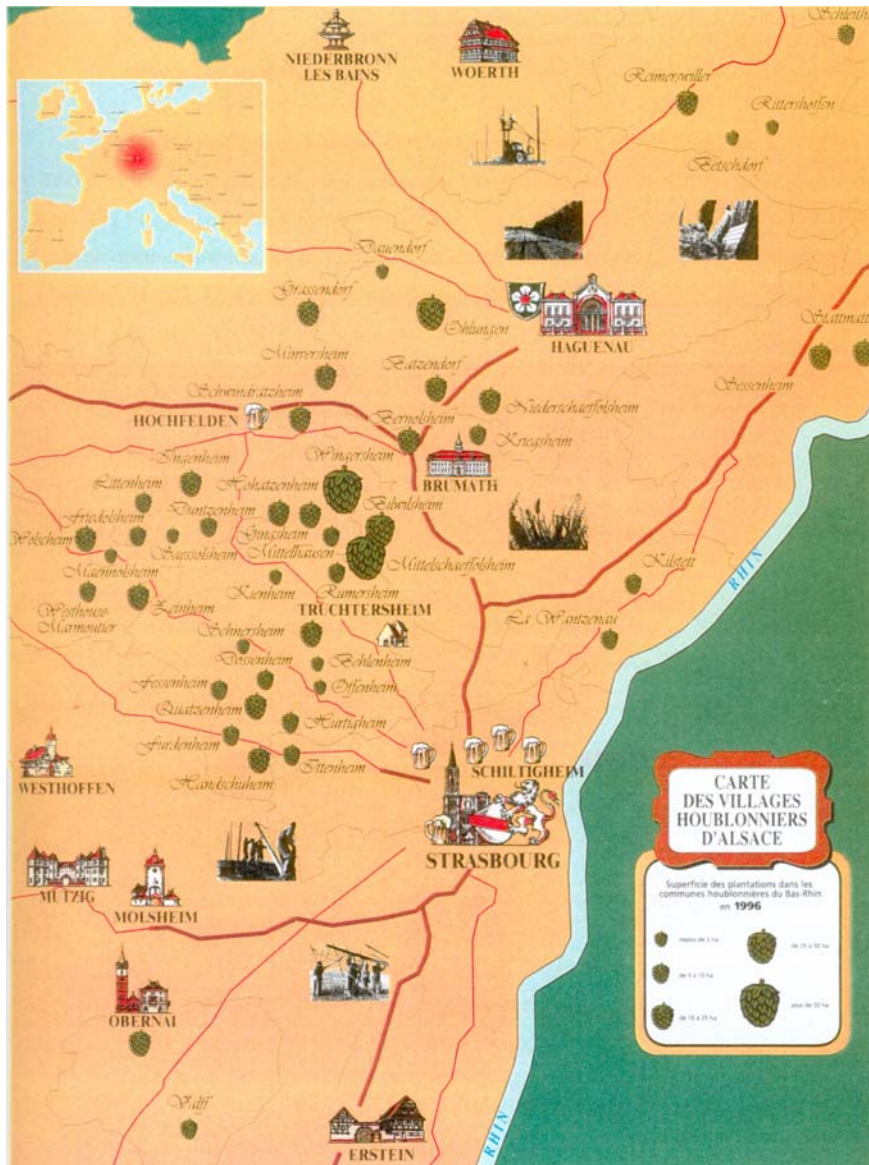


Fig. 5. La culture du houblon en Alsace.

La culture de houblon est effectuée dans des houblonnières. Elles sont composées d'un échafaudage de poteaux et de fils d'aciers supportant les fils de tuteurage. Environ 3000 pieds de houblon sont plantés à l'hectare. La mise en place d'une houblonnière a un coût élevé ( $13\,720\ \text{€} \cdot \text{ha}^{-1}$ ), après trois ans la houblonnière arrive à sa pleine production et est maintenue en exploitation pendant 15 à 20 ans.

Dans l'hémisphère Nord, c'est lors du mois de mars que les pousses de houblon sortent du sol à partir de la souche pérenne. La mise au fil manuelle des jeunes lianes (en général 3 par fil de tuteurage) assure l'enroulement dextre naturel des pousses. La croissance de la plante est vigoureuse jusqu'à la floraison, le plant atteignant alors le haut de l'échafaudage à 7m de hauteur (Fig. 6).



La récolte du houblon s'étale de mi-août à mi-septembre en fonction des variétés cultivées. De nos jours des cueilleuses mécaniques découpent la liane au ras du sol et les chargent sur une remorque pour les emporter à la ferme où les fleurs seront séparées mécaniquement de la liane. Les fleurs seront ensuite séchées par insufflation d'air chaud pendant environ 5h. Les cônes perdent alors près de 80% de leur humidité.



*Fig. 6. Houblonnières alsaciennes.*

*Source : Laboratoire de Phytopathologie – UMR 7100.*

### ***I. 1. 1. 3. Utilisations du houblon***

#### ***I. 1. 1. 3. 1. Utilisation brassicole***

95% de la production de houblon est destinée à l'industrie brassicole. Environ 70% de la production alsacienne de Strisselspalt est exportée vers les Etats-Unis, vers des clients comme Anheuser-Busch. Une partie de la récolte est utilisée dans les brasseries locales : Kronenbourg (groupe Scottish & Newcastle, Strasbourg-Obernai), Météor (brasserie indépendante, Hochfelden) et Fischer (groupe Heineken, Schiltigheim). Des micro-brasseries alsaciennes produisent également des bières avec le houblon local. La variété phare alsacienne, le Strisselspalt, a donné lieu à un brassin exclusif « 1664 Fleur de Houblon ». Le houblon apporte l'amertume mais aussi des arômes à la bière en fonction de la technique brassicole employée.

### ***I. 1. 1. 3. 2. Utilisation en herboristerie***

Le houblon est réputé en herboristerie depuis des siècles. On retrouve des traces indiquant sa présence dans les jardins à plantes médicinales dès le VII<sup>ème</sup> siècle. Il entre dans la composition de nombreux remèdes destinés à soigner différents maux. Les propriétés bactériostatiques des composés du houblon sont aujourd'hui bien connues et un brevet a été déposé sur l'utilisation des extraits de houblon pour l'inhibition de pathogènes alimentaires.

Le caractère sédatif des huiles essentielles du houblon trouvait une application dans la médecine traditionnelle amérindienne. Les grands-mères alsaciennes garantissaient un sommeil profond sur des oreillers remplis de cônes de houblon. De nos jours les oreillers sont encore commercialisés en plus de cônes séchés à consommer en infusion.

Lors des récoltes de houblon, il n'était pas rare que le cycle menstruel des cueilleuses soit perturbé. Il s'agissait des effets de phytoestrogènes présents dans les cônes. Des crèmes destinées à l'accroissement de la poitrine chez les femmes intègrent des extraits de houblon. Les effets endocriniens ont été confirmés, d'où un usage contrôlé recommandé (Milligan et al., 2000).

### ***I. 1. 1. 3. 3. Utilisation culinaire***

En dehors de la présence sous forme de bière sur nos tables, le houblon est également à la base d'une spécialité culinaire : les hopfespetzle. Il s'agit des jets de houblon blanchis dans l'eau bouillante et consommés comme des asperges. La production des jets de houblon se fait par culture des racines nettoyées sous couvert de terre à 15°C. Les pousses se développent en 20 jours et seule la partie croquante est récoltée. Le houblon se retrouve également dans bon nombre d'alcools forts européens comme la « Hopfenliquör » (liqueur de houblon allemande).

### ***I. 1. 1. 4. Pathologies fongiques du houblon***

De nombreuses pathologies ont été décrites sur le houblon (Neve, 1991). Parmi les différents agents pathogènes nous nous sommes focalisés sur les champignons filamenteux.

#### ***I. 1. 1. 4. 1. Mildiou du houblon***

Cette maladie est provoquée par l'agent pathogène *Pseudoperonospora humuli*. Le mildiou est la maladie la plus redoutable pour le houblon comme en témoigne l'épisode pathologique de 1920 pendant lequel la maladie s'est rapidement répandue dans tout l'hémisphère Nord puis en Amérique du sud.

La maladie se déclare au printemps, lorsque les premiers jets de houblons sortent du sol. Infectés, ils produisent des petites feuilles pâles dont le dessous vire au noir laissant apparaître des masses denses de sporangia, devenant ainsi la première source d'infection de l'année et lors de la dispersion des spores du pathogène. Les feuilles des plants voisins peuvent être infectées et présentent alors des tâches anguleuses noires caractéristiques (Fig. 7). Les cônes peuvent également être infectés, causant le brunissement des bractées. Les sporanges produits sous les feuilles malades servent de source d'infection secondaire. Chaque sporange libère 4 à 8 zoospores qui nagent en direction des stomates où ils produisent des tubes germinatifs qui pénètrent dans la plante par le stomate voisin.

*Pseudoperonospora humuli* est un parasite obligatoire du houblon. Il passe l'hiver sous forme de mycélium à l'intérieur du pied mère. Il a été montré que des pieds infectés consomment plus de réserves durant l'hiver que des pieds sains.



Fig. 7. Feuille de houblon infectée par *Pseudoperonospora humuli*.

Différents traitements de la maladie ont été utilisés au fil des années. Les traitements basés sur le cuivre comme l'application de bouillie bordelaise présentent une efficacité de prévention mais ne peuvent enrayer une pathologie établie, de plus les jeunes pousses de houblon sont sensibles au cuivre. Les traitements à base de Metalaxyl sont très efficaces même sur des infections établies. Cette molécule inhibe spécifiquement l'ARN polymérase I des oomycètes. Ces traitements peuvent permettre d'enrayer complètement la maladie et faire disparaître le pathogène d'une plantation de houblon. Cependant l'utilisation non optimale par les planteurs n'a jamais permis de faire complètement disparaître cette maladie.



#### ***I. 1. 1. 4. 2. Oïdium du houblon***

*Sphaerotheca humuli* est responsable de l'oïdium du houblon. Il pose de sérieux problèmes en Angleterre et en Belgique. En Allemagne, seules les épidémies du type de celle qui a suivi la plantation massive de la variété Northern Brewer, sensible au pathogène, sont à craindre.

Les premiers symptômes de la maladie apparaissent lors de l'infection de jeune feuille et se présentent par des cloques à la surface des feuilles (Fig. 8). Un mycélium blanc cotonneux apparaît alors à la surface des cloques. La couleur blanche provient de la formation de conidies asexuelles alors qu'en milieu de saison des cleistocarpes apparaissent de couleur sombre. Les cleistocarpes contiennent 8 ascospores. Le cône est également sensible à l'infection par *Sphaerotheca humuli*. En fonction de l'état de développement du cône la maladie pourra s'établir plus ou moins facilement. Les cônes non fécondés sont par exemple plus sensibles à l'infection. Il peut apparaître une coloration rouge sur les cônes causée par la présence de cleistocarpes. Ces derniers permettent au champignon d'hiverner. Au printemps ces structures vont relâcher les ascospores qui réinfecteront à nouveau des feuilles de houblon. L'infection secondaire se produit majoritairement par les conidies asexuelles. En effet les ascospores ont besoin d'eau pour germer alors que les conidies peuvent se développer sur la surface sèche des feuilles.



*Fig. 8. Feuille de houblon infectée par Sphaerotheca humuli.*

Différents produits phytosanitaires sont disponibles pour lutter contre ces infections. La croissance du champignon s'effectue entièrement à la surface de la feuille, il est ainsi plus facile à contrôler qu'un pathogène qui se développe à l'intérieur de la plante. Le composé triforine de la famille des formamides agit sur la déméthylation des stérols. Il est efficace pour enrayer les infections dues à *Sphaerotheca humuli* cependant il montre un effet phytotoxique sur le houblon. Il est recommandé de limiter son utilisation à quatre applications sur l'année.



Fig. 9. Feuille de houblon infectée par *Verticillium albo-atrum*.

#### ***I. 1. 1. 4. 3. Verticilliose***

La verticilliose est provoquée par le champignon filamenteux *Verticillium albo-atrum*. Ce dernier se caractérise par l'infection des feuilles, qui développent des tâches jaunes suivies de zones irrégulières de nécrose entre les vaisseaux majeurs (Fig. 9).

Deux types de symptômes peuvent apparaître causés par différentes souches du pathogène. Les symptômes dit progressifs apparaissent très tôt dans la saison et se caractérisent par la mort des plants ainsi qu'une dissémination rapide dans toute la plantation. Les symptômes dit fluctuants se traduisent par un épaissement des lianes et une coloration marron du bois limité au centre de la plante.

*Verticillium dahliae* est un pathogène de la pomme de terre, des tomates et des fraises. Il peut également infecter le houblon lors de saisons chaudes en provoquant des symptômes équivalents à ceux trouvés avec *Verticillium albo-atrum*. Il est par conséquent recommandé de

ne pas planter de houblon après avoir cultivé des pommes de terre ou des tomates pour éviter une contamination.

Les traitements des verticillioses du houblon par des produits phytosanitaires sont très délicats. De nombreuses molécules ont été testées et bien qu'elles aient montré une efficacité lors de test en laboratoire, elles n'ont pas eu d'effet en plein champ. La difficulté réside dans l'élimination du pathogène dans les racines. Les traitements systémiques remontent dans la plante avec la sève mais ne diffusent pas dans les racines les plus profondes.

#### ***I. 1. 1. 4. 5. Autres maladies d'origine fongique***

L'oïdium, le mildiou et la verticilliose du houblon sont les principales pathologies de cette plante. Cependant, il existe un nombre de pathogènes secondaires qui provoquent plus rarement des pathologies.

##### *I. 1. 1. 4. 5. 1. Phytophthora citricola*

*Phytophthora citricola* est responsable de la pourriture noire des racines. Il a posé des problèmes majeurs en Nouvelle Zélande jusqu'au développement de souches résistantes. Ce pathogène infecte la plante en pénétrant la souche près du collet où il envahit les vaisseaux du xylème. Les tissus avoisinant sont alors gorgés d'eau et pourrissent. Les traitements phytosanitaires en Europe permettent d'éviter ce type d'infection.

##### *I. 1. 1. 4. 5. 2. Botrytis cinerea*

La maladie provoquée par *Botrytis cinerea* se caractérise par la formation d'un mycélium cotonneux sur les cônes qui changent de couleur pour devenir bruns. Cette maladie est généralement retrouvée au Japon. Des cas en Europe ont été décrits mais restent rares car le champignon nécessite des conditions optimales pour développer la maladie.

##### *I. 1. 1. 4. 5. 3. Alternaria alternata*

*Alternaria alternata* n'est pas un pathogène du houblon cependant un épisode pathologique lui est attribué en Angleterre. Les cônes présentaient une décoloration caractéristique d'une infection par un Oïdium, cependant même les cultivars résistants étaient infectés. Le seul pathogène retrouvé sur ces cônes était *Alternaria alternata*. Des inoculations sur des cônes sains avec ce champignon aboutissent aux mêmes symptômes.

##### *I. 1. 1. 4. 5. 4. Cladosporium*

*Cladosporium* n'est pas non plus un pathogène du houblon mais il peut infecter les cônes de houblon si les conditions lui sont favorables. L'infection des cônes par *Cladosporium* se caractérise par la coloration brune des bractées.

#### *I. 1. 1. 4. 5. 5. Fusarium sambucinum et F. avenaceum*

*Fusarium sambucinum* provoque un chancre du houblon localisé à la base de la liane où apparaît une nécrose du liber (phloème secondaire). La liane peut ainsi facilement être cassée à cet endroit, les feuilles sur la liane deviennent alors flasques. L'infection par ce pathogène se produit à l'endroit d'une blessure de la plante. Le collet est particulièrement sensible, car il subit les contraintes entre la liane et la souche. Dans certains cas de plantation il peut également frotter contre le piquet qui retient le fil de tuteurage. Les tissus au-dessus du chancre gonflent à cause du stockage des matières carbonées car les flux vers la souche par le phloème sont interrompus.

*F. sambucinum* et *F. avenaceum* ont été isolés à partir de cônes nécrosés en Oregon. Ils ont été inoculés sur des cônes sains et ont montré un pouvoir pathogène reproduisant les mêmes symptômes de nécrose (Bienapfl MS thesis).

Les maladies provoquées par *Fusarium sambucinum* peuvent être facilement évitées en préservant les lianes de dommages physiques. Le thiabendazole, qui se combine avec les microtubules, a montré une efficacité dans le contrôle de la maladie.

### ***I. 1. 2. Le champignon modèle : Fusarium graminearum***

#### ***I. 1. 2. 1. Biologie du champignon***

Les champignons se caractérisent par une croissance sous forme de mycélium. Ces eucaryotes sont hétérotrophes vis à vis des sources de carbone.

Les champignons peuvent se classer dans différentes familles. Les **Chytridiomycètes** sont caractérisés par la présence d'un flagelle unique au niveau de la zoospore. Parmi les **Chytridiomycètes**, on retrouve les champignons de la flore du rumen. Ces derniers sont caractérisés par une croissance anaérobie. Les **Zygomycètes** sont définis par leur aptitude à fusionner leur mycélium pour former une gametangia qui donnera des zygospores. Les **Ascomycètes** tirent leur nom des spores haploïdes produites lors de la reproduction sexuelle. Ils ont également un mode de reproduction asexué, qui implique la production de conidiospores. Les **Basidiomycètes** produisent des spores haploïdes nommées basidiospores. La présence de « clamp connections », qui permettent de maintenir l'état dicaryotique à l'extrémité de l'hyphe est également une des caractéristiques de ce groupe. Les autres champignons qui ne montrent pas de phase sexuelle sont habituellement classés parmi les champignons mitosporiques.

*F. graminearum* se cultive facilement sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar, Annexe 1) à une température de 25°C. Il présente alors un aspect duveteux ainsi qu'une coloration caractéristique rose (Fig. 10).

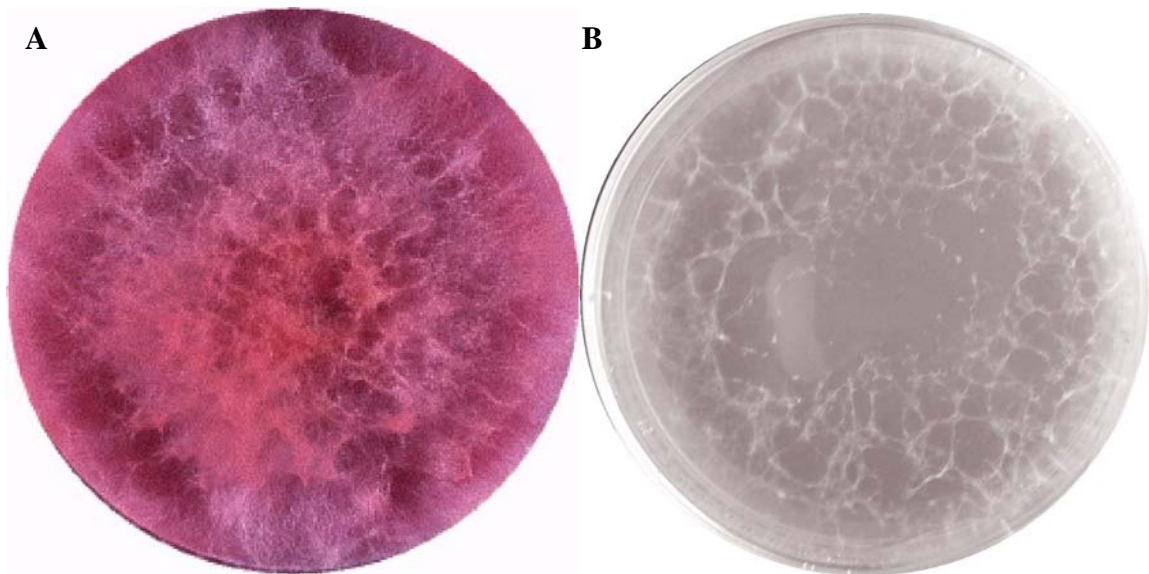


Fig. 10. Apparence de *Fusarium graminearum* en culture *in vitro*.  
A culture sur milieu PDA B culture sur milieu SNA induisant la production de spores.  
Source : Laboratoire de Phytopathologie – UMR 7100.

### **I. 1. 2. 1. 1. Position taxonomique**

*Gibberella zeae* est la forme téléomorphe ou sexuelle du champignon. Il appartient à la division des Ascomycètes, classe des Sordariaceae, ordre des Hypocréales, et famille des Nectriaceae. *Fusarium graminearum* est le nom de la forme anamorphe ou asexuelle, il est classé dans la famille des Hypocréales mitosporiques dans l'ordre des Hypocréales.

Le genre *Fusarium* comporte une cinquantaine d'espèces dont certaines sont connues pour engendrer des pathologies. Dans le complexe d'espèces *F. oxysporum*, les noms attribués aux différentes formes spéciales sont directement dérivés de l'hôte sur lequel le champignon a été isolé. *F. sambucinum* est un pathogène reconnu des solanacées (Lynch et al., 2003). *F. avenaceum* (téléomorphe *Gibberella avenacea*) a été décrit comme pathogène de la pomme de terre mais aussi d'autres plantes comme la gentiane ou encore le pin (Desjardins, 2003). Au contraire de ses cousins pathogènes, *F. venenatum* est utilisé pour la production de Quorn. Le Quorn est un assemblage des filaments du mycélium du champignon, traité avec des arômes pour imiter la viande et servir de source de protéine de substitution.

Parmi l'espèce biologique *G. zeae*, 7 lignées phylogénétiques ont été mises en évidence (O'Donnell et al., 2000). Les auteurs ont réalisé un arbre phylogénétique à partir de la

combinaison des données de 6 gènes (Fig. 11.). Les origines des différentes lignées ainsi que leur migration sont représentées dans la figure 8. La lignée numéro 4 est majoritairement présente en Europe et provient d'Amérique du sud. L'Amérique du sud semble d'ailleurs être le berceau de la plupart des lignées de *Fusarium graminearum*.

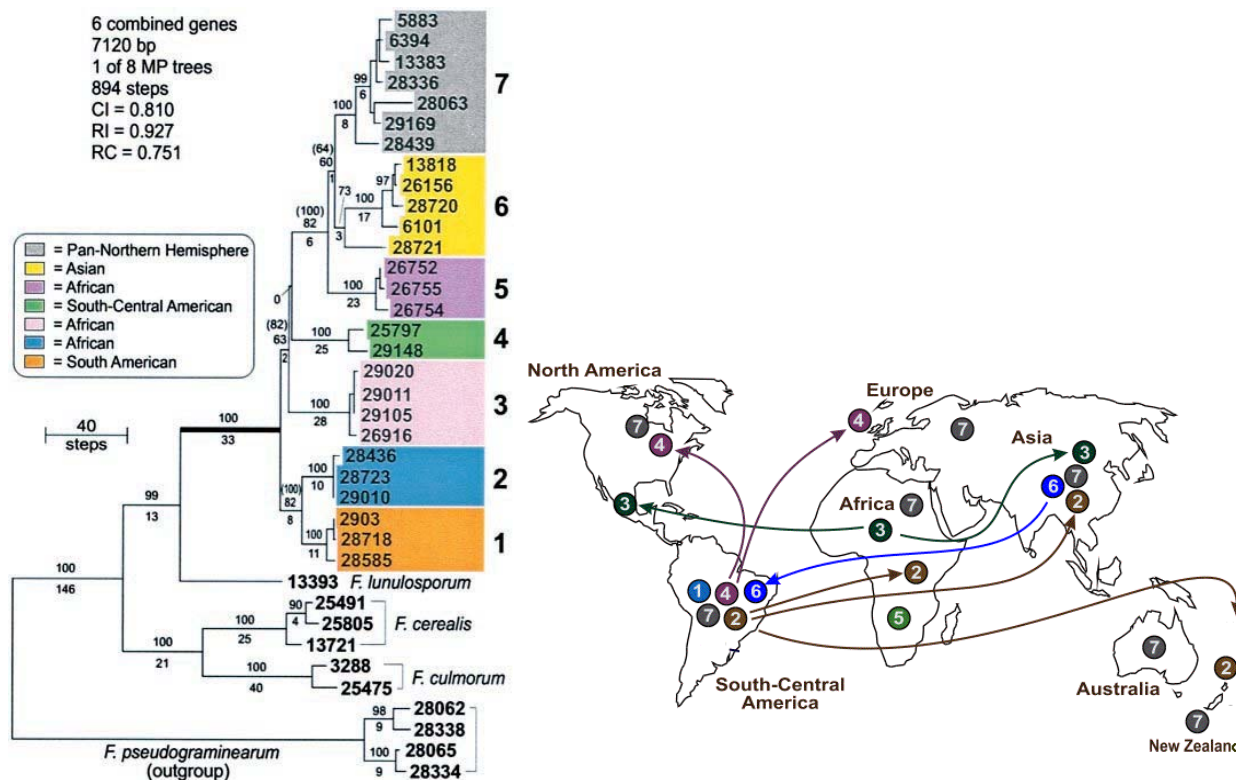


Fig. 11. Différentes lignées de *Gibberella zeae*, leur localisation et migration géographique.  
 Source : O'Donnell et al. 2000 et Cereal Disease Laboratory.

### I. 1. 2. 1. 2. Cycle sexuel de *Gibberella zeae*

Les champignons capables de reproduction sexuée utilisent deux types de stratégie. La première appelée reproduction hétérothallique est caractérisée par la présence d'un locus MAT avec deux formes alternatives. La reproduction ne peut se produire qu'entre individus ayant des loci de différents types. La majorité des Ascomycètes utilisent cette stratégie de reproduction. *G. zeae* utilise un mode de reproduction homothallique, il est caractérisé par la présence simultanée des deux formes du locus. Il est auto fertile et peut donc réaliser une reproduction sexuée avec lui-même ou avec d'autres individus (Yun et al., 2000). Ce type de mode reproductif peut être modifié génétiquement. La délétion de l'une ou l'autre forme du locus MAT peut transformer *G. zeae* en champignon à mode de reproduction hétérothallique (Lee et al, 2003).



### ***I. 1. 2. 1. 3. Spores de Fusarium graminearum***

*F. graminearum* produit deux types de spores : les ascospores et les macroconidies (Fig. 12).

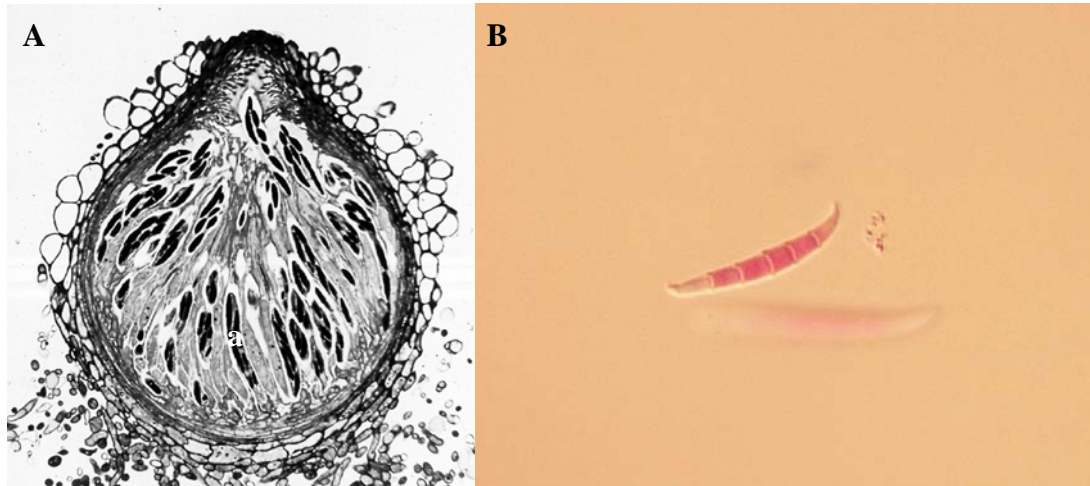


Fig. 12. Différents types de spores de *Fusarium graminearum*.  
**A** Périthécium contenant les ascospores (a) (Source Trail 2002) **B** Macroconidie isolée

Les ascospores sont produites lors de la reproduction sexuée dans des asques contenus dans le périthécium. Cette structure sert de canon à spores : des recherches récentes ont montré que le mécanisme d'expulsion dans les asques serait lié à une augmentation de pression interne lié à un influx d'ion et de mannitol (Trail et al., 2002). Ces auteurs ont également montré que la décharge de spores se réalisait préférentiellement en présence de lumière.

Les macroconidies sont des spores issues de phénomènes mitotiques. L'induction de la production de macroconidies peut être faite par la culture du champignon sur le milieu SNA (Synthetischer Nährstoff Agar, Fig. 10, Annexe 1). Cette forme de spore est la plus couramment utilisée au laboratoire pour inoculer des milieux de culture, de par la facilité à les produire en grande quantité (Stack, 1989). Ces spores sont particulièrement résistantes aux cycles de congélation/décongélation mais perdent rapidement leur viabilité lors d'exposition à des conditions où l'humidité relative est inférieure à 53% (Beyer et al., 2004). Les macroconidies sont les spores observées pour l'identification du genre *Fusarium*.

### ***I. 1. 2. 2. Identification***

L'étude d'un organisme pathogène implique de maîtriser son identification. De plus, dans un souci d'exactitude, il faut pouvoir vérifier l'identité du champignon utilisé tout au long des expériences. L'identification correcte d'un pathogène est également un élément clé dans le suivi des épidémies sur le terrain.

La classification des champignons est historiquement basée sur de nombreux caractères morphologiques et biologiques observables. L'identification des champignons filamenteux est alors effectuée par la comparaison d'un grand nombre de critères (Guarro et al. 1999). Dans le cas des *Fusarium*, l'examen des macroconidies permet d'identifier rapidement le genre et, en fonction de la forme et de la septation, donner une indication quant à l'espèce.

Etant donné que les champignons montrent rarement tous les aspects morphologiques nécessaires à leur identification, il est nécessaire de les cultiver. La culture des champignons inconnus sur différents milieux de culture sert alors à induire des phénotypes recherchés. L'observation des septations, de la forme et du branchement des hyphes, des structures de sporulation et des spores sont une partie des caractères observés pour identifier correctement le champignon. Des méthodes d'analyse biochimiques peuvent également apporter des informations sur le champignon. La détermination du contenu en acide gras, de la composition de la paroi cellulaire, de la composition en protéines ou encore des métabolites secondaires font partie des critères étudiés.

Outre le temps considérable de culture après isolement du champignon de telles méthodes d'identification requièrent l'œil d'un expert pour les observations microscopique ainsi qu'une expérience conséquente.

Depuis quelques années des méthodes d'identification basées sur des techniques de biologie moléculaire ont fait leurs preuves et se sont imposées par leur fiabilité. Ces techniques sont majoritairement basées sur l'ADN.

L'amplification par PCR de régions spécifiques est une méthode puissante pour l'analyse ciblée d'un type de champignon (Hsu et al., 2003). Le polymorphisme d'amplification d'ADN aléatoire (Random Amplified Polymorphic DNA : RAPD, Hadrys et al., 1992) est une méthode consistant à amplifier à l'aide d'amorces dégénérées des cibles aléatoires. Le profil de bandes obtenu peut être caractéristique et permettre la distinction d'espèce de champignons (Carnegie et al., 2001) mais aussi de races du même champignon (Mar Jimenez-Gasco et al., 2003). Les méthodes basées sur l'analyse du polymorphisme de taille de fragments de restriction (Restriction Length Fragment Polymorphism : RFLP



(Botstein et al., 1980) et la combinaison PCR et RFLP : analyse du polymorphisme de fragments amplifiés (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences : CAPS) sont également des méthodes robustes (Kamiya et al., 2004).

Ces méthodes de biologie moléculaire reposent sur des séquences cibles spécifiques à l'exception de l'analyse RAPD. Parmi les cibles classiquement utilisées pour les identifications, on retrouve l'ADN ribosomique (ADNr), l'ADN mitochondrial et parfois des séquences répétées de type microsatellites. Actuellement près de 700 000 séquences d'ADNr fongiques sont disponibles dans Genbank. Pour l'identification des champignons filamenteux, la cible prépondérante est l'ADNr (Guarro et al., 1999). L'avantage de cette cible est multiple. Il s'agit de séquences répétées dans le génome et retrouvées dans tous les organismes vivants. L'unité minimale se compose de plusieurs parties, des séquences très conservées (18S, 5.8S et 28S) alternant avec des séquences beaucoup plus variables (ETS, ITS1 & 2 et IGS) (Fig. 13).

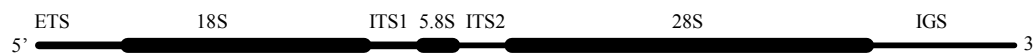


Fig. 13. Représentation d'une unité d'ADN ribosomique. ETS: externally transcribed spacer, ITS: internally transcribed spacer et IGS: intergenic spacer.

Des techniques d'identification basées sur la détection de molécules ont également été développées. Dans ce cas les caractéristiques recherchées sont des exoantigènes qui caractérisent les champignons. Les techniques d'immuno-chimie et notamment la méthode ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) sont couramment utilisées dans ce but. Cette méthode de détection a montré son efficacité dans la détection de champignons filamenteux (Li et al., 2000).

### ***I. 1. 2. 3. Pathogénicité de F. graminearum***

*F. graminearum* peut se comporter comme saprophyte sur des déchets végétaux. Il peut également provoquer diverses pathologies sur de nombreuses céréales (blé, orge, maïs, riz) mais aussi sur d'autres plantes de grande culture comme le soja ou encore le coton (Desjardins, 2003).

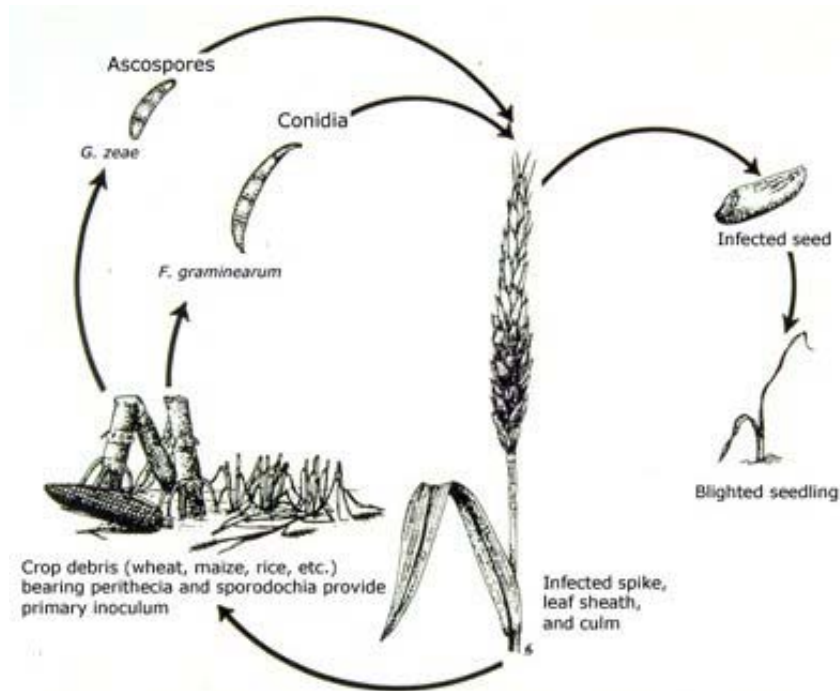


Fig. 14. Cycle infectieux de *Fusarium graminearum* sur les céréales.  
Source : The American Phytopathology Society <http://www.apsnet.org>

### I. 1. 2. 3. 1. Cycle infectieux de *Fusarium graminearum*

Le cycle infectieux classique sur céréales est présenté sur la Fig. 14. Au début de la saison *Fusarium graminearum* se développe sur les déchets végétaux présents dans les champs. Des périthécia sont rapidement formés dans le but de produire des ascospores. Des macroconidies apparaissent également. Les ascospores sont préférentiellement éjectées du périthécium entre 16h et 18h à une concentration de 600 à 9000 ascospores $m^{-3}$  créant une première vague de spores responsables de l'infection initiale (Paulitz, 1996). Il y a approximativement deux fois plus d'ascospores dispersées par l'air que de macroconidies (Markell et Francl, 2003). Les spores vont se fixer sur les épis et germer en fonction des conditions de température et d'humidité. Les symptômes alors provoqués sont un dessèchement précoce de certaines parties de l'épi, ainsi qu'un moindre remplissage des grains. Les champignons se développent également à la surface de l'épi qui présente après une période humide la coloration rose caractéristique du genre *Fusarium*. Cette maladie est appelée **fusariose** de l'épi (Fig. 15.). Lors de l'infection, de nouvelles spores vont être produites pouvant mener à une infection secondaire d'autres plants mais aussi au relargage de spores dans le sol qui seront responsables de l'épidémie de l'année suivante. Les grains de l'épi seront contaminés par les spores du champignon (Fig. 16).



Fig. 15. Fusarioses provoquées par *Fusarium graminearum* sur différents hôtes. A Fusariose de l'épi de maïs B Fusariose de l'épi de blé.

Source : Kent Evans

La plantation de grains contaminés par *F. graminearum* mène à la dissémination du pathogène. De plus lors de la plantation de grains infectés, les jeunes pousses présentent des tâches brunes et des nécroses le plus souvent sur le système racinaire. La plante ne pouvant plus se nourrir correctement meurt rapidement. Ces symptômes décrivent la fonte des semis.

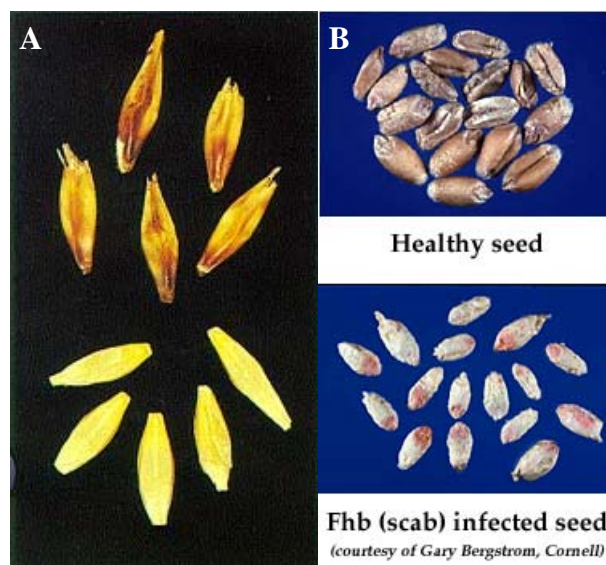


Fig. 16. Grains infectés par *Fusarium graminearum*. A grains d'orge B grains de blé  
Source : Berstrom

### ***I. 1. 2. 3. 2. Production de toxines***

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires retrouvés sur des lieux d'infection (Munkvold et al., 2003). *F. graminearum* produit deux types de toxines.

Dans la famille des trichothécènes, les deux types de mycotoxines les plus importantes économiquement sont le nivalenol (NIV) et le deoxynivalenol (DON) (Fig. 17). *F. graminearum* produit majoritairement le DON. Cette toxine a des effets variés (Rotter et al., 1996). Elle provoque des vomissements chez les animaux aussi bien que chez l'homme, d'où son nom de vomitoxine, ce qui conduit à une anorexie des animaux. Les cochons sont beaucoup plus sensibles à cette toxine que les souris ou encore les bovins. Au niveau cellulaire cette toxine inhibe la synthèse de protéines en se fixant sur les ribosomes. Le DON possède également des effets sur le système nerveux ainsi que sur le système immunitaire. Il a été montré une influence de la toxine sur un facteur de transcription critique dans les réactions immunitaire de type inflammatoire (Ouyang et al., 1996). Une étude a montré une interaction de différents *Fusarium* sur la production de DON chez *F. graminearum*. En présence de *F. moniliforme* ou *F. proliferatum* la production de DON est très fortement stimulée chez *F. graminearum* (Velluti et al., 2001). Une telle induction pourrait souligner un aspect coopératif dans le processus infectieux. En plus de l'action sur l'hôte, le DON a une action protectrice, en inhibant la production d'une chitinase chez l'agent de bio-contrôle *Trichoderma atroviride* (Lutz et al., 2003).

La toxine zéaralénone (ZEN) est également produite par *F. graminearum* et contamine les céréales récoltées avec des taux qui peuvent monter à  $2\text{mgkg}^{-1}$  (Bottalico, 1998) (Fig. 17). Cette toxine a des homologues structurales avec les hormones oestrogéniques des mammifères. Elle provoque des vulvo-vaginites chez les truies prépubères et pendant les gestations, elle réduit le nombre d'embryons viables (Etienne et Dourmad, 1994). Cette toxine provoque également des effets hépatotoxiques, qui ne sont pas encore élucidés mais doivent résulter de produits de détoxification créés lors des réactions de conjugaisons pour éliminer la toxine. De part sa proximité structurale avec les œstrogènes, des dérivés de ZEN sont utilisés comme anabolisants. Au niveau cellulaire, la ZEN inhibe la synthèse d'ADN et de protéines et perturbe le cycle cellulaire (Abid-Essefi et al., 2004). Les effets coopératifs de la production de DON ne sont cependant pas retrouvés pour la production de ZEN, dont le taux de production reste inchangé malgré la présence de *F. moniliforme* ou *F. proliferatum* (Velluti et al., 2000).

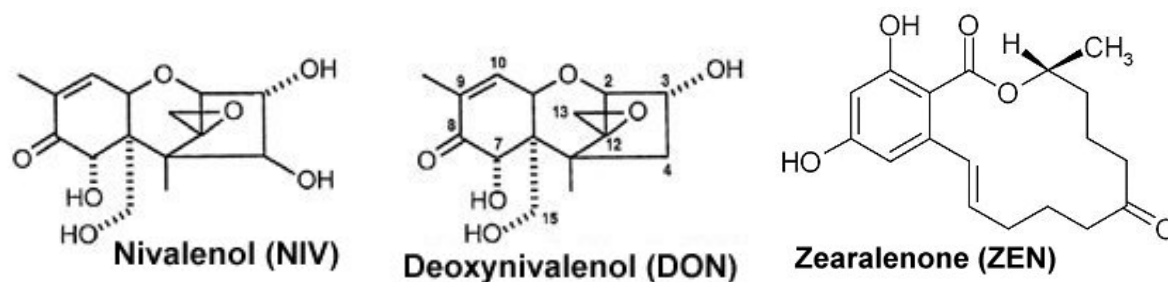


Fig. 17. Structure chimique des principales mycotoxines de *Fusarium graminearum*.

### I. 1. 2. 3. 3. Pouvoir pathogène de *Fusarium graminearum*

L'entrée dans la plante peut se faire par différents moyens (Fig. 18.). Certains champignons disposent de structures leur permettant de percer la paroi de la plante. Ces structures sont appelées appressorium. Certaines spores germent à la surface des plantes et pénètrent par le stomate le plus proche. D'autres champignons s'introduisent par des lésions déjà présentes à la surface des plantes. Enfin il a été montré la pénétration de *Pyrenopeziza brassicae* dans *Brassica napus* sans formation d'appressorium, mais avec une forte production de cutinase (Davies et al., 2000). Cette enzyme permet l'hydrolyse de la cutine, cire hydrophobe présente à la surface des feuilles.

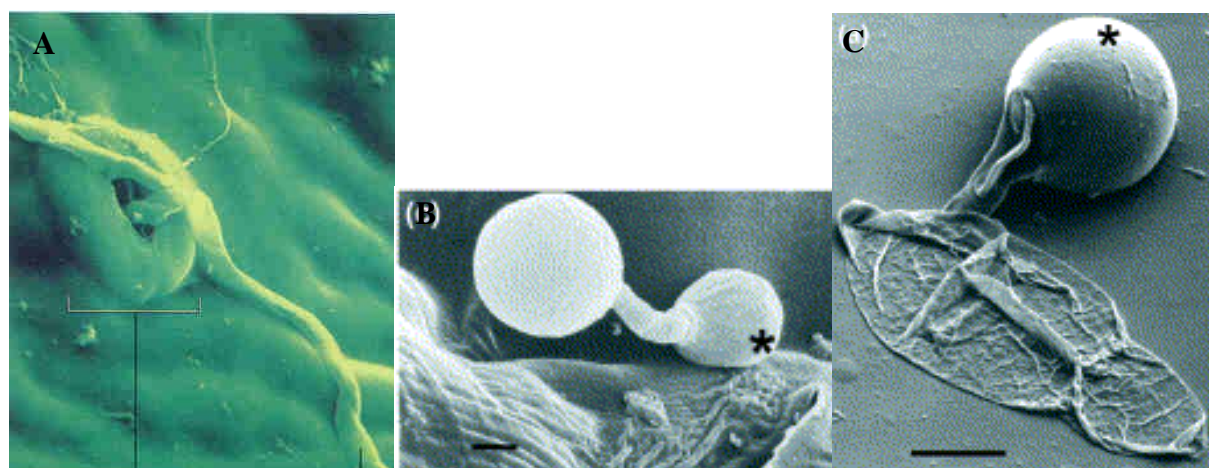


Fig. 18. Mode d'entrée du champignon dans la plante. **A** Entrée du champignon par un stomate **B** Formation d'un appressorium(\*) par *Magnaporthe grisea* **C** Formation d'un appressorium(\*) par *Phytophthora infestans*.

*Fusarium graminearum* n'est pas capable de former des structures de type appressorium comme *Phytophthora infestans*. Il est par conséquent obligé de trouver d'autres voies d'entrée dans la plante. *Fusarium graminearum* trouve facilement des sites propices à infection au niveau des plumeaux des jeunes épis des céréales ou sur des blessures. *F. graminearum*

dispose également de cutinases (8 protéines prédites) mais leur rôle dans le processus infectieux n'a pas encore été clairement démontré.

Les parois végétales sont composées de différents polymères, cellulose, xylane, pectine ainsi que de lignine. *F. graminearum* dispose d'un grand nombre d'enzymes lytiques qui lui permettent de dégrader la paroi cellulaire de la plante. Ces enzymes sont appelées enzymes de dégradation de paroi cellulaire (Cell Wall Degrading Enzymes : CWDE). Parmi les CWDE, on retrouve les enzymes capables de lyser chaque couche de la paroi végétale : cellulases, xylanases et pectinases.

Il a été montré que les spores de *Fusarium graminearum* germaient à la surface des épis en produisant des tubes germinatifs. Ces derniers forment un mycélium dense colonisant préférentiellement les cavités de l'épi. Ensuite le mycélium forme des hyphes infectieux qui colonisent l'ovaire. L'analyse des zones infectées montre une réduction des différents composants de la paroi végétale, indiquant clairement que les CWDE sont des facteurs importants de pathogénicité (Wanjiru et al., 2002).

Outre les enzymes lytiques capables de digérer les tissus végétaux, les mycotoxines de *Fusarium graminearum* jouent un rôle important lors de l'infection des plantes. La disruption de l'enzyme trichodiène synthase désactive la voie de biosynthèse des trichothécènes. Un mutant disrupté a été créé et son aptitude à infecter des épis et grains de maïs a été testée. Le mutant reste pathogène vis à vis du maïs cependant son pouvoir pathogène est réduit (Harris et al., 1999). Il a été également montré que l'implication du DON dans les pathologies végétales est proportionnelle à sa concentration (Asran et al., 2003).

#### ***I. 1. 2. 4. Moyens de lutte contre Fusarium***

Différents moyens de lutte existent, cependant la prévention reste la meilleure arme contre les épidémies de fusariose en champ.

##### ***I. 1. 2. 4. 1. Pratiques culturales***

La production de spores infectieuses à partir des déchets végétaux présents dans les champs est la première étape du cycle infectieux de *F. graminearum*. Il convient donc de ne pas réutiliser les déchets végétaux pour fumer les cultures.

Au niveau du semis, il est recommandé de semer les céréales dans un sol bien travaillé. Idéalement le sol doit favoriser une germination et une levée rapide. De cette manière la jeune plante peut être plus robuste pour faire face à une infection.



Une pratique d’alternance de culture apporte des effets bénéfiques compte tenu de la préservation nécessaire des ressources du sol. De plus, elle induit une variation naturelle de la flore favorable à la résistance aux pathogènes. De plus la culture de variétés résistantes est à privilégier.

#### ***I. 1. 2. 4. 2. Utilisation de fongicides***

De nombreux fongicides sont disponibles pour lutter contre les champignons (Annexe 2).

Pour empêcher la fonte des semis des céréales, les semenciers enrobent, lors du conditionnement, les graines de fongicide (captane ou thirame). La graine bénéficie alors d’une protection lors de la germination ainsi que lors du début de la croissance de la plantule.

#### ***I. 1. 2. 4. 3. Moyens de lutte biologique***

De nombreux agents de bio-contrôle sont actuellement disponibles dans le commerce. Le principe repose sur l’hyper-parasitisme. Certains champignons sont des parasites d’autres champignons. C’est le cas pour de nombreuses espèces du genre *Trichoderma*.

*T. harzianum* a été décrit comme capable de contrôler les pathologies induites par *F. oxysporum* sur le bananier (Thangavelu et al., 2004).

### ***I. 2. Interaction hôte-pathogène : la dégradation de la paroi végétale***

Les interactions entre hôte et pathogène peuvent être nombreuses. *F. graminearum* ne dispose pas de structure lui permettant de franchir la paroi végétale. Il doit trouver d’autres moyens pour pénétrer à l’intérieur de la plante. Dans le cas des céréales il pénètre au niveau des plumeaux des jeunes épis. Cette zone de la plante n’est pas totalement développée et la paroi végétale en ce point est peu épaisse. Plus tard dans le processus infectieux il a été montré que l’épaisseur de la paroi végétale au niveau du site d’infection est diminuée (Wanjiru et al. 2002). Ainsi les CWDE (enzymes de dégradation de paroi cellulaire) jouent un rôle important dans le processus infectieux.

L’interaction entre les deux organismes est donc examinée au niveau de la dégradation de la paroi cellulaire de la plante par le champignon.

### ***1. 2. 1. Paroi végétale***

Une des caractéristiques essentielles des cellules végétales est la présence d'une paroi cellulaire. Cette paroi est formée de différents polysaccharides et joue plusieurs rôles. Elle assure une structure qui évite l'explosion des cellules due à la pression vacuolaire. Elle permet à la plante de s'isoler de l'extérieur et d'éviter les pertes d'eau notamment par l'adjonction d'une couche de cutine. Enfin elle protège la plante de stress physiques et est une barrière efficace contre les insectes et les pathogènes.

La paroi est une structure dynamique avec différents stades de développement. La couche intercellulaire : il s'agit de la première couche formée durant la division cellulaire et est partagée avec la cellule adjacente. Elle est majoritairement formée de pectine et de glycoprotéines. La paroi primaire : elle est formée après la couche intercellulaire. Elle est constituée d'un squelette rigide de microfibrilles dans une matrice de pectine, d'hémicellulose et de glycoprotéines. La paroi secondaire : sa synthèse est réalisée lorsque la cellule a atteint sa taille finale. Elle est extrêmement rigide car composée de cellulose, hémicellulose et lignine.

#### ***1. 2. 1. 1. Cellulose***

La cellulose est un polymère formé de 1 000 à 10 000 résidus de D-glucose en liaison  $\beta$ . Ces polymères ont la capacité de s'associer par des liaisons hydrogènes formant des microfibrilles (Fig. 19). Ces microfibrilles peuvent s'associer en fibres plus grandes. Les fibres de cellulose sont constituées d'environ 500 000 molécules de cellulose, elles-mêmes formées de 5 000 résidus glucoses. Une telle structure peut donc renfermer environ 2,5 milliards de ponts hydrogènes. Même si un pont hydrogène est dix fois moins fort qu'une liaison covalente, 2,5 milliards de ponts expliquent largement la robustesse de la cellulose.



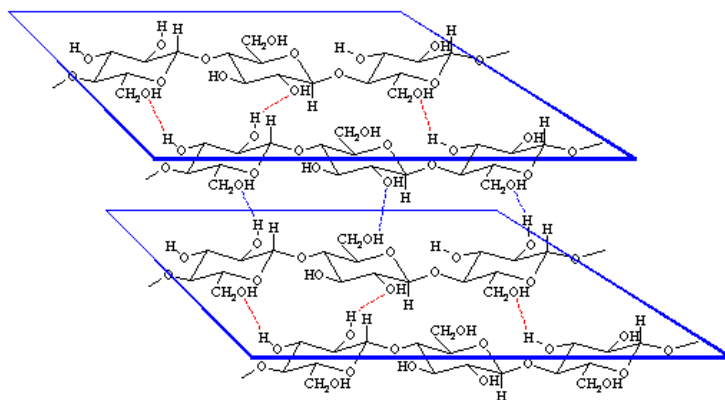


Fig. 19. Structure de la cellulose et formation de ponts hydrogènes.

Source : T. A. Newton

### I. 2. 1. 2. Hémicellulose

L'hémicellulose est une couche formée de différents polymères contenant une variété de sucres : xylose, arabinose, mannose. La particularité de l'hémicellulose est le mélange de monomère ainsi que de nombreuses ramifications. Le xyloglucan est un composant majeur de l'hémicellulose chez les dicotylédones.

La proportion de xylane par rapport à la paroi cellulaire est de 15-30% et 7-10% respectivement pour les angiospermes et les gymnospermes. Ce polymère est formé de xylose avec des liaisons  $\beta$ -1-4. Les monomères peuvent être substitués par différents composés :  $\alpha$ -L-arabinofuranoside, glucuronopyranosyl, 4-O-methyl-D-glucuronopyranosyl, acetyl, feruloyl et/ou p-coumaroyl (Fig. 20). Le xylane réalise l'interface entre la cellulose et la lignine. Il constitue donc une couche importante de la paroi cellulaire secondaire, lui assurant une meilleure cohésion (Beg et al., 2001).

Compte tenu de la complexité du xylane, un large panel d'enzymes doit être mis en œuvre afin d'arriver à sa dégradation complète. Les différentes activités enzymatiques ainsi que leurs cibles sont représentées en Fig 20. Des organismes capables de dégrader le xylane sont effectivement équipés d'une batterie enzymatique, *Trichoderma viride* et *Aspergillus niger* produisent respectivement treize et quinze xylanases différentes (Biely et al., 1985).

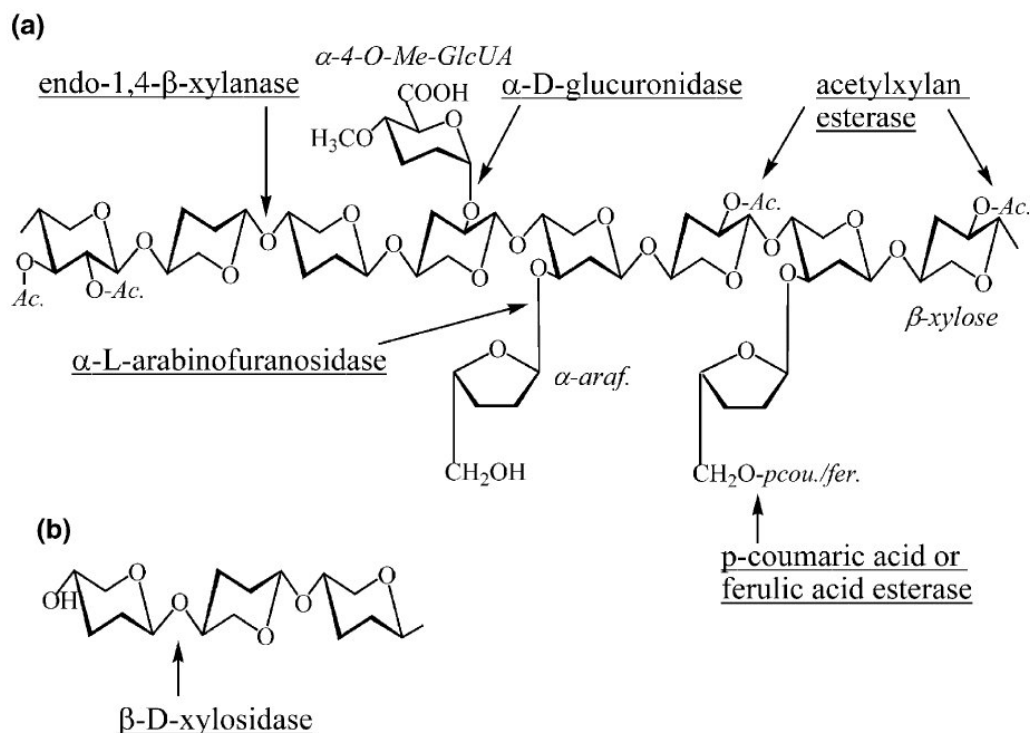


Fig. 20. Structure du xylane et site d'attaque des xylanases. **a** polymère de xylane, Ac., Acetyl group;  $\alpha$ -araf.,  $\alpha$ -arabinofuranose;  $\alpha$ -4-O-Me-GlcUA,  $\alpha$ -4-O-methylglucuronic acid; pcou., *p*-coumaric acid; fer., ferulic acid. **b** hydrolyse de xylo-oligosaccharides.

Source : Collins et al. 2004.

### I. 2. 1. 3. Acide pectique et la pectine

L'acide pectique est formé d'une centaine de monomère d'acide galacturonique liés par des liaisons  $\alpha$ -1-4. La présence d'une fonction acide carboxylique rend la molécule très soluble et permet la formation de ponts ioniques entre les polymères (Fig. 21). La pectine est un polymère d'acide galacturonique plus grand, on compte environ 200 résidus par molécule. De plus, la plupart des groupements carboxyles sont méthylés, rendant la molécule moins soluble (Fig. 21).

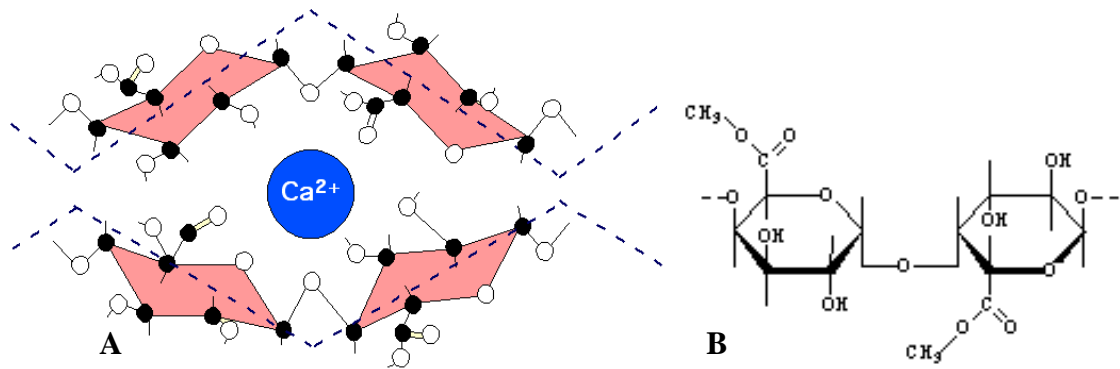


Fig. 21. Structure de l'acide pectique avec la formation de ponts ioniques avec le calcium (A) et acide galacturonique méthylé (B).

Source : Biologie et multimédia - Université Pierre et Marie Curie, Paris

#### I. 2. 1. 4. Glycoprotéines

La paroi cellulaire des plantes contient de nombreuses protéines. Ces protéines se caractérisent par de nombreuses glycosylations mais aussi par une richesse en hydroxyproline. Les résidus hydroxyproline sont souvent glycosylés. De plus, les protéines de la paroi sont également riches en lysine qui par sa fonction  $\text{NH}_3^+$  peut établir de nombreuses liaisons, dont des liaisons avec les fonctions acide-carboxylique des acides pectiques.

L'extensine fait partie des protéines de la paroi cellulaire. Cette protéine a la particularité de pouvoir former des liaisons covalentes avec d'autres extensines par leurs résidus tyrosine. L'extensine a une structure en hélice du fait de sa forte proportion d'hydroxyproline. Cette structure ainsi que les nombreux ponts formés avec la cellulose renforce la cohésion de la paroi.

#### I. 2. 1. 5. Lignine

La lignine est un polymère formé de résidus phénoliques. La phénylalanine ammonia lyase (PAL) permet de synthétiser le cinnamate à partir de phénylalanine. L'acide cinnamique est alors le point de départ de la synthèse de nombreux monolignols (Fig 22).

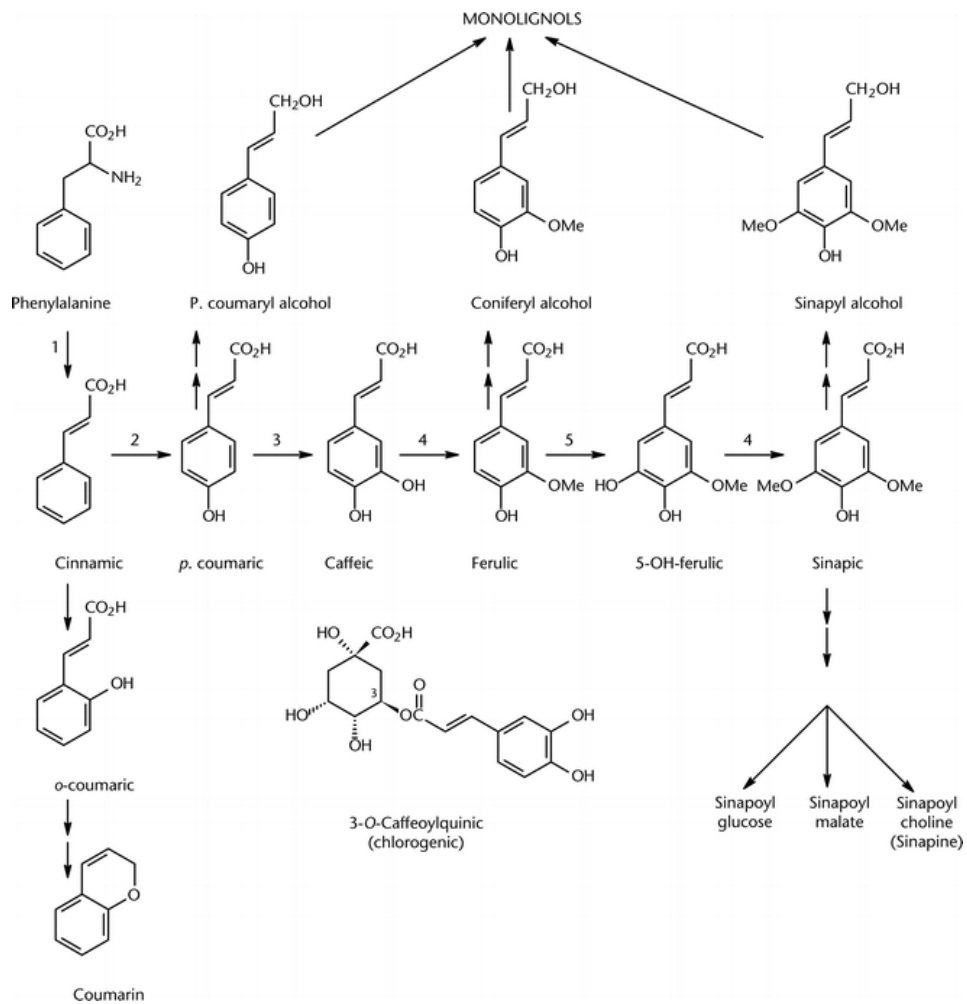


Fig. 22. Synthèse de monolignols.

Source : Stephen C Fry , *Plant Cell Wall Biosynthesis*,

Les monolignols sont sécrétés par la cellule. C'est dans la paroi cellulaire que se produisent des réactions de polymérisation des différents monolignols. Ces derniers forment des radicaux libres intermédiaires qui leur permettent de se polymériser entre eux mais aussi avec les sucres des autres polymères de la paroi. La lignine présente alors une rigidité due au fait des nombreuses liaisons covalentes (Fig. 23).

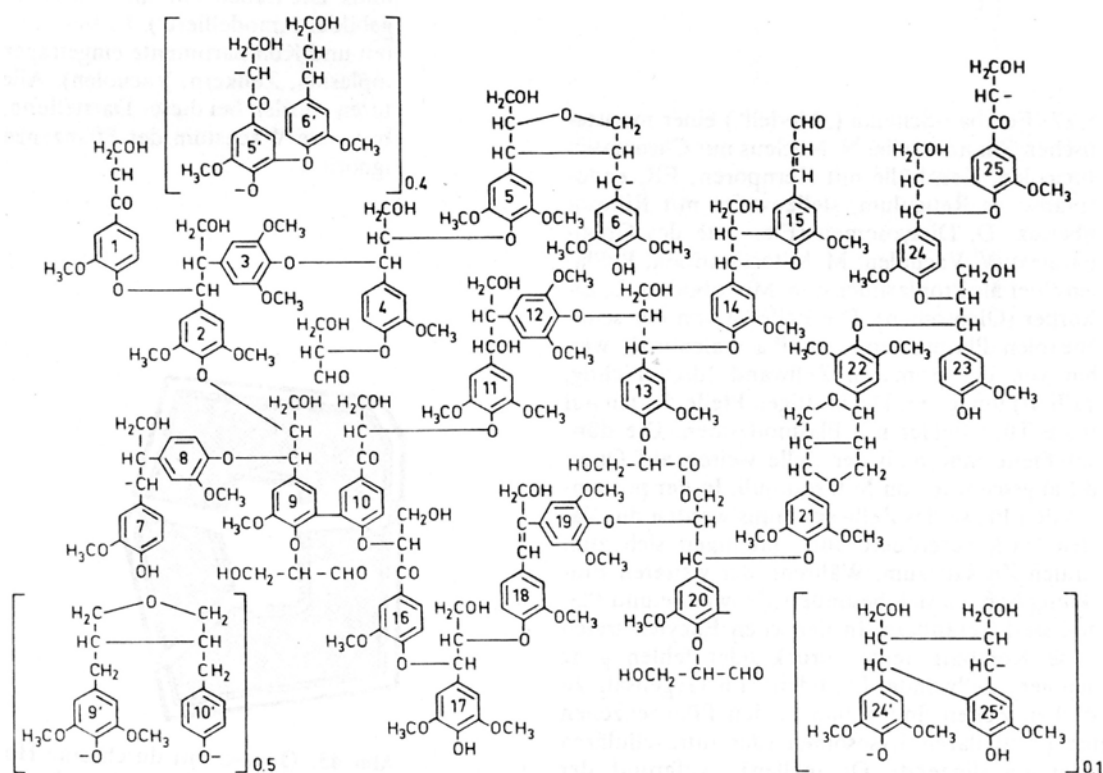


Fig. 23. Polymère de lignine : différentes liaisons possibles entre les différents monolignols.

Source : Weissenböck, 1976

## I. 2. 2. CWDE

Les CWDE (Cell Wall Degrading Enzymes, enzymes de dégradation de la paroi cellulaire) sont l'ensemble des enzymes qui permettent de dégrader les différentes couches de la paroi cellulaire. Les différentes enzymes retrouvées dans cette famille sont : les cellulases, les pectinases, les xylanases et les protéases.

### I. 2. 2. 1. Cellulases

La famille des cellulases est composée des cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91), des endoglucanases (EC 3.2.1.4) qui hydrolysent la cellulose et des  $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.1.21) qui hydrolysent le cellobiose. Les endoglucanases coupent les liaisons  $\beta$ -glucosidiques à l'intérieur du polymère de glucose, elles forment de plus petits polymères et libèrent ainsi un grand nombre d'extrémités. Les cellobiohydrolases réalisent une coupure à l'extrémité des molécules du polymère en libérant du cellobiose. Ce dernier est hydrolysé en deux molécules de glucose par les  $\beta$ -glucosidases. Ces enzymes agissent donc d'une manière synergique dans la dégradation de la cellulose (Lynd et al. 2002).

Les applications biotechnologiques des cellulases sont diverses, dont le traitement des pulpes de bois dans l'industrie du papier.

### ***I. 2. 2. 2. Pectinases***

Les pectinases regroupent différentes familles d'enzymes ayant pour substrat la pectine ou l'acide pectique. Les pectine méthyle estérases (EC 3.1.1.11) catalysent la desestérification du groupement méthyle présent dans la pectine pour la transformer en acide pectique. D'autres enzymes sont responsables de la dépolymérisation. Les polygalacturonases (PG) et les pectate lyases (PL) ont pour substrat l'acide pectique et se subdivisent chacune en deux familles respectivement : les exo-PG (EC 3.2.1.67) et les endo-PG (EC 3.2.1.15) et les exo-PL (EC 4.2.2.9) et endo-PL (EC 4.2.2.2). Les PG et les PL se distinguent par leur mécanisme de rupture de liaison, respectivement par hydrolyse et  $\beta$ -élimination. Les pectine lyases (endo-PNL, EC 3.2.2.10) ont pour substrat la pectine. Elles réalisent toutes des coupures internes dans la chaîne d'acide galacturonique méthylé.

Les pectinases sont utilisées dans l'industrie alimentaire pour réaliser la clarification des jus de fruits et représentent donc un important marché.

### ***I. 2. 2. 3. Xylanases***

Les xylanases sont des glucosidases (EC 3.2.1.x) qui catalysent l'hydrolyse du xylane. Ces enzymes sont produites par une grande diversité d'êtres vivants : des bactéries, des champignons, des protozoaires, des gastéropodes et des arthropodes.

Les xylanases peuvent ont été classifiées de différentes manières. Diverses xylanases ont été décrites, mais il n'est pas possible de classifier correctement les enzymes par leur spécificité de substrat vu la complexité de ce dernier. La classification initiale avait rangé les cellulases et xylanase en 6 familles (A-F). En 1999, ce système a été mis à jour et 77 familles sont maintenant décrites (1-77). En 2004 la classification compte 96 familles, leur nombre augmente en fonction des nouvelles séquences présentes dans les bases de données. La différenciation de ces familles est basée sur la comparaison de séquences des sites catalytiques.

De part leur activité les xylanases font partie des glycosidases, plus précisément des endo-1,4- $\beta$ -xylanases (EC 3.2.1.8). Les enzymes correspondantes sont décrites dans les familles 5, 7, 8, 10, 11, 16, 26, 43, 52 et 62 (Collins et al., 2004). Les auteurs ont effectué des recherches bibliographiques et seulement les enzymes appartenant aux familles 5, 7, 8, 10, 11

et 43, possèdent des domaines dont l'activité endo-1,4- $\beta$ -xylanase a été confirmée par des tests biochimiques. Les séquences relatives aux familles 16, 52 et 62, se rapportent à des enzymes bifonctionnelles contenant des domaines catalytiques des familles 10 et 11. Par conséquent les enzymes à considérer comme xylanases appartiennent aux familles 5, 7, 8, 10, 11 et 43. Les structures de nombreuses xylanases sont connues (Fig. 24). Les six familles montrent des structures très différentes. L'analyse des structures est un facteur dans la compréhension du fonctionnement mais aussi de la stabilité des enzymes dans certaines conditions extrêmes.

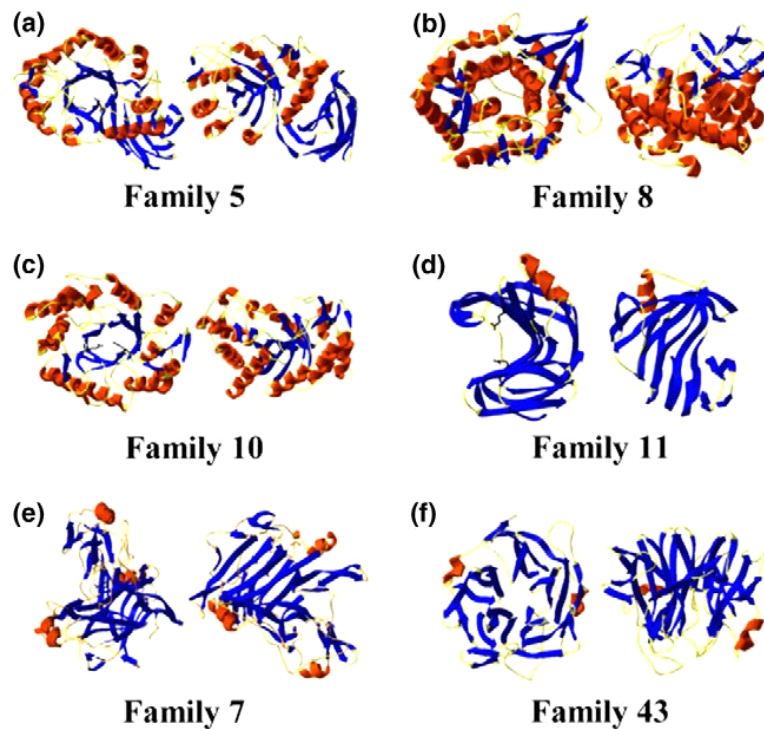


Fig. 24. Structure des différentes familles de Xylanases. **a** XynA, *Erwinia chrysanthemi*. La structure en tonneau ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> du site catalytique et le tonneau  $\beta$  9 sont montrés. **b** pXyl, *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAH3a. La structure du tonneau ( $\alpha/\alpha$ ) est présentée. **c** Xylanase de *Streptomyces lividans* montrant la structure caractéristique de la famille 10. **d** Xylanase de *Trichoderma reesei* montrant la structure caractéristique de la famille 11. **e** ED1, *Trichoderma reesei*. **f**  $\alpha$ -L-arabinanase de *Cellvibrio japonicus*.

Source : Collins et al. 2004.

#### I. 2. 2. 4. Protéases

Ces enzymes s'attaquent aux glycoprotéines de la paroi. La sécrétion de protéases lors d'infection est fortement augmentée et une relation a été établie entre la taille des lésions et les activités protéasiques sur des pommes de terre (Olivieri et al., 2004). Les protéases (EC

3.4.24.x) sont des enzymes hydrolysant les liaisons peptidiques, elles sont classées selon leur mode d'action et leurs sites préférentiels de coupure.

### ***I. 3. X-omique***

#### ***I. 3. 1. Outils bio-informatiques***

Les développements rapides des techniques de biologie moléculaire durant les deux dernières décennies, se sont accompagnés de la génération croissante d'informations. Le traitement de ces informations a pu être réalisé grâce aux progrès de l'informatique, en particulier des outils logiciels. Les gains de temps engendrés par des outils puissants sont considérables : par exemple, l'assemblage d'un millier de séquences peut être réalisé en quelques secondes.

##### ***I. 3. 1. 1. Logiciels***

De nombreux logiciels ont été développés pour subvenir à la demande des chercheurs. Nous ne parlerons pas des solutions commerciales intégrées car elles se remplacent facilement par l'utilisation de multiples solutions gratuites.

##### ***I. 3. 1. 1. 1. Alignements de séquences***

Deux types d'alignements sont très souvent utilisés : les alignements multiples et les recherches d'homologie.

Les alignements multiples permettent de réaliser un alignement entre plusieurs données par l'utilisateur. Cet alignement peut alors donner divers renseignements lors de la comparaison directe des séquences. Il peut également servir de base pour le calcul de distances génétiques. Différents programmes existent un programme est cependant communément utilisé : ClustalW. Ce programme réalise l'alignement par plusieurs étapes en faisant varier les matrices de substitution, les pénalités de gap pour obtenir le meilleur alignement (Thompson et al., 1994).

Les recherches d'homologies ont pour but d'identifier dans une banque de séquences, la ou les séquences présentant le plus d'homologie avec la séquence de requête. Différents algorithmes existent, l'algorithme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) étant majoritairement utilisé dans le programme du même nom, BLAST (Altschul et al., 1997). BLAST se décline en plusieurs programmes qui permettent de réaliser les recherches avec des séquences nucléotidiques (BLASTN), des séquences protéiques (BLASTP) mais aussi de



lancer une recherche sur une banque protéique en utilisant la traduction dans les six cadres de lecture d'une séquence nucléotidique (BLASTX). Les résultats de recherche sont évalués par un score et par un indice de probabilité : l'expectation. Cet indice indique la probabilité de trouver une séquence présentant les mêmes homologies en tenant compte de la taille de la banque dans laquelle la recherche a été effectuée. Les banques de données de séquences représentent un point clé dans le cadre des recherches d'homologies. Leur choix ou alors leur création spécifique permet des analyses très fines d'homologies.

### ***I. 3. 1. 1. 2. Traitement de séquences***

L'analyse de séquences nécessite très souvent plusieurs manipulations comme la détermination de la séquence complémentaire reverse, la recherche de sites de restriction, le formatage et des opérations plus compliquées comme la détermination du site de clivage d'un peptide signal ou encore la détermination des sites antigéniques potentiels d'une protéine.

Historiquement, le package de programme GCG (Oxford molecular) était largement distribué dans les centres de bio-informatique. Le développement d'EMBOSS (European Molecular Biology Open Software Suit) a été initié pour offrir une solution libre d'accès. Depuis 2000, le package de programme est distribué gratuitement et prend de plus en plus d'importance. Cet ensemble de programmes souscrit à la philosophie « Open source » qui laisse le code source des applications et bibliothèque d'accès libre à l'utilisateur. Le package de programme est complet et recouvre tous les champs de la biologie moléculaire. Traditionnellement ces programmes s'utilisent à la ligne de commande ce qui permet d'automatiser les traitements pour de grandes séries d'analyses. Différentes interfaces graphiques permettent d'utiliser facilement les logiciels existant et sont régulièrement développées.

Le programme PHRAP (PHRagment Assembly Program) est un logiciel sous licence qui permet de réaliser l'assemblage automatique de fragments de séquences en une séquence unique. Ce logiciel est destiné à l'assemblage de produits de séquençage massif. Dans le cas de banques d'EST (Expressed Sequence Tag), il permet d'éliminer les séquences redondantes et d'assembler les séquences contiguës.

### ***I. 3. 1. 1. 3. Analyses phylogénétiques***

Les analyses phylogénétiques ont pu être réalisées de plus en plus facilement grâce à l'augmentation de la puissance de calcul des ordinateurs mais aussi par les solutions logiciel disponibles.

Le package de logiciel PHYLIP (PHYLogeny Inference Package) est distribué gratuitement et contient une trentaine de logiciels pour réaliser les analyses phylogénétiques et créer les arbres qui résultent de l'analyse. Le logiciel PAUP\* destiné à réaliser les mêmes analyses, est devenu un standard dans l'analyse phylogénétique des champignons filamenteux. Elle est basée sur l'alignement multiple de séquences que l'on fournit au programme. Il est par conséquent capital d'avoir un alignement de séquences sans erreurs ou incertitudes.

### ***1. 3. 1. 2. Langages de programmation***

Les langages de programmation sont devenus de plus en plus adaptés pour le traitement et l'analyse des séquences. Les langages de scripts sont relativement simples et permettent d'automatiser des tâches répétitives. Des langages plus évolués comme le langage PERL ou le langage python permettent facilement d'exploiter des fichiers textes. Des communautés de développeurs ont réalisé des modules pour ces langages : Bioperl, Biopython et Biojava. Les modules sont, pour ces langages, des bibliothèques de procédures et d'outils additionnels.

Le module Bioperl contient différents sous-ensembles de programmes qui permettent de réaliser différentes tâches. Ainsi Bio::SeqIO va permettre d'avoir des procédures pour manipuler les fichiers de séquences en tenant compte de leurs formats. Bio::SearchIO permet d'analyser les résultats du programme BLAST. Bio::Graphics permet de générer facilement des représentations de position sur des séquences par exemple. D'autres sous-ensembles interfacent l'utilisation de programmes externes au script PERL comme le lancement d'une recherche BLAST ou encore un alignement avec CLUSTALW par exemple.

### ***1. 3. 1. 3. Gestion des ressources bio-informatiques***

De nos jours de nombreux centres de bio-informatique donnent libre accès à leurs ressources par l'intermédiaire de portails : [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov), [www.infobiogen.fr](http://www.infobiogen.fr) ou [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk) par exemple. L'avantage de ces centres est la mise à disposition de grosses capacités de calcul. Cependant ces ressources ne sont pas « stables » et dépendent souvent de la connexion réseau mais aussi de la charge de travail instantané du serveur.

La mise en place d'un serveur de bio-informatique à l'échelle d'un laboratoire ou d'une unité de recherche est envisageable dans le cadre d'un investissement raisonnable. Les temps de réalisation des analyses peuvent rester très compétitifs à cause d'une charge d'utilisateur

moindre. De plus la connectivité réseau en interne est excellente et permet dans de nombreux cas d'obtenir des résultats instantanés.

L'utilisation combinée de ressources internes et externes permet d'optimiser le temps de travail et d'obtenir plus rapidement les résultats d'analyses.

### ***I. 3. 1. Génomique***

Le premier génome complet à avoir été séquencé est celui de *Haemophilus influenzae* (1.8 Mb) en 1995. Le génome de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (14 Mb) a été rendu public en 1996. Dès lors la course au séquençage a été ouverte. Les technologies de séquençage ont fait des progrès énormes : amélioration des chromophores et développement de l'électrophorèse capillaire. Des entreprises privées comme Celera ont été créées afin de séquencer le génome humain plus rapidement, pour breveter les séquences et ainsi maintenir un monopole sur les informations. Les instituts publics ont soutenu leurs efforts dans la course de vitesse les opposant aux entreprises privées, dans le but de garantir le libre accès au génome. La séquence du génome humain a été publiée en 2001. D'autres génomes ont été séquencés depuis. Une priorité particulière a été mise sur les organismes pathogènes et les organismes modèles. L'analyse du génome des organismes modèles comme la levure *S. cerevisiae*, permet de comprendre des mécanismes moléculaires présents chez tous les eucaryotes (Dujon et al., 2004). L'étude des génomes des pathogènes permet quant à elle d'obtenir une meilleure compréhension des phénomènes liés aux pathologies dans le but de les enrayer ou de les contrôler.

La mise à disposition des données de séquences a créé une nouvelle discipline : la génomique. Elle peut être définie comme l'étude exhaustive des génomes et en particulier de l'ensemble des gènes, de leur disposition sur les chromosomes, de leur séquence, de leur fonction et de leur rôle.

#### ***I. 3. 1. 1. Génomes de champignons filamenteux séquencés***

A la date de rédaction de la thèse, 24 génomes de champignons sont disponibles dans la banque de données publique Genbank (Tab. 1).

---

***Ascomycota***

***Pezizomycotina***

<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4
<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Coccidioides posadasii</i> C735
<i>Gibberella zeae</i> PH-1	<i>Magnaporthe grisea</i> 70-15
<i>Neurospora crassa</i> strain OR74A	

***Saccharomycotina***

<i>Candida albicans</i>	<i>Eremothecium gossypii</i>
<i>Kluyveromyces waltii</i> NCYC 2644	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Saccharomyces bayanus</i> 623-6C	<i>Saccharomyces bayanus</i> MCYC 623
<i>Naumovia castellii</i> NRRL Y-12630	<i>Saccharomyces kluyveri</i> NRRL Y-12651
<i>Saccharomyces kudriavzevii</i> IFO 1802	<i>Saccharomyces mikatae</i> IFO 1815
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	

***Schizosaccharomycetes***

<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
----------------------------------

---

***Basidiomycota***

<i>Coprinopsis cinerea</i> okayama7#130	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> H99
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	<i>Ustilago maydis</i> 521

---

***Microsporidia***

***Encephalitozoon cuniculi***

Tab. 1. Liste des champignons dont le génome est complètement ou partiellement séquencé.

Source : NCBI

Ces génomes correspondent principalement à des champignons d'importance sur le plan économique, pathologique ou de l'évolution. *Candida albicans* est un pathogène des humains, hôte dans lequel il occasionne des mycoses des couches superficielles de la peau ou des muqueuses (muguet buccal, vulvo-vaginite, périonyxis, onychomycose, intertrigo). *S. cerevisiae* est une levure modèle. Il s'agit du premier eucaryote à avoir été séquencé. Son étude a permis de comprendre de nombreux mécanismes cellulaires. *Neurospora crassa*, *Magnaporthe grisea*, *F. graminearum* sont des pathogènes réputés de nombreuses plantes. L'étude de leur génome promet une meilleure compréhension des mécanismes de l'infection.

**1. 3. 1. 2. Génome de *F. graminearum***

Le génome de *F. graminearum* est évalué à 40 Mb repartis sur 4 chromosomes. Le nombre de gènes présents dans le génome est estimé à 12 000.

Le projet de séquençage a été initié par le Whitehead Institute et soutenu financièrement par le département d'agriculture des Etats-Unis (USDA). La souche de *F. graminearum* retenue pour le séquençage fait partie de la lignée 7 qui est largement répandue à l'échelle

mondiale et impliquée dans les cas de pathologie. Cette souche a pour dénomination PH-1 (NRRL 31084).

Le séquençage du génome a été effectué avec la technique du « whole-genome shotgun sequencing » avec un taux de couverture de dix fois le génome. Cette technique consiste à découper le génome en morceaux et les séquencer aléatoirement. L'assemblage des différents morceaux de séquence donne lieu à la création de « contig ».

La séquence du génome a été mise à la disposition de la communauté scientifique le 1<sup>er</sup> mars 2003 sous le numéro d'accès AACM00000000. Il est composé de 511 contigs de plus de 2kb qui représentent 36 Mb soit 90% du génome. Les séquences hautement répétées ainsi que les gènes des ARN ribosomiaux ont été exclus.

Le 1<sup>er</sup> septembre 2003, le laboratoire de phytopathologie a ouvert son serveur de bio-informatique au public. Les résultats de BLAST des ORF (Open Reading Frame) de plus de 20aa et de plus de 100aa ont été rendus publics. Une recherche par mot clé dans les résultats de BLAST ainsi que des recherches instantanées par BLAST dans le génome et dans les ORF ont été mises à disposition.

Le 1<sup>er</sup> octobre 2003, la première annotation du génome a été mise en ligne au Whitehead Institute. Elle se composait d'un jeu de 11 640 gènes prédits. La quantité d'ADN codant est évaluée à 49,6%, l'ADN génique à 56, 2% avec une densité de un gène pour 3101pb. 45% des gènes ont une longueur comprise entre 1001 et 2000pb. La majorité des introns trouvés dans les gènes prédits sont de petite taille, 78% inférieurs à 100pb (Tab. 2).

<i>Taille</i>	<i>Genes</i>	<i>Introns</i>	<i>Exons</i>	<i>Non géniques</i>
1-50	0,00	25,70	13,86	0,59
51-100	0,01	52,64	12,74	1,52
101-200	0,06	12,57	18,29	5,16
201-300	0,47	4,66	11,09	6,38
301-500	4,44	3,37	14,31	15,38
501-1000	22,10	1,04	16,41	29,26
1001-2000	45,11	0,02	10,12	23,44
2001+	27,80	0,00	3,18	18,28

Tab. 2. Répartition des pourcentages de gene, introns, exons et séquences non-géniques en fonction de leur taille.

La publication de l'annotation du génome s'est accompagnée de la mise en place sur le site internet du Whitehead institut de nombreux outils de recherche et d'accès aux annotations.

### ***I. 3. 2. Transcriptomique***

Le transcriptome correspond à la population d'ARN messagers (ARNm) présents dans une cellule à un moment et dans une condition donnée. Le transcriptome varie en fonction de l'état des cellules, de leur stade de développement et des conditions extérieures. L'étude de cette population de molécules est appelée transcriptomique.

La transcriptomique permet d'obtenir une image instantanée des ARNm dans une cellule. Il est ainsi possible de déterminer quels gènes sont activés dans certaines conditions. Différentes techniques ont été développées depuis le début des années 1990 permettant l'étude rapide de ces populations de molécules.

#### ***I. 3. 2. 1. RT-PCR quantitative***

La PCR quantitative s'est beaucoup développée grâce à la chimie du Sybr® green. Cette molécule a la particularité de s'intercaler entre les plateaux de bases. Elle acquiert ainsi la possibilité d'émettre un signal de fluorescence. A la fin de chaque cycle de PCR, il est alors possible de mesurer la fluorescence qui est proportionnelle à la quantité d'ADN double brin présent dans la réaction. Il est donc possible de quantifier l'ADN présent initialement. La quantification peut être absolue, déterminée alors par rapport à une gamme de concentration connue. Elle peut être relative et se réfère dans ce cas à la quantité d'une autre cible interne à l'échantillon. La méthode de quantification relative peut facilement être employée en utilisant un gène domestique.

En réalisant une reverse transcription d'ARN et une PCR quantitative (Q-RT-PCR), il est possible d'évaluer la quantité d'un messenger présent dans une population et de suivre son évolution pour différentes conditions (Freeman et al., 1999).

Cette méthode se focalise sur un gène cible en particulier, voire une famille de gènes mais s'applique difficilement à une population entière.

#### ***I. 3. 2. 2. Banques d'EST***

##### ***I. 3. 2. 1. 1. Banques classiques***

Les banques d'EST (Expressed Sequence Tag) correspondent à la stabilisation dans des vecteurs de clonage de fragments d'ADNc correspondant à une population d'ARNm. Ainsi

chaque clone qui correspond à un ARNm. La population de clones est donc une image de la population d'ARNm à un moment donné de la vie de la cellule.

Classiquement de telles banques ont été utilisées pour découvrir de nouveaux gènes. Mais elles permettent également de donner une information quant à la présence ou à l'absence d'un ARNm.

L'analyse de ces banques peut être réalisée de plusieurs manières. Des techniques d'hybridation avec des sondes permettent de se focaliser sur des clones en particulier. Le séquençage massif de nombreux clones, suivi de l'identification des séquences, peut amener à dresser le portrait du transcriptome d'une cellule à un moment donné.

L'avantage d'une approche par banque d'EST est la génération d'une grande quantité de données en un temps très court. Les séquences des EST représentent une sous-catégorie de Genbank : dbEST (Boguski et al., 1993). Le nombre total d'EST disponibles dans la base de donnée au 1er octobre 2004 est de 23 970 155 dont 19 140 proviennent de *F. graminearum*.

### ***I. 3. 2. 1. 2. Banques suppressives***

Il existe dans les banques d'EST un grand nombre de molécules redondantes. Elles correspondent souvent à des gènes domestiques constitutivement exprimés à des taux élevés. Dans un certain nombre de cas, il est préférable de se focaliser sur une partie de la population d'ARNm.

La technique d'hybridation suppressive soustractive permet de réaliser l'enrichissement d'une population d'ARNm en séquences différentiellement exprimées entre deux conditions (Diatchenko et al., 1996). La technique repose sur la double hybridation de la population d'ARNm à enrichir (Tester) possédant différents adaptateurs avec la population d'ARNm qui servira de référence (Driver) (Fig. 25). L'application des deux hybridations suppressives soustractives abouti à l'obtention de différentes populations de molécules hybrides entre les populations Tester et Driver. Seules les molécules dont chacun des brins proviennent des deux différents pools de la population Tester seront amplifiées d'une manière exponentielle (cas e fig. 25).

Il est ainsi possible d'obtenir des populations enrichies en séquences spécifiques présentant un nombre réduit de répétition.

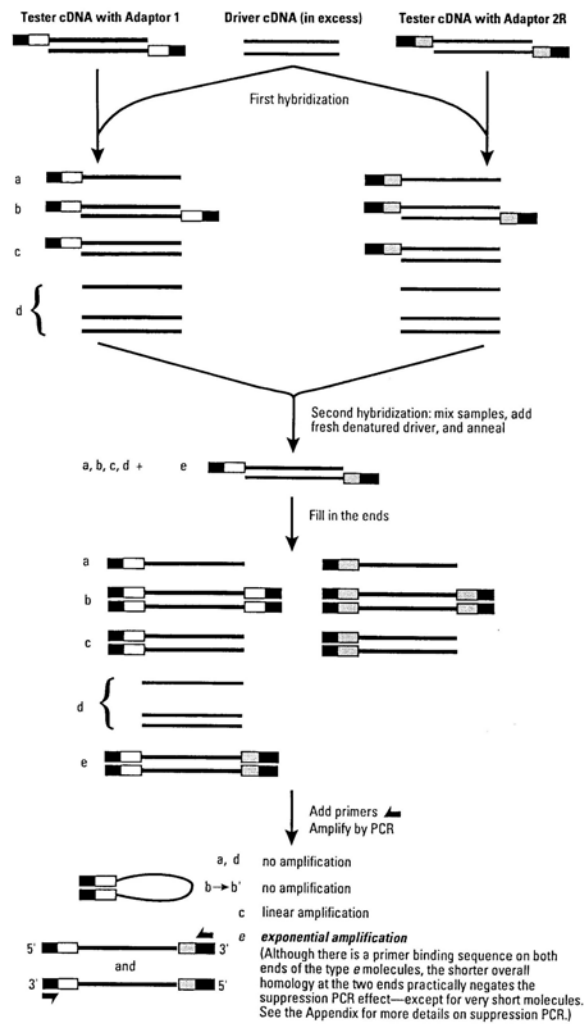


Fig. 25. Schéma explicatif de la méthode d'hybridation suppressive soustractive.

Source : BD Biosciences - Clontech

### I. 3. 2. 3. Microarrays

Les microarray permettent de suivre le niveau d'expression de milliers de gènes simultanément (Park et al., 2004). Leur principe de base repose sur celui du Dot blot. La haute densité des dépôts sur des lames de verres impose le travail avec un robot. Les molécules déposées sur les puces peuvent être de différentes natures. Il peut s'agir d'ADNc obtenus par PCR ou alors d'oligonucléotides de synthèse. Une autre technique consiste à synthétiser directement les oligonucléotides sur la puce en utilisant des masques photolithographiques (Affymetrix Inc.). L'hybridation peut se faire avec plusieurs populations d'ARNm marqués avec des chromophores, qui servent à la lecture par leur excitation (Fig. 26).



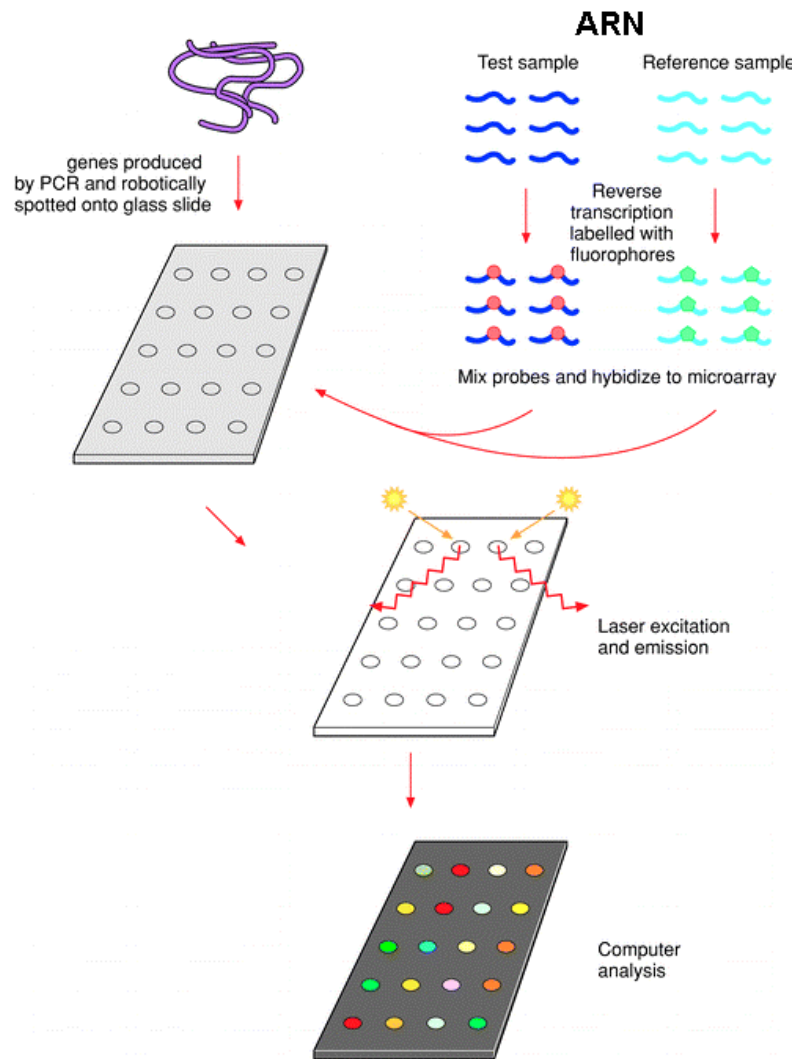


Fig. 26. Principe de l'analyse du transcriptome par microarray.

Source : Dianna Magliano

#### ***1. 4. Notre projet de recherche***

Le laboratoire de phytopathologie de l'ESBS effectue chaque année depuis 1997 des prélèvements sur les plants de houblon qui présentent des pathologies. Différents symptômes peuvent être observés (Fig. 27).

Une centaine de champignons filamenteux ont été isolés. Un représentant de chaque groupe de champignon morphologiquement identique a été envoyé pour identification chez CABI biosciences (Royaume-Uni). Les genres *Alternaria*, *Epicoccum* et *Fusarium* représentent plus de 80% des genres identifiés.

Parmi notre collection 12 champignons (F1 à F12) présentaient un tapis mycélien rose caractéristique des *Fusarium* sur milieu PDA. L'individu F4 a été identifié par CABI biosciences comme *Fusarium graminearum*. L'identification par des techniques de biologie



Fig. 27. Différents symptômes observés sur le houblon. **A** feuille desséchée (isolement de *Alternaria*) **B** Liane blessée présentant un mycélium rose (isolement de *Fusarium graminearum*) **C** Liane entière correspondante.

Source : Laboratoire de Phytopathologie – UMR 7100.

moléculaire des 12 *Fusarium* a donné lieu au développement d'une méthode d'identification ainsi que la validation de marqueurs phylogénétiques. Ces travaux sont présentés dans le chapitre II.

*F. sambucinum* et *F. avenaceum* ont déjà été décrits comme des pathogènes du houblon. Ils provoquent des infections au niveau des cônes ou alors un chancre du collet dans le cas de *F. sambucinum*. Au cours d'une campagne de prélèvements décrite plus haut, *F. graminearum* a été retrouvé sur la blessure d'une liane en dépérissement. Les symptômes de cette liane, en particulier le dépérissement des feuilles correspondent aux symptômes d'une trachéomycose (Fig. 6). La recherche de *F. graminearum* à l'intérieur de la liane endommagée s'est révélée concluante.

Le Postulat de Koch n'a pas été validé par une infection sur liane par *F. graminearum*, ce qui ne nous permet pas d'affirmer qu'il s'agit d'un pathogène du houblon. Cependant des tests d'infection sur feuilles ont présenté un envahissement rapide du tissu de la plante par le champignon. De ce fait, nous avons voulu aborder l'interaction houblon/*F. graminearum* comme un modèle pouvant être transposé à d'autres plantes d'importance économique.

Parmi les ressources dont dispose *F. graminearum* pour infecter une plante nous avons choisi de nous focaliser sur les enzymes de dégradation de la paroi cellulaire (CWDE). Les premières approches suivies par le laboratoire se basaient sur une seule enzyme. Cependant les CWDE sont présentes dans les génomes des champignons sous forme de familles multigéniques. L'inactivation de différents gènes de CWDE chez des espèces de *Fusarium* n'a pas montré de baisse de virulence (Gomez-Gomez et al. 2001 & 2002, Di Pietro et al. 2001, Huertas-Gonzalez et al., 1999, Garcia-Maceira et al. 2000 et 2001). D'autres membres des familles de CWDE inactivés ont remplacé l'activité manquante.

Nous avons donc opté pour une approche plus large en étudiant des familles de gènes. Lors d'une approche génomique décrite dans le chapitre III, nous avons concentré nos investigations sur la famille des xylanases. Ensuite, nous avons abordé une approche transcriptomique qui fait l'objet du chapitre IV. Deux axes ont été suivis, le premier par la constitution d'une banque suppressive soustractive mettant en valeur les familles de CWDE, le deuxième en complétant les investigations génomiques sur la famille des xylanases par leur suivi dans le transcriptome.

**Chapitre II – Identification et marqueurs phylogénétiques  
du genre *Fusarium***

## **II. 1. Identification des espèces du genre *Fusarium***

### **II. 1. 1. Problématique**

Parmi notre collection de champignons filamenteux isolés sur des plants de houblon en dépérissement, douze individus présentaient une coloration rose fréquemment observée chez les espèces de *Fusarium*. La question de l'identité de ces champignons fut soulevée.

Les méthodes d'identification classiques des champignons sont des méthodes lourdes à mettre en place et à exécuter. Elles demandent en plus une connaissance approfondie du genre et une expertise visuelle. De plus, la maîtrise des conditions de culture du champignon et en particulier ses conditions de sporulation sont des points particulièrement importants. La sous-traitance d'une telle analyse est coûteuse (150€ par individu) mais aussi très longue (2 mois). Il était donc nécessaire d'acquérir au laboratoire les compétences relatives à l'identification des espèces du genre *Fusarium*.

Les méthodes de biologie moléculaire semblaient les mieux adaptées par rapport à la facilité de mise en œuvre ainsi que par les compétences déjà présentes au laboratoire. La confirmation de l'appartenance au genre *Fusarium* a été faite selon la méthode décrite par Xue et al. (1999). Puis l'assignation des différents *Fusarium* à leurs espèces respectives a été effectuée à l'aide de la méthode développée par Edel et al. (1997).

La détermination des haplotypes décrits par Edel qui permettent d'attribuer les différents *Fusarium* à leurs espèces respectives a mis en évidence trois cas d'indétermination. Trois haplotypes non définis ont été trouvés.

Dans le but de disposer au laboratoire d'une méthode fiable et rapide adaptée aux populations collectées sur le houblon, nous avons développé une méthode d'identification par la combinaison d'une analyse CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) à une analyse de profils obtenus par Western blot. La description de cette méthode fait l'objet de l'article 1.

*II. 1. 2. Article 1 - Development of a bipartite method for Fusarium identification based on cellobiohydrolase-C: CAPS and Western blot analysis, Hatsch D., Phalip V., Jeltsch J.-M., FEMS Microbiology Letters, 2002*

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

**Development of a bipartite method for *Fusarium* identification based on cellobiohydrolase-C: CAPS and Western blot analysis**

**Didier Hatsch, Vincent Phalip, Jean-Marc Jeltsch**

**FEMS Microbiology Letters, 2002, Vol. 213, pages 245-249**

Pages 245-249 :

- La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.
- Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)00825-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097(02)00825-X)

- Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr)

### II. 1. 3. Extension du travail

La méthode d'identification présentée dans l'article est basée sur la combinaison des analyses CAPS et des analyses de profil par Western blot. Chaque méthode seule ne permet pas d'obtenir l'identification complète.

Lors de ce travail nous avons constaté l'obtention de deux types d'amplification pour la topoisomérase II pour la souche F1. Une première amplification correspondant à *F. sambucinum* et une deuxième correspondant à *F. graminearum*. L'amplification et le clonage ont été renouvelés pour la cellobiohydrolase-C (cbh-C) et le même résultat a été obtenu. La non contamination des matrices de PCR ainsi que la pureté de la souche ont été confirmées. La souche F1 est probablement une souche issue d'un croisement entre *F. sambucinum* et *F. graminearum*.

6 souches de références du genre *Fusarium* ont été ajoutées à notre collection : *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. solani* f.sp. *pisi*, *F. oxysporum* f.sp. *melonis*, *F. moniliforme* et *F. lateritium*. Ces souches correspondent à des pathogènes couramment retrouvés en Europe. Les fragments de CBH-C ont été clonés et séquencés. L'analyse des séquences a permis d'établir une nouvelle stratégie d'analyse CAPS. L'analyse CAPS peut à elle seule faire la distinction entre les 11 espèces de *Fusarium* et requiert 4 enzymes de restriction (Tab. 4).

	<b>ND</b>	<b>EcoRI</b>	<b>HphI</b>	<b>BsmAI</b>	<b>MwoI</b>
<i>F. graminearum</i>	334	77, 257	25, 309	18, 26, 100, 190	14, 128, 192
<i>F. sporotrichioides</i>	336	336	336	18, 26, 102, 190	14, 130, 192
<i>F. poae</i>	331	74, 257	71 ; 103, 157	18, 26, 97, 190	15, 125, 191
<i>F. sambucinum</i>	330	119, 211	70, 103, 157	18, 26, 96, 190	14, 15, 124, 177
<i>F. solani</i> f.sp. <i>pisi</i>	327	327	103, 224	44, 58, 225	15, 135, 177
<i>F. tricinctum</i>	336	336	336	26, 102, 208	15, 45, 132, 144
<i>F. avenaceum</i>	334	334	334	26, 34, 66, 208	15, 45, 132, 142
<i>F. venenatum</i>	330	119, 211	70, 103, 157	18, 26, 96, 190	14, 15, 124, 177
<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>melonis</i>	344	344	25, 78, 241	110, 234	20, 39, 138, 147
<i>F. moniliforme</i>	341	341	25, 78, 238	107, 234	45, 147, 149
<i>F. lateritium</i>	332	65, 267	103, 229	44, 96, 192	126, 206

Tableau 3. Taille des fragments obtenus par l'analyse CAPS. ND : non digéré.



#### **II. 1. 4. Conclusions et perspectives**

Le développement de cette méthode d'identification a été la réponse à une problématique du laboratoire : identifier facilement et rapidement les échantillons des prélèvements au champ du genre *Fusarium*.

Les analyses CAPS sont très efficaces mais se heurtent à deux limites. La première limitation concerne la description des profils de référence. Si le profil n'est pas encore décrit, l'identification n'est pas réalisable. Dans ce but nous avons ouvert une section CAPS sur notre site Internet (<http://phytopathologie.u-strasbg.fr>). Cette page décrit les nouveaux profils obtenus et se veut interactive avec les autres laboratoires. La deuxième limite se trouve être la possibilité de mutation des sites de restriction. La souche F6 présentait un profil de digestion par *MspI* non identifié par la méthode décrite par Edel. La séquence de la zone ADN<sub>r</sub> correspondante présentait un site muté, il est donc impossible d'attribuer correctement un profil.

L'avantage des méthodes CAPS est le fait de pouvoir éviter un séquençage du fragment cible mais aussi de pouvoir réaliser rapidement l'analyse. L'analyse par profil de Western est une approche complémentaire qui peut dans certains cas lever l'ambiguïté lorsque l'on se retrouve face à des séquences mutées. Le profil Western obtenu pour la souche F6 correspondant bien au profil défini pour *F. sambucinum*. Le désavantage de la méthode est l'ajout du temps de culture du champignon sur milieu minimum contenant de la carboxy méthyl cellulose.

Grâce à la méthode d'analyse CAPS étendue, le laboratoire est capable en une journée de confirmer l'appartenance au genre *Fusarium* ainsi que d'attribuer un nom d'espèce à partir des champignons isolés. Dans le cas d'incertitude le séquençage rapide du fragment amplifié permet d'obtenir des informations très détaillées. L'identification de mutations ponctuelles ou alors l'identification d'un nouveau profil peuvent être obtenus par cette méthode.

## **II. 2. Validation de marqueurs phylogénétiques**

### **II. 2. 1. Problématique**

Les travaux réalisés sur la *cbh-C* ont mis en évidence la possibilité d'utiliser cette cible pour l'identification des *Fusarium*. Cependant, la technique repose sur une approche bipartite. Nous avons essayé d'utiliser un deuxième marqueur moléculaire pour pouvoir réaliser une identification basée uniquement sur une approche CAPS. La topoisomérase II a été choisie comme deuxième cible car elle fait partie des gènes domestiques. Un fragment du gène de l'enzyme avait préalablement été cloné au laboratoire.

Les résultats d'amplification ont montré des amplifications doubles pour la souche F1. Ce qui a conduit à la distinction de cette souche particulière et à l'extension de la méthode CAPS-*cbhC* initiale à 11 espèces de *Fusarium*. L'analyse CAPS étendue permet d'identifier les 11 espèces de *Fusarium* à elle seule. Nous nous sommes intéressés à l'utilisation de cet autre marqueur moléculaire pour deux raisons. Premièrement la combinaison de deux marqueurs permet de surmonter des problèmes d'indétermination lorsque l'un des marqueurs présente une mutation ponctuelle. Deuxièmement l'approche par deux cibles différentes permet d'obtenir une meilleure fiabilité quant à l'analyse.

Nous avons choisi d'utiliser une approche phylogénétique pour valider l'utilisation de ces deux marqueurs par rapport au marqueur de référence : l'ADNr.

Le clonage des fragments de gène de la topoisomérase II des différentes espèces ainsi que l'analyse phylogénétique des différents marqueurs sont présentés dans l'article 2.

***II. 2. 2. Article 2 - Use of genes encoding cellobiohydrolase-C and topoisomerase II as targets for phylogenetic analysis and identification of Fusarium, Hatsch D., Phalip V., Jeltsch J.-M., Research in Microbiology, 2004***

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

**Use of genes encoding cellobiohydrolase-C and topoisomerase II as targets for phylogenetic analysis and identification of *Fusarium***

**Didier Hatsch, Vincent Phalip, Jean-Marc Jeltsch**

**Research in Microbiology, 2004, Vol. 155, pages 290–296**

Pages 290–296 :

- La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.
- Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2004.01.002>

- Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP:

[peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr)

### II. 2. 3. Extension du travail

L'étude par Southern blot avec deux enzymes de restriction différentes montre des fragments uniques majoritaires ainsi que deux bandes de plus faible intensité dans le cas de la *cbh-C* (Fig. 28). Les gènes codant la *cbh-C* et la *topII* sont vraisemblablement en copie unique. Ces éléments expérimentaux ont été confirmés par l'analyse de la séquence du génome de *F. graminearum*.

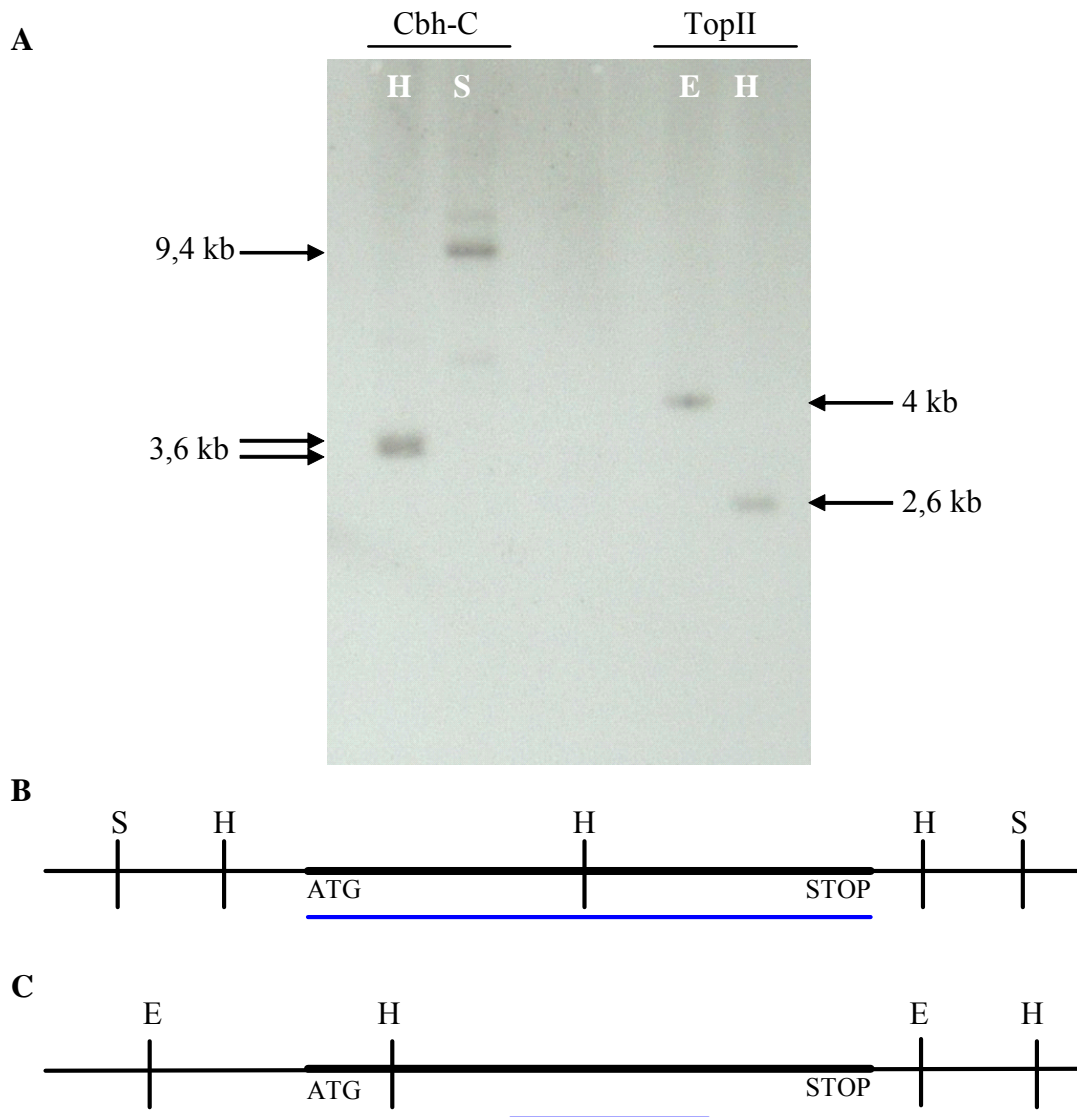


Fig. 28. **A** Southern blot révélant la présence des gènes de la topoisomérase II (*topII*) et cellobiohydrolase-C (*cbh-C*) en copie unique. **B** Représentation schématique du gène *cbh-C* ; **C** Représentation schématique du gène *topII*. Digestion : E : *EcoRI*, H : *HindIII*, S : *SacI*. Les sondes utilisées pour l'hybridation sont schématisées par des traits bleus. Les dessins ne sont pas à l'échelle.

#### ***II. 2. 4. Conclusions et perspectives***

Les deux nouveaux marqueurs moléculaires ont été validés en référence à l'ADNr. Indépendamment, les séquences de la *cbh-C* et de la *topII* sont plus informatives au niveau phylogénique malgré leur taille plus restreinte que la zone d'ADNr. Mais c'est lors de la combinaison des informations que l'apport des marqueurs est le plus remarquable.

L'utilisation de différents marqueurs pour l'identification des *Fusarium* permet de passer outre des problèmes de mutations. Ainsi il est possible de replacer facilement à l'aide de plusieurs marqueurs un champignon inconnu dans les différentes espèces de *Fusarium*.

Une application au laboratoire de ces marqueurs est le contrôle de routine de l'identité du champignon utilisé lors des travaux de biologie moléculaire.

La multiplication des marqueurs moléculaires ainsi que leur combinaison permet d'obtenir des arbres phylogénétiques de plus en plus précis. Il est également important d'élargir la population d'espèces dans laquelle le marqueur est validé. L'extension de ce travail serait de réaliser le clonage et le séquençage des différents marqueurs d'abord dans des populations d'espèces référencées puis dans d'autres espèces.

**Chapitre III – Génomique appliquée du champignon**  
*Fusarium graminearum*

### **III. 1. Problématique**

Lors de la mise à disposition du génome de *F. graminearum* par le Whitehead Institute (Cambridge, MA, USA) plusieurs questions ont été soulevées au laboratoire. Comment pouvoir, à partir des 36Mb de données brutes, localiser les séquences déjà clonées au sein de l'équipe ? Et par extension comment localiser rapidement des gènes d'intérêts ?

L'annotation complète du génome ne faisait pas partie des priorités du laboratoire. De plus, l'annotation était en cours de réalisation dans d'autres laboratoires. Nous avons donc décidé de développer un outil basé sur une approche fluide. Ainsi nous souhaitons mieux cibler nos investigations vers des familles de CWDE.

Parmi elles, les xylanases sont des enzymes capables de déstructurer les parois végétales en diminuant la cohésion entre les différentes couches de polymères. Nous nous sommes focalisés sur ces enzymes dans le but de déterminer leur implication en pathologie mais aussi par rapport à l'intérêt industriel qu'elles peuvent représenter. Nous avons alors appliqué notre outil pour la prédiction des xylanases de *F. graminearum*.

### **III. 2. Prédiction de gènes**

#### **III. 2. 1. Mise en place des outils d'analyse**

Les outils mis en place devaient respecter différentes contraintes notamment la rapidité d'utilisation, la mise à jour automatisable et la flexibilité. Pour ce faire nous avons basé notre stratégie sur l'analyse des ORF (Open Reading Frames, phases de lecture ouvertes).

La prédiction des ORF a été réalisée avec le programme GETORF du package EMBOSS. Des paramètres spécifiques ont été utilisés. La recherche des ORF a été menée selon la définition suivante : région entre deux codons STOP. Une taille minimale a été appliquée afin de limiter le bruit de fond. Les enzymes d'intérêt pour le laboratoire comme les CWDE ont des tailles minimales de l'ordre de 500pb. De plus leurs gènes contiennent de petits introns de 30 à 50pb. De ce fait la taille minimale des ORF a été réglée à 300pb soit 100aa. 71 654 ORF ont été prédites à partir du génome de *F. graminearum*.

A partir de ce jeu de données, deux voies ont été suivies. La première a été de concaténer les ORF, puis de les indexer pour obtenir une base de donnée interrogeable par BLAST. La deuxième voie suivie, a été de comparer chaque ORF avec la banque de données de séquences de protéines non redondantes NR (GenBank CDS translations + PDB +



SwissProt + PIR + PRF) à l'aide du programme BLASTP. Le paramètre de l'expectation joue un rôle important lors de telles analyses. En effet plus la valeur de l'expectation est petite plus la probabilité relative à la taille de la banque de trouver par hasard une séquence similaire est faible. Ainsi deux analyses ont été effectuées avec des expectations de  $10^{-3}$  et 10, qui ont conduit à l'obtention de résultats pour 16 009 ORF et 63 494 ORF respectivement. Les résultats de BLAST ont été stockés dans une base de données. Une recherche par mot clé a été mise en place. Les mots clés sont cherchés dans les résultats de BLAST uniquement dans les définitions des séquences homologues.

Un résultat classique de recherche se présente sous la forme suivante :

*Query= Fusarium.145\_238 [44573 - 44088] (REVERSE SENSE) graminearum*

Cette réponse nous indique que le résultat de BLAST de l'ORF 238 prédite sur le contig 145 allant de la position 44 573 à 44 088 en sens reverse contient le mot clé cherché. Un avantage non prévu de l'approche a été mis en évidence lors des premières recherche par mot clé dans les résultats de BLAST, dans de nombreux cas des réponses de ce type apparaissent :

*Query= Fusarium.457\_260 [138938 - 138582] (REVERSE SENSE) graminearum*

*Query= Fusarium.457\_261 [138551 - 137679] (REVERSE SENSE) graminearum*

Ce type de réponse met directement en évidence la présence d'un intron entre les positions 138 551 et 138 582. Les ORF 260 et 261 correspondent à différents exons du même gène.

L'accès à la recherche par BLAST dans les ORF prédites ainsi que la recherche par mot clés dans les résultats de BLAST ont été ouvert à la communauté scientifique en septembre 2003 sur le site de notre serveur de bio-informatique : <http://biotec.u-strasbg.fr>. Les fiches de résultat de BLAST peuvent être mise à jour automatiquement et régulièrement en fonction des mises à jour de la banque non redondante de protéine. Cette approche est donc fluide car en constante adaptation par rapport aux séquences connues.

### **III. 2. 2. Application des outils**

Les outils de recherche mis en place ont été appliqués dans la recherche des xylanases dans le génome de *F. graminearum*.

Nous avons recherché le mot clé « xylanase » dans les résultats de BLAST et 76 ORF ont été trouvées. Parallèlement deux séquences de xylanases de *Fusarium oxysporum*

(AAC06239, AAC06240) ont été comparées par BLASTP à la banque de données de séquences des ORF de plus de 100aa. Cette comparaison a mis en évidence 7 ORF.

La compilation de ces premiers résultats a mené à la sélection de 36 régions correspondant à différentes ORF. Des investigations plus poussées et une analyse de séquence manuelle a été effectuée. Le codon d'initiation correspondant au plus grand peptide possible a été sélectionné. Les introns ont été déterminés par combinaison de l'observation de l'apparition de codons STOP dans les phases de lecture, mais aussi par l'analyse des résultats de recherche par mot clé présenté plus haut. Les sites d'épissage ont alors été déterminés. Les motifs GTnnGT en 5' et nAG en 3' sont remarquablement conservés dans ces séquences. 27 séquences codantes ont ainsi été délimitées (Tab. 4). Parmi ces 27 séquences, 10 présentent un, voire plusieurs introns de petite taille typiques des champignons.

La xylanase 19 correspond à une xylanase déjà présente dans les banques de données (AAP41129, Watson unpublished).

Les traductions des zones correspondantes aux xylanases 4, 6, 8, 11, 12 et 20 présentent des homologies avec des xylanases. Il n'a pas été possible pour ces zones de prédire des gènes soit par l'absence de détermination de codon d'initiation soit à cause de problèmes de phases de lecture ne pouvant être rétablis par un intron.

Les zones correspondantes aux xylanases 22 et 23 correspondent aux extrémités de deux contigs. Ces extrémités correspondent aux parties 5' et 3' d'un même gène qui présente de fortes homologies avec un inhibiteur de xylanase.

N° xyl	N° contig	Introns	Position sur le contig
1	8	0	[11279 ... 12223]
2	259	3	[48 179 ... 48 548] [48 602 ... 49062] [49 115 ... 49 235] [49298 ... 49338]
3	266	0	[110074 ... 111228]
4	ND		
5	303	0	[62519 ... 63370]
6	ND		
7	318	0	[48351 ... 49715]
8	ND		
9	133	0	[16790 ... 18517]
10	145	0	[111471 ... 112478]
11	ND		
12	ND		
13	158	0	[34956 ... 35813]
14	406	2	[156291 ...156579] [156633 ...156750] [156803 ...157397]
15	160	1	[160670...160950] [161006...161411]
16	415	2	[135260 ... 134705] [134653 ... 134249] [134197 ... 134031]
17	433	2	[149588...149915] [149969...150194] [150240...151029]
18	168	0	[89573 ... 88485]
19	457	2	[103532 ...103821] [103875 ... 103965] [104019 ... 104333]
20	ND		
21	464	2	[104501...104570] [104623...104940] [104993...105750]
22	I		
23	I		
24	468	1	[52795 ... 52349] [52295 ... 51759]
25	147	1	[7494 ... 7146] [7088 ... 6466]
26	315	0	[160440 ... 161417]
27	316	0	[33614 ... 31923]
28	318	0	[51670 ... 50123]
29	321	1	[58277 ... 58387] [58521 ... 59516]
30	323	0	[105872 ... 107083]
31	Cbh-C		
32	363	0	[12972 ... 11989]
33	457	0	[20242 ... 21855]
34	468	0	[3865 ... 4887]
35	470	1	[10998 ... 11152] [11218 ... 12574]
36	6	2	[5814 ... 6480] [6533 ... 6650] [6714 ... 7029]

Tableau 4. Prédiction des xylanases dans le génome. ND : non déterminé, I : inhibiteur de xylanase, cbh-C : cellobiohydrolase-C

### III. 3. Validation des prédictions

#### III. 3. 1. Clonage et séquençage

Dans le but de confirmer les prédictions des séquences codant pour des xylanases de *F. graminearum*, des amorces ont été dessinées pour réaliser l'amplification des 27 candidats (Annexe 3).

L'ARNm rétro-transcrit de *F. graminearum* cultivé sur milieu minimum M3 contenant comme seule source de carbone des parois de houblon (Annexe 1) a été utilisé comme matrice pour l'amplification des séquences codantes des candidats. 22 amplicons ont été clonés et séquencés (Tab. 5). Ces amplifications valident les prédictions comme gènes activement transcrits, cependant les candidats restent putatifs vis à vis de leur activité biologique. Les tailles des xylanases varient de 228 à 575aa.

Certains messagers n'ont pas été amplifiés. Nous ne pouvons cependant pas affirmer que la prédiction était fautive. La présence de la molécule peut être discutée dans la population de messagers provenant du champignon cultivé dans des conditions minimales avec comme seule source de carbone des parois de houblon. En effet, certains gènes peuvent être régulés selon d'autres conditions, comme le pH du milieu de culture ou la présence d'autres substrats.

<i>N° xyl</i>	<i>Taille cDNA (pb)</i>	<i>Taille protéine (aa)</i>	<i>Accession</i>
1	945	314	AY575957
2	960	319	AY730561
3	1155	384	AY575958
7	1365	454	AY575959
9	1728	575	AY730562
13	858	285	AY575960
14	1002	333	AY648858
15	687	228	AY575961
16	1128	375	AY648859
17	1344	447	AY575962
18	1089	362	AY575963
19	696	231	AY648860
21	1146	381	AY575964
24	984	327	AY575965
25	972	323	AY648861
26	978	325	AY648862
27	1692	563	AY730563
28	1548	515	AY730564
32	984	327	AY575966
33	1614	537	AY730565
34	1023	340	AY575967
35	1521	506	AY730566

Tableau 5. Liste des xylanases putatives dont les séquences codantes des cDNA ont été clonées et séquencées.

### III. 3. 2. Analyse des séquences

Les séquences des xylanases clonées ont été ré-analysées en cherchant le type de famille de glycoside hydrolase d'appartenance selon Henrissat (Tab 6). Sur ce tableau nous avons également rappelé le type d'enzyme le plus homologue ainsi que l'organisme chez qui le plus proche homologue est trouvé.

Les xylanases 14 et 18 ne présentent pas d'homologies avec des familles de glycosides hydrolases. Cependant les séquences ont des homologies vis à vis d'arabinosidase et xylanase bactériennes respectivement. La xylanase 13 montre des homologies vis à vis de xylanases bactériennes cependant un morceau de domaine AES (estérase/lipase) est retrouvé dans l'enzyme. L'activité réelle de ces trois « xylanases » est inconnue. La xylanase 16 a été identifiée comme une pectate lyase. Elle avait été intégrée dans le set de séquences initiales de part les homologies de son CBD (cellulose binding domain) avec des xylanases en possédant un. Cette exemple illustre la nécessité du contrôle manuel des résultats automatisés.

<i>N° xyl</i>	<i>Homologie</i>	<i>Organisme</i>	<i>Famille de Glycoside hydrolase</i>	<i>CBD</i>
2	endo-1,4- $\beta$ -xylanase (EC 3.2.1.8)	C	10	
17	endo-1,4- $\beta$ -xylanase (EC 3.2.1.8)	C	10	
21	endo-1,4- $\beta$ -xylanase (EC 3.2.1.8)	C (Fox)	10	
24	endo-1,4- $\beta$ -xylanase (EC 3.2.1.8)	C (Fox)	10	
15	endo-1,4- $\beta$ -xylanase (EC 3.2.1.8)	C	11	
19	endo-1,4- $\beta$ -xylanase (EC 3.2.1.8)	C (Fg)	11	
1	$\beta$ -1,3-1,4-glucanase	B	16	
3	$\beta$ -1,3-1,4-glucanase	B	16	
7	endo-1,4- $\beta$ -xylanase (EC 3.2.1.8)	B	43	C-ter type IV
9	endo-1,4- $\beta$ -xylanase (EC 3.2.1.8)	B	43	
25	1,4- $\beta$ -xylosidase (EC 3.2.1.37)	B	43	
27	1,4- $\beta$ -xylosidase (EC 3.2.1.37)	B	43	
28	endo-1,4- $\beta$ -xylanase (EC 3.2.1.8)	B	43	
32	endo-1,4- $\beta$ -xylanase (EC 3.2.1.8)	C	43	
33	endo-1,4- $\beta$ -xylanase (EC 3.2.1.8)	B	43	
34	endo-1,4- $\beta$ -xylanase (EC 3.2.1.8)	C	43	
35	endo-1,4- $\beta$ -xylanase (EC 3.2.1.8)	B	43	
26	$\alpha$ -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55)	C	62	
13	xylanase	B	AES	
16	pectate lyase (EC 4.2.2.2)	C (Fg)	PL	N-ter fungal CBD_1
14	arabinosidase	B	x	
18	endo-1,4- $\beta$ -xylanase (EC 3.2.1.8)	B	x	

Tableau 6. Détermination de l'appartenance aux famille de glycoside hydrolase. Homologie : type d'enzyme de l'homologue le plus proche. Organisme : organisme de la séquence homologue, B : bactérie, C : champignon (Fg : F. graminearum ; Fox : F. oxysporum). Famille de glycosyl hydrolase : x : pas de motif trouvé, PL : pectate lyase, AES : esterase/lipase. CBD : cellulose binding domain.

Les xylanases 2, 17, 21 et 24 appartiennent aux familles de glycoside hydrolase 10. De nombreux membres de cette famille montrent des activités sur différents substrats (Collins et al., 2004). Les xylanases 21 et 24 montrent de fortes homologues avec des xylanases de *F. oxysporum*. Les xylanases 15 et 19 font partie de la famille 11 qui est historiquement considérée comme la famille des vraies xylanases (Collins et al., 2004).

Les xylanases 1, 3 (famille 16) et 26 (famille 62) sont des enzymes supposées être bi-fonctionnelles et avoir un site catalytique caractéristique des familles 10 ou 11 (Collins et al. 2004).

Les xylanases 7, 9, 25, 27, 28, 32- 35 font partie de la famille 43. Il s'agit de la famille la plus représentée. Des analyses fonctionnelles n'ont pas confirmé l'activité de cette famille d'enzymes sur le xylane (Collins et al., 2004).

### ***III. 4. Prédiction de structures***

Un projet de modélisation a été confié à un groupe d'élèves de l'Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg et a porté sur les xylanases 15 et 24. Elles ont été choisies comme candidates pour la modélisation de leur structure par homologie. Ce type de modélisation est basé sur l'utilisation d'une structure connue (matrice). La protéine cible est alignée sur la séquence peptidique de la matrice et la structure 3D est déduite par homologie. Ces deux xylanases ont été choisies car elles font partie des familles 11 et 10 respectivement. Des évidences biologiques ont montré des activités enzymatiques sur le xylane chez des homologues de ces enzymes.

#### ***III. 4. 1. Détermination des modèles***

Les séquences des protéines ont été étudiées et plusieurs paramètres des protéines ont été déterminés (Tab. 7). Il s'agit d'enzymes de petite taille mais avec des points isoélectriques plutôt basiques. La localisation des acides aminés impliqués dans le site catalytique a été réalisée par homologie.

Enzymes	Taille (aa)	MM (Da)	pI	Site de clivage	Famille de l'enzyme	Résidus du site catalytique
Xyl15	228	24 544	9.35	19-20	Glycosyl hydrolase 11	Glu 122 et Glu 214
Xyl24	327	35 739	9.39	15-16 ou 22-23	Glycosyl hydrolase 10	Glu 154 et Glu 262

Tableau 7. Caractéristiques des xylanases 15 et 24. MM : masse moléculaire prédite, pI : point isoélectrique prédit. Site de clivage : site de clivage prédit du peptide signal. Les résidus du site catalytique ont été prédit par homologie.

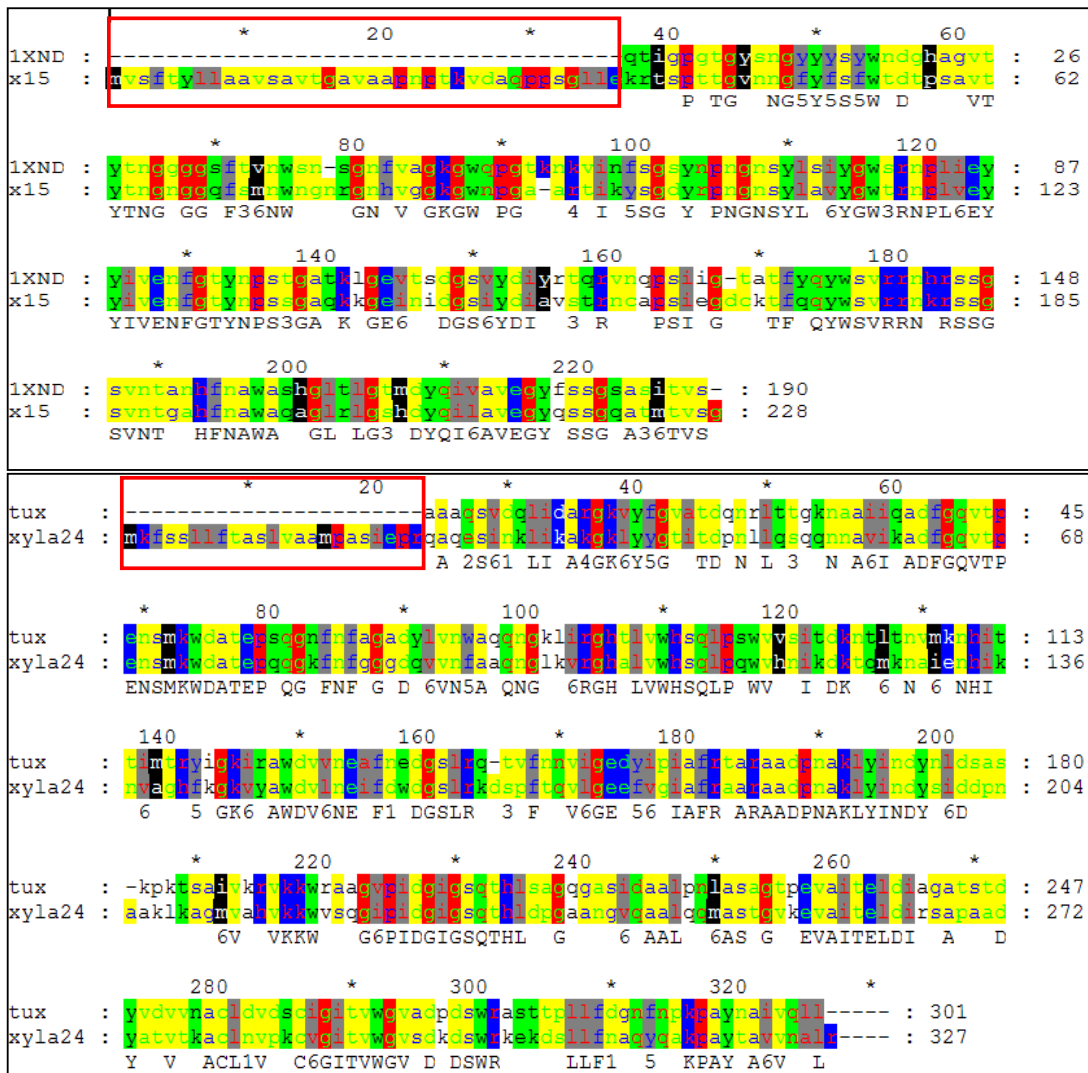


Fig. 29. Alignement des séquences de xylanases 15 et 24 avec leur plus proche homologue ayant une structure connue. Boite rouge : séquence N-terminale contenant un peptide signal éliminé du modèle.

Les séquences des xylanases 15 et 24 ont été comparées à l'aide de BLASTP à la banque de protéine non redondante NR. Parmi les séquences présentant une structure, 1XND et 1TUX ont montré la plus grande homologie vis des xylanases 15 (64%) et 24 (54%) respectivement (Fig. 29). 1XND est une xylanase provenant de *Trichoderma harzianum* dont la structure cristallographique a été résolue à 1.8 Å (Campbell et al., 1994). 1TUX, homologue de la xylanase 24, provient de *Thermoascus aurantiacus* et a été cristallisé à la même résolution que 1XND (Natesh et al., 1999). Les séquences ont été alignées et les parties N-terminales des xylanases ont été retirées. Ces séquences contiennent des peptides signaux et ne sont donc pas décrites dans les modèles de structure.

Le programme MODELLER a créé différents modèles de structure pour les deux enzymes. Le modèle présentant la fonction objective la plus basse a été retenu pour chacune des xylanases. La fonction objective repose sur le calcul de la pseudo énergie qui est calculée en fonction des champs de force et de contraintes issues de l'alignement de séquences.

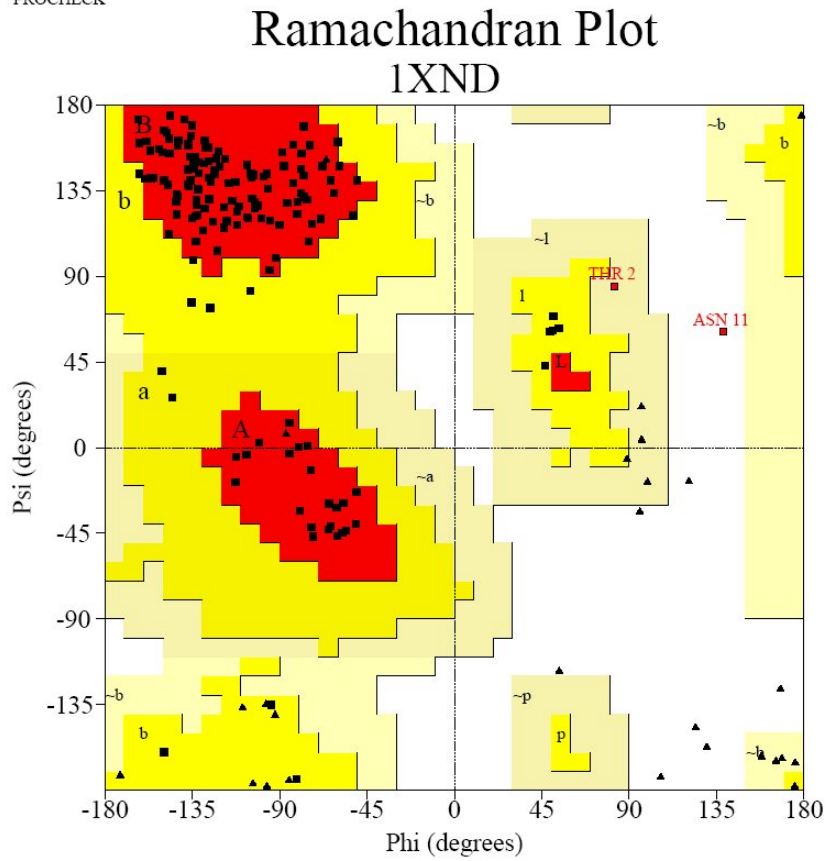
Les modèles obtenus pour les xylanases 15 et 24 ont été évalués avec le programme PROCHECK. Il permet d'évaluer la stéréochimie des modèles notamment par la géométrie des liaisons peptidiques.

Les diagrammes de Ramachandran ont été réalisés pour les structures prédites et les matrices utilisées (Annexe 4). La structure prédite de la xylanase 15 présente un diagramme de Ramachandran cohérent avec sa matrice. Seul le résidu thréonine 21 est dans une zone limite par rapport à la stéréochimie (Fig. 30). Le diagramme de Ramachandran pour la xylanase 24 ne montre pas d'aberrations structurales, seule l'alanine 84 se situe dans une zone limite (Fig. 31).

Les diagrammes d'énergie ont également été réalisés pour les xylanases et leurs matrices. L'énergie totale des molécules est négative. Et les différences d'énergie entre les matrices et les modèles sont proches de zéro.



PROCHECK



PROCHECK

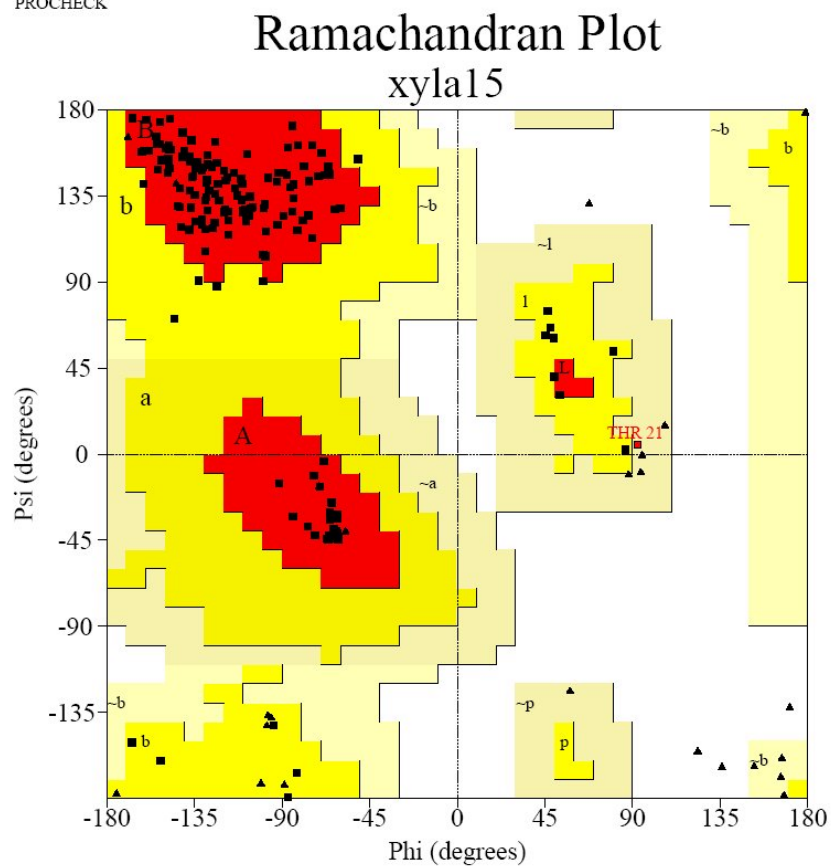
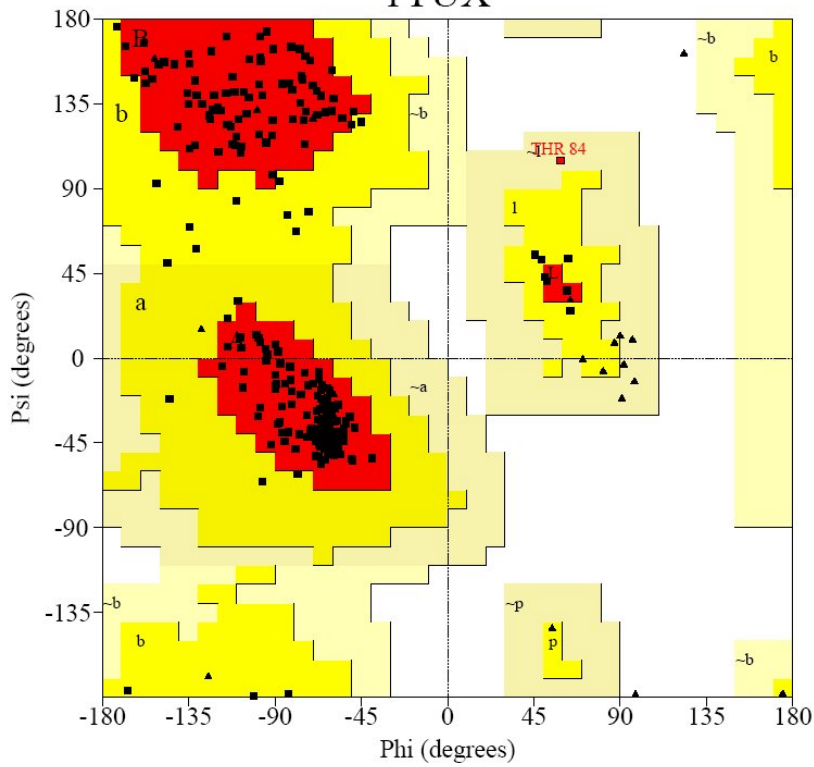


Fig. 30. Diagramme de Ramachandran pour la xylanase 15 et sa matrice 1XND. Les triangles symbolisent les résidus glycine.

PROCHECK

### Ramachandran Plot 1TUX



PROCHECK

### Ramachandran Plot Xyl24

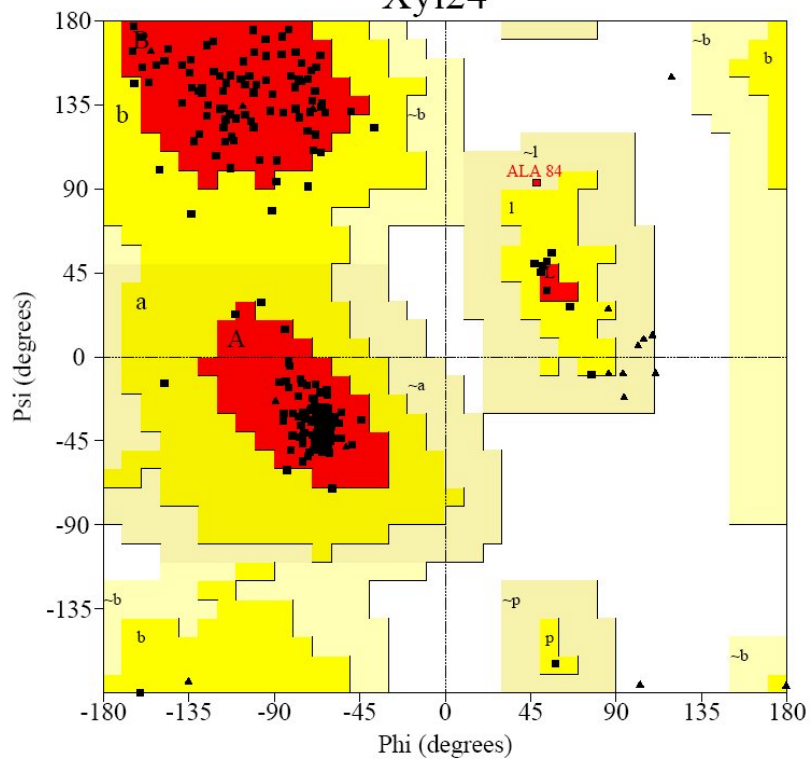
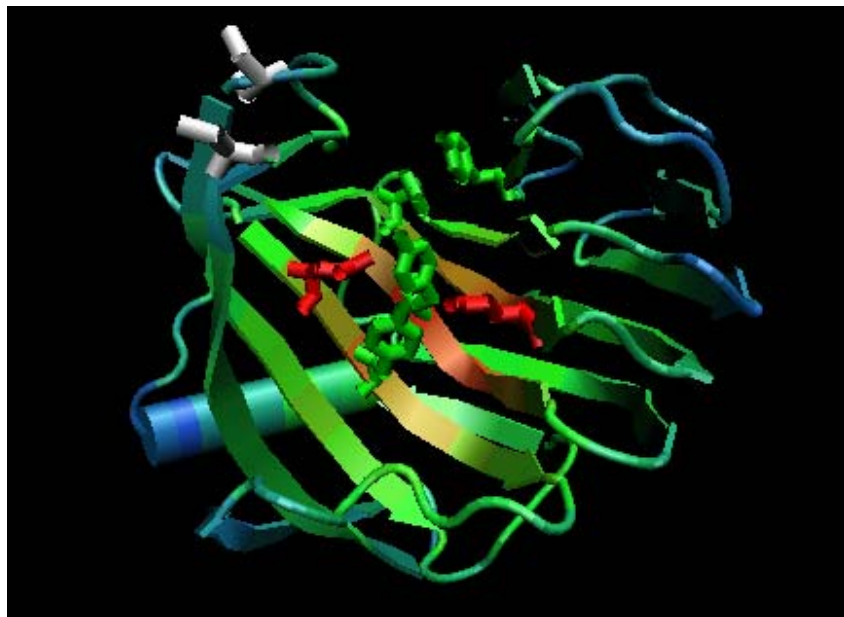


Fig. 31. Diagramme de Ramachandran pour la xylanase 24 et sa matrice 1TUX. Les triangles symbolisent les résidus glycine.

Le modèle obtenu pour la xylanase 15 présente une hélice  $\alpha$  ainsi que 14 brins  $\beta$  repliés en deux feuillets (Fig. 32). Le modèle correspond à la structure classique des xylanases de la famille 11 des glycosides hydrolases (Fig. 24). Les feuillets  $\beta$  forment une poche hydrophobe pouvant recevoir le xylane. On retrouve les résidus impliqués dans la catalyse autour de cette poche.

La xylanase 15 présente deux cystéines (C160 et C168) à une distance de 5,09 Å compatible avec la formation d'un pont disulfure. Ce pont disulfure n'est pas présent dans 1XND, ce qui nous laisse supposer que la xylanase 15 est plus thermostable que 1XND.



*Fig. 32. Modèle de structure de la xylanase 15. Les acides aminés du site catalytique sont indiqués en rouge et en vert. Les cystéines sont indiquées en blanc.*

Le modèle de la xylanase 24 correspond à la structure canonique de la famille 10 des glycosides hydrolases. Le modèle présente un ensemble de 15 hélices  $\alpha$  situées à l'extérieur de l'enzyme et 8 feuillets  $\beta$  formant un « TIM barrel » (Fig. 33.).

Deux cystéines proches forment un pont disulfure entre une hélice et un brin  $\beta$ . Ce pont est également présent dans la matrice 1TUX.

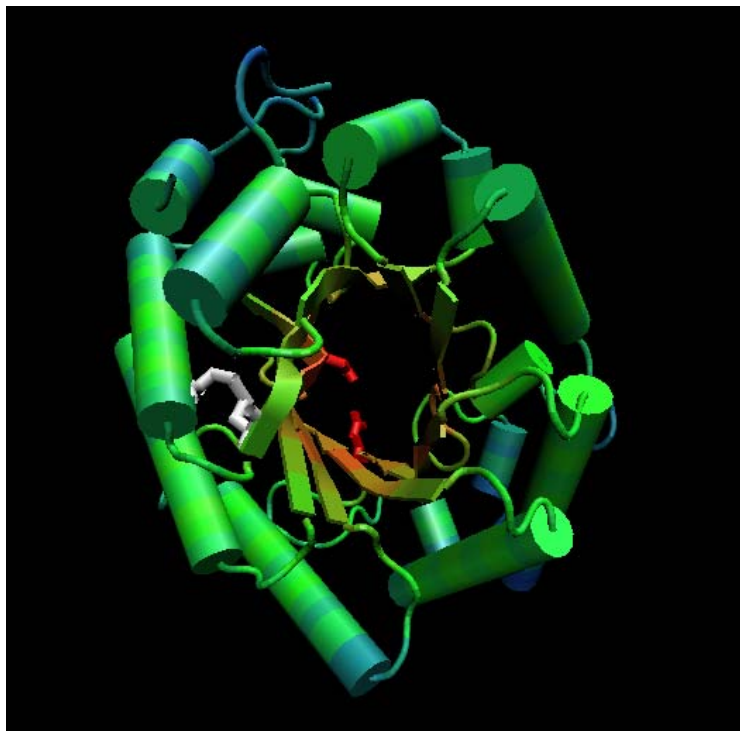


Fig. 33. Modèle de structure de la xylanase 24. Les acides aminés du site catalytique sont indiqués en rouge. Les cystéines sont indiquées en blanc.

Bien que les deux enzymes présentent des structures très différentes, elles utilisent le même mécanisme d'action pour l'hydrolyse de la liaison  $\beta$  1-4. Dans les deux cas il s'agit d'un mécanisme de double déplacement. L'un des deux résidus glutamine du site actif agit comme donneur de proton alors que l'autre agit comme base nucléophile.

#### ***III. 4. 2. Application à l'amélioration enzymatique***

Les xylanases de la famille des glycoside hydrolases 11 contiennent deux résidus acide glutamique impliqués dans un réseau de ponts hydrogènes et essentiels pour la catalyse enzymatique. L'un des deux fonctionne en temps que nucléophile, le second en tant que catalyseur acide/base dans le mécanisme de double déplacement. Un troisième résidu, adjacent à l'acide glutamique servant de catalyseur acide/base semble essentiel et détermine le pH optimum de l'enzyme. Il s'agit d'une asparagine (N) pour les enzymes dites « alcalines » et d'un acide aspartique (D) pour les enzymes dites « acides » (Torrönen et Rouvinen, 1997). Il a été montré que la substitution N/D peut moduler le pH optimum de la xylanase BCX de *Bacillus circulans* en abaissant ce dernier de 5,7 à 4,6 (Joshi et al., 2000).

Dans la séquence de la xylanase 15, les résidus du site actif sont la glutamine 122 en tant que nucléophile et la glutamine 214 en tant que catalyseur acide/base. L'asparagine en position 81 pourrait être impliquée aussi dans la catalyse car elle est proche du résidu glutamine 214 dans la structure. L'enzyme est dite « alcaline » de part son pI basique mais aussi de par l'intervention de l'asparagine dans le mécanisme moléculaire (Torronen et al., 1997). Le pH optimum des xylanase dites « alcalines » est compris entre 4 et 8. La substitution de l'asparagine en position 81 par un acide aspartique (N81D) peut permettre la formation d'une liaison hydrogène plus courte et plus stable entre l'acide aspartique 81 et la glutamine 214, par rapport au pont asparagine 81/glutamine 214 dans la séquence sauvage.

Le modèle de structure de xylanase 15 - N81D a été réalisé. La structure 3D de l'enzyme reste inchangée (Fig. 34). Cette modification peut conduire à une diminution du pH optimum de la xylanase 15.

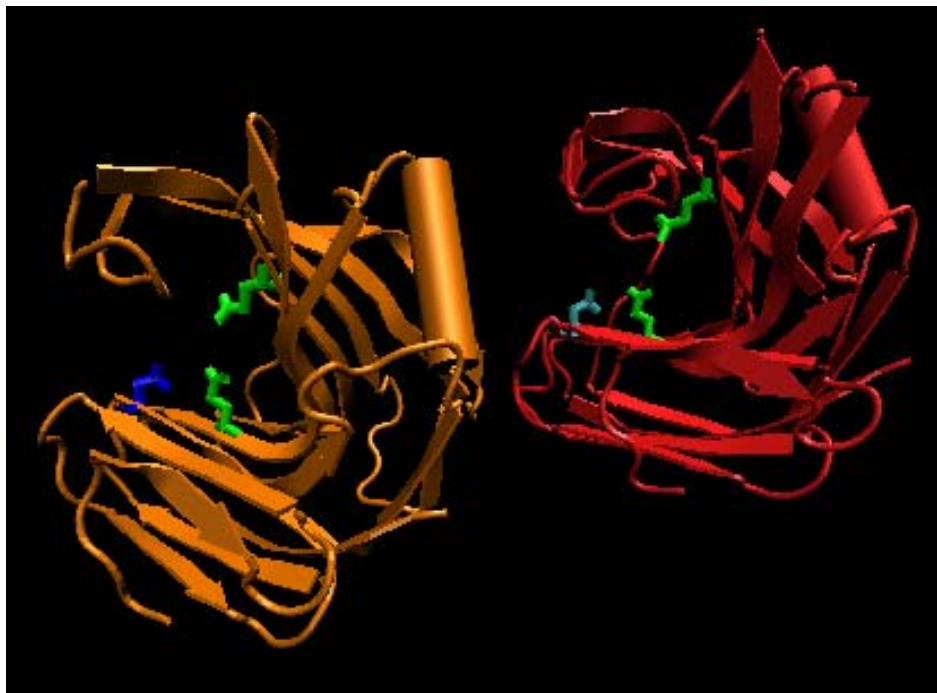


Fig. 34. Modèle de structure de la xylanase 15 (orange) et de la xylanase 15 - N81D (rouge). Les résidus *glutamine* sont représentés en verts, l'*asparagine* en bleu foncé et l'*acide aspartique* en bleu clair.

### **III. 5. Conclusions et perspectives**

La prédiction de gène de la famille des xylanases a abouti à la sélection de 36 zones contenant putativement des gènes de xylanases. L'amplification des ADNc correspondant a permis de valider 22 gènes exprimés par le champignon lors de sa croissance sur milieu minimum contenant des parois de houblon.

L'analyse des séquences révèle leur appartenance à différentes familles de glycoside hydrolase : 10, 11, 16, 21, 43 et 62. Certains des homologues de ces enzymes ont montré une activité biochimique sur le xylane, d'autres sur la cellulose et d'autres présentent un spectre large d'action sur différents polyosides. La fonction biologique des xylanases prédites est encore putative et doit encore être confirmée par des analyses biochimiques.

La prédiction des structures par homologie a été réalisée pour les xylanases 15 et 24. Les modèles moléculaires obtenus sont en accord avec les matrices et les règles de stéréochimie.

L'ingénierie de protéine peut créer des molécules plus adaptées à des conditions industrielles. Nous proposons une modification de la xylanase 15 dans le but de diminuer son pH optimum. Elle pourrait trouver des applications dans le blanchiment de la pâte à papier en condition acide (Tenkanen et al., 1997). Les modèles moléculaires permettent également de prédire des modifications dans le but de stabiliser les enzymes pour les rendre plus résistantes aux hautes températures. L'ajout de pont disulfure dans l'enzyme peut être envisagé. Toutes ces prédictions nécessitent des travaux de mutagenèse dirigée ainsi que la production des protéines correspondantes. Ces expériences pourront valider les prédictions.

Les 22 ARNm correspondant aux différentes xylanases sont retrouvés simultanément dans le transcriptome de *F. graminearum* cultivé dans un milieu contenant, comme seule source de carbone, des parois de houblon. Ceci montre la mobilisation de familles enzymatiques pour la dégradation de substrat complexe. L'étude par famille semble alors indispensable pour comprendre le mécanisme d'attaque des parois.

**Chapitre IV – Transcriptomique du champignon *Fusarium  
graminearum***

## IV. 1. Suivi de l'expression des xylanases

### IV. 1. 1. Problématique

La validation de la prédiction de 22 gènes a été faite par clonage de la séquence codante des ARNm correspondants. Cette validation a mis en évidence la présence simultanée des ARNm codant pour les 22 xylanases dans la population d'ARN du champignon lors de sa culture sur milieu minimum contenant de la paroi de houblon.

Ce constat nous a amené à nous poser des questions quant au niveau d'expression des gènes et notamment de leur activation ou non en présence de substrats déterminés. Certaines xylanases prédites appartiennent à des familles multifonctionnelles, d'autres ne présentent pas de motif typique de glycoside hydrolase. L'induction de l'expression des gènes correspondant par rapport à certains substrats pourrait donner des indications quant aux substrats des enzymes et leur activité putative.

Nous avons décidé de suivre le niveau d'expression de chacun des gènes prédits (cf. chapitre III) dans les populations d'ARN messagers provenant de *F. graminearum* cultivé dans un des milieux minimums différant les uns des autres par la ou les source(s) de carbone. Nous avons cherché à vérifier si le substrat, le xylane, provoquait l'augmentation de l'expression des gènes des xylanases prédites. De même nous avons étudié l'effet inducteur du produit de dégradation enzymatique du xylane : le xylose. L'abolition de la transcription dans les cas précédents a également été testée par l'ajout de glucose. Le même schéma a été reproduit avec la carboxyméthyl-cellulose (CMC) et son produit de dégradation le cellobiose car certaines des xylanases prédites sont potentiellement bi-fonctionnelles et peuvent avoir un spectre de substrat large. Nous avons également cherché à quantifier la présence des messagers sur un substrat complexe comme les parois de houblon (Tab. 8).

Effet recherché	Source de carbone
références	Glucose YPG
induction par le substrat	Xylane CMC
induction par le produit	Xylose Cellobiose
abolition de l'induction	Xylane Glucose, Xylose Glucose CMC Glucose, Cellobiose Glucose
induction par un substrat complexe	Parois

Tableau 8. Différentes sources de carbone ajoutées au milieu minimum M3 pour le suivi de la transcription des gènes prédits.



## ***IV. 1. 2. Détermination du niveau d'expression des xylanases***

### ***IV. 1. 2. 1. Méthode de détermination***

#### ***IV. 1. 2. 1. 1. Descriptif de la méthode***

La Q-RT-PCR (Quantitative Retro-Transcription PCR) est une technique permettant de détecter et de quantifier les ARNm au sein d'une population de molécules. La détermination des quantités se base sur le nombre de cycles minimum ( $C_t$ ) nécessaire pour arriver à un seuil correspondant à une fluorescence dans le tube réactionnel. Le seuil est déterminé pour correspondre à la zone d'amplification linéaire de la réaction de PCR.

Deux techniques de quantification existent. La quantification absolue se base sur une gamme étalon qui permet d'obtenir une quantité de produit initialement présente en ng dans la réaction. La quantification relative exprime le nombre de fois qu'un messager se trouve présent dans une condition donnée par rapport à une condition de référence et cela par rapport à un gène de référence interne.

La quantification relative nous a semblé plus appropriée que la détermination de profil d'expression des différents gènes. De plus, la référence interne à un gène domestique permet de s'affranchir de problèmes de calibration. Le gène de la  $\beta$ -tubuline a été utilisé comme référence interne pour la quantification relative (AY360063).

#### ***IV. 1. 2. 1. 2. Validation***

Des amorces ont été dessinées pour amplifier des fragments compris entre 150 et 250pb avec des températures d'hybridation comprises entre 62 et 66°C (Annexe 3).

Les simplifications mathématiques à l'origine d'un calcul rapide correspondant à la quantification relative imposent que l'efficacité de la réaction PCR soit identique pour les gènes cibles et le gène de référence (Annexe 5).

La validation est réalisée pour chaque couple d'amorce par rapport aux amorces du gène référence. Elle est réalisée en calculant les différences de  $C_t$  entre un gène cible et le gène de référence sur une gamme de concentration couvrant 4 à 6 logs. Le report de ces valeurs sur un graphique permet de déterminer le coefficient directeur et ainsi de vérifier que la différence dans la quantification des deux gènes est constante. Un coefficient directeur inférieur à 0,1 permet de confirmer que l'efficacité d'amplification est bien la même pour les deux cibles.

Les efficacités d'amplification ont été validées pour les 22 couples d'amorces contre le couple d'amorces pour la référence. Un exemple de droite obtenue est montré en Fig. 35.

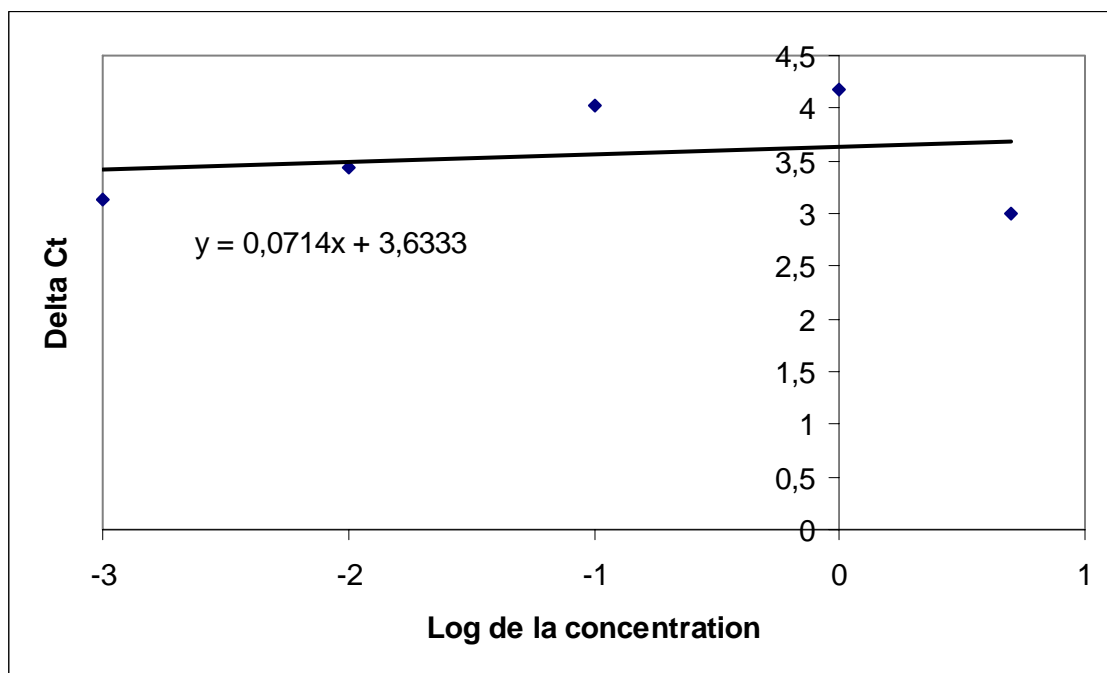


Fig. 35. Validation de l'efficacité d'amplification pour les amorces de la xylanase 16. Le coefficient directeur est inférieur à 0,1.

#### IV. 1. 2. 2. Quantification par Q-RT-PCR

Le niveau d'expression des différents gènes prédits a été déterminé par la méthode de Q-RT-PCR relative. Le niveau d'expression sur le milieu M3-Glc a été pris comme condition de référence dans le calcul pour déterminer le niveau « 1X » d'expression des gènes.

Les profils de niveau d'expression sur les différents milieux ont pu être regroupés en différents types d'induction présentés dans les sous-parties suivantes. Dans le but de visualiser facilement les niveaux d'expression des différentes xylanases sur le même graphique, les valeurs de quantification ont été exprimées en pourcentage du niveau maximum pour chaque gène. La comparaison directe entre les différentes xylanases ne peut pas être effectuée car chacune se rapporte à la valeur d'expression 1X de la condition de référence, mais cette valeur n'est pas la même pour les différents gènes.

**IV. 1. 2. 2. 1. Les xylanases induites par les parois**

Les gènes des xylanases 9, 14 et 25 présentent une très nette induction de leur expression sur milieu paroi (Fig. 36). Les xylanases 9 et 14 montrent une augmentation de leur expression sur milieu YPG. Cette induction peut être liée à des composants de la paroi cellulaire des levures qui sont contenus dans le milieu.

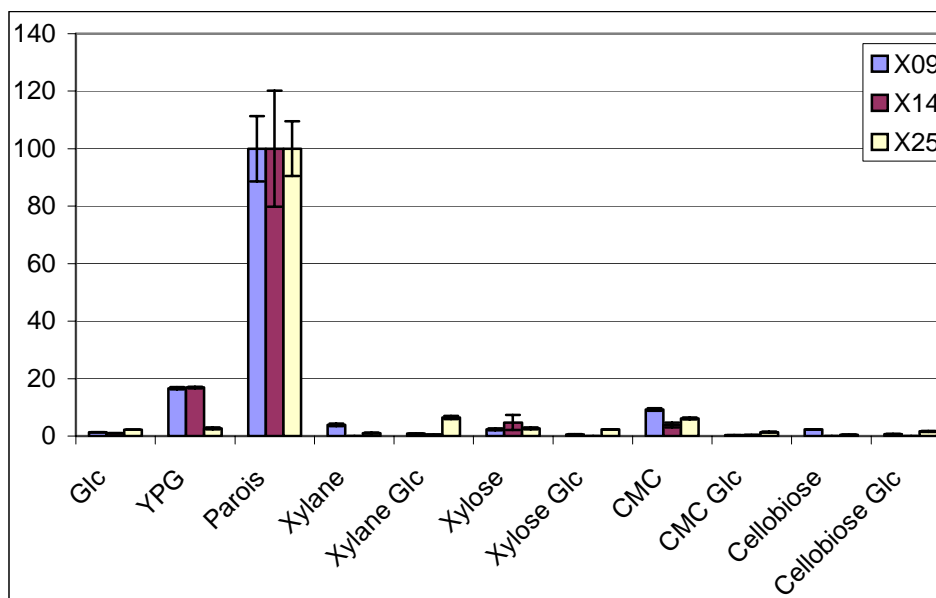


Fig. 36. Profil du niveau d'expression des gènes des xylanases 9, 14 et 25.

**IV. 1. 2. 2. 2. Les xylanases induites par les parois et le xylane**

La xylanase 13 présente une induction du gène correspondant lors de la culture sur milieu M3 Xylane (Fig. 37). Cependant elle présente une induction bien plus forte lors de la présence de parois de houblon dans le milieu de culture. Aucune autre induction n'est retrouvée pour ce gène.

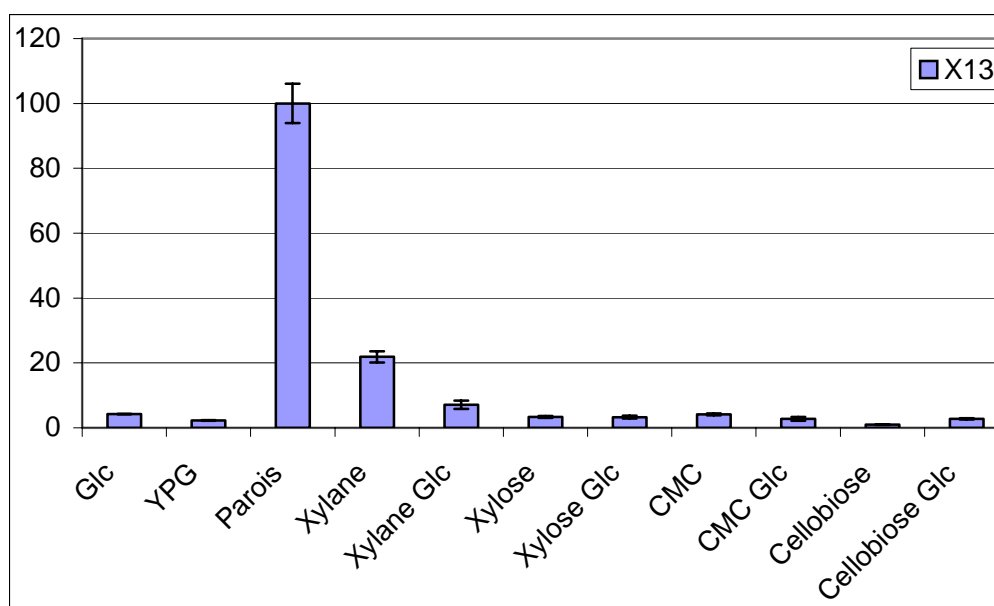


Fig. 37. Profil du niveau d'expression du gène de la xylanase 13.

#### IV. 1. 2. 2. 3. Les xylanases induites par les parois et la CMC

Les xylanases 7, 18, 26 et 28 présentent un profil d'induction par les parois de houblon et la CMC (Fig. 38). Les xylanases 7 et 28 présentent un domaine glycoside hydrolase de la famille 43. La xylanase 26 appartient à la famille 62 et la xylanase 18 ne présentait pas de domaine d'une famille de glycoside hydrolase. Les familles 43 et 62 sont des familles multifonctionnelles.

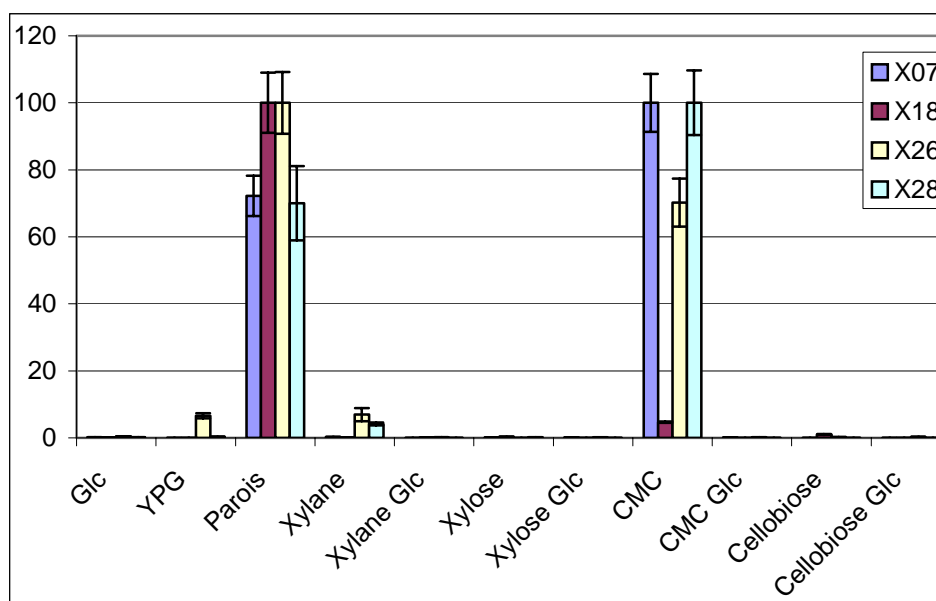


Fig. 38. Profil du niveau d'expression des gènes des xylanases 7, 18, 26 et 28.

**IV. 1. 2. 2. 4. Les xylanases induites par les parois, le xylane et le xylose**

Les gènes des xylanases 2, 15, 17, 24, 32, 33, 34 et 35 subissent une induction très forte sur le milieu contenant du xylane (Fig. 39). De plus les gènes de ces enzymes présentent une régulation vis à vis du produit de dégradation du xylane : le xylose induit l'expression de ces gènes. La présence de glucose dans les milieux de culture abolit les inductions par les parois,

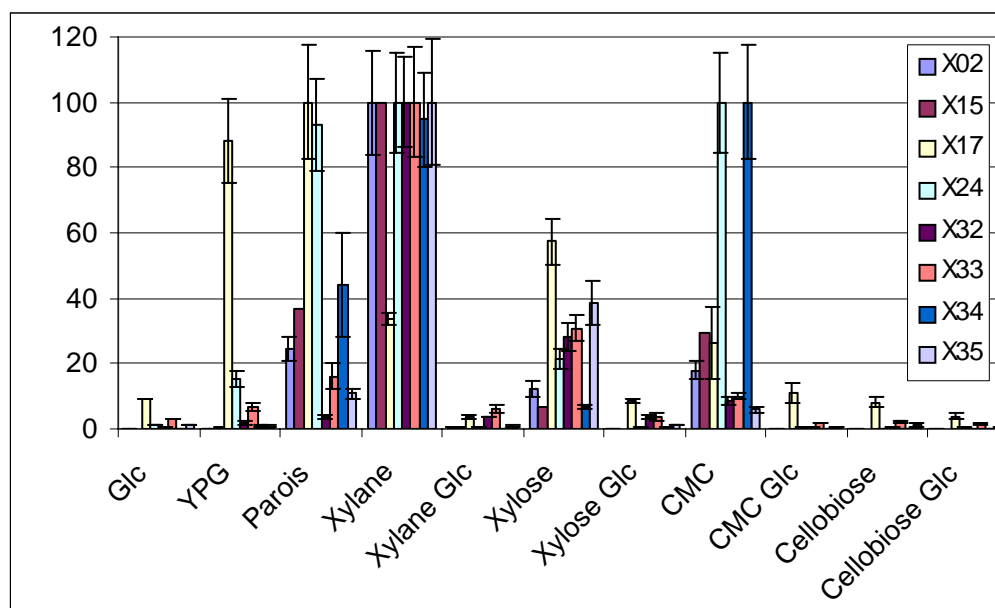


Fig. 39. Profil du niveau d'expression des gènes des xylanases 2, 15, 17, 24, 32, 33, 34, 35. le xylane et le xylose.

La xylanase 17 de la famille des glycoside hydrolases 43 présente une induction du même ordre de grandeur par le milieu YPG que par le milieu contenant des parois. L'induction de cette enzyme par des glucides de petite taille comme le xylose pourrait être à la source d'un tel résultat.

Les xylanases 2, 17 et 24 font toutes partie de la famille de glycoside hydrolases 10.

Les xylanases 19, 21 et 27 présentent des profils d'expression différents des autres par l'absence complète des ARNm correspondant dans les milieux contenant du glucose à l'exception du milieu YPG où leur niveau d'expression est extrêmement faible (Fig 40).

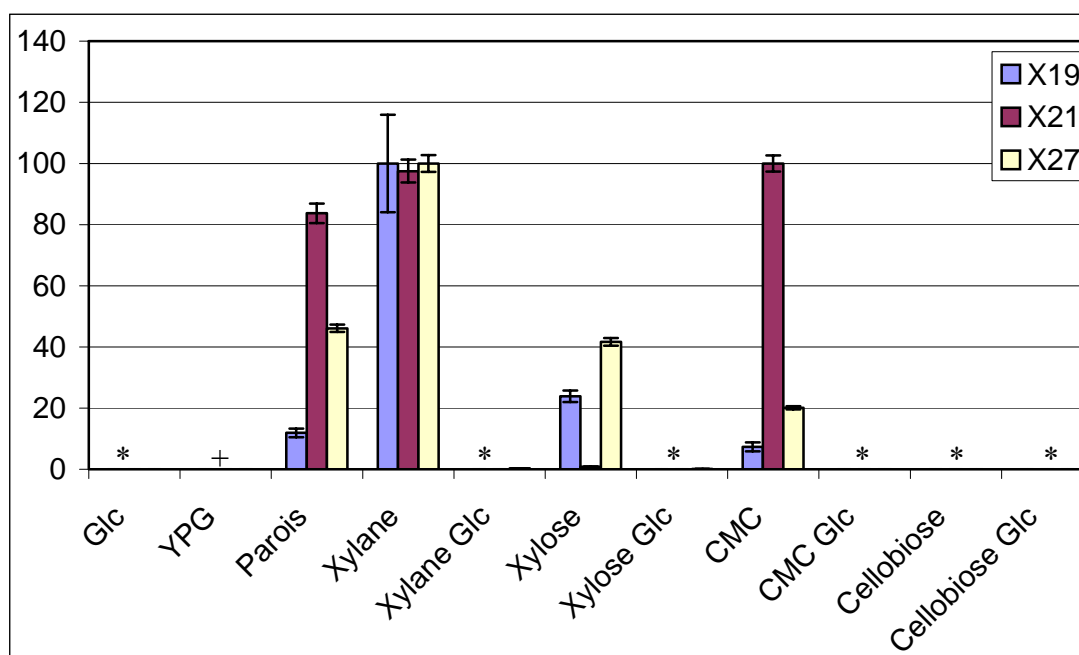


Fig. 40. Profil du niveau d'expression des gènes des xylanases 19, 21, et 27. \* pas d'amplification détectée, + quantité faible d'ARNm détectée.

La xylanase 21 fait partie de la famille des glycoside hydrolases 10 mais contrairement à ses homologues son gène n'est pas induit par le xylose.

La xylanase 19 appartient à la famille des glycoside hydrolases 11 au même titre que la xylanase 15. Les gènes de ces deux enzymes présentent des inductions similaires par les parois, le xylane, le xylose et la CMC.

#### IV. 1. 2. 2. 6. Les xylanases non induites

Les xylanases 1 et 3 présentent un profil d'expression qui ne peut être mis en rapport avec les différents substrats présents dans les milieux de culture (Fig. 41).

Les deux enzymes appartiennent à la famille des glycosides hydrolases 16 qui constituent une famille d'enzymes multifonctionnelles. Des domaines  $\beta$ -glucanase peuvent également être retrouvés dans ces deux enzymes.

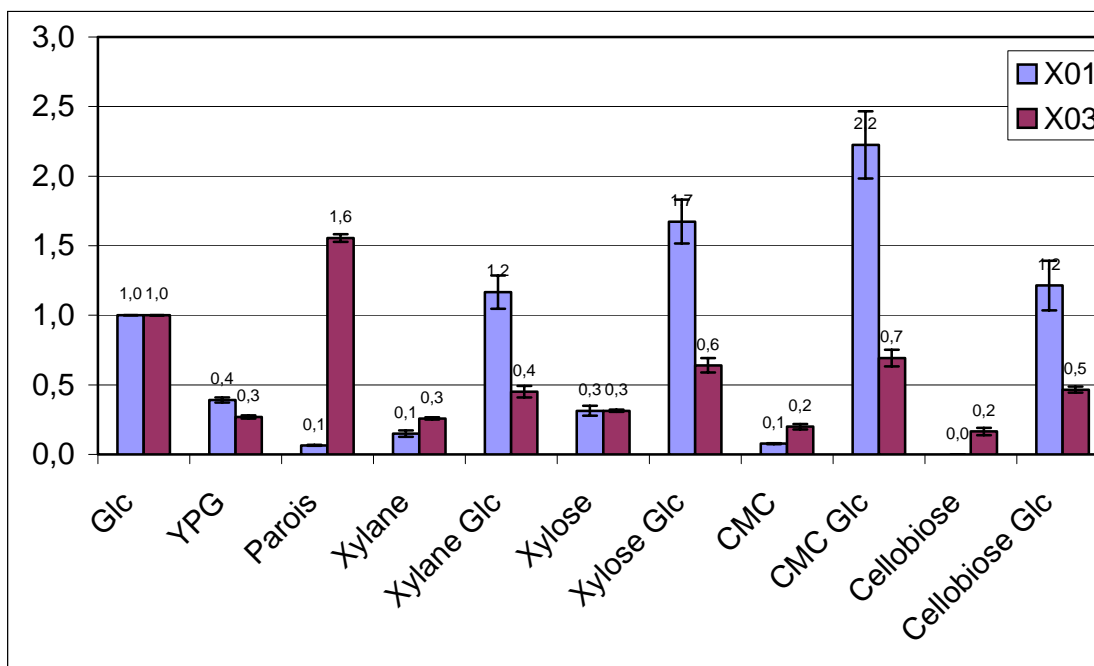


Fig. 41. Profil du niveau d'expression des gènes des xylanases 1 et 3. Les profil est exprimé en nombre de fois relatives à la condition de référence M3-Glc.

#### IV. 1. 2. 2. 7. Réinvestigation des résultats obtenus sur M3-parois

Les différentes xylanases ont montré une induction de la transcription de leur gène par rapport à leur niveau basal lors de la culture sur milieu contenant des parois de houblon. Dans le but de comparer les quantités d'ARNm des différentes xylanases entre elles, la quantification relative a été effectuée par rapport à la  $\beta$ -tubuline puis par rapport à la quantité de la xylanase la moins exprimée dans cette condition. Nous obtenons ainsi le niveau d'expression de chaque xylanase quantitativement en nombre de fois de la quantité de l'ARNm de la xylanase 01 (Fig. 42).

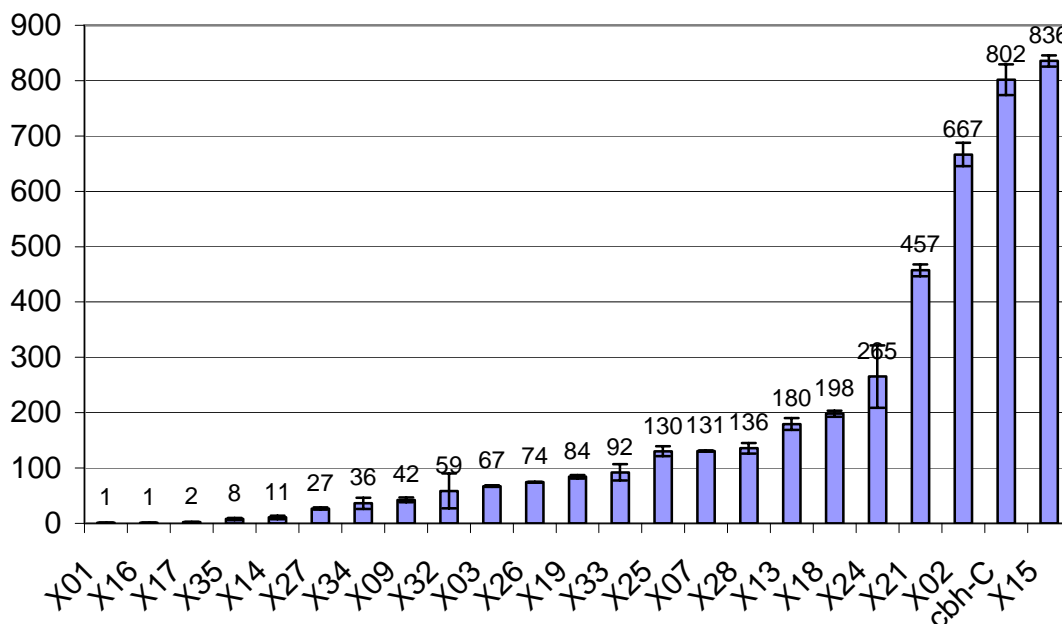


Fig. 42. Quantification de l'expression des xylanases sur milieu paroi par rapport au niveau du transcrit de la xylanase 01 (en nombre de fois). La cbh-C a été ajoutée comme contrôle.

La quantification des niveaux d'expression des gènes des xylanases par rapport au gène le moins exprimé permet d'obtenir un profil pour toute la famille de gènes.

Les gènes des xylanases 2 et 15 se trouvent être les plus exprimés dans cette condition de culture. L'ARNm du gène de la CBH-C est présent en forte quantité comparable à ceux des xylanases 2 et 15.

Les gènes des xylanases les plus exprimés dans cette condition de culture sont des représentants des familles glycoside hydrolases 10 et 11. Ce diagramme laisse supposer l'implication majoritaire des familles de glycoside hydrolases 10 et 11 dans la dégradation des parois végétales.

### IV. 1. 3. Discussion

Le suivi de l'expression des gènes des xylanases prédites a permis de définir différents profils d'expression en fonction des sources de carbone présentes dans le milieu de culture présentés dans les histogrammes précédents. Ces profils ont été évalués d'une manière qualitative et regroupés dans le tableau 9.



	Glc	YPG	Parois	Xylane	Xylane Glc	Xylose	Xylose Glc	CMC	CMC Glc	Cellobiose	Cellobiose Glc
X09	+	+	+++++	+	+	+	+	+	+	+	+
X14	+	+	+++++	+	+	+	+	+	+	0	0
X25	+	+	+++++	+	+	+	+	+	+	+	+
X13	+	+	+++++	++	+	+	+	+	+	+	+
X07	+	+	++++	+	+	+	+	+++++	+	+	+
X18	+	+	+++++	+	+	+	+	+	+	+	+
X26	+	+	+++++	+	+	+	+	++++	+	+	+
X28	+	+	++++	+	+	+	+	+++++	+	+	+
X02	+	+	++	+++++	+	+	+	+	+	+	+
X15	+	+	++	+++++	+	+	+	++	+	+	+
X17	+	+++++	+++++	++	+	+++	+	++	+	+	+
X24	+	+	+++++	+++++	+	++	+	+++++	+	+	+
X32	+	+	+	+++++	+	++	+	+	+	+	+
X33	+	+	+	+++++	+	++	+	+	+	+	+
X34	+	+	+++	+++++	+	+	+	+++++	0	0	+
X35	+	+	+	+++++	+	++	+	+	+	+	+
X19	0	+	+	+++++	+	++	0	+	0	0	0
X21	0	+	+++++	+++++	+	+	+	+++++	0	0	0
X27	0	0	+++	+++++	+	+++	+	++	0	0	0

Tableau 9. Profil d'expression des xylanases prédites sur les différents milieux de culture. L'attribution qualitative a été effectuée selon le critère suivant le pourcentage étant rapporté à l'induction la plus forte de 100% : +++++ >80%, ++++ >60%, +++ >40%, ++ >20%, + >0%, 0 pas d'ARNm amplifiés. \* induction de 60X par rapport au niveau basal du gène.

Les gènes des xylanases 9, 14 et 25 sont induits par la présence de parois de houblon. Le gène de la xylanase 13 montre une augmentation de transcription lors de la culture sur les milieux contenant des parois et du xylane. Les gènes des xylanases 7, 18, 26 et 28 présentent une induction par les parois de houblon et la CMC. La xylanase 7 présente un domaine glycoside hydrolase de la famille 43, comme la xylanase 28, cependant c'est la seule enzyme qui possède un domaine de fixation à la cellulose à son extrémité C-terminale. Malgré les homologies envers des xylanases, la xylanase 7 pourrait appartenir aux cellulases de part son induction par la CMC et la présence d'un CBD. Les homologies de séquences de ces deux xylanases étaient les plus fortes pour des séquences bactériennes. La xylanase 26 appartient à la famille des glycosides hydrolases 62, qui est une famille multifonctionnelle. Les homologies de séquences pour cette enzyme nous ont laissé supposer une activité arabinofuranosidase. La xylanase 18 présentait des homologies avec une xylanase bactérienne mais pas de domaine d'une famille de glycoside hydrolase. Elle montre une induction bien plus faible (60X) par la CMC par rapport à une induction forte (1272X) par les parois de houblon. Les gènes des xylanases 2, 15, 17, 19, 21, 24, 27, 32-35 sont induits de manière très

forte par le xylane et les parois de houblon, de même que le xylose sauf exception pour le gène de la xylanase 21.

Certaines xylanases peuvent présenter une spécificité de substrat réduite. Ces enzymes peuvent agir sur différents substrats, les membres de la famille 10 ont montré des activités sur des substrats celluloseux de faible poids moléculaire (Biely, 2003). Il serait intéressant pour chaque enzyme de comparer sa spécificité de substrat aux sources de carbone qui induisent le plus fortement l'expression du gène correspondant.

A l'exception des gènes des xylanases 19, 21 et 27, les différents gènes semblent être exprimés à un niveau basal dans des conditions de culture contenant du glucose. Une induction de certains gènes est observée en présence de xylose, produit de dégradation du xylane par les xylanases. Dans leur review sur les xylanases, les auteurs présentent le mécanisme d'induction des gènes des xylanases par les produits de leur propre action comme communément admis (Collins et al., 2004). Cependant l'induction des gènes par le xylose n'est jamais aussi élevée qu'avec le xylane et peut être abolie par la présence de glucose. Ces observations tendent à montrer la présence de différents mécanismes de régulation des gènes des xylanases.

La quantification des ARNm sur le milieu contenant des parois de houblon ainsi que la redondance des membres de certaines familles de glycosides hydrolases valident l'approche par famille. Les xylanases 3 et 4 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* appartiennent respectivement aux familles de glycosides hydrolases 10 et 11 et correspondent respectivement aux xylanases 21 et 19 de *F. graminearum*. La disruption de leur gènes n'a pas entraîné de diminution significative de la virulence du champignon sur la tomate (Gomez-Gomez et al., 2002). La quantité d'ARNm de la xylanase 19 est faible comparée à celle des xylanases les plus exprimées. La xylanase 21 fait partie des gènes les plus exprimés dans cette condition de culture tout comme les autres membres de la même famille de glycosides hydrolases 10. La compensation de l'activité perdue pour le produit d'expression d'un gène par celui des autres membres de la même famille pourrait être mise en avant pour expliquer l'absence de diminution de virulence. Les résultats de quantification sur le milieu contenant des parois de houblon doivent cependant être comparés à des résultats de quantification lors d'infection de plantes par *F. graminearum*. Ainsi l'induction présentée par ce milieu pourrait être comparée à celle qu'occasionne une pathologie.

#### ***IV. 1. 4. Conclusions et perspectives***

L'étude plus poussée de la régulation peut être envisagée en incluant cette fois le facteur temps. Le suivi du niveau d'expression des gènes devra être effectué à différents temps dans le but de discerner les mécanismes mis en jeu pour la régulation des gènes des différentes xylanases.

L'expression majoritaire des xylanases 2, 15, 21 et 24 sur le milieu M3-Parois illustre bien le problème de compensation d'activité qui peut être rencontré lors de l'interruption de gène. L'activité perdue peut être compensée par l'activité d'autres membres de la même famille. Ces résultats confirment la nécessité d'une approche par famille dans l'élucidation de l'interaction hôte-pathogène au travers de la dégradation de la paroi végétale.

Dans l'optique d'une étude plus poussée des différentes xylanases, les xylanases 2, 15, 21 et 24 présentent les meilleures caractéristiques pour être de bons candidats : une régulation complexe des gènes, une expression majoritaire sur un milieu contenant des parois de houblon et des homologies fortes avec des enzymes dont l'activité biologique a été démontrée.

## ***IV. 2. Etude spécifique du transcriptome par approche soustractive***

### ***IV. 2. 1. Problématique***

L'étude de la transcription des gènes prédicts des xylanases a mis en valeur la nécessité d'étudier des familles de gènes dans le cas des CWDE. Dans le but d'élargir nos investigations à d'autres CWDE et d'obtenir un profil de CWDE majoritairement exprimées en présence de paroi de houblon, nous nous sommes intéressés à une approche plus globale par l'intermédiaire de l'analyse d'une banque d'EST.

Une première banque d'ADNc de *F. graminearum* cultivé sur milieu M3 contenant des parois de houblon a été réalisée. 192 clones ont été séquencés. La CBH-C a été retrouvée parmi ces EST. Cependant la majorité des EST étaient répétées dans la banque et correspondaient à des activités domestiques.

Nous avons voulu entamer une approche plus ciblée pour obtenir une meilleure représentation de la population spécifique d'ARN messagers induits par les parois de houblon. L'approche par hybridation suppressive soustractive présente de nombreux avantages. Cette technique permet d'enrichir une population d'ARNm en diminuant le bruit de fond des gènes domestiques. De plus la méthode incorpore une étape de PCR visant à égaliser la représentation des EST. De ce fait des ARNm différenciellement exprimés et variant en abondance dans la population de départ se retrouve dans des proportions similaires.

La description et l'analyse de la banque résultant de l'hybridation suppressive soustractive d'ARNm de *F. graminearum* cultivé sur milieu contenant des parois contre le même milieu contenant du glucose sont présentées dans l'article 3.

***IV. 2. 2. Article 3 - The transcriptome of *Fusarium graminearum* grown on plant cell walls reveals several families of pathology-related genes, Hatsch D., Phalip V., Petkovski E., Jeltsch J.M., soumis dans *Fungal Genetics and Biology****

The transcriptome of *Fusarium graminearum* grown on plant cell walls reveals several families of pathology-related genes.

Didier HATSCH<sup>a</sup>, Vincent PHALIP<sup>a</sup>, Elizabet PETKOVSKI<sup>b</sup> and Jean Marc JELTSCH<sup>a</sup> \*

<sup>a</sup> U.M.R. 7100, Université Louis Pasteur-CNRS, Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, Boulevard Sébastien Brant, BP 10413, 67412 Illkirch-Graffenstaden Cedex, France

<sup>b</sup> Institut de Médecine Légale, Université Louis Pasteur, 11 rue Humann 67085 Strasbourg Cedex FRANCE

Keywords : *Gibberella zeae*, SSH, CWDE, suppressive subtractive hybridization, EST

\* Corresponding author : Tel. : +33 3 90 24 47 89; Fax : +33 3 90 24 46 83.

E-mail adress : [jean-marc.jeltsch@esbs.u-strasbg.fr](mailto:jean-marc.jeltsch@esbs.u-strasbg.fr)

Web : <http://phytopathologie.u-strasbg.fr>

### Abstract

*Fusarium graminearum* (téléomorphe *Gibberella zeae*) is a broad host range pathogen that infects several crop plants, mainly cereals. A strain of *F. graminearum* (N° CABI) was isolated surprisingly from diseased hops. A suppressive subtractive hybridization protocol has been applied to cDNA from *F.graminearum* grown on hop cell walls (tester) and on medium containing glucose (driver). 963 EST were generated by the sequencing of 1056 randomly chosen clones (dbEST ACC-ACC) and were assembled in 124 contigs and 413 singleton sequences. Comparing the translation with the Genbank non-redundant protein database, we determined that the 537 unique EST sequences correspond to 441 unique mRNA. Among these, 36 EST were identified coding for proteins related to pathology like 17 CWDE (Cell Wall Degrading Enzymes) and 4 enzymes of the trichothecene biosynthesis cluster. Moreover we described 36 EST corresponding to transporters and finally 15 EST which translation is related to stress proteins. The medium containing hop cell walls not only induce CWDE genes but also genes associated with pathogenicity and virulence. Thus it could be considered as valuable for mimicking part of the interaction between the plant and the fungus.

## 1. Introduction

Filamentous fungi are well known phytopathogens (Scheinflug and Heupel, 1998; Kimura et al., 2001). Attention has been focused on fungal genera isolated from diseased hops (*Humulus lupulus*, L.) (Phalip et al., 2004) other than downy and powdery mildews (respectively *Pseudoperonospora humuli* and *Sphaerotheca humuli*), which are common pathogens of this plant. One of these, *Fusarium* is composed of several phytopathogen species (Nicholson et al., 2003). Although *Fusarium sambucinum* is known as the agent of *Fusarium* canker in hops and was mostly identified in the collected samples, another one, *Fusarium graminearum* (teleomorph : *Gibberella zeae*) happened to be isolated from wounded hops. *F. graminearum* is of particular importance since it is responsible for worldwide crop losses due to either pathogenesis (Munkvold, 2003) or food spoilage by its mycotoxins (Legzdina et al., 2004).

Plant infection by fungi was shown to involve the fungal cell wall degrading enzymes (CWDE) (Kang et al., 2002). CWDE are composed of several families: xylanases, pectinases, cellulases and proteases. It is believed that CWDE are playing a key role in pathogenesis (Esquerré-Tugayé et al, 2000), and are acting at different stages of the host-pathogen interaction (Roncero et al. 2000). The role of several enzyme families has been investigated. For exemple Isshiki et al. (2001) reported that the endopolygalacturonase of *Alternaria citri* is essential for citrus black rot. However it is not the case for that of *Alternaria alternata*, the fungus causing citrus brown spot (Isshiki et al., 2001). Furthermore two genes encoding different xylanases have been disrupted in *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* without any noticeable effect on its tomato infection (Gomez-Gomez et al., 2002). As CWDE mostly result from the expression of multiple gene families, any member of a given family can compensate for a lost gene as it was shown in *Magnaporthe grisea* (Wu et al., 1997). Thus a better knowledge of these gene families is still requested to progress in the understanding of the fungal pathogen mode of action.

One classical route is the study of cDNA libraries in order to discover new sets of genes and to give information on their expression. Kruger et al.(2002) reported the identification of *F.graminearum* pathology-related genes by screening a cDNA library from infected wheat. The major part (98%) of the library was composed of EST from the host plant and only sixteen EST were found to correspond to fungal proteins implicated in pathology. To overcome this methodological bias, libraries were built from fungus grown on nitrogen and carbon starvation media (Trail et al., 2003). These culture conditions were shown to induce

pathology-related EST, classified as homologues to sixteen different genes associated with pathogenicity and virulence in other fungi.

The focus of our study was to characterize families of CWDE secreted by *F. graminearum* in contact with plant cell walls. In order to avoid contamination with plant sequences and to specifically favor EST coding for CWDE, a suppressive subtractive hybridization protocol has been applied involving cDNA from *F. graminearum* grown on hop cell walls (tester) and on medium containing glucose (driver). The resulting EST library was analyzed with special respect first to CWDE then to pathology, transport and stress.

## 2. Material and methods

### 2.1. Fungal strains and culture conditions

*Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) was originally isolated from diseased hops and identified by CABI Bioscience (United Kingdom). The fungus was cultivated on PDA. The method developed on maize by Sposato et al. (1995) was adapted for the preparation of hop cell walls. *F. graminearum* was cultured at 25°C on 10 mL M3 medium (Mitchel et al. 1997) with either Glucose (M3-G) or hop cell walls (M3-CW) as sole carbon source at a concentration of 10g L<sup>-1</sup>.

The *Escherichia coli* strain TOP10 (F- *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *araD139*  $\Delta$ (*araleu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*) was used for all cloning procedures.

### 2.2. Preparation of subtracted library

*F. graminearum* was cultured 48h and 96h respectively in M3-G and M3-CW. At these times the fungal mycelium was still growing and occupied a volume of 5mL. RNA was extracted with the RNeasy® kit (Qiagen, Germany), and poly A+ RNA were further purified with Oligotex mRNA kit (Qiagen, Germany).

The subtracted library was constructed according to the PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (BD Biosciences, CA). Poly A+ RNA extracted from the M3-CW culture was used as tester and poly A+ RNA extracted from M3-G as driver. The  $\beta$ -tubulin gene (AY303689) was used to estimate the relative enrichment of the library in a standard PCR experiment with the specific primers betatub-5 5'- TGT TGA TCT CCA AGA TCC GTG



AGG - 3' and betatub-3 5'- GGT AGT TCA GGT CGC CGT AAG AGG - 3'. The subtracted cDNA were cloned into ddTTP tailed *HincII* digested pUC19 and transformed into *E.coli* TOP10.

### 2.3. Sequencing and sequence analysis

cDNA clones were purified with the R.E.A.L. prep 96 kit (Qiagen, Germany). Plasmids were sequenced with the BigDye terminator kit v1.1 (Applied Biosystems, CA), sequencing reactions were further purified with Autoseq 96 plate (Amersham Biosciences, NJ), separated and read on an ABI prism 3100 apparatus (Applied Biosystems, CA).

The Phragment assembly program (PHRAP) was used to assemble overlapping or repeated EST into contigs and singletons. The six-frame translations of the sequences were blasted (BLASTX) against the nr database (non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF) (Altschul et al., 1997). Sequences without any blast hit in the database and shorter than 300bp were enlarged to 300bp using related genomic sequences ([AACM00000000](#)) and blasted again. When no hit was found a larger region up to 4kb was taken and searched for predicted proteins. If such a protein was identified, the starting EST was analyzed whether it could match to either the 5' or the 3' untranslated region and the corresponding predicted protein sequence was then used to identify the EST.

The functions of the proteins generated from the EST dataset were attributed according to the *F. graminearum* predicted protein (Whitehead) and to the functional assignment performed by MIPS (<http://mips.gsf.de/genre/proj/fusarium/>). The functions of the EST that have not been assigned to any predicted protein have been manually determined.

## 3. Results

### 3.1. Construction of the subtracted library

A differentially expressed library has been created through suppressive subtractive hybridization technique. The mRNA populations for the subtraction were obtained from *F. graminearum* grown on two media varying in the carbon sources: hop cell walls for the tester and glucose for the driver. Subtraction efficiency has been assessed by comparing the abundance of  $\beta$ -tubulin amplicon in subtracted and unsubtracted populations. A difference of 10 cycles is observed to obtain a similar amplification of the  $\beta$ -tubulin target (Fig. 1). This indicates that the enrichment of cDNA sequences resulting from the subtraction process was

effective and in accordance with typical result for such experiments (PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit user Manual).

The transformation event generated roughly 10 000 transformants. A subset of 1056 randomly selected clones was grown and plasmids were prepared for sequencing. The sequences were trimmed of the vector and primer sequences. 963 sequences were deposited in dbEST (ACC – ACC). All the EST were found in the *F. graminearum* genome and analyzed with PHRAP in order to assemble contigs from the repeated and overlapping sequences. A total of 537 unique sequences (124 contigs and 413 singletons) was obtained. The average insert size was  $357 \pm 169$  bp and only 21 sequences exhibited a polyA tail with a mean size of  $26 \pm 7$ bp.

### 3.2 Functional attribution of the proteins deduced from the EST

The 537 EST sequences were blasted (BLASTX) against the non-redundant protein database. Non-overlapping EST could match to the same predicted protein of *F. graminearum*. This was the case for 169 EST corresponding in fact to 73 predicted proteins. Consequently the number of unique mRNA identified is 441. Among these, 18 EST could neither be assigned to any other sequence found in the non-redundant protein database nor to untranslated regions of the corresponding predicted mRNA. Furthermore 12 EST showed only homologies with proteins from other organisms than *F. graminearum*.

A functional annotation of the predicted proteins of *F. graminearum* has been done at the Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS) according to the MIPS functional catalogue version 2.0. Using this annotation, functions were attributed to the 411 (444-18-12) EST homologous to predicted proteins. The functions of the 30 (18+12) other EST were attributed by comparison with the *Saccharomyces cerevisiae* dataset (Fig 2.). A function could be assigned for 51% of the EST.

The blast results were analyzed. For each blast result the best hit was selected for which experimental evidences were available. According to their possible implication in pathologies, transport and stress, 89 pertinent EST were sorted out and further studied.

Thirty-six pathology related EST have been identified, sub classified in cell wall degrading enzymes, toxin pathways and others (Table 1). Two members of the xylanase family, an arabinofuranosidase, a polygalacturonase, a pectate lyase, a galactanase, an endoglucanase and a glucosidase are present among the CWDE. Moreover two secreted chitinases are retrieved. In addition to enzymes acting on the polymerized sugars, five

different proteases were identified. Some EST correspond to genes coding for enzymes involved in toxin biosynthesis pathways and others EST are showing high homologies to proteins known to be acting or being involved in pathogenesis.

Thirty-six members of the transport systems have also been found (Table 2). Two main transporter categories have been highlighted. The first is that of the nitrogen source transporter (13 mRNA), including several general amino acid permeases and acidic amino acid permeases. The second category is that of the carbon source transporter (9 mRNA) which is mainly composed of hexose transporter. Finally, several other transporters (14 mRNA) are present namely purine-cytosine permease, cation transporter, metal ion transporter and transporters of unknown specificity.

Fifteen EST are corresponding to mRNA coding for protein involved in stress response mechanisms. Different heat shock proteins are found but also proteins produced in starvation conditions.

## Discussion

Suppressive subtractive hybridization is widely used to characterize differentially expressed genes between two cellular states or culture conditions. In this study a differentially expressed cDNA library has been constructed using mRNA from *F. graminearum* grown on hop plant cell walls as tester and grown on glucose for the driver. The library showed an enrichment in differentially expressed sequences (Fig 1.). 1056 clones were selected and the corresponding plasmids were sequenced. 956 sequences have been assembled in 124 contigs and 407 singletons representing 537 unique sequences corresponding to 441 unique mRNA.

Functions were assigned to the 441 EST representing unique mRNA according to the MIPS functional catalogue (V2.0) (Fig 2.). In N or C-starved EST libraries, the Protein synthesis and Metabolism categories were found to correspond to 20% and 10% respectively (Trail et al. 2003). In our subtracted library they represent 8% and 25% respectively. Moreover, prevalent mRNA measured by their redundancy like the homologue to DigA protein (CAC27452) is not found in the subtracted library, and the homologue to the 30KD HSP (P40920) only once. Thus being coherent with the enrichment awaited for this type of library.

The genome of *Fusarium graminearum* has been sequenced and released ([AACM00000000](#)). Proteins were predicted over the whole genome out of the nucleotide sequence data (*Fusarium graminearum* Sequencing Project (Broad Institute of MIT and

Harvard, <http://www.broad.mit.edu>). 411 EST were found to have their translation products homologous to predicted proteins of *F. graminearum*. Thus the corresponding predicted genes can now be considered as expressed genes.

Changing the carbon source in the medium from glucose to plant cell walls was supposed to induce several CWDE. In the subtracted library, several EST show homologies with different CWDE families (Table 1). Those are corresponding to the one needed to degrade each layer of the plant cell wall, namely cellulases for cellulose, pectinases for pectin and xylanases for xylan. Moreover synergistically acting enzymes are found for the pectinase and xylanase, respectively galactanase and arabinofuranosidase, which principal function is to depolymerize side chains in order to give free access to the core polymer to the other enzyme (Le Nours et al., 2003; Koseki et al., 2003). In a cDNA library build with the total mRNA of infected wheat spikes with *F.graminearum*, four EST corresponding to xylanases have been found (Kruger et al., 2002). They are corresponding to three predicted proteins, sequences **BM138109** and **BM135798** being homologous to different parts of predicted protein **AAE73188**. EST ac11 is corresponding to this protein, thus there may be a correlation between the presence of this mRNA and the implication of the protein in pathologies. Among the CWDE we previously characterized the cellobiohydrolase-C (AY196784). The absence of the cellobiohydrolase-C in the subtracted library is confusing, since it is found in a cDNA library constructed with mRNA from *F.graminearum* grown on M3-CW (data not shown). Although it is supposed to be found by screening more clones, the lack of some highly expressed mRNA have already been reported for cellulase and can be considered as intrinsic to the SSH method used to construct the library (Schmoll et al., 2004). 5 proteases are identified and putatively secreted in the medium. Other proteins have a homologous EST in the subtracted library. Contig62 shows homologies to an unknown protein of *Glomerella cingulata*, which is weakly induced by N starvation but is expressed at early stages of infection, detected by northern blots at 3 days after inoculation (Manners, J.M., personal communication). Two different integral membrane protein homologues are found. They are supposed to interact with hydrophobic surfaces in order to detect leaf surfaces (DeZwann et al., 1999 ; Perfect E., personal communication). A carnitine acetyl transferase was found in the N-starved library (Trail et al. 2003) and is also present here: it was shown to be a pathogenesis gene by insertional mutagenesis (Sweigard et al. 1998). EST 1g01 encodes a cutinase G-box binding protein, a positive transcriptional activator of cutinase genes (Li et al., 1997), already found in a cDNA library of *F.graminearum* infecting wheat (Kruger et al., 2002). The ceratoplatanin protein family, of which the snod-protein is a member, was shown

to be secreted during infection of wheat leaf by *Stagonospora nodorum* (Hall et al., 1999). A homologue of this protein from *Coccidioides immitis* (Q00398) showed serine proteinase activity thus may give a clue to its implication in pathology (Pan and Cole, 1995). The genus *Fusarium* is well known for producing several mycotoxins, but mainly trichothecenes, which are implicated in plant pathologies (Proctor et al., 1995). Four EST translations are homologous to enzymes implicated in the trichothecene biosynthesis pathway, thus underlining the induction of toxin synthesis in the M3-CW medium. Other EST are coding for protein with high homologies to protein implicated in toxin synthesis for which *F.graminearum* is not a known producer.

Thirty-six EST are corresponding to mRNA coding for proteins of the transporter class (Table 2). These transporters are produced in order to allow active transport of nitrogen or carbon sources present in the medium. Proteins are minor plant cell wall constituents, which can be hydrolyzed by released fungal proteases thus liberating small peptides and amino acids. These are the main organic nitrogen sources in the medium. Different permeases and transporters have been identified in the subtracted cDNA library allowing specific or non-specific amino acid uptake. Enzymatic hydrolysis of the different layers of the plant cell wall by the fungus generates different kind of oligosaccharides. In order to be able to use these energy sources the fungus should display various uptake systems. Transport systems are found in the library assuring the uptake of most sugars available in the fungus's environment. Nevertheless no transport system specific for glucose was recovered although the cellulose layer complete hydrolysis generates only glucose. The first filamentous ascomycete glucose transporter named *glt1* has been characterized in *Trichoderma harzianum* (Delgado-Jarana et al., 2003). The corresponding protein in *F. graminearum*, EAA69031, was not found in the EST dataset. Since the medium used to produce the driver cDNA contains glucose, the corresponding transporter cDNA should have been suppressed by the hybridization process. Some cooperatively acting transporters are found like the plasma membrane ATPase homologue which creates a proton gradient necessary for many other transporters (Tanner and Caspari, 1996). For example, singleton 6d01 is homologous to a ferrioxamine B transporter of the yeast *S. cerevisiae*. The siderophore transporters, recognizing siderophore-iron chelates, are important for the fungus, since they are produced during iron deprivation and allow its efficient uptake.

Fifteen EST showed homologies to protein implicated in stress response of the fungus to its environment. 8 heat shock proteins are found in the library. Singleton 9d06 is

corresponding to the mRNA coding for the HEX1 protein of *Hypocrea jecorina* which transcription was shown to be induced on cellulase-inducing medium (Curach et al. 2004). Polymer of this protein forms Woronin bodies which function is to seal the septum of the hyphae in response to cellular damage. Mutants of *Magnaporthe grisea* lacking the Hex1 gene were shown to be unable to survive under nitrogen starvation thus it is supposed that the Woronin bodies provide a defense against the nutrient-limiting environment during host-plant infection (Soundararajan et al. 2004). EST 7a08 is homologous to the cross-pathway control gene 1 of *Neurospora crassa*. The corresponding protein is required for the regulation of amino acid biosynthetic genes. This gene was found to be induced by starvation, reflecting the effect of the culture conditions (Paluh et al., 1988).

Using the suppressive subtractive hybridization methods gives a specific insight in the transcriptome of *F. graminearum* grown on minimal medium containing hop cell walls. The simple change in the carbon source present in the medium resulted in much more changes in the cell activity than only producing enzymes to degrade the cell walls. Classically nutrient starvation is known to induce gene related to pathogenesis (Trail et al., 2003). The EST found in the subtracted library give the clue, that the fungus grown on plant cell walls switches not only to a metabolism linked to carbon starvation but also to a growth where genes associated with pathogenicity and virulence are expressed. The use of such a medium to study the fungus by mimicking part of its interaction with a plant should be seen as valuable for taking an insight from the pathogen point of view in the interaction with its host.

Based on the presented EST dataset, a selection of genes will be studied by specific deletion and used for the design of micro arrays experiments in order to contribute to a better understanding of the host/pathogen interaction.

### Bibliological references

- Altschul S.F., Madden T.L., Zhang J., Lipman D.J., Schaffer A.A., Zhang Z., Miller W., Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research*, Volume 25, Issue 17, 1997, Pages 3389-3402.
- Ball M.M., Raynal A., Guerineau M., Iborra F., Construction of efficient centromeric, multicopy and expression vectors for the yeast *Kluyveromyces marxianus* using homologous elements and the promoter of a purine-cytosine-like permease, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, Volume 1, Issue 2, 1999, Pages 347-353.
- Brown D.W., McCormick S.P., Alexander N.J., Proctor R.H., Desjardins A.E., A genetic and biochemical approach to study trichothecene diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*, *Fungal Genetics and Biology*, Volume 32, Issue 2, 2001, Pages 121-133.
- Cecchetto G., Amillis S., Diallinas G., Cecchetto G., Scazzocchio C., Drevet C., Scazzocchio C., The *azgA* purine transporter of *Aspergillus nidulans*: Characterization of a protein belonging to a new phylogenetic cluster, *Journal of Biological Chemistry*, Volume 279, Issue 5, 2004, Pages 3132-3141.
- Coleman M., Henricot B., Arnau J., Oliver R.P., Henricot B., Oliver R.P., Arnau J., Starvation-induced genes of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* are also induced during growth in planta, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Volume 10, Issue 9, 1997, Pages 1106-1109.
- Curach N.C., Te'o V.S., Gibbs M.D., Bergquist P.L., Nevalainen K.M., Isolation, characterization and expression of the *hex1* gene from *Trichoderma reesei*, *Gene*, Volume 331, 2004, Pages 133-140.
- Degefu Y., Paulin L., Lubeck P.S., Cloning, sequencing and expression of a xylanase gene from the maize pathogen *Helminthosporium turcicum*, *European Journal of Plant Pathology*, Volume 107, Issue 4, 2001, Pages 457-465.
- Delgado-Jarana J., Moreno-Mateos M.A., Benitez T., Benitez T., Glucose uptake in *Trichoderma harzianum*: Role of *gtt1*, *Eukaryotic Cell*, Volume 2, Issue 4, 2003, Pages 708-717.
- DeZwaan T.M., Carroll A.M., Valent B., Sweigard J.A., *Magnaporthe grisea* Pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues, *Plant Cell*, Volume 11, Issue 10, 1999, Pages 2013-2030

- Draborg H., Kauppinen S., Dalboge H., Christgau S., Molecular cloning and expression in *S. cerevisiae* of two exochitinases from *Trichoderma harzianum*, *Biochemistry and Molecular Biology International*, Volume 36, Issue 4, 1995, Pages 781-791.
- Esquerre-Tugaye, M.-T., Boudart, G., Dumas, B., Cell wall degrading enzymes, inhibitory proteins, and oligosaccharides participate in the molecular dialogue between plants and pathogens. *Plant Physiology and Biochemistry*, Volume 38, 2000, Pages 157-163.
- Ferrol N., Barea J.M., Azcon-Aguilar C., The plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene family in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*, *Current Genetics*, Volume 37, Issue 2, 2000, Pages 112-118.
- Foreman P.K., Dankmeyer L., Dunn-Coleman N.S., Goedegebuur F., England G.J., Kelley A.S., Meerman H.J., Mitchinson C., Olivares H.A., Teunissen P.J.M., Yao J., Ward M., Brown D., Dean R., Diener S., Houfek T.D., Mitchell T., Foreman P.K., Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*, *Journal of Biological Chemistry*, Volume 278, Issue 34, 2003, Pages 31988-31997.
- Geever R.F., Huiet L., Baum J.A., Tyler B.M., Patel V.B., Rutledge B.J., Case M.E., Giles N.H., DNA sequence, organization and regulation of the qa gene cluster of *Neurospora crassa*, *Journal of Molecular Biology*, Volume 207, Issue 1, 1989, Pages 15-34.
- Gomez-Gomez E., Ruiz-Roldan M.C., Di Pietro A., Roncero M.I.G., Hera C., Role in pathogenesis of two endo- $\beta$ -1,4-xylanase genes from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*, *Fungal Genetics and Biology*, Volume 35, Issue 3, 2002, Pages 213-222.
- Hall N., Keon J.P.R., Hargreaves J.A., A homologue of a gene implicated in the virulence of human fungal diseases is present in a plant fungal pathogen and is expressed during infection, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Volume 55, Issue 1, 1999, Pages 69-73.
- Hata Y., Kitamoto K., Gomi K., Kumagai C., Tamura G., Hara S., The glucoamylase cDNA from *Aspergillus oryzae*: its cloning, nucleotide sequence, and expression in *Saccharomyces cerevisiae*, *Agricultural and biological chemistry*, Volume 55, Issue 4, 1991, Pages 941-949.
- Hutchings H., Stahmann K.-P., Espeso E.A., Arst Jr. H.N., Tilburn J., Roels S., Timberlake W.E., Hutchings H., Stahmann K.-P., Timberlake W.E., The multiply-regulated gabA gene encoding the GABA permease of *Aspergillus nidulans*: A score of exons, *Molecular Microbiology*, Volume 32, Issue 3, 1999, Pages 557-568.



- Iikura H., Takashima S., Nakamura A., Masaki H., Uozumi T., Cloning of a gene encoding a putative xylanase with a cellulose-binding domain from *Humicola grisea*, *Bioscience, biotechnology and biochemistry*, Volume 61, Issue 9, 1997, Pages 1593-1595.
- Isshiki, A., Akimitsu, K., Yamamoto, H., Yamamoto, M., 2001. Endopolygalacturonase is essential for citrus black rot caused by *Alternaria citri* but not brown spot caused by *Alternaria alternata*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14, 749-757.
- Ivanova N., Anderson I., Kapatral V., Bhattacharyya A., Mikhailova N., Lapidus A., Chu L., Mazur M., Goltsman E., Larsen N., D'Souza M., Walunas T., Grechkin Y., Pusch G., Haselkorn R., Fonstein M., Overbeek R., Kyrpides N., Sorokin A., Gelleron N., Candelon B., Ehrlich S.D., Reznik G., Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*, *Nature*, Volume 423, Issue 6935, 2003, Pages 87-91.
- Jaton-Ogay K., Paris S., Huerre M., Quadroni M., Falchetto R., Togni G., Latge J.-P., Monod M., Cloning and disruption of the gene encoding an extracellular metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*, *Molecular Microbiology*, Volume 14, Issue 5, 1994, Pages 917-928.
- Kang Z., Buchenauer H., 2002. Studies on the infection process of *Fusarium culmorum* in wheat spikes: Degradation of host cell wall components and localization of trichothecene toxins in infected tissue. *European Journal of Plant Pathology* 108, 653-660.
- Kimura, M., Anzai, H., Yamaguchi, I., Microbial toxins in plant-pathogen interactions : biosynthesis, resistance mechanisms, and significance. *Journal of General and Applied Microbiology*, Volume 47, 2001, Pages 149-160.
- Koo K., Stuart W.D., Sequence and structure of mtr, an amino acid transport gene of *Neurospora crassa*, *Genome*, Volume 34, Issue 4, 1991, Pages 644-651.
- Koseki T., Okuda M., Sudoh S., Kizaki Y., Aramaki I., Iwano K., Matsuzawa H., Role of Two  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidases in Arabinoxylan Degradation and Characteristics of the Encoding Genes from Shochu Koji Molds, *Aspergillus kawachii* and *Aspergillus awamori*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Volume 96, Issue 3, 2003, Pages 232-241.
- Kruger W.M., Pritsch C., Chao S., Muehlbauer G.J., Functional and comparative bioinformatic analysis of expressed genes from wheat spikes infected with *Fusarium graminearum*, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Volume 15, Issue 5, 2002, Pages 445-455.

- Le Nours J., Ryttersgaard C., Lo Leggio L., Larsen S., Ostergaard P.R., Borchert T.V., Christensen L.L.H., Larsen S., Ryttersgaard C., Structure of two fungal  $\beta$ -1,4-galactanases: Searching for the basis for temperature and pH optimum, *Protein Science*, Volume 12, Issue 6, 2003, Pages 1195-1204.
- Legzdina, L., Buerstmayr, H., 2004. Comparison of infection with *Fusarium* head blight and accumulation of mycotoxins in grain of hulless and covered barley, *Journal of Cereal Science*, Volume 40, Pages 61-67.
- Li D., Kolattukudy P.E., Kolattukudy P.E., Cloning of cutinase transcription factor 1, a transactivating protein containing Cys6Zn2 binuclear cluster DNA-binding motif, *Journal of Biological Chemistry*, Volume 272, Issue 19, 1997, Pages 12462-12467.
- Li L., Xue C., Bruno K., Nishimura M., Xu J.-R., Xu J.-R., Two PAK kinase genes, CHM1 and MST20, have distinct functions in *Magnaporthe grisea*, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Volume 17, Issue 5, 2004, Pages 547-556.
- Mitchell, D.B., Vogel, K., Weimann, B.J., Pasamontes, L., Van Loon, A.P.G.M., Mitchell, D.B., 1997. The phytase subfamily of histidine acid phosphatases: Isolation of genes for two novel phytases from the fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*. *Microbiol.* 143, 245-252.
- Motomura M., Chihaya N., Yabe K., Motomura M., Shinozawa T., Hamasaki T., Cloning and characterization of the O-methyltransferase I gene (dmtA) from *Aspergillus parasiticus* associated with the conversions of demethylsterigmatocystin to sterigmatocystin and dihydrodemethylsterigmatocystin to dihydrosterigmatocystin in aflatoxin biosynthesis, *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 65, Issue 11, 1999, Pages 4987-4994.
- Munkvold G.P., Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears, *European Journal of Plant Pathology*, Volume 109, Issue 7, 2003, Pages 705-713.
- Nicholson P., Chandler E., Draeger R.C., Gosman N.E., Simpson D.R., Thomsett M., Wilson A.H., Molecular tools to study epidemiology and toxicology of fusarium head blight of cereals, *European Journal of Plant Pathology*, Volume 109, Issue 7, 2003, Pages 691-703.
- Paluh J.L., Orbach M.J., Legerton T.L., Yanofsky C., The cross-pathway control gene of *Neurospora crassa*, *cpc-1*, encodes a protein similar to GCN4 of yeast and the DNA-binding domain of the oncogene v-jun-encoded protein., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Volume 85, Issue 11, 1988, Pages 3728-3732.

- Pan S., Cole G.T., Molecular and biochemical characterization of a *Coccidioides immitis*-specific antigen, *Infection and Immunity*, Volume 63, Issue 10, 1995, Pages 3994-4002.
- Phalip V., Hatsch D., Jeltsch J.-M., Application of a yeast method for DNA extraction associated with database interrogations for the characterization of various filamentous fungi from diseased hop, *Biotechnology Letters*, Volume 26, Issue 5, 2004, Pages 409-413.
- Posada M.L., Patino B., De La Heras A., Mirete S., Vazquez C., Gonzalez-Jaen M.T., Comparative analysis of an endopolygalacturonase coding gene in isolates of seven *Fusarium* species, *Mycological Research*, Volume 104, Issue 11, 2000, Pages 1342-1347.
- Proctor RH, Hohn TM, McCormick SP. Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Molecular Plant Microbe Interactaction* Volume 8, 1995, Pages 593-601.
- Roncero, M.I.G., Di Pietro, A., Ruiz-Roldan, M.C., Huertas-Gonzalez, M.D., Garcia-Maceira, F.I., Meglecz, E., Jimenez A., Caracuel, Z., Sancho-Zapatero, R., Hera C., Gomez-Gomez, E., Ruiz-Rubio, M., Gonzalez-Verdejo, C.I., Paez, M.J., 2000. Role of cell wall-degrading enzymes in pathogenicity of *Fusarium oxysporum* [Papel de enzimas liticas de la pared celular en la patogeniad de *Fusarium oxysporum*]. *Rev. Iberoam. Micol.* 17, 47-53.
- Rose M.S., Yun S.-H., Asvarak T., Lu S.-W., Yoder O.C., Turgeon B.G., A decarboxylase encoded at the *Cochliobolus heterostrophus* translocation-associated Tox1B locus is required for polyketide (T-toxin) biosynthesis and high virulence on T-cytoplasm maize, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Volume 15, Issue 9, 2002, Pages 883-893.
- Rypniewski W.R., Hastrup S., Betzel C., Dauter M., Dauter Z., Papendorf G., Branner S., Wilson K.S., The sequence and X-ray structure of the trypsin from *Fusarium oxysporum*, *Protein Engineering*, Volume 6, Issue 4, 1993, Pages 341-348.
- Scheinpflug, H., Heupel, M., 1998. The importance of fungal taxonomy for plant pathology. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz* 105, 246-263.
- Schmoll M., Zeilinger S., Mach R.L., Kubicek C.P., Cloning of genes expressed early during cellulase induction in *Hypocrea jecorina* by a rapid subtraction hybridization approach, *Fungal Genetics and Biology*, Volume 41, Issue 9, 2004, Pages 877-887.
- Scott B., Young C., McMillan L., Telfer E., Molecular cloning and genetic analysis of an indole diterpene gene cluster from *Penicillium paxilli*, *Molecular Microbiology*, Volume 39, Issue 3, 2001, Pages 754-764.

- Silva J.C., Minto R.E., Barry III C.E., Holland K.A., Townsend C.A., Isolation and characterization of the versicolorin B synthase gene from *Aspergillus parasiticus*. Expansion of the aflatoxin B1 biosynthetic gene cluster, *Journal of Biological Chemistry*, Volume 271, Issue 23, 1996, Pages 13600-13608.
- Sophianopoulou V., Scazzocchio C., The proline transport protein of *Aspergillus nidulans* is very similar to amino acid transporters of *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular Microbiology*, Volume 3, Issue 6, 1989, Pages 705-714.
- Soundararajan S., Li X., Ramos-Pamplona M., Naqvi N.I., Jedd G., Chua N.H., Ramos-Pamplona M., Naqvi N.I., Woronin body function in *Magnaporthe grisea* is essential for efficient pathogenesis and for survival during nitrogen starvation stress, *Plant Cell*, Volume 16, Issue 6, 2004, Pages 1564-1574.
- Sposato P., Ahn J.H., Walton J.D., Characterization and disruption of a gene in the maize pathogen *Cochliobolus carbonum* encoding a cellulase lacking a cellulose binding domain and hinge region, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Volume 8, Issue 4, 1995, Pages 602-609.
- Sweigard J.A., Carroll A.M., Farrall L., Valent B., Chumley F.G., *Magnaporthe grisea* pathogenicity genes obtained through insertional mutagenesis, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Volume 11, Issue 5, 1998, Pages 404-412.
- Tanner W., Caspari T., Membrane transport carriers, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, Volume 47, 1996, Pages 595-626.
- Trail F., Xu J.-R., San Miguel P., Halgren R.G., Kistler H.C., Analysis of expressed sequence tags from *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*), *Fungal Genetics and Biology*, Volume 38, Issue 2, 2003, Pages 187-197.
- Trip H, Evers ME, Kiel JA, Driessen AJ. Uptake of the beta-lactam precursor alpha-amino adipic acid in *Penicillium chrysogenum* is mediated by the acidic and the general amino acid permease. *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 70, 2004, Pages 4775-83.
- Vasseur V., Van Montagu M., Goldman G.H., *Trichoderma harzianum* genes induced during growth on *Rhizoctonia solani* cell walls, *Microbiology*, Volume 141, Issue 4, 1995, Pages 767-774.
- Wright M.B., Howell E.A., Gaber R.F., Amino acid substitutions in membrane-spanning domains of Holl, a member of the major facilitator superfamily of transporters, confer nonselective cation uptake in *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Bacteriology*, Volume 178, Issue 24, 1996, Pages 7197-7205.

Wu S.-C., Ham K.-S., Darvill A.G., Albersheim P., Ham K.-S., Deletion of two endo- $\alpha$ -1,4-xylanase genes reveals additional isozymes secreted by the rice blast fungus, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Volume 10, Issue 6, 1997, Pages 700-708.

Yamada-Okabe T., Sakamori Y., Mio T., Yamada-Okabe H., Identification and characterization of the genes for N-acetylglucosamine kinase and N-acetylglucosamine-phosphate deacetylase in the pathogenic fungus *Candida albicans*, *European Journal of Biochemistry*, Volume 268, Issue 8, 2001, Pages 2498-2505.

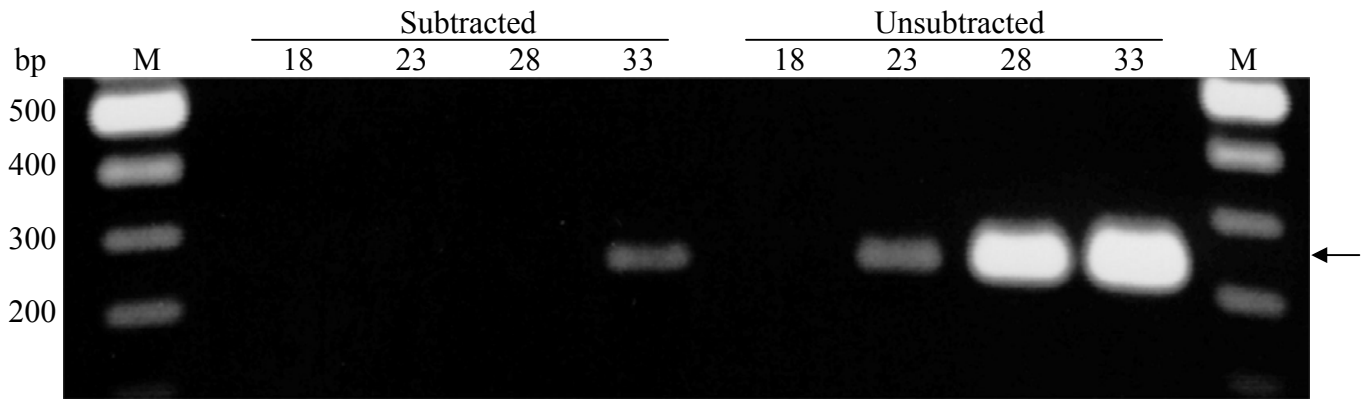


Fig. 1. Amplification of the  $\beta$ -tubulin at 18, 23, 28 and 33 cycles using the subtracted and the unsubtracted cDNA population as matrix. The size of specific  $\beta$ -tubulin amplicon is 234 bp (arrow). M : molecular marker.

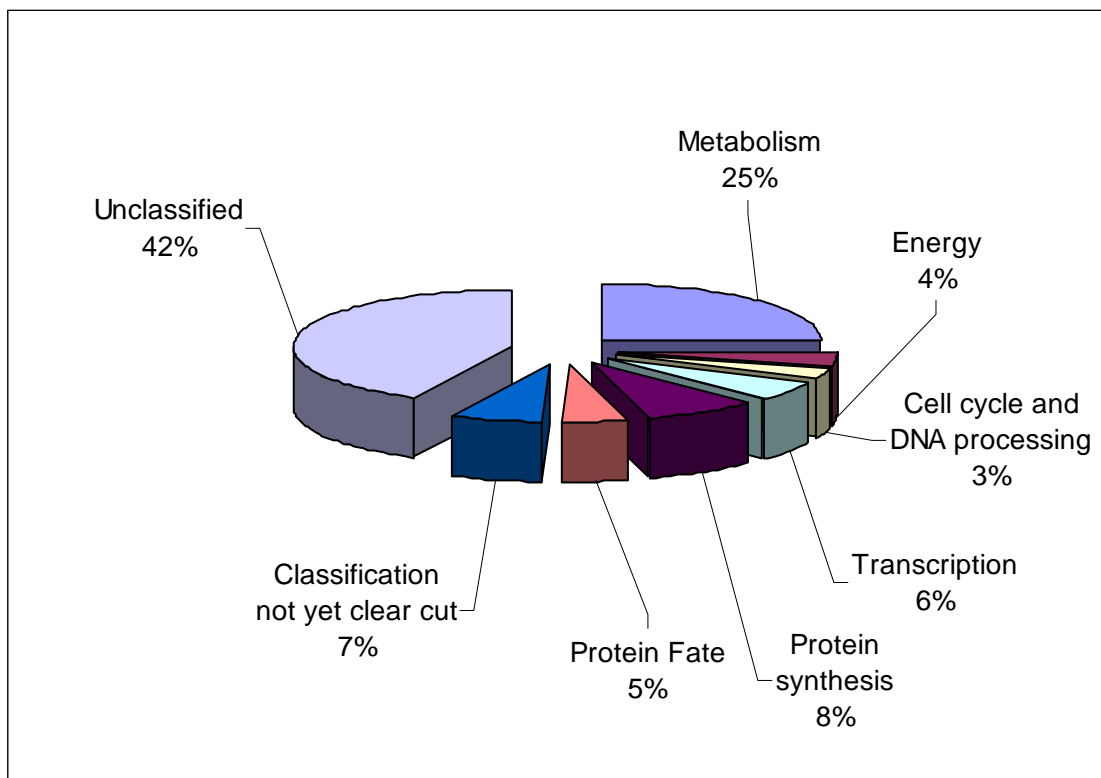


Fig 2. Distribution of the function of the EST according to the MIPS functional catalogue. Percentages are calculated from the 441 unique identified mRNA sequences.

<i>EST #</i>	<i>Acc-FG</i>	<i>Description</i>	<i>Accession</i>	<i>Expectation</i>	<i>Reference</i>
<b>CWDE</b>					
difJ8e05	EAA67375	beta-glucosidase 5 [ <i>Coccidioides posadasii</i> ]	AAL09829	1E-106	
contig36	EAA69039	extracellular chitinase [ <i>Blumeria graminis</i> ]	AAK84437	1E-107	
difJ1f04	EAA69182	leucine aminopeptidase [ <i>Aspergillus sojae</i> ]	AAN31395	1E-113	
difJ8g05	EAA69544	beta-1,3-glucanosyltransferase [ <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> ]	AAP91684	1E-126	
difJ8b11	EAA70592	exochitinase [ <i>Trichoderma harzianum</i> ]	AAB47060	0	Draborg et al. (1995)
difJ7b06	EAA71508	endoglucanase, putative [ <i>Aspergillus fumigatus</i> ]	CAF31975	1E-57	Foreman et al. (2003)
difJ6g12	EAA71669	extracellular elastinolytic metalloproteinase precursor [ <i>Aspergillus fumigatus</i> ]	P46075	0	Jaton-Ogay et al. (1994)
difJac11	EAA73188	xylanase [ <i>Setosphaeria turcica</i> ]	CAB52417	4E-073	Degefu et al. (2001)
difJ8h10	EAA74871	chain A, structure of two fungal beta-1,4-galactanases [ <i>Corynascus heterothallicus</i> ]	1HJS	1E-131	Le Nours et al. (2003)
contig35	EAA75374	trypsin precursor [ <i>Fusarium oxysporum</i> ]	P35049	2E-099	Rypniewski et al. (1993)
difJag12	EAA76051	pectate lyase [ <i>Glomerella cingulata</i> ]	AAA75471	7E-069	
difJbd03	EAA76448	exopolysaccharuronase [ <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> ]	AAF12737	0	Posada et al. (2000)
contig80	EAA78230	endo-1,4-beta-xylanase (EC 3.2.8) [ <i>Humicola grisea</i> ]	JC5861	1E-095	Iikura et al. (1997)
difJ8g01	EAA78248	related to alpha-L-arabinofuranosidase A precursor [ <i>Neurospora crassa</i> ]	CAF05858	0	Koseki et al. (2003)
difJ2f12	EAA78281	prolidase (proline dipeptidase) [ <i>Emericella nidulans</i> ]	CAC39600	1E-154	
difJaa06	EAA78500	subtilisin-like serine protease PR1C [ <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> ]	CAD11898	0	
difJ5c08	EAA78639	glucoamylase precursor [ <i>Neurospora crassa</i> ]	XP_327956	1E-166	Hata et al. (1991)
<b>Toxins</b>					
<i>Trichothecene synthesis pathway</i>					
difJ1f12	EAA68538	monooxygenase [ <i>Fusarium sporotrichioides</i> ]	AAO27751	8E-031	Brown et al. (2001)
contig119	EAA69768	reductase [ <i>Fusarium sporotrichioides</i> ]	AAO27755	1E-125	Brown et al. (2001)
contig104	EAA69769	monooxygenase [ <i>Gibberella zeae</i> ]	AAO34681	0	Brown et al. (2001)
difJ8e08	EAA78237	deacetylase [ <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> ]	CAD10036	1E-018	Brown et al. (2001)
<i>Aflatoxin pathway</i>					
contig77	EAA72210	O-methyltransferase [ <i>Aspergillus parasiticus</i> ]	BAA86103	3E-058	Motomura et al. (1999)
difJ7g04	EAA75438	versicolorin b synthase-like protein, putative [ <i>Aspergillus fumigatus</i> ]	AAC49318	1E-117	Silva et al. (1996)
<i>Other toxins</i>					
contig117	EAA69779	PaxU [ <i>Penicillium paxilli</i> ]	AAK11532	7E-061	Scott et al. (2001)
contig86	EAA70229	reductase RED1 [ <i>Cochliobolus heterostrophus</i> ]	AAM88292	1E-083	Rose et al. (2002)
difJ1e03	EAA76520	methyltransferase required for diphthamide biosynthesis [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	NP_013273	1E-102	

**Other pathology related proteins**

contig62	EAA68081	induced 3 days post infection - unknown [ <i>Glomerella cingulata</i> ]	AAB92222	1E-034	Manners J.M. personal communication
difJ1e01	EAA68682	carnitine acetyl transferase [ <i>Magnaporthe grisea</i> ]	AAB88887	0	Sweigard et al. (1998)
contig1	EAA69530	aldehyde dehydrogenase; ALDH [ <i>Cladosporium fulvum</i> ]	AAF82789	0	Coleman et al. (1997)
difJ3b03	EAA70055	probable SnodProt1 precursor [MIPS] [ <i>Neurospora crassa</i> ]	XP_328493	1E-036	
difJ7d10	EAA70685	NADPH oxidase 1 [ <i>Podospora anserina</i> ]	AAK50853	0	
contig100	EAA71148	CaNAG2 [ <i>Candida albicans</i> ]	BAB43813	1E-072	Yamada-Okabe et al. (2001)
difJ2h08	EAA71225	integral membrane protein [ <i>Blumeria graminis</i> ]	AAL56992	9E-23	Perfect personal communication
difj8c01	EAA75690	integral membrane protein [ <i>Magnaporthe grisea</i> ]	AAD30438	8E-22	DeZwaan et al. (1999)
difJ7d09	EAA76281	PAK kinase [ <i>Magnaporthe grisea</i> ]	AAP93639	7E-051	Li et al. (2004)
difJ1g01	EAA76711	cutinase G-box binding protein [ <i>Nectria haematococca</i> mpVI]	AAB04132	0	Li et al. (1997)
difJ4b08	EAA77986	integral membrane protein [ <i>Blumeria graminis</i> ]	AAL56992	3E-013	Perfect E. personal communication

Table 1. EST from the subtracted library presenting homologies with pathology related proteins sorted by Acc – FG (accession of the corresponding *F. graminearum* predicted protein).



<i>EST #</i>	<i>Acc-FG</i>	<i>Description</i>	<i>Accession</i>	<i>Expectation</i>	<i>Reference</i>
<b>Transporters</b>					
<i>N source transporters</i>					
difJ1d10		acidic amino acid permease [ <i>Penicillium chrysogenum</i> ]	AAS10167	1E-005	Trip et al. (2004)
contig89	EAA67186	acidic amino acid permease [ <i>Penicillium chrysogenum</i> ]	AAS10167	1E-071	Trip et al. (2004)
difJ7d06	EAA70215	related to neutral amino acid permease [ <i>Neurospora crassa</i> ]	CAE76088	5E-045	
difJ3b12	EAA70514	GabA permease, putative [ <i>Aspergillus fumigatus</i> ]	CAE47957	0	Hutchings et al. (1999)
contig107	EAA71470	neutral amino acid permease - [ <i>Neurospora crassa</i> ]	S47892	2E-038	Koo et al. (1991)
difJ7e05	EAA72339	di/tri peptide transporter 2 [ <i>Phaeosphaeria nodorum</i> ]	AAO31597	7E-098	
difJ6b03	EAA72554	Amino-acid permease [ <i>Hypocrea lixii</i> ]	P34054	0	Vasseur et al. (1995)
difJ7b09	EAA73508	plasma membrane carnitine transporter Agp2p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	NP_009690	1E-105	
difJ2c04	EAA75118	general amino acid permease Gap1p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	S38111	1E-117	Trip et al. (2004)
difJ6e09	EAA75973	amino-acid permease [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	NP_595009	1E-101	Sophianopoulou et al. (1989)
difJ8e06	EAA75973	amino-acid permease [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	NP_595009	1E-101	Ivanova et al. (2003)
contig97	EAA76673	neutral amino acid permease [ <i>Neurospora crassa</i> ]	S47892	1E-114	Koo et al. (1991)
difJad12	EAA78103	general amino acid permease; Gap1p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	NP_012965	1E-136	Trip et al. (2004)
<i>C source transporters</i>					
contig94	EAA68315	qinate permease [ <i>Neurospora crassa</i> ]	XP_325881	2E-059	Geever et al. (19889)
difJ5g04	EAA68539	related to L-fucose permease [ <i>Neurospora crassa</i> ]	CAD71039	8E-021	
contig13	EAA69832	maltose permease [ <i>Aspergillus oryzae</i> ]	BAB59002	1E-126	
contig95	EAA71135	MSTA protein [ <i>Emericella nidulans</i> ]	CAC80843	6E-054	
difJ7f10	EAA72224	maltose permease [ <i>Aspergillus oryzae</i> ]	BAB59002	1E-082	
contig15	EAA74377	carboxylic acid transport protein [ <i>Metarhizium anisopliae</i> ]	AAM19667	0	
difJ6c03	EAA74464	hexose transporter [ <i>Aspergillus oryzae</i> ]	BAC20337	3E-067	
difJ5c02	EAA76686	maltose permease [ <i>Aspergillus oryzae</i> ]	BAB59002	1E-114	
difJ3c06	EAA78529	sugar phosphate permease [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	NP_596430	1E-076	
<i>Other transporters</i>					
difJ7c08	EAA67222	MIT family metal ion transporter PI066 [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	NP_595545	1E-099	
difJ2c05	EAA67491	cation efflux family protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	NP_181477	7E-045	
contig48	EAA67898	plasma membrane H <sup>+</sup> ATPase [ <i>Neurospora crassa</i> ]	AAA33563	0	Ferrol et al. (2000)
difJ5d11	EAA69954	putative MSF transporter [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	NP_595140	1E-141	Wright et al. (1996)

difJ1e05	EAA70159	outer mitochondrial membrane protein porin [ <i>Neurospora crassa</i> ]	XP_323644	1E-103	
difJ2b10	EAA70733	MFS transporter of unknown specificity [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	NP_593504	9E-053	
difJ8h05	EAA71679	transport of pyridoxine; Tpn1p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	NP_011329	1E-068	Ball et al. (1999)
difJ9g01	EAA72812	MFS transporter of unknown specificity [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	NP_593504	5E-065	
difJ1f11	EAA73543	transporter, unknown specificity [ <i>Aspergillus fumigatus</i> ]	CAE47906	1E-073	
difJ6d01	EAA74343	ferrioxamine B transporter [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	NP_010849	1E-120	
difJbg09	EAA74902	allantoate permease; Dal5p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	NP_012686	1E-044	
difJ5h11	EAA77343	sodium transport ATPase FST [ <i>Nectria haematococca</i> mpVI]	AAB04131	0	
difJ9f11	EAA78294	choline transporter-related [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	NP_173921	4E-021	
difj4f08	EAA78738	purine transporter [ <i>Emericella nidulans</i> ]	CAE00849	0	Cecchetto et al. (2004)

Table 2. EST from the subtracted library presenting homologies with Transporter related proteins sorted by Acc – FG (accession of the corresponding *F. graminearum* predicted protein).

<b>EST #</b>	<b>Acc-FG Description</b>	<b>Accession</b>	<b>Expectation</b>	<b>Reference</b>
contig98	heat shock protein CLPA [ <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> ]	AAO73810	3E-073	
contig57	EAA67128 heat shock protein 70 [ <i>Emericella nidulans</i> ]	CAA67431	1E-119	
difJ af11	EAA67391 low temperature requirement protein A [ <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579]	NP_832921	7E-006	
difJ8a06	EAA67487 small heat shock protein [ <i>Chaetomium globosum</i> ]	AAR36902	2E-057	
difJ ae07	EAA67818 heat shock protein 78 [ <i>Leptosphaeria maculans</i> ]	AAO49455	0	Idnurm et al. (2003)
difJ 6f03	EAA68554 dnaj protein [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	NP_594359	2E-010	
contig99	EAA70431 HSP70 [ <i>Hypocrea jecorina</i> ]	AAP40020	0	
difJ 9d06	EAA72434 highly expressed on cellulase-inducing medium [ <i>Hypocrea jecorina</i> ]	AAQ56234	2E-071	Curach et al. (2004)
difJ 9b07	EAA74718 70 kDa heat shock protein [ <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> ]	AAP05987	0	
difJ 3d01	EAA75185 related to Hsp90 associated co-chaperone [ <i>Neurospora crassa</i> ]	CAD21185	3E-006	
contig66	EAA76137 against heat-induced protein aggregation [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	NP_116638	2E-060	
difJ 2a10	EAA76757 Ydj1p heat shock protein [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	NP_014335	4E-099	
difJ7a08	EAA76927 cross-pathway control protein 1 [ <i>Neurospora crassa</i> ]	A30208	4E-042	Paluh et al. (1988)
difJ 9a10	EAA76934 COP9/signalosome complex subunit 7B [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	Q09722	5E-034	
contig108	EAA77628 DNA damage-responsive protein 48 [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	NP_013897	9E-020	

Table 3. EST from the subtracted library presenting homologies with stress related proteins sorted by Acc – FG (accession of the corresponding *F. graminearum* predicted protein).

### IV. 2. 3. Extension du travail

L'article 3 présente la réalisation d'une banque suppressive soustractive. Les séquences les plus remarquables par rapport aux aspects de la pathologie, du transport et du stress y sont présentées en détail. La totalité des 537 EST uniques ainsi que le meilleur hit obtenu par recherche d'homologie dans la banque de protéines non redondantes sont présentés dans l'annexe 6.

Lors de ce travail deux EST ont montré des homologies avec des xylanases. La comparaison de la traduction de ces deux EST avec les xylanases prédites a permis d'identifier les EST contig80 et ac11 comme les xylanases 02 et 15. Ces deux xylanases font partie des familles de glycoside hydrolases 10 et 11 respectivement. Elles sont les deux xylanases les plus fortement exprimées sur milieu parois (Fig. 42). Ainsi il est possible de supposer que les gènes correspondant aux EST trouvés dans la banque suppressive soustractive sont les gènes les plus différenciellement exprimés. Les 9 autres CWDE trouvées dans la banque soustractive sont donc potentiellement les représentants de chaque famille de CWDE les plus exprimées lors de la culture de *F. graminearum* sur milieu parois. De plus le singleton ac11, correspondant à la xylanase 15, montre des homologies avec les séquences **BM138109** et **BM135798**. Ces deux séquences sont des EST trouvées dans une banque de cDNA de *F. graminearum* infectant des épis de blé. Nous pouvons donc supposer que la xylanase 15 pourrait être fortement exprimée dans des conditions d'infection sans spécificité de l'espèce hôte.

Les allergies d'origine fongiques sont de plus en plus importantes dans les pathologies humaines provoquant asthmes et problèmes cutanés et intestinaux (Helbling, 2003). Trois EST de la banque suppressive soustractive, 6f06, 8h02 et le contig93, présentent des homologies avec des allergènes décrits chez l'homme (Achatz et al., 1995 ; Hoff et al., 2003).

#### IV. 2. 4. Conclusions et perspectives

L'analyse de la banque suppressive soustractive nous permet d'obtenir une vision ponctuelle dans le transcriptome de *F. graminearum*. L'objectif visé était d'obtenir un aperçu des familles de CWDE induites par les parois de houblon. 12 EST correspondant à des CWDE ont été retrouvés. Parmi eux 2 xylanases correspondent aux xylanases 02 et 15 majoritairement exprimées sur milieu paroi. La xylanase 15 semble être une enzyme importante car elle est également retrouvée dans une banque d'EST de *F. graminearum* infectant des épis de blé. Une investigation plus poussée de cette enzyme semble prometteuse dans la compréhension du mécanisme d'infection intervenant lors de la dégradation de la paroi cellulaire de la plante.

Cependant le changement de source de carbone entre les deux conditions de culture n'induit pas seulement des gènes dont le produit contribue à la dégradation de la source de carbone et à son assimilation au sein de la cellule mais également des gènes induits dans des conditions de déplétion et lors de pathologie. Le comportement du champignon sur le milieu M3-CW semble similaire à celui qu'il adopte lors d'une infection. L'étude de cas d'infection de houblon permettrait de confirmer cette hypothèse et donc de valider la culture de *F. graminearum* sur paroi de houblon comme un modèle mimant une partie du processus d'infection *in-vitro*.

## **Chapitre V – Conclusion et perspectives**

### ***V. 1. Identification et marqueurs phylogénétiques***

Nous avons développé une méthode d'identification des espèces de *Fusarium* bipartite décrite dans l'article 1. L'approfondissement des travaux avec le gène de la cbh-C a permis d'étendre l'analyse CAPS sur ce gène et de définir des profils permettant d'identifier 11 espèces de *Fusarium*.

Dans l'article 2 nous avons décrit la validation du gène de la cellobiohydrolase-C et de celui de la topoisomérase II comme marqueurs phylogénétiques sur une population locale de *Fusarium*. La validation de ces deux gènes par rapport au cluster d'ADNr entérine l'approche d'identification en utilisant l'un ou l'autre de ces marqueurs. L'extension de ce travail consiste à élargir la population considérée à un plus grand nombre d'espèces couvrant les différents complexes ainsi que les différentes lignées de chaque représentant.

Les frais de séquençage ainsi que la rapidité d'obtention des séquences ont considérablement été réduits grâce à l'évolution des technologies. Ainsi l'identification peut être réalisée rapidement par le séquençage direct des amplicons. Une base de données de séquences de facteur d'élongation  $\alpha$  de différentes espèces de *Fusarium* a récemment été mise en place (Geiser et al., 2004). Les auteurs préconisent l'amplification d'un fragment de ce gène suivi de son séquençage pour l'identification de *Fusarium*.

Le laboratoire assure le suivi des populations de champignons filamenteux présents sur les plants de houblon en dépérissement grâce à la préparation rapide d'un grand nombre d'échantillon d'ADN génomique (Phalip et al., 2004). L'identité des différents champignons est déterminée par séquençage d'un amplicon correspondant à l'ITS 1, l'ADNr 5.8S et l'ITS2 et comparaison entre la séquence de ce dernier et les séquences contenues dans Genbank. Cette approche permet d'identifier tous les genres répertoriés dans la base de données publique. Cependant, en guise d'alternative et pour leur identification rapide, certains individus présentant une couleur rose-orangée lors de culture sur milieu PDA sont testés pour leur appartenance au genre *Fusarium* puis identifiés grâce à l'analyse CAPS qui reste peu coûteuse. De plus cette analyse est utilisée couramment au laboratoire pour vérifier rapidement l'identité du champignon utilisé dans différentes expériences.

## ***V. 2. Génomique du champignon Fusarium graminearum***

Le génome de *F. graminearum* a été rendu public en mars 2003 par le Whitehead Institute (Cambridge, MA, USA).

Dès la publication du génome, nous avons cherché à identifier des gènes de CWDE. Nous avons développé une approche basée sur l'analyse des ORF pour mettre rapidement en place des outils de recherche. Ces outils ont été mis à disposition de la communauté scientifique en septembre 2003. Ils sont régulièrement mis à jour en comparant les ORF aux nouvelles versions de bases de données des protéines non-redondantes. Ces outils peuvent être utilisés pour prédire n'importe quel type de protéine. L'annotation du génome a été mise en place 7 mois après la publication du génome sur le site internet du Whitehead Institute en octobre 2003.

Nous avons focalisé nos recherches sur la famille des xylanases. 27 régions contenant des séquences codant pour ce type d'enzymes ont été localisées. Nous avons cherché à confirmer les prédictions en clonant les séquences codantes des ARNm correspondant. 22 séquences codantes ont pu être clonées validant la prédiction des gènes correspondant et faisant ainsi « accéder » chaque gène putatif au statut de gène transcrit. L'analyse fine des séquences a révélé la présence de plusieurs familles de glycoside hydrolases. La prédiction de la structure des xylanases 15 et 24 nous permet d'envisager des éléments d'ingénierie protéique. Une modification est proposée dans le but de baisser le pH optimum de la xylanase 15.

Ce travail se poursuivra par le clonage dans un vecteur d'expression des 22 xylanases prédites et leur surexpression. Il sera ainsi possible de caractériser biochimiquement les enzymes et confirmer leurs activités enzymatiques vis à vis de différents substrats potentiels, notamment le xylane. L'étude de la structure 3D des protéines par cristallisation est également envisagée pour comprendre les mécanismes moléculaires en jeu lors des réactions biochimiques mais aussi dans le but de pouvoir prédire des inhibiteurs par modélisation moléculaire. Chaque famille de glycoside hydrolases possède une structure propre (Fig. 24), le design d'inhibiteur spécifique à chaque famille permettrait d'engager des études de pathologie en inhibant spécifiquement et sélectivement une famille.



### ***V. 3. Transcriptomique du champignon *Fusarium graminearum****

Le transcriptome de *F. graminearum* a été exploré de deux manières. Le suivi de l'expression des xylanases prédites dans différentes conditions de culture a constitué une première approche. Une stratégie plus globale a été suivie par la réalisation et l'analyse d'une banque différentielle d'ADNc.

Plusieurs types de profils d'expressions des xylanases putatives ont été mis en évidence. L'étude de ces profils révèle différents mécanismes de régulation. Une première extension d'un travail consistera à ajouter la dimension « temps » aux expériences déjà réalisées. Il devra ainsi être possible de décortiquer la régulation fine de l'expression de ces gènes. Le suivi d'induction sur d'autres substrats correspondant à différentes couches de la paroi cellulaire des plantes comme la pectine est également envisagé.

L'induction forte sur le milieu paroi a conduit à classer les xylanases en fonction de la quantité de leur ARNm dans cette condition. Les xylanases les plus fortement exprimées dans cette condition de culture appartiennent aux familles de glycoside hydrolases 10 et 11. Ce constat nous laisse supposer leur implication majoritaire dans l'attaque de la paroi cellulaire des plantes dont la composition et l'organisation est proche de celle existant chez le houblon.

L'étude du transcriptome par hybridation suppressive soustractive a permis de mettre également en évidence l'induction forte des gènes des xylanases 02 et 15. De plus dans le cas de la xylanase 15, des évidences expérimentales montrent que le gène de cette enzyme est également induit dans des conditions d'infection d'épi de blé (Kruger et al., 2002).

L'étude plus poussée des xylanases 02, 15, 21 et 24 semble opportune vis à vis de leur niveau d'expression et des évidences expérimentales. L'approche par famille envisagée sera poursuivie, par l'étude de l'expression lors de conditions d'infection des autres CWDE mises en évidence par la banque suppressive soustractive.

Outre plusieurs transporteurs, l'analyse des EST nous a permis de mettre en évidence de nombreuses protéines impliquées dans la pathologie : celles dont leurs homologues ont montré une implication dans les pathologies observées pour d'autres genres de champignons ainsi que différents représentants des gènes du cluster de biosynthèse des trichothécènes. Le milieu paroi induit donc un ensemble de gènes impliqués dans la pathologie. La mise en évidence d'autres gènes potentiellement impliqués dans la pathologie pourrait être envisagée en abordant le séquençage de clones supplémentaires. Ce séquençage s'effectuerait selon la

procédure des signatures DACS (Discriminative Analysis of Clone Signatures) permettant ainsi la production de données dans une logique du haut débit.

Les deux stratégies d'approche du transcriptome nous permettent d'obtenir des gènes candidats pour des études plus approfondies de l'interaction entre le champignon et la plante au niveau de la paroi cellulaire. L'action des candidats sélectionnés, comme par exemple les xylanases 02 et 15, pourra être étudiée plus en détails grâce à l'inactivation du gène correspondant. Elle pourra être effectuée selon deux approches. La première consiste en une interruption du gène (Gomez-Gomez et al., 2002). L'autre approche est basée sur le principe des siRNA. Dans les champignons filamenteux le mécanisme de « silencing » est appelé «quelling » (Catalanotto et al., 2004). Il est possible d'imaginer l'intégration de transgènes exprimant constitutivement ou conditionnellement le complément de l'ARNm d'un gène candidat. Ces approches sont à suivre avec la plus grande prudence de part les phénomènes de complémentarité d'activité que l'on pourrait attendre des familles enzymatiques (Gomez-Gomez et al., 2002).

L'étude du protéome de *F. graminearum* sur le milieu M3-CW est en cours au laboratoire. Les résultats de l'analyse pourront être mis en parallèle des résultats obtenus par la banque suppressive soustractive et confirmer et compléter ces derniers.

#### ***V. 4. Modèle d'étude Humulus lupulus / Fusarium graminearum***

Le travail de cette thèse s'est majoritairement concentré sur l'un des partenaires du modèle *H. lupulus / F. graminearum* dans l'optique de mettre en évidence des gènes candidats à étudier pour décortiquer l'interaction des deux partenaires en se focalisant sur la dégradation de la paroi cellulaire de la plante.

Des banques d'EST du houblon ont été réalisées et séquencées au laboratoire. La collection d'EST de houblon créée au laboratoire contient la signature des principales PRP (pathogenesis related proteins) mais aussi de nombreuses enzymes des voies de biosynthèse spécifiques de cette plante.

L'étude plus poussée de l'interaction *H. lupulus / F. graminearum* est envisagée par une approche d'analyse de transcriptome par microarrays. Une puce sera développée contenant des séquences correspondant aux gènes candidats des deux organismes. Il sera ainsi possible

de suivre l'évolution en parallèle des gènes potentiellement impliqués dans la pathologie à différentes étapes de l'infection et du dialogue hôte/pathogène.

Des travaux ont également été initiés en collaboration pour l'étude de l'action phytopathogène de la souche de *Fusarium graminearum* caractérisée au laboratoire sur d'autres plantes, en particulier des céréales.

## **Chapitre VI – Matériels et méthodes**

Toutes les méthodes utilisées ne sont pas spécifiées dans ce chapitre. Les méthodes spécifiques sont détaillées dans les différents articles.

## ***VI. 1. Matériel Biologique***

### ***VI. 1. 1. Souche de *F. graminearum****

#### ***VI. 1. 1. 1. Description de la souche***

La plantation de houblon de la variété Strisselspalt dans la parcelle Burgklamm sur le ban de la commune de Gingsheim (Bas-Rhin, France) présente régulièrement des épisodes de dépérissement dont celui de septembre 2000 fut foudroyant. D'une liane, de l'un des plants malades de cette houblonnière, qui présentait une blessure, la souche de *F. graminearum* (F9) étudiée au laboratoire a été isolée.

#### ***VI. 1. 1. 2. Conditions de culture***

*F. graminearum* est maintenu sur milieu PDA (Annexe 1) à 25°C. La production de spores est obtenue après culture sur milieu SNA (Annexe 1) à 25°C.

Les cultures en milieu liquide sont réalisées dans 10mL de milieu de culture dans des tubes Falcon de 50mL. L'induction des gènes des xylanases est réalisée par la culture sur milieu minimum M3 (Annexe 1) additionné de différentes sources de carbone à 10g L<sup>-1</sup>. Les différentes sources de carbone proviennent de Sigma-Aldrich. Les parois de houblon ont été préparées en broyant des lianes, des feuilles et des cônes de houblon de la variété Strisselspalt congelés dans l'azote liquide. La poudre obtenue est incubée pendant une heure sous agitation forte à 21°C dans un tampon phosphate (1M, pH 7). Les parois ont ensuite été filtrées sur du papier Whatman 3MM et rincées deux fois avec du tampon phosphate. Les parois sont lavées successivement avec 4 volumes de différents solvants : 2 fois avec de l'eau, deux fois avec du méthanol, deux fois avec du chloroforme/méthanol (1/1) puis avec du méthanol jusqu'à l'absence de pigments dans la phase liquide. Deux lavages finaux sont réalisés avec de l'acétone avant un séchage sous vide. Les parois ainsi préparées sont conservées à 4°C.

### **VI. 1. 1. 3. Conservation des spores**

Les spores de *F. graminearum* sont induites sur milieu SNA et sont récoltées par lavage de la boîte avec de l'eau stérile. Les spores sont conservées en suspension dans l'eau congelée à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **VI. 1. 2. Souche bactérienne**

La souche d'*Escherichia coli* TOP10 (F- *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74 recA1 araD139  $\Delta$ (*ara leu*) 7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*) est utilisée au laboratoire pour les travaux de clonage qui mettent en jeu des vecteurs plasmidiques.*

## **VI. 2. Techniques de biologie moléculaire**

### **VI. 2. 1. Extraction d'acides nucléiques**

#### **VI. 2. 1. 1. Extraction d'ADN plasmidique**

Les plasmides sont préparés grâce au kit NucleoSpin® Plasmide de Macherey-Nagel (Allemagne) selon le protocole du fournisseur. Les solutions de plasmides sont conservées congelées à  $-20^{\circ}\text{C}$ . La quantité est estimée par spectrométrie (mesure d'absorbance à 260nm).

#### **VI. 2. 1. 2. Extraction d'ARN total**

Le champignon est cultivé dans un milieu de culture liquide et récolté en phase de croissance. Le champignon est séché rapidement sur du papier Whatman 3MM et congelé aussitôt dans l'azote liquide. L'échantillon est broyé dans un mortier avec de l'azote liquide et l'ARN est isolé grâce au kit Qiagen RNeasy® de Qiagen (Germany). La qualité de l'ARN est visualisée sur un gel d'agarose. La quantité est estimée par spectrométrie (mesure d'absorbance à 260nm).

L'ARN extrait est débarrassé de l'ADN résiduel par un traitement à la DNase RNase free, Turbo DNA-free™ d'Ambion (USA).

#### **VI. 2. 1. 3. Extraction d'ARN polyA+**

La méthode de préparation des ARN poly A+ est décrite dans l'article 3.

## VI. 2. 2. Southern blot

### VI. 2. 2. 1. Préparation de la membrane

5 $\mu$ g d'ADN génomique du champignon sont digérés dans un volume réactionnel de 200 $\mu$ L pendant 2H. La digestion est précipitée avec un volume d'isopropanol et le culot est repris dans 15 $\mu$ L d'eau. L'échantillon est déposé sur un gel d'agarose à 0,8% (w/v) et soumis à une migration électrophorétique. Le gel est coloré à l'aide de bromure d'éthidium et photographié sous UV (312 nm). L'ADN contenu dans le gel est transféré sur une membrane de nylon chargée positivement (Roche Diagnostics, Meylan, France) par transfert ascendant.

### VI. 2. 2. 2. Préparation de la sonde

Les sondes sont marquées de manière non radioactive à la digoxigénine (DIG, Roche Diagnostics) (Fig. 43). L'incorporation est effectuée de manière aléatoire lors de la synthèse par PCR. Le mélange réactionnel contient les différents nucléotides dans les concentrations suivantes : 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, 0,18 mM dTTP et 0,02 mM DIG-dUTP (Fig. 43). La synthèse est vérifiée et quantifiée sur gel. Les sondes sont utilisées à une concentration finale de 25,0 ng mL<sup>-1</sup> de tampon d'hybridation.

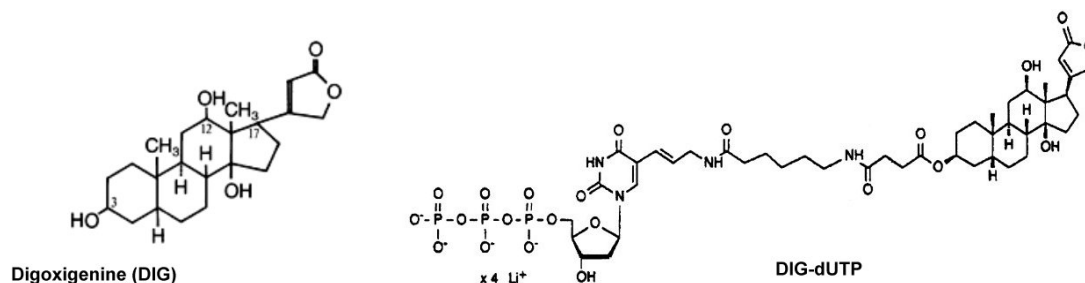


Fig. 43. Structure chimique de la Digoxigénine et de DIG-dUTP.

### VI. 2. 2. 3. Hybridation et détection

L'hybridation et la détection sont réalisées selon le protocole DIG high Prime DNA labeling and detection strater kit II de Roche Diagnostics. L'hybridation est réalisée dans le tampon d'hybridation standard à une température de 65°C pendant la nuit. Les étapes de détection utilisent un anticorps couplé à la phosphatase alcaline dirigé contre la digoxigénine et du CSPD<sup>®</sup> comme substrat. Les émissions de bioluminescence se détectent avec des films

Kodak X-OMAT™ (SIGMA) après un temps d'incubation adapté à chaque cas (de quelques minutes à 2 h).

### ***VI. 2. 3. Rétrotranscription et synthèse d'ADN complémentaire***

La rétrotranscription puis la synthèse de l'ADNc ont été réalisées avec le kit de Clontech à partir de 500ng d'ARN total (Fig 44). Le principe de la méthode réside dans l'activité guanine terminale transférase de la MMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase) qui permet à un primer secondaire de s'apparier au premier brin synthétisé provoquant un « switch » ou glissement de matrice de la MMLV-RT. On obtient ainsi un premier brin bordé de séquences contenant des adaptateurs utilisables comme cible pour des amorces de PCR.

Une adaptation a été apportée au protocole : la synthèse du premier brin d'ADN a été réalisée à 48°C pendant une demi-heure puis la température a été abaissée à 42°C. L'amplification du deuxième brin a été réalisée sur 17 cycles pour rester dans le domaine linéaire d'amplification.

### ***VI. 2. 4. Amplification d'acides nucléiques***

#### ***VI. 2. 4. 1. PCR***

L'amplification par PCR est réalisée avec la Taq polymérase de MBI fermentas (Lithuanie). Le volume réactionnel est de 50µL, la concentration de MgCl<sub>2</sub> est de 1,5mM, la concentration de primer est de 1µM et la concentration de dNTP de 1µM. Les réactions de PCR ont été réalisées sur un iCycler de Biorad.

Le programme d'amplification suivant a été utilisé pour l'amplification des différentes xylanases : 95°C 5 min suivie de 35 cycles de 95°C 30 sec, 53°C 35 sec, 72°C 95 sec et conclu par une extension finale de 2 min à 72°C. La liste des amorces (primers) utilisées pour l'amplification des séquences codantes des xylanases prédites se trouve en Annexe 3.



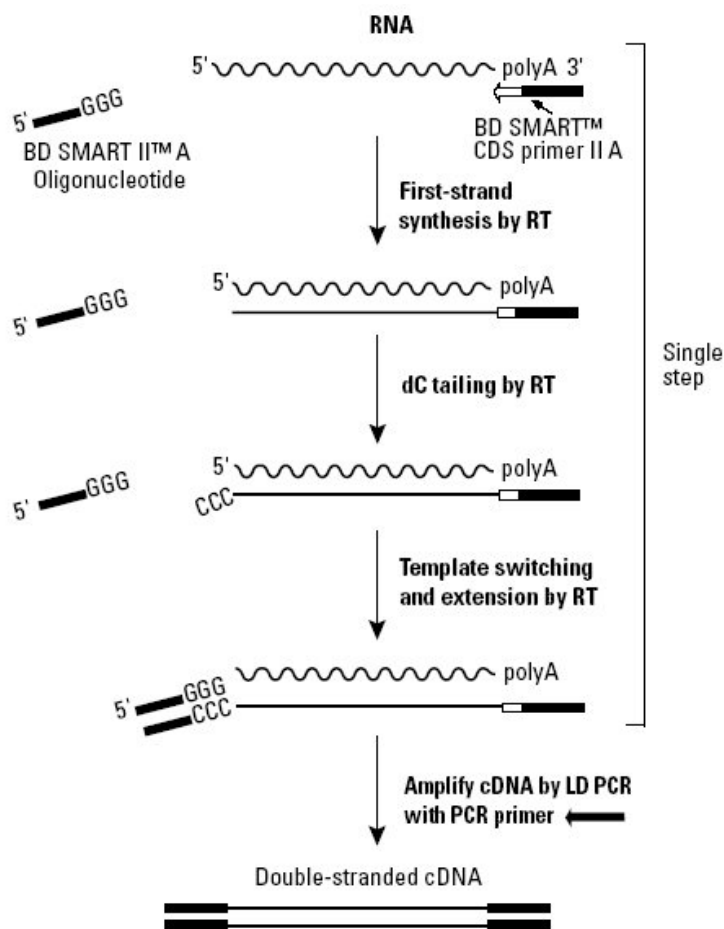


Fig. 44. Déroulement de la synthèse d'ADNc par la technique SMART™.

Source : Clontech.

#### VI. 2. 4. 2. Q-RT-PCR

10ng d'ADNc ont été mis en jeu pour la quantification. Elle a été réalisée sur un thermocycleur Applied 7000 SDS de Applied Bioscience (Royaume-Uni) dans un volume réactionnel de 25µL avec le mix SYBR Green® PCR Master Mix (Applied Biosystem, Royaume-Uni). Les primers ont été utilisés à une concentration finale de 250nM. Toutes les mesures ont été réalisées trois fois. La spécificité d'amplification a été contrôlée par évaluation des courbes de fusion. La liste des primers utilisés pour la quantification se trouve en Annexe 3.

L'analyse des résultats a été effectuée à l'aide du logiciel fourni avec l'appareil. La valeur seuil pour la détermination des Ct a été réglée à 0,1. A cette valeur, ce seuil était dans la zone d'amplification linéaire quelle que soit la concentration de matrice présente dans les différents échantillons.

## **VI. 2. 5. Clonage**

### **VI. 2. 5. 1. Clonage rapide**

Le clonage des produits de PCR a été réalisé avec le kit TOPO TA Cloning kit (Invitrogen, Pays bas).

La méthode nécessite l'utilisation d'un vecteur pré-activé. Deux topoisomérases de type I sont liées à chaque extrémité du vecteur. Les extrémités T cohésives permettent l'insertion du produit de PCR présentant les extrémités 3' A cohésives obtenues lors de la réaction de PCR grâce à l'activité adénosyl terminale transférase des Taq polymérases (Fig. 45).

### **VI. 2. 5. 2. Clonage des EST**

Le nombre de clones obtenus avec le kit TOPO TA Cloning kit se situe entre 100 et 300. Ce système est incompatible avec l'obtention d'un grand nombre de clone dans le cas de banque d'EST.

Une méthode basée sur la présence d'extrémité T cohésives a été développée au laboratoire. Elle a été employée pour préparer un vecteur de clonage pour la réalisation de la banque suppressive soustractive. 3µg du vecteur pUC19 ont été digérés à l'aide de 100U de l'enzyme de restriction *HincII* dans un volume de 100µL à 37°C pendant 2h30. Le vecteur digéré a été purifié à l'aide du kit GeneClean® Spin kit de Bio101 (Qbiogen, France). Une extension d'une base a été réalisée en présence des 3µg de vecteur digéré, de 500pmol de ddTTP et 2U de TDT (Terminal Desoxynucleotide Transferase) dans un volume réactionnel de 20µL à 37°C pendant 1h. Le produit d'extension a subi une purification à l'aide du kit GeneClean® Spin kit de Bio101. L'efficacité de l'extension est testée par ligation du vecteur sur lui même. 50ng de vecteur sont utilisés par ligation.

## **VI. 2. 6. Mise en évidence de protéines**

Les techniques SDS-PAGE et Western blot nous ont permis de mettre en évidence la cellobiohydrolase-C ; elles sont décrites dans l'article 1.

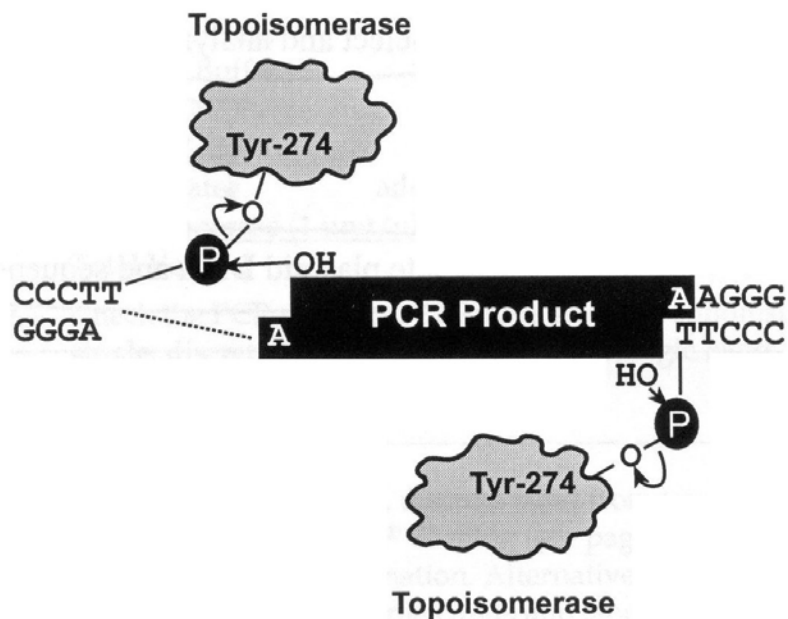


Fig. 45. Principe du vecteur activité du kit TOPO TA cloning.

Source : Invitrogen

### VI. 3. Bio-informatique

#### VI. 3. 1. Analyses de séquences

Les ORF ont été prédites avec le programme GETORF d'EMBOSS (v2.7.1) en incluant l'option `-minsize 300` qui précise au programme que nous ne voulons que les ORF d'une taille en nucléotides supérieure à 300 pb.

Les recherches d'homologies sont effectuées en comparant les séquences aux bases de données de séquences par le programme BLAST (Altschul et al., 1997).

Les recherches d'homologie des ORF ont été effectuées avec la version 2.2.6 du programme BLAST contre la version d'août 2003 de la banque de données de protéines (GenBank CDS translations + PDB + SwissProt + PIR + PRF). Le paramètre d'expectation a été placé à  $10^{-3}$ .

#### VI. 3. 2. Analyses phylogénétiques

Les analyses phylogénétiques ont été effectuées à l'aide du logiciel PAUPv4.0b10 selon la démarche décrite dans l'article 2.

## **Références bibliographiques**

- Abid-Essefi S., Ouanes Z., Hassen W., Baudrimont I., Creppy E., Bacha H., Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein syntheses and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone, *Toxicology in Vitro*, Volume 18, Issue 4, 2004, Pages 467-474.
- Achatz G., Oberkofler H., Lechenauer E., Simon B., Unger A., Kandler D., Ebner C., Prillinger H., Kraft D., Breitenbach M., Molecular cloning of major and minor allergens of *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum*, *Molecular Immunology*, Volume 32, Issue 3, 1995, Pages 213-227.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J., Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research*, Volume 25, Issue 17, 1997, Pages 3389-3402.
- Asran M.R., Buchenauer H., Pathogenicity of *Fusarium graminearum* isolates on maize (*Zea mays* L.) cultivars and relation with deoxynivalenol and ergosterol contents, *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, Volume 110, Issue 3, 2003, Pages 209-219.
- Beg Q.K., Kapoor M., Mahajan L., Hoondal G.S., Microbial xylanases and their industrial applications: a review, *Applied and Microbiological Biotechnology*. Volume 56, 2001, Pages 326–338.
- Beyer M., Roding S., Ludewig A., Verreet J.-A., Germination and survival of *Fusarium graminearum* macroconidia as affected by environmental factors, *Journal of Phytopathology*, Volume 152, Issue 2, 2004, Pages 92-97.
- Biely P., Diversity of microbial endo-b-1,4-xylanases In: S.D. Mansfield and J.N. Saddler, Editors, *Applications of Enzymes to Lignocellulosics*, American chemical Society, Washington 2003, Pages 361–380.
- Biely P., Markovic O., Mislovicova D., Sensitive detection of endo-1,4-beta-glucanases and endo-1,4-beta-xylanases in gels, *Analytical Biochemistry*, Volume 144, 1985, Pages 147–151.
- Bienapfl MS thesis, Hop Cone Tip Blight: A New Disease in the Pacific Northwest, Dept. of Botany & Plant Pathology, Oregon State University, 24 September 2003.
- Boguski M.S., Lowe T.M.J., Tolstoshev C.M., dbEST - Database for 'expressed sequence tags' [2], *Nature Genetics*, Volume 4, Issue 4, 1993, Pages 332-333.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W., Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, *American Journal of Human Genetics*, Volume 32, Issue 3, 1980, Pages 314-331.

- Bottalico A., *Fusarium* diseases of cereals: Species complex and related mycotoxin profiles, in Europe, *Journal of Plant Pathology*, Volume 80, Issue 2, 1998, Pages 85-103.
- Carnegie A.J., Ades P.K., Ford R., The use of RAPD-PCR analysis for the differentiation of *Mycosphaerella* species from Eucalyptus in Australia, *Mycological Research*, Volume 105, Issue 11, 2001, Pages 1313-1320.
- Catalanotto C., Pallotta M., Vayssie L., Macino G., Cogoni C., ReFalo P., Sachs M.S., Sachs M.S., Cogoni C., Redundancy of the Two Dicer Genes in Transgene-Induced Posttranscriptional Gene Silencing in *Neurospora crassa*, *Molecular and Cellular Biology*, Volume 24, Issue 6, 2004, Pages 2536-2545.
- Collins T., Gerday C., Feller G., Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases, *FEMS Microbiology Reviews*, In Press, Corrected Proof, Available online 6 August 2004.
- Davies K. A., De Lorono I., Foster S. J., Li D., Johnstone K., Ashby A. M., Evidence for a role of cutinase in pathogenicity of *Pyrenopeziza brassicae* on brassicas, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Volume 57, Issue 2, 2000, Pages 63-75.
- Desjardins A.E., *Gibberella* from A (venaceae) to Z (eae), *Annual Review of Phytopathology*, Volume 41, 2003, Pages 177-198.
- Di Pietro A., Huertas-Gonzalez M.D., Gutierrez-Corona J.F., Martinez-Cadena G., Meglecz E., Roncero M.I.G., Molecular characterization of a subtilase from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Volume 14, Issue 5, 2001, Pages 653-662
- Diatchenko L., Lau Y.-F.C., Campbell A.P., Chenchik A., Moqadam F., Huang B., Lukyanov S., Lukyanov K., Gurskaya N., Sverdlov E.D., Siebert P.D., Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Volume 93, Issue 12, 1996, Pages 6025-6030.
- Dujon B., Sherman D., Fischer G., Durrens P., Casaregola S., Lafontaine I., Montigny J., Marck C., Neuveglise C., Talla E., Goffard N., Frangeul L., Aigle M., Anthouard V., Babour A., Barbe V., Barnay S., Blanchin S., Beckerich J.-M., Beyne E., Bleykasten C., Boisrame A., Boyer J., Cattolico L., Confanioleri F., Daruvar A., Despons L., Fabre E., Fairhead C., Ferry-Dumazet H., Groppi A., Hantraye F., Hennequin C., Jauniaux N., Joyet P., Kachouri R., Kerrest A., Koszul R., Lemaire M., Lesur I., Ma L., Muller H., Nicaud J.-M., Nikolski M., Oztas S., Ozier-Kalogeropoulos O., Pellenz S., Potier S., Richard G.-F., Straub M.-L., Suleau A., Swennen D., Tekaiia F., Wesolowski-Louvel M., Westhof E., Wirth B., Zeniou-Meyer M., Zivanovic I., Bolotin-Fukuhara M., Thierry A., Boucher C., Caudron B., Scarpelli C., Gaillardin C.,

- Weissebach J., Wincker P., Souciet J.-L., Genome evolution in yeasts, *Nature*, Volume 430, Issue 6995, 2004, Pages 35-44.
- Edel V., Steinberg C., Gautheron N., Alabouvette C., Evaluation of restriction analysis of polymerase chain reaction (PCR)-amplified ribosomal DNA for the identification of *Fusarium* species, *Mycological Research*, Volume 101, Issue 2, 1997, Pages 179-187.
- Etienne M., Dourmad J.Y., Effects of zearalenone or glucosinolates in the diet on reproduction in sows: A review, *Livestock Production Science*, Volume 40, 1994, Pages 99-113.
- Freeman W.M., Walker S.J., Vrana K.E., Quantitative RT-PCR: Pitfalls and potential, *BioTechniques*, Volume 26, Issue 1, 1999, Pages 112-125.
- Garcia-Maceira F.I., Di Pietro A., Roncero M.I.G., Cloning and disruption of *pgx4* encoding an in planta expressed exopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum*, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Volume 13, Issue 4, 2000, Pages 359-365.
- Garcia-Maceira F.I., Di Pietro A., Huertas-Gonzalez M.D., Ruiz-Roldan M.C., Roncero M.I., Molecular characterization of an endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* expressed during early stages of infection., *Applied and environmental microbiology*, Volume 67, Issue 5, 2001, Pages 2191-2196.
- Geiser D.M., Jimenez-Gasco M.D.M., Kang S., Makalowska I., Veeraraghavan N., Ward T.J., Zhang N., Kuldau G.A., O'Donnell K., FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*, *European Journal of Plant Pathology*, Volume 110, Issue 5-6, 2004, Pages 473-479.
- Gomez-Gomez E., Roncero M.I.G., Di Pietro A., Hera C., Molecular characterization of a novel endo- $\beta$ -1,4-xylanase gene from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*, *Current Genetics*, Volume 40, Issue 4, 2001, Pages 268-275.
- Gomez-Gomez E., Ruiz-Roldan M.C., Di Pietro A., Roncero M.I.G., Hera C., Role in pathogenesis of two endo- $\beta$ -1,4-xylanase genes from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*, *Fungal Genetics and Biology*, Volume 35, Issue 3, 2002, Pages 213-222.
- Guarro J., Gene J., Stchigel A. M., Developments in Fungal Taxonomy, *Clinical Microbiology Reviews*, Volume 12, Issue 3, 1999, Pages 454-500.
- Hadrys H., Balick M., Schierwater B., Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology, *Molecular ecology*, Volume 1, Issue 1, 1992, Pages 55-63.
- Harris L.J., Desjardins A.E., Plattner R.D., Nicholson P., Butler G., Young J.C., Weston G., Proctor R.H., Hohn T.M., Possible role of trichothecene mycotoxins in virulence of *Fusarium graminearum* on maize, *Plant Disease*, Volume 83, Issue 10, 1999, Pages 954-960.

- Helbling A., Fungi as allergens [Pilze als allergene], *Allergologie*, Volume 26, Issue 11, 2003, Pages 482-489.
- Hoff M., Ballmer-Weber B. K., Niggemann B., Cistero-Bahima A., San Miguel-Moncín M., Conti A., Hausteiner D., Vieths S., Molecular cloning and immunological characterisation of potential allergens from the mould *Fusarium culmorum*, *Molecular Immunology*, Volume 39, Issue 15, May 2003, Pages 965-975.
- Hsu M.-C., Chen K.-W., Lo H.-J., Chen Y.-C., Liao M.-H., Lin Y.-H., Li S.-Y., Species identification of medically important fungi by use of real-time LightCycler PCR, *Journal of Medical Microbiology*, Volume 52, Issue 12, 2003, Pages 1071-1076.
- Huertas-Gonzalez M.D., Ruiz-Roldan M.C., Maceira F.I., Roncero M.I.G., Di Pietro A., Cloning and characterization of p11 encoding an in planta-secreted pectate lyase of *Fusarium oxysporum*, *Current Genetics*, Volume 35, Issue 1, 1999, Pages 36-40.
- Joshi M.D., Sidhu G., Pot I., Brayer G.D., Withers S.G., McIntosh L.P., Hydrogen bonding and catalysis: A novel explanation for how a single amino acid substitution can change the pH optimum of a glycosidase, *Journal of Molecular Biology*, Volume 299, Issue 1, 2000, Pages 255-279.
- Kamiya A., Kikuchi A., Tomita Y., Kanbe T., PCR and PCR-RFLP techniques targeting the DNA topoisomerase II gene for rapid clinical diagnosis of the etiologic agent of dermatophytosis, *Journal of Dermatological Science*, Volume 34, Issue 1, 2004, Pages 35-48.
- Kruger W.M., Pritsch C., Chao S., Muehlbauer G.J., Functional and comparative bioinformatic analysis of expressed genes from wheat spikes infected with *Fusarium graminearum*, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Volume 15, Issue 5, 2002, Pages 445-455.
- Lee J., Lee T., Lee Y.-W., Yun S.-H., Turgeon B.G., Shifting fungal reproductive mode by manipulation of mating type genes: Obligatory heterothallism of *Gibberella zeae*, *Molecular Microbiology*, Volume 50, Issue 1, 2003, Pages 145-152.
- Lepoivre P., *Phytopathologie : Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte*, De boeck Université, Les Presses Agronomiques de Gembloux, 2003.
- Li S., Marquardt R.R., Abramson D., Immunochemical detection of molds: A review, *Journal of Food Protection*, Volume 63, Issue 2, 2000, Pages 281-291.
- Lutz M.P., Feichtinger G., Defago G., Duffy B., Mycotoxigenic *Fusarium* and deoxynivalenol production repress chitinase gene expression in the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* P1, *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 69, Issue 6, 2003, Pages 3077-3084.



- Lynch D.R., Kawchuk L.M., Chen Q., Kokko M., Resistance to *Fusarium sambucinum* in Wild and Cultivated Solanum Species, *American Journal of Potato Research*, Volume 80, Issue 6, 2003, Pages 353-358.
- Lynd L.R., Weimer P.J., Van Zyl W.H., Pretorius I.S., Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Volume 66, Issue 3, 2002, Pages 506-577.
- Mar Jimenez-Gasco M.D., Jimenez-Diaz R.M., Development of a specific polymerase chain reaction-based assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and its pathogenic races 0, 1A, 5, and 6, *Phytopathology*, Volume 93, Issue 2, 2003, Pages 200-209.
- Markell S.G., Franc L.J., *Fusarium* head blight inoculum: Species prevalence and *Gibberella zeae* spore type, *Plant Disease*, Volume 87, Issue 7, 2003, Pages 814-820.
- Milligan S.R., Kalita J.C., Pocock V., Van De Kauter V., Stevens J.F., Deinzer M.L., Rong H., De Keukeleire D., The endocrine activities of 8-prenylnaringenin and related hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Volume 85, Issue 12, 2000, Pages 4912-4915.
- Munkvold G.P., Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears, *European Journal of Plant Pathology*, Volume 109, Issue 7, 2003, Pages 705-713.
- Neve R.A., Hops, Chapman and Hall, New York, 1991.
- O'Donnell K., Kistler H.C., Tacke B.K., Casper H.H., Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Volume 97, Issue 14, 2000, Pages 7905-7910.
- Olivieri F.P., Maldonado S., Tonon C.V., Casalongue C.A., Hydrolytic activities of *Fusarium solani* and *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* associated with the infection process of potato tubers, *Journal of Phytopathology*, Volume 152, Issue 6, 2004, Pages 337-344.
- Ouyang Y.L., Li S., Pestka J.J., Effects of vomitoxin (Deoxynivalenol) on transcription factor NF- $\kappa$ B/Rel binding activity in murine EL-4 thymoma and primary CD4<sup>+</sup> T cells, *Toxicology and Applied Pharmacology*, Volume 140, Issue 2, 1996, Pages 328-336.
- Park P.J., Cao Y.A., Lee S.Y., Kim J.-W., Chang M.S., Hart R., Choi S., Current issues for DNA microarrays: Platform comparison, double linear amplification, and universal RNA reference, *Journal of Biotechnology*, Volume 112, Issue 3, 2004, Pages 225-245.
- Paulitz T.C., Diurnal release of ascospores by *Gibberella zeae* in inoculated wheat plots, *Plant Disease*, Volume 80, Issue 6, 1996, Pages 674-678.

- Phalip V., Hatsch D., Jeltsch J.-M., Application of a yeast method for DNA extraction associated with database interrogations for the characterization of various filamentous fungi from diseased hop, *Biotechnology Letters*, Volume 26, Issue 5, 2004, Pages 409-413.
- Rotter B.A., Prelusky D.B., Pestka J.J., Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin), *Journal of Toxicology and Environmental Health*, Volume 48, Issue 1, 1996, Pages 1-34.
- Stack R.W., A comparison of the inoculum potential of ascospores and conidia of *Gibberella zeae*, *Canadian Journal of Plant Pathology*, Volume 11, 1989, Pages 137-142.
- Thangavelu R., Palaniswami A., Velazhahan R., Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing fusarium wilt of banana, *Agriculture, Ecosystems and Environment*, Volume 103, Issue 1, 2004, Pages 259-263.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J., CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Research*, Volume 22, Issue 22, 1994, Pages 4673-4680.
- Torronen A., Rouvinen J., Structural and functional properties of low molecular weight endo-1,4-  $\beta$  - xylanases, *Journal of Biotechnology*, Volume 57, Issue 1-3, 1997, Pages 137-149.
- Trail F., Xu H., Loranger R., Gadoury D., Physiological and environmental aspects of ascospore discharge in *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*), *Mycologia*, Volume 94, Issue 2, 2002, Pages 181-189.
- Velluti A., Marin S., Bettucci L., Ramos A.J., Sanchis V., The effect of fungal competition on colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* and on fumonisin B1 and zearalenone formation, *International Journal of Food Microbiology*, Volume 59, Issue 1-2, 2000, Pages 59-66.
- Wanjiru W.M., Zhensheng K., Buchenauer H., Importance of cell wall degrading enzymes produced by *Fusarium graminearum* during infection of wheat heads, *European Journal of Plant Pathology*, Volume 108, Issue 8, 2002, Pages 803-810.
- Yun S.-H., Arie T., Kaneko I., Yoder O.C., Turgeon B.G., Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic, and asexual *gibberella/fusarium* species, *Fungal Genetics and Biology*, Volume 31, Issue 1, 2000, Pages 7-20.

## **Annexes**

### ***Annexe 1 – Milieux de culture***

#### ***Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)***

Composants pour 1L : 200g de pomme de terre, 20g d'agar, 15g de dextrose.

Les pommes de terres doivent être découpées en cubes de 12mm en gardant la peau et rincées sous l'eau. Elles sont cuites pendant une heure dans un litre d'eau. Elles sont ensuite mélangées avec l'agar et le dextrose dans un blender. Le milieu est ensuite autoclavé pendant 20 min à 121°C.

#### ***Milieu SNA (Synthetischer Nährstoff Agar)***

Composants pour 1L : 1g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1g de  $\text{KNO}_3$ , 0,5g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5g de  $\text{KCl}$ , 0,2g de glucose, 0,2g de saccharose, 15g d'agar.

Les composants sont mélangés puis le milieu est autoclavé pendant 20 min à 121°C.

#### ***Milieu M3***

Composants : 2g de  $\text{NaCO}_3$ , 0,1g de  $\text{KCl}$ , 0,1g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,4mg de  $\text{CuSO}_4$ , 0,8mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,8mg de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 8mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,04mg de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , 0,8g de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1,4g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et 0,68g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .

Les composants sont mélangés ainsi que la source de carbone à  $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Le milieu est ensuite autoclavé pendant 20 min à 121°C.





Biosynthèse de l'ARN INHIBITION DE L'ARN-POLYMÉRISE I amines, amides • phénylamides ou anilides bénalaxyl (1981), furalaxyl (1977), métalaxyl (1977), ofurace (1992), oxadixyl (1983) méfénoxam (1998)	S *	P/C p	Spécifique des Oomycètes Spécifique des Oomycètes
Biosynthèse de l'ARN INHIBITION DE L'ADÉNOSINE-DÉSAMINASE I hétérocycles azotés • (hydroxy) pyrimidines bupirimate (1975), éthyrimol (1974)	S	P	Spécifique des oïdiums
<b>FONGICIDES DONT LE MODE D'ACTION N'EST PAS ÉLUCIDÉ OU MULTIPLE</b>			
ALTÉRATION DES MEMBRANES CELLULAIRES, ACTION SUR LA CROISSANCE MYCÉLIENNE, LA PRODUCTION DE SPORANGES ET GERMINATION DES OOSPORES DES PHYCOMYCÈTES carbamates propamocarbe HCl (1978)	S	P	Spécifique des Oomycètes
ALTÉRATION DES GLUCIDES ? INHIBITION DE LA GERMINATION DES SPORES ET DE L'ÉLONGATION DES HYPHES MYCÉLIENS dérivés du benzène quintozène ou PCNB (1930) dicarboximides ou imides cycliques chlozolinate (1980), iprodione (1974), vinchlozoline (1975)	C C	P P/C	
dicarboximides ou imides cycliques (suite) procymidone (1976) hétérocycles azotés • (phényl) pyrroles fenpiclonil (1988), fludioxonil (1993) organo-phosphorés • phosphates tolclofos-méthyl (1982)	C/P C C	P/C P P	
INHIBITION DE LA BIOSYNTHÈSE DES ACIDES NUCLÉIQUES DES LIPIDES ET DES ACIDES AMINÉS MODIFICATION DE LA PERMÉABILITÉ CELLULAIRE ET STIMULATEURS DES DÉFENSES NATURELLES amines, amides • acétamides, cyanooximes cymoxanil (1976)  hétérocycles azotés • isoxazoles hyméxazol (1966)	P S	P/C P/C	Spécifique des Oomycètes : Péronosporales
MALFORMATION DES PAROIS CELLULAIRES hétérocycles azotés • morpholines diméthomorphe (1988)	S/P	P/C	Spécifique des Oomycètes
EFFET ANTIPHOSPHATE ET INDUCTEUR D'ÉLICITEURS, STIMULATEUR DES DÉFENSES NATURELLES organo-phosphorés • phosphonates fosétyl-Al (1977) BIOSYNTHÈSE DES MÉLANINES hétérocycles azotés • triazines triazoxide (1982) organo-phosphorés • phosphates pyrazophos (1969)  • phosphonates ampropylfos (?)	S C S ?	P P/C P/C ?	Spécifique de l'helminthosporiose  Spécifique des oïdiums et de l'helminthosporiose action sur le processus respiratoire et sur la synthèse des phospholipides Spécifique de l'helminthosporiose

## Annexes

INHIBITION DE L'ÉLONGATION DES TUBES GERMINATIFS ET DES HYPHES MYCÉLIENS hétérocycles azotés • anilinopyrimidines cyprodinil (1994) pyriméthanol (1992) amines, amides • (hydroxy) anilides fenhexamid (1997)	S P  C	P/C C  P	   Spécifique de Botrytis, Monilia, Sclerotinia
INHIBITION DE LA GERMINATION ET DE LA FORMATION DES APPRESSORIA hétérocycles azotés • (phénoxy) quinoléines quinoxyfène (1996)	  C/P	  P	  Spécifique des oïdiums
phénylurées pencycuron (1981)	C	P	Spécifique de Rhizoctonia solani



**Annexe 3 - Liste des amorces**

Les séquences sont décrites de leur extrémité 5' vers leur extrémité 3'

Amorces utilisées pour l'amplification des séquences codantes des xylanases :

```

>xy11-5
ATG CCT TCC AAG TCC ATC CTC G
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy11-3
CTA AAC CTG CAC AGC CTT ACC AG
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy12-5
ATG AAA GCC GCC GGC AAG AAG TAC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy12-3
CTA CGA GTT GTT AGT ATA GAT AAT AAC C
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy13-5
ATG TCT TGG TCT TTT CGC TC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy13-3
TTA CTA GAT GGC CAT CAA GAT CAC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy15-5
ATG CCC CGA CTT GAC GTC AAC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy15-3
TCA AGC AGA GTT ATC CAC TCT G
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy17-5
ATG GTC AAA GCA AAG TCT TGG G
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy17-3
TTA CTT AAA CTG CCA CCA ATT GAC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy19-5
ATG TGC CTC TGT GCA TCG TCA C
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy19-3
CTA CCT ACA AGT TAC TTT CTT C
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy110-5
ATG CGT TTT TTC TCC ATC CCT AG
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy110-3
TTC TCA TCA TGG TAA GGG CCT AGG
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy113-5
ATG AAT CGG GCG TCT TCA CAA C
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy113-3
CTA TTC TAT CCA TTT GTT CTG CC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy114-5
ATG ATG AGT GTC CTC GCT CTC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy114-3
TTA TTT GCC ATA CTT TGC AAC AAC C
... .. |.. ... ..|. ... ..|

```

```
>xy115-5
ATG GTC TCC TTC ACC TAC CTT CTC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy115-3
TTA TCC AGA GAC AGT CAT GGT AG
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy116-5
ATG CGA ACC TCT ACT CTT TTG ACG
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy116-3
CTA GCA GGT CTC AGC AAA GCT GTC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy117-5
ATG CAC AAA TCT GCC CTC ATC GG
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy117-3
TCA TCG TCG CCA TCG TAG ACG
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy118-5
ATG CTC CTA CAT TTC AAG TCT CTG
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy118-3
CTA TGC ACC AAA AGC ACT CAT AAG C
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy119-5
ATG GTC TCG TTC AAA TCC CTT CTC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy119-3
TTA ACT AGT CTG GAC ATA GAT AGA AG
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy121-5
ATG CAC TTC CTA GGA CTC GTC G
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy121-3
TTA GTT GAG GGC GTT GCT CAC AG
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy124-5
GAA GTT CTC TTC CCT CCT CTT TAC C
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy124-3
TTA ACG GAG AGC GTT GAC AAC AGC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy125-5
CAT CAT GGT TTC CTG GAA TAA CAT C
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy125-3
CTA TTT GGA AGG CTC CGC AAA CTG
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy126-5
ATG AAG CTC CTC AAC AAC GAC ATC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy126-3
TTA CTT CTT GAG GGT CAA CAG ACC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy127-5
ATG CTT CTC ACG TCT CTC CTC TTC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy127-3
CGG TTT AAG CCT TAA CAA AAA CTC C
... .. |.. ... ..|. ... ..|
```

```

>xy128-5
ATG ACG GGC TTC AAG AAG AGC G
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy128-3
CTT ATC GGT TAT CAA ATC TCT CAA CC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy129-5
ATG GCA TCA TTC AAG ACA TCC TCC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy129-3
TCA AAG ACA CTG CCA GTA GTA CTC G
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy130-5
CAT GCG TTT CTC TTC CAC TA TTAG
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy130-3
TCA GAG ACA CTG CGA GTA CCA C
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy132-5
ATG GCG CCT CTC ATC ACC AAC G
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy132-3
CTC TAG TCG GCT GTA GTG GTA ATG
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy133-5
ATG CCT CAA GTC AGG AAC CCA ATT C
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy133-3
TCA TAC CTG TCC GAA TCA TCA TGA AC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy134-5
ATG AAG TCC AAG TTG TTA TTC CCA CTC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy134-3
TCA AGG CTT CTT TGT CAA GAT CTT TCC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy135-5
ATG TCG CCT TCT AAC CCC ATT ATC C
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy135-3
ATC CAT TTA CTC CAC ATT GAA ATC GG
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy136-5
CAT GCT TTC ACG CTA TAT CCT CC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy136-3
CTA AGG TGC CGC CTG GGC TG
... .. |.. ... ..|. ... ..|

```

## Liste des amorces utilisées en PCR quantitative :

```
>betatubQ-5
TGT TGA TCT CCA AGA TCC GTG AGG
... .. |.. .. .|. ... .. |
>betatubQ-3
GGT AGT TCA GGT CGC CGT AAG AGG
... .. |.. .. .|. ... .. |
>cbhQ-5
GAC TCT TGC GGT GGA ACC TAC TCC
... .. |.. .. .|. ... .. |
>cbhQ-3
TTG GAC TCA GAG TTG GCA ATG ACC
... .. |.. .. .|. ... .. |
>xyl101Q-5
GCC GAC ATC GAG GTC CTC ACC
... .. |.. .. .|. ... .. |
>xyl101Q-3
GCC AGA GCT CCT TGT CGT TGA CC
... .. |.. .. .|. ... .. |
>xyl102Q-5
ATG TCG ACG TTG CCT ACA CTG AGC
... .. |.. .. .|. ... .. |
>xyl102Q-3
GAC GGC TTC TTG TTG AAG TTG TCG
... .. |.. .. .|. ... .. |
>xyl103Q-5
CTT CAG ACA CGT TCC TCA CCA TGC
... .. |.. .. .|. ... .. |
>xyl103Q-3
AGG ATC TCA ATG TCG GCT TCT TGC
... .. |.. .. .|. ... .. |
>xyl105Q-5
TCG AAC AAG ATA CTC TTC CAG GAG ACG
... .. |.. .. .|. ... .. |
>xyl105Q-3
CTA TTG CTC CAC CTT CGT CCT TCG
... .. |.. .. .|. ... .. |
>X7-Q2-5
CAA GTC GCT TCT CGC AAT GG
... .. |.. .. .|. ... .. |
>X7-Q2-3
TCG TCG ATG AAG ACC GTT GG
... .. |.. .. .|. ... .. |
>xyl109Q-5
CCT ATA ACG GCA CTG GTG AGA TTG G
... .. |.. .. .|. ... .. |
>xyl109Q-3
TAG TTG TTG GCG CTG TAG GTG AGC
... .. |.. .. .|. ... .. |
>xyl113Q-5
CAA GTC GAA TTC GCC ATC CTT GG
... .. |.. .. .|. ... .. |
>xyl113Q-3
AGC GTT AAC CAC AGG CAC AAC AGG
... .. |.. .. .|. ... .. |
>xyl114Q-5
TGA TGA GTG TCC TCG CTC TCT TGG
... .. |.. .. .|. ... .. |
```

```
>xyl114Q-3
GGT ACC GAC ATT ACT CGT CAA GAC TGG
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xyl115Q-5
GTC ACC TAC ACC AAC GGC AAC G
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xyl115Q-3
GGT TGT AGG TGC CGA AGT TCT CG
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xyl116Q-5
TCT TGC GGT AAC TGT AAG GAC AAT GG
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xyl116Q-3
TGG ACA GCT TAG TTG GCT CAC TGC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xyl117Q-5
ACA aCG GCT ACC TCA GCG ATT CC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xyl117Q-3
GCA GAG AAC TTG CCA GCA GAG ACC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>X18-Q2-5
TGC TCA GCG ACA CGT CAA GG
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>X18-Q2-3
GCG CGA TGT CTT GCT GTC C
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xyl119Q-5
CGA ACC ATC AAC TAC GGA GGT TCC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xyl119Q-3
GTC GAT CGA AGG CTG TTG GTA ACG
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xyl121Q-5
CAA CCT CGA TAT CGC CAA CTA CGC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xyl121Q-3
ATG TCA AGC TCG GTA ATG GCA ACC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>Xyl124-Q2-5
CCA GAT GAA GAA CGC CAT CG
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>Xyl124-Q2-3
AGG CAA TGC CAA CGA ACT CC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>X25-Q2-5
GAC CAA CCT GCA GCT CTC TCG
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>X25-Q2-3
TGT GAA CGC TGT CCG GTA AGG
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xyl126Q-5
CCG TCC AGG TCT ACT CTG TCA AGG
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xyl126Q-3
GAA GGT CTC GTC GTT GGA GGT ACG
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xyl127Q-5
GTC TCA TCA GCC ATG TCT GGA ACC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
```

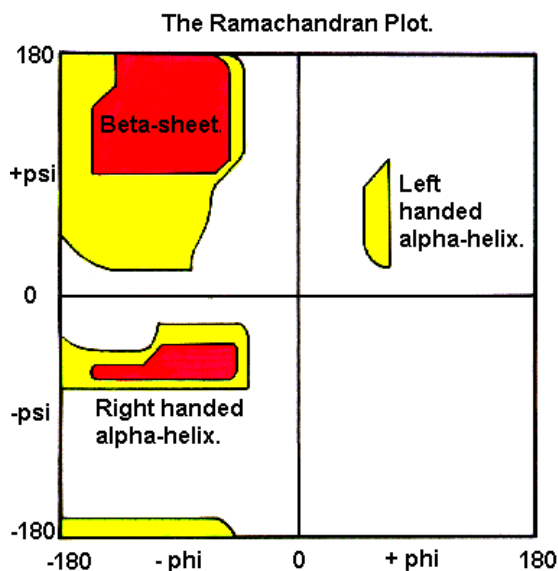
```

>xy127Q-3
TGT CAC AGG ATC ACT CCA GCT TGC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy128Q-5
TGA ACA GCG AAG TCA AGG AAC AGG
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy128Q-3
AGG AGA TCC AGC TCT AGG CAC AGC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>X30-Q2-5
CCA CCG GCC TCG ACA TCT AC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>X30-Q2-3
CCT CCA TAC CGT CGG TGA GC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy132Q-5
CAA CGA CAA TGG CGA TCA GTA CG
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy132Q-3
GCT TGT CAC CGA CAG CAA CAC C
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy133Q-5
TCT ATC TCA CCG TGA CAG CTC ATG C
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy133Q-3
GAC AAC AGC GAA GCA TCA TAC ACG
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy134Q-5
CGC GAC ATG CTC ATT CTT GAC C
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy134Q-3
GAG TGA GTA GTC CAG CCA TCA ACT GG
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy135Q-5
AGC TGT GGA AGG CGT CGA TTA CC
... .. |.. ... ..|. ... ..|
>xy135Q-3
GCG GTG TTC ATC CTT GTA TGA TGC
... .. |.. ... ..|. ... ..|

```

#### Annexe 4 – Diagramme de Ramachandran

In a polypeptide the main chain N-Calpha and Calpha-C bonds relatively are free to rotate. These rotations are represented by the torsion angles phi and psi, respectively.



G N Ramachandran used computer models of small polypeptides to systematically vary phi and psi with the objective of finding stable conformations. For each conformation, the structure was examined for close contacts between atoms. Atoms were treated as hard spheres with dimensions corresponding to their van der Waals radii. Therefore, phi and psi angles which cause spheres to collide correspond to sterically disallowed conformations of the polypeptide backbone. In

the diagram above the white areas correspond to conformations where atoms in the polypeptide come closer than the sum of their van der Waals radii. These regions are sterically disallowed for all amino acids except glycine which is unique in that it lacks a side chain. The red regions correspond to conformations where there are no steric clashes, ie these are the allowed regions namely the alpha-helical and beta-sheet conformations. The yellow areas show the allowed regions if slightly shorter van der Waals radii are used in the calculation, ie the atoms are allowed to come a little closer together. This brings out an additional region which corresponds to the left-handed alpha-helix.

L-amino acids cannot form extended regions of left-handed helix but occasionally individual residues adopt this conformation. These residues are usually glycine but can also be asparagine or aspartate where the side chain forms a hydrogen bond with the main chain and therefore stabilises this otherwise unfavourable conformation. The 3(10) helix occurs close to the upper right of the alpha-helical region and is on the edge of allowed region indicating lower stability.

Disallowed regions generally involve steric hindrance between the side chain C-beta methylene group and main chain atoms. Glycine has no side chain and therefore can adopt phi and psi angles in all four quadrants of the Ramachandran plot. Hence it frequently occurs in turn regions of proteins where any other residue would be sterically hindered.

**Annexe 5 - Calcul de Q-RT-PCR relative****Méthode pour la quantification relative :**

La formule (1) décrit l'amplification exponentielle de la PCR :

$$X_n = X_0 \times (1 + E_X)^n \quad (1)$$

Avec  $X_n$  : nombre de molécule au cycle  $n$  ;  $X_0$  : quantité initiale de molécules ;  $E_x$  : efficacité de l'amplification de  $X$  et  $n$  : nombre de cycles

Le cycle seuil est le nombre de cycle nécessaire pour arriver à une quantité définie d'amplicon.

$$X_T = X_0 \times (1 + E_X)^{C_{T,X}} = K_X \quad (2)$$

Avec  $X_T$  : nombre de molécules au seuil ;  $C_{T,x}$  : nombre de cycles pour atteindre le seuil et  $K_x$  : une constante

Une équation similaire peut être établie pour le gène de référence :

$$R_T = R_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}} = K_R \quad (3)$$

Avec  $R_T$  : nombre de molécules références au seuil,  $R_0$  : nombre de molécules de référence initiales ;  $E_R$  : efficacité de l'amplification de la référence ;  $C_{T,R}$  : nombre de cycles pour atteindre le seuil,  $K_R$  : une constante.

La division de l'équation (2) par l'équation (3) permet d'obtenir l'expression suivante :

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0 \times (1 + E_X)^{C_{T,X}}}{R_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}}} = \frac{K_X}{K_R} = K \quad (4)$$

En supposant que les efficacités de réaction sont identiques :  $E_x = E_R = E$  On peut simplifier l'équation (4) :

$$\frac{X_0}{R_0} \times (1 + E)^{C_{T,X} - C_{T,R}} = K \quad (5)$$



Il est possible de réarranger la formule (5) en :

$$X_N \times (1 + E)^{\Delta C_T} = K \quad (6)$$

Avec  $X_N$  :  $X_0/R_0$  quantité de cible normalisée par rapport à la référence ;  $\Delta C_T = C_{T,x} - C_{T,R}$  la différence des cycles seuils pour la cible et la référence.

La division de  $X_N$  pour n'importe quel échantillon (q) par le  $X_N$  du gène dans la condition de calibration (cb) donne :

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,q}}}{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,cb}}} = (1 + E)^{-\Delta \Delta C_T} \quad (7)$$

Avec  $\Delta \Delta C_T = C_{T,q} - C_{T,cb}$

L'efficacité d'amplification dans les conditions optimales pour la PCR quantitative (taille de l'amplicon < 150bp) est proche de 1. Ainsi la formule simplifiée pour le calcul de la quantité relative d'une cible par rapport à une référence peut être calculée par :

$$2^{-\Delta \Delta C_T}$$

La démonstration de la formule de calcul souligne deux éléments :

- Les efficacités sont supposées être identiques : il convient donc pour valider la méthode de calcul de prouver que la supposition est vraie.
- L'évaluation résulte de la division d'une quantité dans la condition à tester par une quantité dans une condition de calibration : la condition de calibration n'a pas le droit d'être égale à zéro sinon le calcul n'est pas autorisé.

***Annexe 6 – Liste des 537 EST de la banque suppressive soustractive***

Le tableau suivant contient les 537 EST uniques de la banque suppressive soustractive. Le numéro d'accèsion de la protéine prédite à partir du génome de *F. graminearum* correspondante est indiqué (***Acc Fg***). De même que la base de donnée (***bdd***), le numéro d'accèsion (***Acc Hit***) et la description (***Description du Hit***) du meilleur hit lors de la recherche d'homologie sur la banque non-redondante de protéines. Les valeurs de l'expectation (***E-value***) ainsi que du score (***Score***) sont indiquées. Lorsque la protéine prédite a été utilisée pour identifier l'EST les cases correspondant aux valeurs d'expectation et aux scores sont laissées vides.

Le tableau a été classé en fonction des numéros d'accèsion des protéines prédites de *F. graminearum*.

Tableau EST

<i>Clone ID</i>	<i>Acc FG</i>	<i>bdd</i>	<i>Acc Hit</i>	<i>Description du hit</i>	<i>E-value</i>	<i>Score</i>
contig57	EAA67128	emb	CAA67431	heat shock protein 70 [ <i>Emericella nidulans</i> ]	1E-119	429
difj9h03	EAA67128	emb	CAA67431	heat shock protein 70 [ <i>Emericella nidulans</i> ]	1E-119	429
difj8h02	EAA67154	gb	AAL79931	thioredoxin-like protein [ <i>Fusarium culmorum</i> ]	1E-56	219
difj9h01	EAA67154	gb	AAL79931	thioredoxin-like protein [ <i>Fusarium culmorum</i> ]	1E-56	219
difj9c10	EAA67154	gb	AAL79931	thioredoxin-like protein [ <i>Fusarium culmorum</i> ]	1E-56	219
difj9a03	EAA67169	pir	T49507	probable 26S proteasome regulatory particle chain RPT1 imported – [ <i>Neurospora crassa</i> ]	1E-97	357
contig89	EAA67186	gb	AAS10167	acidic amino acid permease [ <i>Penicillium chrysogenum</i> ]	1E-71	271
difjab12	EAA67203	ref	NP_011290	May regulate Golgi function and glycosylation in Golgi; Vrg4p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	5E-19	95
difj7c08	EAA67222	ref	NP_595545	MIT family metal ion transporter PI066 [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	1E-99	365
difjbb04	EAA67278	emb	CAE47879	chord containing protein homologue, putative [ <i>Aspergillus fumigatus</i> ]	2E-23	79
difj2c07	EAA67314		T49729	zinc finger protein 1 homolog [ <i>imported</i> ] - [ <i>Neurospora crassa</i> ]	1E-13	520
difj5a08	EAA67362			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj8e05	EAA67375	gb	AAL09829	beta-glucosidase 5 [ <i>Coccidioides posadasii</i> ]	1E-106	387
difjaf11	EAA67391	ref	NP_832921	Low temperature requirement protein A [ <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579]	7E-06	55
contig5	EAA67394	emb	CAB99181	related to long-chain-fatty-acid-CoA ligase FAA2 [ <i>Neurospora crassa</i> ]	3E-40	164
difj5b07	EAA67405	ref	NP_596229	fibrillar. [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	4E-92	339
difj3e06	EAA67409			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj8a05	EAA67424			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
contig56	EAA67447	gb	AAM95965	ESDC required for sexual development [ <i>Aspergillus nidulans</i> ]	4E-43	176
difj8a06	EAA67487	gb	AAR36902	small heat shock protein [ <i>Chaetomium globosum</i> ]	2E-57	223
difj2c05	EAA67491	ref	NP_181477	cation efflux family protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	7E-45	184
difj9f01	EAA67498	ref	NP_982784	ABL163Wp [ <i>Eremothecium gossypii</i> ] deshydrogenase	8E-72	272
difj4g12	EAA67500	emb	CAD20227	cytidine deaminase [ <i>Methylobacterium chloromethanicum</i> ]	2E-04	37
difj3g10	EAA67547	ref	NP_767769	bll1129 [ <i>Bradyrhizobium japonicum</i> ] oxydoreductase	1E-161	571
contig101	EAA67582	emb	CAD37155	putative 3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase [ <i>Aspergillus fumigatus</i> ]	1E-28	127
difj6c06	EAA67584			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj6f05	EAA67594			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj3f11	EAA67600	ref	NP_596685	carbamoyl-phosphate synthase [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	1E-80	300

<b>Clone ID</b>	<b>Acc FG</b>	<b>bdd</b>	<b>Acc Hit</b>	<b>Description du hit</b>	<b>E-value</b>	<b>Score</b>
contig37	EAA67671	ref	XP_323671	60S RIBOSOMAL PROTEIN L5 (CPR4) [ <i>Neurospora crassa</i> ]	5E-37	154
contig78	EAA67671	ref	XP_323671	60S RIBOSOMAL PROTEIN L5 (CPR4) [ <i>Neurospora crassa</i> ]	4E-46	184
contig7	EAA67676			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj3e10	EAA67688			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj5e02	EAA67725	gb	AAN32717	protein kinase SNF [ <i>Colletotrichum gloeosporioides f. sp. malvae</i> ]	1E-116	424
contig111	EAA67736	sp	Q9Y8G7	Bifunctional P-450:NADPH-P450 [ <i>Fusarium oxysporum</i> ]	1E-116	419
contig51	EAA67736	sp	Q9Y8G7	Bifunctional P-450:NADPH-P450 [ <i>Fusarium oxysporum</i> ]	6E-52	203
contig75	EAA67736	sp	Q9Y8G7	Bifunctional P-450:NADPH-P450 [ <i>Fusarium oxysporum</i> ]	1E-116	420
difj2h10	EAA67736	sp	Q9Y8G7	Bifunctional P-450:NADPH-P450 [ <i>Fusarium oxysporum</i> ]	3E-04	46
difjaa05	EAA67736	sp	Q9Y8G7	Bifunctional P-450:NADPH-P450 [ <i>Fusarium oxysporum</i> ]	2E-20	100
difj9b03	EAA67745	emb	CAE53350	non-ribosomal peptide synthetase [ <i>Actinoplanes teichomyeticus</i> ]	0,034	40
difj5e03	EAA67750	ref	NP_596397	60s ribosomal protein [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	0,014	40
contig84	EAA67772	ref	NP_595736	60s ribosomal protein 17-c. [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	9E-43	173
difjae07	EAA67818	gb	AAO49455	heat shock protein 78 [ <i>Leptosphaeria maculans</i> ]	0	1112
difj7h07	EAA67819	emb	CAE76504	probable ribosomal protein L6.e.B, cytosolic [ <i>Neurospora crassa</i> ]	4E-17	88
contig6	EAA67839	emb	CAE76503	probable ribosomal protein L35 [ <i>Neurospora crassa</i> ]	3E-14	79
difj9c05	EAA67844	ref	NP_851527	putative phytoene synthase [ <i>Streptomyces rochei</i> ]	4,1	32
difj7e03	EAA67845	ref	NP_484214	glycolate oxidase [ <i>Nostoc sp. PCC 7120</i> ]	05	42
contig48	EAA67898	gb	AAA33563	plasma membrane H+ ATPase [ <i>Neurospora crassa</i> ]	0	1438
contig19	EAA67898	gb	AAA33564	plasma membrane H+ ATPase [ <i>Neurospora crassa</i> ]	0	1438
contig90	EAA67908	gb	AAN05587	ribosomal protein L11 [ <i>Argopecten irradians</i> ]	9E-16	84
difj3g05	EAA67910			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
contig73	EAA68042	ref	NP_986457	AGL210Cp [ <i>Eremothecium gossypii</i> ] Uroporphyrinogen decarboxylase (URO-D)	1E-129	462
contig62	EAA68081	gb	AAB92222	induced 3 days post infection - unknown [ <i>Glomerella cingulata</i> ]	1E-34	145
difj5b08	EAA68083	dbj	BAA07784	L41 ribosomal protein [ <i>Candida maltosa</i> ]	03	43
difj7g08	EAA68107	sp	P55059	Protein disulfide isomerase precursor [ <i>Humicola insolens</i> ]	0	732
difjag07	EAA68238	ref	NP_596304	bifunctional purine biosynthetic protein [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	3E-58	225
difj6f06	EAA68248	gb	AAN73248	helix-loop-helix protein [ <i>Fusarium culmorum</i> ]	0	694
contig94	EAA68315	ref	XP_325881	QUINATE PERMEASE (QUINATE TRANSPORTER) [ <i>Neurospora crassa</i> ]	2E-59	232
difj7c10	EAA68356	gb	AAK55436	cytochrome-c oxidase chain VIIc-like protein [ <i>Ophiostoma ulmi</i> ]	1E-19	97
difj8e03	EAA68385	gb	AAL08944	L-arabinitol 4-dehydrogenase [ <i>Hypocrea jecorina</i> ]	1E-180	631
difj3h08	EAA68414	ref	NP_594825	probable arginine N-methyltransferase [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	2E-24	112

<i>Clone ID</i>	<i>Acc FG</i>	<i>bdd</i>	<i>Acc Hit</i>	<i>Description du hit</i>	<i>E-value</i>	<i>Score</i>
difjbb07	EAA68421	sp	Q9P810	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase [ <i>Aspergillus nidulans</i> ]	1E-06	54
contig92	EAA68434	ref	NP_983806	ADL290Wp [ <i>Eremothecium gossypii</i> ] Ribosomal protein L6	1E-63	244
difj3b10	EAA68434	ref	NP_983806	ADL290Wp [ <i>Eremothecium gossypii</i> ] Ribosomal protein L6	1E-63	244
contig26	EAA68451			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
contig83	EAA68453			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj6e05	EAA68463			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj8c08	EAA68480	ref	NP_596149	cyclin c homolog 1. [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	3E-10	66
difjbg01	EAA68527	ref	XP_327089	probable glutamate decarboxylase [MIPS] [ <i>Neurospora crassa</i> ]	7E-06	51
difj1f12	EAA68538	gb	AAO27751	monooxygenase [ <i>Fusarium sporotrichioides</i> ]	8E-31	136
difj5g04	EAA68539	emb	CAD71039	related to L-fucose permease [ <i>Neurospora crassa</i> ]	8E-21	103
difj6f03	EAA68554	ref	NP_594359	dnaj protein [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	2E-10	70
difjbf04	EAA68609	gb	AAB94631	small S - vegetative incompatibility [ <i>Podospora anserina</i> ]	9E-81	301
difj1c04	EAA68655			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj1e01	EAA68682	gb	AAB88887	carnitine acetyl transferase [ <i>Magnaporthe grisea</i> ]	0	860
difjaa07	EAA68682	gb	AAB88887	carnitine acetyl transferase [ <i>Magnaporthe grisea</i> ]	0	860
difj2e06	EAA68724			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj6a04	EAA68724			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difjaa02	EAA68740	gb	AAF37300	secretory pathway Ca <sup>2+</sup> -ATPase [ <i>Aspergillus niger</i> ]	0	1074
difj9g12	EAA68756	pir	T42521	probable UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	9E-20	97
difj5d03	EAA68778			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj1b01	EAA68785	ref	NP_588391	conserved protein; putative tRNA synthetase class II [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	4E-41	170
difj9g06	EAA68814	ref	NP_057175	eukaryotic translation initiation factor 3 [ <i>Homo sapiens</i> ]	1E-113	411
difj6e12	EAA68814	ref	NP_057175	eukaryotic translation initiation factor 3 [ <i>Homo sapiens</i> ]	1E-113	411
difj9e10	EAA68821			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj8a02	EAA68827	ref	NP_010390	Putative membrane protein, conserved in mammals; Tms1p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	5E-96	353
difj5c03	EAA68830	sp	O13684	PCS1_SCHPO Chromosome segregation protein pcs1 [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	4E-08	62
difj4e05	EAA68889	emb	CAC15500	putative 60s ribosomal protein [ <i>Colletotrichum gloeosporioides f. sp. aeschynomene</i> ]	2E-04	46
difj5a07	EAA68894	ref	NP_011392	Protein component of the small (40S) subunit	6E-04	45
contig116	EAA68955	ref	NP_912831	unnamed protein product [ <i>Oryza sativa (japonica cultivar-group)</i> ]	0,94	29
difj2g12	EAA68955	ref	NP_912831	unnamed protein product [ <i>Oryza sativa (japonica cultivar-group)</i> ]	0,94	29
difj8g08	EAA68955			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj4f01	EAA68962	ref	NP_014451	Putative GTPase [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	1E-163	578

<i>Clone ID</i>	<i>Acc FG</i>	<i>bdd</i>	<i>Acc Hit</i>	<i>Description du hit</i>	<i>E-value</i>	<i>Score</i>
difj8a11	EAA68994			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difjbf09	EAA68994			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj3a12	EAA69029			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj4a01	EAA69037	gb	AAO50962	similar to Dictyostelium discoideum (Slime mold). Citrate synthase	1E-28	126
contig36	EAA69039	gb	AAK84437	extracellular chitinase [ <i>Blumeria graminis</i> ]	1E-107	390
difj7e12	EAA69039	gb	AAK84437	extracellular chitinase [ <i>Blumeria graminis</i> ]	1E-107	390
difj9e08	EAA69039	gb	AAK84437	extracellular chitinase [ <i>Blumeria graminis</i> ]	1E-107	390
difj1g08	EAA69060			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj1f04	EAA69182	gb	AAN31395	leucine aminopeptidase [ <i>Aspergillus sojae</i> ]	1E-113	409
contig24	EAA69202			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj9f09	EAA69209	sp	P06785	Thymidylate synthase (TS) (TSase) [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	8E-54	211
difj3e05	EAA69246			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difjbb02	EAA69436			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj6b07	EAA69455			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
contig1	EAA69530	gb	AAF82789	aldehyde dehydrogenase; ALDH [ <i>Cladosporium fulvum</i> ]	0	733
difj8g05	EAA69544	gb	AAP91684	beta-1,3-glucanosyltransferase [ <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> ]	1E-126	453
contig28	EAA69547	ref	NP_985779	AFR232Cp [ <i>Eremothecium gossypii</i> ] gb AAS53603  AFR232Cp [ <i>Eremothecium gossypii</i> ]	1E-29	108
difj6f12	EAA69547	ref	NP_985779	AFR232Cp [ <i>Eremothecium gossypii</i> ] gb AAS53603  AFR232Cp [ <i>Eremothecium gossypii</i> ]	3E-57	122
difj4h02	EAA69566			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj4d07	EAA69609			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj9e11	EAA69616			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj4d12	EAA69674			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difjbb06	EAA69708			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
contig119	EAA69768	gb	AAO27755	reductase [ <i>Fusarium sporotrichioides</i> ]	1E-125	449
difj6f01	EAA69768	gb	AAO27755	reductase [ <i>Fusarium sporotrichioides</i> ]	1E-125	449
contig104	EAA69769	gb	AAO34681	monooxygenase [ <i>Gibberella zeae</i> ]	0	671
contig42	EAA69769	gb	AAO34681	monooxygenase [ <i>Gibberella zeae</i> ]	0	671
contig117	EAA69779	gb	AAK11532	PaxU [ <i>Penicillium paxilli</i> ]	7E-61	235
contig33	EAA69779	gb	AAK11532	PaxU [ <i>Penicillium paxilli</i> ]	7E-61	235
difj7a11	EAA69794	ref	NP_595653	sexual differentiation process protein isp4 [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	3E-25	115
difjbg02	EAA69821			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
contig23	EAA69821			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		

<i>Clone ID</i>	<i>Acc FG</i>	<i>bdd</i>	<i>Acc Hit</i>	<i>Description du hit</i>	<i>E-value</i>	<i>Score</i>
difj3d11	EAA69827	ref	NP_567513	acyl-CoA oxidase (ACX1) [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	1E-111	404
difj2f09	EAA69831	sp	P07754	Alcohol dehydrogenase III [ <i>Emericella nidulans</i> ]	4E-19	95
contig13	EAA69832	dbj	BAB59002	maltose permease [ <i>Aspergillus oryzae</i> ]	1E-126	454
contig122	EAA69844	ref	NP_013542	ornithine aminotransferase; Car2p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	5E-81	195
difj9a07	EAA69869	emb	CAF32145	fasciclin I family protein, putative [ <i>Aspergillus fumigatus</i> ]	7E-27	123
difj5d11	EAA69954	ref	NP_595140	putative MSF transporter [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	1E-141	503
contig18	EAA69962	gb	AAD52617	glutamine synthase [ <i>Nectria haematococca</i> ]	5E-48	182
difj3b03	EAA70055	ref	XP_328493	probable SnodProt1 PRECURSOR [MIPS] [ <i>Neurospora crassa</i> ]	1E-36	152
contig29	EAA70074	ref	XP_326662	NADH-UBIQUINONE OXIDOREDUCTASE 24 KD SUBUNIT PRECURSOR [ <i>Neurospora crassa</i> ]	4E-20	99
difj7a04	EAA70074	ref	XP_326662	NADH-UBIQUINONE OXIDOREDUCTASE 24 KD SUBUNIT PRECURSOR [ <i>Neurospora crassa</i> ]	7E-48	191
difjag10	EAA70089	ref	NP_594315	60s ribosomal protein l10 [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	7E-31	116
difj8h09	EAA70092	ref	XP_327013	SPERMIDINE SYNTHASE (PUTRESCINE AMINOPROPYLTRANSFERASE) [ <i>Neurospora crassa</i> ]	1E-136	486
difj1a11	EAA70105	ref	NP_010216	cytochrome c oxidase subunit VIIa [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	1E-07	57
difj1e05	EAA70159	ref	XP_323644	OUTER MITOCHONDRIAL MEMBRANE PROTEIN PORIN [ <i>Neurospora crassa</i> ]	1E-103	377
difj5d04	EAA70159	ref	XP_323644	OUTER MITOCHONDRIAL MEMBRANE PROTEIN PORIN [ <i>Neurospora crassa</i> ]	1E-103	377
difj7c06	EAA70164	ref	NP_985666	AFR119Cp ABC1 family [ <i>Eremothecium gossypii</i> ]	1E-120	436
difj7d06	EAA70215	emb	CAE76088	related to neutral amino acid permease [ <i>Neurospora crassa</i> ]	5E-45	184
contig86	EAA70229	gb	AAM88292	reductase RED1 [ <i>Cochliobolus heterostrophus</i> ]	1E-83	311
difj5e07	EAA70248			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difjbg07	EAA70379			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difjba10	EAA70393	ref	NP_595137	putative mitochondrial ribosomal protein [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	1E-23	78
difj2b02	EAA70398	ref	NP_834349	Metal-dependent hydrolase [ <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579]	2E-37	159
contig91	EAA70431	gb	AAP40020	HSP70 [ <i>Hypocrea jecorina</i> ]	0	1076
contig99	EAA70431	gb	AAP40020	HSP70 [ <i>Hypocrea jecorina</i> ]	0	1076
difj7h02	EAA70431	gb	AAP40020	HSP70 [ <i>Hypocrea jecorina</i> ]	0	1076
difj9c01	EAA70438	sp	O13418	60S RIBOSOMAL PROTEIN L15 emb CAA75582  putative ribosomal protein L15 [ <i>Aspergillus niger</i> ]	2E-21	102
difj4g11	EAA70438	ref	XP_328215	60S RIBOSOMAL PROTEIN L15 [ <i>Neurospora crassa</i> ]	3E-37	155
difj3d12	EAA70467	ref	NP_595820	actin-related protein [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	4E-11	69
difj8h03	EAA70468	ref	NP_588387	lysyl-trna synthetase [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	3E-43	176
difj2f10	EAA70476			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
contig8	EAA70508	sp	Q10499	Putative flavoprotein C26F14C [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	1E-40	167
difj3b12	EAA70514	emb	CAE47957	GabA permease, putative [ <i>Aspergillus fumigatus</i> ]	0	718

<i>Clone ID</i>	<i>Acc FG</i>	<i>bdd</i>	<i>Acc Hit</i>	<i>Description du hit</i>	<i>E-value</i>	<i>Score</i>
difj2h01	EAA70587		Q9USX4	R33A_SCHPO 60S ribosomal protein L33-A (L37A)	5E-38	157
difj8b11	EAA70592	gb	AAB47060	exochitinase [ <i>Trichoderma harzianum</i> ]	0	758
difj2e09	EAA70618	emb	CAE47880	ethanolamine kinase, putative [ <i>Aspergillus fumigatus</i> ]	1E-112	407
difj7d10	EAA70685	gb	AAK50853	NADPH oxidase 1 [ <i>Podospora anserina</i> ]	0	944
difj8c10	EAA70690	pir	A42019	tyrosine-tRNA ligase (EC 6) precursor, mitochondrial – [ <i>Podospora anserina</i> ]	4E-08	58
difj7h11	EAA70702	ref	NP_596422	small nuclear ribonucleoprotein [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	3E-08	55
difj2b10	EAA70733	ref	NP_593504	MFS transporter of unknown specificity [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	9E-53	209
difj6c08	EAA70773			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj9d10	EAA70777	ref	XP_330191	probable pyruvate dehydrogenase beta chain precursor (PDB1) [MIPS] [ <i>Neurospora crassa</i> ]	2E-62	138
contig53	EAA70844	ref	NP_596284	zuotin like; putative zdna binding; dnaj domain containing protein [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	2E-45	181
difjbf10	EAA70869	sp	P28345	Malate synthase, glyoxysomal [ <i>Neurospora crassa</i> ]	3,7	32
contig46	EAA70869	ref	XP_322865	MALATE SYNTHASE, GLYOXYSOMAL [ <i>Neurospora crassa</i> ]	1E-70	266
contig70	EAA70927	dbj	BAA34062	lactonohydrolase [ <i>Fusarium oxysporum</i> ] dbj BAA34218  lactonohydrolase [ <i>Fusarium oxysporum</i> ]	2E-41	169
difj8f10	EAA70927	dbj	BAA34062	lactonohydrolase [ <i>Fusarium oxysporum</i> ] dbj BAA34218  lactonohydrolase [ <i>Fusarium oxysporum</i> ]	3E-30	132
contig120	EAA70928			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj5g08	EAA70928			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj7b08	EAA70928			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj5a10	EAA70929	ref	ZP_00030704	COG1020: Non-ribosomal peptide synthetase modules and related proteins [ <i>Burkholderia fungorum</i> ]	0,46	35
contig44	EAA70964	gb	AAP58401	ribosomal protein Srp1 [ <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ]	8E-50	197
difj1e09	EAA70964		AAP58401	ribosomal protein Srp1 [ <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ]	3E-57	221
difj4d11	EAA71027	ref	ZP_00092049	COG0738: Fucose permease [ <i>Azotobacter vinelandii</i> ]	3E-63	244
difj6d12	EAA71027	ref	ZP_00092049	COG0738: Fucose permease [ <i>Azotobacter vinelandii</i> ]	3E-63	244
difj7a05	EAA71106	emb	CAD71220	related to chloroperoxidase [ <i>Neurospora crassa</i> ]	4E-07	55
contig10	EAA71133	emb	CAD54043	PhiA protein [ <i>Emericella nidulans</i> ]	2E-26	120
contig121	EAA71135	gb	CAC80843	MSTA protein [ <i>Emericella nidulans</i> ]	6E-54	209
contig95	EAA71135	gb	CAC80843	MSTA protein [ <i>Emericella nidulans</i> ]	6E-54	209
difj8d09	EAA71140			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
contig100	EAA71148	dbj	BAB43813	CaNAG2 [ <i>Candida albicans</i> ] dbj BAB43820  CaNAG2 [ <i>Candida albicans</i> ]	1E-72	275
difj5g03	EAA71148	dbj	BAB43813	CaNAG2 [ <i>Candida albicans</i> ] dbj BAB43820  CaNAG2 [ <i>Candida albicans</i> ]	1E-72	275
contig96	EAA71150	gb	AAD42233	glucosamine-6-phosphate deaminase [ <i>Mus musculus</i> ]	1E-91	338
difj8h04	EAA71150	gb	AAD42233	glucosamine-6-phosphate deaminase [ <i>Mus musculus</i> ]	1E-91	338
difj8d04	EAA71180			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		



<i>Clone ID</i>	<i>Acc FG</i>	<i>bdd</i>	<i>Acc Hit</i>	<i>Description du hit</i>	<i>E-value</i>	<i>Score</i>
difj1g04	EAA71197			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj2h08	EAA71225	gb	AAL56992	integral membrane protein [ <i>Blumeria graminis</i> ]	9E-23	109
difj4a11	EAA71294	emb	CAD38166	putative nuclear transport factor 2 [ <i>Davidiella tassiiana</i> ]	4E-10	57
difj2h07	EAA71295	ref	NP_011830	Ribosomal protein L4 of the large (60S) ribosomal subunit [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	1E-07	57
difj6b06	EAA71295	ref	NP_011830	Ribosomal protein L4 of the large (60S) ribosomal subunit [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	4E-39	161
difjbe02	EAA71307	ref	NP_587711	BTB domain and Ankaryin repeat containing protein [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	2E-75	286
difj9e09	EAA71315	ref	ZP_00085158	COG1197: Transcription-repair coupling factor (superfamily II helicase) [ <i>Pseudomonas fluorescens PfO-1</i> ]	0,012	40
contig107	EAA71470	pir	S47892	neutral amino acid permease - [ <i>Neurospora crassa</i> ]	2E-38	162
difj1b03	EAA71470	pir	S47892	neutral amino acid permease - [ <i>Neurospora crassa</i> ]	2E-38	162
difjjae06	EAA71470	pir	S47892	neutral amino acid permease - [ <i>Neurospora crassa</i> ]	2E-38	162
difjbb03	EAA71470	pir	S47892	neutral amino acid permease - [ <i>Neurospora crassa</i> ]	2E-38	162
difj2b04	EAA71501			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difjbb10	EAA71501			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj7b06	EAA71508	emb	CAF31975	endoglucanase, putative [ <i>Aspergillus fumigatus</i> ]	1E-57	224
contig9	EAA71538	gb	AAQ95166	methyltransferase [ <i>Emericella nidulans</i> ]	4E-06	45
difj1d02	EAA71612			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difjba07	EAA71635	ref	NP_596480	putative golgi membrane protein-sorting protein [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	3E-25	115
difj8b05	EAA71658	ref	NP_683570	alanyl-tRNA synthetase-related [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	9E-06	50
difj6g12	EAA71669	sp	P46075	ELM2_ASPFU Extracellular elastinolytic metalloproteinase precursor	0	727
contig61	EAA71677	emb	CAD88590	glucose oxidase [ <i>Botryotinia fuckeliana</i> ]	4E-65	251
contig58	EAA71678	emb	CAF32121	integral membrane protein, putative [ <i>Aspergillus fumigatus</i> ]	5E-06	54
difj5g05	EAA71679	ref	NP_011329	transport of pyridoxine; Tpn1p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	1E-68	262
difj8h05	EAA71679	ref	NP_011329	transport of pyridoxine; Tpn1p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	1E-68	262
difj1f01	EAA71711	emb	CAD29613	mfs-family multidrug resistance protein, putative [ <i>Aspergillus fumigatus</i> ]	0	798
difj1h11	EAA71768			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj4e02	EAA71972	ref	NP_596026	pim1 GTPase protein [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	5E-11	68
difj6h10	EAA72030			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj9g02	EAA72101	ref	NP_011856	Involved in pheromone response and pseudohyphal growth pathways; Ste20p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	0,044	38
difj8d10	EAA72140	sp	P26969	Glycine dehydrogenase [ <i>Pisum sativum</i> ]	1E-49	197
difj4f04	EAA72142			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj7f09	EAA72149			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj4g02	EAA72184	ref	XP_323632	probable branched-chain amino acids aminotransferase [ <i>MIPS</i> ] [ <i>Neurospora crassa</i> ]	9E-29	127

<i>Clone ID</i>	<i>Acc FG</i>	<i>bdd</i>	<i>Acc Hit</i>	<i>Description du hit</i>	<i>E-value</i>	<i>Score</i>
contig77	EAA72210	dbj	BAA86103	O-methyltransferase [ <i>Aspergillus parasiticus</i> ] dbj BAA86104  O-methyltransferase [ <i>Aspergillus parasiticus</i> ]	3E-58	227
difj7f10	EAA72224	dbj	BAB59002	maltose permease [ <i>Aspergillus oryzae</i> ]	1E-82	309
difj6f11	EAA72236			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj4f11	EAA72243	ref	NP_594121	fibronectin type III domain protein; yeast chs5 homolog [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	2E-30	132
difj2c09	EAA72257			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj8c12	EAA72268	ref	NP_973522	metal-dependent phosphohydrolase HD domain-containing protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	4E-35	149
difjbc09	EAA72278	gb	AAR23110	3-methylcrotonyl-CoA carboxylase biotin-containing subunit [ <i>Emericella nidulans</i> ]	8E-48	189
difj9a06	EAA72315	emb	CAB46694	SPBC839.01 [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	1E-106	389
contig65	EAA72328	dbj	BAB18098	uricase [ <i>Tolypocladium inflatum</i> ]	3E-28	125
difj7h12	EAA72328	dbj	BAB18098	uricase [ <i>Tolypocladium inflatum</i> ]	5E-37	154
difj7e05	EAA72339	gb	AAO31597	di/tri peptide transporter 2 [ <i>Phaeosphaeria nodorum</i> ]	7E-98	360
difj2e07	EAA72339	gb	AAO31597	di/tri peptide transporter 2 [ <i>Phaeosphaeria nodorum</i> ]	7E-98	360
difj5e04	EAA72339	gb	AAO31597	di/tri peptide transporter 2 [ <i>Phaeosphaeria nodorum</i> ]	7E-98	360
difj8h06	EAA72339	gb	AAO31597	di/tri peptide transporter 2 [ <i>Phaeosphaeria nodorum</i> ]	7E-98	360
contig87	EAA72351	gb	AAA85778	fumarylacetoacetate hydrolase	2E-24	68
contig68	EAA72373	emb	CAA04820	phenylacetyl-CoA ligase [ <i>Penicillium chrysogenum</i> ]	4E-17	68
difj4e12	EAA72373	emb	CAA04820	phenylacetyl-CoA ligase [ <i>Penicillium chrysogenum</i> ]	06	42
difj1d05	EAA72409	sp	P55250	Fumarate hydratase, mitochondrial precursor [ <i>Rhizopus oryzae</i> ]	2E-17	90
difj5f02	EAA72428	ref	XP_324865	CASEIN KINASE I HOMOLOG HHP1 [ <i>Neurospora crassa</i> ]	1E-168	592
difj9d06	EAA72434	gb	AAQ56234	HEX1 highly expressed on cellulase-inducing medium [ <i>Hypocrea jecorina</i> ]	2E-71	270
difjac12	EAA72524	ref	NP_014661	Membrane protein Rod1p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	3E-33	144
difj2g10	EAA72545			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj6b03	EAA72554	pir	P34054	INA1_TRIHA AMINO-ACID PERMEASE [ <i>Hypocrea lixii</i> ]	0	655
difj1d09	EAA72613	gb	AAG53992	acyl-CoA thioesterase [ <i>Cochliobolus heterostrophus</i> ]	1E-25	103
difjac07	EAA72629	gb	AAL10705	phosphoenolpyruvate carboxykinase [ <i>Emericella nidulans</i> ]	0	936
difj8b03	EAA72677			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj3h03	EAA72694	gb	AAH56091	Gk2-prov protein [ <i>Xenopus laevis</i> ] glycerol kinase	1E-127	456
contig114	EAA72694	gb	AAH56091	Gk2-prov protein [ <i>Xenopus laevis</i> ] glycerol kinase	1E-127	456
contig102	EAA72694	gb	AAH56091	Gk2-prov protein [ <i>Xenopus laevis</i> ] glycerol kinase	1E-127	456
difj1a06	EAA72695	ref	NP_066190	aquaporin 9 [ <i>Homo sapiens</i> ]	8E-42	172
contig59	EAA72695	ref	NP_066190	aquaporin 9 [ <i>Homo sapiens</i> ]	8E-42	172
contig113	EAA72695	ref	NP_066190	aquaporin 9 [ <i>Homo sapiens</i> ]	8E-42	172

<i>Clone ID</i>	<i>Acc FG</i>	<i>bdd</i>	<i>Acc Hit</i>	<i>Description du hit</i>	<i>E-value</i>	<i>Score</i>
difj7f03	EAA72743			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
contig34	EAA72784	ref	NP_010223	Twenty S rRNA accumulation; Tsr1p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	1E-135	485
difj7b07	EAA72785	ref	NP_011005	Nucleolar protein, belong to the small subunit processome contain the U3 snoRNA [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	1E-136	486
difj9g01	EAA72812	ref	NP_593504	MFS transporter of unknown specificity [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	5E-65	250
difj7h08	EAA72863			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
contig12	EAA72863			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
contig67	EAA72929	gb	AAO27746	putative methyltransferase [ <i>Fusarium sporotrichioides</i> ]	0,033	30
contig118	EAA73068			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
contig47	EAA73068			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difjaa09	EAA73130	ref	NP_012667	Xanthine Phosphoribosyl Transferase [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	3E-32	139
difjac11	EAA73188	emb	CAB52417	xylanase [ <i>Setosphaeria turcica</i> ]	4E-73	275
contig39	EAA73216	emb	CAD60593	unnamed protein product [ <i>Podospora anserina</i> ]	2E-22	107
contig124	EAA73242	dbj	BAA33011	flavo-hemoglobin [ <i>Fusarium oxysporum</i> ]	1E-133	477
contig74	EAA73242	dbj	BAA33011	flavo-hemoglobin [ <i>Fusarium oxysporum</i> ]	0,53	35
difj8e12	EAA73242	dbj	BAA33011	flavo-hemoglobin [ <i>Fusarium oxysporum</i> ]	3E-64	244
difj6c01	EAA73255			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj4g09	EAA73260	gb	AAO32580	RPS24 [ <i>Saccharomyces kluyveri</i> ] 40S ribosomal protein	1E-35	149
difjag05	EAA73294	gb	AAO27751	monooxygenase [ <i>Fusarium sporotrichioides</i> ]	5E-13	75
difj8f06	EAA73363			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj5e11	EAA73437		CAA64974	QI74 protein [ <i>Hypocrea lixii</i> ]	2E-67	258
difj7f12	EAA73437		CAA64974	QI74 protein [ <i>Hypocrea lixii</i> ]	2E-67	258
difj9g11	EAA73470			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj3f08	EAA73495	emb	CAB11063	RNA-binding protein; eukaryotic conserved protein [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	2E-74	281
difj3b09	EAA73496	ref	NP_593835	putative atp-dependent RNA helicase [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	5E-88	325
difj7a06	EAA73507	gb	AAR92034	elongation factor 3 [ <i>Clavispora lusitaniae</i> ]	0	1242
difjbg03	EAA73507	gb	AAR92034	elongation factor 3 [ <i>Clavispora lusitaniae</i> ]	0	1242
contig72	EAA73507	gb	AAR92034	elongation factor 3 [ <i>Clavispora lusitaniae</i> ]	0	1242
difj6d04	EAA73507	gb	AAR92034	elongation factor 3 [ <i>Clavispora lusitaniae</i> ]	0	1242
difj7b09	EAA73508	ref	NP_009690	plasma membrane carnitine transporter Agp2p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	1E-105	385
difj5b12	EAA73522	gb	AAR37949	succinate-semialdehyde dehydrogenase [ <i>uncultured bacterium 561</i> ]	1E-132	472
difjah08	EAA73522	gb	AAR37949	succinate-semialdehyde dehydrogenase [ <i>uncultured bacterium 561</i> ]	1E-132	472
difjbg04	EAA73539			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		

<i>Clone ID</i>	<i>Acc FG</i>	<i>bdd</i>	<i>Acc Hit</i>	<i>Description du hit</i>	<i>E-value</i>	<i>Score</i>
difj1f11	EAA73543	emb	CAE47906	transporter, unknown specificity [ <i>Aspergillus fumigatus</i> ]	1E-73	279
contig45	EAA73565	ref	ZP_00058470	COG0791: Cell wall-associated hydrolases (invasion-associated proteins) [ <i>Thermobifida fusca</i> ]	2E-11	71
difj1g03	EAA73587	ref	NP_012740	ribose-phosphate pyrophosphokinase; Prs1p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	7E-72	273
contig115	EAA73595	emb	CAE85541	related to lactose regulatory protein [ <i>Neurospora crassa</i> ]	3E-07	60
difj5g10	EAA73595	emb	CAE85541	related to lactose regulatory protein [ <i>Neurospora crassa</i> ]	3E-07	60
contig40	EAA73614	emb	CAD29608	zinc finger protein, putative [ <i>Aspergillus fumigatus</i> ]		
contig63	EAA73614	emb	CAD29608	zinc finger protein, putative [ <i>Aspergillus fumigatus</i> ]	1E-52	206
contig71	EAA73614	emb	CAD29608	zinc finger protein, putative [ <i>Aspergillus fumigatus</i> ]	1E-18	96
difjaf08	EAA73617	emb	CAD21513	probable DNA-directed RNA polymerase I [ <i>Neurospora crassa</i> ]	5E-32	138
difj5d05	EAA73619		CAD01120	related to epithelial zinc-finger ezf protein [ <i>Neurospora crassa</i> ]	7E-69	671
difjaf01	EAA73638	sp	P23704	ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor [ <i>Neurospora crassa</i> ]	2E-46	185
difjab09	EAA73657	emb	CAD42868	solaneyl pyrophosphate synthase [ <i>Mucor circinelloides f. lusitanicus</i> ]	1E-102	374
contig27	EAA73659	sp	P59671	60S ribosomal protein L3 emb CAD70371  probable 60s ribosomal protein l3 (rpl3) [ <i>Neurospora crassa</i> ]	3E-70	149
difj8b04	EAA73708	ref	NP_595319	putative eukaryotic translation initiation factor 3 alpha subunit(eif-3 alpha). [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	3E-15	82
difjaf10	EAA73708	sp	O59742	Probable eukaryotic translation initiation factor 3 [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	7E-22	105
difj1d01	EAA73721	ref	NP_564043	expressed membrane protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	8E-73	276
difj9f02	EAA73768	gb	EAE20031	unknown [ <i>environmental sequence</i> ]	2E-77	291
contig82	EAA73771	emb	CAC28838	related to DNAJ-like protein homolog [ <i>Neurospora crassa</i> ]	1E-108	394
difj2a02	EAA73785	sp	AAB97419	succinate dehydrogenase iron-sulphur protein [ <i>Mycosphaerella graminicola</i> ]	1E-102	373
difjbb09	EAA73785	gb	AAB97419	succinate dehydrogenase iron-sulphur protein [ <i>Mycosphaerella graminicola</i> ]	1E-102	373
difjbb09	EAA73798	gb	AAN62898	cell wall protein; Sed1p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	2E-14	81
difj6g06	EAA73871			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj7a01	EAA73916		AAO13381	metacaspase [ <i>Aspergillus nidulans</i> ]	5E-86	319
difj1b06	EAA74017	gb	EAA66474	FAS2_PENPA Fatty acid synthase subunit alpha [ <i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4]	2E-47	188
difj5d10	EAA74018	gb	AAB41494	fatty acid synthase, beta subunit [ <i>Emericella nidulans</i> ]	3E-21	102
difj7f08	EAA74018	gb	AAB41494	fatty acid synthase, beta subunit [ <i>Emericella nidulans</i> ]	1E-44	179
difjba05	EAA74019	gb	AAO50910	similar to Rattus norvegicus (Rat). Guanine deaminase (EC 3.5.4 [ <i>Dictyostelium discoideum</i> ]	6E-19	94
contig60	EAA74070	emb	CAC28755	probable MAK16 protein [ <i>Neurospora crassa</i> ]	1E-61	238
difjbb10	EAA74086			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj1a04	EAA74088			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj4a05	EAA74129	ref	XP_329834	40S RIBOSOMAL PROTEIN S5 [ <i>Neurospora crassa</i> ]	3E-40	115
difjab03	EAA74129	ref	XP_329834	40S RIBOSOMAL PROTEIN S5 [ <i>Neurospora crassa</i> ]	3E-32	138

<i>Clone ID</i>	<i>Acc FG</i>	<i>bdd</i>	<i>Acc Hit</i>	<i>Description du hit</i>	<i>E-value</i>	<i>Score</i>
contig85	EAA74131	gb	AAN11327	ADP-ATP translocase [ <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> ]	1E-128	460
difj7f05	EAA74170	gb	AAL56638	putative DEAD-box RNA helicase [ <i>Emericella nidulans</i> ]	3E-13	75
difj5g06	EAA74171			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj1h09	EAA74201			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj3g09	EAA74218	ref	NP_823172	putative allantoinase [ <i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680]	2E-13	76
difj7f04	EAA74224	ref	NP_595368	putative U3 snoRNP component [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	2E-46	186
difj2d11	EAA74225	gb	AAC24705	monoubiquitin/carboxy extension protein fusion [ <i>Botryotinia fuckeliana</i> ]	1E-49	197
difj7d05	EAA74251	gb	EAA63472	ARGI_EMENI Arginase [ <i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4]	1E-126	453
contig103	EAA74251	gb	EAA63472	ARGI_EMENI Arginase [ <i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4]	2E-87	323
difj8f07	EAA74275	ref	NP_009693	subunit of the Cdc28 protein kinase; Cks1p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	3E-34	145
difj6g10	EAA74276	ref	NP_596116	possibly required for protein disulfide bond formation in the ER [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	9E-21	100
difj7b02	EAA74298	emb	CAD37159	putative ribosomal protein [ <i>Aspergillus fumigatus</i> ]	2E-13	75
difj7g06	EAA74298	emb	CAD37159	putative ribosomal protein [ <i>Aspergillus fumigatus</i> ]	7E-10	65
difj1a01	EAA74332	ref	NP_010172	Ribosomal RNA Processing; Rrp42p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	5E-17	91
difjad09	EAA74332	ref	NP_010172	Ribosomal RNA Processing; Rrp42p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	5E-17	91
difj9a08	EAA74334	dbj	BAA85768	cytochrome c549 [ <i>Fusarium oxysporum</i> ]	4E-35	147
difj6d01	EAA74343	ref	NP_010849	Ferrioxamine B transporter	1E-120	434
difj2g04	EAA74352	ref	XP_326728	related to RNA splicing factor PRP9 [ <i>Neurospora crassa</i> ]	0	645
difj5d02	EAA74367	ref	ZP_00059195	COG1024: Enoyl-CoA hydratase/carnithine racemase [ <i>Thermobifida fusca</i> ]	3E-14	79
contig15	EAA74377	gb	AAM19667	carboxylic acid transport protein [ <i>Metarhizium anisopliae</i> ]	0	738
difj4h06	EAA74387	ref	ZP_00098516	COG0329: Dihydrodipicolinate synthase/N-acetylneuraminate lyase [ <i>Desulfitobacterium hafniense</i> ]	1E-07	57
contig54	EAA74387	ref	ZP_00098516	COG0329: Dihydrodipicolinate synthase/N-acetylneuraminate lyase [ <i>Desulfitobacterium hafniense</i> ]	1E-07	57
contig31	EAA74412	gb	AAC09045	GATA transcription factor [ <i>Penicillium chrysogenum</i> ]	7E-33	97
contig21	EAA74424	ref	NP_691595	acyl-CoA dehydrogenase [ <i>Oceanobacillus iheyensis</i> HTE831]	9E-61	234
difjac04	EAA74434	dbj	BAA85768	cytochrome c549 [ <i>Fusarium oxysporum</i> ]	3E-10	65
difj5e06	EAA74434	dbj	BAA85768	cytochrome c549 [ <i>Fusarium oxysporum</i> ]	3E-10	65
difj6c03	EAA74464	dbj	BAC20337	hexose transporter [ <i>Aspergillus oryzae</i> ]	3E-67	258
difj9c08	EAA74487	ref	NP_414846	NAD <sup>+</sup> -dependent betaine aldehyde dehydrogenase [ <i>Escherichia coli</i> K12]	7E-21	101
contig64	EAA74490	ref	NP_116690	Protein component of the large (60S) ribosomal subunit [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	4E-04	45
difj9b12	EAA74506			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj5c11	EAA74514	ref	XP_322653	VACUOLAR ATP SYNTHASE SUBUNIT [ <i>Neurospora crassa</i> ]	4E-25	108
difjbc05	EAA74559	ref	NP_596073	strong similarity to yeast cell division and spore germination protein Krr1p [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	5E-06	52

<i>Clone ID</i>	<i>Acc FG</i>	<i>bdd</i>	<i>Acc Hit</i>	<i>Description du hit</i>	<i>E-value</i>	<i>Score</i>
difj7c04	EAA74578	ref	NP_177564	mitochondrial substrate carrier family protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	3E-25	118
difj9a01	EAA74619	gb	EAA65057	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM17 [ <i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4]	5E-57	222
contig2	EAA74639	ref	NP_587683	putative exosome 3'-5' exoribonuclease complex [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	5E-47	187
contig22	EAA74689	gb	NP_081828	kynureninase (L-kynurenine hydrolase) [ <i>Mus musculus</i> ]	1E-103	379
difj5h12	EAA74689	gb	NP_081828	kynureninase (L-kynurenine hydrolase) [ <i>Mus musculus</i> ]	1E-103	379
difjaa04	EAA74689	ref	NP_081828	kynureninase (L-kynurenine hydrolase) [ <i>Mus musculus</i> ]	1E-103	379
difj9b07	EAA74718	gb	AAP05987	70 kDa heat shock protein [ <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> ]	0	987
difj1g06	EAA74738	ref	NP_595525	putative thioredoxin [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	6E-59	231
difj6a06	EAA74761			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj7f02	EAA74795			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj8a07	EAA74800			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj8h10	EAA74871	pdb	1HJS	Chain A, Structure Of Two Fungal Beta-1,4-Galactanases [ <i>Corynascus heterothallicus</i> ]	1E-131	468
difjbe05	EAA74902	ref	NP_012686	allantoate permease; Dal5p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	1E-44	182
difjbg09	EAA74902	ref	NP_012686	allantoate permease; Dal5p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	1E-44	182
difj8d11	EAA74903			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj4b11	EAA74932			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
contig14	EAA75018			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj9b05	EAA75039	pir	S47150	NADH2 dehydrogenase (ubiquinone) (EC 1.6.5) [ <i>Neurospora crassa</i> ]	4E-08	58
contig41	EAA75090		EAA64975	OAT_EMENI Ornithine aminotransferase[ <i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4]	1E-166	1513
contig123	EAA75090	sp	Q92413	Ornithine aminotransferase (Ornithine--oxo-acid aminotransferase) [ <i>Emericella nidulans</i> ]	6E-54	211
difjba01	EAA75100	emb	CAA98726	something about silencing 10 (SAS10) [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	5E-30	134
difj2c04	EAA75118	pir	S38111	general amino acid permease Gap1p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	1E-117	424
contig32	EAA75142			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
contig30	EAA75144	gb	AAK63186	probable acyl-CoA dehydrogenase [ <i>Glomus intraradices</i> ]	5E-70	247
difj3d01b	EAA75185	emb	CAD21185	related to Hsp90 associated co-chaperone [ <i>Neurospora crassa</i> ]	3E-06	53
difj4e07	EAA75198	sp	O74633	DNA-directed RNA polymerase I polypeptide 2 (RNA polymerase I subunit 2) [ <i>Neurospora crassa</i> ]	9E-22	103
difjac10	EAA75210			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj6h08	EAA75216			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj5c04	EAA75234		AAO27752	deacetylase [ <i>Fusarium sporotrichioides</i> ]	8E-49	496
difj7g03	EAA75236	ref	NP_917158	P0039G053 [ <i>Oryza sativa (japonica cultivar-group)</i> ]	1E-21	103
contig35	EAA75374	sp	P35049	Trypsin precursor gb AAB27568  preprotrypsin [ <i>Fusarium oxysporum</i> ]	2E-99	363
difj9f06	EAA75383			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		

<i>Clone ID</i>	<i>Acc FG</i>	<i>bdd</i>	<i>Acc Hit</i>	<i>Description du hit</i>	<i>E-value</i>	<i>Score</i>
difj9h06	EAA75427	emb	CAE47862	oxidoreductase, putative [ <i>Aspergillus fumigatus</i> ]	0,028	39
difj7g04	EAA75438	gb	AAC49318	versicolorin b synthase-like protein, putative [ <i>Aspergillus fumigatus</i> ]	1E-117	425
difj7h05	EAA75438	gb	AAC49318	versicolorin b synthase-like protein, putative [ <i>Aspergillus fumigatus</i> ]	1E-117	425
difj6e01	EAA75459	ref	NP_984686	lysine decarboxylase-like protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	2E-29	130
difj7c03	EAA75487	ref	NP_984794	cytochrome c reductase iron-sulfur subunit [ <i>Neurospora crassa</i> ]	8E-86	318
contig3	EAA75573			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj6h03	EAA75573			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj1b11	EAA75577	gb	AAF93498	ribosomal protein L1 [ <i>Vibrio cholerae O1 biovar eltor str. N16961</i> ]	5E-18	94
contig11	EAA75582	ref	NP_777003	phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma) [ <i>Bos taurus</i> ]	4E-17	92
difj3c12	EAA75645			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj8c01	EAA75690	gb	AAD30438	integral membrane protein [ <i>Magnaporthe grisea</i> ]	8E-22	106
difj2b03	EAA75816			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj9d04	EAA75850	gb	AAP92915	serine/threonine kinase IREI [ <i>Hypocrea jecorina</i> ]	0	1323
difj1a03	EAA75942	ref	NP_596806	putative ubiquinol-cytochrome c reductase complex subunit [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	2E-12	55
difj6e09	EAA75973	ref	NP_595009	amino-acid permease [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	1E-101	371
difj8e06	EAA75973	ref	NP_595009	amino-acid permease [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	1E-101	371
difjag12	EAA76051	gb	AAA75471	pectate lyase	7E-69	261
difj9d07	EAA76077			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difjbd09	EAA76092	ref	NP_014051	NADPH-dependent alcohol dehydrogenase; Adh6p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	0,032	39
difjbb11	EAA76102	ref	NP_013230	Nucleolar protein part of the small subunit (SSU) processome Dip2p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	0	740
contig66	EAA76137	ref	NP_116638	involved in protection against heat-induced protein aggregation [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	2E-60	235
contig38	EAA76166	gb	AAF82684	multifunctional beta-oxidation enzyme [ <i>Yarrowia lipolytica</i> ]	2E-31	135
difj8e10	EAA76167	ref	NP_849912	phosphoribulokinase/uridine kinase-related [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	1E-08	60
difj3f07	EAA76201		NP_013432	NAD(+) salvage pathway; Nma1p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	6E-71	687
contig50	EAA76239			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
contig52	EAA76272	emb	CAD27297	probable translation elongation factor precursor, mitochondrial [ <i>Aspergillus fumigatus</i> ]	4E-46	184
difj5c01	EAA76273			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj7d09	EAA76281	gb	AAP93639	PAK kinase [ <i>Magnaporthe grisea</i> ]	7E-51	200
contig110	EAA76292	gb	AAG13457	putative 3-ketoacyl-CoA thiolase [ <i>Aspergillus oryzae</i> ]	6E-37	154
difj1d12	EAA76307			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
contig49	EAA76388	sp	P34913	soluble epoxide hydrolase [ <i>Homo sapiens</i> ]	1E-39	166
difj6d07	EAA76388	sp	P34913	soluble epoxide hydrolase [ <i>Homo sapiens</i> ]	1E-39	166

<i>Clone ID</i>	<i>Acc FG</i>	<i>bdd</i>	<i>Acc Hit</i>	<i>Description du hit</i>	<i>E-value</i>	<i>Score</i>
difj1b09	EAA76393			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj4g08	EAA76395	sp	P14010	4-aminobutyrate transaminase (EC 2.69) – [ <i>Emericella nidulans</i> ]	4E-59	228
difjbd03	EAA76448	gb	AAF12737	exopolysaccharuronase [ <i>Fusarium oxysporum f. sp. radialis-lycopersici</i> ]	0	881
difj8c06	EAA76475	dbj	BAC20584	2-oxoisovalerate dehydrogenase alpha subunit [ <i>Macaca fascicularis</i> ]	6E-41	167
contig112	EAA76482	sp	Q8ISP0	40S ribosomal protein S18 gb AAN52390  ribosomal protein S18 [ <i>Branchiostoma belcheri</i> ]	8E-57	220
difj6a01	EAA76512			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj1e03	EAA76520	ref	NP_013273	Methyltransferase required for diphthamide biosynthesis [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	1E-102	372
contig43	EAA76570	gb	AAC61778	aconitase [ <i>Aspergillus terreus</i> ]	0	1281
contig81	EAA76570	gb	AAC61778	aconitase [ <i>Aspergillus terreus</i> ]	0	1281
difj3a10	EAA76588			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj8f03	EAA76608	ref	XP_218195	similar to splicing factor U2AF homolog - mouse [ <i>Rattus norvegicus</i> ]	6E-21	76
difj4e04	EAA76646	gb	AAO38840	beta-tubulin [ <i>Parmelia saxatilis</i> ]	3E-37	155
difjab08	EAA76664			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
contig97	EAA76673	pir	S47892	neutral amino acid permease [ <i>Neurospora crassa</i> ]	1E-114	412
difj1f06	EAA76685			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj5c02	EAA76686	dbj	BAB59002	maltose permease [ <i>Aspergillus oryzae</i> ]	1E-114	414
difj1g01	EAA76711	gb	AAB04132	cutinase G-box binding protein	0	704
difjaf03	EAA76711	gb	AAB04132	cutinase G-box binding protein	0	704
difj2b06	EAA76715	sp	P49377	ATP synthase gamma chain, mitochondrial precursor [ <i>Kluyveromyces marxianus var. Lactis</i> ]	9E-38	158
difj1a02	EAA76753	ref	NP_014915	microtubule-associated protein; Ytm1p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	4E-80	300
difj2a10	EAA76757	ref	NP_014335	yeast dnaJ homolog (nuclear envelope protein); heat shock protein; Ydj1p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	4E-99	363
contig55	EAA76759	sp	Q9C3Z6	60S acidic ribosomal protein P0 gb AAK11262  ribosomal protein P0 [ <i>Podospora anserina</i> ]	4E-55	169
difj9g09	EAA76770	gb	AAK68862	CCAAT-binding protein subunit HAP3 [ <i>Hypocrea jecorina</i> ]	1E-75	284
difj9h05	EAA76780	sp	O57539	Nuclear receptor coactivator [ <i>Xenopus laevis</i> ]	0,55	34
difj3e09	EAA76793	ref	NP_015502	Geranylgeranyltransferase Type II beta subunit; Bet2p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	1E-23	110
contig76	EAA76800	gb	AAS66028	hexose transporter [ <i>Aspergillus parasiticus</i> ]	2E-72	275
difjad10	EAA76841			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj6g05	EAA76842	ref	ZP_00109187	COG0161: Adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase [ <i>Nostoc punctiforme</i> ]	0,07	38
difj9d11	EAA76863			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
contig79	EAA76921	pir	JC7375	fructose-1,6-bisphosphatase [ <i>Aspergillus oryzae</i> ]	4E-52	168
difj6g02	EAA76922	pir	S50281	PMP32 protein peroxisomal membrane protein - yeast [ <i>Candida boidinii</i> ]	2E-16	88
difj7a08	EAA76927	pir	A30208	cross-pathway control protein 1 - Neurospora crassa	4E-42	174



<i>Clone ID</i>	<i>Acc FG</i>	<i>bdd</i>	<i>Acc Hit</i>	<i>Description du hit</i>	<i>E-value</i>	<i>Score</i>
difj9a10	EAA76934	sp	Q09722	COP9/signalosome complex subunit 7B [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	5E-34	147
difjbh06	EAA76960			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
contig106	EAA76971	emb	CAE47895	60S ribosomal protein l1-b, putative [ <i>Aspergillus fumigatus</i> ]	3E-91	305
difj4c03	EAA77044	gb	AAO13381	metacaspase [ <i>Aspergillus nidulans</i> ]	1E-119	430
difj8e09	EAA77101			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj7c11	EAA77135			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj7b03	EAA77220	ref	NP_594319	probable succinate dehydrogenase flavoprotein subunit precursor(ec 1.5) [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	5E-81	301
contig16	EAA77228	ref	XP_213850	similar to RIKEN cDNA 1500041N16 [ <i>Rattus norvegicus</i> ]	2E-50	201
contig105	EAA77289			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
contig4	EAA77289			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj2d07	EAA77289			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difjbe06	EAA77293			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj5h11	EAA77343	gb	AAB04131	sodium transport ATPase FST	0	895
difj9f12	EAA77343	gb	AAB04131	sodium transport ATPase FST	0	895
difjbf08	EAA77370	dbj	BAC66634	succinate dehydrogenase cytochrome b560 subunit [ <i>Coprinopsis cinerea</i> ]	3E-05	49
difj6c02	EAA77414	ref	NP_171806	Uncharacterized protein family UPF0005 with 7 transmembrane domains. [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	6E-17	87
difj7b12	EAA77414			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj2f04	EAA77447			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj6f02	EAA77464			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj9d09	EAA77469	pir	T52474	probable methyltransferase Pmt2 [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	1E-12	74
contig109	EAA77497	emb	CAD70957	probable ribosomal protein 10, cytosolic [ <i>Neurospora crassa</i> ]	1E-94	317
contig17	EAA77508			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj5g02	EAA77521	ref	NP_080671	RER1 homolog retrograde transport, Golgi to ER [ <i>Mus musculus</i> ]	9E-54	211
difjbh07	EAA77527	ref	NP_014886	pseudouridylates U2 snRNA at position 35; Pus7p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	1E-89	333
difjbf02	EAA77542			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difjbg05	EAA77573	ref	sp Q10156	LKH1_SCHPO Protein kinase lkh1	1E-106	389
difjbh12	EAA77624	gb	AAM19083	diacylglycerol acyltransferase [ <i>Sus scrofa</i> ] gb AAM66767  diacylglycerol acyltransferase [ <i>Sus scrofa</i> ]	0,048	39
contig108	EAA77628	ref	NP_013897	DNA damage-responsive protein 48 (DDR48)[ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	9E-20	99
difj1b08	EAA77628	ref	NP_013897	DNA damage-responsive protein 48 (DDR48)[ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	9E-20	99
difj9f03	EAA77628	ref	NP_013897	DNA damage-responsive protein 48 (DDR48)[ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	9E-20	99
difj5b09	EAA77629	gb	AAB39564	phosphoinositide-specific phospholipase C [ <i>Botryotinia fuckeliana</i> ]	2E-20	99
difjaf09	EAA77636	gb	AAO25609	NBP35 nucleotide binding protein [ <i>Candida glabrata</i> ]	1E-120	431

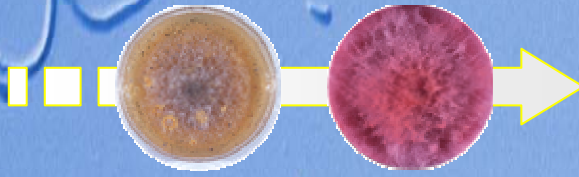
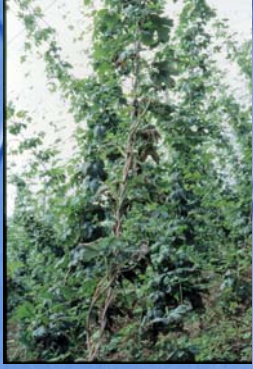
<i>Clone ID</i>	<i>Acc FG</i>	<i>bdd</i>	<i>Acc Hit</i>	<i>Description du hit</i>	<i>E-value</i>	<i>Score</i>
difj4d06	EAA77658			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj3h11	EAA77682	gb	AAH60414	MGC68656 protein [ <i>Xenopus laevis</i> ]	2E-27	124
difj8a08	EAA77922			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj4b08	EAA77986	gb	AAL56992	integral membrane protein [ <i>Blumeria graminis</i> ]	3E-13	78
difj9g07	EAA78050	sp	P08978	60S ribosomal protein L28 (L27A) (L29) (CRP1) [ <i>Neurospora crassa</i> ]	6E-16	84
difj9a05	EAA78085	gb	AAD38394	S-adenosylmethionine decarboxylase [ <i>Emericella nidulans</i> ]	3E-27	121
difjad12	EAA78103	ref	NP_012965	general amino acid permease; Gap1p [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	1E-136	488
difj4g03	EAA78111	dbj	BAC56975	5-carboxyvanillic acid decarboxylase [ <i>Sphingomonas paucimobilis</i> ]	2E-42	174
difj6c09	EAA78111	dbj	BAC56975	5-carboxyvanillic acid decarboxylase [ <i>Sphingomonas paucimobilis</i> ]	2E-42	174
difjbc01	EAA78113	emb	CAE47967	salicylate hydroxylase, putative [ <i>Aspergillus fumigatus</i> ]	0,75	35
contig80	EAA78230	pir	JC5861	endo-1,4-beta-xylanase (EC 3.8) [ <i>Humicola grisea</i> ]	1E-95	351
difj8e08	EAA78237	emb	CAD10036	deacetylase [ <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> ]	1E-18	94
difj8g01	EAA78248	emb	CAF05858	related to alpha-L-arabinofuranosidase A precursor [ <i>Neurospora crassa</i> ]	6,77E+02	0
contig25	EAA78258	emb	CAE47957	GabA permease, putative [ <i>Aspergillus fumigatus</i> ]	1E-129	463
difj2f12	EAA78281	emb	CAC39600	Prolidase (proline dipeptidase) [ <i>Emericella nidulans</i> ]	1E-154	547
difj9f11	EAA78294		NP_173921	choline transporter-related [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	4E-21	105
contig20	EAA78329	dbj	BAB78511	cystathionine beta-synthase [ <i>Pichia pastoris</i> ]	4E-34	144
difj6h09	EAA78365		CAA75926	acetyl-CoA carboxylase [ <i>Emericella nidulans</i> ]	0	8235
difj2b01	EAA78417		AAB51228	short-chain alcohol dehydrogenase [ <i>Aspergillus parasiticus</i> ]	8E-30	132
difj8f11	EAA78417		AAB51228	short-chain alcohol dehydrogenase [ <i>Aspergillus parasiticus</i> ]	8E-30	132
difj8h11	EAA78417		AAB51228	short-chain alcohol dehydrogenase [ <i>Aspergillus parasiticus</i> ]	8E-30	132
difjaa06	EAA78500	emb	CAD11898	subtilisin-like serine protease PR1C [ <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> ]	0	962
difj3c06	EAA78529	ref	NP_596430	transmembrane transporter liz1p. Sugar phosphate permease [ <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ]	1E-76	289
difj5c08	EAA78639	ref	XP_327956	GLUCOAMYLASE PRECURSOR [ <i>Neurospora crassa</i> ]	1E-166	586
difj3f09	EAA78652	emb	CAB06078	AmMst-1 monosaccharide transporter [ <i>Amanita muscaria</i> ]	6E-53	210
difj1d07	EAA78729	dbj	BAC54259	histone H2B [ <i>Rosellinia necatrix</i> ]	4E-48	190
difj5g07	EAA78730		CAA75581	histone H2A [ <i>Aspergillus niger</i> ]	4E-42	171
difj4f08	EAA78738		CAE00849	purine transporter [ <i>Emericella nidulans</i> ]	0	650
difj2h05	EAA78739			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
difj6d10	EAA78739			Protein expressed in other organisms without clear function assigned		
contig69		gb	AAO73810	heat shock protein CLPA [ <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> ]	7E-04	44
contig98		gb	AAO73810	heat shock protein CLPA [ <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> ]	3E-73	275

<i>Clone ID</i>	<i>Acc FG</i>	<i>bdd</i>	<i>Acc Hit</i>	<i>Description du hit</i>	<i>E-value</i>	<i>Score</i>
difj1d06		gb	AAO73810	heat shock protein CLPA [ <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> ]	2E-17	89
difj6e11		gb	AAO73810	heat shock protein CLPA [ <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> ]	7E-65	246
difj8h08		gb	AAR09756	Ribosomal protein L37e [ <i>Drosophila yakuba</i> ]	8E-05	48
difj1d10		gb	AAS10167	acidic amino acid permease [ <i>Penicillium chrysogenum</i> ]	1E-05	50
difj7d02		emb	CAA03987	GTP-binding protein (Ran) [ <i>Neurospora crassa</i> ]	3E-44	116
difj1a08		ref	NP_491690	aminotransferase, class I and II family member [ <i>Caenorhabditis elegans</i> ]	3E-37	155
contig88		ref	NP_983969	ADL127Cp Ribosomal Proteins L2, RNA binding domain [ <i>Eremothecium gossypii</i> ]	2E-57	127
difj1g02		ref	NP_984912	AER052Wp Ribosomal protein S14 [ <i>Eremothecium gossypii</i> ]	2E-08	60
difj4f05		sp	O42784	Guanine nucleotide-binding protein alpha subunit [ <i>Colletotrichum trifolii</i> ]	1E-102	371
contig93		sp	P42041	Aldehyde dehydrogenase (ALDDH) (Allergen Alt a 10) [ <i>Alternaria alternata</i> ]	6E-82	184
difj5h09				EST		
difj1a09				EST		
difj2g11				EST		
difj4d02				EST		
difj4h04				EST		
difj6h02				EST		
difj7g10				EST		
difj8c02				EST		
difj8d08				EST		
difj8e11				EST		
difj9a02				EST		
difj9d03				EST		
difj9d08				EST		
difjac05				EST		
difjbb03				EST		
difjbd08				EST		
difjbd10				EST		
difjbd12				EST		



# Identification et caractérisation des *Fusarium* isolés sur des plants de Houblon en dépérissement

HATSCH D. @ ; PHALIP V. ; JELTSCH J.M.



## Introduction :

Le houblon, *Humulus lupulus* L., est une plante pérenne dioïque dont les fleurs femelles sont utilisées comme épice aromatique dans les processus brassicole. La région Alsace assure 1,3% de la production mondiale. Cependant le houblon est sujet à des épisodes pathologiques se traduisant par le dépérissement des lianes et par conséquent des pertes importantes de rendement. Une collection de champignons filamenteux a été créée à partir de prélèvements effectués sur des plants de houblon malades. Au sein de cette collection, 12 souches présentent des éléments caractéristiques du genre *Fusarium* : couleur et morphologie des macroconidies. Une des souches est *F.graminearum*.

## Microséquençage de peptide :

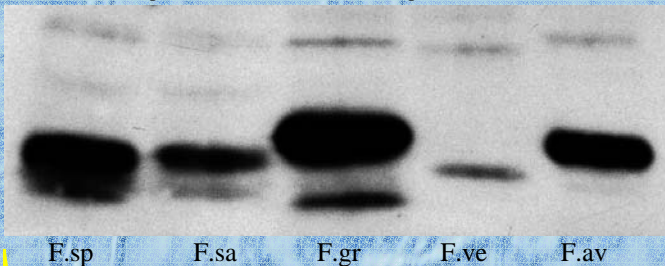
Lors de la culture de *F.graminearum* en milieux M3 supplémenté en carboxy-méthyl-cellulose (CMC), une protéine ayant une activité cellulolytique est excrétée. Après digestion trypsique de cette enzyme, les fragments ont été microsequencés. Trois peptides ont été obtenus : *FGI-1*, *FGI-2* et *FGI-3*. Nous avons utilisé ces résultats pour développer pour mettre au point une méthode d'identification basée sur deux approches.

## Approche protéique :

Un anticorps a été obtenu par injection du peptide FGI-1 chez le lapin. Cet anticorps permet la détection spécifique de Cellobiohydrolase-C du genre *Fusarium*.

## Western :

La détection par western blot des Cellobiohydrolases-C contenues dans les surnageants de culture M3+CMC, permet la détermination de 4 profils identifiants 3 espèces et un doublet de deux espèces.



F.sp : *Fusarium sporotrichioides* ; F.sa : *Fusarium sambucinum* ; F.gr : *Fusarium graminearum* ; F.ve : *Fusarium venenatum* ; F.av : *Fusarium avenaceum*

## Approche nucléaire :

Des primers dégénérés ont été dérivés des peptides : FGI-1 ; FGI-2. Ils ont permis d'amplifier une partie du gène de la cellobiohydrolase-C chez tous les *Fusarium* de la collection, dont les séquences ont été déterminées.

## CAPS :

A partir des alignements de séquence des primers spécifiques consensus ont été déterminés menant à une amplification chez tous les *Fusarium*. L'étude des alignements des séquences a permis de mettre au point une méthode de distinction entre espèces du genre *Fusarium* par Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS). Les différences étant majoritairement dues à la présence d'un intron dans la séquence



B : *Bsm*AI ; H : *Hph*I ; E : *Eco*RI ; ND : non digéré

## Identification par combinaison des deux approches

CAPS	<i>F.avenaceum</i> / <i>F.graminearum</i> / <i>F.venenatum</i>	<i>F.graminearum</i> / <i>F.venenatum</i> / <i>F.avenaceum</i>	<i>F.graminearum</i> / <i>F.venenatum</i> / <i>F.avenaceum</i>	<i>F.graminearum</i> / <i>F.venenatum</i> / <i>F.avenaceum</i>	<i>F.graminearum</i> / <i>F.venenatum</i> / <i>F.avenaceum</i>	<i>F.graminearum</i> / <i>F.venenatum</i> / <i>F.avenaceum</i>
Western	Fgr	Fsp / Fsa	Fve	Fave	Ftr	X
Identité :	Fgr	Fsp	Fsa	Fve	Fave	Ftr

## Conclusions / perspectives :

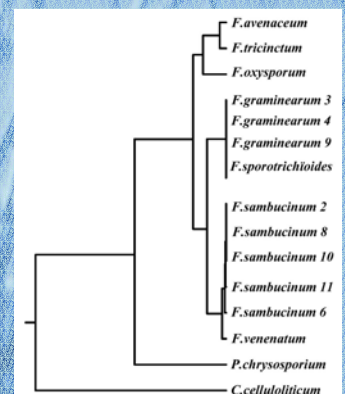
La combinaison des l'analyses CAPS et western :

- ↳ permet une identification de six espèces de *Fusarium* en quelques jours à partir de souches isolées.
- ↳ à terme permettra l'identification en quelques jours à partir d'un échantillon de plante en dépérissement, fournissant un diagnostic rapide aux producteurs de houblon.

## Phylogénie

basée sur une partie de la séquence de Cellobiohydrolase-C.

- *Phanerochaete chrysosporium* : champignon cellulolytique
- *Clostridium cellulolyticum* : Bactérie cellulolytique





# Data mining : finding specific genes in a phytopathogenic fungus.

## A case study : *Fusarium graminearum*'s xylanases.

Didier HATSCH\*, Vincent PHALIP, Jean-Marc JELTSCH

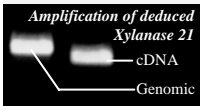
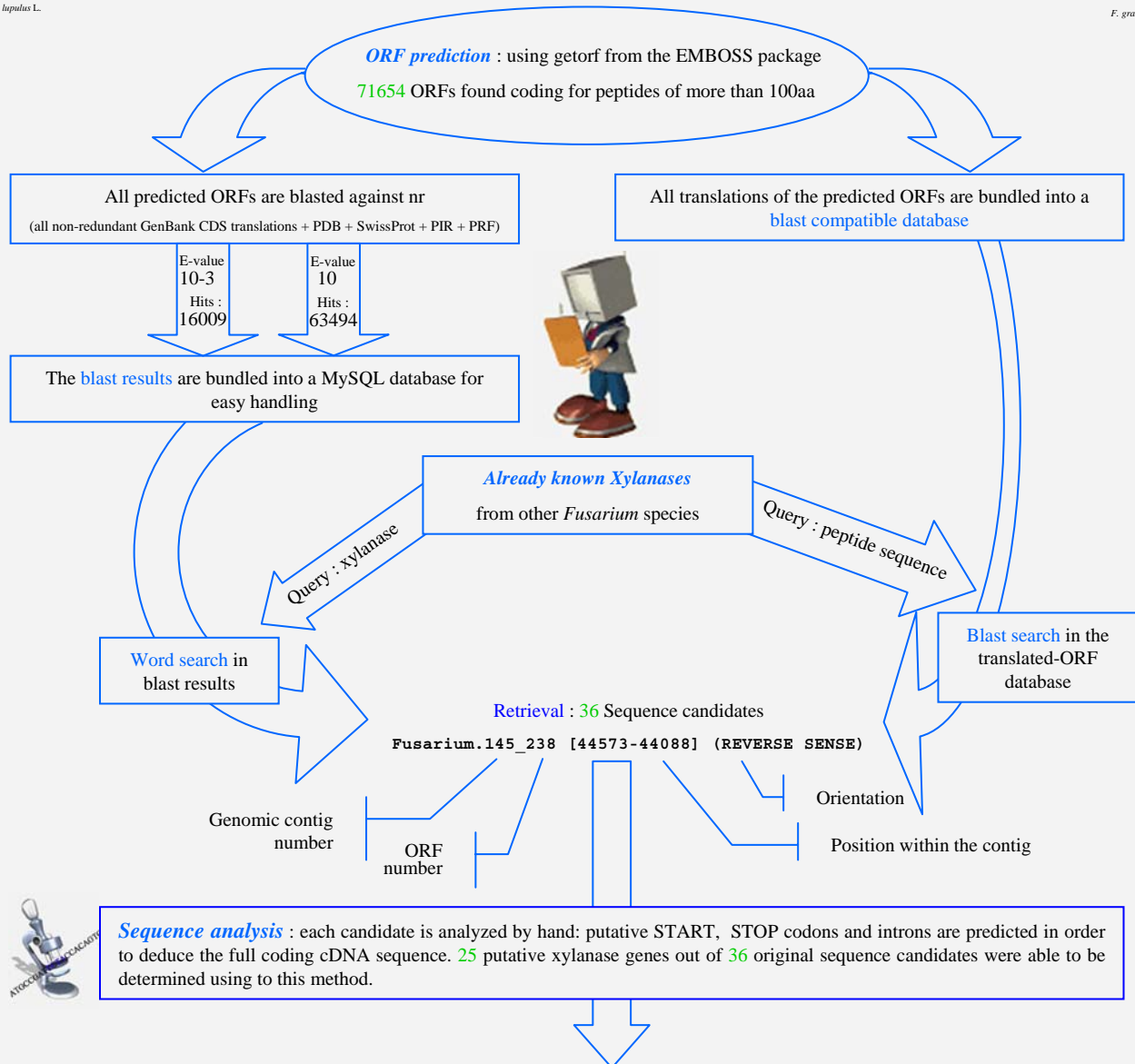


*Humulus lupulus L.*

**Introduction :** *Fusarium graminearum* is a widespread phytopathogenic filamentous fungus. It infects several plants of agricultural value : wheat, barley and rice, causing serious crop losses. Moreover, on a local level, we have found some specimens on diseased hops (*Humulus lupulus L.*). The genome of this fungus was released by the Whitehead Institute/MIT, Center for Genome Research (WI-CGR) on May 1st 2003. In order to quickly identify protein candidates implicated in phytopathogenesis among these crude data, a combination of approaches has been developed in our laboratory. Cell Wall Degrading Enzymes are often implicated in phytopathogenesis; among these we focused on xylanases (EC 3.2.1.8/32/136, ≈300 amino acids), as some of them are overexpressed during plant infection.



*F. graminearum*



**Validation of the candidates :** mRNA was extracted from a culture of *F. graminearum* grown on hop cell walls. The predicted cDNA were successfully amplified through RT-PCR, cloned and sequenced. Therefore, the gene products of the 22 targets are no longer putative but expressed proteins.

**Perspectives :** The cloned cDNAs have to be expressed in order to confirm xylanase activity. Furthermore, the implication in pathogenesis of these candidate genes will be investigated through expression pattern under different conditions using macro arrays. Finally, the implication of each of these genes in plant pathogenesis will be tested by gene knock-out.



**Conclusion :** The data mining method presented uses basic bioinformatic methods. Search parameters have to be well defined (ORF size, E-value, words). Although it is possible that we could miss some candidates, we have set up very stringent parameters to obtain reliable results : 25 expressed genes out of 36 sequence candidates. This method appears to be powerful and could be applied to other targets than xylanases.

The tools are available at: <http://biotec.u-strasbg.fr>

## The genes encoding cellobiohydrolase-C and topoisomerase II used as targets for phylogenetic analysis and identification of *Fusarium* at a species level.

Hatsch D., Phalip V., Jeltsch J.-M.

UMR 7100 / IFR 85 – Laboratoire de phytopathologie – ESBS – Boulevard Sébastien Brant – 67 400 Illkirhc-Graffenstaden

rDNA is a widely used target for phylogenetic studies and molecular identification techniques, but is sometimes insufficient. However the use of other target sequences may allow more reliability and accuracy.

The partial sequence of the Cellobiohydrolase-C gene of 17 *Fusarium* was cloned and sequenced. The genomic fragments ranged from 327 to 344bp and contained one intron inducing the length variability. These sequence data allow completing of our CAPS method based on this region (actualized data on : <http://biotec.u-strasbg.fr>).

Moreover a genomic fragment of 724bp coding for the ATP binding domain of the topoisomerase II gene have been cloned and sequenced for the 11 *Fusarium* species of our collection. In addition a fragment ranging from 1123 to 1157bp containing ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 and the 5' end of the 28S rDNA was cloned and sequenced for all the species, confirming the previous identification.

Phylogenetic analyses of aligned sequences obtained though the three targets show strongly congruent results. The three phylogenetic trees build with the data gained from the three regions showed the same topology. The variability found in the topoisomerase II and cellobiohydrolase-C gene part is high enough to clearly separate the 11 *Fusarium* species.

In conclusion these two new genetic markers can be seen as valuable for the identification and phylogenetic study of the *Fusarium* species.

## **Résumé**

*Fusarium graminearum* est un agent pathogène de première importance pour les cultures céréalières. Cette espèce n'est pas répertoriée comme pathogène du houblon (*Humulus lupulus* L.), cependant elle a été retrouvée en Alsace sur cette plante lors d'épisodes de dépérissement. Une technique d'identification des espèces du genre *Fusarium* basée sur la cellobiohydrolase-C associant une méthode CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) et une analyse par western blot a été mise au point. Elle permet d'identifier rapidement et à moindre coût 11 espèces de *Fusarium*. Dans le but d'améliorer la fiabilité de l'identification nous avons retenu un autre marqueur moléculaire : la topoisomérase II. Ces deux nouveaux marqueurs ont été validés et se montrent plus pertinents dans la détermination des espèces du genre *Fusarium* que l'ADNr. Une approche de génomique a permis de prédire et de valider 22 gènes codant putativement pour des xylanases. Lors d'une approche transcriptomique quantitative, l'expression des différents gènes a permis de mettre en évidence l'implication majoritaire de 4 xylanases dans la dégradation de parois végétales. La construction et le criblage aléatoire d'une banque suppressive soustractive a mis en évidence de nombreuses CWDE (Cell Wall Degrading Enzymes) et confirmé l'implication des xylanases majoritaires dans la dégradation des parois végétales. De plus des gènes candidats potentiellement impliqués dans la pathologie ont également été révélés. Ce travail est une première exploration du couple *Humulus lupulus* / *Fusarium graminearum* comme modèle d'étude. L'apport des marqueurs moléculaires permet d'entamer une nouvelle approche des populations de *Fusarium* sur des plants de houblon. L'identification de CWDE étant activées lors du processus infectieux permet d'engager la recherche d'inhibiteurs de ces enzymes, afin de comprendre et de contrôler la pathologie.

## **Abstract**

*Fusarium graminearum* is a pathogen of first importance for cereal crops. This species is not described as a hop (*Humulus lupulus* L.) pathogen, however it was found in Alsace on this plant during decay episodes. An identification method of the species of the genus *Fusarium* based on the cellobiohydrolase-C and combining CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) analysis and western blot has been developed. This method allows the quick and reliable identification of 11 species of *Fusarium*. We investigated another molecular marker: the topoisomerase II. These two novel markers showed a better accuracy in the determination of *Fusarium* species than the rDNA. Through a genomic strategy, 22 genes coding putatively for xylanases were predicted and validated. A transcriptomic approach, allowed the determination of gene expression profile of the predicted genes and underlined the major implication of 4 xylanases in cell wall degradation. The construction and random sequencing of a subtractive suppressive library highlighted several CWDE (Cell Wall Degrading Enzymes) and confirmed the implication of the major xylanases in the degradation of plant cell walls. Moreover gene candidates putatively implicated in pathologies have also been revealed. This work is a first step in the study of the *Humulus lupulus* / *Fusarium graminearum* system as a model. The two novel molecular markers allow a new insight in fungal communities on hop plants. The identification of CWDE putatively implicated in pathologies will lead to the design of inhibitors in order to understand and control the pathological process.