

Evaluation et compréhension des mécanismes fongiques impliqués dans la dégradation du bois

Serge-Thierry Lekounoungou

▶ **To cite this version:**

Serge-Thierry Lekounoungou. Evaluation et compréhension des mécanismes fongiques impliqués dans la dégradation du bois. Autre. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2008. Français. NNT : 2008NAN10027 . tel-01748530

HAL Id: tel-01748530
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748530

Submitted on 29 Mar 2018

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

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

AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

U. F. R. ENSTIB
Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources Procédés Produits et Environnement
Département de Formation Doctorale Sciences du Bois

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-I

par

Serge-Thierry Lekounoungou

Evaluation et Compréhension des Mécanismes fongiques impliqués dans la dégradation du bois

Soutenue publiquement le 4 avril 2008 devant la commission d'examen :

Rapporteurs : Bernard KUREK, Directeur de Recherche INRA

Rapporteurs : Bertrand CHARRIER, Maître de Conférences, Université de Pau

Président : Bernard BOTTON, Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy-I

Examinateur : Marie France THEVENON, Responsable du laboratoire Préservation des bois, CIRAD

Examinateur : Eric GELHAYE, Maitre de Conférences, Université Henri Poincaré, Nancy-I

Examinateur : Philippe GERARDIN, Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy-I

UMR 1136 INRA/UHP, Interactions Arbres Microorganismes
UMR 1093 INRA/ENGREF/UHP, Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur le Matériau Bois
Faculté des Sciences et Techniques, 54506 Vandoeuvre les Nancy, France

A MES PARENTS

A CHARLENE

Remerciements

Je tiens à remercier tous ceux qui ont de près ou de loin aidé à la réalisation de ce travail :

- Monsieur Jean Pierre Jacquot Professeur en physiologie/biochimie végétale à l'Université Nancy-I, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire IaM (Interaction arbres/microorganismes) et pour ces judicieux conseils.

- Monsieur Eric Gelhaye Maître de conférences à l'Université Nancy-I, pour avoir dirigé cette thèse, je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour la disponibilité dont il a su faire preuve à mon égard et pour les conseils éclairés qu'il m'a prodigués pendant ces quatre années, ainsi qu'à la confiance qu'il m'a témoignée.

- Monsieur Philippe Gérardin Professeur en chimie organique à l'Université Nancy-I, codirecteur de cette thèse de m'avoir accueilli au sein du Laboratoire d'Etude et de Recherche sur le Matériau Bois (LERMAB). Pour la confiance qu'il m'a accordée, l'intérêt qu'il a apporté à ce travail, et ces précieux conseils, je tiens à l'assuré de ma profonde reconnaissance.

- Monsieur Stéphane Dumarçay et Mathieu Pétrissans Maître de conférences à l'Université nancy-I, pour les conseils qu'ils m'ont prodigués.

J'exprime ma plus profonde gratitude aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail **:** Messieurs Bernard Kurek, Directeur de Recherche INRA, Reims, Bertrand Charrier, Maître de Conférences, à l'Université de Pau, Bernard Botton, Professeur émérite en physiologie végétale à l'Université Henri Poincaré, Nancy-I et Madame Marie France Thevenon, Responsable du laboratoire Préservation des bois, CIRAD, Montpellier.

Je remercie également les membres du laboratoire IaM, Philipe, Nicolas Rouhier, Mélanie, Kamel, Nicolas Navrot, Jérémie et Pierre-Emmanuel pour leurs conseils et leurs amitiés.

Je remercie aussi les membres du LERMAB, Steeve, Gildas, Bouddha, Kamal, Thierry et sa femme dely, Mounir, Lyne, Ludovic et Peter pour leurs conseils, leurs amitiés et leur bonne humeur.

Ma reconnaissance s'adresse également aux membres de ma famille, monsieur et madame Ngamamba, madame Oboum's, Amélie, Diane, Olive, Wendy, Euder, Jacques qui m'ont assisté moralement et matériellement à la réalisation de ce travail.

Mes remerciements s'adressent aussi à Charlène Maxant et à toute sa famille qui ont contribué à la réalisation de ce travail par leur assistance morale et leurs conseils.

En fin, je tiens à remercier le gouvernement gabonais pour la bourse qui m'a permis de réaliser ce travail.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION 3

2. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE 5

2.1. Formation et composition chimique du bois 5
2.1.1. Constitution du matériau bois 5
2.1.2. Composition chimique du bois 6
2.1.3. Substances macromoléculaires 7
2.1.3.1. La cellulose 7
2.1.3.2. Les hémicelluloses 9
2.1.3.3. La lignine 10
2.1.4. Substances de faible poids moléculaire 12
2.1.4.1. Extraits 12
2.1.4.2. Terpènes et terpénoïdes 12
2.1.4.3. Glycérides, cires et leurs constituants 13
2.1.4.4. Constituants phénoliques 14
2.2. Les champignons de pourriture blanche 17
2.3. *Trametes versicolor* 18
2.3.1. Le système de dégradation de la lignine 19
2.3.1.1 Les lignine peroxydases (LiPs) 20
2.3.1.2. Les manganèse peroxydases (MnPs) 21
2.3.1.3. Les laccases 23
2.3.1.4. Les enzymes auxiliaires 24
2.3.1.4.1. Aryl alcool oxydase (AAO) 25
2.3.1.4.2. Glyoxal oxydase (GOx) 25
2.3.1.4.3. Aryl alcool déhydrogénase (AAD) 26
2.3.1.4.4. La pyranose oxydase (POD) 26
2.3.1.4.5. Cellobiose déhydrogenase (CDH) 27
2.3.1.4.6. Autres enzymes auxiliaires 27
2.3.1.4.7. Réactions générant des radicaux chez *T. versicolor* 28
2.3.2. Système enzymatique dégradant les polysaccharides 30
2.3.2.1. Le système de dégradation de la cellulose 30
2.3.2.2. Le système de dégradation des hémicelluloses 32
2.3.2.2.1. Les acétyl xylane estérases 33
2.3.2.2.2. Les α-glucuronidases 33
2.3.2.2.3. Les β-xylosidases 33
2.3.2.2.4. Les α-arabinofuranosidases 33
2.3.3. Régulation des activités extracellulaires 33
2.3.3.1. Expression des gènes ligninolytiques 34

2.3.3.2. Expression des cellulases....35
2.3.3.3. Expression des hémicellulases....36
2.4. Préservation du bois....37

3. OBJECTIFS.....40

4. RESULTATS..... 42

4. 1 : Etapes du processus de colonisation du bois par *T. versicolor*.....42
4.1.1. Introduction....42
4.1.2. Résultats....44
4.1.3. Conclusion....59

4.2. Stade initial de la colonisation du bois par le champignon *T. versicolor*.....61
4.2.1. Introduction....61
4.2.2. Résultats....61
4.2.3. Conclusion....78

4.3. Effet du propiconazole sur la production d'enzymes extracellulaires 79
4.3.1. Introduction....79
4.3.2. Résultats....80
4.3.3. Conclusion....92

4.4. Effet de la caféine sur la croissance des champignons de pourriture du bois.....93
4.4.1. Introduction....93
4.4.2. Résultats....93
4.4.3. Conclusion....106

4.5. Effet du traitement traitement thermique sur les activités enzymatiques 107
4.5.1. Introduction....107
4.5.2. Résultats....108
4.5.3. Conclusion....106

5. DISCCUSSION GENERALE..... 122

6. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES..... 129

7. BIBLIOGRAPHIE..... 131

INTRODUCTION

1. Introduction

Le bois dispose de nombreux atouts qui en font un matériau idéal pour la construction. En plus de ses qualités esthétiques, c'est un matériau léger, résistant, isolant et renouvelable. Comme la pierre et l'argile, il fait partie des matériaux de construction les plus anciens. Sa facilité d'emploi, de façonnage et ses propriétés mécaniques ont fait que, pendant des millénaires, le bois a été et est encore abondamment utilisé. Le bois est l'un des plus anciens matériaux utilisés par l'homme, il jalonne notre histoire et a fait l'objet de progrès technologiques majeurs dans différents domaines comme la construction, l'ameublement ou la fabrication d'instruments de musique.

Toutefois, en tant que matériau naturel, le bois est sensible à de nombreux agents de dégradation abiotiques ou biotiques comme les insectes et les micro-organismes (champignons et bactéries). Les détériorations les plus importantes sont provoquées par les champignons lignivores qui ont la capacité de décomposer les polymères complexes constituant le bois.

La complexité et l'hétérogénéité du bois, son instabilité dimensionnelle, son hygroscopicité et sa faible résistance aux agents de dégradation ont conduit, au cours des dernières décennies, à l'utilisation de plus en plus importante de matériaux de construction concurrents tels que le béton, le PVC ou l'aluminium qui ont bénéficié d'un développement rapide du fait de leur durabilité plus importante. Néanmoins, dans le contexte actuel du réchauffement climatique, le bois en tant que matériau renouvelable capable de stocker le CO_2 connaît un nouvel essor et prend une dimension importante dans la mise en œuvre des nouvelles politiques de développement durable mises en place par les différents gouvernements.

Dans ce cadre, les produits de préservation du bois sont également soumis à de nouvelles normes environnementales telles que la Directive Biocide, dont l'objectif est de réduire les nuisances occasionnées par l'utilisation de produits trop toxiques pour l'environnement. Jusqu'à présent, les produits chimiques utilisés pour protéger le bois pouvaient être divisés en trois grandes familles : les produits huileux, les produits organiques et les sels métalliques. Le traitement des déchets de bois arrivés en fin de vie, le relargage de biocides dans l'environnement lors du traitement et de la mise en œuvre des bois traités et la toxicité potentielle de ces produits pour les écosystèmes constituent les principales limites de ces méthodes de protection du bois.

Une maîtrise et une connaissance approfondie des différents systèmes enzymatiques des champignons lignivores pourraient permettre de mettre au point des produits ou des formulations de préservation plus respectueuse de l'environnement. En effet, plutôt que d'utiliser des biocides à

large spectre d’activité, peu sélectifs des micro-organismes visés, il semble intéressant de développer des produits pouvant avoir une action ciblée sur certains systèmes enzymatiques impliqués dans la dégradation du bois. Par ailleurs, une meilleure connaissance des activités enzymatiques fongiques exprimées lors de la dégradation du bois pourrait permettre la mise au point de tests de détection de l’activité du champignon en temps réel ouvrant ainsi de nouvelles perspectives quant à l’évaluation de l’efficacité de nouveaux produits de préservation.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

2. Partie Bibliographique

2.1. Formation et composition chimique du bois

2.1.1. Constitution du matériau bois

Le bois, encore appelé xylème, est un tissu végétal qui joue un double rôle chez les plantes vasculaires : conducteur de la sève brute et tissu de soutien donnant leur résistance aux tiges, pouvant parfois également jouer le rôle de tissu de réserve. Il présente un ensemble de tissus résistants secondaires (soutien, conduction et réserve) formant le tronc, les branches et les racines des plantes ligneuses. Issu du fonctionnement du cambium périphérique, il est situé entre celui-ci et la moelle (figure 1).

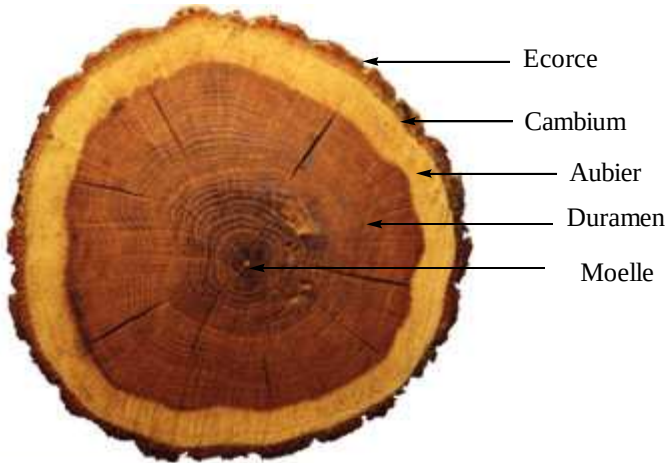


Figure 1. Coupe transversale d'un tronc

Le bois est composé de différents types de tissus végétaux : tissus vasculaires, fibres et parenchymes de réserves (figure 2). Les fibres sont des faisceaux de cellules, disposées dans le sens axial, qui assurent la rigidité et la résistance mécanique du bois. Les tissus vasculaires sont formés de vaisseaux, cellules creuses qui servent à conduire la sève brute depuis les racines jusqu'aux feuilles.

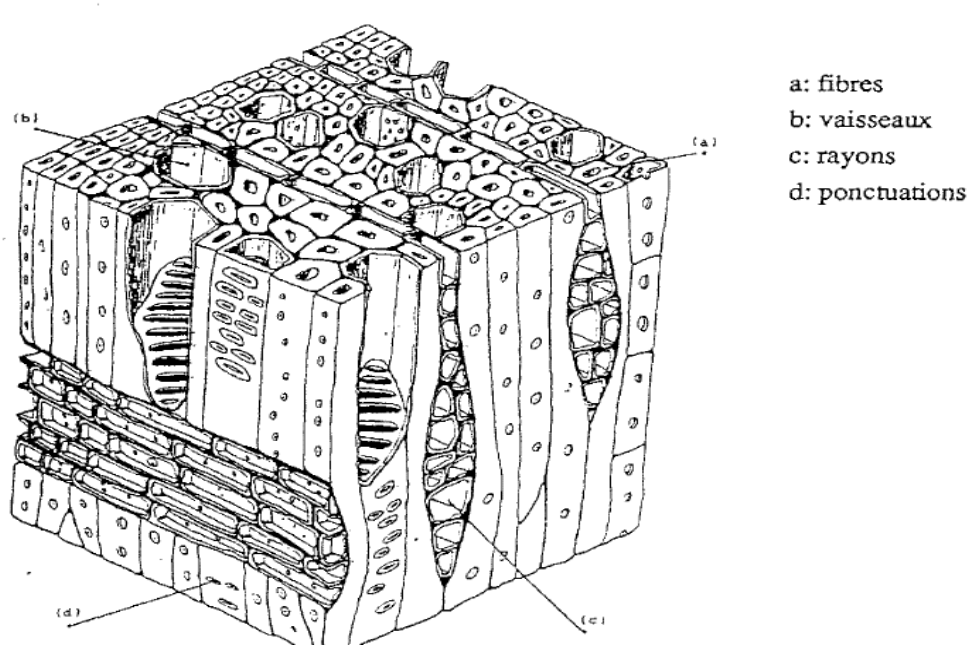


Figure 2. Organisation cellulaire du bois des feuillus.

Chez les résineux, les vaisseaux sont appelés trachéides. Ces dernières participent également aux fonctions de conduction de sève et de soutien. Le bois est un matériau anisotrope présentant des propriétés différentes en fonction des trois directions axiale, tangentielle et longitudinale qui le constituent.

La disposition des tissus, la forme et la taille des cellules déterminent les différents plans ligneux. Ces derniers sont caractéristiques de chaque essence. L'orientation générale des cellules et des fibres est dans le sens axial, déterminant le fil du bois.

2.1.2. Composition chimique du bois

La composition chimique du bois est complexe. Une première distinction peut être faite entre les composants macromoléculaires des parois cellulaires (cellulose, hémicelluloses et lignine) constituant l'essentiel du matériau et les composants de faible poids moléculaire tels que les substances minérales et les extractibles généralement présents en faibles quantités. Les proportions et la composition chimique de la lignine et des polyoses diffèrent suivant les types de bois et tout particulièrement selon la nature de l'essence (feuillus ou résineux) (Saka, 1991). Ces polymères végétaux ne sont pas distribués uniformément au sein des parois cellulaires. De plus, leurs proportions varient en fonction de la localisation dans le bois. Le tableau 1 présente les proportions des composants chimiques dans le bois.

Composant	Proportion dans le bois
Cellulose	30 % à 50 %
Hémicellulose	15 % à 35 %
Lignine	15 % à 30 %

Tableau 1. Composition chimique du bois

Les proportions des différents constituants macromoléculaires peuvent varier légèrement selon l'essence envisagée. Il existe également des substances extractibles présentes en quantités plus ou moins importantes (2 à 10 % en moyenne pour les essences de zones tempérées). Ces extractibles peuvent être de nature chimique très variée et comprennent les cires, les graisses, les terpènes et les composés phénoliques, ces derniers se divisant eux-mêmes en différentes catégories : les phénols simples, les lignanes, les flavonoïdes et les tannins. En plus de ces extractibles de nature organique, il existe également des extractibles d'origine minérale, dont la quantité dépasse rarement 1 % chez les essences des zones tempérées. Les essences des zones tropicales renferment généralement des teneurs en extractibles plus élevées.

2.1.3. Substances macromoléculaires

2.1.3.1. La cellulose

La cellulose se situant dans la paroi cellulaire, constitue la structure de base des cellules végétales. C'est la substance naturelle la plus abondante produite par les organismes vivants sur terre (environ 40 % du carbone organique). On estime que la production mondiale de cellulose est de l'ordre de $1{,}3.10^{10}$ tonnes par an. La cellulose correspond à un polymère linéaire constitué d'unités β-D-glucopyranose liées entre elles par des liaisons β-1,4 glycosidique (figure 3). Le degré de polymérisation (DP) moyen de la cellulose, correspondant au nombre de motifs de β-D-glucopyranose, est de l'ordre de 10000.

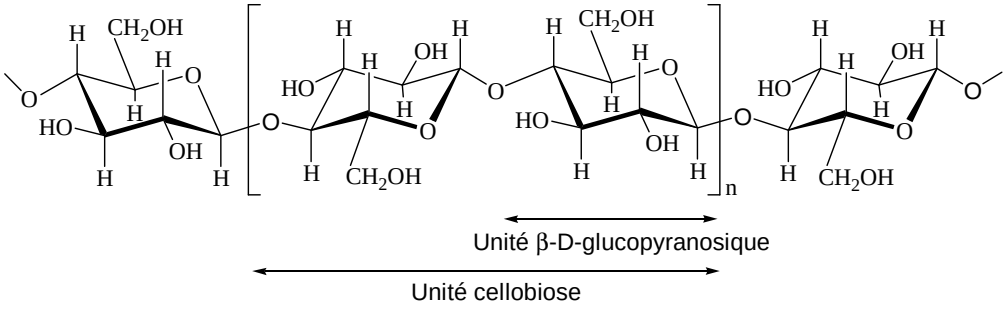


Figure 3. Structure de la cellulose

Les nombreux groupements hydroxyle sont responsables du comportement physico-chimique de la cellulose. Selon leur position dans l'unité glucose, ils sont capables de former des liaisons hydrogène intramoléculaires à l'intérieur d'une même chaîne de cellulose ou intermoléculaires entre deux chaînes différentes constituant ainsi des micro-domaines hautement organisés. Ces liaisons hydrogène sont responsables de la formation des microfibrilles dans lesquelles certaines régions sont hautement ordonnées (régions cristallines) et d'autres moins (régions amorphes) (figure 4). Les microfibrilles de cellulose sont imbriquées dans une matrice d'hémicelluloses et de lignine, le tout constituant la paroi cellulaire (Marchessault et Sundararajan, 1983).

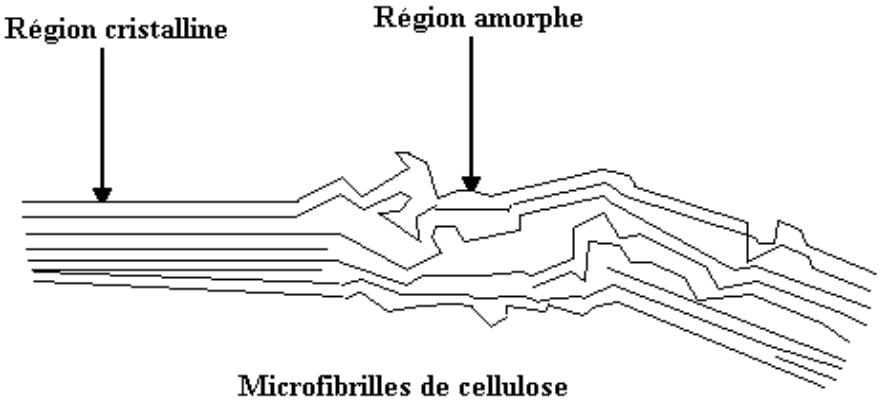


Figure 4. Représentation schématique des zones cristallines et amorphes de la cellulose

La structure cristalline de la cellulose a été déterminée par diffraction des rayons X ainsi que par des méthodes basées sur la polarisation du rayonnement infrarouge (Emsley et Stevens, 1994 ; Marchessault et Sundararajan, 1983). Des études ont été réalisées pour déterminer la structure cristalline des microfibrilles dans différents types de cellulose natives ou traitées chimiquement (Sarko, 1978). Quatre structures de cellulose cristalline (Cellulose I, II, III et IV) ont été mises en évidence. La principale différence entre ces structures est le déplacement latéral des chaînes et leurs liaisons. La cellulose I est la forme prédominante dans les parois secondaires des plantes, elle est quelquefois appelée cellulose native. Dans cette forme, les liaisons des chaînes sont orientées parallèlement en formant des liaisons hydrogène. La cellulose II est obtenue à partir de la cellulose I par un traitement à l'hydroxyde de sodium. Les chaînes ainsi obtenues sont orientées de manière antiparallèle avec formation de plusieurs liaisons hydrogène consécutives rendant la cellulose II plus stable que la cellulose I. La cellulose III est, quant à elle, obtenue à partir de la cellulose I ou II en effectuant un traitement à l'ammoniac. La cellulose IV est la forme prédominante des parois cellulaires primaires des plantes, elle peut être obtenue par chauffage de la cellulose III dans du glycérol.

2.1.3.2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses sont définies comme étant des hétéropolysaccharides non cellulosiques présents dans les parois cellulaires des végétaux**.** Ces macromolécules polyosidiques présentent une grande diversité structurale (Fengel and Wegener, 1984). Les chaînes des hémicelluloses présentent un degré de polymérisation moyen de 150 unités plus faible que celui de la cellulose et sont, au contraire de la cellulose, ramifiées. Elles sont constituées d'unités osidiques différentes réparties de façon plus ou moins aléatoire. La structure des différentes unités osidiques présentes dans les hémicelluloses est rapportée figure 5.

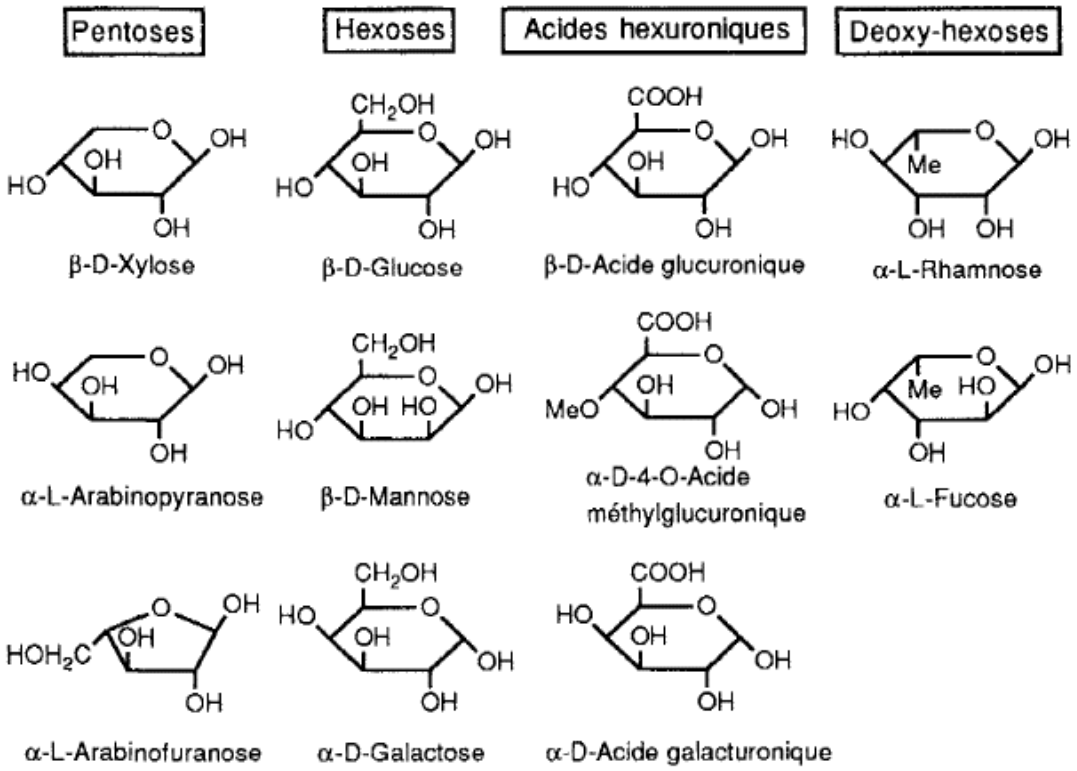


Figure 5. Oses simples composant les hémicelluloses (Fengel et Wegener**,** 1984)

Différents types d'hétéropolysaccharides peuvent être rencontrés dans le bois, leur structure variant selon les essences (Joseleau, 1980) :

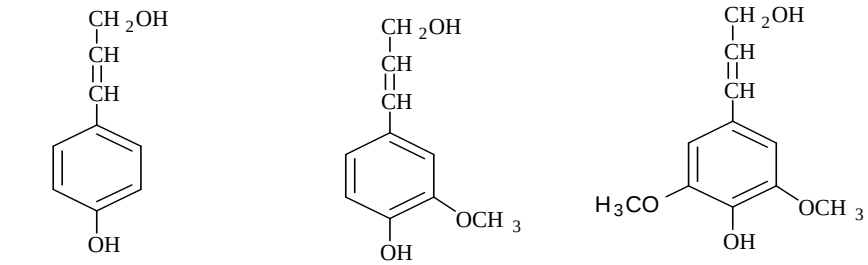
- des glucuronoxylanes et des glucomannanes chez les feuillus,
- des arabinoglucuronoxylanes, des galactoglucomannanes et des arabinogalactanes chez les résineux.

A la différence de la cellulose, les hémicelluloses sont principalement amorphes et par conséquent leur réactivité chimique plus importante, expliquant leur vitesse de dégradation plus élevée lors de la pyrolyse du bois. En terme d'applications industrielles, les hémicelluloses sont

essentiellement utilisées pour la production d'oses. En effet, en milieu acide, l'hydrolyse des hémicelluloses conduit aux monomères constitutifs tels que le xylose, le glucose et l'arabinose (Jacquinot et al., 1989). La fermentation alcoolique ou enzymatique des oses ainsi formés, les transforme en alcools (éthanol, butanol) (Delgenes et al., 1989) et en acides organiques (butyrique, acétique, lactique …) (Lund and Spendler, 1989).

2.1.3.3. La lignine

La lignine est, après la cellulose, la matière organique renouvelable la plus abondante dans la nature. La lignine constitue la fraction non saccharidique la plus importante des fibres végétales. C'est la matière "incrustante" de la cellulose. C'est un polymère polyphénolique amorphe synthétisé par la plante à partir de trois précurseurs de type phénylpropane : les alcools p-coumarylique, coniférylique et sinapylique (figure 6).



Alcool p-coumarylique Alcool coniférylique Alcool synapylique

Figure 6. Alcools précurseurs de la lignine

Contrairement à la cellulose qui présente une structure régulière, la lignine présente une structure très complexe. Sa composition est différente suivant les espèces végétales. La composition varie également à l'intérieur d'une même essence selon qu'il s'agit de bois normal ou de bois de réaction ou encore au niveau pariétal en fonction de la localisation dans la paroi cellulaire, la lamelle mitoyenne étant généralement plus riche en lignine. La lignine des résineux est constituée principalement d'unités guaïacyl obtenues à partir de l'alcool coniférylique et d'une faible quantité d'unités *p*-hydroxyphényl obtenue à partir de l'alcool *p*-coumarylique. Par contre, la lignine de feuillus comprend des proportions équivalentes, de groupements guaïacyl et syringyl, ces derniers dérivant de l'alcool synapylique ainsi qu'une faible quantité de groupements *p*-hydroxyphényl (figure 7).

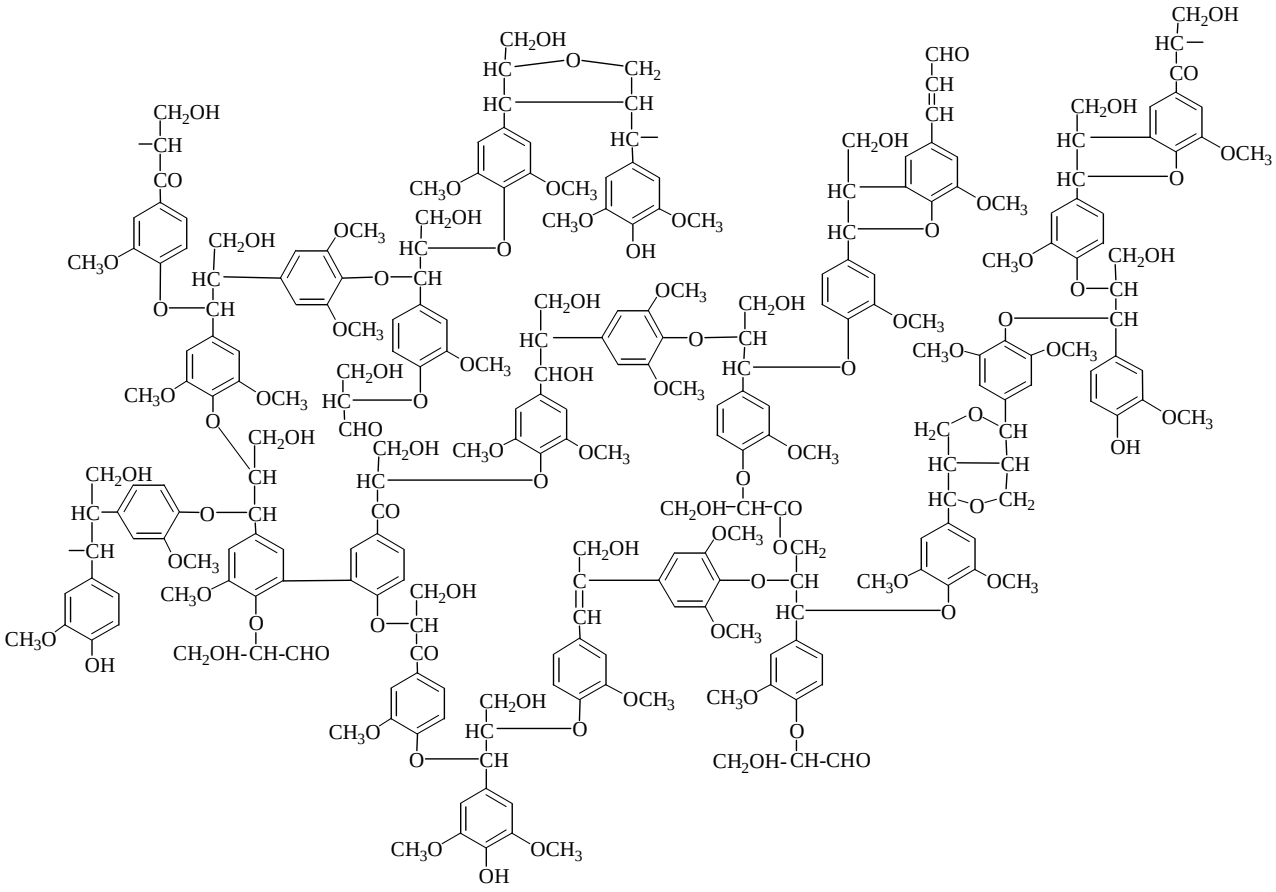
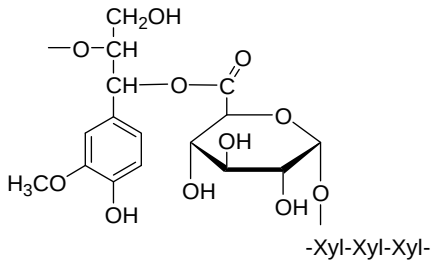
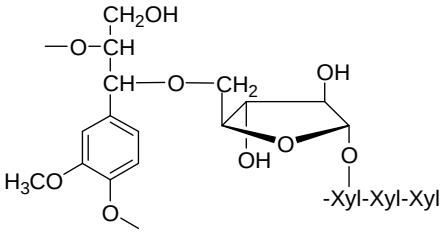


Figure 7. Lignine de hêtre (*Fagus sylvatica*) d'après Nimz (1974)

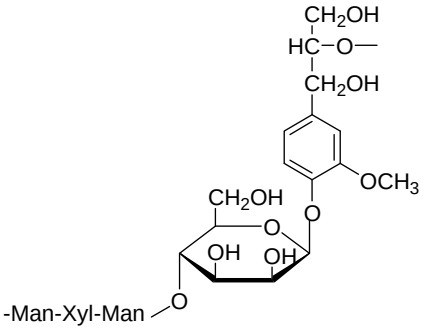
La présence de nombreuses fonctions hydroxyle (phénoliques ou non) explique la grande réactivité de la lignine. Cependant, leur accessibilité est limitée par la structure tridimensionnelle du réseau moléculaire, mais aussi par la distribution de ce polymère parmi les autres constituants de la paroi cellulaire avec lesquels la lignine établit de nombreuses interactions moléculaires par le biais de liaisons de faible énergie telles que des liaisons hydrogène. La lignine peut également être liée aux hémicelluloses par l'intermédiaire de liaisons covalentes (figure 8).



Liaisons de type ester benzylique



Liaisons de type éther benzylique



Liaisons de type phénylglycosidique

Figure 8. Les différentes liaisons covalentes lignine-hémicelluloses présentes dans le bois

2.1.4. Substances de faible poids moléculaire

2.1.4.1. Extraits

Le terme « extrait » recouvre un grand nombre de constituants qui peuvent être extraits du bois avec des solvants plus ou moins polaires. La teneur et la composition en extraits varient avec les essences. On observe aussi des variations en fonction du site géographique et de la saison. De nombreuses essences contiennent des substances extractibles toxiques pour les bactéries, champignons et termites (Bauch and al., 1977). D'autres extraits confèrent une couleur ou une odeur au bois. Une partie de ces extraits est appelée résine, terme qui ne caractérise pas des constituants chimiques mais plutôt un aspect physique.

2.1.4.2. Terpènes et terpénoïdes

Les terpènes produits par de nombreuses plantes sont exclusivement constitués de carbone et d'hydrogène. Ils constituent les composants majeurs de la résine des conifères. Les terpénoïdes possèdent des groupements fonctionnels renfermant de l'oxygène tels que des fonctions alcool,

carbonyle ou acide. Tous ces composés ont pour point commun d'être bio-synthétisés à partir d'un même précurseur en C5 dérivant de pyrophosphate d'isopenténylе correspondant d'un point de vue chimique à l'isoprène (2-méthyl but-2-ène). Suivant le nombre d'unités en C5, ils sont subdivisés en plusieurs catégories : monoterpènes (2 unités), sesquiterpènes (3 unités), diterpènes (4 unités), sesterpènes (5 unités) et triterpènes (6 unités). Chez les résineux, on rencontre toutes les classes de terpènes, tandis que chez les feuillus, on observe surtout des triterpènes. Leurs structures peuvent être très complexes. A titre d'exemple, quelques uns des mononoterpènes identifiés dans la fraction volatile des bois de conifères sont rapportés dans la figure 9 montrant la présence de composés aussi bien acycliques, que monocycliques ou bicycliques. Cette complexité devient de plus en plus importante au fur et à mesure que la classe des terpènes augmente.

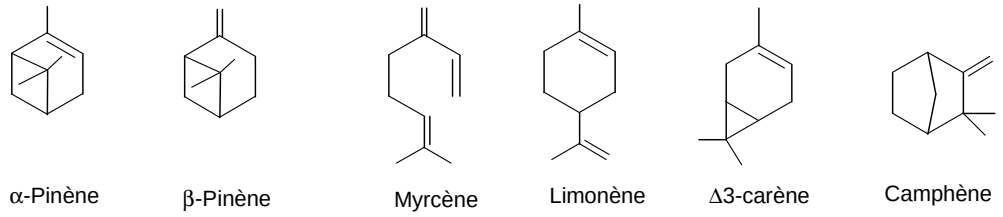


Figure 9. Différents monoterpènes extraits de résineux

Les triterpènes sont essentiellement présents dans les feuillus des régions tempérées et tropicales. Dans les extraits de différentes espèces de chêne et de bouleau, la bétuline est le constituant le plus abondant (figure 10).

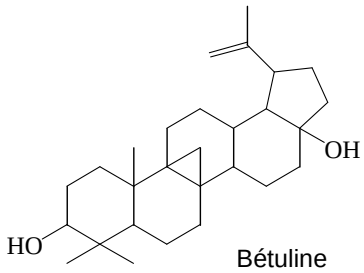


Figure 10. Un exemple de triterpène rencontré chez les feuillus

2.1.4.3. Glycérides, cires et leurs constituants

Les glycérides sont des esters d'acides gras et de glycérol, tandis que les cires sont des esters d'acides gras et d'alcools gras. Tous deux sont extractibles avec des solvants peu polaires tels que l'hexane ou l'éther de pétrole. Les acides gras et les alcools gras sont également des constituants de ce type d'extraits, néanmoins, les acides gras sont presque toujours estérifiés et les triglycérides sont les constituants majeurs des glycérides.

2.1.4.4. Constituants phénoliques

Un premier type de constituants phénoliques pouvant être isolé du bois correspond aux phénols simples. Ces composés sont principalement constitués de dérivés de type phénylpropane et de leurs produits d'oxydation tels que des aldéhydes ou acides benzoïques et correspondant soit à des produits dérivant de la biosynthèse de la lignine, soit à des produits de dégradation de cette dernière. Des analyses effectuées sur les extraits de *Picea abies*, ont pu mettre en évidence des composés tels que la vanilline, le parahydroxybenzaldéhyde, le coniféraldéhyde, le guaicylglycérol ou encore le paraéthylphénol (figure 11). Les acides *p*-hydroxybenzoïque, vanillique, syringique et férulique ainsi que des aldéhydes comme la vanilline et le syringaldéhydes ont été identifiés chez des essences comme *Populus* et *Salix*. (Jodin, 1994). Le tableau1 présente quelques extractibles isolés du bois de hêtre *Fagus sylvatica* (Tableau1) (Janja, 2003 ; Solár et al., 2007).

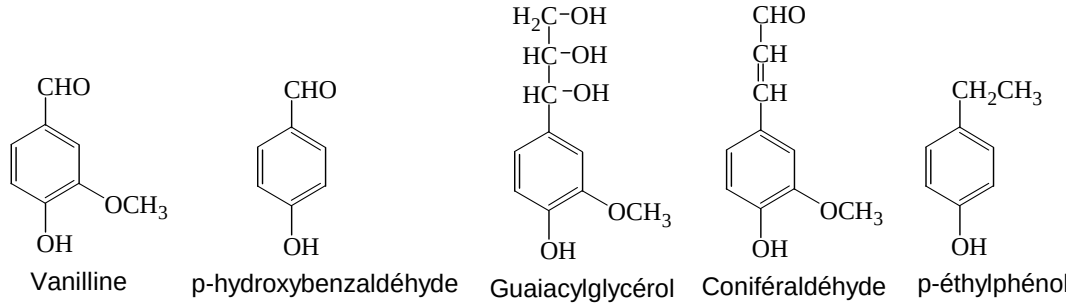


Figure 11. Phénols simples isolés de *Picea abies*

Tableau 2. Extractibles rencontrés dans le bois de hêtre (Fagus *sylvatica*) (Janja Zule, 2003, Solár, 2007)

Composés phénoliques	**Composés lipophiliques**
Vanilline	Acide palmitique (C16 : O)
Acide syringique	Acide linoléique (C18 :2)
Syringaldéhydes	Acide Oléique (C18 :1)
Catéchine	Acide Stéarique (C18 :0)
Acide vanillique	β-sitostérol
P-hydroxybenzaldéhyde	Glycérol

Un second groupe de constituants phénoliques est constitué par les lignanes correspondant à des dimères, trimères, tétramères ou plus d'unités phénylpropane. Ils résultent de réactions de couplage oxydatif similaires à celles rencontrées dans la biosynthèse de la lignine. Quelques exemples de lignanes sont rapportés dans la figure 12.

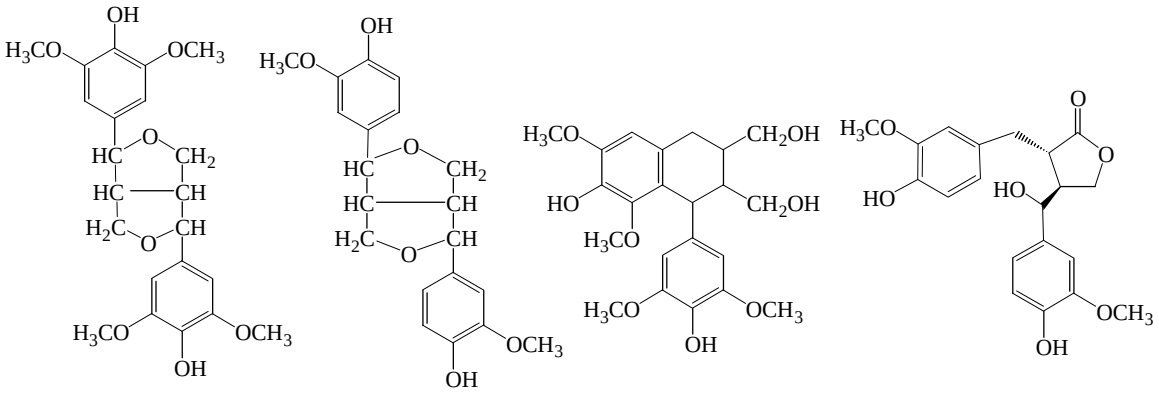


Figure 12. Lignanes isolés de feuillus et de résineux

Un autre groupe de constituants aromatiques est représenté par les stilbènes. Ces constituants seraient responsables du noircissement du bois induit par la lumière et des difficultés rencontrées au cours de la fabrication de la pâte à papier en milieu acide.

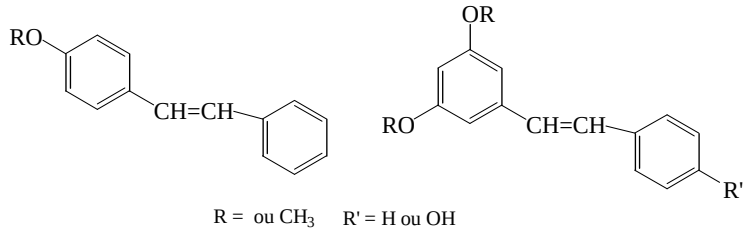


Figure 13. Structure générale de différents composés stilbéniques

Les flavonoïdes sont une autre catégorie de composés phénoliques que l'on rencontre dans les extraits de différents bois. Ces derniers peuvent se diviser en différentes familles : les flavanes, les flavones, les flavanones, les chalcones, les isoflavones, les aurones… (figure 14).

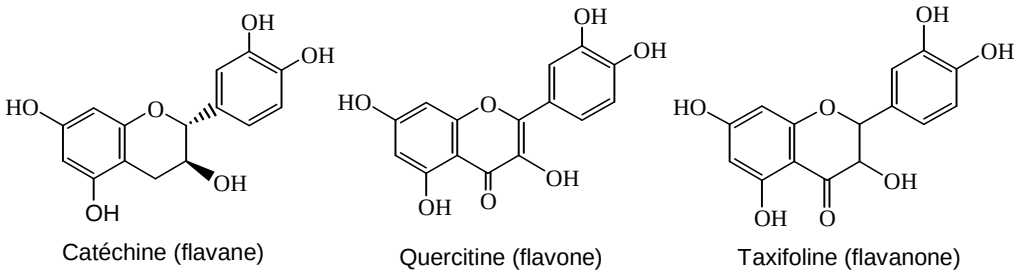


Figure 14. Structure de quelques flavonoïdes

Les tanins sont des constituants phénoliques qui peuvent se combiner aux protéines pour donner des complexes solubles ou insolubles. Ils se divisent en deux groupes : les tanins hydrolysables et les tanins condensés ou phlobaphènes.

Les tanins hydrolysables sont des esters d'acide gallique ou de ses dimères (digallique, acide ellagique) et de monosaccharides. Les tanins hydrolysables sont souvent divisés en gallotanins conduisant à de l'acide gallique après hydrolyse et en ellagitanins libérant de l'acide ellagique après hydrolyse (Figure 15).

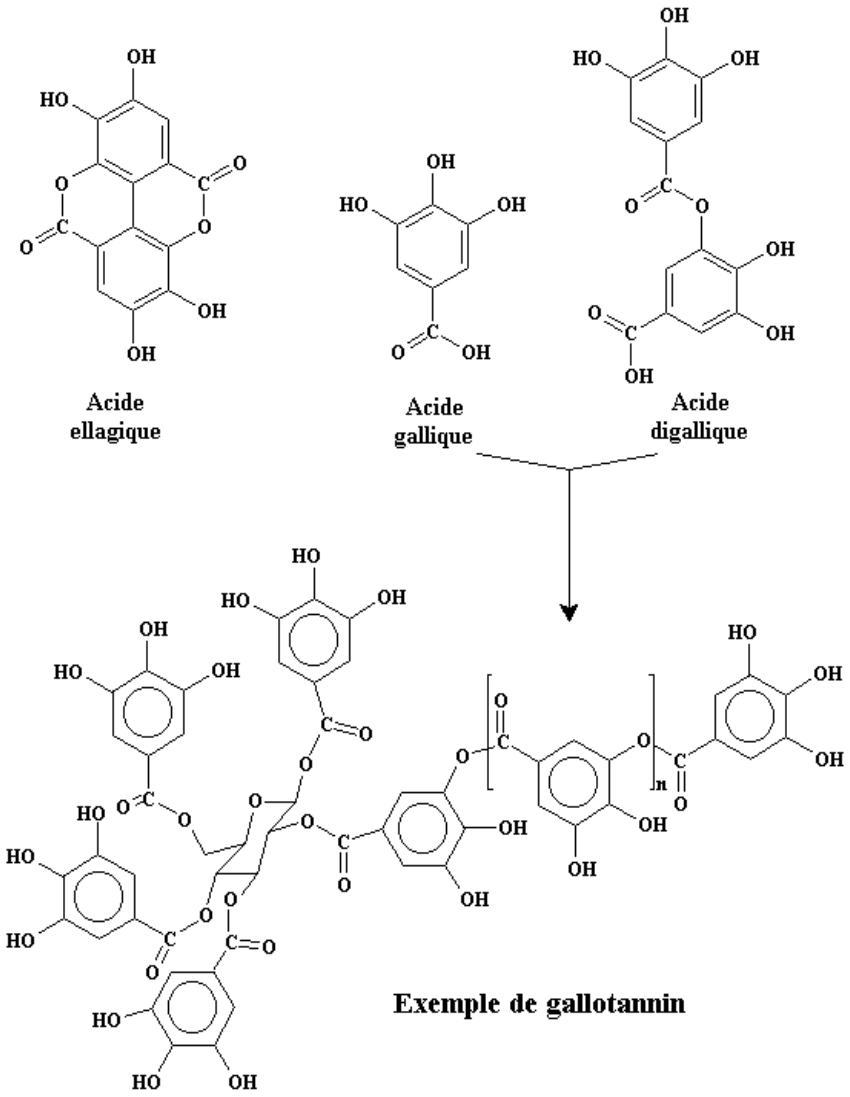


Figure 15. Les tanins hydrolysables

Les principaux constituants des tanins condensés sont les flavan-3-ols comme la catéchine et les leucoanthocyanes (flavan-3,4-diols). Ces unités sont liées par des liaisons entre les C4-C6 et C4-C8. Selon le nombre d'unités flavane liées entre elles, on parlera de proanthocyadidines pour les

dimères et trimères et de phlobaphènes ou tannins condensés pour un nombre plus important d'unités (4 à 11) (Figure 16). Tous ces produits appartiennent à la famille des polyphénols.

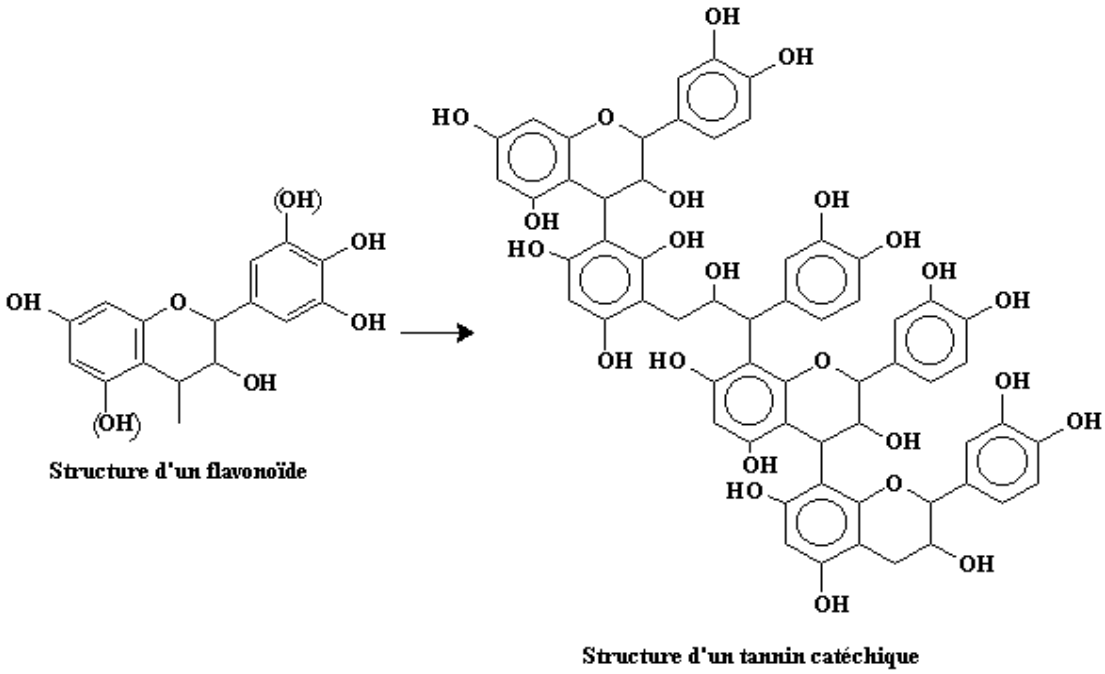


Figure 16. Les tanins condensés

Les tanins condensés peuvent être utilisés pour obtenir des phénols simples par fusion alcaline. Ils sont utilisés pour la fabrication d'adhésifs pour les contreplaqués et autres panneaux de particules après autocondensation ou condensation avec du formaldéhyde.

2.2. Les champignons de pourriture blanche

Le bois fait partie des matériaux de construction très utilisés, néanmoins son utilisation reste dans certaines circonstances problématiques du fait de sa biodégradabilité. En effet, le bois étant constitué de cellulose, d'hémicelluloses et de lignine, ces composés peuvent servir de source d'alimentation à toute une variété d'organismes dont les champignons, les insectes, les xylophages marins… Seule l'action des champignons sur la dégradation du bois sera abordée dans le cadre de cette étude bibliographique.

Les champignons constituent un des trois groupes principaux des eucaryotes. Ils ont une très grande importance environnementale et économique :

- les champignons sont les principaux acteurs de la dégradation de la matière organique, principalement des polymères structuraux tels que la lignine, la cellulose et les hémicelluloses
- les champignons causent environ 70 % des maladies les plus importantes touchant les plantes cultivées
- en formant des mycorhizes avec la plupart des plantes terrestres, les champignons jouent un rôle fondamental dans la nutrition azotée et minérale de ces plantes
- les voies métaboliques extrêmement diversifiées trouvées chez les champignons peuvent aboutir à la synthèse de nombreuses molécules utilisables d'un point de vue commercial et industriel comme l'éthanol, les acides organiques, différentes enzymes, des antibiotiques etc.…

Les champignons vrais contiennent tous de la chitine au niveau de la paroi cellulaire et partagent également de nombreuses caractéristiques cellulaires et biochimiques. Cinq sous-groupes peuvent être définis :
- les *Chytridiomycota* (chytridiomycètes) ou chytrides.
- les *Zygomycota* (zygomycètes)
- les *Ascomycota* (ascomycètes)
- les *Deuteromycota* (deuteromycètes)
- les *Basidiomycota* (basidiomycètes)

Dans les professions liées à l'industrie du bois, on divise les champignons en catégories artificielles qui ne sont liées ni à la systématique ni à la morphologie des organismes, mais aux types de dégâts qu'ils occasionnent. On considère ainsi les champignons de :

- pourriture fibreuse
- pourriture cubique
- pourriture molle
- bleuissement
- moisissures

Du fait de l'importance et de la virulence des champignons de pourriture blanche dans la dégradation du bois, nous limiterons la suite de notre étude bibliographique à *Trametes versicolor* qui a été le champignon modèle utilisé dans nos travaux.

2.3. Trametes versicolor

Trametes versicolor est un basidiomycète de la famille des *Polyporacea* (Hofrichter, 2002) trouvé de façon ubiquitaire dans les forêts subtropicales et tempérées où il intervient comme décomposeur primaire du bois. D'un point de vue fonctionnel, ce champignon est classé comme une pourriture blanche. Dans le domaine de la préservation du bois, *T. versicolo*r représente un organisme modèle d'étude des champignons de pourriture blanche au même titre que *Phanerochaete chrysosporium*.

Les pourritures blanches sont les seuls micro-organismes capables de dégrader efficacement les différents constituants du bois : cellulose, hémicelluloses et lignine. Ils jouent donc un rôle central dans le cycle global du carbone. Le bois attaqué devient clair avec apparition de zones fibreuses d'où leur autre appellation de pourritures fibreuses.

Seules les pourritures blanches minéralisent complètement la matière lignocellulosique. Des analyses microscopiques ont montré que *P. chrysosporium* dégrade la cellulose, les hémicelluloses et la lignine de manière simultanée, alors que *Ceriporiopsis subvermispora* tend à enlever la lignine avant les polyosides (Daniel, 1994). *Trametes versicolor* cause, quant à lui, une dégradation simultanée de la lignine, de la cellulose et des hémicelluloses (Enoki et al., 1988). Néanmoins aucun micro-organisme n'est capable d'utiliser la lignine comme seule source de carbone et d'énergie et il est donc généralement admis que la dégradation de la lignine est nécessaire aux micro-organismes pour pouvoir accéder à la cellulose et aux hémicelluloses (Cullen and Kersten, 2004).

Il est important de noter, pour comprendre les mécanismes de dégradation, que les enzymes ont une taille trop importante pour pénétrer le bois intact (Blanchette et al., 1997 ; Cowling, 1961). Blanchette et al. ont montré que, durant la dégradation du bois de pin par *C. subvermispora*, les parois cellulaires deviennent progressivement perméables à l'insuline (5.7 KDa), à la myoglobuline (17.6 KDa) mais pas à l'ovalbumine (44.3 KDa) même à des stades avancés de la dégradation. Comme la majorité des enzymes impliquées dans la dégradation de la lignine, mais également les cellulases et hémicellulases ont une taille similaire à celle de l'ovalbumine, il a été proposé que des molécules réactives générées par les enzymes ligninolytiques pénètrent du lumen vers les parois cellulaires (Blanchette et al., 1997).

2.3.1. Le système de dégradation de la lignine

Des enzymes oxydatives extracellulaires sont impliquées dans la dépolymérisation de la lignine. On distingue notamment des peroxydases et des oxydases (Cullen and Kersten, 2004). Ces enzymes sont responsables de la génération d'espèces radicalaires hautement réactives qui vont être les principaux artisans de la dégradation de la lignine.

Parmi les peroxydases impliquées dans la dégradation de la lignine, on distingue deux grandes classes d'enzymes : les lignine peroxydases (LiP ; EC 1.11.1.14) et les manganèse peroxydases (MnP ; EC 1.11.1.13. Ces enzymes catalysent l'oxydation de nombreux composés en utilisant le peroxyde d'hydrogène.

2.3.1.1 Les lignine peroxydases (LiPs)

Chez *Trametes versicolor*, seize isoformes de LiPs ont été mises en évidence (Johansson and Nyman, 1996). Ce nombre élevé d'isoformes semble être une donnée constante chez les pourritures blanches, ainsi dix isoformes de LiPs sont détectées chez *P. chrysosporium* (Cullen and Kersten, 2004). Ces protéines contenant un noyau protoporphyrique IX sont généralement modifiées post-traductionnellement. Un cluster contenant les gènes lipIII, lipIV et mnp1 a été mis en évidence chez *T. versicolor* (Johansson and Nyman, 1996), alors que tous les gènes codant pour des peroxydases sont situés indépendamment des uns des autres dans le génome de *P. chrysosporium* (Kersten and Cullen, 2007).

Les LiPs sont des glycoprotéines de poids moléculaire compris entre 38 et 46 kDa. Les intermédiaires catalytiques retrouvés au cours de l'oxydation de certains substrats sont similaires à ceux des autres peroxydases (Wariishi and Gold, 1990). Les interactions entre les LiPs et leurs substrats répondent à un mécanisme catalytique de type ping-pong. Le peroxyde d'hydrogène oxyde l'enzyme selon un mécanisme entraînant un transfert de deux électrons permettant la formation du composé I qui contient un centre oxyferrique et un cation porphyrique radicalaire. Le composé I oxyde à son tour une molécule de substrat par transfert d'un électron conduisant à la formation du composé II, qui à son tour oxyde une deuxième molécule de substrat permettant le retour de l'enzyme à son état initial (Figure 17) (Wesenberg et al., 2003).

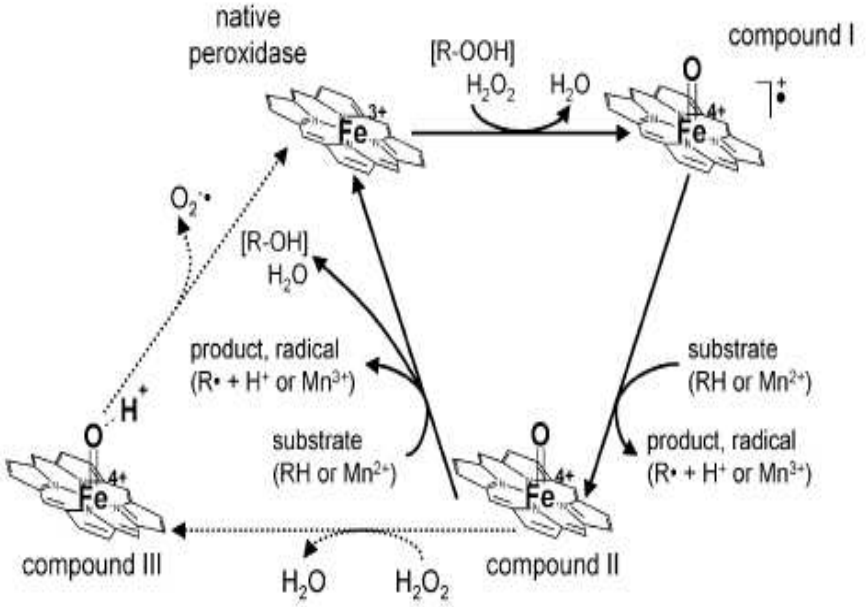


Figure 17. Schéma général du mécanisme catalytique des peroxydases (d'après Cullen and Kersten, 2004).

Les réactions catalysées par les LiPs sont très diverses et incluent l'hydrolyse de liaisons C_α-C_β des chaînes propyle de la lignine, l'hydroxylation de groupements benzyliques, l'oxydation d'alcools benzyliques entraînant la formation d'aldéhydes et de cétones correspondantes… (Tien and Kirk, 1988; Hammel et al., 1985; Leisola et al., 1985; Cullen and Kersten, 2004).

L'alcool veratryl (VA) est un substrat des LiPs. Il est oxydé via le transfert successif de deux électrons conduisant à la formation de veratrylaldéhyde (Tien et al, 1986). Chez *P. chrysosoporium*, VA est synthétisé en même temps que les LiPs, durant le métabolisme secondaire (Fenn and Kirk, 1981). VA a de multiples effets sur le système ligninolytique de *P. chrysosporium*, néanmoins son rôle exact reste incertain (Schick and Tien, 1997). VA jouerait un rôle dans la protection des LiPs contre leur inactivation par le peroxyde d'hydrogène, mais surtout réagirait avec les LiPs pour former un cation radicalaire qui a pu être mis en évidence par ESR. En présence de certains substrats, ce cation radicalaire pourrait agir en tant que médiateur redox. La stabilité de ce cation radicalaire lui permettrait de diffuser à une distance supérieure à 7 µm, néanmoins il pourrait également rester fixé à l'enzyme augmentant ainsi sa stabilité (Schick and Tien, 1997).

2.3.1.2. Les manganèse peroxydases (MnPs)

La principale fonction des manganèse peroxydases (MnPs) est d'oxyder le Mn^{2+} en Mn^{3+} en utilisant le peroxyde d'hydrogène (Paszczynski et al., 1985). Les bactéries et levures ne produisent pas de MnPs, cette faculté semblant être restreinte aux champignons dégradant le bois et la litière. Chez *T. versicolor*, comme chez *P. chrysosporium*, cinq isoformes de MnPs ont été mises en évidence (Johansson and Nyman, 1996). La présence d'acides organiques comme l'acide oxalique stimule l'activité des MnPs en stabilisant les ions Mn^{3+} formés, permettant ainsi la formation de complexes oxydants qui peuvent diffuser (Glenn et al., 1986).

Les intermédiaires formés lors de l'activité catalytique des MnPs sont similaires à ceux des autres peroxydases (figure 18). La MnP native est oxydée en composé I par le peroxyde d'hydrogène qui sera lui-même réduit par du Mn^{2+} et des phénols (RH) pour donner le composé II. Le composé II sera réduit par du Mn^{2+} mais pas par des composés phénoliques permettant ainsi d'obtenir de nouveau l'enzyme native (Wariishi et al., 1989).

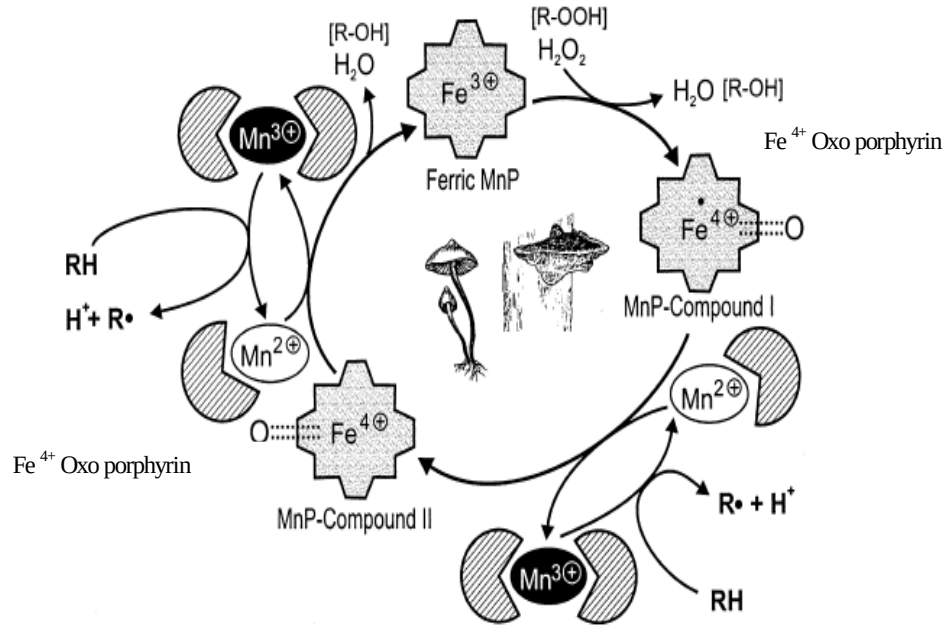


Figure 18. Cycle catalytique des manganèse peroxydases (MnP). (Hofrichter, 2002).

L'utilisation de modèles de lignine a permis de suggérer que les MnPs pouvaient être impliquées dans l'oxydation de composés phénoliques, mais également non phénoliques dans le processus de dégradation de la lignine. De plus, en présence de manganèse et d'acides organiques, les MnPs sont capables d'oxyder une grande variété de molécules (figure 19).

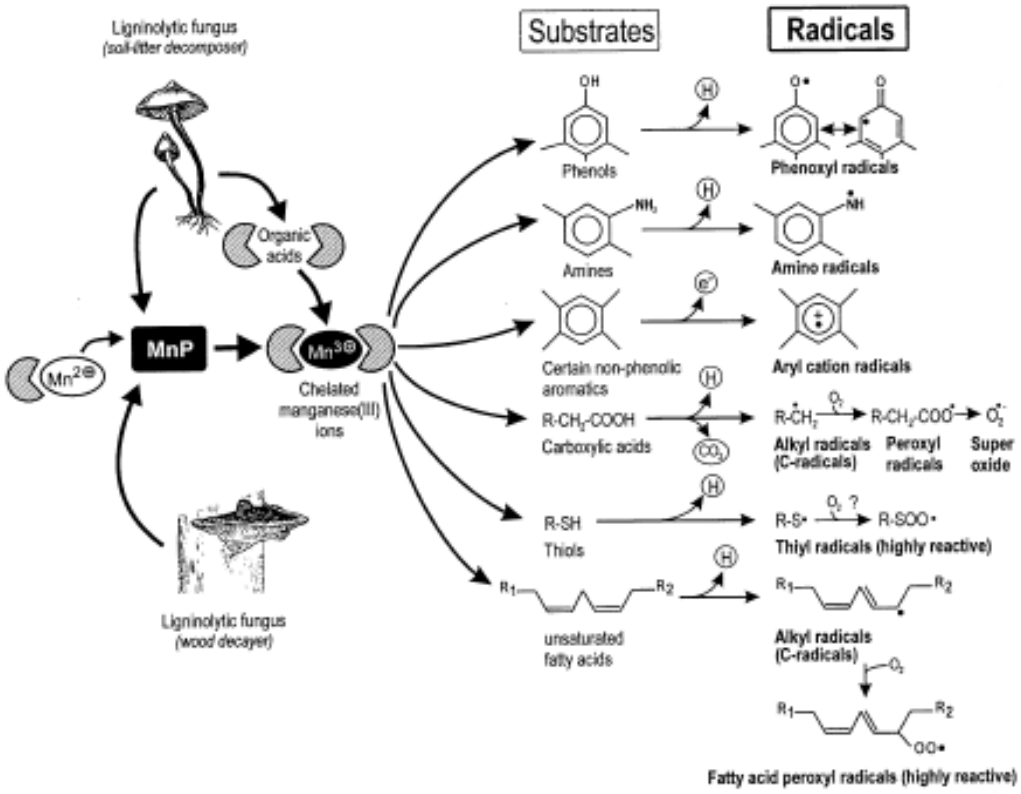


Figure 19. Le système manganèse peroxydase formant des radicaux en présence de différents substrats pouvant être oxydés par les MnPs (d'après Hofrichter, 2002)

2.3.1.3. Les laccases

Les laccases sont des enzymes à cuivre potentiellement impliquées dans la dégradation du matériau bois. Chez *T. versicolor,* quatre isoformes ($\alpha, \beta, \delta, \gamma$) sont présentes, les gènes correspondants ayant été identifiés et caractérisés (Johnson and Nyman, 1995). Si la plupart des champignons de pourriture blanche produisent des laccases, le séquençage du génome de *P. chrysosporium* a confirmé que ce champignon ne produit pas ce type d'enzymes suggérant que la présence de ces oxydases n'est pas indispensable à une dégradation efficace de la lignine (Kersten and Cullen, 2007). Les laccases catalysent l'oxydation de composés phénoliques présents dans la lignine (méthoxyphénols, hydroquinones) ainsi que des dérivés acides et aldéhydiques de celle-ci (Saparrat et al., 2002 ; Debbies et al., 1996) en utilisant l'oxygène comme accepteur d'électrons. Elles appartiennent au groupe des « blue multicopper oxidase » (Shah and Nerud, 2002) possédant dans leur site actif quatre atomes de cuivres (Cu^{2+}), un de type 1, isolé, responsable de l'oxydation des phénols et un groupe de 3 atomes de cuivre (1 de type 2 et 2 de type 3) responsables de l'activation du dioxygène (figure 20) (Wesenberg et al., 2003).

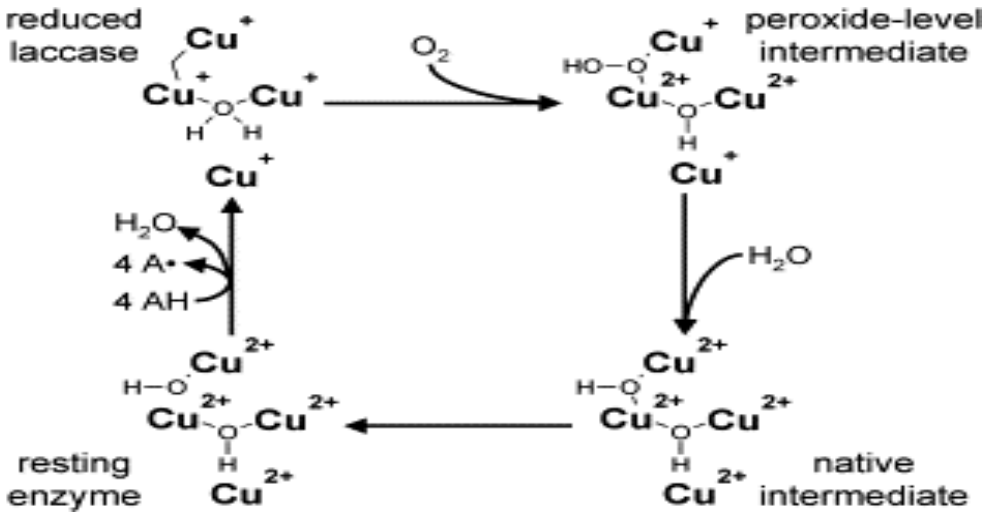


Figure 20. Mécanisme catalytique des laccases (Wesenberg et al., 2003)

Les laccases ou les peroxydases lignynolitiques (MnP, LiP) produites par les champignons de pourriture blanche oxyde la lignine en générant les radicaux aromatiques. Il va suivre différentes

réactions non enzymatiques qui vont intervenir pour briser les liaisons éthers, carbone- carbone et le noyau aromatique permettant au champignon de se procurer la source de carbone nécessaire à sa croissance (figure 21).

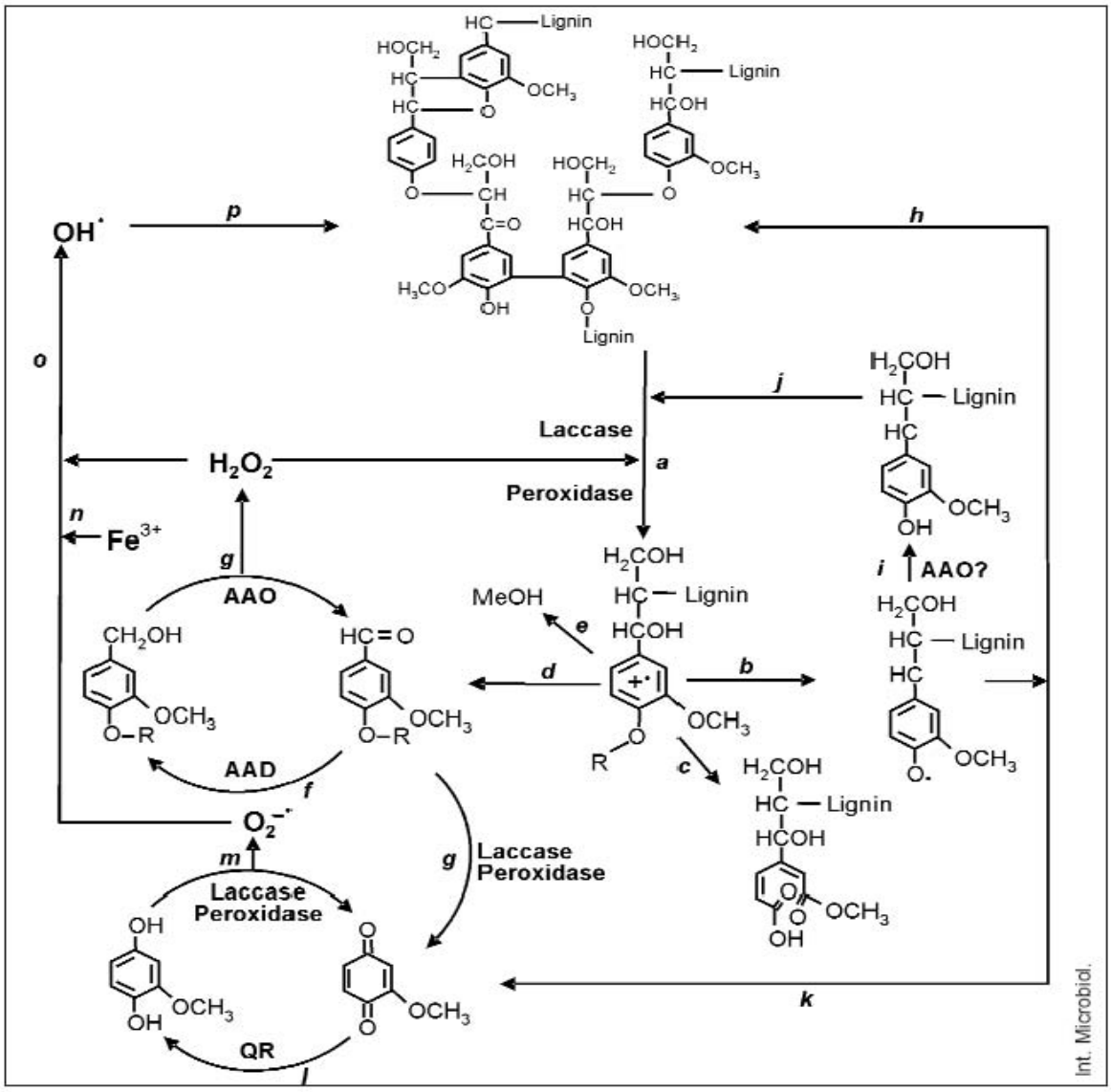


Figure 21. Schéma montrant la biodégradation et l'activation de l'oxygène par la combinaison des réactions enzymatiques et non enzymatiques. (Martinez et al . 2005).

2.3.1.4. Les enzymes auxiliaires

D'autres oxydases extracellulaires sont impliquées dans la dégradation de la lignine. Ces enzymes sont responsables de la génération du H_2O_2 indispensable au fonctionnement des

peroxydases. Il s'agit de l'aryl alcool oxydase (AAO), de la glyoxal oxydase (GOx), de l'aryl alcool déhydrogénase (AAD), de l'alcool oxydase (AOx) et des quinones réductases (QR) (figure 22).

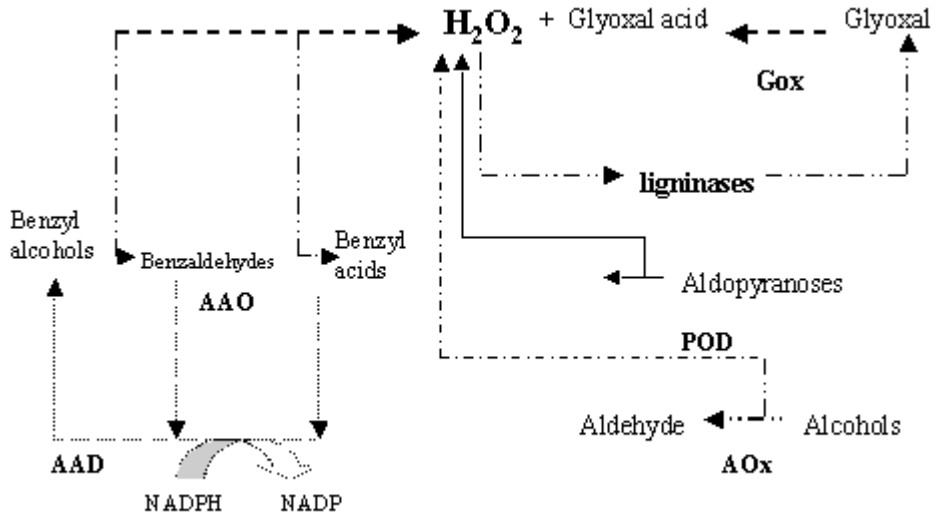


Figure 22. Mécanisme de formation du peroxyde d'hydrogène par les champignons de pourriture blanche. GOx, glyoxal oxydase ; POD, pyranose oxydase ; AOx, alcool oxydase ; AAD, aryl alcool déhydrogénase ; AAO, aryl alcool oxydase (d'après Shah and Nerud, 2002)

2.3.1.4.1. Aryl alcool oxydase (AAO)

La génération du H_2O_2 par les AAOs est due à la catalyse par ces enzymes de l'oxydation des alcools benzyliques en benzaldéhydes qui à leur tour sont converties en acides benzoïques (figure 22). Pendant ces réactions, du peroxyde d'hydrogène est formé. Les substrats des AAOs (principalement des alcools aromatiques) peuvent être formés durant la dépolymérisation de la lignine (Muheim et al., 1990). Les champignons ligninolytiques peuvent également excréter des substrats comme par exemple les alcools aryl, veratryl ou anisyl (Gallois et al., 1990).

Des études effectuées sur *Pleurotus ostreatus* indiquent que les AAOs ne participent pas seulement à la dégradation de la lignine, mais qu'elles sont également impliquées dans la réduction de quinones et de radicaux phénoxy, inhibant aussi la repolymérisation des produits de dégradation de la lignine (Marzullo et al., 1995).

2.3.1.4.2. Glyoxal oxydase (GOx)

Ce sont des enzymes à cuivre produites par les champignons de pourritures blanches dont *P. chrysosporium* (Kersten and Kirk, 1987). Ces enzymes peuvent utiliser des aldéhydes simples

comme substrats produisant du peroxyde d'hydrogène (figure 23). Cette activité est exprimée au cours du métabolisme secondaire lorsque les peroxydases (LiPs et MnPs) sont induites.

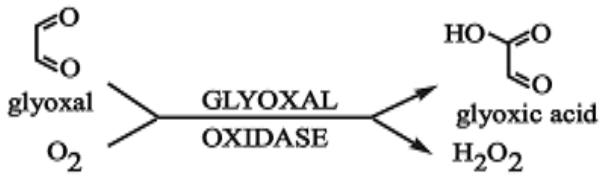


Figure 23. Formation du H_2O_2 par la GOx à partir d'acide oxalique et d'oxygène

2.3.1.4.3. Aryl alcool déhydrogénase (AAD)

Cette enzyme catalyse la réduction de la benzaldéhyde et de l'acide benzoïque permettant la régénération de l'alcool benzylique (Guillen et al., 1994) (figure 22).

2.3.1.4.4. La pyranose oxydase (POD)

C'est une autre oxydase impliquée dans la génération du H_2O_2, elle catalyse l'oxydation de différents aldopyranoses tels que le glucose, le xylose, le mannose et le galactose (Eriksson et al., 1990; Giffron, 2000). En général, la pyranose oxydase est une flavoprotéine sous forme d'homotétramère (Machida and Nakanishi, 1984 ; Danneel et al., 1993).

Chez *P. chrysosporium*, il a été identifié deux glucose oxydases ; la glucose 1-oxydase (Kelley and Reddy, 1986) et la glucose 2-oxydase ou pyranose 2-oxydase (Eriksson et al., 1990). La pyranose 2-oxydase est majoritairement intracellulaire chez *P. chrysosporium* et *Trametes versicolor*, préférentiellement localisée dans l'espace périplasmique de l'hyphe et associée à la membrane (Daniel et al., 1994).

Hormis la production de peroxyde d'hydrogène, la pyranose oxydase peut aussi agir de concert avec les laccases pour maintenir le cycle glucose-quinone oxydoréductase et éviter une repolymérisation spontanée des quinones formées au cours du processus ligninolytique (figure 21).

L'alcool oxydase (AOX) agit sur les groupes méthoxyle de la lignine en les transformant en aldéhydes, produisant ainsi du H_2O_2 (Nishida and Eriksson, 1997). D'autres oxydases sont capables de produire du H_2O_2 comme la glucose-1-oxydase (Kelley and Reddy, 1986) ou les acides acyl-coenzyme A oxydases (Green and Gould, 1984).

2.3.1.4.5. Cellobiose déhydrogenase (CDH)

La cellobiose déhydrogénase (cellobiose : quinone oxydoréductase) est une flavoenzyme produite par plusieurs champignons de pourritures blanches incluant *Trametes versicolor* (Stapleton and Dobson, 2003) et brunes. La CDH oxydée va oxyder le cellobiose et les chaînes courtes de certains cello-oligomères en utilisant différents accepteurs d'électrons, comme des radicaux phénoxy, le dioxygène ainsi que les ions Cu^{2+} et Fe^{3+} (Henriksson et al., 2000). Cette enzyme peut donc jouer un rôle dans le métabolisme des carbohydrates ainsi que dans la dégradation de la lignine. Des études réalisées sur *Trametes versicolor* montrent la présence de deux isoformes distinctes qui ont pu être isolées. Ces enzymes oxydent rapidement le cellobiose et le lactose, alors que la cellulose est oxydée plus lentement. Les deux glycoprotéines sont capable de réduire des quinones ainsi que des radicaux organiques (Roy et al., 1996).

La figure 24 reprend les différents systèmes oxydatifs présents chez les champignons de pourritures blanches.

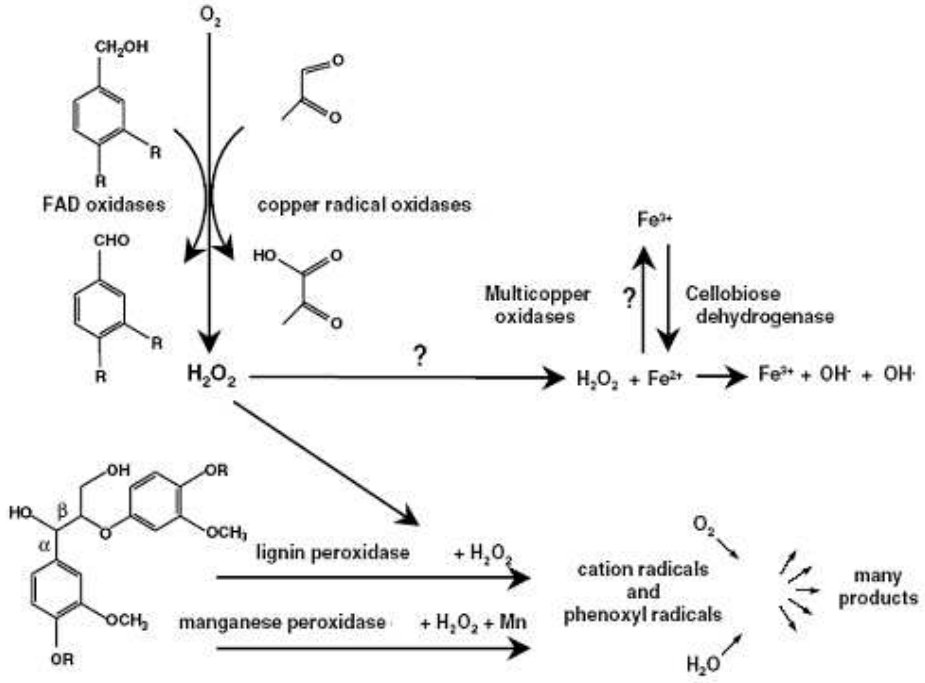


Figure 24. Système oxydatif extracellulaire de *Phanerochaete chrysosporium* (Kersten and Cullen, 2007)

2.3.1.4.6. Autres enzymes auxiliaires

La dégradation complète de la lignine nécessite la participation de plusieurs enzymes intra et extracellulaires pour une minéralisation complète des monomères en CO_2 et H_2O, pour la

génération de métabolites secondaires (alcool vératryl) et le métabolisme extracellulaire. Chez *P. chrysosporium* par exemple, les enzymes qui ont été caractérisées comprennent notamment la méthanol oxydase (Asada et al., 1995), la 1,4-benzoquinone réductase (Brock and Gold, 1996), des méthyltransférases (Harper et al., 1990), la L-phénylalanine ammonialyase (Hattori et al., 1999), différents cytochrome P450 (Kullman and Matsumura, 1997), des glutathione transférases (Dowd et al., 1997)…

2.3.1.4.7. Réactions générant des radicaux chez *T. versicolor*

Le radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$) et l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) sont des radicaux produits par les champignons de pourriture blanche (Guillen et al., 1997). Parmi ces radicaux, le radical $OH^{\bullet}$ est capable de réagir directement avec les unités constitutives de la lignine (figure 25).

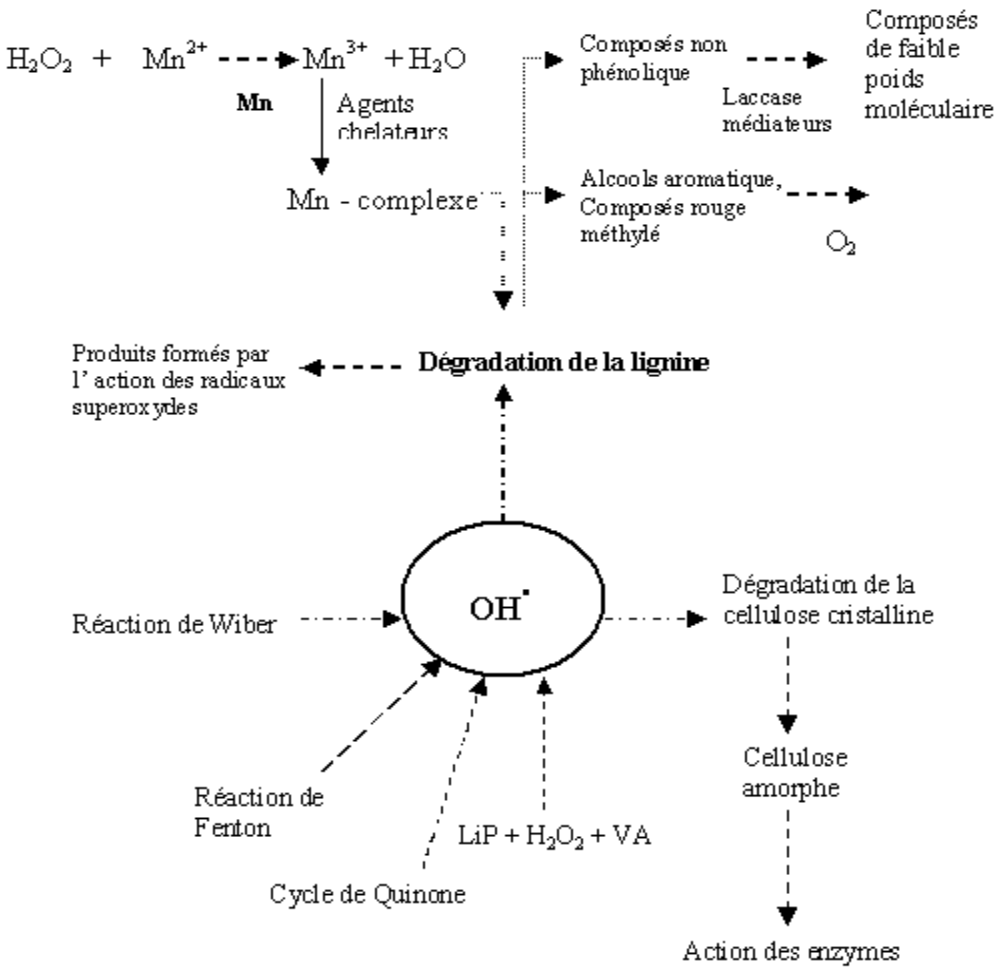


Figure 25. Génération des radicaux hydroxyles et des agents impliqués dans la dégradation de la lignine par les champignons de pourritures blanches. LiP, lignine peroxydase, MnP, manganèse peroxydase (Shah and Nerud, 2002)

Les enzymes impliquées dans la dégradation de la lignine sont des molécules de haut poids moléculaire qui ne pénètrent donc pas dans les parois cellulaires du bois (Hirano et al., 1997). On suppose donc que des substrats de plus petite taille comme l'ion Mn^{3+} ou $OH^{\bullet}$ sont responsables de la dégradation initiale du substrat lignocellulosique. La production des radicaux hydroxyle ($OH^{\bullet}$) peut se faire à travers le cycle redox des quinones dans le cas des champignons de pourritures blanches. Chez *Pleurotus eryngii*, les radicaux hydroxyle sont au cœur de différentes réactions impliquant les laccases, les hydroquinones dérivées de lignine et des ions ferriques chélatés (Guillen et al., 2000). Dans ce système, les laccases convertissent tout d'abord les hydroxyquinones en semiquinones (Guillen et al., 1997). L'auto-oxydation des semiquinones conduit à l'activation de l'oxygène par production d'anions superoxydes, qui vont réduire l'ion ferrique en ion ferreux et oxyder l'oxygène en un radical anion superoxyde. La réaction de dismutation fournit le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui va générer le $OH^{\bullet}$ via la réaction de Fenton (Guillen et al., 2000).

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow OH^{\bullet} + Fe^{3+}\,OH^{-}$$

La cellobiose déhydrogenase (CDH) est aussi associée à la production des radicaux hydroxyle (Cameron and Aust 2001). La participation de la CDH dans la dégradation de la lignine a lieu via l'oxydation de composés phénoliques.

Le radical $O_2^{\bullet -}$ peut entraîner certaines réactions impliquées dans la dépolymérisation de la lignine en oxydant les agents dégradant la lignine. En agissant comme un oxydant, il va produire l'ion Mn^{3+} à partir de Mn^{2+} selon la réaction :

$$Mn^{2+} + O_2^{\bullet -} + 2H^{+} \longrightarrow Mn^{3+} + H_2O_2$$

Il peut aussi réagir avec le H_2O_2 pour former des $OH^{\bullet}$ à travers la réaction d'Haber- Weiss :

$$O_2^{\bullet -} + H_2O_2 \longrightarrow OH^{\bullet} + OH^{-} + O_2$$

Le radical $O_2^{\bullet -}$ peut également former H_2O_2 via la réaction de dismutation:

$$2\,O_2^{\bullet -} + 2\,H^{+} \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

2.3.2. Système enzymatique dégradant les polysaccharides

Dans la nature, les microorganismes cellulolytiques et hémicellulolytiques dégradent la cellulose et les hémicelluloses principalement selon un processus hydrolytique grâce à l'action d'enzymes extracellulaires. La dégradation du matériel cellulosique et hémicellulosique n'est pas un processus isolé, mais est intégré dans le cadre d'une détérioration complète des composés du bois. Ces enzymes sont produites par de nombreux micro-organismes dont notamment des champignons (Biély and Tenkanen, 1998).

2.3.2.1. Le système de dégradation de la cellulose

Les cellulases sont un groupe d'enzymes cellulolytiques qui hydrolysent les liaisons β-1,4-glycosidiques présentes dans la cellulose. Trois différentes activités cellulolytiques ont été identifiées chez le champignon de pourriture blanche *Trametes versicolor* :

- ✓ endo-(1,4)-β-D-glucanase (endoglucanase, endocellulase, carboxymethyl cellulase [EC 3.2.1.4])
- ✓ exo-(1,4)-β-D-glucanase (cellobiohydrolase, exocellulase [EC 3.2.1.91])
- ✓ β-D- glucosidase (cellobiase [EC 3.2.1.21]).

Les endoglucanases attaquent les liaisons internes de la chaîne de cellulose. Les exoglucanases hydrolysent à partir de l'extrémité non réductrice de la cellulose libérant principalement du cellobiose. Les β-glucosidases sont des enzymes qui sont capables d'hydrolyser l'extrémité non réductrice des cellodestrines et du cellobiose conduisant à la libération de glucose (Aro et al., 2005).

Comme précedemment décrit, l'activité cellobiose déshydrogénase (CDH) a aussi été mise en évidence chez *Trametes versicolor* et *Phanerochaete chrysosporium,* (Roy et al., 1996 ; Li et al., 1996). La CDH oxyde le cellobiose et les cellodextrines en lactones (Henrikson et al., 2000). Elle joue donc un rôle dans la dégradation de la cellulose (Ayers et al., 1978) et peut également avoir un rôle dans la dégradation de la lignine.

L'efficacité d'hydrolyse de la cellulose en glucose nécessite une coopération de ces différentes d'enzymes (endoglucanase, cellobiohydrolase et β-glucosidases). Ces enzymes ont été décrites chez *Phanerochaete chrysosporium* ainsi que chez *Trametes versicolor* (Eriksson et al.,

1990 **;** Kirk and Cullen, 1998). La figure 26 présente un modèle de synergie dans la dégradation de la cellulose par les champignons.

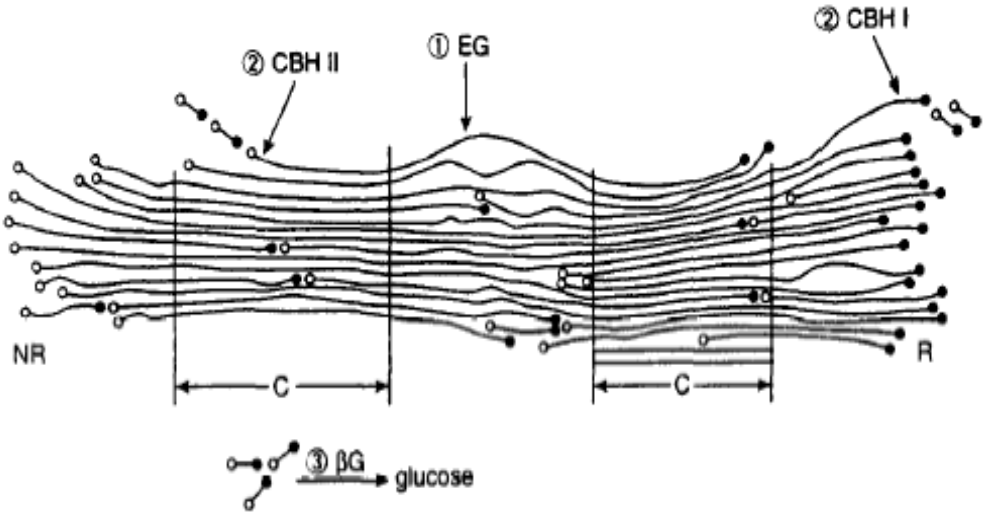


Figure 26. Synergie entre les trois types d'enzymes pour hydrolyser la cellulose en glucose. EGs : Endoglucanases. CBHs : cellobiohydrolases. NR : extrémité non réductrice. R : extrémité réductrice. C : régions cristallines (Teeri, 1997)

Dans le cas des endoglucanases (EGs dans la figure 26), elles hydrolysent les liaisons β-1,4-glucosidiques internes au niveau des régions amorphes des microfibrilles de cellulose. L'action des endoglucanases crée de nouvelles extrémités sur la chaîne de cellulose. L'ensemble de ces extrémités va constituer de nouveaux sites d'action des cellobiohydrolases qui vont libérer des unités cellobiose clivées en deux glucoses par les β-glucosidases. Ces oses simples sont utilisés par le champignon comme source d'énergie et de carbone pour sa croissance.

Les endoglucanases chez les champignons ont été largement caractérisées, elles ont une taille de 25 à 50 KDa. Chez *Phanerochaete chrysosporium*, elles varient entre 28 et 37 KDa (Eriksson et al., 1990). Elles ont deux domaines structuraux distincts, un domaine catalytique et un domaine de liaison à la cellulose (Divne et al., 1994).

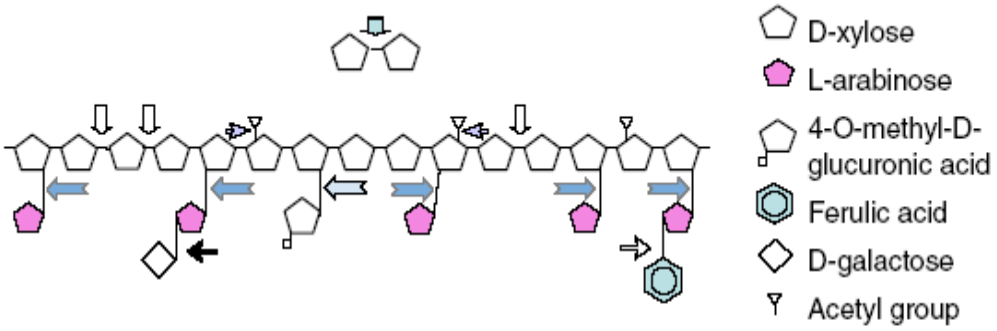
Les cellobiohydrolases (CBHs) agissent en synergie avec les endoglucanases pour solubiliser la cellulose. Ces enzymes sont structuralement similaires aux endoglucanases. Chez *Phanerochaete chrysosporium*, 6 isoenzymes ont été détectées (Uzcategui et al., 1991). Ce champignon possède aussi dans son système hydrolytique plusieurs β-glucosidases (Smith and Gold, 1979). Ces enzymes ont une masse moléculaire variant entre 165 et 182 KDa (Eriksson et al., 1990).

2.3.2.2. Le système de dégradation des hémicelluloses

Les hémicelluloses sont les plus abondants polysaccharides dans la nature après la cellulose. Elles contiennent notamment du xylane qui représente environ 20 à 25 % du bois. L'hydrolyse du xylane implique trois types d'enzymes

- des endo-1,4-β-xylanases
- des exo-1-4-β-xylanases
- des β-xylosidases

L'endoxylanase hydrolyse la liaison β-1,4 entre les résidus xylosyl à l'intérieur de la chaîne du xylane, l'exo-1-4-β-xylanase coupe la liaison β-1,4 entre 2 molécules de D-xylose à partir des extrémités des chaînes, alors que la β-xylosidase clive le xylobiose en 2 unités xylose au niveau de la liaison β-1,4. De plus, l'hydrolyse complète des hémicelluloses requièrent l'action d'autres enzymes comme : les xylanes acétyle estérases, les α-L-arabinofuranosidases ou les α-glucuronidases (Katapodis et al., 2003) (Figure 27).



SYMBOL	ENZYME	EC-NUMBER	LINKAGE HYDROLYSED
⇩	Endo-1,4-β-xylanase	3.2.1.8	β-1,4
	β-D-xylosidase	3.2.1.37	β-1,4
⇨	α-L-arabinofuranosidase Arabinoxylan arabino-furanohydrolases	3.2.1.55	α-L-1,2; α-L-1,3 and α-L-1,5
⇨	α-D-glucuronidase	3.2.1	α-1,2
⇨	feruloyl esterase	3.2.1	ester bond
➔	α-D-galactosidase	3.2.1.22	α-1,6
⇨	asetylxylan esterase	3.1.1.6	ester bond

Figure 27. Un exemple de synergie dans la dégradation des arabinoxylanes (Aro et al., 2005)

2.3.2.2.1. Les acétyl xylane estérases

Ces enzymes sont impliquées dans le clivage des liaisons ester présentes au niveau des hémicelluloses. Elles ont été isolées et caractérisées chez plusieurs champignons filamenteux, incluant *T. reesei, Phanerochaete chrysosporium* et *Trametes versicolor*. Chez *T. reesei*, la xylane esterase étudiée était une glycoprotéine de 34 KDa active sur des xylooligomères acetylé (DP = 10), sur du xylose et du glucose acetylé (Kirk and Cullen, 1998).

2.3.2.2.2. Les α-glucuronidases

Cette activité est aussi présente chez *Phanerochaete chrysosporium* (Castanares et al., 1995). Castanares et son équipe (1995) ont purifié et caractérisé une α-glucuronidase chez *P. chrysosporium,* cette enzyme agissant en synergie avec les endoxylanases, β-xylosidases et l' arabinofuranosidase pour hydrolyser le xylane du bois de hêtre.

2.3.2.2.3. Les β-xylosidases

Elles ont été décrites chez différents champignons dont *T. versicolor* et *P. chrysosporium* (Eriksson et al., 1990). Ces enzymes hydrolysent les xylooligosaccharides en xylose. Leur masse moléculaire varie entre 90 à 122 KDa.

2.3.2.2.4. Les α-arabinofuranosidases

Elles ont été étudiées chez un grand nombre de champignons filamenteux, ainsi que chez différentes bactéries. Luonteri et son équipe (1995) ont isolé et caractérisé 3 enzymes possédant une activité α-arabinofuranosidase à partir du champignon ascomycète *Aspergillus terreus*.

2.3.3. Régulation des activités extracellulaires

De manière générale, les systèmes contrôlant des mécanismes de régulation des champignons lors de l'utilisation des biopolymères des plantes ont déjà fait l'objet de nombreuses études (Aro et al, 2005). La régulation de la production et la secrétion des enzymes extracellulaires

d'une part et la régulation métabolique de l'utilisation des produits d'hydrolyse d'autre part, doivent être coordonnées, pour permettre au champignon d'accéder à ces sources de carbone et d'énergie.

2.3.3.1. Expression des gènes ligninolytiques

La dépolymérisation de la lignine semble être un processus lié au métabolisme secondaire des champignons se nourrissant des composants structuraux du bois. La dépolymérisation de la lignine commence lorsque la source d'azote ou de carbone se raréfie et est également activée en présence d'hydrates de carbone. Celle-ci est inhibée par la présence de sources d'azote facilement assimilables par les champignons (ammonium et acides aminés) (Fenn and Kirk, 1981). Ce phénomène est appelé répression catabolique. La répression catabolique est un phénomène bien connu et étudié notamment chez plusieurs champignons comme *Trichoderma reesei*, *Aspergillus nidulans* et *Aspergillus niger* (Mach et al. 1996, Flipphi et al. 2003), et également chez *Sacccharomyces cerevisiae* (Gancedo, 1998).

C'est un mécanisme contrôlant l'utilisation préférentielle d'une source de carbone facilement métabolisable comme le glucose, galactose, maltose, arabinose ou le xylose (Stapleton et al. 2003**)**. Dès que la source de carbone est épuisée dans le milieu de culture, on assiste à une induction des activités hydrolytiques. Ce phénomène a été récemment étudié chez *Trametes versicolor*. Stapleton et son équipe (2003) ont montré que la production de cellobiose deshydrogénase chez *Trametes versicolor* est réprimée lorsque des sources de carbone supplémentaires comme le glucose, le maltose, le galactose et le xylose sont ajoutées aux cultures fongiques se développant sur cellulose.

La régulation des gènes codant pour les enzymes ligninolytiques a été particulièrement étudiée chez *P. chrysosporium*, Ce dernier contient dix gènes codant pour des lignine peroxydases (Lip) désignés de lipA à lip J (Gaskell et al., 1994) et cinq gènes codant pour des manganèse peroxydases (mnp1 à mnp5) (Alic et al., 1997 **;** Godfrey et al., 1990 **;** Martinez, 2002). De manière générale, l'expression de ces gènes ligninolytiques est induite par une carence nutritionnelle notamment en azote, en carbone ou en soufre (Gold and Alic, 1993). De plus, la présence de Mn (II) dans le milieu active l'expression des mnps (Brown et al., 1991). L'addition de H_2O_2 ainsi que d'autres stress chimiques induit également l'expression de mnp (Li et al., 1995). Similairement aux gènes de manganèse peroxydase, les gènes codant pour des LiPs sont également fortement régulées chez *P. chrysosporium*, notamment par la présence de sources carbonées et azotées facilement assimilables (Stewart and Cullen 1999).

L’expression de gènes codant pour des laccases chez *Trametes versicolor* est régulée au niveau transcriptionnel par les teneurs en cuivre et en azote (Collins et Dobson, 1997**)**. L’augmentation du taux de transcrits en réponse aux composés aromatiques tels que le 2,5-xylidine a été décrite chez *Trametes versicolor* (Collins and Dobson 1997) et *Trametes villosa* (Yaver et al., 1996). Certains chercheurs ont suggéré que les laccases exprimées de manière constitutive sont les premières enzymes impliquées dans la dégradation de la lignine et que les produits de dégradation issus de la lignine agissent comme inducteurs augmentant l'expression de gènes de laccases ainsi que celle d’autres gènes ligninolytiques (Scheel et al. 2000).

2.3.3.2. Expression des cellulases

La régulation de gènes de cellulases a été principalement étudiée chez *Trichoderma reesei* et une grande variété des composés provoquant l’expression de cellulases a été décrite chez ce champignon. El-Gogary et al. (1989) ont montré une absence d'induction des gènes codant pour les cellulases chez *T. reesei* en croissance sur un milieu contenant la cellulose en présence d’anticorps dirigés contre les cellulases dans le milieu. De plus, le taux d'expression de ces gènes était extrêmement faible sur un milieu contenant du glucose, du sorbitol ou du glycérol.

Le sophorose (liaison β-1,2 de deux unités glucose) est un inducteur soluble chez *T. reesei,* et il a été considéré pendant plusieurs années comme un inducteur naturel. Le sophorose est formé à partir de cellobiose par transglycosylation catalysée par la β-glucosidase (Gritzali and Brown, 1979). Toutefois, le sophorose est un inducteur spécifique de certains champignons comme *T. reesei, Aspergillus terrens* et *P. purpurogenum*. Par contre, chez *Phanerochaete chrysosporium, Aspergillus nidulans* et *Aspergillus niger* le sophorose n'induit pas l'expression de gènes de cellulases (Bisaria and Mishra, 1989). La croissance en présence de cellobiose (liaison β-1,4 de 2 unités glucoses), le produit final de l'action des cellobiohydrolases (Ilmén et al., 1997) montrait une induction de l'expression des cellulases de *T. reesei* (Ilmén et al., 1997) et de *A. nidulans* (Chikamatsu et al., 1999). Toutefois, l'effet inducteur du cellobiose reste encore controversé.

Le lactose (1,4-β-D-galactopyranosyl-D-glucose) est actuellement la source de carbone la plus soluble qui permet l'expression des cellulases chez *T. reesei*. Ainsi, le lactose a été utilisé comme source de carbone pour la production de protéines homologues mais également hétérologues sous le promoteur de la cellobiohydrolase I (cbh1) du champignon (Penttilä, 1998). Le lactose seul n’est pas un composé polymère des parois cellulaires des plantes. Il est coupé par une β-glucosidase

extracellulaire en glucose et galactose. En présence d'une variété d'oligosaccharides dans les cultures de *T. reesei*, il y a également induction de l'expression des cellulases (cellobiono-1,5-lactone, laminaribiose, gentiobiose, xylobiose et le sorbose) (Durand et al., 1988).

La régulation des cellulases a été étudiée chez différents champignons filamenteux montrant que le glucose agit généralement comme un répresseur (Ilmén et al., 1997).

2.3.3.3. Expression des hémicellulases

L'expression de ces gènes a été largement étudiée chez *Aspergillus* et *T. reesei*. D'une manière générale, la présence du xylane, d'arabinane et de mannane induit l'expression de ces gènes. De ce fait, les gènes codant pour des enzymes xylanolytiques chez *Aspergillus* sont induits par le xylose. De plus, le xylobiose et le xylose induisent l'expression d'une variété d'autres gènes en plus de ceux codant pour les xylanases chez *A. niger*, incluant les gènes codant pour les glucuronidases et l'acétylxylane estérase (de Vries et al., 2002). La production de plusieurs hémicellulases dans le cas de *T. reesei* est induite au cours de la croissance en présence de cellulose, xylane, sophorose, xylobiose et d'arabitol. Ainsi, des études réalisées sur *T.* reesei ont montré une induction des gènes impliqués dans l'hydrolyse du xylane (xyn1 et xyn2) et de la β-xylosidase (bxl1) plus des gènes codant pour la β-galactosidase et la β-glucuronidase (Margolles-Clark et al., 1997). Toutefois, de faibles concentrations en xylose peuvent induire seulement l'un des deux principaux gènes de xylanases (xyn1), alors que l'expression de l'autre gène (xyn2) peut être induite par le xylobiose et le sophorose (Mach et al., 1996). D'autres études ont montré que l'expression de gènes codant pour des xylanases lorsque la concentration en xylose était élevée (Margolles-Clark et al., 1997). Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par des concentrations différentes en source de carbone ou d'inducteur dans le milieu de culture au cours de la période d'analyse. En effet, le xylose en très faible concentration peut agir comme un inducteur, alors que de fortes concentrations entraînent une répression (de Vries et al., 1999).

L'arabinose et l'arabitol induisent cependant l'expression de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la dégradation de l'arabinoxylane (gènes codant l'arabino-furanosidase et l'arabinoxylane-arabinofuranohydrolase chez *A. niger*) (de Vries et al., 1994). Chez *T. reesei*, la croissance sur un milieu contenant du galactose induit seulement l'expression de gènes codant pour les galactosidases (agl1 et agl2) et pour l'acétyle xylane estérase (axe1) (Margolles-Clark et al., 1997). Alors que chez *A. niger*, le galactose et le mannose sont impliqués dans l'induction de gènes de galactosidase et mannosidase (Ademark et al., 2001).

D’une manière générale, des éléments régulateurs sont rencontrés dans les régions promotrices des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la dégradation du bois. Ils incluent les sites de fixation du répresseur (CRE), des éléments CCAA et les sites liant les activateurs transcriptionnels ou des facteurs modulant l’expression (figure 28).

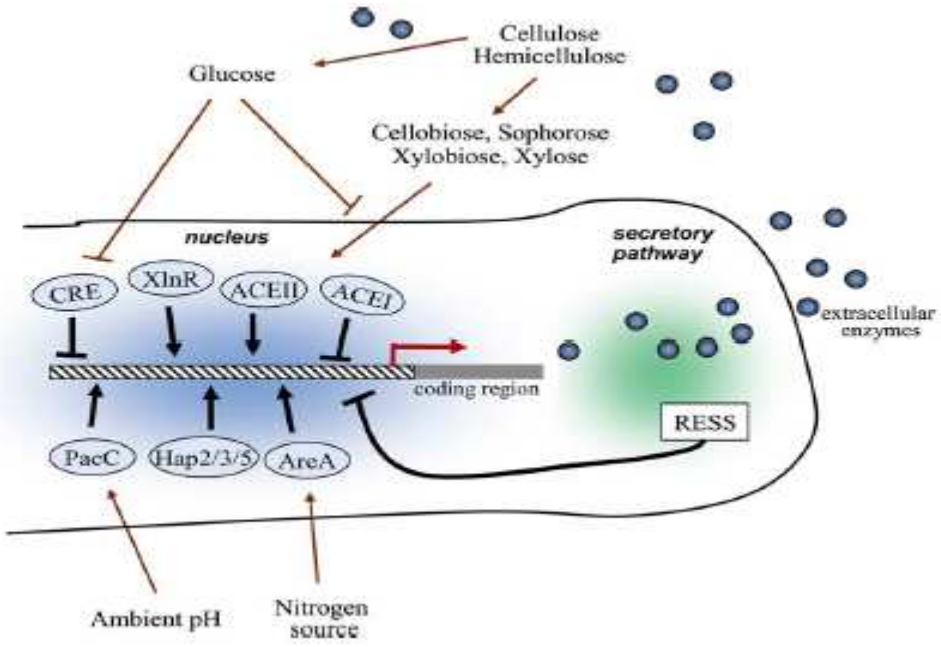


Figure 28. Représentation schématique de différents facteurs de transcription des champignons filamenteux et réponses affectant la régulation des expressions de gènes de cellulases et hémicellulases. Le répresseur catabolique de carbone CRE, les activateurs XlnR et ACEII, le répresseur ACEI, le complexe Hap 2/3/5 lié à la séquence CCAAT, le régulateur de pH PacC, et le régulateur d’azote AreA. (Aro et al., 2005)

Cette figure montre des facteurs bien caractérisés comme XlnR, ACEI et ACEII impliqués dans la régulation des enzymes dégradant les polymères du bois. En plus de ces facteurs, le rôle de Cre a aussi été bien établi. Toutefois, les fonctions du complexe Hap, du régulateur de pH PacC et des régulateurs d’azote AreA/ Nit-2 et NirA/ Nit-4 nécessitent d’être clarifiées pour confirmer leur implication chez les champignons filamenteux.

2.4. Préservation du bois

Le bois est un polymère d’origine naturel qui reste sensible aux attaques de différents micro-organismes (bactéries, insectes, champignons). Il est donc nécessaire de le traiter pour qu’il conserve toutes ses propriétés mécaniques et esthétiques. Dans ce contexte, le choix du traitement doit être effectué en fonction des conditions d’emplois et des principaux risques biologiques

pouvant être rencontrés lors de la mise en service du matériau. Le tableau 2 présente les critères de décisions établis par la norme européenne EN335-2

Classes	Situation en service	Exemple d'emplois	Risques biologiques
I	Bois toujours sec	A l'abri de l'humidité	Insectes
II	Bois sec dont la surface est humidifiée temporairement ou accidentellement.	Charpente, ossatures correctement ventilées en service	Insectes, termites[1], champignons de surface
III	Bois soumis à des alternances humidité/sécheresse	Toutes pièces de construction ou de menuiseries extérieures verticales soumises à la pluie	Pourriture, insectes, termites[1]
IV	Bois d'humidité toujours ≥ 20%, en tout ou partie de son volume	Bois horizontaux en extérieur et bois en contact avec le sol	Pourriture, insectes, termites[1]
V	Bois en contact permanent avec l'eau de mer	Piliers, ponton, bois immergés	térébrants marins

[1]Dans les régions infestées

Tableau 3. Classification européenne des classes de risques du bois en service (d'après la norme EN335-1, 1992).

La norme EN335 distingue 4 ou 5 classes de risques, hormis le domaine maritime, dans lequel il n'y a aucun risque d'attaque par les insectes et les champignons. Avant d'envisager un traitement, il est utile de déterminer la nature précise des risques auxquels le bois va être exposé afin de sélectionner le produit de préservation adéquat et le procédé de traitement adapté. Selon les risques encourus on peut envisager des techniques de traitement plus ou moins efficaces. Les procédés d'aspersion, badigeonage et de trempage sont utilisés pour des traitements superficiels du matériau, alors que les techniques de type vide pression sont utilisées lorsqu'une imprégnation à cœur est necessaire... Historiquement, les produits de dégradations sont classés en trois grandes familles :

- les goudrons et les huiles
- les produits organiques
- les sels métalliques

Dans la catégorie des goudrons et des huiles, on rencontre majoritairement les créosotes obtenues par distillation de goudron. On distingue des créosotes légères correspondant à la fraction distillée en premier et des créosotes lourdes correspondant aux produits distillés à plus haute température.

Bien que abondamment utilisée au début du vingtième siècle jusque dans les années 1960. La créosote est de nos jours peu utilisée du fait de sa toxicité et de l'aspect inesthétique au traitement (couleur, odeur…).

Les composés organiques sont constitués de différents produits appartenant aux familles chimiques différentes. Ils ont été pendant longtemps utilisés en solution dans des solvants organiques associées à des résines de fixation. A l'heure actuelle, ces produits sont de plus en plus utilisés en phase aqueuse sous forme d'émulsion ou de microémulsion. Du fait de leur forte toxicité, certains de ces produits ont pratiquement disparu des compositions actuelles dans la majorité des pays occidentaux. C'est le cas notamment du pentachlorophenol (PCP) longtemps utilisé comme fongicide ou de composés organochloré, comme l'aldrine ou la dieldrine utilisée comme pesticides. Actuellement, le PCP a été remplacé par des produits moins toxiques comme les triazoles (propiconazole, azaconazole, tébuconazole), les sels d'ammonium quaternaire (chlorure de didécyldimethyl ammonium), des carbamates (IPBC), des complexes organométalliques (oxine de cuivre, citrate de cuivre). Les insecticides de la famille des pyrèthes remplacent pour leur part les organochlorés. Tous ces produits sont utilisables en classe II et III, leurs applications en classe IV restent limitées.

Le traitement des bois destinés à des utilisations en classe IV est réalisé en grande partie à l'aide de formulations multisels à base de chrome, de cuivre et d'arsenic (CCA). Leur consommation est passée de 450.000 m^3 à plus d'un million de mètres cubes de bois traités entre 1968 et 1977 aux Etats Unis (Nicholas et Cockcroft, 1982). Elles sont toxiques pour les champignons lignivores, les insectes et les térébrants marins. Les CCA protègent efficacement le bois mis en service dans les classes de risques biologiques élevés (Classe IV et V). Ces sels peuvent toutefois induire de nombreuses pathologies chez les êtres vivants qui conduit actuellement à leur abandon progressif dans la plupart des pays industrialisés (Lahiry, 1998). Un autre problème est la gestion des déchets de bois traités arrivés en fin de cycle. En effet, la combustion des bois traités au CCA génère des émissions gazeuses toxiques dues à la forte teneur en arsenic des cendres volantes et à la présence d'arsenic gazeux As_4O_6 (Mouras et al., 1996).

Dans leurs soucis de réduire les nuisances dues à l'utilisation de biocides, la directive biocide mis en place en 1998 en Europe a entrainé une mise en question des pratiques de préservation conduisant l'abandon des produits les plus toxiques pour l'environnement. Il semble donc important de trouver des alternatives aux différents produits de préservation dont l'utilisation a été mise en cause. Dans ce contexte, les contraintes environnementales de plus en plus sévères et surtout la limitation des COV (composés organiques volatiles), pèsent fortement sur le développement de nouveaux produits de préservation. La mise au point de nouveaux produits de préservation passe donc par une meilleure compréhension des systèmes biologiques impliqués dans la dégradation de ce matériau.

OBJECTIFS

3. Objectifs

Un des principaux objectifs des travaux présentés dans le cadre de ce manuscrit consistait à améliorer nos connaissances des processus de dégradation du matériau bois par les champignons de pourriture, en focalisant notamment sur les systèmes de dégradation excrétés par le champignon de pourriture blanche, *Trametes versicolor* lors de la dégradation du bois sur milieu malt agar dans des conditions opératoires proches des conditions rencontrées dans la norme EN 113. En effet, bien que la plupart des systèmes enzymatiques impliqués dans la dégradation du bois soient connus depuis de nombreuses années, aucune donnée n'était rapportée sur l'expression de ces différentes activités lors de la colonisation et de la dégradation du bois sur milieu malt agar.

Différents travaux avaient déjà été effectués sur la production d'enzymes en milieu liquide par les champignons de pourriture du bois (Karahanian et al., 1998 ; Brown et al., 1991 ; Aro et al., 2005). Par contre, les données sur l'expression des différentes enzymes en présence de bois massifs comme substrat restaient limitées à la mise en évidence de certaines activités, mais aucune étude ne rapportait l'ensemble de la globalité des activités lignocellulolytiques (Datta et al., 1991 ; Daniel et al., 1994 ; Dawson-Andoh and Morrel, 1992 ; Zhao et al., 1996 ; Machuca and Feraz 2001). A cet effet, nous nous sommes efforcés de mettre au point les différentes techniques nous permettant de suivre qualitativement et quantitativement la colonisation et l'altération du bois sur milieu gélosé par *Trametes versicolor* un champignon de pourriture blanche. Dans ce contexte, une meilleure connaissance des activités enzymatiques exprimées par les champignons de pourriture impliqués dans la dégradation du bois pouvait ouvrir différents champs d'investigations. Le premier était de développer une méthode d'évaluation rapide de la dégradation du bois basée sur la détection précoce de différentes activités enzymatiques impliquées dans sa dégradation.
L'autre objectif de l'étude était d'utiliser dans un deuxième temps les connaissances acquises sur l'expression de différentes activités enzymatiques pour tenter de mettre au point des formulations de préservation plus respectueuses de l'environnement, car plus sélective en ciblant les produits utilisés en fonction du type d'activités enzymatiques. Le choix de ce système se justifie par plusieurs raisons : *Trametes versicolor* est un champignon particulièrement virulent connu pour dégrader efficacement le bois de hêtre qui est une essence peu durable et facilement imprégnable, par ailleurs, le couple *Trametes versicolor* / hêtre est souvent utilisé comme système de référence dans les différentes normes destinées à évaluer l'efficacité de produits de préservation telles que la norme EN 113.

La colonisation du bois a également été suivie par microscopie électronique à balayage. D'autres techniques ont aussi été utilisées, telles que la chromatographie liquide haute performance (HPLC) permettant de suivre l'évolution des constituants du bois au cours de la dégradation, et la croissance du champignon via l'analyse de l'ergosterol lipide membranaire impliqué dans la biosynthèse des parois. La technique de PCR (Polymérase Chain Réaction) sera aussi utilisée pour quantifier la croissance du champignon.
Après avoir mis au point ces tests enzymatiques, nous avons étudié l'expression de ces différentes activités enzymatiques en présence de biocides comme le propiconazole. Les résultats obtenus nous ont alors conduits à évaluer l'effet d'inhibiteurs de chitinases sur la préservation du bois. Enfin, dans un deuxième temps, nous avons étudié l'expression de différentes activités enzymatiques mis en évidence précédemment en présence de bois traité thermiquement pour tenter de comprendre les raisons de l'augmentation de la durabilité du matériau.

La partie résultat de ce manuscrit se divise en cinq parties :

- La mise au point de différentes techniques nous permettant de détecter rapidement la colonisation et l'altération du bois par un champignon de pourriture blanche : *Trametes versicolor* utilisé comme organisme modèle dans le domaine.

- La caractérisation du stade initial du processus de colonisation et de dégradation du bois par *T. versicolor*

- L'étude de l'effet du propiconazole sur la production d'enzymes impliquées dans la mobilisation des nutriments.

- L'effet de la caféine et du propiconazole sur la croissance des champignons de pourriture et leur apport dans la mise au point de nouvelles stratégies d'inhibition de l'altération du matériau bois.

- L'effet du traitement thermique sur les activités enzymatiques exprimées par *T. versicolor* lors de la colonisation et de la dégradation du bois de hêtre dans le but de mieux comprendre les raisons de l'augmentation de durabilité due au traitement.

RESULTATS

ETAPES DU PROCESSUS DE COLONISATION DU BOIS PAR *T. versicolor*

4. Résultats

4. 1. Etapes du processus de colonisation du bois par *T. versicolor*

4.1.1. Introduction

Il existe de nombreux organismes impliqués dans la biodégradation du matériau bois, comme les bactéries, les champignons et les insectes. Parmi ces organismes, les champignons basidiomycètes, comprenant les pourritures blanches, les pourritures brunes et les pourritures molles jouent un rôle essentiel (Eriksson et al., 1990).

Dans le souci de lutter contre les agents de pourritures et de développer de nouveaux produits ou formulations de préservation, il est important de disposer de méthodes permettant de détecter précocement la pourriture du bois par les champignons. La méthode la plus fréquemment utilisée consiste à effectuer des analyses gravimétriques permettant de suivre l'évolution de la masse d'un échantillon exposé à un champignon dans des conditions données conduisant à une mesure de perte de masse caractéristique du niveau de dégradation du bois (Wälchli, 1970). D'autres méthodes impliquent la mesure de la perte du module d'élasticité (Mohebby, 2003 ; Mohebby and Militz, 2002), des tests de microcalorimétrie (Bjurman and Wadsö, 2000 ; Xie et al., 1997 ; Mohebby, 2003 ; Mohebby et al., 2003) ou des techniques microscopiques permettant de détecter la présence du champignon dans les parois cellulaires du bois (microscopie confocale, microscopie électronique et polarisée) (Anagnost, 1998). La résonnance magnétique nucléaire (RMN), la résonance paramagnétique (Illman and Bajt, 1997) et la spectroscopie infrarouge (FTIR) permettent de suivre l'évolution chimique des composés du bois (Pandey and Pitman, 2003). Le suivi de l'ergostérol qui est un constituant des lipides membranaires des champignons (Mohebby et al., 2003.), des analyses utilisant le diacétate de fluorescéine (FDA) (Mohebby et al., 2003), l'analyse des composés extractibles par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) ou par chromatographie liquide haute pression (HPLC), ainsi que l'analyse des constituants pariétaux du bois (Zabell and Morrell, 1992; Mohebby and Militz, 2002) ont également été proposé. Enfin, des techniques d'immunodiagnostique ont également été envisagées (Clausen, 1997).

La plupart de ces techniques impliquent généralement des temps d'expérimentation relativement longs pour détecter la dégradation du bois, supérieurs à plusieurs semaines (16 semaines par exemple dans la norme EN-113 destinée à tester l'efficacité de produits de

préservation). Dans la perspective de limiter ce temps d'incubation, Pandey et son équipe ont utilisé la spectroscopie infrarouge (FTIR) qui est une méthode permettant de déterminer qualitativement la présence des différents constituants du bois notamment durant les stades initiaux du processus de dégradation (Pandey and Thegarjan, 1997 ; Pandey, 1999 ; Pandey et Pitman 2003). Mohebby (2005) a également travaillé sur la détection précoce de la dégradation du bois par les champignons, notamment celle du bois de hêtre (*Fagus sylvatica*) par *Trametes versicolor*, en utilisant la technique de spectroscopie infrarouge à réflexion totale atténuée (ATR). Des petits blocs de bois ont été exposés durant 84 jours en présence du champignon, puis analysés toutes les deux semaines. Les résultats obtenus permettent de mettre en évidence un début d'altération du bois après deux semaines d'exposition au champignon. L'apparition de nouveaux signaux entre 28 et 70 jours d'exposition indique la présence de modifications de la paroi cellulaire du bois. La disparition de ces signaux après 84 jours suggére que les constituants des parois cellulaires sont totalement dégradés.

Le développement de la PCR (Polymérase Chain Reaction) a contribué à améliorer la sensibilité de la détection du champignon sur son substrat naturel (bois). La spécificité de cette technique et sa sensibilité permettent une détection rapide des agents de dégradation permettant l'application de traitements biocides adaptés durant les premiers stades de la dégradation. Cette méthode, appliquée par Jasalavich et al (2000), a permis de détecter des champignons de pourritures brune et blanche à différents stades de dégradation. Cette étude a permis de démontrer qu'il était possible de détecter la présence de champignons sur le bois, grâce à l'utilisation de primers universels et/ou spécifiques des basidiomycètes dérivés des séquences d'ADN ribosomales, avant qu'une perte de masse mesurable puisse être détectée.

Zaremski et al. (2005) ont également travaillé sur la détection moléculaire *in situ* des basidiomycètes de pourritures blanche et brune infectant des bois des pays tempérés et tropicaux. L'objectif de cette étude consiste à mettre au point une méthode moléculaire faisant appel à la PCR et au séquençage d'ADN permettant l'identification précoce des différents organismes impliqués. L'outil ainsi mis au point peut être utilisé pour garantir que des bois commerciaux sont sains et pour faire un usage plus efficace des produits chimiques utilisés dans le cadre de la préservation et par conséquent réduire leur impact négatif sur l'environnement.

Dans le but de détecter précocement la présence de champignons mais également dans un souci d'une meilleure compréhension des phénomènes de dégradation du bois de hêtre par *Trametes versicolor*, nous nous sommes attachés à étudier l'expression de différentes enzymes impliquées

dans la mobilisation nutritionnelle. Dans la littérature, plusieurs études ont été effectuées sur la production d'enzymes en milieu liquide par les champignons (Aro et al., 2005 ; Karahanian et al., 1998 ; Brown et al., 1991). Par contre, les études sur milieu solide restent limitées (Lobos et al., 1994 ; Janse et al., 1998 ; Machuca and Ferraz, 2001 **;** Ferraz et al., 2003). L'utilisation de substrats fluorescents permet également d'envisager une détection sensible et précoce des différentes activités recherchées (Courty et al., 2005) et donc du processus de dégradation. A cet effet, les activités cellobiohydrolase, β-Glucosidase, β-xylosidase, phosphatase, aminopeptidase, chitinase et galactosidase ont été détectées en utilisant différents substrats associées à un marqueur fluorescent la methylumbelliferone (MU), l'enzyme va couper le substrat et libérée une molécule fluorescente qui sera détecter au spectrophotomètre à fluorescence (Wallac perkin-Elmer life sceinces, Villebon-sur-Yvette, France) à 450 nm. Nous avons choisi d'utiliser ces substrats pour la suite de notre travail pour la rapidité et la sensiblité de cette méthode à la détection des activités enzymatiques.

4.1.2. Résultats

Les résultats obtenus sont présentés dans l'article en cours de préparation intitulé : « Extracellular enzymes involved in nutrient mobilization during T*rametes versicolor* wood colonization» (*en préparation*)

Extracellular enzymes involved in nutrient mobilization during *Trametes versicolor* wood colonization

By S. Lekounougou[a,b], S. Mounguengui[b] , S. Dumarçay[b], P. Gérardin[b], J.P. Jacquot[a] and E. Gelhaye[a*]

[a]IFR 110, UMR INRA 1136, Interactions Arbres/Micro-organismes, Faculté des Sciences, BP 239, Nancy Université, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

[b]Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur le Matériau Bois, UMR INRA 1093, Faculté des Sciences, BP 239, Nancy Université, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.
[c] IFR 110, UMR INRA 1137, INRA Centre De Nancy , 54280 Champenoux

Corresponding author : gelhaye@lcb.uhp-nancy.fr

Running title: Extracellular enzymes during wood colonization

Abstract

T. versicolor was grown on *Fagus sylvatica* wood chips under solid state fermentation in presence of malt-agar medium. Wood colonization process has been followed determining total wood, polysaccharides and lignin decay rates and pattern production of relevant enzymes during the biodegradation. *T. versicolor* is able to degrade simultaneously lignin and polysaccharides, nevertheless when the lignin removal rate was almost constant throughout the experiment, the polysaccharides removal rate increased strongly after 40 incubation days in the tested culture conditions. This degradation is correlated with the induction of carbohydrates hydrolysing activities as well as with leucine peptidases, chitinases and phosphatases involved in nutrients mobilization. Taking together, these data suggest that at the initial stage, extend of wood decay is dependent of surrounding medium components; increase of wood decay rate correlated with hydrolytic and oxidative activities occurring after surrounding medium exhaustion and/or nutrients transport limitation. Furthermore, regulations of hydrolytic and oxidative activities are clearly different.

Keywords:

Trametes versicolor, wood decay, solid-state, laccases, cellulases, peroxidases

Introduction

Lignocellulose biodegradation is a key step for carbon recycling in terrestrial ecosystems. The ability to degrade cellulose and hemicelluloses is fairly common as a primary metabolic process among fungi and other organisms. Lignin, however, is extremely recalcitrant and is mineralized in an oxidative process. Only a few groups of micro-organisms are capable of degrading complex lignin polymers and they are best exemplified by the white-rot fungi, which cause the greatest degree of mineralization (Field et al., 1993; Orth et al., 1993). Oxidation of lignin yields no net energy gain and so lignin is degraded during secondary metabolism in order to access wood polysaccharides locked in lignin-carbohydrate complexes and providing also an energy source to which other organisms do not have access (Jeffries, 1990). White-rot lignocellulose degradation arises from the production of extracellular enzymes that act on a broad array of organic compounds (Martinez, 2002; Rabinovich et al., 2004). Some of these extracellular enzymes are involved in lignin degradation such as lignin peroxidases, manganese peroxidases and laccases. Attributed to the low specificity and strong oxidative abilities to their lignin degradative systems, white-rot fungi are also able to degrade a broad spectrum of aromatic xenobiotics. This unique ability has been a matter of high scientific interest leading to numerous studies with the aim to characterize these extracellular oxidative systems (Pointing, 2001; Martinez, 2002; Ikehata et al., 2004; Lekounougou et al., 2007a).

Expression of these extracellular enzymes has been extensively studied, showing a tight regulation at the transcriptional level (Aro et al., 2005). A synergistic action of the enzymes is needed for lignocellulose degradation and thus production of many enzymes is coordinately regulated. For instance, the same compounds may provoke expression of both cellulases and hemicellulases (Margolles-Clark et al., 1997). Majority of the genes studied are repressed by the presence of easily available carbon sources, such as glucose, and induced in presence of the substrate polymers. Concerning lignin and manganese peroxidases, genes expression is usually triggered by the nitrogen, carbon or sulphur depletion. In contrast, laccases are constitutively expressed and often enhanced by inducers as copper or aromatic compounds (Collins and Dobson, 1997).

Although the enzymology of lignocellulose degradation by white-rot fungi has been widely studied during the last few decades (Cullen and Kersten, 2004), fairly little is known about the expression of the different enzymes during fungal growth on lignocellulose substrates, such as wood. Reported here are data on solid-state fermentation of *Fagus sylvatica* wood using *Trametes versicolor* cultures. Some relevant hydrolytic enzymes (cellobiohydrolases, β-glucuronidases) and oxidative enzymes (laccases and peroxidases) present in the culture extracts were studied. The changes in the polysaccharides and lignin contents in the decayed wood were also determined to investigate the

relationship between the enzyme equipment of the fungus and its corresponding pattern of wood decay.

Materials and methods

Decay fungus

The white-rot fungus, *Trametes versicolor* (L) Quelet (Strain CTB 863A) was employed. Stock cultures of fungi were maintained on malt-agar slants stored at 4°C.

Solid state cultures on wood

Beech wood (*Fagus sylvatica*) blocks (1.5 x 0.5 x 3.5 cm) in radial, tangential, longitudinal directions respectively) were dried at 103°C and weighed at ± 0.01 g (m_0). Sterile culture medium (20 ml), prepared from malt (40 g) and agar (30 g) in distilled water (1l), was placed in 9 cm Petri dishes, inoculated with fungus and incubated during 2 weeks at 22°C and 70% HR to allow colonization of the medium by the mycelium.

Five U.V. sterilized blocks (treated or untreated) were placed in each Petri plates under sterile conditions. Incubation was carried out at 22°C under controlled humidity conditions of 70% RH in a climatic chamber WTB BINDER TYP KBF 115.

Wood component analysis

Hydrolytic method for analysis of carbohydrates

Dried extractive-free sawdust of 350 mg was mixed with 4 ml of 72% sulphuric acid and stirred at room temperature for 1 h. After this period, 60 ml of distilled water was added and the mixture heated under reflux for 4 h. The insoluble residue was removed from the hydrolysate by filtration on a Büchner funnel, washed with 100 ml of distilled water, dried at 103°C and weighed. The filtrate was quantitatively transformed into a 250 ml volumetric flask and completed to 250 ml with distilled water. 20 ml was placed in a 50 ml Erlenmeyer flask and neutralized to pH = 5 with a saturated Ba $(OH)_2$ solution. The mixture was centrifuged, and the clear supernatant transferred into a 50 ml round bottomed flask, and evaporated to dryness under vacuum using a rotary evaporator. The residue was redissolved in 2 ml of water, filtered through a Millipore Millex-HA 0.45 μm filter and analyzed by HPLC. Each hydrolysis was triplicated.

HPLC analysis

The analysis were performed on a Waters liquid chromatograph (Waters SAS, Saint Quentin-en Yvelines, France) equipped with a system controller 600E, a manual injector system with a 20 µl loop and a waters 2420 Evaporative Light Scattering (ELS) detector (gain = 1, evaporator tube temperature = 60°C and nebulizer gas pressure = 50 psi). The data were recorded with the Empower software. The analytical measurements were obtained on a Supelco (Sigma-Aldrich Chimie sarl, Saint Quentin Fallavier, France) Discovery LC-NH_2 column (250 mm x 4.6 mm i.d) at 30°C with a acetonitrile (78%), water (20%), methanol (2%) mixture as mobile phase and a flow rate of 1.5 ml min^{-1}. Each sugar hydrolysate was analyzed 3 times and the obtained values being averaged. Glucose content (%) was determined on the basis of glucose and cellobiose contents.

Wood weight loss

At different incubation times, colonized wood blocks were carefully collected, mycelia were then removed, and the blocks were dried at 80°C and weighted (m_1). a. Weight loss (WL) was expressed as a percentage of the initial oven dried weight of the sample according to the formula, where m_0 corresponds to the initial mass of the wood block

$$WL\ (\%) = ((m_0 - m_1)/m_0)\ x100$$

Enzymatic activities using fluorogenic assays

Colonized wood blocks were carefully removed from agar plates, mycelium surrounding wood chips being excised. The wood chips were then placed into a test tube containing 1 ml of 50 mM phosphate buffer pH 6. Then, mycelium was separated from the wood in order to facilitate enzyme extraction and the whole samples were incubated during 1 hour at room temperature. The samples were then centrifuged (10 000 g for 15 min); the supernatant being collected and tested for different activities.

Six enzyme substrates based on methylumbelliferone (MU) and 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) were studied: MU-phosphate for the detection of the acid phosphatase (EC 3.1.3.2), MU-β-D-glucopyranoside for β-glucosidase (EC 3.2.1.3), MU-β-D-glucuronide hydrate for glucuronidase (EC 3.2.1.31), MU-β-D-cellobioside for cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91), and L-leucine-AMC for leucine aminopeptidase (EC 3.4.11.1) activities. All chemicals were purchased from Sigma Aldrich Chemicals (Lyon, France).

The experimental conditions for fluorescence assays, incubation buffers and substrates concentrations were the same as described previously (Lekounougou et al, 2007a). Briefly, 50 µl of samples were mixed with 50 µl substrate solution, and 50 µl incubation buffer according to Courty

et al., 2005. Incubation occurred in black 96-well microtitration plates for 1 hour, fluorescence emission being recorded every 5 min on a Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Varian, Mulgrave, Australia) with an excitation wavelength of 360 nm and an emission wavelength of 450 nm.

ABTS oxidizing activities

Colonized wood blocks were removed carefully from agar plates, mycelium surrounding wood chips being excised. The wood chips were then placed into a test tube containing 900 µl of 50 mM phosphate buffer pH 6. Then, mycelium was separated from the wood in order to facilitate substrate diffusion and 50 µl of 100 mM 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonat. In order to stay in substrates-saturated conditions, incubation times have been varied (typically from 10 min to 2 hours) in order to obtain an 420 nm OD around 0.5. The samples were then centrifuged (10 000 g; 5 min) before to measure the 420 nm absorbance of the supernatant (ε_{420}=36 mM^{-1}. cm^{-1}).

In additional experiments, colonized wood chips harvested after 30 incubation days were cut in small pieces using a knife, incubating with 1 ml of 50 mM phosphate buffer pH 6 during 1, 2 and 5 hours at 37°C and then tested as described above. Whatever the used conditions, measured ABTS oxidizing activity were not significant different suggesting that ABTS diffusion was not limiting in these experimental conditions (data not shown).

Peroxydase activities

6 wood chips were removed after 11 incubation days and mixed in tubes for 30 min with 4 mL of sodium succinate buffer (50 mM ; pH 4.5) and sodium lactate buffer (50 mM; pH 4.5). Results were recorded after 30, 45 and 60 days incubation. Extracted solutions were pooled, centrifuged at 10.000 g for 10 min and the supernatant used for enzyme assays. The experiment was repeated three times.

Manganese peroxydase (MnP) activity was determined by monitoring the oxidation of red phenol spectrophotometrically at 610 nm (Glenn and Gold, 1985). Each reaction mixture contained 2. 65 mL sodium succinate buffer (50 mM ; pH 4.5) and sodium lactate buffer (50 mM; pH 4.5), 30 µL $MnSO_4$ (10 mM), 15 µL H_2O_2 (100 mM) and 300 µL phenol red (10 mM) . The reaction was initiated by adding H_2O_2, and the mixture incubated at 37°C. The reaction mixture was sampled by removing 500 µL of the 2 mL and adding the 10 µL sample of 10 N sodium hydroxide every minute for 5 min and this mixture was centrifuged at 10.000g for 10 min, and the supernatant from this colonized wood chips extract was monitored.

In the other tube, the reaction mixture contained 2. 65 mL sodium succinate buffer (50 mM ; pH 4.5) and sodium lactate buffer (50 mM; pH 4.5), 300 µL phenol red (10 mM) and 15 µL H_2O_2 (100 mM) without $MnSO_4$. After centrifuging, the supernatant was monitored.

FTIR analysis

FTIR spectra were recorded as KBr disks on a Perkin Elmer Spectrum 2000 FTIR spectrometer. Finely divided sawdust, approximately 10 mg, was dispersed in a matrix of KBr (300 mg) and pressed to form pellets. Due to the difficulty in defining a reference spectral band remaining completely invariable to perform quantitative measurements, all comparisons were made qualitatively. All spectra were smoothed and presented without baseline correction or normalization.

Results

Wood colonization

SEM observations indicated that wood chips were deeply colonized after 10 days. Hyphae were clearly present in wood vessels, whereas a wide mantle was observed at the wood surface (data not shown). Since after 10 incubation days, the wood degradation remained very low (see below), these qualitative observations suggest that wood colonization and wood degradation are not directly connected as previously suggested for *T. versicolor* (Lekounougou et al., 2007a; 2007b) and for other wood decayed fungi (Ferraz et al., 2003).

Degradation of wood components

The mean percentage weight losses for samples exposed to *T. versicolor* for different exposure periods are given in Fig.1. After 90 days of incubation, around 45% of wood weight loss was measured confirming the efficiency of *T. versicolor* in the beech degradation in these laboratory conditions (Mabicka et al., 2004). Wood decay proceeded in two different stages leading to two wood mass loss rates, the decay amounts being too small to be significant during the first 10 incubation days. Between 10 to around 40 incubation days, the apparent decay rate appeared to be more or less constant at a value of 0.35 % per day. From about 45 incubation days, this degradation rate increased to a value of 0.80 % per day.

The lignin degradation occurred throughout the whole incubation time with a rate remaining constant (around 4% per day) (Fig.1).

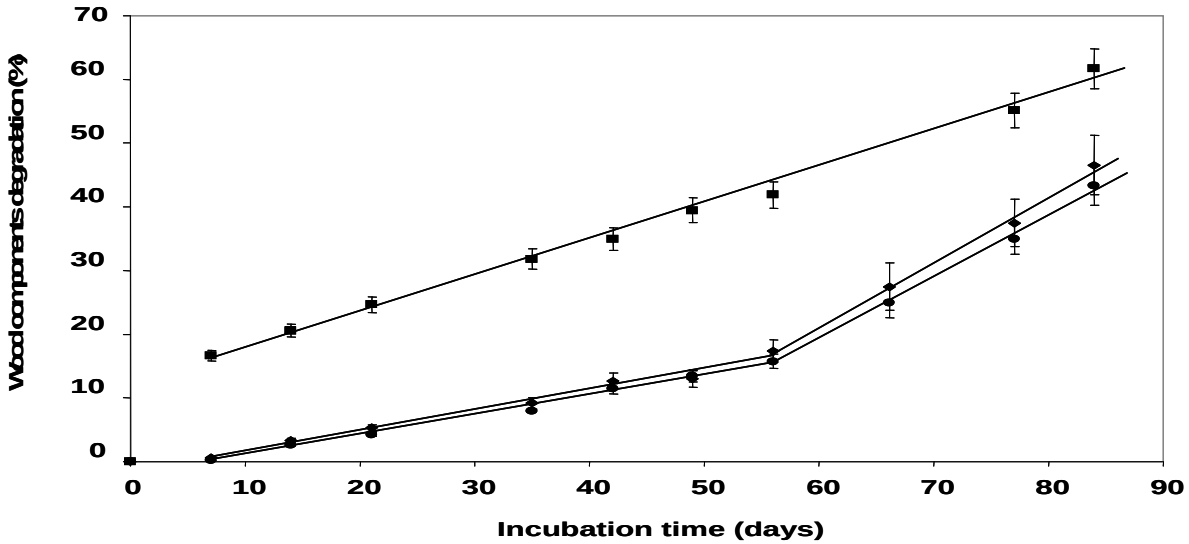


Figure 1. Degradation (%) of *Fagus sylvatica* components induced by *Trametes versicolor* under solid state fermentation. Each point is the mean ± standard deviation of nine different experiments. Mass of Polysaccharides (●); mass of lignin (■); weight loss (▲).

At the end of experiment, around 60% of lignin loss was measured. The wood polysaccharides degradation reached around 45% after three months. In contrast to lignin decay rate, the polysaccharides degradation rate was not constant during the experiment and was directly connected to the total wood mass loss. A linear relationship links indeed both levels of degradation (polysaccharides and total wood).

Analysis of glucose and xylose released after wood acid hydrolysis were performed throughout the experiment. The obtained data revealed a constant glucose/xylose ratio (around 1.8) suggesting that hemicelluloses and cellulose were simultaneously degraded (data not shown). IFR spectroscopy has been also used to follow chemical alteration during beech wood degradation by *T. versicolor*. The pattern of spectra obtained after 4, 10 and 12 incubation weeks are quite similar to that one obtained with no-inoculated wood, confirming that *T. versicolor* degrades both carbohydrates simultaneously in these experimental conditions (data not shown) (Mohebby, 2003).

Oxidative enzymes

Some relevant extracellular enzymes produced during the wood colonization and degradation by *T. versicolor* have been measured from wood chips. ABTS oxidation has been used allowing the detection of laccases (Rodríguez et al.; 1999) but also non enzymatic oxidative reactions since oxidizing non-enzymatic molecules have been proposed to be involved in the wood decay process (Tornberg and Olsson, 2002; Tanaka et al., 1999). The ABTS oxidases production pattern during wood degradation by *T. versicolor* is showed in Fig. 2.

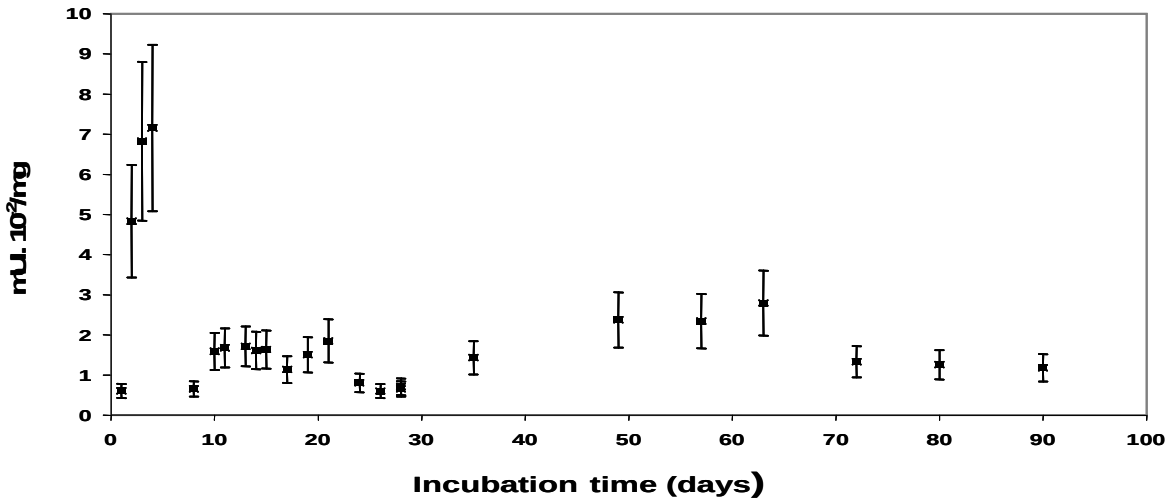


Figure 2. ABTS oxidizing activity during wood chips colonization by *T. versicolor*. Each point is the mean ± standard deviation of nine different experiments.

Three stages could be observed during the whole process. In the first 10 incubation days, a sharp activity increase has been observed, reaching around 0.07 mUI/mg after 4 days. This increase has been previously associated with laccases production, which is involved in wood extractives degradation (Lekounougou et al., 2007a). In the second stage comprised between 10 and around 30 incubation days, a second increase of the ABTS oxidizing activity has been detected. Nevertheless, the maximal value obtained during this stage remains largely smaller that one detected during the first part (around 0.02 mUI/mg). The third increase of activity is correlated to the second phase of wood weight loss (see Fig. 1) and also the induction of carbohydrate hydrolyzing enzymes (see below). The maximal value of activity detected during this phase was around 0.03 mUI/mg after 60 days before to decrease slightly.

Manganese peroxidases (MnPs) activities have been detected throughout the experiment excepting the first incubation days, a strong MnPs production being detected after 11 days reaching 0.211 UI/g (Tableau 1).

Tableau 1. Manganese peroxidase activity detected during wood chips colonization by *T. versicolor*. Each point is the mean ± standard deviation of six different experiments

Incubation Time (Day)	MnP activity (UI/g)	Extraction
11	0.211 0.073 0.0068	1 2 3
45	0.0614 - -	1 2 3
60	0.0142 - -	1 2 3

Interestingly, after around incubation 30 days, as observed for laccases, the production of MnPs was particularly weak, suggesting a change of the extracellular enzymes production and also of the fungal metabolism. After this transition, MnPs were also detected during the last part of the experiment.

Carbohydrates hydrolysing activities

Carbohydrates hydrolytic activities have also been followed using specific substrates for cellobiohydrolases, β-glucosidases (enzymes involved in cellulose breakdown) and β-glucuronidases (enzyme involved in hemicelluloses breakdown). A similar pattern has been observed for the three tested activities with a detected basal level from 10 to 40 incubation days following to a strong increase of the measured activity, the maximal activity being detected after 70 incubation days. As example, the pattern of cellobiohydrolase and β-glucuronidase activities plotted against the percentage of wood degradation is shown in Figure 3.

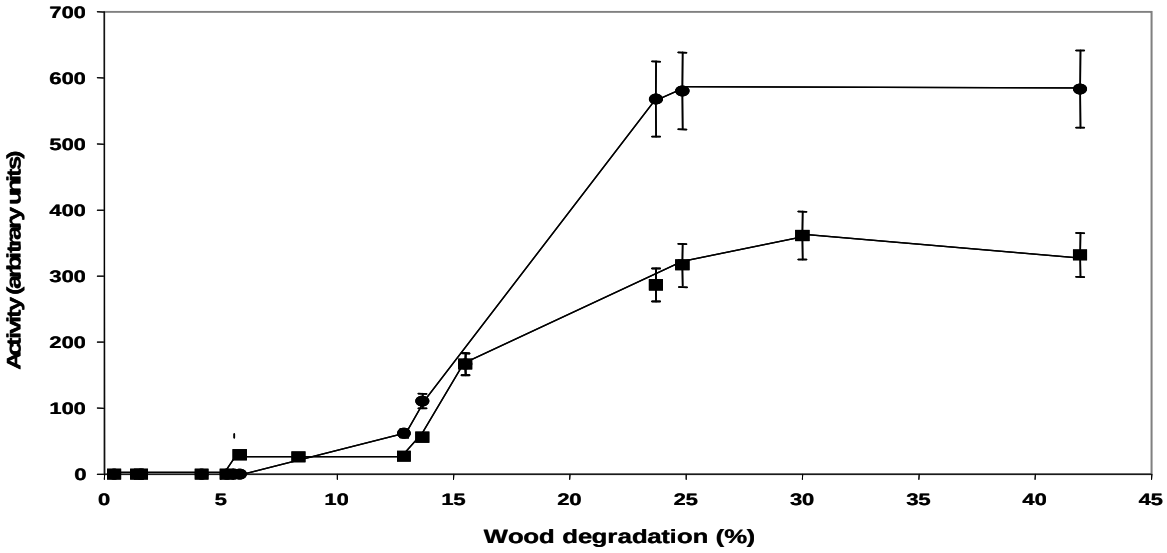


Figure 3. Cellobiohydrolase and glucuronidase activities during wood chips colonization by *T. versicolor*. (■) cellobiohydrolase; (●) glucuronidase. Each point is the mean ± standard deviation of nine different experiments

The induction of both activities occurred when between 10 to 15% of wood has been degraded, corresponding to the beginning of the second phase characterized with an increase of polysaccharides degradation rate (Fig.1).

Other activities

In addition of enzymes involved in lignocellulose breakdown, additional experiments have been performed in order to detect leucine peptidases, phosphatases and chitinases. Detection of chitinases

occurred only in the last part of experiments, a strong induction of this activity being detected from around 50 incubation days (data not shown). In a similar way, phosphatases and leucine peptidases induction was also detected after 45-50 incubation days (Fig.4).

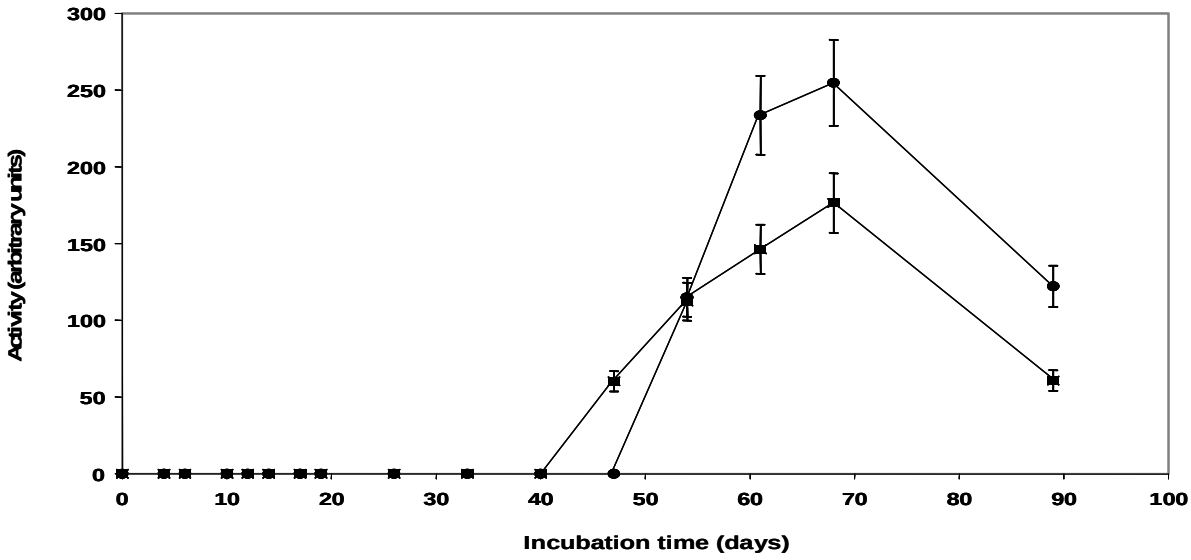


Figure 4. Leucine aminopeptidase and phosphatase activities during wood chips colonization by *T. versicolor*. (●), Leucine aminopeptidase; (■), phosphatase. Each point is the mean ± standard deviation of nine different experiments

Discussion

The aim of this study was to investigate wood colonization by *T. versicolor*, a fungus which has been extensively studied as a model for white-rot fungi. Chemical analyses and microscopically findings have also shown that *T. versicolor* is a non-selective or simultaneous type and that it removes lignin, hemicelluloses and cellulose (Faix et al**,** 1993**;** Mohebby, 2003). Nevertheless, for *T. versicolor* as for other wood decay fungi, data about the wood colonization process are scarce but should be very important to understand the key stages of the process and also design new wood preservatives. In the wood protection field, the main laboratory test is based on EN 113 method using malt agar as co-substrate. From this one, we have developed a method using small wood chips in order to follow the wood colonization process.

In these experimental conditions, wood degradation is not directly related to wood colonization by *T. versicolor*. Wood chips were indeed deeply colonized after three weeks whereas the level of degradation remained low at this stage. The fungal growth occurred during this colonization stage probably in depend of malt agar nutrients. It is clear that *T. versicolor* is able to degrade simultaneously lignin and polysaccharides (Machuca and Ferraz, 2001; Mohebby, 2003), nevertheless when the lignin removal rate was almost constant throughout the experiment, the

polysaccharides removal rate increased strongly after 40 incubation days in the tested culture conditions. In fact, the detected increase of wood decay rate is mainly due to the polysaccharides degradation rate as shown by wood components analyses. The polysaccharides degradation is correlated to a strong induction of carbohydrates hydrolyzing activities. Contrary to peroxidases, carbohydrates degrading enzymes could not act *via* low molecular weight mediators, a previous lignin removal being necessary to permit these enzymes to diffuse into the wall cells (Cullen and Kersten, 2004**;** Machuca and Ferraz, 2001). This could explain the low level of cellulases and hemicellulases detected during the first colonization stage. Another important point is that the fungal production of cellulases and hemicellulases has been shown to be tightly regulated depending of both presence of inducers and absence of easily available carbon source (Aro et al., 2005). The increase of polysaccharides removal rate observed after 40 incubation days could be also due to a depletion of malt-agar nutriments. This hypothesis is sustained by the measured induction at the same time of phosphatases, chitinases and leucine peptidases. These enzymes are involved in nitrogen and phosphorus mobilization and their induction is in accordance with easily available nutrients depletion in the second part of the experiment.

While hydrolyzing activities are mainly present in the second stage of wood decay, a more complex pattern of oxidative activities was observed. The first burst of ABTS-oxidizing activities occurring at the beginning of the colonization process has been shown to be related to wood extractives degradation (Lekounougou et al., 2007a). This degradation is mainly due to laccases, the production of these enzymes being induced by phenolic compounds and also wood extractives (Aro et al., 2005; Lekounougou et al., 2007a). MnPs were not involved in this stage. After this first induction, a second phase of ABTS oxidizing activity has been observed. In a similar way, MnPs have been also detected during this stage. Lignin peroxidase activity was not assayed, because UV-absorbing compounds derived from wood and present in the fungal extracts interfered with the veratryl alcohol method (Machuca and Ferraz, 2001; Ferraz et al., 2003). Clearly, the level of detected oxidative enzymes could not be related to the lignin degradation rate, which remains nearly constant throughout the experiment. Since the regulation of peroxidases has been shown to be tightly dependant of the nutrients availability, the fungal micro-environnement (nutrients availability and inducers presence) is probably an important factor in the regulation of the enzymes production. The third peak of oxidative activities is correlated with the induction of carbohydrates hydrolyzing activities in accordance with the simultaneous degradation of lignin and polysaccharides.

In conclusion, we have shown that in the currently experimental system used in the wood preservative field (*i. e.* wood and malt agar as co-substrates), wood degradation occurred at least in two different stages depending probably of malt-agar nutriments availability. This two-stages process is mainly correlated with the polysaccharides degradation, whereas lignin degradation

remains constant throughout the experiment. This model could be useful to study in detail the expression regulation of isoenzymes involved in lignocellulose breakdown during the different observed stages.

References

Aro, N., Pakula, T., and Penttilä, M. (2005) Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev* **29:** 719-739.

Collins, P., and Dobson, A.W. (1997) Regulation of laccase gene transcription in T*rametes versicolor*. *Appl Environ Microbiol* **63:** 3444-3450.

Courty, P.E., Pritsch, K., Schloter, M., Hartmann, A., Garbaye, J., 2005. Activity profiling of ectomycorrhiza communities in two forest soils using multiple enzymatic tests. New Phytologist 167, 309-319.

Cullen D and Kersten P. J (2004). Enzymology and molecular biology of lignin degradation. Bioch. Mol. Biol. **2**: 249-263.

Faix O, Bremer J, Schmidtt O, Stevanovic T (1993). Monitoring of chemical changes in white-rot degraded beech wood by pyrolisis-gas chromatography and Fourrier transform
infrared spectroscopy. Journal of Analytic. Appl. Pyro. **2:** 147-162.

Ferraz, A., Córdova, A.M., Machuca (2003). A. Wood biodegradation and enzyme production by Ceriporiopsis subvermispora during solid-state fermentation of Eucalyptus grandis Enzyme and Microbial Technology 32 (1), pp. 59-65

Field, J.A., de Jong, E., Feijo-Costa, G., and de Bont, J.A.M. (1993) Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends Biotech* **11:** 44-49.

Glenn,J.K., and Gold, M.H. (1985). Purification and characterization of an extracellular Mn (II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys. **242:** 329-341.

Ikehata, K., Buchanan, I. A., and Smith, D.W. (2004) Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. *J Environ Eng Sci* **3:** 1-19.

Jeffries, T.W. (1990) Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. *Biodegradation* **1:** 163-176.

Lekounougou S, Mounguengui S, Dumarçay S, Rose C, Courty P. E, Garbaye J, Gérardin P, Jacquot J.P and Gelhaye E (2007a). Initial stages of Fagus sylvatica wood colonization by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*: Enzymatic characterization. Int. Biodeter. Biodegrad. (In press).

Lekounougou S, Jacquot J.P, Gérardin P, Gelhaye E (2007b). Effects of propiconazole on extra-cellular enzymes involved in nutrient mobilization during *Trametes versicolor* wood colonization. Wood Science Technology. (In press)

Mabicka A, Dumarçay S, Gelhaye E, Gérardin P (2004). Inhibition of fungal degradation of wood by 2-hydroxypyridine-N-oxide. Holzforshung. **58**:566-8.

Machuca A, Ferraz A (2001). Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium. Enz. Microbial. Technol. **29:** 386-391.

Margolles-Clark, M., Ilmen, M., and Pentillä, M. (1997) Expression patterns of 10 hemicellulase genes from filamentous fungus Trichoderma reesei on various carbon sources. *J Biotechnol* **57:** 167-179.

Martinez, A.T. (2002) Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme Microb Technol* **30:** 425-444.

Mohebby B (2003). Biological attack of acetylated wood. Ph. D. Thesis, Göttingen University, Göttingen, Germany.

Orth A.B, Royse D.J and Tien M (1993). Ubiquity of lignin-degradation peroxidases among various wood-degrading fungi. Appl. Environ. Microbiol. **59** (12): 4017-4023.

Pointing, S.B. (2001) Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* **57:** 20-33.

Rabinovich, M.L., Bolobova, A.V., Vasil'chenko, L.G (2004). Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: a review. Applied and Biochemical Microbiology 40, 1-17.

Rodríguez E, Pickard M. A and Vázquez-Duhalt R (1999). Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. Curr. Microbiol. **30**: 27-32.

Tanaka H, Itakura S, Enoki A (1999). Hydroxyl radical generation by an extracellular low-molecular-weight substance and phenol oxidase activity during wood degradation by the white- rot basidoimycete Trametes versicolor. J. Biotechnol. **75**. 57- 70.

Tornberg K. and Olsson S (2002). Detection of hydroxyl radicals produced by wood-decomposing fungi. FEMS Mycrobiol. Ecol. **40** : 13-20

4.1.3. Conclusion

Les résultats de cette étude nous ont permis de montrer qu'apparemment, dans des conditions de culture proches de celles préconisées par la norme EN113, il n'y a pas de corrélation directe entre la colonisation du bois et la perte de masse induite par la dégradation du bois par *T. versicolor*. La dégradation des éprouvettes se déroule dans ces conditions selon un processus biphasique. La première phase, couplée à une vitesse de dégradation du matériau relativement lente (0.35 % par jour), est caractérisée par la présence d'activités laccases et peroxydases. La présence de ce système oxydatif est couplée à une dégradation de la lignine. Au cours de la seconde phase, la vitesse de dégradation augmente significativement (0,8 % par jour). Cet accroissement de la vitesse de dégradation est dû essentiellement à une augmentation de la vitesse d'hydrolyse des polysaccharides. Cette hydrolyse est liée à une forte induction d'activités cellulosiques et hémicellulosiques durant cette période. Durant cette seconde phase, la vitesse de dégradation de la lignine reste quand à elle équivalente à celle mesurée durant la première phase. Plusieurs phénomènes peuvent expliquer cette induction d'activité hydrolytique après 40 jours d'incubation. L'expression des cellulases et hémicellulases est hautement régulée notamment chez les champignons (Mach et al. 1996 ; Flipphi et al. 2003 ; Stapleton et al. 2004 ; Aro et al., 2005) et nécessite la présence d'inducteurs ainsi que l'absence de sources carbonées facilement assimilables. La croissance du champignon durant la première phase pourrait se dérouler essentiellement à partir des nutriments présents dans le milieu malt-agar *via* des phénomènes de translocation. Cet apport nutritif pourrait donc expliquer en partie la faible teneur détectée en activité hydrolytique. De plus, la structure même des parois cellulaires suggère que les enzymes, d'une taille moléculaire comparable à celles des cellulases, ne peuvent pas accéder directement à leur substrat sans une action préalable des mécanismes oxydatifs permettant de dégrader la lignine (Cullen and Kersten, 2004). Ceci pourrait également expliquer l'activité des peroxydases et des laccases (*via* des médiateurs de faibles masses moléculaires) durant la première phase, afin de permettre aux enzymes hydrolytiques telles que les hémicellulases et les cellulases d'accéder à leur substrat. Ces premiers résultats nous ont permis de mettre en évidence que si *T. versicolor* dégrade de manière simultanée polysaccharides et lignine (Pandey et Pitman, 2003), les régulations des systèmes oxydatifs et hydrolytiques de *T. versicolor* sont totalement différentes et expliquent la non linéarité entre la perte de masse et le temps d'incubation.

Dans le cadre d'une détection précoce du champignon et de la dégradation du bois, il apparaît que l'utilisation de substrats fluorescents permettant la détection de différentes activités hydrolytiques n'est pas indiquée dans un tel dispositif expérimental. En effet, la dégradation des

polysaccharides liée à l'induction des enzymes ne se déroule qu'après une forte colonisation, une dégradation importante (de 10 à 15 %) et une incubation relativement longue (environ 50 jours). En ce qui concerne les peroxydases, la teneur en activité détectée ne présente aucune relation avec la vitesse de dégradation observée. Il apparaît que seuls des substrats du type ABTS pourraient être utilisés comme indicateur précoce de la présence du champignon, du fait de la présence de laccases dans les premiers jours de colonisation et de la simplicité de mise en œuvre du test. Néanmoins, de tels bio-indicateurs potentiels serviraient uniquement d'un point de vue qualitatif, les teneurs en activités détectées n'étant pas directement corrélées à la dégradation du matériau, ni à la quantité de champignon présente.

STADE INITIAL DE COLONISATION DU BOIS PAR LE CHAMPIGNON T. versicolor

4.2. Stade initial de la colonisation du bois par le champignon *T. versicolor*

4.2.1. Introduction

Au cours des travaux précédents, une forte induction de l'expression de laccases a pu être mise en évidence durant les premiers jours de colonisation. Les laccases sont des enzymes potentiellement impliquées dans la dégradation du matériau bois. Elles catalysent l'oxydation de composés phénoliques (méthoxyphénols, hydroquinones) ainsi que de dérivés de la lignine comme des aldéhydes aromatiques (Saparrat et al., 2002 ; Debbies et al., 1996). Hormis la cellulose, les hémicelluloses et la lignine qui en sont les principaux constituants, on trouve également dans le bois une faible proportion d'extraits. Ces derniers sont des composés de faibles poids moléculaires comme les acides gras, les terpènes et les tanins... Ils peuvent avoir un rôle important sur les propriétés du bois, lui conférant par exemple sa couleur et son odeur. Ils peuvent également avoir un rôle protecteur contre les agressions extérieures (Dorado et al., 2001). Dans la littérature, la dégradation des extraits du bois par les champignons de pourriture blanche a été largement étudiée (Gutierrez et al., 2001**;** Teris et al., 2007), principalement dans le but de contrôler les résidus des industries papetières.

C'est pourquoi, nous nous sommes attachés à étudier les premiers jours de colonisation du bois de hêtre par *T. versicolor*, en focalisant notamment sur le rôle des laccases.

4.2.2. Résultats

Les résultats obtenus sont présentés dans la publication intitulée : « Initial stages of *Fagus sylvatica* wood colonization by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*: Enzymatic characterization » (International Biodeterioration and Biodegradation**,** *sous presse*.)

Initial stages of *Fagus sylvatica* wood colonization by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor:* Enzymatic characterization

By S. Lekounougou[a,b], S. Mounguengui[b] , S. Dumarçay[b], C. Rose[c], P. E. Courty [a], J. Garbaye [a], P. Gérardin[b] , J. P. Jacquot[a] and E. Gelhaye[a*]

[a]IFR 110, UMR INRA 1136, Interactions Arbres/Micro-organismes, Faculté des Sciences, BP 239, Nancy Université, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

[b]Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur le Matériau Bois, UMR INRA 1093, Faculté des Sciences, BP 239, Nancy Université, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.
[c] IFR 110, UMR INRA 1137, INRA Centre De Nancy , 54280 Champenoux

Corresponding author: gelhaye@lcb.uhp-nancy.fr

Running title: Wood colonization

Abstract

The initial stages of wood colonization and degradation by the white-rot *Trametes versicolor* have been investigated. *T. versicolor* was grown on *Fagus sylvatica* wood chips under solid state fermentation in presence of malt-agar. The beginning of the colonization process was not associated with peroxidases as well as hydrolytic activities production. In contrast, a sharp induction of laccase expression was observed during the first colonization days. This induction is not due solely to fungal growth on wood chips since similar data were obtained in presence of biocide (propiconazole) -treated wood, suggesting that enzyme production is due at least in part to the mycelium surrounding wood chips using nutrients from malt agar medium. Laccase production correlated with wood acetone extractives degradation, in particular with the oxidation of catechin, a major compound of beech extracts. In complementary experiments, wood-extracted laccases were shown to be active with wood acetone extracts and pure catechin. Furthermore, wood extractives induced laccase expression. Taken together, these data suggest that the initial stages of wood colonization on malt agar by *T. versicolor* correlate with wood extractives degradation requiring laccase activity, whereas the other wood degrading systems (peroxidases and polysaccharides hydrolases) are still repressed.

Keywords:

Trametes versicolor, wood decay, solid-state, laccase, colonization, wood extracts

1. Introduction

White-rot fungi are among the best degraders of lignocellulose and the only known microorganisms than can completely breakdown lignin to carbon dioxide and water (Ten Have and Teunissen, 2001). However, lignin degradation is not providing carbon and energy, since this process also enables fungi to gain access to cellulose and hemicellulose. The degradation of these polymers is mainly due to extracellular enzymes. Cellulases and hemicellulases are involved in polysaccharides degradation whereas peroxidases and laccases are mainly devoted to lignin breakdown, the production of these extracellular enzymes being regulated essentially at the transcriptional level. Numerous studies on enzyme production by wood-rot fungi have been conducted using chemically defined liquid media (Karahanian et al. 1998; Brown et al., 1991; Aro et al., 2005). However, in natural environments, these fungi grow on woody substrates under quite different conditions, and consequently the patterns of enzyme production are different (Datta et al., 1991; Dawson-Andoh and Morrel, 1992; Daniel et al., 1994; Zhao et al., 1996; Machuca and Ferraz, 2001). For instance, solid-state cultivation of *Ceriporiopsis subvermispora* and *Phanerochaete chrysosporium* on wood results in a peroxidase isoform pattern that differs from those described in liquid cultures (Lobos et al., 1994; Janse et al., 1998). Since some of the enzymes are clearly expressed only under solid-state conditions, it is important to study enzyme production on wood chips in order to elucidate the role of different enzymes during wood colonization and degradation. Furthermore, the decomposition of wood extractives by white-rot fungi has been largely studied (Gutierrez et al., 2001; Teris et al., 2007), mainly to control pitch in paper pulp manufacturing. Wood extractives have a major impact on wood properties, they are low molecular weight lipophilic and phenolic substances such as fatty acids, terpenes and phenolic compounds (tannins). Extractives give wood its color, odor and physical properties, and they play also a protective role (Dorado et al., 2001).

Among the enzymes involved in wood degradation, laccases catalyse the oxidation of a broad range of phenolic compounds reducing oxygen to water (Baldrian, 2006). Laccases belong to the group of blue multicopper oxidases and have been shown to be able to oxidize wood extractives as the polyphenolic catechin, one of a major compound of beech extracts (Tagger et al., 1998). Besides their role in lignin degradation, the fungal laccases participate in the synthesis of melanin and other pigments (Langfelder et al., 1998), formation of fruiting bodies (Kües and Liu, 2000), conidiation, sporulation, and plant pathogenesis (Thurston, 1994; Mayer and Staples, 2002).

The aim of this study was to investigate the initial stages of wood colonization *by Trametes versicolor*. Chemical analyses and microscopical findings have shown that *T. versicolor* is a non-selective or simultaneous type and that it degrades lignin, hemicellulose and cellulose (Faix et al, 1993; Mohebby, 2005). Nevertheless, for *T. versicolor* as for other wood decay fungi, data about the wood colonization process are scarce but they are nevertheless very important to understand the

key stages of the process. In the wood protection field, the main laboratory test is based on the EN 113 method using malt agar medium. Deriving from this one, we have developed a method using small wood chips in order to follow wood colonization, with emphasis on the initial stages of this process.

2. Materials and methods

2.1. Fungus

The white rot *Trametes versicolor* (L: Fr.) Pilat (CTB 863A) was used in this study. Cultures were grown on plates with malt-agar slants stored at 4°C.

2.2. Solid state cultures on wood

Beech wood (*Fagus sylvatica)* blocks (1, 5 cm x 0,5cm x 3,5cm) in radial, tangential and longitudinal directions, respectively, were dried at 80°C and weighed (m_o). Treatment of wood blocks with the biocide propiconazol has been performed as described previously (Mabicka et al., 2004). Sterile culture medium (20ml), containing 20 ml of culture medium prepared from malt extract (40 g) and agar (30 g) in distilled water (1 L), were placed on Petri dishes (diameter 9.0 cm), inoculated with the fungus and incubated for 2 weeks at 22°C and 70% RH to allow colonization of medium by the mycelium.

Five U.V. sterilized blocks (treated or untreated) were placed in each Petri dish under sterile conditions. Incubation was carried out at 22°C under controlled humidity conditions of 70% RH in a climatic chamber WTB BINDER TYP KBF 115**.**

2.3. Wood weight loss

Wood decay was measured as the percentage loss of wood weight after the fungal test. Measurements were done after drying of each sample. At different incubation times, colonized wood blocks were carefully removed, dried at 103°C and weighed. Mycelia were then removed and the blocks were dried at 103°C and weighed (m_1). Weight loss (WL) was expressed as a percentage of the initial oven dried weight of the sample (m_0) according to the formula: WL (%) = ((m_o – m_1) - m_o) x 100

2.4. Wood extractives

Wood chips were harvested at different incubation times, ground and dried. The sawdusts were then extracted with 200mL of acetone for 6 hours in a Soxhlet apparatus.

2.5. Pumice stones impregnation

Beech wood extractives (20 mg) were solubilized in 30 mL water by sonication (Decon ultrasonics FS 100). Pumice stones were impregnated with extractives for 2 hours. After drying, pumice stones were incubated in presence of *Trametes versicolor* (6 pumice stones by Petri dish).

2.6. HPLC analysis

High-performance liquid chromatography (HPLC) was performed on a Waters system equipped with a system controller 600E, a manual injector system and a Waters 2996 photo diode array (PDA) detector. All injections were 20µl in volume. The column used was a Supelco Discovery C18 column (250 x 4,6mm i.d) at 30°C. The separation was performed during 60 minutes using water containing 0.05% TFA (100 to 0%) and methanol containing 0.05% TFA (0 to 100%), the flow rate being 1ml/min.

2.7. Enzyme assays

2.7.1. Enzymatic activities using fluorogenic assays

Colonized wood blocks were removed carefully from agar plates, the mycelium surrounding wood chips being excised. The wood chips were then placed into a test tube containing 1 ml of 50 mM phosphate buffer pH 6. Then, mycelium was separated from the wood in order to facilitate enzyme extraction and the samples were incubated during 1 hour at room temperature. The samples were then centrifuged (10 000 g for 15 min) and the supernatant being collected and tested for different activities.

Six enzyme substrates based on 4-methylumbelliferone (MU) or 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) were studied: MU-phosphate (MU-P) for the detection of the acid phosphatase (EC 3.1.3.2), MU-β-D-glucopyranoside (MU-G) for β-glucosidase (EC 3.2.1.3), MU-*N*-acetyl-β-D-glucosaminide (MU-NAG) for chitinase (EC 3.2.1.14), MU-β-D-glucuronide hydrate (MU-GU) for glucuronidase (EC 3.2.1.31), MU-β-D-cellobioside (MU-C) for cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91), and L-leucine-AMC (Leu-AMC) for leucine aminopeptidase (EC 3.4.11.1) activities. All chemicals were purchased from Sigma Aldrich Chemicals (Lyon, France).

The experimental conditions for fluorescence assays, incubation buffers and substrates concentrations were as described previously (Courty et al, 2005). Briefly, 50 µl of samples were mixed with 50 µl substrate solution, and 50 µl incubation buffer according to Courty et al., 2005. Incubation lasted 1 hr in black 96-well microtitration plates, fluorescence emission being recorded every 5 min with a fluorescence Spectrophotometer (Wallac Perkin-Elmer life sciences, Villebon-

sur-Yvette, France) with an excitation wavelength of 360 nm and an emission wavelength of 450 nm.

2.7.2. Enzyme extraction

Nineteen wood chips were harvested after 4 incubation days and mixed during 2 hours with 200 mL of 50 mM acetate buffer (pH 5.0). Wood chips were removed and incubated again with 200 mL of 50 mM acetate buffer (pH 5.0). Extraction solutions were pooled, centrifuged and the resulting supernatant concentrated by ultrafiltration.

During experiments using pumice stones, surrounding colonized malt-agar (from 20 plates) were mixed twice during two hours with 500 mL of 50 mM acetate buffer (pH 5.0). Extraction solutions were pooled, centrifuged and the resulting supernatant concentrated by ultrafiltration.

2.7.3. Laccases and peroxidases assays on wood chips

Colonized wood blocks were carefully removed from agar plates and the mycelium surrounding wood chips excised. The wood chips were then placed into a test tube containing 900 µl of 50 mM phosphate buffer pH 6. The mycelium was separated from the wood in order to facilitate substrate diffusion and 50 µl of 100 mM 2, 2, - azinobis -3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate (ABTS) were added to detect laccase activity. In order to maintain substrate-saturation, incubation times were varied (typically from 5 min to 1 hour). The samples were then centrifuged (10 000g; 1 min) before measuring the 420 nm absorbance of the supernatant (ε_{420} = 36mM^{-1}.cm^{-1}) using a Varian Cary 50 spectrophotometer

To detect peroxidase activities, wood chips were placed into a test tube containing either 900 µl of 50 mM of selected buffer (either acetate buffer, pH 4.5, or phosphate buffer pH 7.0, or succinate buffer pH 3.0) and reactions were started by addition of hydrogen peroxide. LiP activity was measured according to the method of Tien and Kirk (1988) following the oxidation of veratryl alcohol to veratryl aldehyde. MnP activity was measured as described by Kuwahara et al. (1984) with phenol red as the substrate.

For induction experiments, a similar procedure was used. In this case, 0.5 cm^2 of malt-agar surrounding pumice stone were cut and incubated with 980 µL of 50 mM acetate buffer pH 5.0 and 20 µl of 100 mM 2, 2, - azinobis -3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate (ABTS).

The oxidation of catechin was performed as follows: 0.35 mM of catechin was added to enzymes extracted in 50 mM acetate buffer pH 5.0 (see section 2.7.3) and absorption spectra were recorded every 3 minutes.

2.7.4. Oxygen consumption

To test laccase activity, oxygen consumption was measured with a Clark-type O_2 electrode (Rank brothers, Cambridge, U.K.). 100 µL of wood extracted enzymes (see section 2.7.2) were incubated in 900 µL of acetate buffer 50 mM (pH 5) and various concentrations of beech wood extractives or ABTS were added.

2.8. Electronic microscopy

SEM observations were performed using a ZEISS (LEO) 1450VP scanning microscope equiped with ultracool Peltier stage system. Images of the wood and fungi were directly obtained with back-scattered secondary electron detector (QBSD) at 20KV of accelerating voltage, 600pA electron beam intensity in VP mode (30 pa of pressure in chamber) and sample temperature kept at -50°C.

3. Results

3.1. Wood colonization

To follow fungal development, scanning electronic microscopy observations have been performed during the initial stages of beech wood colonization by *T. versicolor*. After four days of incubation, the wood surface was slightly colonized (Fig. 1A) but not the wood structure (Fig. 1B), whereas wood chips were fully, deeply colonized after 20 days (Fig. 1C). The mycelium surrounding wood chips appeared to represent a large part of the whole fungal biomass found in wood chips.

Weight losses of samples exposed to *T. versicolor* for different exposure periods have been measured. After 10 days, no significant mass loss (below 5%) could be observed. After 90 days of incubation, around 45% of wood weight loss was measured confirming the efficiency of *T. versicolor* in the beech degradation in these laboratory conditions

Treatments of wood chips with propiconazole have been performed. The concentrations of biocide used (10^{-4} M and 5 10^{-4} M) have been chosen in order to limit but not abolish the decay process. In these conditions, the fungal growth on wood chips surfaces was altered. Fungal growth was detected on wood chips only after around 15 and 35 incubation days for 10^{-4} M and 5 10^{-4} M biocide treatments respectively (data not shown). Wood chips weight losses were significantly reduced in presence of biocide reaching around 30 and 35 % for 5 10^{-4} M and 10^{-4} M treatments respectively after 90 incubation days.

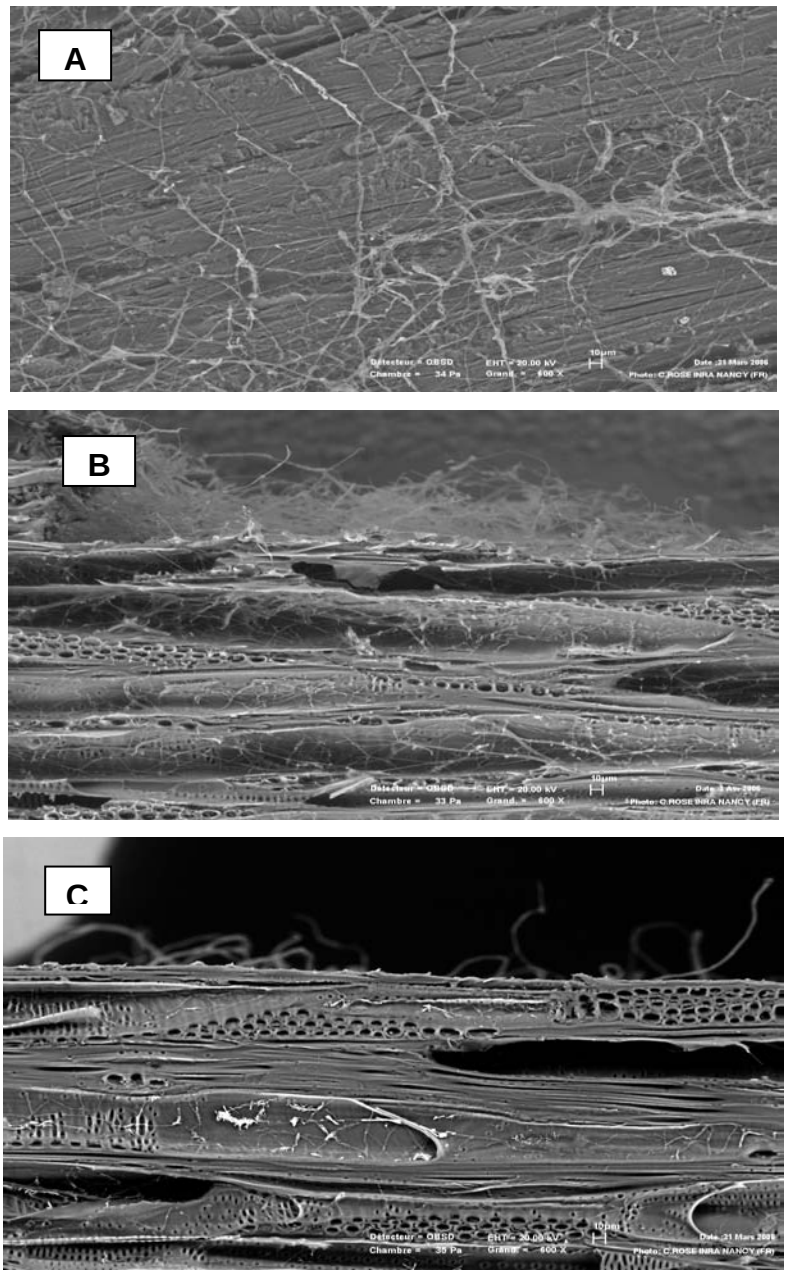


Fig. 1. Wood (*Fagus sylvatica*) colonization by *T. versicolor* after 4 (A, B) and 20 (C) incubation days.SEM observations (backscattered electron imaging in VP mode) at the surface of the wood (block of beech). Mycelium development at the beginning of colonization by fungi (A). SEM images (backscattered electron imaging in VP mode) of cross section of woodblocks at 4 (B) and 20 (C) days of incubation by fungi. Observations of mantle development and mycelium colonization in wood vessels.

3.2. Enzyme production

During the initial stage of wood colonization (0-10 days), hydrolytic, i.e. acid phosphatase, β-glucosidase, chitinase, glucuronidase, cellobiohydrolase and leucine aminopeptidase, activities were not detected on wood chips using fluorescent substrates. Nevertheless, a strong chitinase activity was detected during the initial stage of propiconazole-treated wood, showing the sensitivity of the method (Fig. 2).

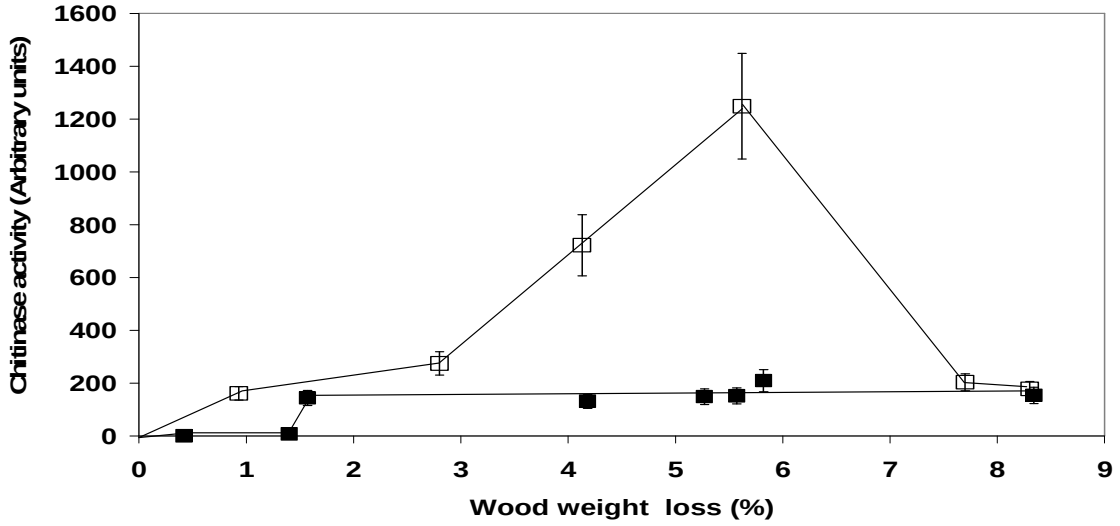


Fig. 2. Chitinase activity produced during propiconazole-treated (10^{-4} M, □) and untreated (■) wood chips degradation by *T. versicolor*.
Each point is the mean ± standard deviation of four different experiments

During this initial stage, lignin peroxidase activities were not detected whatever the pH used during the enzymatic test (pH 3.0, pH 5.0 and pH 7.0). Similar result were obtained when manganese peroxidase activity was tested, suggesting that at this colonization stage, peroxidases were not produced by the fungus.

In contrast, a strong laccase activity could be detected during the first 10 days of incubation. A sharp increase in activity was observed, reaching about 70 µUI/ mg of wood chips after 4 days. A similar pattern of activity was observed during the first incubation days using propiconazole-treated wood chips (Fig. 3).

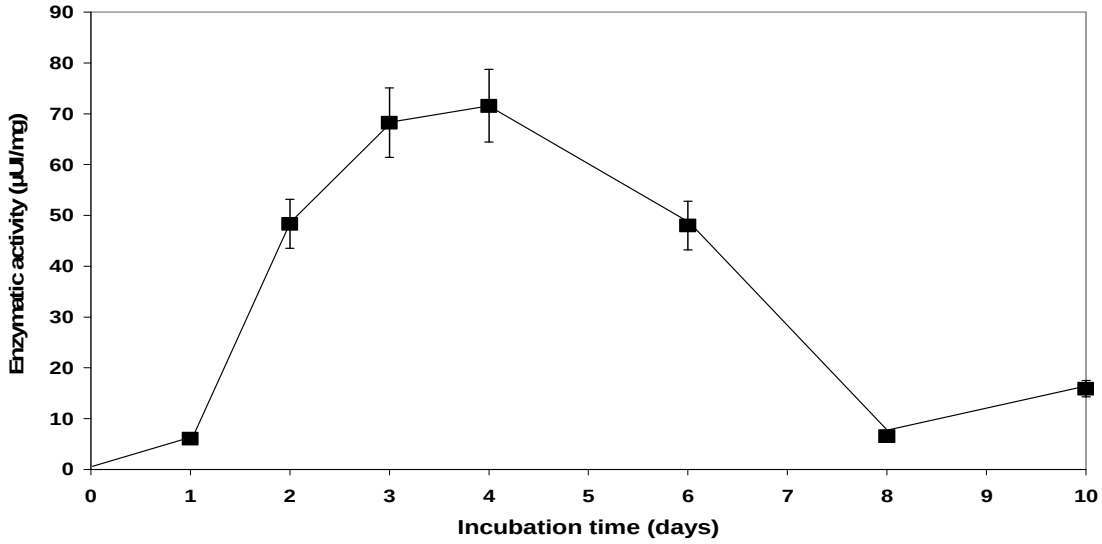


Fig. 3. ABTS oxidizing activity produced during wood chips colonization by *T. versicolor*. Each point is the mean ± standard deviation of nine different experiments

3.3. Wood extractives

Acetone extracts of wood have been analysed after 5 and 10 days of incubation in presence of *T. versicolor* (Fig. 4). The pattern of acetone wood extractives analysed by HPLC is dramatically altered in presence of *T. versicolor*. The amount of catechin, a major beech acetone wood extractive, decreased especially during the first days of incubation. Similar decreases have also been observed for other major components of beech wood extractives.

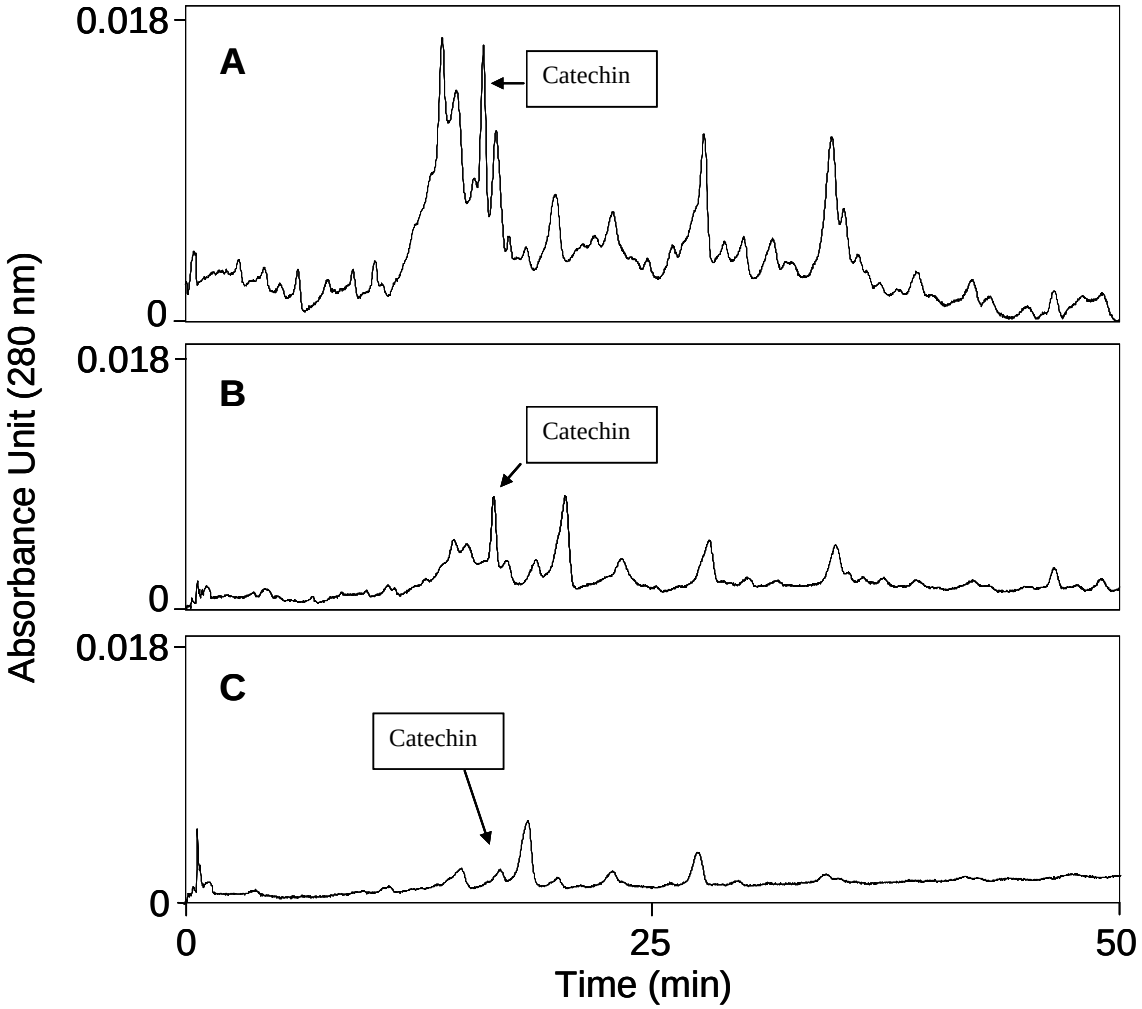


Fig. 4. Wood extractives (*Fagus sylvatica*) degradation by *T. versicolor*. Acetone extraction was performed on wood chips incubated 0 (A), 5 (B) and 10 (C) days in presence of *T. versicolor*

3.4. Wood extractives and laccases

Activities from 4 days colonized wood chips have been extracted as described in Materials and Methods. The presence of laccase activity has been confirmed measuring oxygen consumption both in presence of ABTS or beech extractives. Interestingly, oxygen consumption rates by laccases were shown to be related to beech extractives concentrations, reaching a value of 14.6 nmol. min^{-1} in the presence of 0.8 mg/ml of beech extracts. Beech extractives modification by laccases was also

confirmed by HPLC analysis, which showed a strong alteration of beech extractives after incubation in presence of extracted laccases (data not shown).

The direct oxidation of catechin by extracted enzymes has been also demonstrated. In presence of extracted enzymes, a strong modification of catechin absorption spectrum was observed. A large increase of the detected absorbance was measured in the 250-450 nm region (maximum at 400 nm and an absorbance shoulder peak at 450 nm) suggesting the oxidation of polyphenolic compounds to the corresponding quinones. When the incubation was performed in absence of either extracted enzymes or catechin, modifications of the absorption spectrum were not detected (data not shown).

3.5. Induction of laccases expression

To test laccase induction, pumice stones have been impregnated with beech-acetone extracts and ABTS oxidizing activities measured in solid medium surrounding stones. Control experiments were performed using pumice stones impregnated with buffer only (Fig. 5). Laccase activity was clearly induced by the presence of acetone-beech extractives (around 50 µUI/cm^2 after 75 incubation hours).

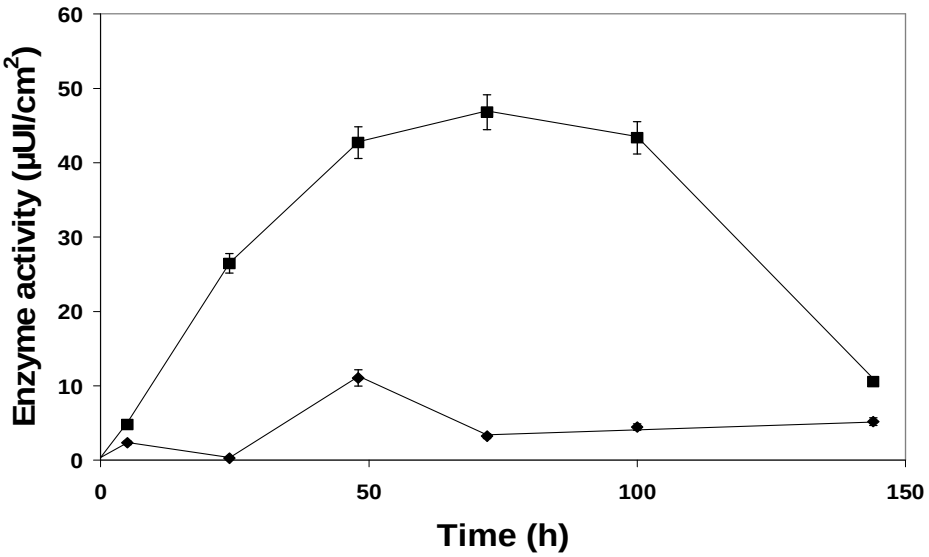


Fig. 5. Induction of laccases by *Fagus sylvatica* wood extractives
Pumices stones were used as inert support and were impregnated with ◆ 50 mM acetate buffer (pH 5.0) or ■ : 0.6 mg/ml of beech extractives solubilized in 50 mM acetate buffer (pH 5.0). Each point is the mean ± standard deviation of three different experiments

4. Discussion

Understanding the mechanisms used by white-rot fungi for wood decay could be useful for designing new wood preservative targets. We report in this paper that in solid state conditions, the initial stages of wood colonization by *T. versicolor*, namely the first ten days of incubation, are associated with considerable laccase production and wood extractives degradation. Analysis of enzyme production revealed that in these conditions, peroxidases are not involved in this first colonization stage. Peroxidase gene expression in white-rot fungi is usually triggered by the depletion of nutrient nitrogen, carbon or sulphur and the expression of most of the ligninolytic genes is regarded as a stress response to nutrient depletion (Keyser et al., 1978; Tien and Kirk, 1988). At the beginning of the colonization process, fungal growth occurs probably using nutrients providing from surrounding malt agar preventing nutrient depletion, explaining the absence of peroxidase activities.

In a similar way, hydrolytic activities have not been detected during this initial stage. In filamentous fungi, a majority of the genes involved in polymer breakdown are repressed by the presence of easily available carbon sources, such as glucose, and induced in the presence of the substrate polymers (Aro et al., 2005). Glucose repression takes also place very efficiently and typically overrides the induction of the genes. Again, the fungal development from surrounding malt-agar could explain these low hydrolytic activities

Interestingly, a strong chitinase activity has been observed in presence of propiconazole-treated wood. As other triazoles, propiconazole is known to alter fungal sterol synthesis, these sterols maintaining optimal fluidity and structural integrity of membranes (Joseph-Horne and Hollomon, 1997). The detected chitinase activity is linked to enzymes involved in fungal cell wall synthesis (Rast et al., 2003), which are probably over-expressed by the fungus in order to limit the propiconazole effects. The obtained data revealed the expected sensitivity of fluorescent substrates used to detect hydrolytic activities (Courty et al., 2005).

The initial stage of wood colonization by *T. versicolor* is associated with a sharp induction of laccase production, this induction being not correlated with the colonization process, since the same phenomenon was observed in propiconazole-treated wood. These data suggest that enzyme production is due at least in part to the mycelium surrounding wood chips in malt agar. In *T. versicolor*, laccases are encoded by at least four genes (Necochea et al., 2005). Pumice stones have been used to test the effects of wood extractives on laccase gene expression. Clearly, wood extractives are able to induce the expression of laccase activities in *T. versicolor* and laccases are able to degrade beech wood extractives. It has been previously shown that transcription of laccase genes in *T. versicolor* is enhanced in response to aromatic compounds such as xylidine (Bollag and

Leonowicz, 1984; Couto et al., 2002), veratryl alcohol (Mansur et al., 1998) and pyrogallol (Osiadacz et al., 1999). The decay resistance of heartwood of naturally durable wood species is expected to be mainly due to the amount and type of extractives, especially of polyphenols, terpenoids, tropolones and tannins (Dorado et al., 2001). Tannins have antimicrobial properties and have been shown to inhibit the growth of decay fungi and several monomeric aromatic compounds have also been shown to inhibit growth of white-rot and brown-rot fungi (Highley and Micales, 1990; Buswell and Eriksson, 1994). The induction of laccases observed during the initial stage of wood colonization by *T. versicolor* could also be explained by the presence of aromatic compounds in beech wood extractives, suggesting a detoxification function for laccases.

Wood degradation by white-rot fungi is a complex phenomenon involving a complex set of extracellular enzymes (Martinez, 2002; Rabinovich et al., 2004). The role of different enzymes in this process is only partially understood. In this study, we have shown that the initial stage of wood colonization on malt agar starts with wood extractives degradation. This degradation is mediated at least partially by laccases and not by peroxidases. In particular, we demonstrate that the polyphenolic catechin, one of a major compound of beech extracts, is a substrate of laccases. Further experiments are required to investigate the role of various laccase isoenzymes in wood-extractives degradation and to understand the complex regulation of these extracellular enzymes involved in wood degradation.

Acknowledgments

The authors thanks J. Gérard for her technical assistance. S. M. was supported by a grant from the Ministère de la Recherche et de la Technologie. This research was supported by a grant of Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (N°0201035).

References

Aro, N., Pakula, T., Penttilä, M., 2005. Transcriptional regulation of plant cell degradation by filamentous fungi. FEMS Microbiology Reviews 32, 59-65.

Baldrian, P., 2006. Fungal laccases-occurrence and properties. FEMS Microbiology Reviews 30, 215-242.

Bollag, J.-M., Leonowicz, A., 1984. Comparative studies of extracellular fungal laccases. Applied and Environmental Microbiology. 48, 849-854

Brown, J.A., Alic, M., Gold, M.H., 1991. Manganese regulates expression of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. Journal of Bacteriology 172, 3125-3130.

Buswell, J.A., Eriksson, K.E.L., 1994. Effect of lignin-related phenols and their methylated derivatives on the growth of eight white-rot fungi. World Journal of Microbiology and Biotechnology 10, 169-174.

Courty, P.E., Pritsch, K., Schloter, M., Hartmann, A., Garbaye, J., 2005. Activity profiling of ectomycorrhiza communities in two forest soils using multiple enzymatic tests. New Phytologist 167, 309-319.

Couto, S.R., Gundín, M., Lorenzo, M., Sanromán, M.Á., 2002. Screening of supports and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions. Process Biochemistry 38, 249-255.

Daniel, G., Volc, J., Kubatova, E., 1994. Pyranose oxidase, a major source of H_2O_2 during wood degradation by *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, and *Oudemansiella mucida*. Applied and Environmental Microbiology 60, 2524-2532.

Datta, A., Bettermann, A., Kirk, T.K. 1991. Identification of a specific manganese peroxidase among ligninolytic enzymes secreted by *Phanerochaete chrysosporium* during wood decay. Applied and Environmental Microbiology 57, 1453-1460.

Dawson-Andoh, B.E., Morrel, J.J., 1992. Extraction of proteins from wood colonized by decay fungi. Holzforshung 46,117-120.

Dorado, J., Van Beek, T.A., Classen, F.W., Sierra-Alvarez, R. 2001. Degradation of lipophilic wood extractive constituents in *Pinus sylvestris* by the white-rot fungi *Bjerkandera sp*. and *Trametes versicolor*. Wood Sciences and Technology 35, 117-125.

Faix, O., Bremer, J., Schmidtt, O., Stevanovic, T., 1993. Monitoring of chemical changes in white-rot degraded beech wood by pyrolisis-gas chromatography and Fourrier transform infrared spectroscopy. Journal of Analytical and Applied Pyrolyse 2,147-162.

Gutierrez, A., del Rio, J.C., Martinez, M.J., Martinez, A.T., 2001. The biotechnological control of pitch in paper pulp manufacturing. Trends in Biotechnology 19, 340–348.

Highley, T.L., Micales, J.A., 1990. Effect of aromatic monomers on production of carbohydrate-degrading enzymes by white-rot and brown-rot fungi. FEMS Microbiology Letters 66, 15-22.

Janse, B.J.H, Gaskell, J., Akhtar, M., Cullen, D., 1998. Expression of *Phanerochaete chrysosporium* genes encoding lignin peroxidases, manganese peroxidases and glyoxal oxidases in wood. Applied and Environmental Microbiology 64, 3536-3548.

Joseph-Horne, T., Hollomon, D.W., 1997. Molecular mechanisms of azole resistance in fungi. FEMS Microbiology Letters 149, 141-149.

Karahanian, E., Corsini, G., Lobos, S., Vicuna, R., 1998. Structure and expression of a laccase gene from the ligninolytic basidiomycete C*eriporiopsis subvermispora*. Biochemica Biophysica Acta 1443, 65-74.

Keyser, P., Kirk, T.K., Zeikus, J.G., 1978. Ligninolytic enzyme system of *Phanerochaete chrysosporium*: Synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation. Journal of Bacteriology 135, 790-797.

Kües, U., Liu, Y., 2000. Fruiting body production in basidiomycetes. Applied Microbiology and Biotechnology 54, 141-152.

Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A., Gold, M.H., 1984. Separation and characterization of two extracellular H_2O_2-dependant oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Letters 169, 247-250.

Langfelder, K., Jahn, B., Gehringer, H., Schmidt, A., Wanner, G., Brakhage, A.A., 1998. Identification of a polyketide synthase gene (pksP) of *Aspergillus fumigatus* involved in conidial pigment biosynthesis and virulence. Medical Microbiology and Immunology 187, 79-89.

Lobos, S., Larra, J., Cullen, D., Vicuna, R., 1994. Isoenzymes of manganese-dependant peroxidase and laccase produced by the lignin degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. Microbiology 140, 2691-2708.

Mabicka, A., Dumarçay, S., Gelhaye, E., Gérardin, P., 2004. Inhibition of fungal degradation of wood by 2-hydroxypyridine-N-oxide. Holzforshung 58, 566-568.

Machuca, A., Ferraz, A., 2001. Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium. Enzyme and Microbial Technology 29, 386-391.

Mansur, M., Suárez, T., González, A.E., 1998. Differential gene expression in the laccase gene family from basidiomycete I-62 (CECT 20197). Applied and Environmental Microbiology 64, 771-774.

Martinez, A.T., 2002. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. Enzyme and Microbial Technology 30, 425-444.

Mayer, A.M., Staples, R.C., 2002. Laccase: New functions for an old enzyme. Phytochemistry 60, 551-565.

Mohebby, B., 2005. Attenuated total reflection infrared spectroscopy of white-rot decayed beech. International Biodeterioration and Biodegradation 55, 247-251.

Necochea, R., Valderrama, B., Díaz-Sandoval, S., Folch-Mallol, J.L., Vázquez-Duhalt, R., Iturriaga, G., 2005. Phylogenetic and biochemical characterisation of a recombinant laccase from *Trametes versicolor*. FEMS Microbiology Letters 2, 235-241.

Osiadacz, J., Al-Adhami, A.J.H., Bajraszewska, D., Fischer, P., Peczyñska-Czoch, W., 1999. On the use of Trametes versicolor laccase for the conversion of 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid to actinocin chromophore. Journal of Biotechnology 72, 141-149.

Rabinovich, M.L., Bolobova, A.V., Vasil'chenko, L.G., 2004. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: a review. Applied and Biochemical Microbiology 40, 1-17.

Rast, D.M., Baumgartner, D., Mayer, C., Hollenstein, G.O., 2003. Cell wall-associated enzymes in fungi. Phytochemistry 64, 339-366.

Tagger, S., Périssol, C., Gil, G., Vogt, G., Le Petit, J., 1998. Phenoloxidases of the white-rot fungus *Marasmius quercophilus* isolated from an evergreen oak litter (Quercus ilex L.). Enzyme and Microbial Technology 23, 372-379.

Ten Have, R., Teunissen, J.M., 2001. Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi. Chemical Review, 10, 3397-3413.

Teris, A., van Beeka, B., Kustera, F., Claassena, W., Tienvierib, T., Bertaud, F., Lenon, G., Petit-Conil, M., Sierra-Alvarez, R., 2007. Fungal bio-treatment of spruce wood with *Trametes versicolor* for pitch control: Influence on extractive contents, pulping process parameters, paper quality and effluent toxicity. Bioresource Technology 98, 302-311.

Thurston, C.F., 1994. The structure and function of fungal laccases. Microbiology 140, 19-26.

Tien, M, Kirk, K.T., 1988. Lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. Methods in Enzymology 161, 238-249.

Zhao, J., De Kober, T.H., Janse, B.J.H., 1996. Comparative studies of lignin peroxidases and manganese-dependant peroxidases produced by selected white-rot fungi in solid media. FEMS Microbiology Letters 145, 393-399.

4.2.3. Conclusion

Trametes versicolor produit une grande quantité d'enzymes extracellulaires telles que les laccases, lignine peroxydases et manganèse peroxydases pour dégrader la lignine. De nombreuses études indiquent également que les champignons de pourriture blanche sont capables de dégrader les extraits du bois (Dorado et al., 1998 ; Gutiérrez et al., 1998).

Dans cette étude, nous avons montré que le stade initial de colonisation et de dégradation du bois de hêtre *Fagus sylvatica* par *T. versicolor* n'est pas corrélé à la production de peroxydases et d'activités hydrolytiques. Par contre, ce stade est caractérisé par une production massive de laccases responsables de la dégradation des extraits, en particulier de l'oxydation de la catéchine qui est un composé majeur des extraits du bois de hêtre. De plus, ces extraits induisent l'expression des laccases. Une régulation au niveau transcriptionnel de l'expression de ces gènes par la présence de molécules aromatiques comme la xylidine ou le pyrogallol (Bollag and Leonowicz, 1984 ; Couto et al., 2002 ; Osiadacz et al., 1999) a déjà été mise en évidence chez *T. versicolor*. Les molécules aromatiques présentes dans les extraits étant toxiques pour de nombreux organismes, on peut penser que l'induction des laccases durant la phase initiale de colonisation est liée à un rôle de détoxication.

EFFET DU PROPICONAZOLE SUR LA PRODUCTION D'ENZYMES

4.3. Effet du propiconazole sur la production d'enzymes extracellulaires

4.3.1. Introduction

Le bois est largement utilisé dans de nombreux domaines dont celui de la construction qui constitue une part importante des marchés liés à l'utilisation du bois. Cependant, en tant que matériau biodégradable, il est facilement altéré par l'action des champignons et des insectes. Afin d'améliorer sa durabilité, différents produits ont été utilisés. Pendant longtemps ces produits ont été regroupés en trois grandes familles:

- les huiles et les goudrons dont est issu la créosote
- les produits organiques comme le pentachlorophénol (PCP)
- les formulations multisels constituées de cuivre, de chrome et d'arsenic (CCA).

Toutefois, la toxicité de certains de ces composés a conduit à l'interdiction partielle, voire totale de leur utilisation dans la plupart des pays industrialisés. Depuis, de nouvelles générations de produits de préservations se sont développées dans le but de trouver des alternatives aux méthodes traditionnelles. Une des alternatives envisagées consiste à utiliser des additifs non biocides capables d'interagir avec les mécanismes enzymatiques impliqués dans la dégradation du bois permettant de limiter les quantités de biocides nécessaires à la protection du bois (Schultz and Nicholas, 2002). Ces formulations sont basées sur l'association de différentes molécules agissant par effets additifs ou de synergie sur les champignons dégradant le bois. Le but de cette approche est d'augmenter l'efficacité des biocides organiques conventionnels en ajoutant des composés moins toxiques et donc de diminuer la quantité de biocides utilisée. Ainsi, Schultz et al. ont mis en évidence une synergie entre l'hydroxytoluène butylé (BHT), choisi pour ses propriétés antioxydantes et des biocides organiques (Schultz et al., 2005). Dernièrement, Mabicka et al. (2005) ont également montré une synergie entre l'antioxydant Irganox 1076 et la 2-hydroxypyridine-N-oxyde.

La famille des triazoles dont l'effet majeur est d'inhiber la lanostérol-14α-diméthylase, représente une catégorie importante de produits de préservation actuellement utilisés (Kauffman, 2006). Cette enzyme est impliquée dans la synthèse de l'ergostérol, un lipide essentiel des membranes cellulaires fongiques. En se liant à l'enzyme, les triazoles inhibent la dernière étape de la biosynthèse de ce stérol (déméthylation oxydative du lanestérol) et altèrent ainsi la stabilité de la membrane, le transport des nutriments ainsi que la synthèse de la chitine (Kang et al., 2001).

La paroi cellulaire fongique est une structure dynamique qui assure l'élasticité et le déplacement du champignon et permet la croissance et la division cellulaire. De plus, elle maintient

la forme et l'intégrité de la cellule face au stress environnementaux. La paroi cellulaire du champignon lui permet donc d'interagir avec le milieu environnant, notamment lors d'apports nutritionnels (azote, carbone, phosphore...) et pour son déplacement (Bowman and Free, 2006). La modification de la structure de la paroi cellulaire a donc un effet primordial sur la croissance et la morphologie du champignon, ce qui pourrait conduire à la mort cellulaire. Les parois cellulaires fongiques sont structuralement uniques. Elles sont principalement constituées de glycoprotéines et de polysaccharides notamment de glucanes et de chitine. La chitine est un résidu N-acétylglucosamine lié par des liaisons β-1,4, moins abondant que les glycoprotéines ou que les glucanes dans la paroi (10 – 20 %). Lorsque la synthèse de chitine est interrompue, la paroi est désorganisée et les cellules fongiques subissent des modifications qui entraînent des malformations et une instabilité au stress osmotique.

La paroi est donc une structure dynamique qui est soumise à des changements constants, par exemple au cours du développement et de la division cellulaire chez les levures (Bowman and Free, 2006), et pendant la germination et la formation des hyphes chez les champignons filamenteux (Kuranda et al., 2006). La maintenance de la plasticité de la paroi dépend en partie de la présence d'activités hydrolytiques associées à la paroi cellulaire, notamment de chitinases et de glucanases qui peuvent couper et reformer les liaisons à l'intérieur et entre les polymères, conduisant à un remodelage de la paroi pendant la croissance et la morphogenèse (Adams, 2004).

L'objectif de ce travail était d'étudier l'effet du propiconazole sur la production d'enzymes extracellulaires impliquées dans la mobilisation des nutriments (azote, phosphore et les polysaccharides) par le champignon *T. versicolor*. En effet, les triazoles pourraient altérer le métabolisme du champignon et induire des changements majeurs dans la production de ces enzymes. La connaissance de ces mécanismes pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles afin de développer de nouvelles stratégies pour augmenter l'efficacité des triazoles.

4.3.2. Résultats

Les résultats obtenus sont présentés dans la publication intitulée : « Effects of propiconazole on extra-cellular enzymes involved in nutrient mobilization during *Trametes versicolor* wood colonization » (Wood Science and Technology, sous presse.)

Effects of propiconazole on extra-cellular enzymes involved in nutrient mobilization during *Trametes versicolor* wood colonization

By Serge Lekounougou[1,2], Jean-Pierre Jacquot[1], Philippe Gérardin[2], Eric Gelhaye[1*]

[1] UMR INRA/UHP1136, Interactions Arbres/Micro-organismes, IFR 110, Nancy Université, Faculté des Sciences et Techniques, BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France

[2]Laboratoire d'Etudes et de Recherche sur le Matériau Bois, UMR INRA 1093 Equipe de Chimie Organique et Microbiologie, Nancy Université, BP 239, 54506 Vandoeuvre les Nancy Cedex, France

Corresponding author : Eric Gelhaye : UMR INRA/UHP1136, Interactions Arbres/Micro-organismes, IFR 110 GEEF, Nancy Université, Faculté des Sciences et Techniques, BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France.

Email: gelhaye@lcb.uhp-nancy.fr

Abstract

The effects of propiconazole on extra-cellular enzyme levels in T*rametes versicolor* have been investigated during wood colonization and degradation. The working hypothesis was that the biocide could alter metabolic pathways, which could lead to an alteration of extra-cellular enzyme production. In presence of a propiconazole sub-lethal concentration, the wood degradation rate decreased in accordance with the lag phase of fungal development observed during wood colonisation. The pattern of production of enzymes involved in polysaccharide degradation (β-glucosidases, glucuronidases, cellobiohydrolases), nitrogen (leucine aminopeptidase) and phosphorus (acid phosphatase) mobilization was only slightly altered in presence of the biocide. In the experiments performed in presence of propiconazole, there was a strong induction of chitinases at the beginning of the colonization process. Addition of caffeine, a pleitropic drug, which is also a chitinase inhibitor, together with propiconazole resulted in synergistic inhibition of the fungal growth. The implication of these results in the development of a new wood preservation strategy is discussed.

Keywords: *Trametes versicolor,* propiconazole, fluorogenic substrates, chitinases, caffeine, wood degradation

Introduction

Wood is susceptible to degradation caused by many biological organisms especially fungi, resulting in tremendous economic and resource losses. For many years, pentachlorophenol or metallic salts (chromate, copper and arsenate salts) have been used to prevent fungal development. Nevertheless, the toxicity of these compounds leads many countries to partially or totally prohibit their use. A new generation of totally organic preservatives has been developed, targeting specifically fungi. One important category of such preservatives is the triazole family. The primary target of azole antifungals is the lanosterol-14α-demethylase (Kauffman 2006). This enzyme, which belongs to the group of cytochrome P450 enzymes, is involved in the synthesis of ergosterol, a major and essential lipid constituent of the cell membrane of fungi. After binding of triazole to the enzyme, the oxidative demethylation of lanosterol to ergosterol, which is one of the last steps in the biosynthesis pathway, is inhibited. Exposure of fungi to azoles thus leads to a depletion of ergosterol. The lack of or the shortage of ergosterol alters the stability of the fungal cell membrane, the transport of nutrients and the chitin synthesis (Kang et al. 2001).

In recent years attempts have been made to develop more environmentally acceptable wood preservation formulations. These strategies are based on the use of different molecules acting together on the wood-rotting fungi. In wood decay studies, Schultz et al showed that combinations of butylated hydroxytoluene (BHT) chosen for its antioxidant properties and various organic biocides were synergistic (Schultz and Nicholas 2002; Schultz et al. 2005). Mabicka et al. (2005) recently reported also that the mixture of antioxidant Irganox 1076 and 2-hydroxypryidine-N-oxide was synergistic.

The aim of this study was to investigate the effects of propiconazole on the production of extra-cellular enzymes involved in nutrient mobilization in *T. versicolor*. The working hypothesis was that triazoles could alter the fungal metabolism and also induce major changes in the pattern of extra-cellular enzyme production. The identification of such changes could lead to propose new strategies in order to enhance the efficiency of triazoles, the ultimate goal being to identify new potential wood preservative additives. To test this hypothesis, we have investigated the production of several enzymes involved in nitrogen, phosphorus and polysaccharide mobilization during wood colonization by *T. versicolor*.

Materials and Methods

Fungal strain

The fungal strain used was the white-rot fungus *Trametes versicolor* (strain CTB 863), which was maintained on malt-agar. Stock cultures were maintained on malt-agar slants, which were kept at 4°C before use.

Product impregnation and wood block test

Weighed (m_0) oven-dried beech blocks (*Fagus sylvatica*), 4mm x 15mm x 30mm (in radial, tangential and longitudinal directions, respectively), were placed in a beaker inside a vacuum dryer equipped with a two-way tap and subjected to a 5 mbar vacuum for 20 min. Blocks were then impregnated by suction with a solution of propiconazole. After soaking for 2 h, the blocks were removed and dried at 103°C for two days. Treated or untreated blocks (3 replicates) were placed on a 2-week culture of *T. versicolor* malt agar [malt, 40 g; agar, 30 g; distilled water (1 L)] in Petri dishes, and incubated for 12 or 16 weeks at 22°C under controlled humidity (70% RH).

Wood weight loss and fungal biomass

Decay was measured as the percentage weight loss after the fungus test. Measurements were done after drying each sample. At different incubation times, colonized wood blocks were carefully removed, dried at 103°C and weighed (m_1). Mycelia were then removed and the blocks were dried at 103°C and weighed (m_2). Weight loss (WL) was expressed as a percentage of the initial oven dried weight of the sample according to the formula:

$$WL\ (\%) = ((m_o - m_2) - m_o) \times 100$$

Fungal biomass (m) was calculated from the following formula: $m = m_1 - m_2$

Enzymatic activities using fluorogenic assays

Colonized wood blocks were removed carefully from agar plates, the mycelium surrounding wood chips being excised. The wood chips were then placed into a test tube containing 1 ml of 50 mM phosphate buffer pH 6. The mycelium was then separated from the wood in order to facilitate enzyme extraction and the samples were incubated during 1 hour at room temperature. The samples were then centrifuged (10 000 g for 15 min) and the supernatant was collected and tested for activity.

Six enzyme substrates based on 4-methylumbelliferone (MU) or 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) were studied: MU-phosphate (MU-P) for the detection of the acid phosphatase, MU-β-D-glucopyranoside (MU-G) for β-glucosidase, MU-*N*-acetyl-β-D-glucosaminide (MU-NAG) for chitinase, MU-β-D-glucuronide hydrate (MU-GU) for glucuronidase, MU-β-D-cellobioside (MU-

C) for cellobiohydrolase, and L-leucine-AMC (Leu-AMC) for leucine aminopeptidase activities. All chemicals were purchased from Sigma Aldrich Chemicals (St Quentin Fallavier, France).

The experimental conditions for fluorescence assays, incubation buffers and substrate concentrations were as described previously (Courty et al. 2005). Briefly, 50 µl of samples were mixed with 50 µl substrate solution and 50 µl incubation buffer. Incubations lasted for 1 hr in black 96-well microtitration plates, fluorescence emission being recorded every 5 min with a fluorescence spectrophotometer (Wallac Perkin-Elmer life sciences, Villebon-sur-Yvette, France) with an excitation wavelength of 360 nm and an emission wavelength of 450 nm.

Antifungal assays

Antifungal assays were performed based on the procedure of Chang et al. (1999) with slight modifications. Propiconazole was dissolved in ethanol, whereas caffeine was dissolved in distilled water. Solutions with different chemical concentrations (from 0 to 10 mM) were added into sterilized malt agar prepared as described above in 9 cm Petri dishes. Petri dishes were inoculated with the mycelia of the different fungal strains and incubated in the dark at 22 °C and 70% RH. When the mycelium reached the edge of the control dishes, the antifungal indices were calculated. Antifungal index (AI) was calculated according to the following formula and averaged: AI = [(1-(Da/Db)]

where Da is the diameter of growth zone (cm) in the dish containing chemicals and Db is the diameter of growth zone in the control dish. Each test was repeated three times. A total inhibition corresponds to AI = 1 and no effect to AI = 0.

The estimated response in case of additive effects of compounds X and Y can be calculated according the following formula (Colby, 1967): $AI = AI_X + AI_Y – AI_XAI_Y$

where AI_X and AI_Y are the responses for products X and Y. Thus, an experimental response AI superior to the estimated response indicates a synergistic effect.

Results and Discussion

Wood colonization and degradation

Wood chips have been treated using 5 10^{-4}M solution of propiconazole and then exposed to *T. versicolor*. At this concentration, wood weight losses were found to decrease from 45% to nearly 30% in presence of the biocide after 10 incubation weeks.

In the control experiments, wood degradation could be divided into two stages. In the first stage, the degradation rate remained weak (around 0.35% per day, this value corresponding to the slope of the decay curve showed Figure 1). After ca 40 incubation days, the degradation rate increased to reach about 0.8% per day (Figure 1).

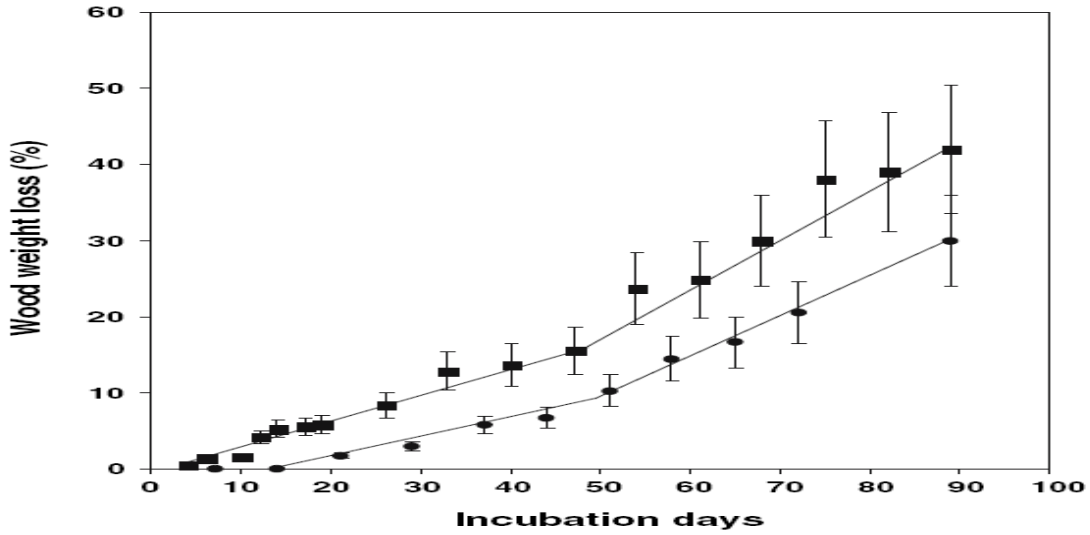


Figure 1. Weight loss of *Fagus sylvatica* wood chips decayed by *Trametes versicolor* under solid state fermentation in absence (■) and in presence (●) of propiconazole

This two-step phenomenon was not correlated with the colonization process. Estimation of the fungal biomass on the wood chips surfaces showed indeed that wood colonization started without lag phase in these conditions (Figure 2).

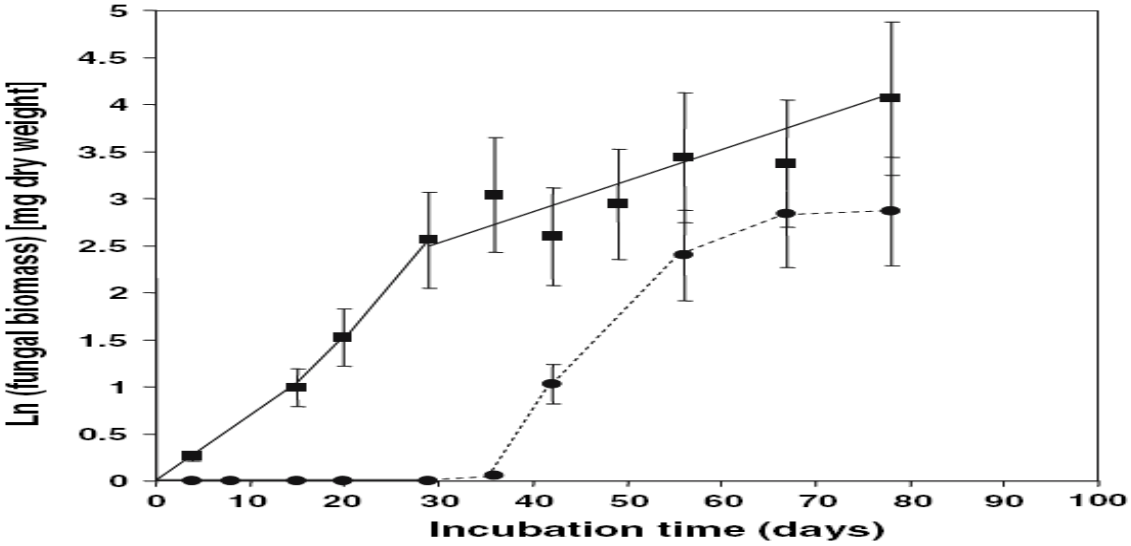


Figure 2. Fungal biomass detected on the surface of *Fagus sylvatica* wood chips colonized by *Trametes versicolor* in absence (■) and in presence (●) of propiconazole

Propiconazole treatment induced major changes during the first incubation days leading to the presence of a lag phase observed both in the wood colonization and degradation (Figure 1 and Figure 2). The length of the lag phase was dependent on the biocide concentration (data not shown). These data suggested that the fungus needs to adapt before starting its growth in the presence of this biocide concentration. After this adaptation time, the pattern of weight loss was similar to the one detected in control experiments, the degradation rates remaining however smaller. The presence of this adaptation phase suggests that the fungus adapts its metabolism to the presence of the biocide,

changing for instance the composition of the cell wall as previously reported in *S. cerevisiae* (Kauffman 2006). These data suggested that the presence of propiconazole induced a lag phase in the process of wood colonization and degradation. However, the wood degradation pattern was not strongly altered by the biocide presence.

Detected activities

The effects of propiconazole were also investigated on the production of several enzyme activities involved mainly in organic matter mobilization: β-glucosidases, glucuronidases, phosphatases, alanine aminopeptidases, and chitinases. Except for chitinases, a similar pattern of hydrolytic enzyme productions was observed in presence or in absence of propiconazole. As an example, the pattern of β-glucosidase production is shown Figure 3 in presence and in absence of propiconazole.

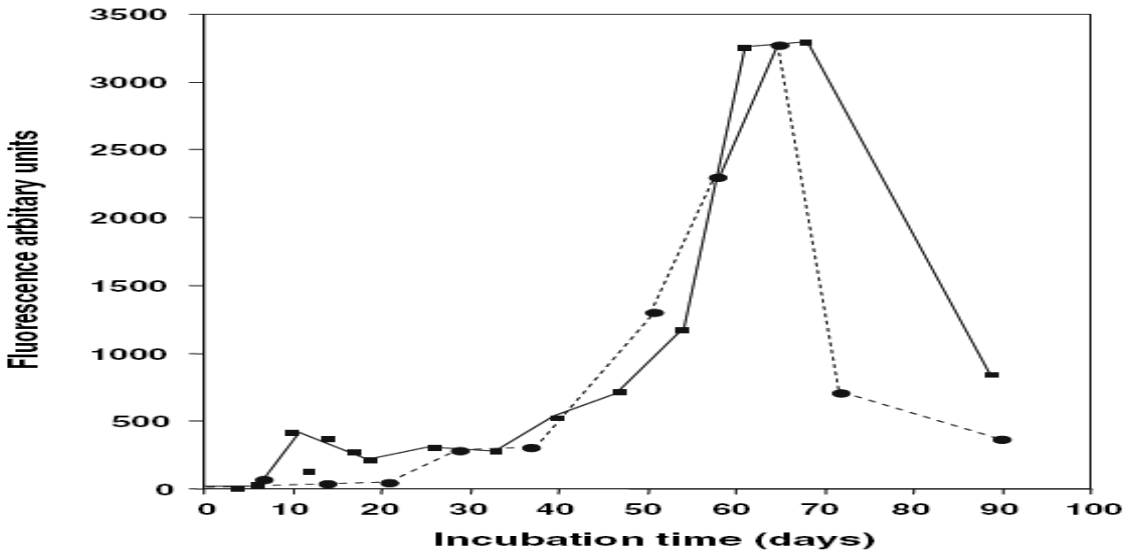


Figure 3. β-glucosidases activity detected during *Fagus sylvatica* wood degradation by *Trametes versicolor* in absence (■) and in presence (●) of propiconazole

Apart from chitinases, hydrolytic activities have been detected mostly after 40 days of incubation (i.e. in the second stage of wood degradation) with a sharp induction corresponding to the second phase of wood weight loss.

In these experimental conditions, wood degradation was not directly related to wood colonization by *T. versicolor*. Wood chips were indeed deeply colonized after three weeks whereas the level of degradation remained low at this stage. The fungal growth occurring during this time period is probably dependent on the presence of malt-agar nutriments. The increase of wood decay rate observed after 40 incubation days is probably due to a depletion of malt-agar nutriments. This hypothesis is sustained by data obtained with propiconazole-treated wood chips, where the same two-step phenomenon was observed. In these conditions, the shift in wood decay rate was

independent of the wood degradation process (15% without biocide, around 7% for propiconazole treated wood). The fungal production of cellulases and hemicellulases has been shown to be tightly regulated depending both on the presence of inducers and on the absence of easily available carbon sources (Aro et al. 2005). In *T. versicolor* for instance, cellobiose dehydrogenase transcription has been shown to be repressed by carbon catabolites (Stapleton et al. 2003). Furthermore, induction of enzymes such as phosphatases or leucine peptidases during this stage correlates nutriment depletion, since these enzymes are involved in phosphorus and nitrogen mobilization (Courty et al. 2005). The reported data point out to the importance of nutriment translocation during fungal wood colonization and degradation.

Taken together, all these data show that propiconazole at this concentration only slightly altered wood colonization and the pattern of enzyme production was slightly modified

Chitinases

One remarkable result concerning the experiments performed in presence of propiconazole was a strong induction of chitinases at the beginning of the colonization process (Figure 4). In control experiments, chitinase production occurred when the second degradation phase started and it correlated with the induction of other hydrolytic activities.

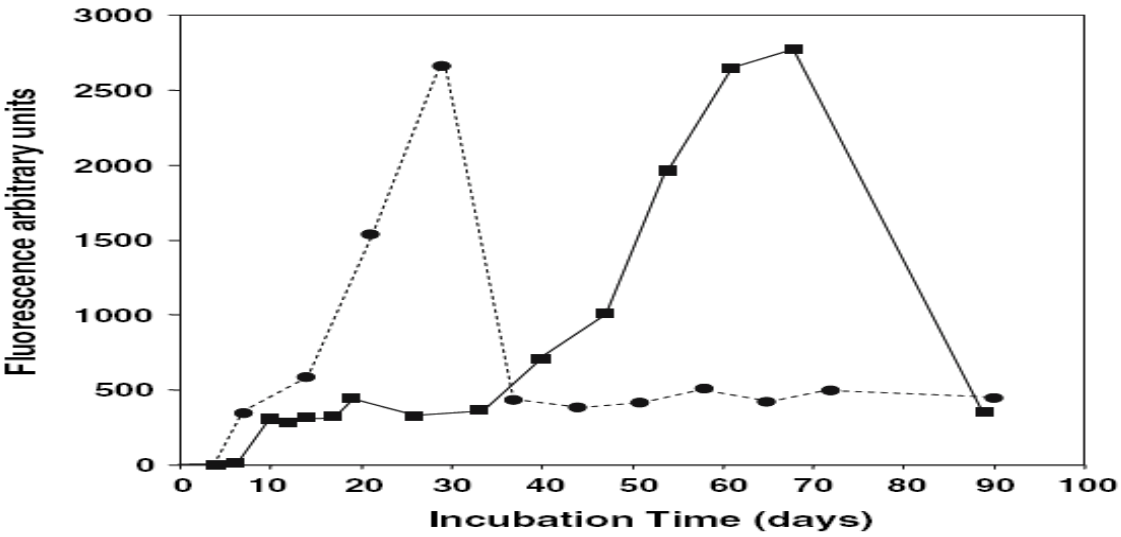


Figure 4. Chitinases activity detected during *Fagus sylvatica* wood degradation by *Trametes versicolor* in absence (■) and in presence (●) of propiconazole

From these results, we postulate that the detected chitinolytic activities could be due to enzymes either excreted or associated to the fungal cell wall. Triazoles are inhibitors of enzymes involved in sterol synthesis indirectly disrupting the cell wall organization. Particularly, in fungi, triazole treatment leads to a cellular response, in an attempt by the cell to survive, that has been called the

"compensatory mechanism". This response clearly illustrates the dynamic nature of the cell wall, and it is characterized notably by an increase in chitin content (Kauffman 2006). Cell-wall associated chitinases are likely to have overlapping functions but, in some cases, they have been shown to play a role in cell wall dynamics (Bowman and Free 2006). The detected chitinases were also probably involved in cell-wall hydrolysis and remodelling, this phenomenon being enhanced by the propiconazole treatment. Furthermore, since the fungus enhances the level of chitin in the cell wall, we assume that the increase in extra-cellular chitinase production could also help provide essential chitin constituents for the cell.

Effect of caffeine on T. versicolor growth

From the data described above, we hypothesized that chitinase inhibitors should be predicted to act with propiconazole as fungal inhibitors. In the literature, data about commercially available and economically suitable chitinase inhibitors are scarce. Recently, a high throughput screen identified three xanthine derivatives, theophylline, caffeine, and pentoxifylline, as competitive inhibitors of 18 chitinases of the bacterial, fungal, and human families (Rao et al. 2005; Schüttelkopf et al. 2006). We also tested the effects of caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) on *T. versicolor* growth. The fungal growth was dramatically inhibited in presence of this drug. At a concentration of 10 mM, caffeine fully inhibited the growth of *T. versicolor* on malt-agar (Table 1).

Table 1. Antifungal index of tested compounds against *Trametes versicolor*

	Caffeine concentration (mM)				
	0	2.5	5	7	10
Antifungal Index Without propiconazole addition	0	0.46	0.7	0.87	1
Antifungal Index With 0.5 mM propiconazole addition	0.14	0.58	0.8	1	1

Nevertheless, the commercial fungicide propiconazole was the most effective since *T. versicolor* growth was totally inhibited in the presence of 5 mM of this compound (data not shown). Various concentrations of caffeine have been mixed with 0.5 mM propiconazole to determine whether their combination displayed enhanced effects against *T. versicolor*. The antifungal index for the treatment using the combination of both products was indeed increased whatever the caffeine concentrations used. Using Colby's formula, the obtained results suggest that propiconazole and

caffeine have additive effects on *T. versicolor* growth. For instance, the antifungal index obtained in presence of 2.5 mM caffeine and 0.5 mM propiconazole is 0.58. The value calculated with the Colby's formula: AI = AIpro + AIcaf – (AIpro x AIcaf) is 0.54 [= 0.14 + 0.46 – (0.46 x 0.14)] is not substantially different from the experimental antifungal index (0.58) obtained in these conditions. In complementary experiments, the fungal growth was totally inhibited in the presence of 0.7 mM propiconazole and 7 mM caffeine, since no growth was detected even after two months, whereas both compounds used alone did not prevent fungal growth (data not shown). These data suggest that caffeine and propiconazole exert their action independently of each other, but that the use of compounds such as caffeine could help reduce the propiconazole concentrations needed in the wood preservation formulation.

Conclusions

At the beginning of this study, we postulated that propiconazole could induce a strong alteration of the production pattern of enzymes involved in nutrient mobilization. Among the tested enzymes, only the chitinase production is affected suggesting a role for these enzymes in the fungal response linked to the biocide treatment. This phenomenon is probably due to the fact that the fungal cell wall modification induced by the biocide requires increased amounts of chitin. The use of chitinase inhibitors such as caffeine could help reduce the triazole concentrations needed. Nevertheless, caffeine elicits pleiotropic effects in fungi leading ultimately to cell death through largely uncharacterized mechanisms (Kurunda et al. 2006), which could explain the observed additive effects of caffeine when it was used with propiconazole. Nevertheless, the approach developed in this study could be a useful way to identify new class of additives suitable for triazole-containing wood preservatives.

References

Aro N, Pakula T, Penttila M (2005) Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. FEMS Microbiol Rev 29:719-739

Bowman SM, Free SJ (2006) The structure and synthesis of the fungal cell wall. Bioassays 8:798-808

Chang ST, Wang SY, Wu CL, Su,YC, Kuo YH (1999) Antifungal compounds in the ethyl acetate soluble fraction of the extractives of Taiwania (*Taiwania cryptomerioides hayata*) heartwood. Holzforschung 53:487-490

Colby SR (1967) Calculating synergistic and antagonistic responses of herbicide combinations. Weeds 15: 20-22

Courty PE, Pritsch K, Schloter M, Hartmann A, Garbaye J (2005) Activity profiling of ectomycorrhiza communities in two forest soils using multiple enzymatic tests. New Phytol 167:309-319

Kang Z, Huang L, Krieg U, Mauler-Machnik A, Buchenauer H (2001) Effects of tebuconazole on morphology, structure, cell wall components and trichothecene production of *Fusarium culmorum in vitro*. Pest Manag Sci 57:491-500

Kauffman CA (2006) Clinical efficacy of new antifungal agents. Curr Opin Microb 9: 483-488

Kuranda K, Leberre V, Sokol S, Palamarczyk G, François J (2006) Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. Mol Microbiol 61:1147-1166

Mabicka A, Dumarcay S, Rouhier N, Linder M, Jacquot JP, Gérardin P, Gelhaye E (2005) Synergistic wood preservatives involving EDTA, Irganox 1076 and 2-hydroxypyridine-N-oxide. Int Biodeter Biodegrad 55: 203-211

Rao FV, Andersen OA, Vora KA, DeMartino JA, Van Aalten DMF (2005) Methylxanthine drugs are chitinase inhibitors: Investigation of inhibition and binding modes. Chem and Biol 12: 973-980

Schultz TP, Nicholas DD (2002) Development of environmentally-benign wood preservatives based on the combination of organic biocides with antioxidants and metal chelators. Phytochem 61:555-560

Schultz TP, Nicholas DD, Henry WP, Pittman CU, Wipf DO, Goodell B (2005) Review of laboratory and outdoor exposure efficacy results of organic biocide: Antioxidant combinations, an initial economic analysis and discussion of a proposed mechanism. Wood Fiber Sci 37: 175-184

Schüttelkopf AW, Andersen OA, Rao FV, Allwood M, Lloyd C, Eggleston IM, Van Aalten DMF (2006) Screening-based discovery and structural dissection of a novel family 18 chitinase inhibitor. J Biol Chem 281:27278-27285

Stapleton PC, Dobson ADW (2003) Carbon repression of cellobiose dehydrogenase production in the white rot fungus *Trametes versicolor* is mediated at the level of gene transcription. FEMS Microbiol Lett 221:167-172

4.3.3. Conclusion

L'effet du propiconazole au cours du processus de dégradation du bois par *T. versicolor* a été étudié. Dans ce but, une faible concentration de propiconazole a été utilisée dans le but de retarder la croissance du champignon et non de l'inhiber. Ce traitement induit la présence d'une phase de latence au début du processus de dégradation. Après cette phase d'adaptation, la perte de masse présente le même profil que celui du témoin. Toutefois, les éprouvettes de bois traitées avec le biocide ont une perte de masse moins importante (environ 30 %) comparé au bois non traité dont la perte de masse est proche de 45 %. Ces résultats confirment l'efficacité du biocide utilisé.

Parmi les résultats obtenus sur les activités hydrolytiques, la production des activités chitinases présentait des modifications importantes suggérant que ces enzymes pouvaient jouer un rôle dans la réponse du champignon contre le traitement au biocide. La modification de la paroi cellulaire du champignon induite par le biocide entraîne une modification de l'expression des enzymes impliquées dans ce remodelage (Adams, 2004) et pourrait expliquer l'induction des chitinases. Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs de chitanases pourrait réduire la quantité de triazoles utilisée dans le cadre d'un traitement de préservation du bois. Dans la littérature, trois dérivés de xanthine, la théophylline, la caféine et la pentoxifiline, ont été identifiés comme des inhibiteurs de chitinases bactériennes et fongiques (Schüttelkopf and al., 2006). La caféine (1, 3,7-triméthylxanthine) est un analogue de substrat à base de purine, inhibant de manière compétitive les chitinases. C'est également une drogue à effets multiples qui affecte une variété de processus cellulaires et qui provoque notamment des altérations de la paroi fongique (Jacoby et al., 1998 ; Martin et al., 2000 ; Park et al., 2005 ; Kuranda et al., 2006). Chez la levure, la caféine est responsable d'une forte modification de l'architecture de la paroi, conduisant à une augmentation de la teneur en chitine et en β-glucanes. Nos résultats suggèrent que la caféine a un effet additif sur l'inhibition de la croissance de *T. versicolor* lorsqu'elle est associée avec le propiconazole.

EFFET DE LA CAFEINE SUR LA CROISSANCE DES CHAMPIGNONS DE POURRITURE DU BOIS

4.4. Effet de la caféine sur la croissance des champignons de pourriture du bois

4.4.1. Introduction

Dans la continuité des résultats obtenus montrant qu'un inhibiteur de chitinases tel que la caféine pouvait avoir un effet additif avec les triazoles sur la croissance de *Trametes versicolor*, nous avons décidé d'étendre cette étude à différents champignons ligninolytiques utilisant des systèmes de dégradation du bois différents. Notre choix s'est donc porté sur deux champignons de pourriture brune *Coniophora puteana* et *Poria placenta* ainsi que sur une deuxième pourriture blanche *Phanerochaete chrysosporium*. Nous avons également complété cette étude en testant l'action d'un autre agent perturbant la paroi cellulaire, le rouge congo, sur la croissance de *T. versicolor*. Le rouge congo est un colorant qui se fixe spécifiquement sur les β-glucanes, un autre constituant majeur de la paroi cellulaire. Enfin, l'action combinée du propiconazole et de la caféine sur la dégradation du bois de hêtre par *T. versicolor* a été étudiée.

4.4.2. Résultats

Les résultats obtenus sont présentés dans la publication en préparation intitulée : «Effects of caffeine on growth of wood-decaying fungi ». Une partie de ces travaux a également été présentée dans le cadre du 38ème congrès annuel de l'International Research Group on Wood Protection (2007).

Effects of caffeine on wood-decaying fungi

S. Lekounougou[1,2], J. P. Ondo[2], J.P. Jacquot[1], G. Nevers[3], P. Gérardin[2], E. Gelhaye[1]

[1]Equipe Interactions Arbres/Micro-organismes, UMR INRA/UHP1136,
Nancy Université
Faculté des Sciences et Techniques, BP 239,
54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France

[2]Laboratoire d'Etudes et de Recherche sur le Matériau Bois, UMR INRA 1093
Equipe de Chimie Organique et Microbiologie, Nancy Université, BP 239,
54506 Vandoeuvre les Nancy Cedex, France

[3]OBBIA sas F–19190 Aubazine, France

Abstract

The wide-used triazoles alter the biosynthesis of ergosterol leading to a disruption of fungal membrane functions. The aim of this study was to investigate the effects of another cell wall perturbing agent, caffeine, in combination with propiconazole on the growth of wood-decaying fungi. 10 mM caffeine inhibits totally the growth of four tested fungal species. The obtained results showed that caffeine have an additive effect with propiconazole and Congo red, another cell-wall perturbing agent, on *Trametes versicolor* growth. In addition, combination of propiconazole and caffeine leads to a better protection of wood compared to that one obtained using each drug individually. Taking together, these data suggest that caffeine could be potentially used as additive in wood preservatives formulation using triazoles.

Keywords: Wood preservation, rotting fungi, caffeine, propiconazole, congo red

Introduction

Triazoles fungicides are widely used in the field of wood preservation. The primary target of azole antifungal agents is the lanosterol-14-α-demethylase (Kauffman, 2006). This enzyme, which chemically belongs to the group of cytochrome P450 enzymes, is involved in the synthesis of ergosterol, which is a major and essential lipid constituent of the cell membrane of fungi. By binding to the enzyme, the oxidative demethylation of lanosterol is inhibited, which is one of the last steps in ergosterol biosynthesis. Consequently, exposure of fungi to azoles leads to a depletion of ergosterol modifying the stability of the fungal cell membrane, the transport of nutrients and the chitin synthesis. These fungicides often cause striking morphological malformations, irregular cell wall thickenings, and excessive branching in fungi (Kang et al., 2001). The depletion of functional sterols and the accumulation of sterol intermediates induced by this kind of fungicides result also in a disruption of membrane functions, including activation of chitin and β-1,3-glucan synthesis (Kang et al., 2001).

In the recent years, attempts have been made to develop more environmentally acceptable wood preservation formulations based on association of different molecules acting together on the wood-rotting fungi. The main goal of these approaches is to enhance the efficiency of conventional organic biocides by addition of cheap low toxicity compounds able to decrease the quantity of biocides necessary to protect wood. In wood decay studies, Schultz et al showed that combinations of butylated hydroxytoluene (BHT) chosen for its antioxidant properties and various organic biocides were synergistic (Schultz et al., 2005). Mabicka et al. (2005) recently reported also that the mixture of antioxidant Irganox 1076 and 2-hydroxypyridine-N-oxide was synergistic. Use of antioxidants in wood preservative mixtures came from studies performed on wood extractives. Indeed, wood extractives have been shown to act via at least three different mechanisms, namely fungicide action, free radical scavenging/antioxidation and metal chelation (Schultz and Nicholas, 2002). Consequently, antioxidants and metal chelators have been suggested as promising additives for the development of novel and environmentally benign preservative systems (Schultz and Nicholas, 2002; Mabicka et al., 2004).

Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) is an analogue of purine bases, reported to affect a variety of cellular processes. Particularly, it has been shown that caffeine induces cell wall alteration in fungi (Jacoby et al., 1998; Martin et al., 2000; Park et al., 2005; Kuranda et al., 2006). In yeast, caffeine induces a strong alteration of the cell wall architecture, leading to an increase of β-glucans and chitin contents. Caffeine is currently used as a phenotypic criterion to evaluate the function of factors involved in cell wall integrity pathway in yeast as well as in other fungi (Kurunda et al., 2006). Caffeine has been also to be shown to have an additive action with the biocide propiconazole

on the growth of *T. versicolor* (Lekounougou et al., 2007). To pursue our investigations on the use of additives able to enhance the efficiency of triazoles, we report in this study the effects of caffeine in combination with propiconazole on wood-degrading fungi.

Experimental

Fungi

Trametes versicolor (strain CTB 863A), *Poria placenta* (strain FPRL 280), *Coniphora puteana* (strain CIRAD 1202/2), and *Phanerochaete chrysosporium* (strain RP78) were used throughout this study. Stock cultures were maintained on malt-agar slants, which were kept at 4°C before use.

Antifungal assays

Antifungal assays were performed based on Chang et al. (1999) with slight modifications. Propiconazole was dissolved in ethanol, whereas caffeine and Congo red were dissolved in distillate water. Solutions of different concentrations of chemicals were added into sterilized malt agar in 9 cm Petri dishes. Petri dishes were inoculated with the mycelia of the different fungal strains and incubated in the dark at 22 °C and 70% RH. When the mycelium of fungi reached the edges of the control dishes, the antifungal indices were calculated. Each test was repeated three times. Antifungal index (AI) was calculated according to the following formula and averaged.

$AI(\%) = [(1-(Da/Db)]$

where Da is the diameter of growth zone (cm) in the dish containing chemicals and Db is the diameter of growth zone in the control dish.

The estimated response in case of additive effects of compounds X and Y can be calculated as follows (Colby, 1967):

$AI = AI_X + AI_Y – AI_XAI_Y$

where AI_X and AI_Y are the responses for products X and Y, with AI = 1 corresponding to a total inhibition and AI = 0 meaning no effect. Thus, an experimental response AI superior to the estimated response would indicate a synergistic effect.

Decay test on wood

Experimental procedure used throughout this study to evaluate ability of caffeine to protect wood blocks is a non standardized procedure inspired from EN 113 norm. Beech wood Fagus sylvatica) blocks (1.5 x 0.5 x 3.5 cm in radial, tangential, longitudinal directions respectively) were dried at 80°C and weighed at ± 0.01 g (m_0). Dried blocks (6 replicates) were placed in a beaker inside a dessicator equipped with a two-way tap and subjected to 4 mbar vacuum for 15 min. Blocks were then impregnated by suction and covered with ethanolic solution of the different tested compounds

and the pressure returned to atmospheric. After 2 h of soaking, blocks were removed from the solution, weighed (m_1) and drained at air and dried at 80°C for 2 days. Sterile culture medium (20ml), prepared from malt (40g) and agar (30g) in distilled water (1l), was placed in 9 cm Petri dishes, inoculated with fungus and incubated during 2 weeks at 22°C and 70% HR to allow colonization of the medium by the mycelium. Three U.V. sterilized blocks (treated or untreated) were placed in each Petri dishes under sterile conditions. Incubation was carried out for 10 weeks at 22°C under controlled humidity conditions of 70 % RH in a climatic chamber WTB BINDER TYP KBF 115. After this period, mycelia were removed and the blocks were dried at 103°C and weighed (m_2). All experiments were duplicated. Weight loss (WL) was expressed as a percentage of the initial ovendried weight of the sample according to the formula:

$$WL\ (\%) = ((m_0 - m_2)/m_0)\ x100$$

Wood protective index (WPI) was calculated according to the following formula and averaged.

WPI (%) = [(1-(Wa/Wb)]

where Wa is the weight loss measured on wood containing chemicals and Wb is the weight loss measured on untreated wood.

The estimated response in case of additive effects of compounds X and Y has been calculated according to Colby (1967).

Results and Discussion

Effects of caffeine on wood-decaying fungi growth

Whatever the tested wood-decaying fungus, *i.e.* the two brown-rot fungi *Coniphora puteana* and *Poria placenta* and the two white-rot fungi *Trametes versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium*, the fungal growth is dramatically altered in presence of caffeine on malt agar medium (Figure 1). Growth of the four tested fungi is fully inhibited in presence of 10 mM (around 2 g/L) of caffeine (Figure 1) in accordance with the previous data on the microbial toxicity of caffeine (Kuranda et al., 2006).

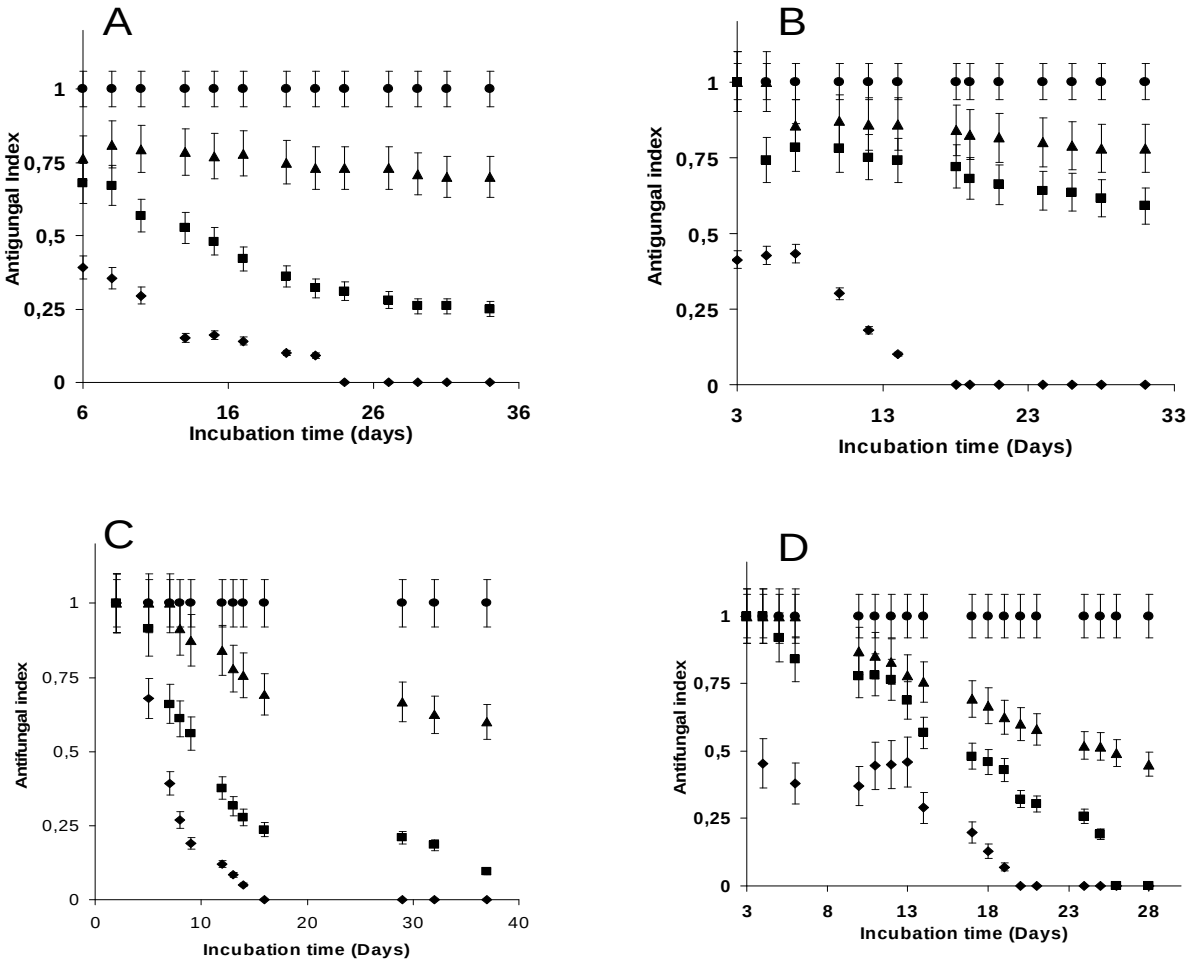


Figure 1. Effect of caffeine [◆ , 2.5 mM; ■, 5 mM; ▲; 7 mM; ●, 10 mM] on the growth of A, *Poria placenta;* B, *Coniphora puteana*; C, *Phanerochaete chrysosporium*; D, *Trametes versicolor*.

Caffeine-degrading ability has been reported in various bacterial and fungal species isolated from the soil of coffee plantation areas or from coffee dumps. Nevertheless, apart these special groups of micro-organisms, which have unique metabolic characteristics and enzyme systems for the breakdown of caffeine, this drug is generally considered to be toxic to microbes (Dash and Gummadi, 2006). Caffeine has been reported to be toxic to bacteria since caffeine concentration greater than 2.5 g/l in the medium inhibited the growth of many bacterial species (Sundarraj and Dhala; 1965; Putrament et al., 1972). Several filamentous fungi have been described as caffeine degrading organisms; nevertheless it has been reported that fungal biomass production was a critical step for caffeine degradation due to its toxicity (Hakil 1999; Suárez-Quiroz et al., 2004).

Effects of combinations of propiconazole and caffeine on the growth

The effects of caffeine have been also tested on the growth of the four fungi in presence of 0.5 mM propiconazole (Table 1).

Table 1: Antifungal index (AI) of tested compounds against *Coniophora puteana*, *Poria placenta*, *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor* growth

	Caffeine concentration (mM)			
	0	**2.5**	**5**	**7**
P. placenta				
AI (without addition)	0	0.43	0.75	1
AI (with 0.5mM Propi)	0.47	0.65	0.88	1
Pcolby	0.47	0.70	0.86	1
C. puteana				
AI (without addition)	0	0.61	0.85	1
AI (with 0.5mM Propi)	0.77	0.87	1	1
Pcolby	0.77	0.91	0.97	1
T. versicolor				
AI (without addition)	0	0.46	0.70	0.87
AI (with 0.5mM Propi)	0.12	0.58	0.76	1
Pcolby	0.12	0.54	0.73	0.92
P. chrysosporium				
AI (without addition)	0	0.49	0.69	0.82
AI (with 0.5mM Propi)	0.72	0.68	0.77	0.91
Pcolby	0.70	0.85	0.91	0.95

The primary target of this azole is the lanosterol-14α-demethylase, an enzyme involved in the synthesis of ergosterol, a major and essential lipid constituent of the cell membrane of fungi (Kauffman 2006). For *T. versicolor*, *C. puteana* and *P. placenta*, the obtained data suggest that propiconazole and caffeine act independently, even if the presence of these compounds leads to a strong alteration of the fungal cell wall composition. Indeed, in all tested combinations, the measured antifungal index showed an additive effect between the tested drugs, since the theoretical calculated values are quite similar to those measured experimentally. For *P. phanerochaete*, the theoretical values are slightly superior to them measured experimentally suggesting that both drugs could act on similar targets in this fungus.

Effects of combinations of Congo red, propiconazole and caffeine on T. versicolor growth

In complementary experiments, we scheduled to explore the effects of one another cell-wall perturbing agents, the Congo red on the growth of *T. versicolor*. The dye binds specifically to β-glucans and also alters strongly the cell wall composition (Kuranda et al., 2006). The presence of this dye leads for instance in yeast to inactivation of the so-called "compensatory mechanism," aimed at preserving cell integrity through a remodeling of this extracellular matrix (Garcia et al.,

2004). Since Congo red acts specifically on cell wall, this dye could be used to investigate the combination of a specific cell-wall perturbing agent with caffeine.
The growth of *T. versicolor* is strongly altered in presence of Congo red (Table 2).

Table 2: Antifungal index of tested compounds against *Trametes versicolor* growth

	Congo red concentration (mM)			
	0	**0.01**	**0.05**	**0.08**
Antifungal Index Without addition	**0**	**0**	**0.42**	**0.43**
Antifungal Index With 0,5 mM propiconazole addition	**0.12**	**0.12**	**0.46**	**0.52**
Pcolby	**0.12**	**0.13**	**0.49**	**0.56**
Antifungal Index With 5 mM caffeine addition	**0.76**	**0.8**	**0.81**	**0.82**
Pcolby	**0.76**	**0.8**	**0.82**	**0.83**

An antifungal index of 0.42 has been observed in presence of 0.05 mM Congo red, a similar value being reported in *Saccharomyces cerevisiae* (Kuranda et al., 2006). The effects of Congo red have been also investigated in presence of 5 mM caffeine. Combinations led to an increase of the observed antifungal index showing that both drugs have additive effects on the *T. versicolor* growth. The obtained data suggest that Congo red and caffeine act independently, even if the presence of these compounds leads to a strong alteration of the fungal cell wall composition (Kauffman, 2006; Kuranda et al., 2006). In complementary experiments, we tested the effects of Congo red in presence of propiconazole on *T. versicolor* growth (Table 2). In all tested combinations, the measured antifungal index showed an additive effect between the tested drugs. The obtained data suggest that the three drugs act independently to each other, even when the presence of these compounds leads to a strong alteration of the fungal cell wall composition (Kauffman, 2006; Kuranda et al., 2006).

Effects of combinations of propiconazole and caffeine on wood-degradation induced by T. versicolor

In order to determine the range of required concentrations, several mixtures varying the concentrations of both drugs were firstly tested on *T. versicolor* growth on malt agar. The growth of the fungus was totally inhibited in presence of 0.7 mM propiconazole and 7 mM caffeine, since no

growth has been detected even after two months, whereas both compounds used alone allowed the fungal growth (Figure 2).

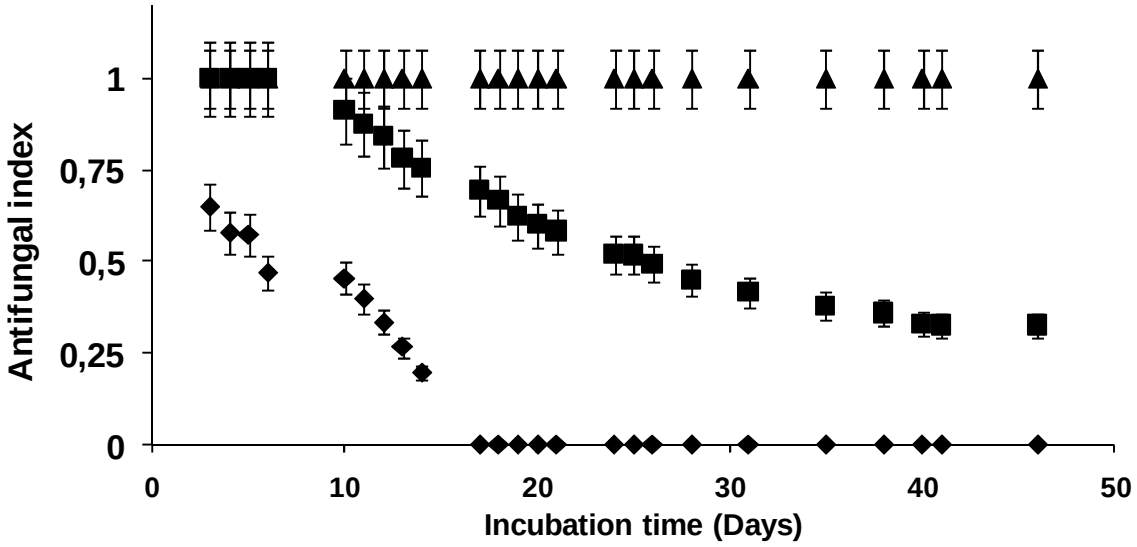


Figure 2. Effect of 7mM caffeine (■),0.7 mM propiconazole (♦) and combination of both (▲) on *T. versicolor* growth

From these data, several mixtures have been chosen in order to test the effects of the combination of both drugs on wood degradation induced by *T. versicolor*. As detected during experiments on malt-agar medium, caffeine inhibits strongly the wood degradation induced by *T. versicolor* (Figure 3).

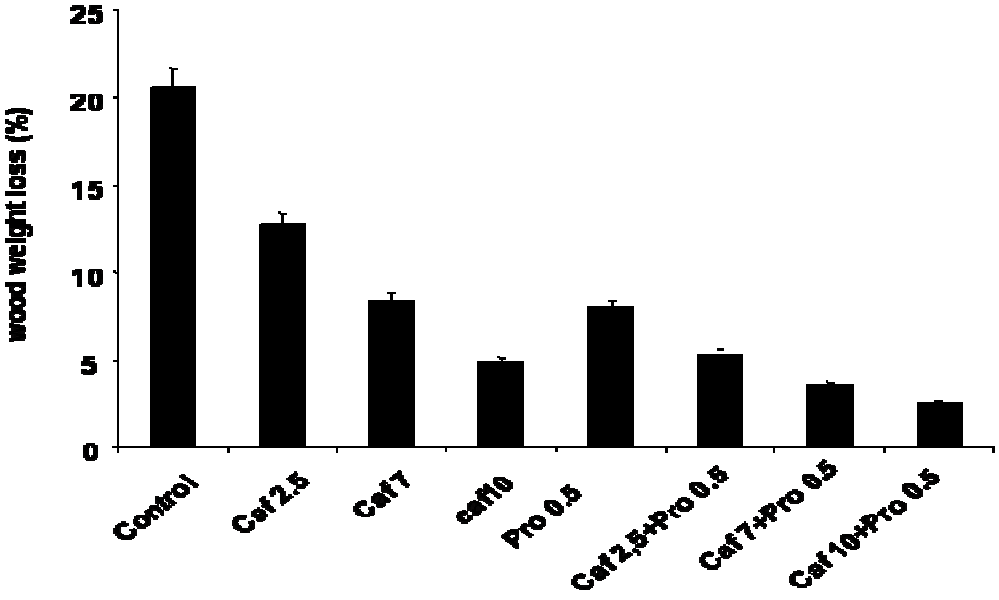


Figure 3. Effects of caffeine (2.5, 7 and 10 mM), propiconazole (0.5 mM) and combination of both on *Fagus sylvatica* wood degradation induced by *T. versicolor* after 8 incubation weeks.

Furthermore, combinations of different caffeine concentrations with 0.5 mM propiconazole led to an increase of wood protection. The detected wood protection indexes show that both drugs have additive effects on wood protection as defined by Colby (1967) (Table 3).

Table 3 : Wood preservation index of tested compounds during *Fagus sylvatica* wood degradation induced by *Trametes versicolor*

	0	**2.5**	**7**	**10**
Wood preservation Index Without propiconazole addition	0	0.38	0.59	0.76
Wood preservation Index With 0.5 mM propiconazole addition	0.61	0.76	0.84	0.90
Pcolby		**0.74**	**0.83**	**0.88**

Conclusion

In this study, we have shown that caffeine inhibits the growth of wood-decaying fungi, the effects of caffeine on fungal growth being mainly additive to this observed in the presence of propiconazole. The use of Congo red confirmed that addition of a cell-wall perturbing agent with propiconazole leads to an additive response as defined by Colby (1967). Further experiments need to be performed in order to determine the target(s) of this pleiotropic drug on wood-decaying fungi. Caffeine is a well-known natural product, economically suitable and available, which could be potentially used as additive in wood preservatives formulation as shown in experiments using wood. Further experiments in the field are needed to investigate the potential use of caffeine in combination with triazoles in wood preservation.

References

Chang, S.-T., Wang, S.-Y., Wu, C.-L., Su, Y.-C., Kuo, Y.-H., 1999. Antifungal compounds in the ethyl acetate soluble fraction of the extractives of Taiwania (Taiwania cryptomerioides hayata) heartwood. Holzforschung 53 (5), pp. 487-490.

Colby, S.R., 1967. Calculating synergistic and antagonistic responses of herbicide combinations. Weeds, 15, 20-22.

Dash, S.S., Gummadi, S.N., 2006. Catabolic pathways and biotechnological applications of microbial caffeine degradation. Biotechnology Letters 28 (24), pp. 1993-2002.

García, R., Bermejo, C., Grau, C., Pérez, R., Rodríguez-Peña, J.M., Francois, J., Nombela, C., Arroyo, J., 2004. The Global Transcriptional Response to Transient Cell Wall Damage in *Saccharomyces cerevisiae* and Its Regulation by the Cell Integrity Signaling Pathway. Journal of Biological Chemistry 279 (15), pp. 15183-15195.

Hakil, M., Voisinet, F., Viniegra-González, G., Augur, C., 1999. Caffeine degradation in solid state fermentation by Aspergillus tamarii: Effects of additional nitrogen sources. Process Biochemistry 35 (1-2), pp. 103-109.

Jacoby, J.J., Nilius, S.M., Heinisch, J.J., 1998. A screen for upstream components of the yeast protein kinase C signal transduction pathway identifies the product of the SLG1 gene. Molecular and General Genetics 258 (1-2), pp. 148-155.

Kang, Z., Huang, L., Krieg, U., Mauler-Machnik, A., Buchenauer, H., 2001. Effects of tebuconazole on morphology, structure, cell wall components and trichothecene production of *Fusarium culmorum in vitro*. Pest Management Science 57 (6), pp. 491-500

Kauffman, C.A., 2006. Clinical efficacy of new antifungal agents. Current Opinion in Microbiology 9 (5), pp. 483-488.

Kuranda, K., Leberre, V., Sokol, S., Palamarczyk, G., François, J., 2006. Investigating the caffeine effects in the yeast Saccharomyces cerevisiae brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. Molecular Microbiology 61 (5), pp. 1147-1166.

Lekounougou, S., Jacquot, J.P., Gelhaye, E. and Gérardin, P., 2007. Effects of propiconazole on extra-cellular enzymes involved in nutrient mobilization during *Trametes versicolor* wood colonization. Wood Science and Technology. (In press)

Mabicka, A., Dumarçay, S., Gelhaye, E., Gérardin, P., 2004. Inhibition of fungal degradation of wood by 2-hydroxypyridine-N-oxide. Holzforschung 58 (5), pp. 566-568.

Mabicka, A., Dumarçay, S., Rouhier, N., Linder, M., Jacquot, J.P., Gérardin, P., Gelhaye, E., 2005. Synergistic wood preservatives involving EDTA, Irganox 1076 and 2-hydroxypyridine-N-oxide. International Biodeterioration and Biodegradation 55 (3), pp. 203-211.

Martin, S., Laude-Lemaire, I., Kerbiriou-Nabias, D., Freyssinet, J.-M., Martínez, M.C., 2000. Relation between phosphatidylserine exposure and store-operated Ca^{2+} entry in stimulated cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 279 (2), pp. 639-645.

Park, J.-I., Collinson, E.J., Grant, C.M., Dawes, I.W., 2005. Rom2p, the Rho1 GTP/GDP exchange factor of Saccharomyces cerevisiae, can mediate stress responses via the Ras-cAMP pathway. Journal of Biological Chemistry 280 (4), pp. 2529-2535.

Putrament, A., Baranowska, H., Biliński, T., Prazmo, W., 1972. On the specificity of caffeine effects. Inhibition by caffeine of RNA and protein synthesis in yeast and Escherichia coli. Molecular and General Genetics 118 (4), pp. 373-379.

Schultz, T.P., Nicholas, D.D., 2002. Development of environmentally-benign wood preservatives based on the combination of organic biocides with antioxidants and metal chelators. Phytochemistry 61 (5), pp. 555-560.

Schultz, T.P., Nicholas, D.D., Henry, W.P., Pittman, C.U., Wipf, D.O., Goodell, B., 2005. Review of laboratory and outdoor exposure efficacy results of organic biocide: Antioxidant combinations, an initial economic analysis and discussion of a proposed mechanism. Wood and Fiber Science 37 (1), pp. 175-184.

Suárez-Quiroz, M.L., González-Rios, O., Barel, M., Guyot, B., Schorr-Galindo, S., Guiraud, J.P., 2004. Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee. Food Microbiology 21 (6), pp. 629-634.

Sundarraj, C.V. and Dhala, S., 1965. Effect of naturally occurring xanthines on bacteria (I). Antimicrobial action and potential effect on antibiotic spectra, Applied Microbiology 13, pp. 432–436.

4.4.3. Conclusion

Les triazoles sont largement utilisés dans le domaine de la préservation du bois. Ils altèrent la biosynthèse de l'ergostérol, désorganisant la stabilité de la membrane fongique, le transport des nutriments et la synhèse de la chitine (Kang et al., 2001).

Le but de cette étude était d'étudier les effets d'autres agents perturbant la paroi cellulaire comme la caféine et le rouge Congo, utilisés en association avec le propiconazole. Les résultats obtenus montrent que la caféine inhibe la croissance des champignons de pourritures blanche et brune et qu'elle présente un effet additif à celui exercé par le propiconazole. Des expériences plus spécifiques utilisant *T. versicolor* comme organisme modèle ont été conduites en utilisant le rouge Congo. Le rouge Congo est un autre agent qui altère la paroi cellulaire des champignons en se liant spécifiquement aux β-glucanes. La présence de ce colorant conduit chez la levure à une inactivation appelé mécanisme compensatoire, permettant la préservation de l'intégrité de la cellule (Garcia et al., 2004). Nos données suggèrent que ces trois drogues (rouge Congo, propiconazole et caféine) agissent indépendamment bien que leur présence conduit à une forte altération de la composition de la paroi cellulaire des champignons (Kauffman, 2006; Kuranda et al., 2006).

EFFET DU TRAITEMENT THERMIQUE SUR LES SYSTEMES ENZYMATIQUES IMPLIQUES DANS LA DEGRADATION DU BOIS

4.5 Effet du traitement thermique sur les systèmes enzymatiques impliqués dans la dégradation du bois

4.5.1. Introduction

La préservation du bois est une nécessité économique lorsque ce dernier est amené à être utilisé dans des conditions dans lesquelles les risques de dégradation sont importants. Plusieurs moyens existent, notamment l'application de produits chimiques sur le bois afin de le rendre plus durable face aux insectes ou aux champignons. Cependant, certains de ces produits peuvent être toxiques pour l'environnement particulièrement lorsqu'ils sont lessivables ou volatils. La Directive Biocide fixe désormais un cadre législatif pour l'utilisation des produits de préservation du bois, conduisant après examen au cas par cas des différents biocides utilisés jusqu'à présent, soit à leur abandon soit à une réglementation d'utilisation très stricte. Du fait des pressions environnementales apparues ces dernières années en France et dans les principaux Etats Européens (Directive Biocide, loi sur l'air), le développement de méthodes de préservation plus respectueuses de l'environnement visant à diminuer les risques de rejet de produits toxiques dans l'environnement connaît un intérêt sans cesse croissant.

Parmi les différentes alternatives envisagées, le traitement thermique est un des traitements de préservation qui s'est le plus développé ces dernières années. Traité à des températures comprises entre 180 et 240°C, les constituants du bois subissent des modifications chimiques plus ou moins importantes conférant au matériau de nouvelles propriétés. Dans tous les cas, la modification des différents constituants du bois joue un rôle primordial sur les propriétés finales du matériau justifiant les nombreuses études dédiées à l'identification et à la compréhension des transformations chimiques intervenant lors du traitement thermique. Cependant, en fonction des conditions opératoires utilisées (voie sèche ou voie humide, durée de traitement, température…), les modifications chimiques peuvent être légèrement différentes conduisant à des propriétés variables d'un traitement à l'autre. Différents types de traitements ont ainsi été développés ces dernières années: le procédé PLATO, le procédé de rétification NOW, le procédé ThermoWood et différents procédés oléothermiques…

Un des avantages considérables du traitement thermique est la résistance du bois contre les attaques des champignons. La durabilité des bois traités à des températures au-dessus de 180°C augmente considérablement. Pour des bois traités à 280°C, la résistance aux champignons est totale, mais les propriétés mécaniques deviennent très médiocres. La résistance au pourrissement dépend

donc de la température du traitement. Les modifications chimiques durant le traitement thermique sont une hypothèse plausible pour expliquer l'amélioration de la durabilité du bois.

Les raisons moléculaires de cette augmentation ont été en partie abordées dans le travail de thèse de Mohamed Hakkou développé au laboratoire (Hakkou, 2006). Dans ce travail, quatre hypothèses principales résultant de l'analyse bibliographique existant dans le domaine avaient été mises en avant pour expliquer l'accroissement de durabilité :

- l'augmentation du caractère hydrophobe du bois, limitant le transport capillaire de l'eau dans le matériau et limitant ainsi la croissance du champignon par manque d'eau,
- la génération, durant le traitement, de molécules de type extractibles ayant un caractère toxique empêchant le champignon de se développer,
- la modification de la structure des polymères du bois bloquant ainsi les systèmes enzymatiques de dégradation du champignon incapable de reconnaitre plus le substrat à dégrader,
- la forte dégradation thermique des hémicelluloses faisant disparaître le principal nutriment du champignon et empêchant ainsi son développement.

Les principales conclusions de ce travail de thèse avaient été que la modification du caractère hydrophile/hydrophobe du bois, ainsi que la génération d'extractibles pouvant jouer le rôle de biocides semblaient avoir un effet très limité sur la durabilité, et que la raison la plus vraisemblable était la modificication chimique des polymères constituant le bois.

Après avoir mis au point des méthodes efficaces de dosage des différentes activités enzymatiques exprimées par *T. versicolor* lors de la dégradation du bois, il nous a semblé intéressant d'appliquer ces méthodes au cas du bois traité thermiquement dans le but de vérifier l'effet de la modification des polymères du bois sur l'activité enzymatique du champignon et donc de valider ou non les deux dernières hypothèses évoquées pour expliquer l'augmentation de durabilité.

4.5.2. Résultats

Les résultats obtenus sont présentés dans la publication intitulée : «Effect of heat treatment on extracellular enzymatic activities involved in beech wood degradation by *Trametes versicolor* » soumise à Wood Science and Technology.

Effect of heat treatment on extracellular enzymatic activities involved in beech wood degradation by *Trametes versicolor*

S. Lekounougou[a,b], M. Pétrissans[a], J.P. Jacquot[b], E. Gelhaye[b], P. Gérardin[a] (✉)

[a]Laboratoire d'Etudes et de Recherches sur le Matériau Bois, UMR_A 1093, Nancy Universités, Faculté des Sciences et Techniques, BP 239, F-54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

[b]IFR 110, UMR_A 1136, Interactions Arbres/Micro-organismes, Faculté des Sciences, BP 239, Nancy Université, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Abstract

Effect of heat treatment on extracellular enzymes involved in wood degradation by *Trametes versicolor* was investigated. Heat-treated and untreated beech blocks were exposed to *T. versicolor* on malt agar medium and extracellular enzymatic activities investigated. A strong ABTS oxidizing activity has been detected during the first stage of colonization in both cases, while cellulase activities are mainly detected in the case of untreated beech wood. Further investigations carried out on holocellulose, isolated using sodium chlorite delignification procedure, either on untreated beech wood or heat treated one, indicates that commercially available cellulases are able to hydrolyse totally holocellulose from untreated sawdust, while hollocellulose from heat treated one was only partially hydrolysed. All these data suggest that chemical modifications of wood components during heat treatment disturb enzymatic system involved in wood degradation.

Keywords: beech, cellulase, enzymatic activity, heat treatment, laccase, oxidase, *Trametes versicolor*, wood

---

E-mail: Philippe.Gerardin@lermab.uhp-nancy.fr

Tel: 33 (0)3 83 68 48 40

Fax: 33 (0)3 83 68 48 51

Introduction

Adoption of Biocidal Product Directive in 1998 has lead to important changes in the field of wood preservation in Europe. Different heat treatment processes have been developed during the last decade allowing industrialisation and commercialization of heat-treated timbers resulting from the treatment of low natural durability wood species. (Patzelt *et al.*, 2002; Militz, 2002). Heat treatment carried out under inert atmosphere of nitrogen in a temperature range between 200 and 260°C converts wood into a new product called torrified or retified wood (Weiland and Guyonnet, 2003). Heat treated wood possesses new properties like improved dimensional stability and decay resistance, while its strength decreases more or less according to the treatment conditions (Tjeerdsma et al., 1998; Santos, 2000; Alén et al., 2002; Kamdem et al., 2002; Pétrissans et al., 2003; Grosslink et al., 2004; Hakkou et al., 2005 and 2006; Yildiz et al., 2006). Due to the improvement of durability towards wood rotting fungi, heat-treated wood is considered as a valuable "non-biocidal" alternative to classical wood preservatives for applications in hazard classes 2 and 3. However, in spite of numerous studies on the reasons of this improvement of durability of heat-treated wood (Weiland and Guyonnet, 2003; Alén et al., 2002; Kamdem et al., 2002; Grosslink et al., 2004; Hakkou et al., 2006; Boonstra et al.2006), no data has been reported on the effect of chemical modifications occurred during treatment on fungal enzymatic activities involved in wood degradation. The aim of this paper is to investigate the effect of heat treatment on expression of the different enzymatic activities, like cellobiohydrolases, β-glucosidases and oxidases involved in carbohydrates and lignin degradation during wood colonization and degradation by the white rot fungus *Trametes versicolor*.

Materials and methods

Heat treatment

Wood heat treatment was performed under nitrogen on previously dried (m) beech blocks (*Fagus sylvatica*) (1.5 x 3.0 x 3.5 cm in radial, tangential and longitudinal directions) in a glass reactor placed in an oven at 240°C during 8h. The oven temperature was increased by 20°C min^{-1} from ambient to final temperature. Mass loss of the samples after heat treatment was equal to 22% ± 0.5.

Decay fungus

The white-rot fungus, *Trametes versicolor* (L) Quelet (Strain CTB 863A) was used during this study. Stock cultures of fungi were maintained on malt-agar slants stored at 4°C.

Solid state cultures on wood

Beech wood blocks (1.5 x 0.5 x 3.5 cm in radial, tangential and longitudinal directions) were dried at 103°C and weighed at ± 0.01 g (m_0). Sterile culture medium (20ml), prepared from malt (40g) and agar (30g) in distilled water (1l), was placed in 9 cm Petri dishes, inoculated with fungus and incubated during 2 weeks at 22°C and 70% HR to allow colonization of the medium by the mycelium. Five U.V. sterilized blocks (heat -treated or not) were placed in each Petri plates under sterile conditions. Incubation was carried out at 22°C under controlled humidity conditions of 70 % RH in a climatic chamber WTB BINDER TYP KBF 115.

After different incubation times, colonized wood blocks were carefully collected, mycelium removed, dried at 103°C and weighed (m_1). Weight loss (WL) was expressed as a percentage of the initial oven dried weight of the sample according to the following formula, where m_0 corresponds to the initial mass of the wood block:

$$WL\ (\%) = ((m_0 - m_1)/m_0)\ x100$$

Enzymatic activities using fluorogenic assays

Colonized wood blocks were carefully removed from agar plates, mycelium surrounding wood chips being excised. The wood chips were then placed into a test tube containing 1 ml of 50 mM phosphate buffer pH 6. Then, mycelium was separated from the wood in order to facilitate enzyme extraction and the whole samples were incubated during 1 hour at room temperature. The samples were then centrifuged (10 000 g for 15 min) and the supernatant collected to test the different activities.

Three enzymes substrates based on methylumbelliferone (MU) were used for enzymatic detections: MU-β-D-glucopyranoside for β-glucosidase (EC 3.2.1.3), MU-β-D-cellobioside for cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91) and MU-N-acetyl-β-D-glucosaminide (MU-NAG) for chitinase. All chemicals were purchased from Sigma Aldrich SARL (Saint Quentin Fallavier, France). The experimental conditions for fluorescence assays, incubation buffers and substrates concentrations were the same as described previously (Lekounougou et al, 2007). Briefly, 50 µl of samples were mixed with 50 µl substrate solution, and 50 µl incubation buffer according to Courty et al., 2005. Incubation occurred in black 96-well microtitration plates for 1 hour, fluorescence emission being recorded every 5 min on a Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Varian, Mulgrave, Australia) with an excitation wavelength of 360 nm and an emission wavelength of 450 nm.

ABTS oxidizing activities

Colonized wood blocks were removed carefully from agar plates and mycelium surrounding wood chips excised. The wood chips were then placed into a test tube containing 900 µl of 50 mM

phosphate buffer pH 6 and the mycelium separated from the wood before addition of 50 µl of 100 mM 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonat. In order to stay in substrates-saturated conditions, incubation times have been varied (typically from 10 min to 2 hours) in order to obtain a 420 nm OD around 0.5. The samples were then centrifuged (10 000 g during 5 min) before determination of the supernatant absorbance at 420 nm (ε_{420}=36 mM^{-1}. cm^{-1}).

Preparation of holocellulose and of heat treated holocellulose

Beech heartwood was grounded to fine sawdust. The sawdust, thus obtained, was washed in a Soxhlet extractor with a toluene/ethanol (2:1, v/v) mixture (6 hours), with ethanol (6 hours) and dried at 103°C for 48 hours before delignification. 500 mg of sawdust were placed in a 100 ml flask containing 30 ml of distilled water and heated at 75°C. Acetic acid (0.1 ml) and 15 % aqueous sodium chlorite (2 ml) were then added each hour for 7 hours. The mixture was filtered on a Büchner funnel and the residue washed with water, Soxhlet extracted for 2 hours with ethanol and dried at 103°C to a constant mass. Heat treatment of hollocellulose was performed under nitrogen at 240°C during 5h30 as described previously (Nguila Inari et al., 2007).

Cellulase and xylanase assays

Cellulase from *Trichoderma reesei* (ATCC 26921) and xylanase from *Thermomyces lanuginosus* (EC 253-439-7) were purchased from Sigma Aldrich SARL (Saint Quentin Fallavier, France). 50 mg of cellulase or 125 mg of xylanase were placed into test tubes containing 10 ml of 50 mM acetate buffer (pH = 5). Heat-treated or not holocellulose (230 mg) were added in each tube and the mixture incubated during 24 h or 72 h at 37°C for cellulase and xylanase respectively. The remaining holocellulose was separate from the hydrolysate by centrifugation (10, 000 g for 30 min). The residue was filtered, washed with distilled water, dried at 103°C and weighed. Weight loss due to enzyme activity was calculated according to the following formula:

$$WL\ (\%) = ((230 - m)/230)\ x100$$

Results and discussion

The mean percentage weight losses of heat-treated or not samples exposed to *T. versicolor* for different periods are given in figure 1.

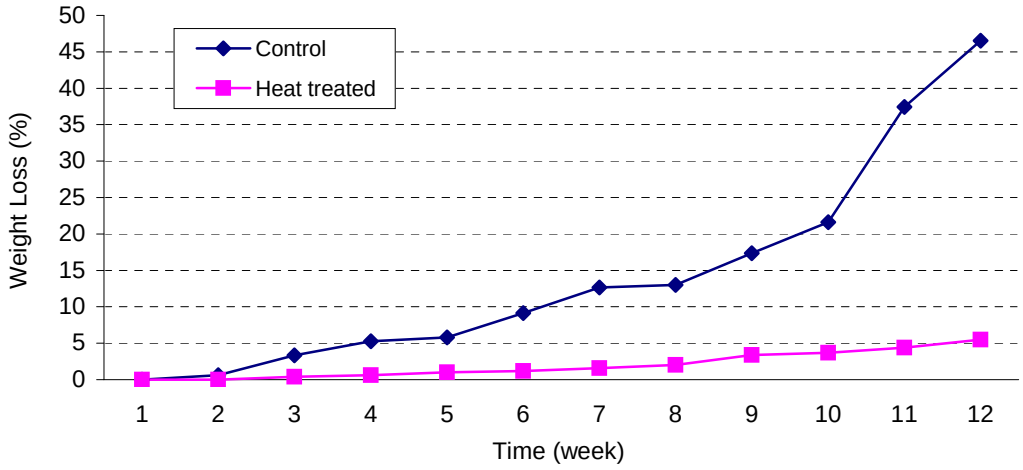


Figure 1. Weight losses of wood blocks exposed to *T. vesicolor*

After 90 days of incubation, wood weight losses of around 45% were measured for untreated samples confirming the virulence of *T. versicolor* under the tested conditions. In all cases, control samples were deeply colonized by the mycelium, while heat-treated samples are only slightly or not colonized. Weight losses recorded for heat-treated samples are low and consistent with values previously reported under similar conditions (Hakkou et al., 2005). Decaying process of untreated beech wood appears to proceed in two stages leading to different wood mass loss rates. During the first 10 incubation days, measured weight losses are to small to determine significant wood degradation. Between 10 to around 40 incubation days, the apparent decay rate appeared to be more or less constant and corresponded to a weight loss value of approximately 0.35 % per day. After 45 incubation days, this degradation rate increased to a value of 0.80 % per day. The ABTS oxidases production pattern during wood degradation by *T. versicolor* is showed in figure 2.

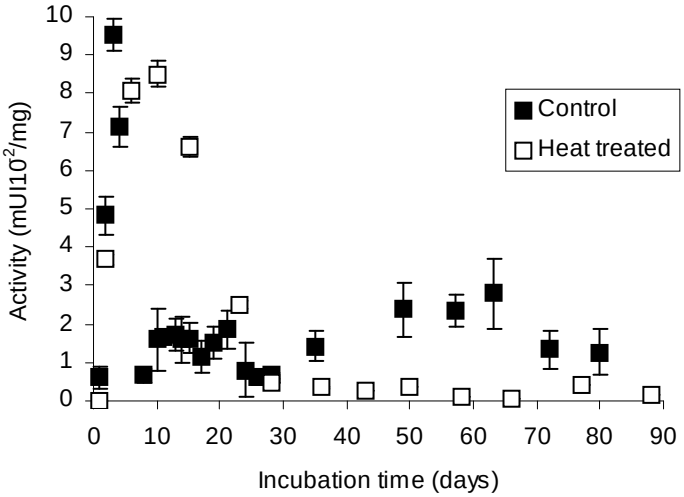


Figure 2. ABTS oxidizing activities during wood colonization by *T. versicolor*. Each point is the mean ± standard deviation of nine different experiments

Behaviour of ABTS oxidizing activities is different according to the wood substrate used. In the case of untreated samples, three stages could be observed during the whole process. In the first 10 incubation days, a strong activity was observed, reaching around 0.07 mUI/mg after 4 days. This activity has been previously associated with laccases productions, which are involved in wood extractives degradation (Lekounougou et al., 2007). In the second stage, comprised between 10 and around 30 incubation days, a second increase of the ABTS oxidizing activity has been detected. Nevertheless, the maximal value obtained during this stage remains largely smaller that one detected during the first part (around 0.02 mUI/mg). The third increase of activity started after around 45 days and seems to be correlated to the increase of wood degradation rate (see Fig. 1). The maximal value of activity detected during this phase was around 0.03 mUI/mg after 60 days before to decrease slightly. In the case of heat-treated samples, oxidizing activities were detected only during the 30 first days of incubation and are practically inexistent after this period. The maximal activity detected for heat-treated samples (0.08 mUI/mg) was similar to that detected in the first stage of control colonization. Carbohydrates hydrolytic activities have also been investigated using specific substrates for cellobiohydrolases, β-glucosidases responsible of cellulose degradation. Results are presented in figures 3 and 4.

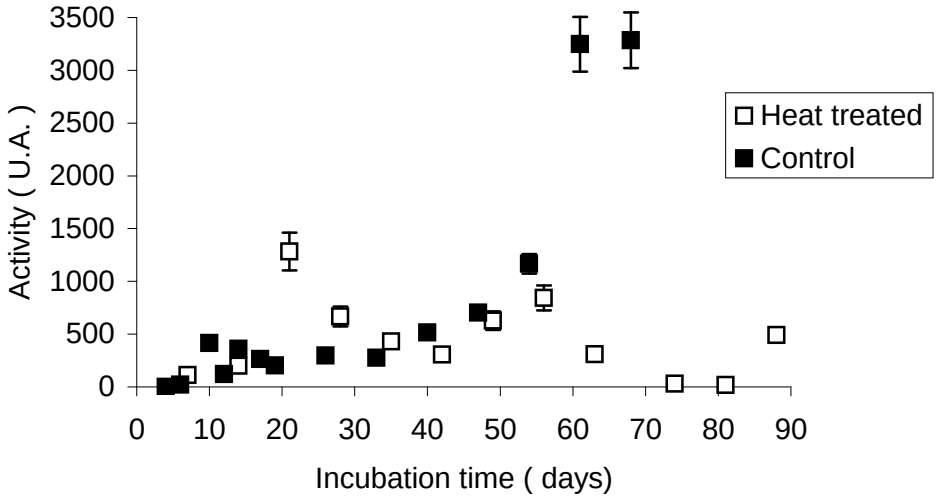


Figure 3. Glucosidase activities during wood colonization by *T. versicolor*. Each point is the mean ± standard deviation of nine different experiments

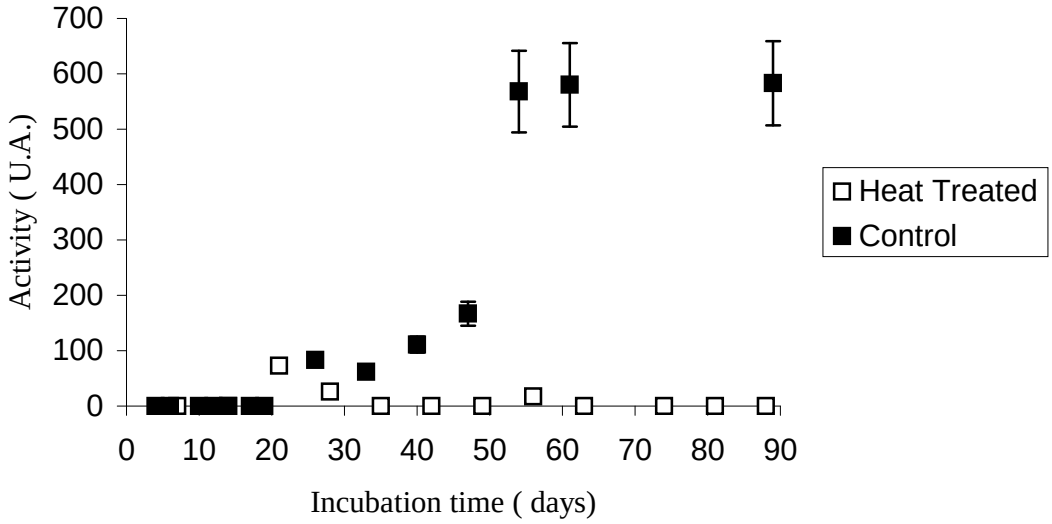


Figure 4. Cellobiohydrolase activities during wood colonization by *T. versicolor*. Each point is the mean ± standard deviation of nine different experiments

Similar patterns were observed for the two tested activities in the case of untreated beech blocks. A first stage of degradation, characterized by a relatively low and constant activity, was detected between 0 to 40 incubation days followed by a second stage corresponding to a strong increase of activity. However, even if *T. versicolor* is known to degrade simultaneously lignin and polysaccharides (Machuca and Ferraz, 2001), detection of enzymatic activities involved in degradation of these two components seems quite different. Contrary to peroxidases, carbohydrates degrading enzymes could not act *via* low molecular weight mediators, a previous lignin removal being necessary to permit these enzymes to diffuse into the cell walls (Cullen and Kersten, 2004; Machuca and Ferraz, 2001). This could explain the low level of cellulases and hemicellulases detected during the first stage of colonization. Another important point is that the fungal production of cellulases and hemicellulases has been shown to be tightly regulated depending of both presence of inducers and absence of easily available carbon source (Aro et al., 2005). Therefore, the increase of wood degradation rate observed after 40 incubation days could be also due to a depletion of easily assimilable malt-agar nutriments. This hypothesis is supported by the induction at the same time of chitinases activities, which could be involved in nutrients mobilization during the second part of the experiment (figure 5). Behaviour of heat-treated beech is completely different leading to the detection of very low levels of hydrolytic activities. Glucosidase activities detected in the presence of heat-treated beech wood are similar to that detected in the first stage of degradation of untreated wood and remains constant throughout the experiment, while practically no cellobiohydrolase activities were detected. Chitinase activities detected during degradation of heat-

treated wood are important in the first part of the experiment and decrease with time during the second part of this latter one.

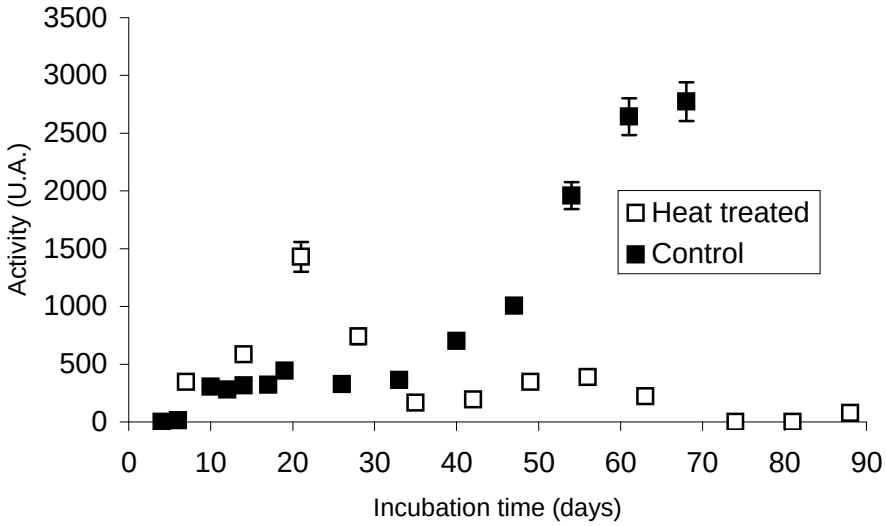


Figure 5. Chitinase activities during wood colonization by *T. versicolor*. Each point is the mean ± standard deviation of nine different experiments

All these results clearly demonstrated that the expression of enzymatic activities during wood decaying process by *T. versicolor* are strongly connected to the nature of wood blocks used. Heat treatment results in a noticeable decrease of carbohydrates hydrolytic activities like cellobiohydrolases and β-glucosidases, while ABTS oxidizing activities involved in lignin degradation seem less affected. These observations could be directly connected to the evolution of wood chemical composition during heat-treatment. Indeed, it is well established that heat treatment resulted in an important degradation of amorphous polysaccharides constitutive of the cell walls, while lignin and crystalline cellulose remain unaffected (Tjeerdsma et al. 1998; Sivonen et al. 2002; Wikberg and Maunu, 2004). These modifications have been reported to be at the origin of the changes of some macroscopic properties of the material. Dimensional stability and decay resistance increased, while strength of wood decreased (Santos, 2000; Alén et al., 2002; Kamdem et al., 2002; Pétrissans et al., 2003; Grosslink et al., 2004; Hakkou et al., 2005 and 2006; Yildiz et al., 2006). Different reasons have been proposed to explain improvement of wood durability to fungi:

- an increase of the hydrophobic character of wood limiting the sorption of water and consequently the development of fungi.
- generation of biocidal extractives during heat treatment which can act as fungicides.
- modification of the wood polymers leading to a non recognition of these latter by enzymes involved in fungal degradation and especially, degradation of amorphous polysaccharides, which constitute one of the main nutritive source for fungi.

According to the preceding results, it seems that the modification of wood polymers during heat treatment disturbs considerably enzymatic systems involved in wood biodegradation. These modifications are particularly obvious in the case of enzymes involved in polysaccharides degradation, while enzymes involved in lignin degradation seems less affected. However, the absence of enzymatic activities could also be associated to generation of fungicidal extractives during treatment. To confirm the effect of chemical modification on enzymatic activities, behaviour of holocellulose heat-treated or not has been investigated *in vitro* using commercially available cellulase and xylanase (figure 6).

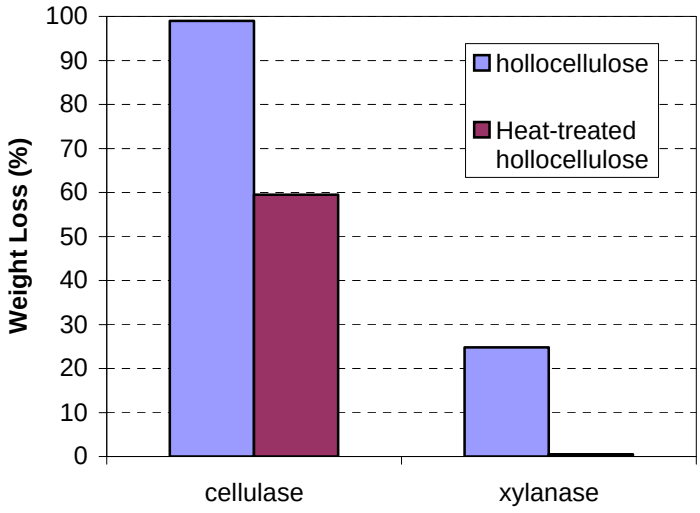


Figure 6. In vitro degradation of holocellulose by different commercially available enzymes

Results indicated that holocellulose was totally solubilized after 24 h incubation in the presence of cellulase, while heat-treated holocellulose was only partially solubilized in the same conditions. These results confirm that chemical modification of wood polysaccharides disturb enzymatic systems involved in wood degradation. Similar results were obtained with xylanases, which are able to partially degrade holocellulose, while heat treated holocellulose remains unaffected under the same conditions.

Conclusion

Expression of extracellular enzymatic activities has been studied during wood degradation by *T. versicolor* using either heat treated or untreated beech blocks. Oxidases production pattern indicate a strong activity in both cases at the beginning of wood colonization. This increase is associated with laccases productions, which are involved in extractives degradation. After this first stage,

oxidases production is less important in the case of untreated beech blocks and decrease significantly in the case of heat-treated beech blocks. Carbohydrates hydrolytic activities (cellobiohydrolases and β-glucosidases) have been detected mainly in the case of untreated beech blocks, with a strong increase of activities after about 40 days of incubation. This increase of carbohydrates hydrolysing activities is correlated with the increase of wood weight losses as well as with increase of chitinases activities involved in nutrients mobilization. Additional experiments performed on heat-treated or not holocellulose subjected to commercially available cellulases or xylanases indicated that heat-treated holocellulose is less susceptible to enzymatic hydrolysis than untreated holocellulose. All these data suggest that chemical modifications resulting from heat treatment disturb enzymatic systems involved in wood degradation by *T. versicolor* and could be at the origin of the improvement of durability observed for heat-treated wood. These observations are also in good agreement with the fact improvement of wood durability can be achieved only if a sufficient level of chemical modification has been reached.

References

Alén R., Kotilainen R. and Zaman A. (2002). Thermochemical behaviour of Norway spruce (Picea abies) at 180-225°C. *Wood Sci. Technol.* 36: 163-171.

Aro, N., Pakula, T., and Penttilä, M. (2005) Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbio.l Rev.* 29: 719-739.

Boonstra M J, Pizzi A, Rigolet S. (2006). Correlation of ^{13}C-NMR analysis with fungal decay tests of polymeric structural wood constituents.I. basidiomycetes. *J. Appl. Polym. Sci.*101: 2639-2649.

Courty, P.E., Pritsch, K., Schloter, M., Hartmann, A., Garbaye, J., (2005). Activity profiling of ectomycorrhiza communities in two forest soils using multiple enzymatic tests. *New Phytologist* 167: 309-319.

Cullen D., Kersten P. J. (2004). Enzymology and molecular biology of lignin degradation. *Bioch. Mol. Biol*. 2: 249-263.

Grosselink R.J.A., Krosse A.M., van der Putten J.C., van der Kolk J.C., de Klerk-Engels B., van Dam J.E.G. (2004). Wood preservation by low-temperature carbonisation. Industrial Crops and Products.19: 3-12.

Hakkou M, Pétrissans M., Zoulalian A, Gérardin P. (2005). Investigation of wood wettability changes during heat treatment on the basis of chemical analysis. *Polym. Degrad. Stab*. 89: 1-5.

Hakkou M., Pétrissans M., Gérardin P., Zoulalian A. (2006). Investigations of the reasons for fungal durability of heat-treated beech wood. Polym. Degrad. Stab. 9: 393-399.

Nguila Inari G., Mounguengui S., Dumarçay S., Petrissans M., Gérardin P. (2007). Evidence of char formation during heat treatment by mild pyrolysis. *Polym. Degrad. Stab. 92: 997-1002.*

Kamdem DP, Pizzi A, Jermannaud A. (2002). Durability of heat-treated wood. Holz Roh- Werkst. 60:1-6.

Lekounougou S., Mounguengui S., Dumarçay S., Rose C., Courty P. E., Garbaye J., Gérardin P., Jacquot J.P., Gelhaye E. (2007). Initial stages of *Fagus sylvatica* wood colonization by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*: Enzymatic characterization. *Int. Biodeter. Biodegrad.* (In press).

Machuca A, Ferraz A (2001). Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium. *Enz. Microbial.Technol.* 29: 386-391.

Militz H (2002) Thermal treatment of wood: European processes and their background. The International Research Group on Wood Preservation. Document No IRG/WP 02-40241.

Sivonen H, Maunu SL, Sundholm F, Jämsä S, Viitaniemi P. (2002). Magnetic resonance studies of thermally modified wood. *Holzforschung*. 56:648-654.

Patzelt M, Stingl R, Teischinger A (2002) Termische Modifikation von Holz und deren Einfluβ auf ausgewählte Holzeigenschaften. In Modifiziertes Holz Eigenschaften und Märkte, Lignovisionen Band 3, ISSN 1681-2808, 101-49.

Pétrissans M, Gérardin P, Elbakali D, Serraj M. (2003).Wettability of heat-treated wood. *Holzforschung.* 57:301-307.

Santos J.A. (2000). Mechanical behaviour of Eucalyptus wood modified by heat. *Wood Sci. Technol.* 34:39-43.

Tjeerdsma BF, Boonstra M, Pizzi A, Tekely P, Militz H. (1998) Characterisation of thermally modified wood: molecular reasons for wood performance improvement. *Holz Roh- Werkst.* 56:149-153.

Weiland J.J. and Guyonnet R. (2003). Study of chemical modifications and fungi degradation of thermally modified wood using DRIFT spectroscopy. *Holz Roh- Werkst.* 61: 216-220.

Wikberg H, Maunu SL. (2004). Characterization of thermally modified hard- and softwoods by CP/MAS ^{13}C NMR. *Carbohydrate Polymers*. 58:461-466.

Yildiz S, Gezer ED, Yildiz UC. (2006). Mechanical and chemical behaviour of spruce wood modified by heat. *Building and Environment*. 41:1762-1766.

4.5.3. Conclusion

L'utilisation des méthodes mises au point pour suivre l'expression des activités enzymatiques lors de la colonisation et de la dégradation du bois de hêtre par *T. versicolor* ont pu être transposées avec succés au cas du bois de hêtre traité thermiquement. Les résultats obtenus indiquent un comportement totalement différent entre les deux substrats. Les essais réalisés in vivo mettent en évidence de faibles activités cellobiohydrolase and β-glucosidase impliquées dans la dégradation des polysaccharides dans le cas du bois traité thermiquement, alors que ces mêmes activités sont importantes dans le cas du bois témoin. Le comportement des activités ABTS oxydases impliquées dans la dégradation des extractibles et de la lignine semble moins sensible au traitement thermique, même si une diminution d'activité et là aussi également observée.

L'utilisation de cellulases et xylanases commerciales, utilisées pour dépolymériser de l'holocellulose traitée thermiquement ou non, a permis de mettre en évidence in vitro les mêmes phénomènes.

Ces différents résultats mettent en évidence que les modifications chimiques intervenant lors du traitement thermique du bois impliquant principalement les polysaccharides jouent un rôle prépondérant sur l'expression des activités enzymatiques utilisée par *T. versicolor* lors de la dégradation du bois expliquant ainsi l'augmentation de durabilité du bois traité thermiquement.

DISCUSSION GENERALE

5. Discussion générale

Vers un modèle d'étude de la dégradation du bois

Ce travail avait pour objectif principal d'étudier les processus fongiques impliqués dans la dégradation du matériau bois. Dans ce contexte, nous avons suivi la colonisation et la dégradation du bois de hêtre par le champignon de pourriture blanche *Trametes versicolor* en culture solide sur milieu malt-agar (publication n°1). Dans ces conditions expérimentales, un processus biphasique a pu être mis en évidence, montrant que la dégradation de la lignine semblait être découplée de la dégradation des polysaccharides, impliquant une régulation différente des activités oxidatives (peroxydases et laccases) et hydrolytiques (cellulases et hémicellulases). Deux hypothèses majeures peuvent expliquer le phénomène observé (i) l'action des cellulases et hémicellulases nécessiterait une « pré-dégradation » permettant aux enzymes d'accéder à leurs substrats, (ii) la présence de malt-agar réprimerait la synthèse des enzymes hydrolytiques. En effet, ces résultats confirment bien le phénomène de répression catabolique qui est un mécanisme contrôlant l'utilisation préférentielle d'une source de carbone facilement métabolisable comme le glucose, le xylose, le maltose… (Stapleton et al. 2003 ; Aro et al. 2005). Ce phénomène a été largement étudié chez plusieurs champignons notamment *Saccharomyces cerevisiae, Trichoderma reesei*, *Aspergillus nidulans* et *Aspergilus niger* (Mach et al. 1996 ; Flipphi et al. 2003 Gancedo, 1998). Des études réalisées sur *T. versicolor* par Stapleton et al (2003) montrent que la production de cellobiose déshydrogénase est réprimée lorsque des sources de carbone supplémentaires comme le glucose, le maltose, le galactose, l'arabinose et le xylose sont ajoutées aux cultures fongiques se développant sur la cellulose. Dans le cas de notre étude, le champignon dégraderait dans un premier temps les nutriments présents dans le milieu malt agar expliquant l'absence d'activités hydrolytiques durant les premières phases de dégradation. Ainsi, la dégradation des polysaccharides est corrélée à une induction d'activités hydrolysant les carbohydrates. Contrairement aux peroxydases, les enzymes dégradant les polysaccharides n'agissent pas via les médiateurs de faibles poids moléculaires. Pour diffuser dans les parois cellulaires, il est nécessaire d'enlever la lignine un polymère qui protège les hémicelluloses et la cellulose (Cullen and Kersten, 2004 ; Machuca and Ferraz, 2001). Ces données expliquent le faible taux d'activités cellulases et hémicellulases détecté pendant les premiers jours du processus de colonisation du bois. L'augmentation de la dégradation des polysaccharides est observée après 40 jours d'incubation en présence de *T. versicolor* due probablement à une délétion des nutriments présents dans le milieu malt agar. Cette hypothèse est confirmée par les mesures d'induction des activités phosphatases, chitinases et leucine peptidases impliquées dans la mobilisation de l'azote et du phosphore. L'induction de ces activités est en accord avec une absence

des nutriments facilement disponible observé dans la seconde phase de notre expérience. Certains auteurs ont montré que les enzymes telles que les peroxydases et des laccases ne peuvent pas pénétrer dans les parois cellulaires du bois du fait de leur taille (Daniel et al. 1989 ; Blanchette et al. 1997) dans les stades initiaux du processus de dégradation du matériau. Il existe des agents de faible poids moléculaires qui agissent dans des stades précoces de la colonisation et initient la dégradation du bois (Goodell et al. 1997).

Une poursuite de ces travaux passe par l'utilisation de milieux de culture définis permettant ainsi de discriminer entre ces deux hypothèses. Dans cette optique, nous avons réalisé des expériences préliminaires, non présentées dans ce manuscrit, utilisant des cultures solides sur bois en présence uniquement d'agar. Les résultats obtenus restent difficiles à interpréter du fait de la faible dégradation observée (après trois mois) et du faible niveau d'activités détectées. Les résultats obtenus sur la dégradation de la lignine montrent une évolution constante de ce polymère tout le long du processus de dégradation. Par contre, le taux de dégradation des polysaccharides n'est pas constant, il est corrélé à la perte de masse des éprouvettes de bois. A cet effet, au début du processus de colonisation du bois, la perte de masse est relativement faible ainsi que la dégradation des carbohydrates. Les analyses du rapport glucose/xylose ont été réalisées après une hydrolyse acide des éprouvettes de bois dégradées par *T. versicolor*. Les résultats obtenus indiquent un taux constant du rapport glucose/xylose (1.8) suggérant que les hémicelluloses et la cellulose étaient simultanément dégradées (données non montrées). De plus, les travaux réalisés en utilisant la méthode de spectroscopie infra rouge (IFR) ont permis de suivre l'altération chimique du hêtre Fagus sylvatica par *T. versicolor*. Les spectres obtenus après 4, 10 et 12 semaines d'incubation en présence du champignon sont identique que ceux du bois témoin non exposé à *T. versicolor*. Ces résultats confirment bien que le champignon *T. versicolor* dégrade simultanément les carbohydrates dans nos conditions expérimentales (données non présentées) (Mohebby, 2003). L'ensemble de ces résultats conforte les données obtenues par Pandey and Pitman (2003) qui ont montré une dégradation simultanée de la lignine et des polysaccharides.

Chez *T. versicolor*, de nombreux gènes impliqués dans la dégradation de la lignine (4 isoformes de laccases, 5 isoformes de lignine peroxydases et 3 isoformes de manganèse peroxydases) et des polysaccharides ont été caractérisés permettant donc une approche RT-PCR (Johansson and Nyman, 1996 ; Eriksson et al. 1990 **;** Kirk and Cullen, 1998 ; Johnson and Nyman, 1995 Necochea et al. 2005). Au cours de notre étude, nous avons caractérisé le stade initial du processus de colonisation du bois, et montré l'implication des laccases dans la dégradation des extraits. Néanmoins, les premiers tests effectués sur le suivi de l'expression des différents gènes codant pour des laccases par RTPCR ont été infructueux (Données non présentées). Cette méthode, appliquée

par Jasalavich et al (2000), a permis de détecter des champignons de pourritures brune et blanche à différents stades de dégradation. Cette étude leur a permis de démontrer qu'il était possible de détecter la présence de champignons sur le bois, grâce à l'utilisation de primers universels et/ou spécifiques des basidiomycètes dérivés des séquences d'ADN ribosomales, avant qu'une perte de masse mesurable puisse être détectée.

Au cours de nos travaux, nous avons également montré la présence d'activités manganèse peroxydases qui interviennent aux alentours du onzième jour du processus de colonisation du bois. Ces activités sont impliquées dans la dégradation de la lignine et sont présent chez d'autres champignons de pourriture blanche (Pointing, 2001; Martinez, 2002). Par contre, nous n'avons pas détecté la présence d'activités lignine peroxydases qui jouent aussi un rôle déterminant dans la dégradation de la lignine chez les champignons de pourriture blanche. Sûrement la méthode utilisée n'était pas très sensible pour révéler ce type d'activités dans nos conditions expérimentales, ou encore l'extraction effectuée au cours de ces tests n'était pas suffisante pour révéler ces activités. Nous avons également tenté de détecter la présence du champignon dans le bois en suivant le taux du phosphore et du manganèse par microscopie électronique à balayage. Les résultats obtenus n'étaient pas satisfaisant dus probablement à un problème de sensibilité de l'appareil utilisé.

Vers le développement de « biosenseurs »

La dégradation du bois reste un problème majeur lié à son utilisation comme matériau. Dans une optique de limitation des coûts engendrés par les attaques biotiques, il semble important de développer des méthodes permettant de détecter précocement la présence des champignons ligninolytiques notamment avant toute modification importante des propriétés physiques et surtout de résistance du bois. Parmi les techniques expérimentées, on peut citer :

- l'isolement et la mise en culture des champignons (Martinez et al., 2005 ; Mohebby 2005 ; Jasalavich et al., 2000)

- l'extraction et les dosages de la chitine et de l'ergostérol (Nilsson and Bjurman, 1990 ; Pasanen et al. 1999 ; Eikenes et al., 2005)

- les techniques d'immuno-détection (ELISA) (Jellison and Goodel, 1988 ; Clausen et al. 1991 ; Clausen, 1997)

- l'utilisation de la PCR quantitative (avec des primers synthétisés à partir des séquences conservées des ADNr) (Adair et al, 2002 ; Stapleton et al., 2003 ; Zaremski et al., 2005).

Néanmoins, ces méthodes restent difficiles à mettre en œuvre et d'une manière générale non corrélées au taux de dégradation du matériau (Eikenes et al. 2005).

Au cours de cette étude, nous avons pu mettre en évidence que la vitesse de dégradation du matériau bois dans les conditions de culture testées n'est pas corrélée directement à la colonisation par le champignon. De même, le dosage des activités impliquées dans la dégradation des polysaccharides et de la lignine n'est pas quantitativement relié au taux de la dégradation du matériau.

Dans l'objectif permettant de mettre en place une méthode de détection rapide de la dégradation du bois par le champignon *T. versicolor*, il est difficile d'envisager une méthode directe. Car, les activités hydrolytiques obtenues au cours de nos résultats, ne nous permettent pas de conclure sur la détection précoce de la dégradation, elles débutent après une longue période de colonisation du bois (40 jours), et dans cette zone la perte de masse du bois est déjà importante. Au vu des résultats obtenus au cours de nos travaux, il semble que la détection qualitative de *Trametes versicolor* au cours du stade initial de la dégradation pourrait être obtenue par la mesure des activités ABTS oxydases. En effet, la présence de ces activités semble être liée à la présence de bois ou de ses constituants (publication n° 2), que celui-ci soit traité par un biocide (publication n° 3) ou thermiquement (publication n°5). Dans les résultats obtenus, la présence des activités ABTS oxydases est révélée sur bois normal, soit sur bois traité (par un biocide ou thermiquement) en présence du champignon. Des tests complémentaires ont été réalisés sur bois en absence du champignon (résultats non présentés dans ce manuscrit) pour voir si la présence d'activité ABTS oxydases était induite par une dégradation abiotique (lumière) du bois, les résultats obtenus n'ont rien révélé. Ce qui montre que ces activités sont produites en présence du champignon.

La technique utilisée pour la détection des ces activités est relativement simple à mettre en œuvre, et suffisamment sensible pour permettre une détection précoce après 2 à 10 jours de colonisation avant toute détection visuelle de la présence du champignon. Néanmoins, la présence des activités ABTS oxydases ne rend pas compte de la dégradation ultérieure du matériau. En effet, sur bois rétifié, ces activités sont détectées bien que le matériau soit très faiblement dégradé par le champignon. L'utilisation de tels biosenseurs ne peut donc être envisagée qu'en termes de kit de diagnostic démontrant la présence ou non de champignons ligninolytiques et suggérant un traitement du matériau, même si ce dernier ne s'impose pas forcément.

Vers la recherche de nouveaux agents de préservation

Le but de cette étude était également d'avoir une meilleure connaissance des différents systèmes enzymatiques des champignons lignivores impliqués dans la dégradation du bois, pour mettre au point des formulations de préservation plus respectueuses de l'environnement. A cet effet, Pendant plusieurs années les produits tels que le pentachlorophénol, les sels métalliques

(CCA) ont été utilisés pour protéger le bois contre la dégradation provoquée par les champignons. Toutefois, la toxicité de ces produits a conduit certains pays à interdire partiellement, voir totalement leur utilisation. Durant ces dernières années, des tests ont en effet été effectués dans le but de développer de nouveaux produits de préservation respectueux de l'environnement. Ces formulations étaient basées sur l'association de différentes molécules agissant de concert sur les champignons dégradant le bois. Le but de ce type d'approche est d'augmenter l'efficacité des biocides organiques conventionnels en ajoutant des composés moins toxiques comme la caféine et en diminuant la quantité de biocides utilisée. Dans cet ordre, les études réalisées par Schultz et al montraient une combinaison d'un antioxydant, l' hydroxytoluène (BHT) agissant en synergie avec une variété de biocides (Schultz and Nicholas, 2002 ; Schultz et al. 2005). Récemment, Mabicka et al. (2005) montraient également une synergie entre l'antioxydant l'irganox 1076 et la 2-hydroxypirydine-N-oxide sur le champignon de pourriture blanche *T. versicolor*.

Au cours de nos travaux (publication n°2), nous avons pu montrer que l'utilisation du propiconazole avait un effet sur la paroi cellulaire du champignon. En effet, le traitement des éprouvettes de hêtre par de faibles concentrations de biocide provoque une diminution de la perte de masse en accord avec la phase de latence observée au début du processus de colonisation du bois par le champignon *T. versicolor*. Ainsi, la production des enzymes impliquées dans la dégradation des polysaccharides, de l'azote et du phosphate était faiblement altérée par la présence du biocide. Par contre, la présence du propiconazole entraîne une forte induction d'activités chitinases au début du processus de colonisation du bois. Ce phénomène s'explique par le fait que la modification de la paroi cellulaire du champignon induit par le biocide nécessite une augmentation de la quantité de chitine. A cet effet, les triazols (propiconazole…) sont des inhibiteurs des enzymes impliquées dans la synthèse des stérols entrainant une perturbation dans l'organisation de la paroi cellulaire. Chez les champignons, le traitement aux triazols conduit à une réponse cellulaire à la survie de la cellule, ce phénomène est appelé mécanisme compensatoire. Cette réponse illustre clairement la nature dynamique de la paroi cellulaire caractérisée par une augmentation de la teneur en chitine (Kauffman, 2006). Le changement de la composition de la paroi cellulaire a déjà été montré chez *S. cerevisiae* (Kauffman, 2006). Les résultats remarquables obtenus sur l'expression des chitinases en présence de propiconazole nous ont conduits à nous interroger sur le fonctionnement de la combinaison entre les inhibiteurs de chitinases, et le propiconazole sur la croissance du champignon *T. versicolor*. Dans la littérature trois dérivées de xanthine ont récemment été identifiés comme les inhibiteurs de 18 familles de chitinases des bactéries et des champignons, il s'agit de la théophylline, la caféine et la pentoxifylline (Rao et al. 2005 ; Schüttelkopf et al. 2006). Nous avons ainsi choisi de tester l'effet de la caféine associée au biocide sur la croissance des champignons de pourriture. La caféine est un analogue de substrat à base de purine, inhibant de manière compétitive

les chitinases, il est relativement moins couteaux, et on peut se le procurer facilement. C'est également une drogue à effets multiples qui affecte une variété de processus cellulaires et qui provoque notamment des altérations de la paroi fongique (Jacoby et al. 1998 ; Martin et al. 2000 ; Park et al. 2005 ; Kuranda et al. 2006). Chez la levure, la caféine est responsable d'une forte modification de l'architecture de la paroi, conduisant à une augmentation de la teneur en chitine. Les résultats obtenus montrent un effet additif sur la croissance et le développement du champignon. Cette méthode pourrait permettre de réduire les concentrations de triazoles en utilisant des composés tels que la caféine qui est moins toxique que les biocides dans les nouvelles formulations de préservation du bois répondant aux normes environnementales.

Vers une explication de l'augmentation de durabilité du bois traité thermiquement

Le traitement thermique du bois est une alternative aux méthodes de préservation classique du bois. Cette technologie implique le chauffage du bois en l'absence d'oxygène dans une gamme de températures comprises entre 160 et 280 °C. Le traitement peut être réalisé dans une ambiance gazeuse pauvre en oxygène (azote, fumée), dans une phase aqueuse ou bien par immersion dans une huile chaude. Des modifications chimiques confèrent au matériau une meilleure stabilité dimensionnelle et une meilleure durabilité face aux champignons de pourriture (Guyonnet et Bourgois, 1986 ; Kamdem et al. 2000). La durabilité du matériau bois peut-être définie par son aptitude à résister aux attaques fongiques et/ou d'insectes comme les termites. L'utilisation des tests enzymatiques mis au point pour détecter et suivre la colonisation et la dégradation du bois par *T. versicolor* a été mis à profit pour suivre l'évolution des activités enzymatiques sur du bois traité thermiquement. L'objectif de ces tests était d'appliquer les méthodes enzymatiques sur le bois traité thermiquement à fin de vérifier la modification chimique des polymères du bois et apporter les réponses sur l'augmentation de la durabilité du bois traité thermiquement. A cet effet, les raisons moléculaires de l'amélioration de la durabilité du bois traité thermiquement ont déjà été en partie abordées dans la thèse de Mohamed Hakkou (Hakkou, 2006). Dans son travail, quatre hypothèses résultant de l'analyse bibliographique existant dans le domaine avaient été en partie mise en avant pour expliquer l'accroissement de la durabilité :

- l'augmentation du caractère hydrophobe du bois, limitant le transport capillaire de l'eau dans le matériau et limitant ainsi la croissance du champignon par manque d'eau,
- la génération, durant le traitement, de molécules de type extractibles ayant un caractère toxique empêchant le champignon de se développer,
- la modification de la structure des polymères du bois bloquant ainsi les systèmes enzymatiques de dégradation du champignon incapable de reconnaitre plus le substrat à dégrader,

- la forte dégradation thermique des hémicelluloses faisant disparaître le principal nutriment du champignon et empêchant ainsi son développement.

Ces résultats ont montrés que la modification du caractère hydrophobe du bois et la génération des extractibles pouvant joués le rôle de biocide avaient un effet très limité sur l'augmentation de la durabilité du bois traité thermiquement. C'est dans ce contexte que nous avons regardé dans ce travail l'hypothèse sur la modification chimique des polymères du bois pour tenter d'apporter des éléments nouveaux sur l'amélioration de la durabilité du bois thermiquement traité.

L'expression des différentes activités enzymatiques sur substrat traité thermiquement ou non dépend du type d'activité pris en compte et du temps d'incubation au bout du quel l'activité est mesurée. Dans tous les cas, de fortes activités ABTS oxydases sont détectées dans les stades initiaux de la colonisation du bois, alors que ces dernières deviennent beaucoup moins importantes dans le cas des substrats traités thermiquement comparativement aux substrats non traités pour des durées d'incubation plus longues. L'expression des activités cellulolytiques est quant à elle pratiquement inexistante dans le cas des substrats traités thermiquement et ceci quel que soit le moment de détection, alors que ces dernières sont plus ou moins importantes dans le cas du bois témoin.

L'étude in vitro de ces activités réalisée en utilisant de l'holocellulose traitée thermiquement ou non et une cellulase ou une xylanase commerciales a permis de mettre en évidence une susceptibilité plus importante de l'holocellulose non traitée comparativement à son homologue traitée thermiquement. Ces résultats suggèrent que les modifications chimiques consécutives au traitement thermique perturbent l'expression des activités enzymatiques impliquées dans la dégradation des polysaccharides du bois pouvant ainsi expliquer en partie l'augmentation de la durabilité du bois.

Ces résultats ouvrent un champ d'investigation particulièrement intéressant pour mieux cerner et comprendre les raisons de l'augmentation de la durabilité du bois traité thermiquement qui connaît à l'heure actuelle un essor très important.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

6. Conclusions et Perspectives

L'un des objectifs de ce travail était de mettre au point des méthodes de détection précoce de la dégradation du bois par les champignons de pourriture blanche. Dans les résultats obtenus, nous avons montré que les activités hydrolytiques étaient révélées à partir du quarantième jour. Ces activités ne peuvent pas servir d'indicateurs de la dégradation, car dans cette période la perte de masse est déjà décelable. Par contre, les activités ABTS oxydases sont détectées dans le stade initial du processus de dégradation du bois (10 premiers jours), ces activités peuvent servir de kit de diagnostic pour indiquer la présence du champignon à la surface du bois. Néanmoins, la présence de ces activités ne rend pas compte de la dégradation ultérieure du matériau. Elle nous indique simplement la présence du champignon sur notre échantillon. Des études complémentaires sont nécessaires, notamment sur la caractérisation de gènes de laccases par des études RT-PCR, afin de valider cette approche à d'autres champignons modèles et de déterminer notamment les seuils de détection. Le modèle de dégradation de la lignine pourrait servir de bon indicateur de la dégradation du bois par le champignon *T. versicolor*, car les résultats obtenus montrent que la vitesse de dégradation de la lignine se déroule de manière constante au cours du temps. Il serait intéressant de regarder plus en détail la dégradation de ce polymère en travaillant avec des substrats analogues de la lignine pour tenter de la corréler au taux de dégradation.

Le choix du couple *Trametes versicolor*/hêtre s'est imposé au début de nos travaux compte tenu que nous souhaitions rester dans un modèle expérimental proche de la norme EN113 utilisée dans le cadre de la préservation du bois. Une continuité de ces travaux peut également passer par l'utilisation d'autres espèces de bois pour appréhender l'influence de la nature de l'essence sur le processus de dégradation. En ce qui concerne le choix du champignon, la question se pose quant à la poursuite de ces travaux avec *T. versicolor*. En effet, le séquençage récent du génome de *P. chrysosporium* (Martinez, 2002) permet d'accéder à la totalité des gènes potentiellement impliqués dans la dégradation du bois et donc à une approche globale de la régulation de ces gènes. Il faut noter également que *P. chrysosporium* ne possède pas de laccases et il serait intéressant de savoir comment ce champignon dégrade aussi « les extraits » et quels processus chimiques et/ou enzymatiques sont impliqués par comparaison à ceux employés par *T. versicolor*. De même, la mise à disposition du génome de *Poria placenta*, une pourriture brune, par le DOE joint génome insitut (http://genome.jgi-psf.org/Pospl1/Pospl1.home.html), laisse entrevoir la possibilité de comparer les mécanismes mis en jeu par ce type de basidiomycètes avec ceux développés par les pourritures blanches. Toutefois, il serait nécessaire d'envisager une suite de ces travaux en s'intéressant à l'étude de la régulation de la transcription de gènes de *T. versicolor* en effectuant les tests de RT-PCR qui semble une méthode plus sensible à une détection précoce de la dégradation du bois en se

focalisant dans les dix premiers jours du processus de colonisation. Cette démarche pourrait permettre éventuellement de définir le rôle des différentes enzymes dans ces processus. Ceci semble particulièrement judicieux pour étudier le rôle des différentes laccases trouvées chez *T. versicolor*. En effet, nous avons mis en évidence que les laccases étaient impliquées dans la dégradation des extraits, mais également présentes tout au long du processus de dégradation. L'étude de la régulation de la transcription de ces gènes permettrait éventuellement d'observer des spécificités potentielles de ces enzymes. De même, les études du génie génétique pourraient aussi être envisagées pour isoler les gènes responsables de la duraménisation et de la production de substances protégeant le bois des agresseurs biologiques avec comme objectif final la sélection des espèces plus résistantes. Il semble donc que la continuité de ces travaux passe par une étude de la régulation transcriptionnelle des gènes impliqués. Nos travaux ont en effet posé les bases techniques et méthodologiques pour étudier de manière plus approfondie ces processus de dégradation.

L'autre objectif de ce travail visait à mettre au point des nouvelles perspectives de produits de préservation plus respectueux de l'environnement. Dans cette optique, les résultats intéressant obtenus sur l'expression des chitinases en présence de propiconazole nous ont conduits à utiliser la combinaison entre un inhibiteur de chitinases tel que la caféine et le propiconazole sur la croissance du champignon *T. versicolor*. Les résultats obtenus montrent un effet additif de ces deux produits sur la dégradation du bois par le champignon. Cette méthode pourrait permettre de réduire les concentrations de biocides en utilisant des composés tels que la caféine qui est moins toxique que les triazoles dans les nouvelles formulations de préservation du bois répondant aux normes environnementales. Avant de confirmer ces résultats, il serait intéressant de regarder dans un premier temps le mode d'action de la caféine qui est une drogue pléiotropique affectant une variété de processus cellulaires, mais aussi d'effectuer les tests de lessivage en laboratoire pour vérifier la capacité de rétention de ce produit dans les parois cellulaires du bois.

Les résultats obtenus sur l'expression des activités enzymatiques ont été appliqués dans le cas du bois traité thermiquement afin de vérifier l'effet de la modification chimique des polymères du bois suite au traitement et apporter les réponses sur l'augmentation de la durabilité du bois traité thermiquement. Nous avons obtenu des résultats intéressants, notamment avec les activités hydrolytiques qui sont pratiquement inexistantes sur le bois traité thermiquement comparativement au bois non traité où ces activités sont révélées à partir de quarante jours. Ces données confirment l'influence des modifications chimiques consécutives au traitement thermique sur l'amélioration de la durabilité du bois. Ces modifications, capables de perturber l'expression des activités enzymatiques impliquées dans la dégradation des polysaccharides du bois, expliqueraient en partie l'augmentation de la durabilité du bois traité thermiquement.

BIBLIOGRAPHIE

7. Bibliographie

Adair S., Kim S.H., and Breuil C. (2002). A molecular approach for early monitoring of decay basidiomycetes in wood chips. FEMS. Microbiol. Lett. 211: 117-122.

Adams J.D. (2004). Fungal cell wall chitinases and glucanases. Microbiol. 150: 2029-2035.

Ademark P., de Vries R.P., Hagglund P., Stalbrand H. and Visser J. (2001). Cloning and characterization of *Aspergillus niger* genes encoding an α-galactosidase and a β-mannosidase involved in galactomannan degradation. Eur. J. Biochem. 268: 2982-2990.

Alic M., Akileswaran L. and Gold M.H. (1997). Characterization of the gene encoding manganese peroxidase isozyme 3 from *Phanerochaete chrysosporium*. Biochim. Biophys. Acta. 1338: 1-7.

Anagost S.E. (1998). Light microscopic diagnosis of wood decay. IAWA J. 19: 141-167.

Aro N., Pakula T. and Penttilä M. (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. FEMS. Microbiol. Rev. 29: 719-739.

Asada Y., Ichizaki M., Watanabe A., Kuwahara M. (1995). Production, purification, and characterization of alcohol oxidase of a lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. Kagawa Daigaku Nogakubu Gakujutsu Hokoku 47: 61-70.

Ayers A.R., Ayers S. and Eriksson K.E. (1978). Cellobiose oxidase, purification and partial characterization of a hermoprotein from *Sporotrichum pulverulentum*. Eur. J. Biochem. 90: 171-181.

Bauch J., Schmidt O., Hillis W.E. and Yazaki Y. (1977). Deposits in the heartshakes of dacrydium species and their toxicity against fungi and bacteria. Holzforsch. 31: 1-7.

Biely P. and Tenkanen M. (1998). In *Trichoderma* and *Gliocladium*: enzymes, biological control and commercial applications. (Harman A. E and Kubicek C. P eds) 2: 25-47.

Bisaria V.S. and Mishra S. (1989). Regulatory aspects of cellulase biosynthesis and secretion. CRC crit. Rev. Biotechnol. 9: 61-103.

Bjurman J. and Wadsö L. (2000). Microcalometric measurements of metabolic activity of six decay fungi on spruce wood as a function of temperature. Mycol. 92: 23-28.

Blanchette R., Krueger E., Haight J., Aktar M., Akin D. (1997). Cell wall alterations in lobolly pine wood decayed by the white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. J. Biotechnol. 53: 203-213.

Bollag J.M. and Leonowicz A. (1984). Comparative studies of extracellular fungal laccases. Appl.Environ. Microbiol. 48: 849-854

Bowman S.M. and Free S.J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. BioEssays 28: 799-808.

Brock B.J. and Gold M.H. (1996). 1,4-benzoquinone reductase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* : Spectral and kinetic analysis. Arch. Biochem. Biophys. 331: 31-40.

Brown J.A., Alic M., Gold M.H. (1991). Manganese regulates expression of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. J. Bacteriol. 172: 3125-3130.

Cameron M.D. and Aust S.D. (2001). Cellobiose dehydrogenase an extracellular fungal flavocytochrome. Enz. Microbiol. Biotechnol. 28: 129-138.

Castanares A., Hay A.J., Gordon A.H., McCrae S.I., and Wood T. (1995). D-xylan-degrading enzyme system from the fungus *Phanerochaetes chrysosporium*: isolation and partial characterization of an α-(4-O-methyl)-D-glucuronidase. J. Biotechnol. 43: 183.

Chikamatsu G., Shirai K., Kato M., Kobayashi T. and Tsukagoshi N. (1999). Structure and expression properties of the endo---1-4-glucanase A gene from the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. FEMS Microbiol. Lett. 175: 239-245

Clausen C. (1997). Immunological detection of wood decay fungi, an overview of technics developed from 1986 to the present. Int. Biodeter. Biodegrad. 39: 133-143.

Clausen C., Green F. and Highley T. (1991). Early detection of brown-rot decay in southern yellow pine using immunodiagnostic procedures. Wood Sci. Technol. 26: 1-8.

Collins P. and Dobson A.W. (1997). Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3444-3450.

Courty P.E., Pritsch K., Schloter M., Hartmann A., Garbaye J. (2005). Activity profiling of ectomycorrhiza communities in two forest soils using multiple enzymatic tests. New. Phyt. 167: 309-319

Couto S.R., Gundín M., Lorenzo M. and Sanromán M.Á. (2002). Screening of supports and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions. Process. Biochem. 38: 249-255.

Cowling E.B. (1961). Comparative biochemistry of the decay of sweetgum sapwood by white-rot and brown-rot fungi. Technical bulletin. no.1258. US departement of agriculture, Washington, DC.

Cullen D. and Kersten P.J. (2004). Enzymology and molecular biology of lignin degradation. Biochem. Mol. Biol. 13: 249-263.

Daniel G, Nilsson T and Petterson B (1989). Intra and extracellular localization of lignin peroxidase during the degradation of solid wood and wood fragments by *Phanerochaete chryosoporium* by using transmission electron microscopy and immuno-gold labelling. Appl. Environ. Microbiol. 55: 871-881.

Daniel G, Volc J. and Kubatova E. (1994). Pyranose oxidase, a major source of H_2O_2 during wood degradation by *Phanerochaete chrysosporium, Trametes versicolor and Oudemansiella mucida*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 2524-2532.

Danneel H.J., Rossner E., Zeeck A. and Giffhorn F. (1993). Purification and characterization of pyranose oxidase from the basidiomycete *Peniophora gigantea* and chemical anlyses of its reaction products. Eur. J. Biochem. 214: 795-802.

Datta A., Bettermann A. and Kirk T.K. (1991). Identification of a specific manganese peroxidase among ligninolytic enzymes secreted by *Phanerochaete chrysosporium* during wood decay. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1453-1460.

Dawson-Andoh B.E. and Morrel J.J. (1992). Extraction of proteins from wood colonized by decay fungi. Holzforsh. 46: 117-120.

Debbies S.Y., Xu F., Golightly E.J., Kim M.B., Brown S.H., Rey M.W., Scheider P., Halkier T., Mondore K. and Henrik F. (1996). Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa.* Environ. Microbiol. 62 (3): 834-841.

Delgenes J.P., Moletta R. and Navarro J.M. (1989). Production of ethanol from hemicellulosic and cellulosic hydrolysates of wheat straw using Pichia stipitis. Biomass for Energy and Industry, 5th E.C. Conference: 2258 – 2262.

Divne C., Stahlberg J., Reinikainen T., Ruohonen L., Pettersson G., Reinikeainen T., Ruohonen L., Pettersson G., Knowles J.K.C., Teeri T.T. and Jones T.A. (1994). The three dimensionale structure of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. Sci. 265: 524-528.

de Vries R.P., Flipphi M.J., Witteveen C.F. and Visser J. (1994). Characterization of an *Aspergillus nidulans* L-arabitol dehydrogenase mutant. FEMS Microbiol. Lett. 123: 83-90.

de Vries R.P., van de Vondervoort P.J., Hendriks L., van de Belt M. and Visser J. (2002). Regulation of the α-glucuronidase-encoding gene (aguA) from *Aspergillus niger*. Mol. Genet. Genouil. 268 : 96-102.

de Vries R.P., Visser J. and de Graaff L.H. (1999). CreA modulates the XlnR-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. Res. Microbiol. 150: 281-285.

Dorado J., Van Beek T.A., Classen F.W., Sierra-Alvarez R. (2001). Degradation of lipophilic wood extractive constituents in *Pinus sylvestris* by the white-rot fungi *Bjerkandera sp*. and *Trametes versicolor*. Wood Sc.Technol. 35: 117-125.

Dorado J., Martinez-Inigo M.J., Classen F.W., Van Beek T.A., Wijnberg H.B.P.A., Lenon G. and Sierra-Alvarez R. (1998). Degradation and detoxification of pitch constituents in scots pine by white-rot fungi. Proceedings Intern.confer. Biotechnol.Pulp. Pap. Indust. 2: 41-44.

Dowd C.A., Buckley C.M. and Sheehan D. (1997). Glutathione S-transferases from the white-rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem. J. 324: 243-248.

Durand H., Clanet H. and Tiraby G. (1988). Genetic improvement of Trichoderma reesei for large scale cellulase production. Enzyme. Microbiol. Technol. 10: 341-346.

Eikenes M., Hietala A.M., Alfredsen G., Fossdal C.G. and Solheim H. (2005). Comparison of quantitative real-time PCR and ergosterol assays for monitoring colonization of *Trametes versicolor* in birch wood. Holzforsch. 59: 568-573.

El-Gogary S., Leite A., Crivellaro O., Eveleigh D.E and el-Dorry H. (1989). Mechanism by which cellulose triggers cellobiohydrolase I gene expression in *Trichoderma reesei*. Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 6138-6141.

Emsley A.M. and Steven G.C. (1994). Review: Kinetics and mechanisms of the low temperature degradation of cellulose. Cellulose. 1: 26-56.

Enoki A., Tanaka H. and Fuse G. (1988). Degradation of lignin-related compounds, pure cellulose, and wood components by whit-rot and brown-rot fungi. Holzfors. 42 : 85-93.

Erikson K.E.L., Blanchette R.A. and Ander P. (1990). Biodegradation of lignin. In Microbial and enzymatic degradation of wood and wood compenents. Edited by T. E. Timell, Springer-Velag. GmbH & co. KG, Berlin: 225-397.

Fengel D. and Wegener G. (1984). Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Walter de Gruyter, Berlin : 613.

Fenn P. and Kirk T.K. (1981). Relationship of nitrogen to the onset and suppression of ligninolytic activity and secondary metabolism in *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Microbiol. 130: 59-65.

Ferraz A., Cordova A.M. and Machuca A. (2003). Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis*. Enz. Microbial. Technol. 32: 59-65.

Flipphi M., Van de Vondervoort P.I.J., Ruijter G.J.G., Visser J., Arst Jr H.N. and Felenbok B. (2003). Onset of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*: parallel involvement of hexokinase and glucokinase in sugar signalling. J. Biol. Chem. 278: 11849 -11857.

Gallois A., Gross B., Langlois D., Spinnler H.E. and Brunerie P. (1990). Influence of culture conditions on production of flavour compounds by 29 ligninolytic basidiomycetes. Mycol. Res. 94 : 494-504.

Gancedo J.M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62 : 334-361.

Garcia R., Bermejo C., Grau C., Perez R., Rodriguez-Pena J.M., François J., Nombela C. and Arroyo J. (2004). The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. J. Biol. Chem. 279 (15): 1583-15195

Gaskell J., Stewart P., Kersten P.J., Covert S.F., Reiser J. and Cullen D. (1994). Establishment of genetic linkage by allele specific polymerase chain reaction: application to the lignin peroxidase gene family of *Phanerochaete chrysosporium*. Biotechnol. 12: 1372-1375.

Giffron F. (2000). Fungal pyranose oxidases: occurrence, properties and biotechnical applications in carbohydrate chemistry. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54: 727-740.

Glenn J.K., Akileswaran L. and Gold M.H. (1986). Manganese (II) oxidation is the principal function of the extracellular manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys. 251: 688-696.

Godfrey B.J., Mayfield M.B., Brown J.A. and Gold M.H. (1990). Characterization of a gene encoding a manganese peroxidase from *phanerochaete chrysosporium*. Gen. 93: 119-124.

Gold M.H. and Alic M. (1993). Molecular biology of the lignin degrading basidiomycete *phanerochaete chrysosporium*. Microbiol. Rev. 57: 605-622.

Goodell B, Jellison J, Liu J, Daniel G, Pasczczynski A, Fekete F, Krishnamurthy S, Jun L, Xu G (1997**)**. Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. J. Biotechnol. 53: 133-162.

Gutiérrez A., del Río J.C., Martinez M.J. and Martinez A.T. (2001). The biotechnological control of pitch in paper pulp manufacturing. Trends. Biotechnol. 19: 340–348.

Gutiérrez A., del Río J.C., González F.J. and Martín F. (1998). Analysis of lipophilic extractives from wood and pitch deposits by solid-phase extraction and gas chromatography. J. Chromatogr. 823: 449-455.

Green R.V. and Gould J.M. (1984). Fatty acyl-coenzyme a oxidase activity and H_20_2 production in *Phanerochaete chrysosporium* mycelium. Biochem. Biophs. Res. Commun. 157: 992-999.

Gritzali M. and Brown R.D.J. (1979). The cellulase system of *Trichoderma*: relationship between purified extracellular enzymes from induced or cellulose-grown cells. Adv. Chem. Ser. 181: 237-260.

Guillen F., Martinez A.T., Martinez M.J. and Evans C.S. (1994). Hydrogen peroxide-producing system of *Pleurotus eryngii involving* the extracellular enzyme aryl-alcohol oxidase. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41: 465-470.

Guillen F., Muňos C., Gómez-Toribo V., Martinez A.T. and Martinez M.J. (2000). Oxygen activation during oxidation of methoxyhydroquinones by laccase from *Pleurotus eryngii*. Appl. Environ. Microbiol. 66 : 170-175.

Guillen F., Martinez MJ., Munoz C. and Martinez A.T. (1997). Quinone redox cycling in the ligninolytic fungus Pleurotus eryngii leading to extracellular production of superoxide anion radical. Arch. Biochem. Biophys. 339 : 190-199.

Guyonnet R and Bourgois J (1986). Procédé de fabrication d'un matériau lignocellulosiques par traitement thermique et matériau obtenu par ce procédé. Brevet France n° 86-14138

Hammel K.E., Tien M., Kalyanaraman B. and Kirk T.K. (1985). Mechanism of oxidative carbon-carbon cleavage of a lignin model dimer by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase: stoichiometry and involvement of free radicals. J. Biol. Chem. 260 : 8348-8353.

Hakkou M. (2006). Procédé de traitement thermique du bois, évolution de la composition chimique et des propriétés macroscopiques. Identification d'un paramètre de contrôle de la durabilité. Thèse. Université Henri Poincaré. Nancy 1.

Harper D.B., Buswell J.A., Kennedy J.T. and Hamilton J.T.G. (1990). Chloromethane, methyl donor in veratryl alcohol biosynthesis in *Phanerochaete chrysosporium* and other lignin-degrading fungi. Appl. Environ. Microbiol. 56: 3450-3457.

Hattori T., Nishiyama A. and Shimada M. (1999). Induction of L-phenylalanine ammonia-lyase and suppression of veratryl alcohol biosynthesis by exogenously added L-phenylalanine in a white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS. Microbiol. Lett. 179: 305-309.

Henriksson G., Johansson G. and Pettersson G. (2000). A critical review of cellobiose dehydrogenases. J. Biotechnol. 78: 93-113.

Hirano T., Tanaka H. and Enoki A. (1997). Relationship between production of hydroxyl radicals and degradation of wood by the brown-rot fungus *Tyromyces palustris*. Holzforsch. 51: 389-395.

Hofrichter M. (2002). Lignin conversion by manganese peroxidase. Enzy. Microbiol. Technol. 454-466

Ilmémen M., Saloheimo A., Onnela M.L. and Pentilä M.E (1997). Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Appl. Environ. Microbiol. 63: 1298-1306

Ilman B.L. and Bajt S. (1997). Nondestructive elemental analysis of wood biodeterioration using electron paramagnetic resonance and synchroton X-ray fluorescence. Int. Biodeter. Biodegrad. 39 : 235-243.

Jacoby J.J., Nilius S.M. and Heinisch J.J. (1998). A screen for upstream components of the yeast protein kinase C signal transduction pathway identifies the product of the SLG1 gene. Mol. Gener. Genet. 258 (1-2): 148-155

Jacquinot B., Raymond B. and Frontere L. (1989). Procédé bertin d'hydrolyse acide des matériaux lignocellulosiques. Biomass for Energy and Industry, 5th E.C Conference: 282 – 288.

Janja Z.A.M (2003). GC analysis of extractive compounds in beech wood. J. Sep. Sci. 26: 1292-1294

Janse B.J.H., Gaskell J., Akhtar M., Cullen, D. (1998). Expression of *Phanerochaete chrysosporium* genes encoding lignin peroxidases, manganese peroxidases and glyoxal oxidases in wood. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3536-3548.

Jasalavich C.A., Ostropskyand A. and Jellison J. (2000). Detection and identification of decay fungi in spruce wood by restriction fragment length polymorphism analysis of amplified gene encoding rDNA. Appl. Environ. Microbiol. 66: 4725-4734.

Jellison J. and Goodel B. (1988). Immunological detection of decay in wood. Wood Sci. Technol. 22 : 293-297.

Jodin P. (1994). Le bois matériau d'ingénierie. Association pour la recherche sur le bois en lorraine (ARBOLOR) (ed.) : 80-81.

Johansson T. and Nyman P.O. (1996). A cluster of genes encoding major isozymes of lignin peroxidase and manganese peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. Gen. 170: 31-38.

Johansson T. and Nyman P.O. (1995). The gene from the white rot fungus *Trametes versicolor* encoding the lignin peroxidase isozyme LP7. Biochem. Biophys. Acta. 1263 : 71-74.

Joseleau J.P. (1980). Les hémicelluloses, les polymères végétaux, polymères pariétaux et alimentaires non azotés. Ed. Monties B., Bordas, Paris: 87-121.

Kamdem P, Pizzi A and Triboulot M. C (2000). Heat treatment timber: potentially toxic by products presence and extent of wood cell wall degradation. Holz als Roh-und Werkstoff. 58 : 253-257.

Kang Z., Huang L., Krieg U., Mauler-Machnik A., Buchenauer H. (2001). Effects of tebuconazole on morphology, structure, cell wall components and trichothecene production of *Fusarium culmorum* in vitro. Pest. Manag. Sci. 57: 491-500

Kauffman C.A. (2006). Clinical efficacy of new antifugal agents. Curr. Opin. Microbiol. 9: 483-488.

Karahanian E., Corsini G., Lobos S. and Vicuna R. (1998). Structure and expression of a laccase gene from the ligninolytic basidiomycete C*eriporiopsis subvermispora*. Biochem. Biophy. Acta. 1443: 65-74.

Katapodis P., Vršanská M., Kekos D., Nerinckx W., Biely P., Claeyssens M., Macris B.J. and Christakopoulos P. (2003). Biochemical and catalytic properties of an endoxylanase purified from the culture filtrate of *Sporotrichum termophile*. Carbohydr. Res. 338(18): 1881-1890.

Kelley R.L. and Reddy C.A. (1986). Purification and characterization of glucose oxidase from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. J. Bacteriol. 166: 269-274.

Kersten P.J. and Kirk T.K. (1987). Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H_2O_2 production by *Phanerochaete chrysosporium*. J. Bacteriol. 169: 2195-2201.

Kersten P. and Cullen D. (2007). Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Fung. Gen. Biol. 44: 77-87.

Kirk T.K. and Cullen D. (1998). Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: Young R. A Akhtar M (Eds). Environ. Friend. Technol. John wiley and Sons, New York: 273-308.

Kullman S.W. and Matsumura F. (1997). Identification of a novel cytochrome P-450 gene from the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 63 : 2741-2746.

Kuranda K., Leberre V., Sokol S., Palamarczyk G. and François J. (2006). Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. Mol.Microbiol. 61: 1147- 1166.

Lahiry A.K (1998). A discussion on causes, effects and remedies of arsenic's pollution of groundwater's in Bangladesh. The International Research Group on Wood Preservation Stockholm, Suede, Doc IRG/WP/98-50102.

Leisola M.S.A., Schmidt B., Thanei W.U. and Fiechter A. (1985). Aromatic ring cleavage of veratryl alcohol by *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS. Lett. 189: 260-270.

Li D., Alic M., Brown J.A. and Gold M.H. (1995). Regulation of manganese peroxidase gene transcription by hydrogen peroxide, chemecal stress, and molecular oxygen. Appl. Environ. Microbiol. 61: 341-345.

Li B., Nagalla S.R. and Renganathan V. (1996). Cloning of a cDNA encoding cellobiose dehydrogenase a hemoflavoenzyme from Phanerochaete chrysosporium. Appl. Environ. Microbiol. 62 : 1329-1335.

Lobos S., Larra J., Cullen D. and Vicuna R. (1994). Isoenzymes of manganese-dependant peroxidase and laccase produced by the lignin degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. Microbiol. 140: 2691-2708.

Luonteri E., Siika-Aho M., Tenkanen M. and Viikari L. (1995). Purification and characterization of three α-arabinofuranosidases from Aspergillus terreus. J. Biotechnol. 38 (3): 279-291.

Lund B. and Spendler F. (1989). Conversion of hemicellulose into organic acids. Biomass for energy and industry, 5th E.C. Conference: 2313 – 2318.

Mabicka A., Dumarcay S., Rouhier N., Linder M., Jacquot J.P., Gérardin P. and Gelhaye E. (2005). Synergistic wood preservatives involving EDTA, Irganox 1076 and 2-hydroxypyridine-N-oxide. Int. Biodeter. Biodegrad.. 55 (3): 203-211.

Mach R.L., Strauss J., Zeilinger S., Schindler M. and Kubicek C.P. (1996). Carbon catabolite repression of xylanase I (xyn1) gene expression in *Trichoderma reesei*. Mol. Microbiol. 21: 1273-1281.

Machida Y. and Nakanishi T. (1984). Purification and properties of pyranose oxidase from *Coriolus versicolor*. Agric. Biol. Chem. 48: 2463.

Machuca A. and Ferraz A. (2001). Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium. Enz. Microbial.Technol. 29: 386-391.

Marchesseault R.H., Sundarajan P.R. (1983). Cellulose, the polysaccharides, molecular biology series, Ed. 3.O. Aspinall, Academic Press, XNC. London 2: 11-95.

Margolles-Clark M., Ilmén M., and Pentilä M. (1997). Expression patterns of 10 hemicellulase genes from filamentous fungus *Trichoderma reesei* on various carbon sources. J. Biotechnol. 57: 167 -179.

Martinez A.T. (2002). Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. Enz. Microbial. Technol. 30: 425-444.

Martinez A.T., Speranza M., Ruiz-Dueňas F.J., Feirreira P., Camarero S., Guillén F., Martínez M.J., Gutiérrez A. and del Río J.C. (2005). Biodegrdation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. Intern. Microbiol. 8: 195-204.

Martin S., Laude-Lemaire I., Kerbiriou-Nabias D., Freyssinet J.M. and Martinez M.C. (2000). Relation between phosphatidylserine exposure and store-operated Ca^{2+} entry in stimulated cells. Biochem. Biophysic. Research. Communications 279 (2): 639-645.

Marzullo L., Cannio R., Giardina P., Santini M.T., Sannia G. (1995). Veratryl alcohol oxidase from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevents polymerization of laccase-oxidized substrates. J Biol. Chem. 270: 3823-3827.

Mouras S, Labat G and Deroubaix G (1996). Déchets de bois et adjuvants dans les industries de la transformation du bois : problématique et examen des solutions. Proceedings 4ème colloque sciences et industries du bois, ARBOLOR, Nancy, France : 551-558.

Mohebby B. (2003). Biological attack of acetylated wood. Ph. D. Thesis, Göttingen University, Göttingen, Germany

Mohebby B. (2005). Attenuated total reflection infrared spectroscopy of white-rot decayed

beech. Int. Biodeter. Biodegrad. 55: 247-251

Mohebby B. and Militz H. (2002). Soft rot fungi decay in acetylated wood. IRG Document No. IRG/WP 02-40231. The International Research Group on Wood Preservation, Stockholm.

Mohebby B., Mai C. and Militz H. (2003). Soft rot decay in acetylated wood: microcalorimetry and ergosterol assay in decay wood. Proceedings, European Conference on wood modification, Ghent, Belgium, 3-4 April 2003 pp. 197-202.

Muheim A., Leisola M.S.A. and Schoemaker H.E. (1990). Aryl-alcohol-oxidase and lignin-peroxidase from the white rot fungus *Bjerkandera adusta* comparison with *Phanerochaete chrysosporium* lignin-peroxidase for reactivity with veratryl alcohol, homoveratric acid and alpha-benzyl veratryl alcohol. J Biotechnol. 13: 159-167.

Necochea R, Valderrama B, Díaz-Sandoval S, Folch-Mallol J.L, Vázquez-Duhalt R, Iturriaga G (2005). Phylogenetic and biochemical characterisation of a recombinant laccase from *Trametes versicolor*. FEMS Microbiology Letters 2: 235-241.

Nicholas D.D and Cockcroft R (1982). Wood preservation in the U.S.A. The international research group on wood preservation, Stockholm, Suede, Doc IRG/WP/3215.

Nilsson K. and Bjurman J. (1990). Estimation of mycelial biomass by determination of the ergosterol content of wood decayed by *Coniophora puteana* and *Fomes fomentarius*. Mater. Org. 25: 275-285.

Nimz H.H. (1974). Beech lignin proposal of a constitutional scheme. Angew. Chem. Int. Ed. 13: 313-321.

Nishida A. and Eriksson K.E. (1997). Formation, purification, and partial characterization of methanol oxidase, a H_2O_2 producing enzyme in *Phanerochaete chrysosporium*. Biotechnol. Appl. Biochem. 9: 325-338.

Osiadacz J., Al-Adhami A.J.H., Bajraszewska D., Fischer P., Peczyñska-Czoch W. (1999). On the use of *Trametes versicolor* laccase for the conversion of 4-methyl-3- hydroxyanthranilic acid to actinocin chromophore. J. Biotechnol. 72: 141-149

Pandey K.K. and Pitman A.J. (2003). FTIR studies of the changes in wood following decay by brown-rot and white-rot fungi. Int. Biodeter. Biodegrad. 52: 151-160.

Pandey K.K. (1999). A study of chemical structure of soft and hardwood polymers by FTIR spectroscopy. J. Appl. Polym.Sci. 71: 1969-1975.

Pandey K.K. and Thegarjan K.S. (1997). Analysis of wood surface and ground wood by diffuse reflectance (DRIFT) and photoacoustic (PAS) Fourrier transform infra red spectroscopy. Holz als Roh-und Werkstoff 55: 383-390.

Pasanen A.L., Yli-Pietila K., Pasanen P., Kalliokoski P. and Tarhanen J. (1999). Ergosterol content in various fungal species and Biocontaminated building materials. Appl. Environ. Microbiol. 65: 138-142.

Park J.I., Collinson E.J., Grant C.M. and Dawes I.W. (2005). Rom2p, the Rho1 GTP/GDP exchange factor of *Saccharomyces cerevisiae*, can mediate stress responses via the Ras-cAMP pathway. J. Biol. Chem. 280 (4): 2529-2535.

Paszczynski A., Huynh V.B. and Crawford R. (1985). Enzymatic activities of an extracellular, manganese-dependente peroxidase from Phanerochaete chrysosporium. FEMS. Microbiol. Lett. 29: 37-41.

Pentilä M. (1998). Heterologous protein production in Trichoderma. In: *Trichoderma* and *Gliogladium*. (Harman G.E and Kubicek C.P Eds). 22: 367-382. Taylor and Francis, London.

Pointing, S.B. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl Microbiol Biotechno*l 57**:** 20-33.

Rao F.V, Andersen O.A, Vora K.A, DeMartino J.A, Van Aalten D.M.F (2005). Methylxanthine drugs are chitinase inhibitors: Investigation of inhibition and binding modes. Chem and Biol 12: 973-980

Robinson T., McMullan G., Marchant R. and Poonam N. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative Biores Technol. 77: 247-255

Roy B.P., Dumonceaux T., Koujoula A.A. and Archibald F.S. (1996). Purification and characterization of cellobiose dehydrogenases from the white rot fungus *Trametes versicolor*. Appl. Environ. Microbiol. 62 (12): 4417-4427.

Saka S. (1991). Chemical composition and distribution, wood and cellulosic chemistry, Shiraishi N., Hon D.N.S., Ed. M. Dekker: 59-88.

Saparrat M.C.N., Guillén F., Arambarri A.M., Martinez A.T. and Martinez M.J. (2002). Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. Appl. Environ. Microbiol. 68 (4): 1534-1540.

Sarko A. (1978). What is the crystalline structure of cellulose? T. J. 62 (2): 59 – 61.

Scheel T., Hofer M., Ludwig S. and Holker U. (2000). Differential expression of manganese peroxidase and laccase in white-rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54: 686-691.

Schick Z.L. and Tien M. (1997). The roles of veratryl alcohol and oxalate in fungal lignin degradation. J. Biotechnol. 53: 93-102.

Schultz T.P. and Nicholas D.D. (2002). Development of environmentally begin preservatives based on the combination of organic biocides with antioxidants and metal chelators. Phytochem. 61: 555-560.

Schultz T.P., Nicholas D.D., Henry W.P., Pittman C.U., Wipf D.O. and Goodell B. (2005). Review of laboratory and outdoor exposure efficacy results of organic biocide: Antioxidant combinations, an initial economic analysis and discussion of a proposed mechanism. Wood Fiber Sci. 37: 175-184.

Schuttelkopf A.W., Andersen O.A., Rao F.V., Allwood M., Lloyd C., Eggleston I. M., Van Aalten D. M. F (2006). Screening-based discovery and structural dissection of a novel family 18 chitinase inhibitor. J. Biol. Chem. 281:27278-27285

Shah V. and Nerud F. (2002). Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. Can. J. Microbiol. 48: 857-870.

Smith M.H. and Gold M.H. (1979). *Phanerochaete chrysosporium* β-glucosidase: induction, cellular localization, and physical characterization. Appl. Environ. Microbiol. 37: 938-942.

Solár R, Kurjatko S, Mamo M, Kosiková B, Neuschlová E, Vybohová E (2007). Selected properties of beech wood degraded by brown-rot fungus *Coniophora puteana*. Drvna Industrija 58 (1): 3-11.

Stapleton P.C. and Dobson A.D.W. (2003). Carbon repression of cellobiose dehydrogenase production in the white rot fungus *Trametes versicolor* is mediated at the level of gene transcription. FEMS. Microbiol. Lett. 221: 167-172

Stewart P. and Cullen D. (1999). Organization and differential regulation of a cluster of lignin peroxidase genes of *Phanerochaete chrysosporium*. J. Bacteriol. 181: 3427-3432.

Teeri T.T. (1997). Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. Trends. Biotechnol. 15: 160-167.

Teris A., van Beeka B., Kustera F., Claassena W., Tienvierib T., Bertaud F., Lenon G., Petit-Conil M. and Sierra-Alvarez R. (2007). Fungal bio-treatment of spruce wood with *Trametes versicolor* for pitch control: Influence on extractive contents, pulping process parameters, paper quality and effluent toxicity. Biores. Technol. 98: 302-311.

Tien M. and Kirk K.T. (1988). Lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. Methods in Enz. 161: 238-249.

Tien M., Kirk K.T., Bull C. and Fee J.A. (1986). Steady-state and transient-state kinetic studies on the oxidation of 3,4-dimethoxybenzyl alcohol catalyzed by the ligninase of *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biol. Chem. 261: 1687-1693.

Uzcategui E., Ruiz A., Montesino G., Johansson and Pettersson G. (1991). The 1,4-β-D-glucan cellobiohydrolase from *Phanerochaete chrysosporium* I. A system of synergistically acting enzymes homologous to *Trichoderma reesei*. J. Biotechnol. 19: 271-286.

Wälchli O. (1970). Influence of the content of organic matter of soil on the degradation of wood by soft rot fungi. IRG document No. IRG/WP 27. The International Research Group on Wood Preservation, Stockholm

Wariishi H. and Gold M.H. (1990). Lignin peroxydase compound III. Mecanism of formation and decomposition. J. Biol. Chem. 265(5): 2070-2077.

Wariishi H., Dunford H.B., MacDonald I.D. and Gold M.H. (1989). Manganese peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biol. Chem. 264: 3335-33340.

Wesenberg D., Kyriakides I., and Agathos S.N. (2003). White rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. Biotechnol. Adv. 22: 161-187.

Xie Y., Bjurman J. and Wadsö L. (1997). Microcalorimetric characterization of the recovery of brown rot fungus after exposure to high and low temperature, oxygen depletion and drying. Holzforsch. 51: 201-206.

Yaver D.S., Xu F., Golightly E.J., Brown K.M., Brown S.H., Rey M.W., Schneider P., Halkier T., Mondorf K., and Dalboge H. (1996). Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 834-841.

Zabell R.A., and Morell J.J. (1992). Wood microbilogy, decay and its prevent. Academic press, New York.

Zhao J., De Kober T.H. and Janse B.J.H. (1996). Comparative studies of lignin peroxidases and manganese-dependant peroxidases produced by selected white-rot fungi in solid media. FEMS Microbiol. Lett. 145: 393-399.

Zaremski A., Ducousso M., Domergue O., Fardoux J., Rangin C., Fouquet D. Joly H., Sales C., Dreyfus B. and Prin Y. (2005). *In situ* molecular detection of some white-rot and brown-rot basidiomycetes infecting temperate and tropical woods. Can. J. For. Res. 35 : 1256-1260

EVALUATION ET COMPREHENSION DES MECANISMES FONGIQUES IMPLIQUES DANS LA DEGRADATION DU BOIS

RESUME

L'étude des activités enzymatiques exprimées lors de la croissance du champignon de pourriture blanche *Trametes versicolor* sur milieu malt agar en présence des éprouvettes du hêtre *Fagus sylvatica* été réalisée. Le processus de dégradation du bois se déroule en deux phases. La première phase est caractérisée par une production d'activités laccases et peroxydases couplées à la dégradation de la lignine. La seconde phase correspond à la production d'activités hydrolytiques impliquées dans la dégradation des polysaccharides. Au début du processus de colonisation du bois, on observe une production d'activités laccases responsables de la dégradation des extractibles du bois, en particulier la catéchine qui est un des composés facilement identifiables dans les extraits du hêtre. La présence d'un biocide comme le propiconazole provoque une forte induction d'activités chitinases lors du stade initial de la colonisation du bois. L'utilisation d'inhibiteurs de chitinases tels que la caféine permet de réduire la quantité du biocide nécessaire pour protéger le bois. La caféine et le rouge congo, un autre agent capable de perturber la mise en place des parois cellulaires du champignon ont un effet additif sur l'inhibition de la croissance de *T. versicolor* lorsqu'ils sont associés avec le biocide. L'application des méthodes mises en place dans le cadre de notre étude au cas de la dégradation du bois de hêtre traité thermiquement a permis de mettre en évidence l'effet de ce type de traitement sur l'expression des activités enzymatiques expliquant en partie les raisons de l'augmentation de la durabilité du bois suite au traitement thermique.

Mots clés : activité enzymatique, bois, caféine, dégradation, durabilité, extractibles, hêtre, propiconazole, traitement thermique, *Trametes versicolor*.

EVALUATION AND COMPREHENSION OF FUNGAL MECHANISMS INVOLVED IN WOOD DEGRADATION

ABSTRACT

The study of enzymatic activities expressed during growth of the white rot fungus *T. versicolor* on malt agar medium in the presence of beech (*Fagus sylvatica)* wood chips was investigated. The process of wood degradation was divided in two stages. The first stage was characterized by the production of laccases and peroxidases activities. The second stage was characterized by production of carbohydrates hydrolyzing activities. At the beginning of wood colonization process, the production of laccases activities was correlated with degradation of wood acetonic extractives as catechin, which was easily identified in the beech extracts. The presence of a biocide like propiconazole is responsible of the induction of a strong chitinases activity at the beginning of the colonization process. Utilisation of caffeine, a chitinases inhibitor, in the presence of propiconazole allowed to reduce the quantity of biocide necessary to prevent wood from fungal degradation. Similarly, congo red, another cell wall perturbing agent, presented additive effect on inhibition of the fungal growth when associated to propiconazole. The application of the methods developed in this study to the case of heat treated beech wood highlighted the effect of this treatment on the expression of enzymatic activities during wood degradation process explaining in great part the improvement of durability observed after heat treatment.

Keywords: beech, caffeine, degradation, *enzymatic activity, durability, extractives, heat treatment*, propiconazole, *Trametes versicolor*, wood