HAL
open science

Diversité écologique et fonctionnelle des champignons décomposeurs du bois : l'influence du substrat de la communauté à l'enzyme

Yann Mathieu

To cite this version:

Yann Mathieu. Diversité écologique et fonctionnelle des champignons décomposeurs du bois : l'influence du substrat de la communauté à l'enzyme. Biologie végétale. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0255 . tel-01749638

HAL Id: tel-01749638

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749638

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.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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. Sciences & Technologies
E.D. Ressources, Procédés, Produits et Environnement
Biologie Végétale et Forestière

IFR 110 Génomique, Ecophysiologie et Ecologie Fonctionnelle
Unité Mixte de Recherche INRA/UL-1136
Interactions Arbres-Microorganismes

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

en Biologie Végétale et Forestière

par **MATHIEU Yann**

Diversité écologique et fonctionnelle des champignons décomposeurs du bois : l'influence du substrat de la communauté à l'enzyme.

Soutenance publique prévue le 11 Décembre 2012

Membres du jury :

Rapporteurs :
Eric RECORD, Directeur de Recherche, INRA
Jean-François COLLET, Professeur, Université Catholique de Louvain

Examinateurs :
Gaétan LE FLOCH, Maître de Conférences, Université de Bretagne Occidentale
Pierre-Emmanuel COURTY, Research Associate, Université de Bâle
Philippe GERARDIN, Professeur, Université de Lorraine
Eric GELHAYE, Professeur, Université de Lorraine, Directeur de Thèse

Invités :
Marc BUEE, Chargé de Recherche, INRA, Co-directeur de Thèse
Luc HARVENGT, Responsable Scientifique Biotech, FCBA, Co-directeur de Thèse
Mélanie Morel, Maître de Conférences, Université de Lorraine
Claude DIDIERJEAN, Maître de Conférences, Université de Lorraine

La Science est fille de l’étonnement.

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier les membres du jury, Eric Record, Jean-François Collet, Gaétan Le-Floch, Pierre Emmanuel Courty et Philippe Gérardin pour avoir accepté de lire ce manuscrit et d'évaluer mes travaux de thèse. Je voudrais également remercier les personnes qui ont collaboré avec moi sur ces travaux, Mélanie Morel et Claude Didierjean, notamment pour les conseils de rédaction des différents articles ainsi que pour leur disponibilité.

Je remercie ensuite mes « nombreux » directeurs de thèse Eric, Marc et Luc pour la confiance et la grande autonomie qu'ils m'ont accordées durant ces trois années de doctorat et surtout pour leur disponibilité au jour le jour que ce soit pour des questions pratiques et surtout scientifiques, mais également pour leur patience, leurs encourgaments et leur bonne humeur qui sont des qualités rares. Je remercie particulièrement Nico qui malgré mon arrivée en retard systématique à ses cours (surtout à 8h00) m'a quand même orienté vers cette bourse de thèse. Enfin une dédicace spéciale à Jean Pierre qui a marqué à jamais ma vision de l'enseignement supérieur !

Je voudrais ensuite remercier les personnes avec qui j'ai partagé un de mes multiples bureaux : Edgar pour ta gay attitude, ta curiosité musicale et ton gardiennage de chat, Benjy pour tes blagues douteuses sur les curés et les petits enfants, Anne pour la touche de féminité apportée au bureau, PA pour ta gentillesse et tes remarques souvent à coté de la plaque, Stéphane pour ta culture métal et le petit Grégory, Vincent (le bucheron) pour ton humour douteux et les bières partagées, Nicolas pour ton régime alimentaire digne d'un extra terrestre et Cendrella pour ta culture geek et cinématographique.

J'aimerai aussi remercier les personnes avec qui j'ai pu échanger sur tout et n'importe quoi durant ces années : Arnaud, Kamel, Jérémy, Tiphaine, Antoine, Henri (à toi d'assurer la relève !), Andrew, Seb, Ben, Béatrice, JB, Emeline, PJ, Christine, Jean-Louis, Cyrille, Manue, Annegret, Francis, Yohann, Aude, Adeline, Alice, Sara, Juliette, Jaime, Pete, Bruno (aka vomito), Patrice, Emilie, Angela, Claude, Aurore, Stéphane, Claire, Valérie, Aurélie, Agnès, et les nombreux stagiaires.

Au cas où j'oublierai quelqu'un je remercie tout simplement toutes les personnes avec lesquelles j'ai interagi durant ces trois dernières années.

Pour finir j'adresse un énorme merci à mes parents et ma soeur qui grâce à leur patience, leur soutien moral et surtout financier, m'ont permis de mener à bout mes études dans d'excellentes conditions pour un domaine qui me passionne.

Enfin, j'adresse également un énorme merci à celle qui partage ma vie depuis bientôt cinq ans : Caroline. Merci d'avoir supporté cette période délicate de fin de thèse où j'ai passé plus de temps collé à mon écran qu'à toi, merci pour tes encouragements quand le moral n'était pas présent, et je te remercie d'avance pour la patience dont tu feras preuve lors de mes multiples répétitions de l'oral à venir… Merci également pour tout ce que tu m'apportes quotidiennement. Pour toutes ces raisons, je te dédicace ce travail.

2,5-DMHQ : 2,5-diméthoxyhydroquinone
AAO : aryl-alcool oxydase
ABTS : 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)
ADN : acide désoxyribonucléique
ANS : 8-anilino-1-napthalenesulfonic acid
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messager
ARNr : ARN ribosomique
ATP : adénosine triphosphate
CAZy : pour Carbohydrate Active enZyme
CBH : cellobiohydrolase
CBM : pour cellulose binding domain
CDH : cellobiose déshydrogénase
CE : pour carbohydrate esterase
CLIC : pour chloride intracellular channel
COA : analyse de correspondance
DGGE : Electrophorèse sur gel en gradient dénaturant
DHAR : pour dehydroascorbate reductase
Dsb : pour disulfide bond protein
ECM : ectomycorhizien
EG : endoglucanase
FAD : flavine adénine dinucléotide
G : guaiacyle
GH : pour glycoside hydrolase
GOx : glyoxal oxydase
GRX : glutarédoxine
GST : glutathion S-transférase
GSH : glutathion
GTE : pour glutathione transferase etherase like
GTO : glutathion transférase Oméga
H : p-hydroxyphényl
HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique
HBT : 1-hydroxybenzotriazole
HCCA : 2-hydroxychromène-2-carboxylate
ITS : Internal Transcribed Spacer
kDa : kilodalton
LiP : pour lignin peroxydase
MnP : pour manganese peroxydase
MID : Multiplex IDentifier
ML : Lamelle moyenne
MOTU : pour molecular operational taxonomic units
MUA : 4-Methylumbelliferyl acétate
NADP(H) : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
PMO : monooxygénase de polysaccharides
POD : pyranose-2-oxydase
(T)RFLP : Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (terminaux)
S : syringyle
TGGE : Electrophorèse sur gel en gradient de température
TRX : thiorédoxine
VP : pour versatile peroxydase

Table des matières

TABLE DES MATIERES 1

INTRODUCTION 7

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE 11

1) DIVERSITE DE LA COMPOSITION STRUCTURALE ET CHIMIQUE DU BOIS 13

1.A) FORMATION ET COMPOSITION DU BOIS 13
1.A.I) ANATOMIE ET ORGANISATION CELLULAIRE DU BOIS 13
1.A.II) COMPOSITION CHIMIQUE DU BOIS 16
1.B) SUBSTANCES MACROMOLECULAIRES 16
1.B.I) LA CELLULOSE 16
1.B.II) LES HEMICELLULOSES 18
1.B.III) LA LIGNINE 20
1.C) SUBSTANCES DE FAIBLE POIDS MOLECULAIRE 22
1.C.I) LES EXTRACTIBLES 22
1.C.II) TERPENES ET TERPENOÏDES 22
1.C.III) COMPOSES PHENOLIQUES 23
1.C.IV) LES INERTES 25

2) DIVERSITE DES MICROORGANISMES SAPROPHYTES 26

2.A) MOISISSURES (« MOULDS ») ET AGENTS DE BLEUISSEMENT (« BLUE STAIN ») 29
2.B) LES AGENTS DE POURRITURE MOLLE (« SOFT ROT ») 29
2.C) LES AGENTS DE POURRITURE BRUNE (« BROWN ROT ») 30
2.D) LES AGENTS DE POURRITURE BLANCHE (« WHITE ROT ») 31

3) DIVERSITE DES SYSTEMES ENZYMATIQUES IMPLIQUES DANS LA DECOMPOSITION DU BOIS : 34

3.A) DEGRADATION DE LA CELLULOSE 36
3.A.I) DEGRADATION DE LA CELLULOSE PAR L'UTILISATION D'ENZYMES HYDROLYTIQUES : 37
3.A.II) DEGRADATION DE LA CELLULOSE PAR DES PROCESSUS OXYDATIFS 39
3.A.II.(1) Cellobiose déshydrogénase 41
3.A.II.(2) Cycle redox des quinones 43
3.A.II.(3) Réaction de Fenton catalysée par des glycopeptides 44
3.A.II.(4) Les monooxygénases de polysaccharides (PMO) 45
3.B) DEGRADATION DES HEMICELLULOSES 47
3.C) DEGRADATION DE LA LIGNINE 49
3.C.I) LES LIGNINE PEROXYDASE (LIP) 51
3.C.II) LES PEROXYDASES A MANGANESE (MNP) 56
3.C.III) LES PEROXYDASES VERSATILES (VP) 60
3.C.IV) LES LACCASES 61
3.C.V) LES ENZYMES AUXILIAIRES 64
3.C.VI) ENZYMES D'ORIGINE BACTERIENNE 65

4) DIVERSITE DES ENZYMES IMPLIQUEES DANS LA DETOXICATION 68

4.A) PHASE I 68
4.B) PHASE II 70
4.C) PHASE III 70

5) LES GLUTATHION-S-TRANSFERASES (GST) 71

5.A) CLASSIFICATION 72
5.B) LES GST CYTOSOLIQUES (CGST) 73
5.C) RELATION STRUCTURE FONCTION DES GST CYTOSOLIQUES 74
5.C.I) LE DOMAINE I : SITE G 75
5.C.II) LE DOMAINE II : SITE H 77
5.C.III) DIMERISATION 78
5.D) FONCTIONS DES GST CHEZ LES CHAMPIGNONS DECOMPOSEURS DU BOIS 79
5.E) EVOLUTION DES GST CYTOSOLIQUES 81
5.E.I) PHASE 1 82
5.E.II) PHASE 2 82

OBJECTIFS 85

RESULTATS 89

CHAPITRE 1 : ANALYSE DE LA DIVERSITE DES CHAMPIGNONS PRESENTS DURANT LES STADES PRECOCES DE LA DECOMPOSITION DU BOIS 91

1) INTRODUCTION 91

2) MATERIEL ET METHODES 93

2.A) SITE D'ETUDE ET STRATEGIE D'ECHANTILLONNAGE 93
2.B) EXTRACTION D'ADN ET AMPLIFICATION PAR PCR EN VUE DU PYROSEQUENÇAGE 454 GS-FLX .. 93
2.C) TRAITEMENT BIO-INFORMATIQUE DES DONNEES 94

3) RESULTATS ET DISCUSSION 96

3.A) DISTRIBUTION DES SEQUENCES 96
3.B) ANALYSE DE LA RICHESSE ET DIVERSITE FONGIQUE 99
3.C) DISTRIBUTION ET SUCCESSION DES DIFFERENTS GROUPES ECOLOGIQUES 102
3.D) NORMALISATION ET RECHERCHE D'ESPECES BIO-INDICATRICES DES STADES PRECOCES DE LA DEGRADATION DU BOIS 105

4) CONCLUSIONS 106

5) REFERENCES 108

CHAPITRE 2 : EVALUATION DES CAPACITES LIGNOCELLULOLYTIQUES D'UNE COLLECTION DE SOUCHES FONGIQUES ET DETECTION DE L'ACTIVITE ß-ETHERASE SECRETEE 117

ARTICLE 1 : SELECTION AND VALIDATION OF ENZYMATIC ACTIVITIES AS FUNCTIONAL MARKERS IN WOOD BIOTECHNOLOGY FUNGAL ECOLOGY. 119

CHAPITRE 3 : ANALYSE DE LA DIVERSITE BIOCHIMIQUE ET FONCTIONNELLE DES GTE 141

1) CARACTERISATION DE LA GSTFUA1 DE P. CHRYSOSPORIUM : 141

ARTICLE 2 : CHARACTERIZATION OF A PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM GLUTATHIONE TRANSFERASE REVEALS A NOVEL STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CLASS WITH LIGANDIN PROPERTIES. 142

2) DIVERSITE FONCTIONNELLE ET STRUCTURALE DES GSTFUA : 167

ARTICLE 3 : DIVERSITY OF FUNGAL SPECIFIC CLASS A GLUTATHIONE TRANSFERASES AMONG SAPROTROPHIC FUNGI REVEALS A PUTATIVE STRATEGY TO WOOD ADAPTATION. 169

DISCUSSION GENERALE 197

1) LE BOIS, BIEN PLUS QU'UN SIMPLE SUBSTRAT : UN FACTEUR DE SELECTION DES COMMUNAUTES 200

2) DIVERSITE DES ACTIVITES ENZYMATIQUE : VERS LA RECHERCHE DE MARQUEURS FONCTIONNELS SPECIFIQUES 205

3) LA DIVERSITE DU XENOME FONGIQUE : UN REFLET DE L'ADAPTATION DES CHAMPIGNONS AU SUBSTRAT BOIS ? 210

ARTICLE 4 : XENOMIC NETWORKS VARIABILTY AND ADAPTATION TRAITS IN WOOD DECAYING FUNGI. . 211

4) PROMISCUITE, NEOFONCTIONALISATION, ET CONVERGENCE FONCTIONNELLE : IMPORTANCE DE LA POST-GENOMIQUE 243

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 251

REFERENCES 255

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES 287

Introduction

Le bois a depuis toujours contribué au développement de l'humanité et fait partie intégrante de la société moderne. Ses qualités esthétiques et mécaniques en font un matériau de prédilection pour les constructions. Cependant, en tant que matériau naturel, le bois est sensible à de nombreux agents de dégradation abiotiques ou biotiques comme les insectes et les microorganismes (champignons et bactéries). Les détériorations les plus importantes étant provoquées par les champignons ligninolytiques capables de dégrader la totalité des polymères constitutifs du bois. Les champignons sont des acteurs majeurs des cycles géochimiques en particulier des cycles du carbone et de l'azote de par leur action dans le recyclage des matières organiques. Ils jouent également des rôles importants à travers leurs interactions avec les organismes (pathogenèse et symbiose) dans différents écosystèmes. La génomique comparative a mis en évidence une extraordinaire diversité des systèmes enzymatiques impliqués dans la dégradation de la matière organique, et en particulier de la lignocellulose par les champignons saprophytes. Il apparaît également que des familles de gènes impliquées dans les voies de détoxication sont particulièrement étendues chez ces champignons reflétant une évolution régie, en partie, par l'hétérogénéité de la composition chimique du bois.

Mes travaux de thèse se sont déroulés au sein de l'unité « Interactions Arbres-Microorganismes », qui développe des projets de recherche autour de la biologie et de l'écologie des champignons forestiers qu'ils soient saprophytes, symbiotiques ou pathogènes, par l'intermédiaire d'une bourse CIFRE en partenariat avec l'institut technologique FCBA qui vise à améliorer les méthodes d'identification et de caractérisation des champignons décomposeurs du bois afin de développer des agents de protection du bois matériau moins polluants. Mes deux équipes d'accueil, « Ecogénomique des interactions » et « Réponse au stress et régulation redox » m'ont permis d'aborder la thématique des champignons décomposeurs du bois selon plusieurs niveaux allant de la communauté à l'enzyme. Grâce à ces approches, j'ai pu évaluer l'influence qu'exerce le bois sur la structuration des communautés fongiques, la physiologie des différents types de pourriture et leur système de détoxication.

Après une analyse bibliographique, les expériences menées et les résultats obtenus sont présentés sous forme de trois chapitres formant la partie résultats de ce manuscrit. Ces résultats donnent ensuite lieu à une discussion générale portant sur l'ensemble du travail effectué proposant des perspectives de recherche.

Analyse bibliographique

1) Diversité de la composition structurale et chimique du bois

1.A) Formation et composition du bois

1.A.I) Anatomie et organisation cellulaire du bois

Le bois, aussi appelé xylème secondaire, est un ensemble de tissus dont les parois des cellules sont lignifiées. C'est un matériel organique hétérogène utilisé par l'homme depuis des milliers d'années pour ses propriétés mécaniques, esthétiques et calorifiques. La norme NF B 50-003 le définit comme un « ensemble de tissus résistants secondaires (de soutien, de conduction et de mise en réserve) qui forment le tronc, les branches et les racines des plantes ligneuses ». Il est issu du cambium périphérique qui de par sa croissance induit le développement de l'arbre sous forme d'anneaux appelés cernes annuels (Figure 1). Chaque cerne correspond à une année complète de croissance de l'arbre qui commence au printemps, où elle est rapide, et s'interrompt à la fin de l'été.

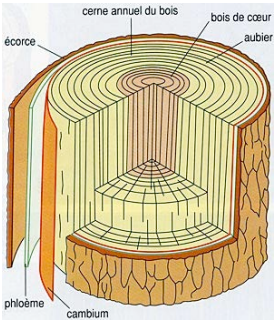


Figure 1 : Structure macroscopique d'un arbre : détail des différentes parties du tronc (http://cerig.efpg.inpg.fr).

Au niveau microscopique le bois présente des caractéristiques cellulaires permettant de définir deux types d'essences forestières (Figure 2) :

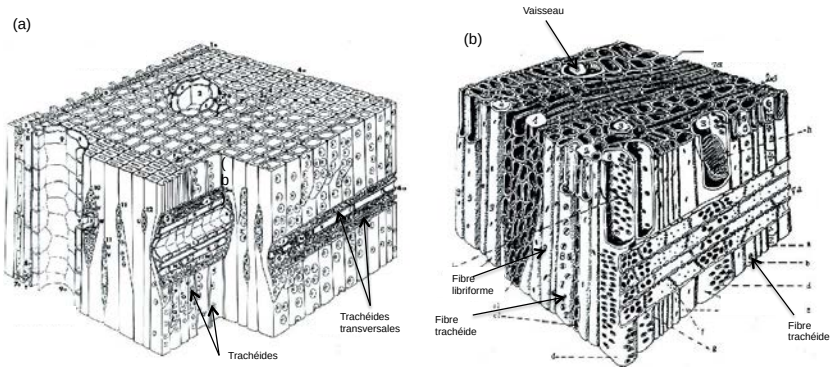


Figure 2 : Organisation cellulaire du bois des résineux **(a)** et des feuillus **(b)** (http://cerig.efpg.inpg.fr).

- Les résineux, « softwood » : ils possèdent une structure anatomique simple composée principalement de cellules longitudinales, les trachéides. Ces cellules participent aux fonctions de conduction de la sève ainsi qu'au soutien de l'arbre.
- Les feuillus, « hardwood » : ils présentent une organisation plus complexe composée en grande partie de fibres orientées axialement ayant une fonction de soutien ainsi que de quelques trachéides.

Au niveau cellulaire, qu'il s'agisse des résineux ou des feuillus, les cellules ligneuses différenciées sont reliées entre elles par la lamelle moyenne et présentent une paroi primaire et une paroi secondaire constituée de trois sous-couches (Figure 3).

La lamelle moyenne (ML), permet aux cellules de s'assembler en tissu. La paroi primaire (P), forme avec la lignine un réseau irrégulier et lâche lui conférant ses propriétés élastiques. Enfin, la paroi secondaire est subdivisée en trois couches distinctes (S_1, S_2, S_3) contenant chacune des proportions variables de cellulose, d'hémicellulose et de lignine.

L'association des chaînes de cellulose en microfibrilles, liées entre elles par les hémicelluloses via des liaisons hydrogène, est à l'origine de la structure élastique pariétale propice aux mouvements cellulaires. Ces hémicelluloses sont également reliées aux lignines par des liaisons esters ou éthers pour former le complexe lignines/hydrates de carbone (Decker et al., 2008). Cet enchevêtrement combiné à un réseau secondaire de protéines forme un ensemble rigide (Figure 4).

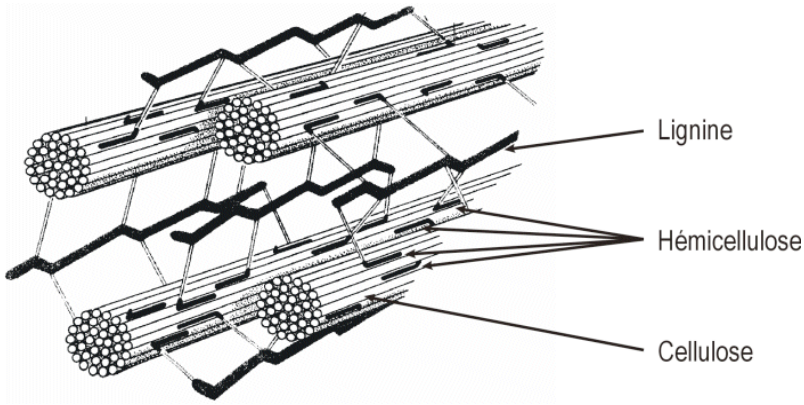


Figure 4 : Représentation schématique de l'organisation des polymères pariétaux dans une fibre de bois (http://cen.acs.org).

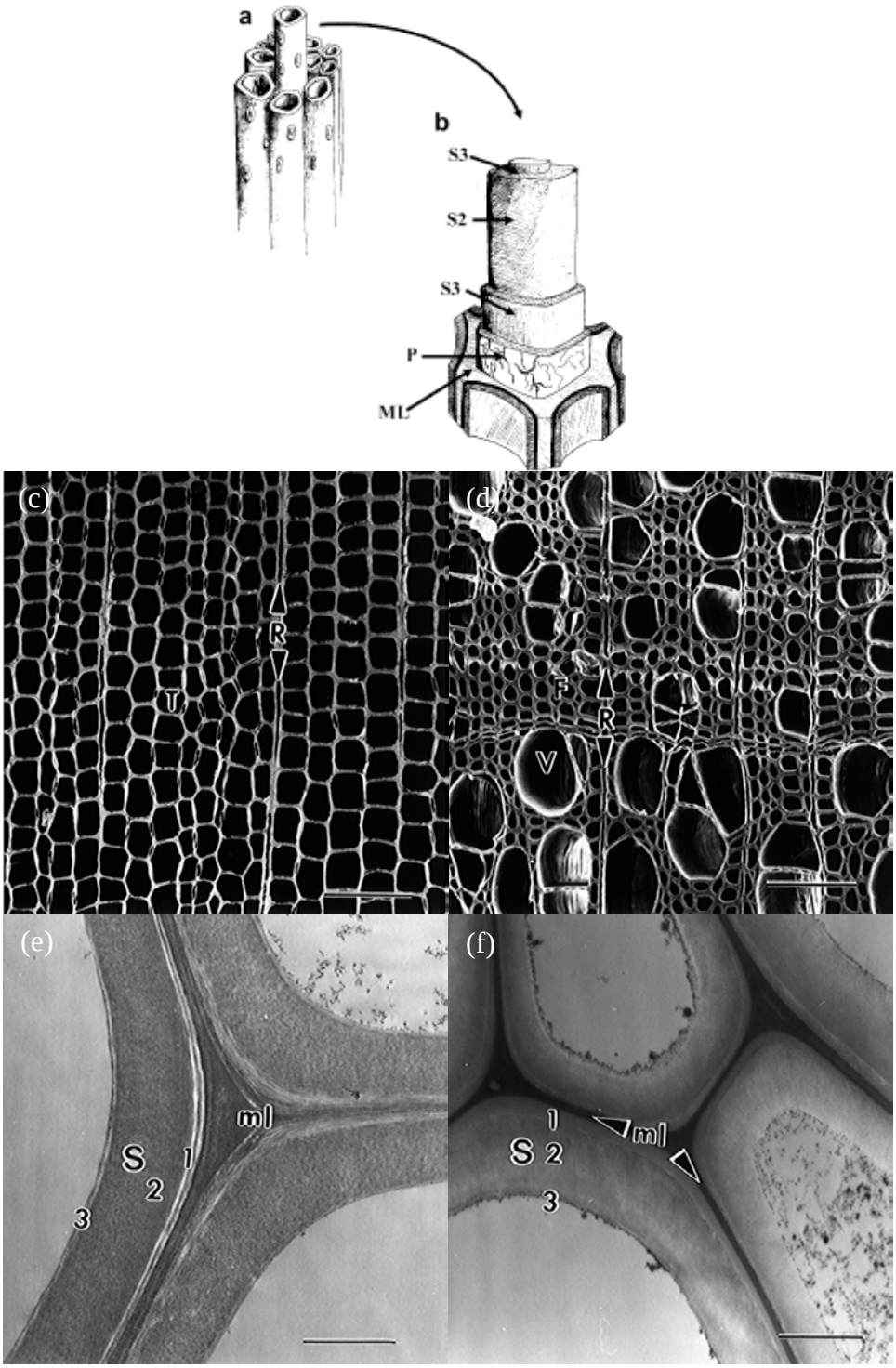


Figure 3 : Organisation cellulaire des tissus du bois (adapté de Perez et al., 2002 et Schwarze et al., 2000).
(a) Cellules adjacentes, **(b)** cellule isolée. S1, S2, S3, couches de la paroi secondaire ; P, paroi primaire ; ML, lamelle moyenne. **(c)** Microscopie d'une coupe transversale du bois de résineux montrant les trachéides (T) et les parenchymes verticaux (R). **(d)** Microscopie d'une coupe transversale du bois de feuillus montrant les vaisseaux (V), les fibres (F) et les parenchymes (R). **(e)** Paroi cellulaire du bois de résineux montrant les différentes couches de la paroi secondaire (S1, S2, S3) et la lamelle moyenne (ml). **(f)** Paroi cellulaire du bois de feuillus montrant les parois secondaires (S1, S2, S3) et la lamelle moyenne (ml).

1.A.II) Composition chimique du bois

La composition chimique du bois est complexe et varie selon l'essence de l'arbre (Tableau 1). Les trois principaux polymères constitutifs du bois, la cellulose, les hémicelluloses et la lignine représentent plus de 90% de la matière sèche du bois (Pu et al., 2011). Ceux-ci sont fortement entremêlés et liés chimiquement par des interactions non covalentes ainsi que par des liaisons covalentes inter-polymères. Il existe également un autre polymère complexe de nature saccharidique représentant jusqu'à 5% de la paroi cellulaire principalement localisé dans la lamelle moyenne : la pectine (Kubicek, 2012). Des composés de faible poids moléculaire (extractibles et substances minérales), généralement plus spécifiques des différentes essences de bois, sont également présents en faibles quantités. Les extractibles peuvent être de nature chimique très variée et comprennent notamment les cires, les graisses, les terpènes et les composés phénoliques (Figure 5).

1.B) Substances macromoléculaires

1.B.I) La cellulose

La cellulose est le composant majeur du bois et du squelette polysaccharidique des parois cellulaires. C'est un polymère linéaire dont l'unité de base, le cellobiose, est constitué de deux molécules de ß-D-glucose (conformation pyranose) liées entre elles par une liaison osidique ß-1→4 entre les carbones C1 et C4 (Figure 6). Les nombreux groupements hydroxyles présents forment des liaisons hydrogène intra-chaîne ou inter-chaîne (Hallac et Ragauskas, 2011). Ce réseau étendu d'interactions non covalentes permet l'association des différentes chaînes de cellulose sous forme de microfibrilles. La structure de la cellulose présente des régions hautement ordonnées (régions cristallines) et d'autre moins (régions amorphes) (Figure 7) (Ding et Himmel, 2008; Lynd et al., 2002). Malgré sa composition chimique uniforme, la cellulose peut être présente sous forme de sept polymères structuraux (I_α, $I_ß$, II, III_1, III_{11}, IV_1 et IV_{11}) différant principalement par la position et les liaisons de leurs chaînes latérales (Sarko, 1978). Cette diversité structurale lui confère diverses propriétés d'accessibilité vis à vis des enzymes impliquées dans sa dégradation (pour plus d'informations sur la structure cristalline de la cellulose voir : O'Sullivan, 1997).

Tableau 1 : Composition chimique du bois selon le type d'essence (Howard et al., 2003).

Composant	Proportion dans le bois des feuillus	Proportion dans le bois des résineux
Cellulose	40 - 55 %	45 - 50 %
Hémicellulose	24 - 40 %	25 - 35 %
Lignine	18 - 25 %	25 - 35 %

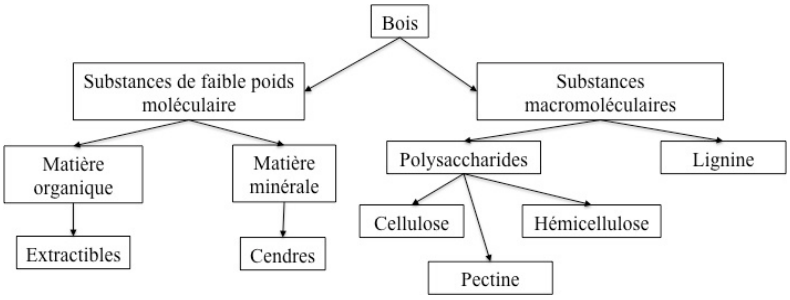


Figure 5 : Schéma général des constituants chimiques du bois (d'après Pereira et al., 2003).

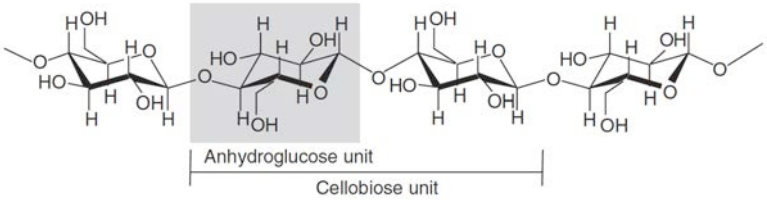


Figure 6 : Structure chimique de la cellulose montrant la répétition des molécules de ß-D-glucose (entouré en gris) ainsi que l'unité de cellobiose (Pereira et al., 2003).

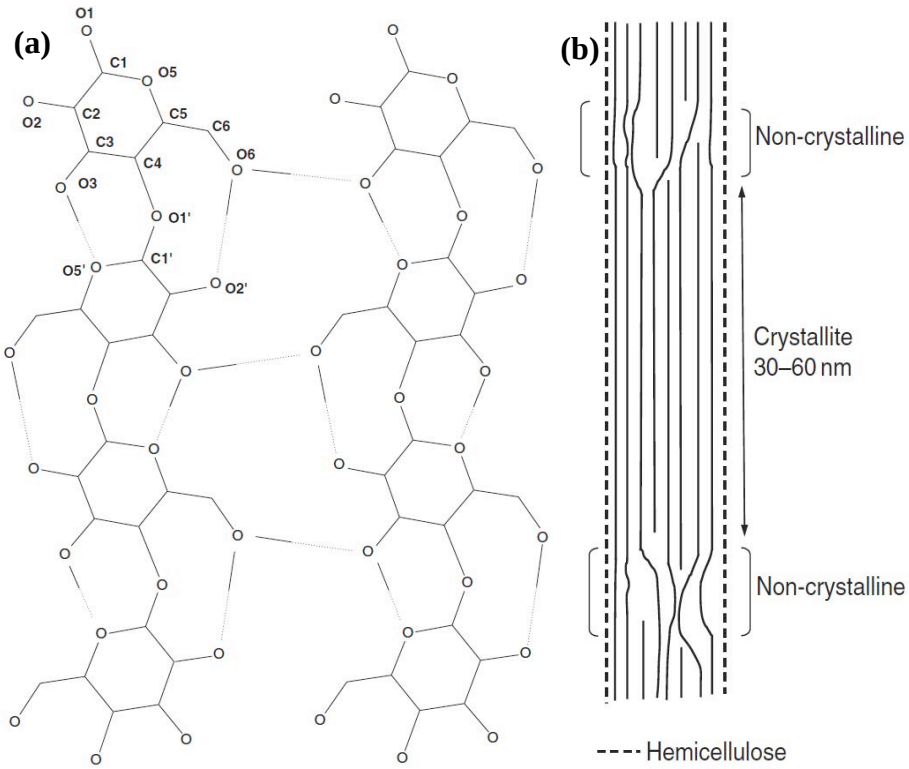


Figure 7 : Structure de la cellulose. **(a)** Réseau de liaisons hydrogène intra- et inter-chaîne au sein de la cellulose. **(b)** Représentation schématique de l'organisation des régions cristallines et amorphes d'une microfibrille de cellulose (Pereira et al., 2003).

1.B.II) Les hémicelluloses

Les hémicelluloses sont des hétéropolysaccharides composés d'une grande variété d'oses modifiés (Figure 8). Contrairement à la cellulose, elles sont ramifiées, n'existent pas sous forme cristalline, et certains groupements hydroxyles des unités osidiques constituant la chaîne principale sont naturellement acétylés. La chaîne principale d'une hémicellulose peut être soit un homopolymère (cas du xyloglucane) ou un hétéropolymère (cas des glucomannanes), et présente de courtes ramifications d'unités osidiques (1 à 3 résidus selon les hémicelluloses). Le bois des résineux et des feuillus diffère dans la proportion et le type d'hémicelluloses (Tableau 2). Dans le bois des feuillus, les xylanes (xyloglucanes et glucuronoxylanes) sont prédominants, tandis que dans le bois des résineux les mannanes (glucomannanes et galactoglucomannanes) sont les plus abondants (Girio et al., 2010; Jeffries, 1994; Sanchez, 2009). Les hémicelluloses forment des liaisons hydrogène avec la surface des microfibrilles de cellulose et des liaisons covalentes avec la matrice de lignine (Decker et al., 2008). La dégradation des hémicelluloses rend le bois fragile, démontrant l'importance de leur rôle dans les propriétés viscoélastiques du bois.

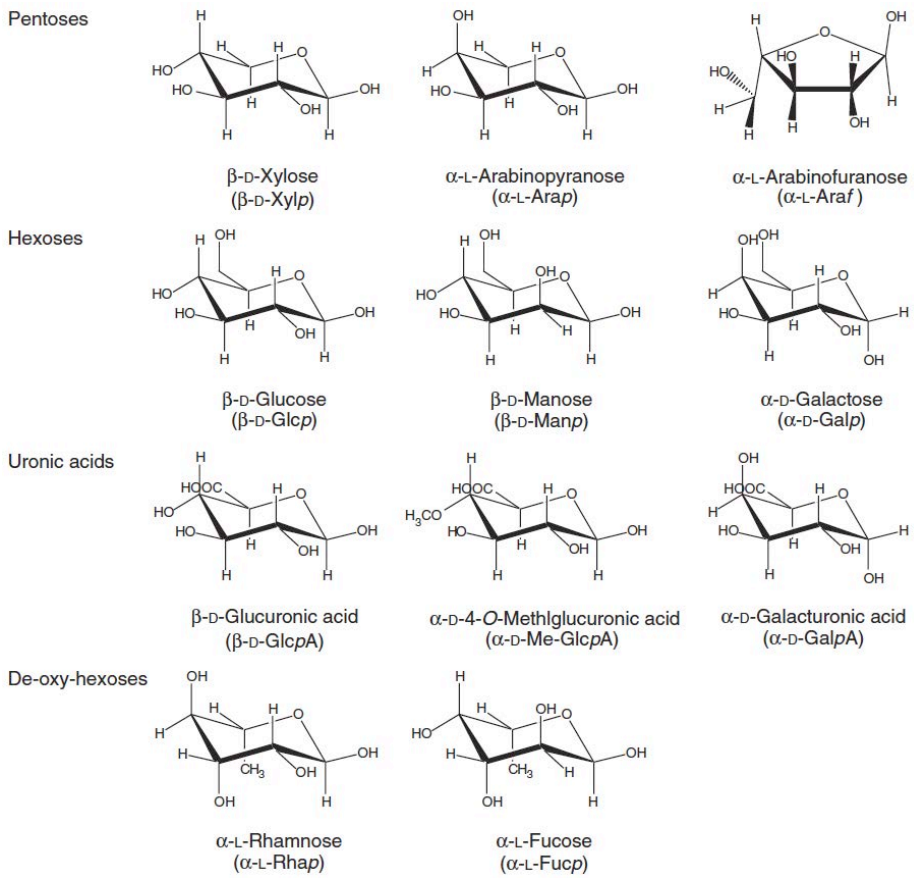


Figure 8 : Formules structurales des principaux oses composant les hémicelluloses (Pereira et al., 2003).

Tableau 2 : Principaux types de polysaccharides présents des les hémicelluloses (adapté de Girio et al., 2010). ß-D-Gal*p* : acide ß-D-galacturonique ; α-L-Ara*f* : α-L-Arabinofuranose ; ß-L-Ara*p* : ß-L-Arabinopyranose ; ß-D-Glc*p* : ß-D-Glucose ; ß-D-Xyl*p* : ß-D-Xylose ; α-L-Fuc*p* : α-L-Fucose ; ß-D-Man*p* : ß-D-Manose ; 4-O-Me-α-D-Glc*p*A : α-D-4-O-Methylglucuronic acid ; ß-L-Ara*f* : ß-L-Arabinofuranose.

Polysaccharide type	Biological origin	Abbreviation	Amount[a]	Units			DP[b]	Schematic representation
				Backbone	Side chaine	Linkage		
Arabinogalactan	Softwoods	AG	1-3;35*	ß-D-Gal*p*	ß-D-Gal*p* α-L-Ara*f* ß-L-Ara*p*	ß-(1-->6) α-(1-->3) ß-(1-->3)	100-600	
Xyloglucan	Hardwoods	XG	2-25	ß-D-Glc*p* ß-D-Xyl*p*	ß-D-Xyl*p* ß-D-Gal*p* α-L-Ara*f* α-L-Fuc*p* Acetyl	ß-(1-->4) α-(1-->3) ß-(1-->2) α-(1-->2) α-(1-->2)		
Galactoglucomannan	Softwoods	GGM	10-25	ß-D-Man*p* ß-D-Glc*p*	ß-D-Gal*p* Acetyl	α-(1-->6)	40-100	
Glucomannan	Softwoods and hardwoods	GM	2-5	ß-D-Man*p* ß-D-Glc*p*			40-70	
Glucuronoxylan	Hardwoods	GX	15-30	ß-D-Xyl*p*	4-O-Me-α-D-Glc*p*A Acetyl	α-(1-->2)	100-200	
Arabinoglucuronoxylan	Softwoods	AGX	5-10	ß-D-Xyl*p*	4-O-Me-α-D-Glc*p*A ß-L-Araf	α-(1-->2) α-(1-->3)	50-185	

[a] : %, dry biomass.
b : Degree of polymerization
* : (up to) in the heartwood of larches
, ß-D-Gal*p* ; , ß-D-Glc*p* ; , ß-D-Man*p* ; ●, ß-D-Xyl*p* ; , ß-L-Ara*f* ; ○, ß-L-Ara*p* ; , α-L-Fuc*p* ; , 4-O-Me-α-D-Glc*p*A ; ▼, Acetyl.

1.B.III) La lignine

La lignine est, après la cellulose, la matière organique renouvelable la plus abondante dans la nature. Elle est chimiquement différente des autres composés macromoléculaires contenus dans le bois. C'est un polymère amorphe synthétisé à partir de trois types de précurseurs appelés monolignols : les alcools p-coumarylique, coniférilyque et sinapylique. Les unités phénylpropanoïdes correspondantes retrouvées au sein du polymère sont connues sous le nom de : *p*-hydrophényle (H), guaiacyle (G), et syringyle (S) (Wong, 2009) (Figure 9).

Sa synthèse est initiée par déshydrogénation enzymatique du groupement alcool via des laccases ou des peroxydases entraînant la formation de radicaux phénoxy stabilisés par résonnance entre l'atome d'oxygène phénolique et les atomes de carbone 1, 3 et 5 du noyau aromatique et l'atome situé en ß de la chaîne aliphatique (Figure 10) (Sangha et al., 2012). Le reste de la synthèse se produit par couplage oxydatif de ces molécules donnant naissance à une grande variété de liaisons entre deux unités (Figure 11). La plupart de ces liaisons sont de type C-C et aryl-éther, la plus abondante étant de type aryl-glycérol ß-aryl éther (jusqu'à 50% de la totalité des liaisons au sein du polymère).

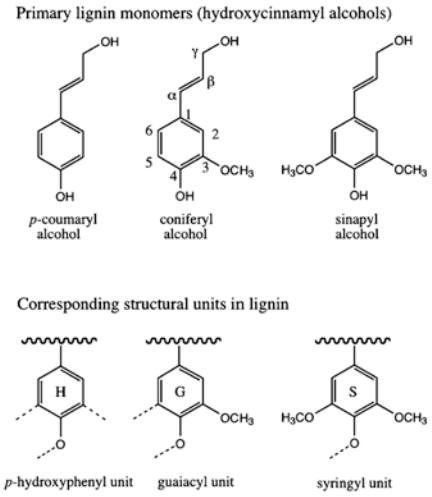


Figure 9 : Monomères primaires de la lignine et unités structurales correspondantes (Wong, 2009).

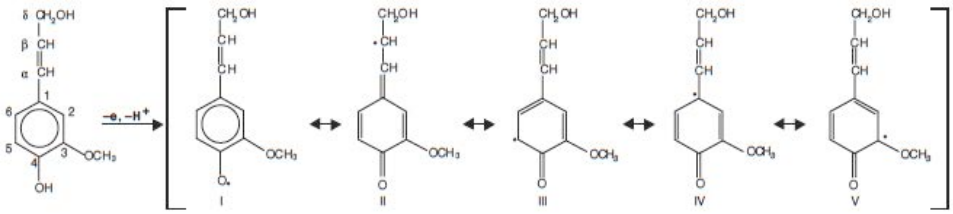


Figure 10 : Formation et stabilisation des radicaux phénoxy à partir de l'alcool coniférylique (Pereira et al., 2003).

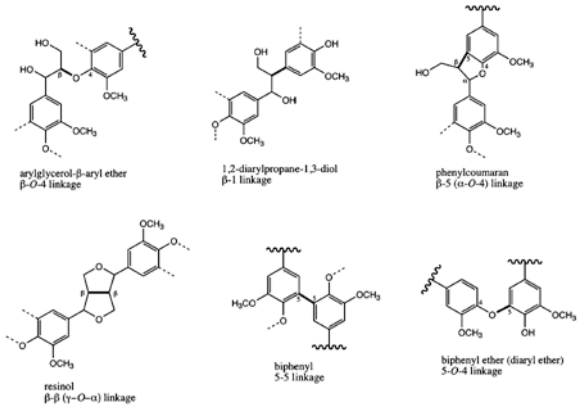


Figure 11 : Diversité des liaisons résultant du couplage des différentes formes mésomériques des monomères de lignine (Wong, 2009).

La composition et la structure de la lignine varient selon les essences considérées. La lignine des résineux est principalement composée d'unités G et d'une faible quantité d'unités H, tandis que celle des feuillus est beaucoup plus hétérogène comprenant des proportions équivalentes de groupements G et S ainsi qu'une faible quantité de groupements H (Figure 12). Le rapport S/G est classiquement utilisé pour caractériser la sensibilité de la lignine aux facteurs de dégradation (enzymes, agents chimiques, traitements physiques) et comme critère de sélection des arbres (Eckardt, 2002). Grâce à la formation de liaisons hydrogène avec les autres constituants de la paroi, et de liaisons covalentes avec les hémicelluloses, elle confère à la paroi cellulaire un rôle de support structural et de barrière contre les attaques microbiennes et le stress oxydatif.

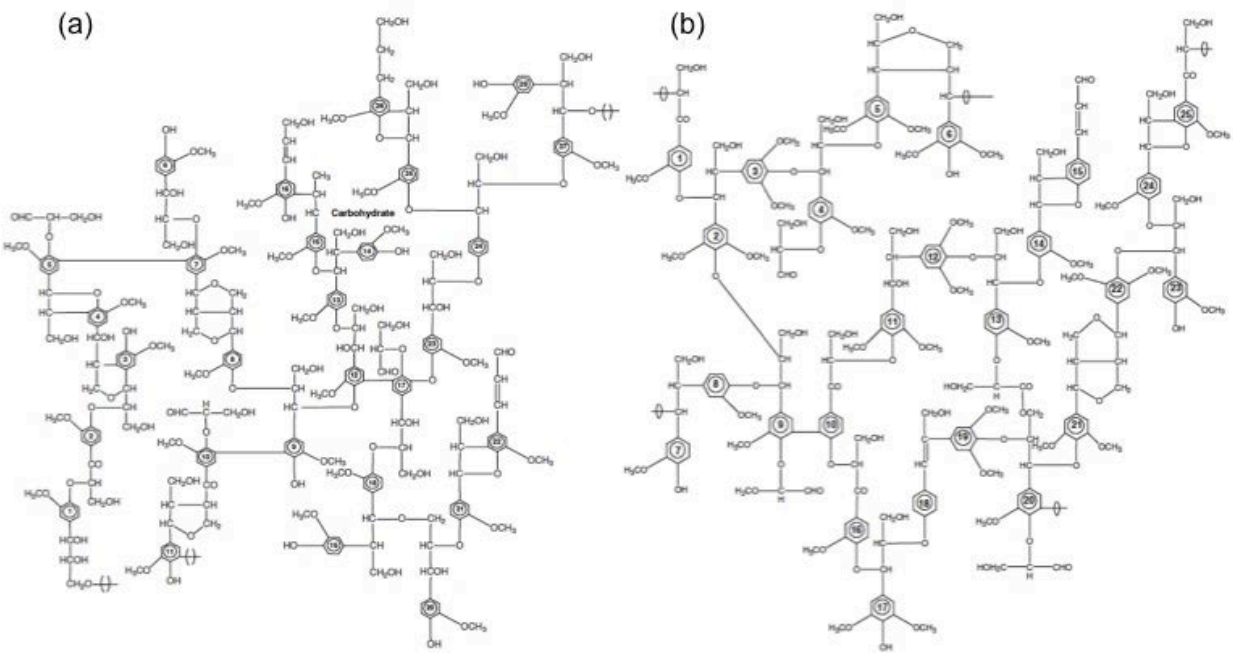


Figure 12 : Structure de la lignine des résineux **(a)** et des feuillus **(b)** (Pereira et al., 2003).

1.C) Substances de faible poids moléculaire

1.C.I) Les extractibles

Les constituants regroupés sous le terme « extractibles » sont obtenus par extraction du bois en utilisant des solvants plus ou moins polaires. Selon les essences de bois considérées, la teneur et la composition en extractibles varient de 0,5% à 20%. De nombreuses essences contiennent des substances extractibles toxiques pour les bactéries, champignons et termites tels que les terpènes (Gershenzon et Dudareva, 2007). D'autres extraits confèrent une couleur ou une odeur au bois. Une partie de ces extraits est appelée résine, terme qui ne caractérise pas la composition chimique mais plutôt un aspect physique. Parmi les extraits on retrouve aussi des glycérides (esters d'acides gras et de glycérol) et des cires (esters d'acides gras et d'alcool gras). On trouve également des composés phénoliques tels que les flavonoïdes ou les tanins (Pereira et al., 2003).

1.C.II) Terpènes et terpénoïdes

Produits par de nombreuses plantes, les terpènes sont exclusivement composés de carbone et d'hydrogène et constituent les composants majeurs de la résine des conifères. Les terpénoïdes, contrairement aux terpènes, possèdent des groupements fonctionnels supplémentaires contenant de l'oxygène tels que des fonctions alcool, carbonyle ou acide. Ils ont pour point commun d'être synthétisés à partir d'un même précurseur : l'isoprène (2-methyl-1,3-butadiene), une structure à 5 carbones (Figure 13). La condensation de deux ou plusieurs unités d'isoprène permet d'identifier plusieurs catégories de terpènes : les hémiterpènes (une unité), les monoterpènes (deux unités), les sesquiterpènes (trois unités), les diterpènes (quatre unités), les sesterpènes (cinq unités), les triterpènes (six unités) et les polyterpènes (huit et au délà) (Pereira et al., 2003).

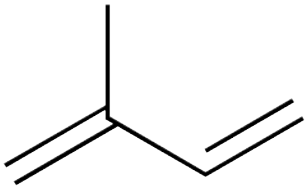
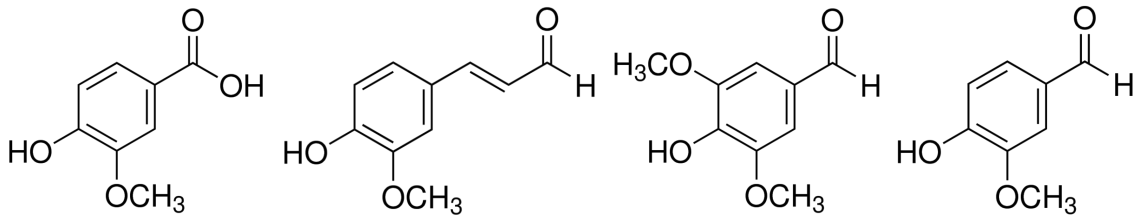


Figure 13 : Unité d'isoprène.

1.C.III) Composés phénoliques

Parmi les composés phénoliques pouvant être isolés du bois, un premier type correspond aux molécules possédant une unité phénolique dans leur structure. Ces composés sont principalement constitués de dérivés phénylpropanoïques et de leurs produits d'oxydation tels que des aldéhydes ou des acides benzoïques. Ils correspondent à des produits dérivants de la biosynthèse de la lignine ou à des produits de dégradation de cette dernière. Des analyses effectuées sur des extraits de différentes espèces de chêne ont mis notamment en évidence la présence de vanilline, de coniferaldéhyde, de syringaldéhyde et d'acide vanillique (Figure 14) (Simon et al., 1996). Ces composés posent problème lors du fractionnement du bois (purification, fermentation ou transformation chimique de la cellulose) en vue de son usage industriel (papeterie, production de biocarburants, bioraffinerie) mais ils possèdent également des propriétés médicinales. La vanilline par exemple présente des propriétés anti microbiennes, anti oxydantes, et sert d'agent chimio protecteur lors d'inflammations ou de cancers (Lee et al., 2012). Chez les champignons, elle induit un stress chimique et active les voies métaboliques des composés phénoliques (Nakamura et al., 2012; Shimizu et al., 2005).



Acide vanillique | Coniferaldéhyde | Syringaldéhyde | Vanilline

Figure 14 : Composés phénoliques simples isolés à partir d'extraits de hêtre.

Un second groupe de constituants phénoliques, présents dans les résineux et les feuillus, est constitué par les lignanes. Ces composés correspondent à des dimères d'unités phénylpropane de structure souvent similaire à ceux rencontrés dans la lignine. Les lignanes les plus communs possèdent des liaisons de type ß-O-4 et ß-ß comme dans le pinorésinol issu des résineux ou le syringarésinol issu des feuillus (Figure 15) (Pereira et al., 2003).

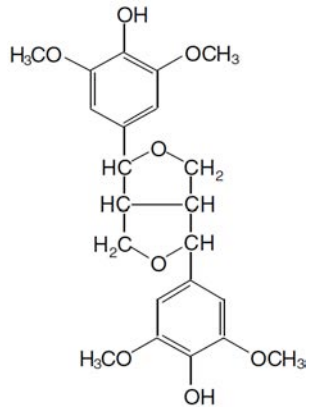


Figure 15 : Structure chimique d'une lignane de feuillus : le syringrésinol (Pereira et al., 2003).

Un autre groupe de composés aromatiques rencontrés plus fréquemment dans le bois de cœur est constitué par les stilbénoïdes (Figure 16). Ils sont capables d'inhiber la croissance des champignons et sont synthétisés en réponse aux attaques des insectes xylophages. Ils sont également responsables du noircissement du bois induit par la lumière et posent aussi des difficultés dans la production de pâte à papier (Pereira et al., 2003).

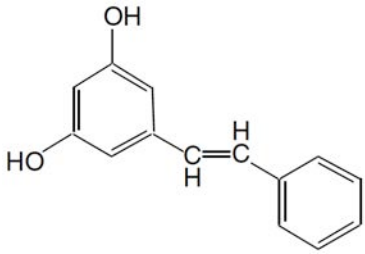


Figure 16 : Exemple de stilbène : la pinosylvine (Pereira et al., 2003).

Les flavonoïdes sont un autre groupe important que l'on retrouve dans les extractibles de bois. Ils possédent une structure composée trois cycles de type C6-C3-C6. La structure du cycle central, ainsi que ses différentes substitutions, définissent les différentes classe de flavonoïdes : flavones, flavanes, flavanones, isoflavones, chalcones et aurones. Le plus répandu des flavonoïdes est un flavane, la catéchine (Figure 17). La synthèse de ces composés par l'arbre constitue un moyen de défense contre des attaques fongiques (Danielsson et al., 2011).

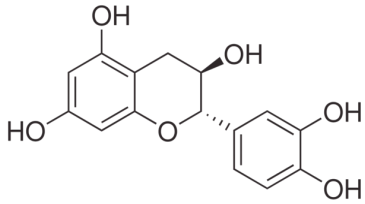


Figure 17 : Structure de la catéchine.

La dernière classe de composés phénoliques est celle des tanins. Ce sont des substances organiques retrouvées principalement chez les feuillus et en quantité moindre chez les résineux. Ils peuvent se diviser en quatre groupes sur la base de leurs propriétés structurales : les gallotanins, les ellagitanins, les tanins complexes et les tanins condensés (Khanbabaee et van Ree, 2001) (Figure 18). Les tanins contenus dans le bois sont utilisés pour tanner les peaux conférant aux cuirs leur imputrescibilité, cependant ils posent problème lors de la production de pâte à papier (Pereira et al., 2003). Par contre, ils sont essentiels en tonnellerie car confèrent aux vins et alcools des arômes recherchés (Prida et al., 2007; Prida et Puech, 2006).

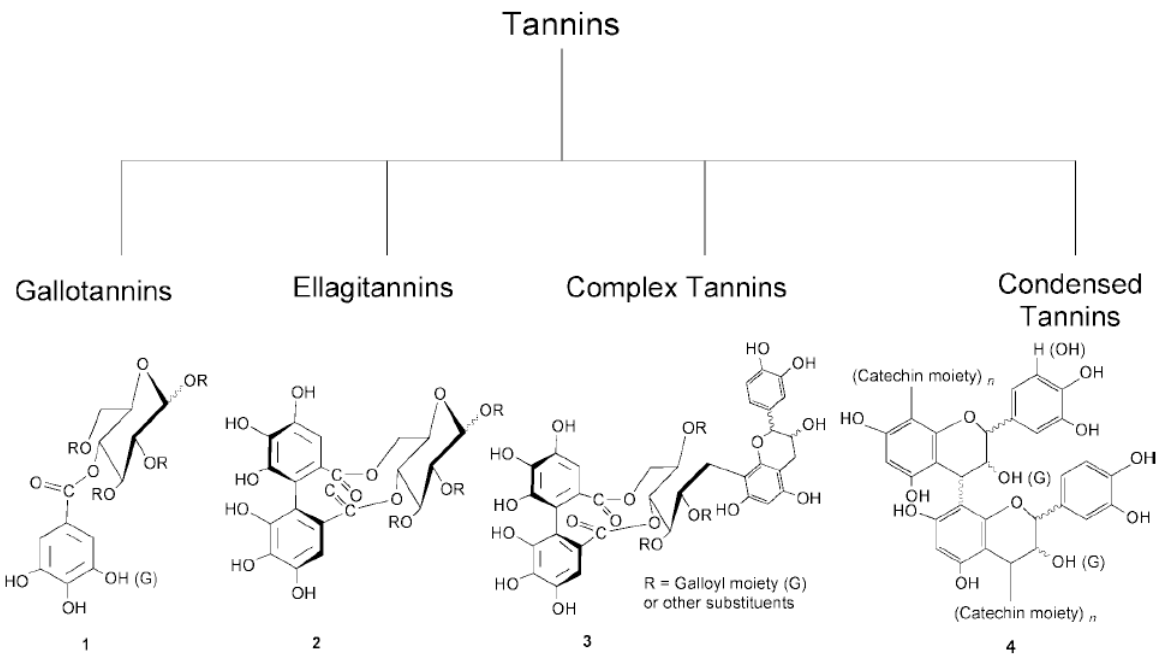


Figure 18 : Classification des tanins. (1) gallotanins, (2) ellagitanins, (3) tanins complexes, (4) tanins condensés (Khanbabaee et van Ree, 2001).

1.C.IV) Les inertes

Le bois contient de faibles quantités de matières minérales appelées cendres. Leur proportion massique oscille entre 0,3 et 1% et leur composition varie en fonction de l'essence et surtout du lieu de croissance de l'arbre. Leur présence constitue une gêne majeure pour les chaudières collectives ou industrielles tandis qu'elle représente un élément majeur de la gestion de la fertilité des sols forestiers.

2) Diversité des microorganismes saprophytes

Les microorganismes saprophytes sont des bactéries et des champignons capables de se nourrir de matière organique morte en mobilisant le carbone et l'azote à partir de composés complexes (cellulose, hémicellulose et lignine dans le cas du bois). Les champignons saprophytes sont les agents principaux de la décomposition du bois dans les forêts jouant un rôle central dans le cycle des nutriments et la dynamique du carbone. Au fur et à mesure de la progression de la dégradation du bois, les propriétés physiques et chimiques de ce dernier évoluent en parallèle avec un renouvellement des communautés fongiques. Les premières espèces présentes sont remplacées par d'autres plus adaptées au substrat ; par conséquent, il y a donc une corrélation importante entre la composition chimique du bois et la succession des espèces impliquées dans sa dégradation (Rajala et al., 2012).

La connaissance actuelle des champignons saprophytes, de leur préférence d'hôte, ainsi que de leur succession durant la décomposition du bois est basée principalement sur l'observation macroscopique de leurs fructifications (Allen et al., 2000; Fukasawa et al., 2009a; Jönsson et al., 2008; Nordén et al., 2004) et de leurs mycelia isolés grâce à des milieux de culture artificiels (Fukasawa et al., 2009b; Lumley et al., 2001). Cependant, ces deux approches ne permettent pas un inventaire exhaustif d'une communauté car certains champignons ne forment pas de fructifications, et seulement une petite partie d'entre eux peut être cultivée *in vitro*.

Récemment, les techniques basées sur les acides nucléiques (électrophorèse sur gel en gradient dénaturant et polymorphisme de longueur des fragments de restriction) ont été appliquées à l'extraction et l'identification des espèces présentes sur le bois en décomposition (Allmer et al., 2006; Kebli et al., 2011; Kulhankova et al., 2006; Ovaskainen et al., 2010; Rajala et al., 2011; Rajala et al., 2010; Reddy et al., 2003 Rajala et al., 2012). Les nouvelles techniques de séquençage à haut débit (pyroséquençage) ont également été adaptées à l'analyse des communautés fongiques dans le sol (Buee et al., 2009) ainsi que dans le bois mort (Kubartová et al., 2012; Ovaskainen et al., 2010). Ces nouvelles approches, n'étant pas limitées à des groupes fonctionnels ou taxonomiques, offrent une meilleure compréhension de la diversité fongique et de ses interactions avec les facteurs environnementaux tels que la composition du substrat, son stade de décomposition, l'humidité, la distance par rapport au sol... (Rajala et al., 2012)

Les champignons décomposeurs du bois assurent leur nutrition par digestion enzymatique des constituants du bois (Rabinovich et al., 2002; Sanchez, 2009), et leur action

aboutit à une diminution des propriétés mécaniques et esthétiques du bois, la phase ultime de destruction étant la « pourriture » du matériau. Le mycélium de ces champignons se développe dans les vides cellulaires des fibres ou vaisseaux et s'étend sur tout le plan ligneux. Il existe plusieurs groupes écologiques de champignons se développant sur ou dans le bois, chacun ayant des propriétés d'attaque spécifiques observables à l'échelle macroscopique résultant de leur différentes activités enzymatique (Cf. § 3) : les agents de bleuissement, les champignons de pourriture blanche, les champignons de pourriture brune et les champignons de pourriture molle (Schwarze et al., 2000). Le tableau 3 résume les caractéristiques de l'attaque du bois par ces différents groupes écologiques.

Tableau 3 : Caractéristiques anatomiques et chimiques du bois attaqué par les différents types de champignons saprophytes (tiré de Schwarze et al., 2000).

	White rot		Brown rot	Soft rot	Stain fungi
Decay aspect and consistency	Bleached appearance, lighter in color than sound wood, moist, soft, spongy, strength loss after advanced decay.		Brown, dry, crumbly, powdery, brittle consistency, breaks up like cubes, drastic loss of strength at initial stage of decay. Very uniform ontogeny of wood decay.	Soft consistency in wet environments. Brown and crumbly in dry environment. Generally uniform ontogeny of wood decay.	Discoloration sapwood areas (specks, spots and patches), blue (softwood), black (hardwood), red, or other colors. Discoloration due to colored hypha, or physiological response of tree against damage.
Host (wood-type)	Simultaneous rot	Selective delignification			
	Hardwood, rarely softwood	Hardwood and softwood	Softwoods; seldom hardwoods. Forest ecosystems and wood in service.	Generally hardwoods (softwoods very slightly degraded). Forest ecosystems, waterlogged woods, historic archaelogical wood, utility poles.	Both softwoods and hardwoods in forest ecosystems, and during transport and storage of timber.
Cell-wall constituents degraded	Cellulose, lignin and hemicellulose. Brittle fracture.	Initial attack selective for hemicelluloses and lignin, later cellulose also. Fibrous feature.	Cellulose, hemicelluloses. Lignin slightly modified. In some cases, extended degradation of hardwood (including middle lamella).	Cellulose and hemicelluloses, lignin slightly altered.	Wood extractives and water soluble compounds (sugars and starch).
Anatomical features	Cell wall attacked progressively from lumen. Erosion furrows associated with hyphae.	Lignin degradation in middle lamella and secondary wall. Middle lamella dissolved by diffusion mechanism (not in contact with hyphae), radical cavities in cell wall.	Degradation at a great distance from hyphae (diffusion mechanism). Entire cell wall attacked rapidly with cracks and clefts.	Cell wall attack in the proximity of hyphae starts from cell lumen. Facultative soft-rot decay by some basidiomycetes.	Colonization primarily affecting ray parenchyma and resin channels (produced through pits).
Causal agents	Basidiomycetes (e.g. *Trametes versicolor, Phanerochaete chrysosporium and Heterobasidion annosum)* and some Ascomycetes (e.g. *Xylaria hypoxylon*).	Basidiomycetes (e.g. *Ganoderma australe, Phlebia tremellosa, Ceriporiopsis subvermispora, Pleurotus* spp. and *Phellinus pini*).	Basidiomycetes exclusively (e.g. *Coniophora puteana, Gloeophyllum trabeum, Laetiporus sulphureus, Piptoporus betulinus, Postia placenta* and *Serpula lacrimans*).	Ascomycetes (*Chaetomium globosum, Ustulina deusta*) and Deuteromycetes (*Alternaria alternata, thielavia terrestris*). Some white (*Inonotus hispidus*) and brown-rot (*Rigidoporus crocatus*), basidiomycetes cause facultative soft-rot decay.	Ascomycetes (e.g. *Ophiostoma* and *Ceratocystis* spp.) and Deuteromycetes (e.g. *Aureobasidium pullulans, Phialophora* spp. and *Trichoderma* spp.)

La succession des différents groupes écologiques en fonction de l'état de décomposition du bois est représentée en figure 19. Un grand nombre d'espèces présentes appartiennent à des groupes écologiques inconnus, généralement des ascomycètes, pouvant être des champignons endophytes ou des agents de bleuissement (Rajala et al., 2012). La plupart des endophytes, déjà présents au sein des arbres vivants, pourraient évoluer du statut d'endophytes latents vers saprophytes à la mort de l'hôte (Menkis et al., 2004; Parfitt et al., 2010). Parmi les champignons possédant un statut écologique défini, les colonisateurs initiaux sont les champignons de pourriture molle, avec les champignons de pourriture brune et blanche. Ces deux derniers groupes seront prédominants jusqu'aux stages de décomposition avancée pour finalement se retirer au profit des champignons ectomycorhiziens (ECM). Les ECM apparaissent lors des stades précoces de la dégradation et seront retrouvés tout le long du processus. Leur présence demeure encore énigmatique. Certains auteurs avancent l'hypothèse que les ECM pourraient vivre en tant que saprophytes facultatifs (Bodeker et al., 2009; Rajala et al., 2012) ou alors qu'ils prélèvent les nutriments depuis le mycélium vivant ou mort des espèces saprotrophiques (Buée et al., 2007; Lindahl et al., 1999). Leur prédominance durant les stades tardifs serait due à la diminution des polymères constitutifs du bois et d'une teneur augmentée en azote (Lindahl et al., 2007).

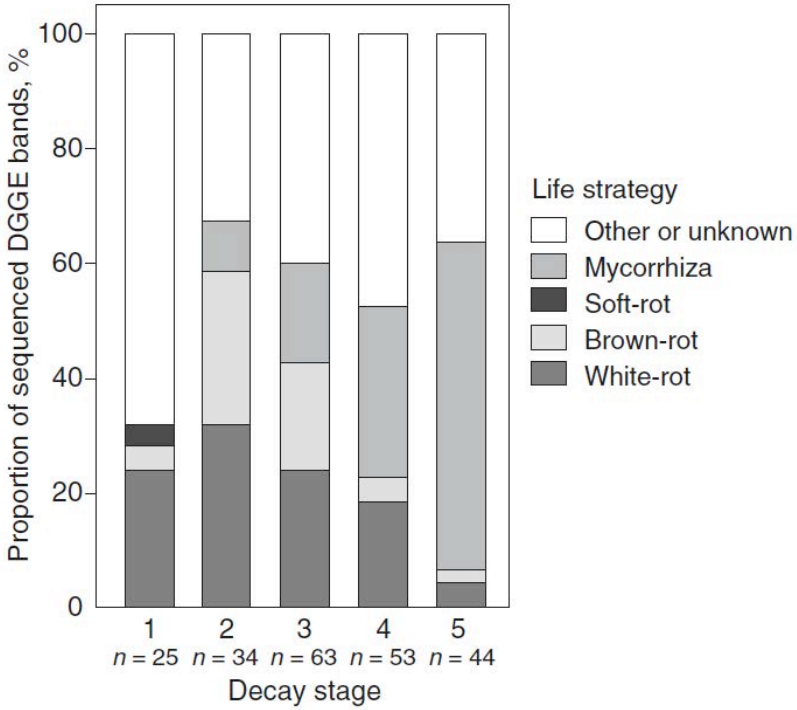


Figure 19 : Succession des différents groupes écologiques en fonction du stade de décomposition du bois (5 étant le plus avancé). L'identification des différentes espèces a été réalisée par séquençage de bandes issues d'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (Rajala et al., 2012).

2.A) Moisissures (« Moulds ») et agents de bleuissement (« Blue stain »)

Les moisissures (Ascomycètes, Deutéromycètes ou Zygomycètes) et les agents de bleuissement (Ascomycètes) se développent uniquement à la surface du bois dans les cavités naturellement présentes ou bien produites par d'autres organismes. Pour ces deux groupes les principales sources de nutriments semblent être des oses ou des carbohydrates simples présents dans le bois de cœur. Leur développement se traduit par une coloration de la surface du bois due à la pigmentation de la paroi des hyphes, ou à la réaction des extractibles avec des composés métaboliques provenant du champignon (Hon et Minemura, 2001) (Figure 20). Ces champignons se développent principalement sur les bois de résineux et de feuillus des zones tempérées (pin, hêtre, frêne, peuplier).

Figure 20 : Coloration de la surface du bois due à la présence d'agents de bleuissement (http://www.wiseacre-gardens.com/).

2.B) Les agents de pourriture molle (« Soft rot »)

Ces champignons sont les premiers colonisateurs du bois en milieu naturel. Ils appartiennent à la famille des Ascomycètes et des Deutéromycètes dont le plus étudié est *Chaetomium globosum*. Capables de dégrader la cellulose et les hémicelluloses mais seulement partiellement la lignine, leur présence est surtout observée dans des environnements humides (contact avec le sol, milieux aquatiques) à forte teneur en azote. Le bois dégradé par ce type de pourriture présente un aspect gris-noirâtre ainsi qu'un affaiblissement mécanique très marqué. Deux types distincts de pourriture molle sont actuellement reconnus. Le type 1 induit des cavités longitudinales formées à l'intérieur de la paroi secondaire tandis que le type 2 entraîne une

érosion entière de la paroi secondaire (Figure 21). Dans les deux cas, la lamelle moyenne n'est pas dégradée mais peut être modifiée aux stades de décomposition avancés (Blanchette, 2000; Nilsson et al., 1989).

La destruction de la paroi cellulaire se produit au voisinage immédiat de l'hyphe sous l'action de systèmes enzymatiques et non-enzymatiques qui restent mal connus car peu étudiés. Les vaisseaux des feuillus, aux parois hautement lignifiées majoritairement composées d'unités guaïacyles, seraient plus résistants que les fibres dont les parois sont moins lignifiées et composées d'unités guaïacyles et syringyles (Daniel et Nilsson, 1998).

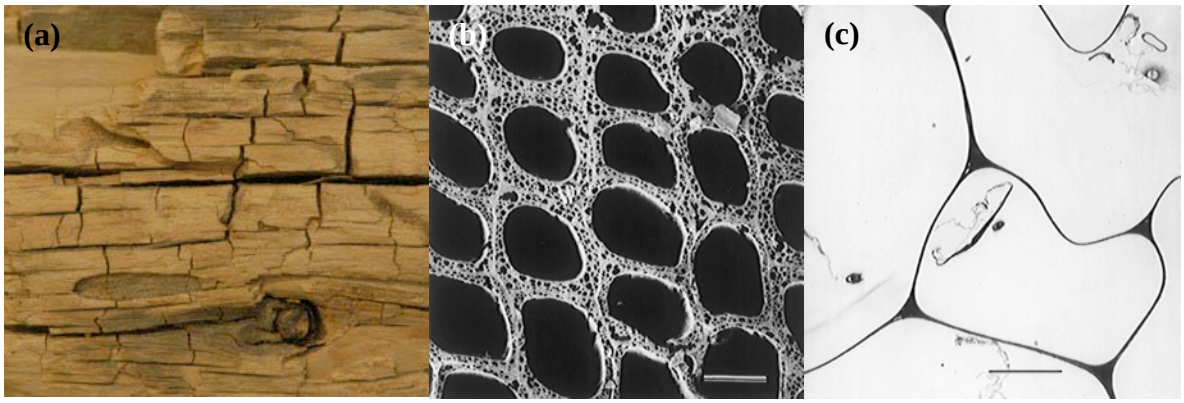


Figure 21 : Attaque du bois par la pourriture molle à différentes échelles. **(a)** Caractéristique macroscopique de l'attaque. **(b)** Caractéristique microscopique de l'attaque de type 1 : apparition des cavités au sein de la paroi secondaire. **(c)** Caractéristique microscopique de l'attaque de type 2 : érosion complète de la paroi secondaire laissant intacte la lamelle moyenne (Blanchette, 2000).

2.C) Les agents de pourriture brune (« Brown rot »)

Aussi appelée pourriture cubique à cause de l'aspect du bois attaqué, elle est induite par des champignons dégradant la cellulose et les hémicelluloses. En revanche ces derniers sont incapables de digérer complètement la lignine et ne peuvent que la modifier chimiquement. Les champignons de pourriture brune sont des Basidiomycètes appartenant majoritairement à la famille des Polyporaceae et seulement 6% des champignons décomposeurs du bois appartiennent à ce type de pourriture (Schwarze et al., 2000). D'un point de vue écologique, ils attaquent principalement les résineux, dont ils sont les décomposeurs essentiels dans les forêts, et rarement les feuillus. De plus ils sont fortement impliqués dans la dégradation du bois matériau (Eriksson et al., 1990). Le bois attaqué par ces champignons présente une perte rapide de ses qualités mécaniques exhibant alors un aspect friable, brun foncé, avec des fractures en quadrillage d'où son appellation de « cubique » (Figure 22).

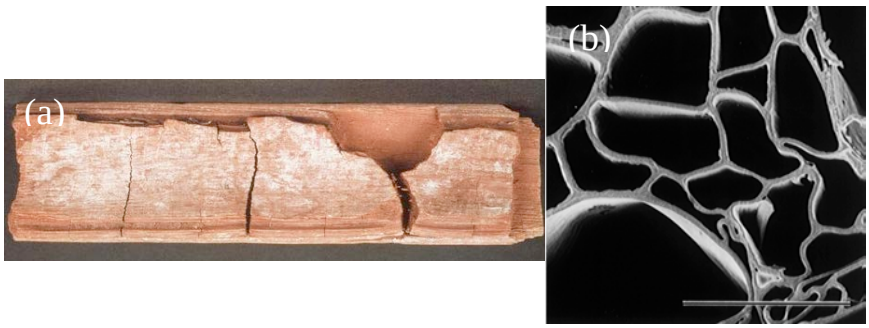


Figure 22 : Attaque du bois par la pourriture brune à différentes échelles. **(a)** Morceau de bois attaqué par une pourriture brune présentant des fractures de type cubique. **(b)** Microscopie montrant les cellules dégradées ayant une paroi poreuse et fragile (Blanchette, 2000).

La dégradation du bois réalisée par la pourriture brune fait appel à des systèmes enzymatiques et non-enzymatiques et se déroule selon plusieurs phases (Blanchette et al., 1997). La première implique des agents de faible poids moléculaire et la production de radicaux libres qui vont initier la dépolymérisation de la fraction cellulosique à distance de l'hyphe. Plusieurs études ont démontré que les enzymes lignocellulolytiques, trop larges pour pénétrer dans la paroi cellulaire intacte du bois, causent la dégradation des constituants macromoléculaire situés au voisinage immédiat de l'hyphe, et que les systèmes non enzymatiques jouent un rôle crucial dans le processus global de la biodégradation de la lignocellulose par la pourriture brune (Arantes et Milagres, 2009; Arantes et al., 2011; Green et Highley, 1996). L'hémicellulose, qui entoure la cellulose, est aussi affectée afin que cette dernière puisse devenir accessible. Cette dégradation de l'hémicellulose serait responsable de la perte rapide des propriétés mécaniques du bois. La deuxième phase implique des systèmes enzymatiques (exo-endo) qui participent à la dégradation des chaînes de cellulose issues de la dépolymérisation des microfibrilles (Winandy et Morrel, 1993).

2.D) Les agents de pourriture blanche (« White rot »)

Ces champignons sont présents dans tous les principaux groupes de Basidiomycètes. Il existe cependant quelques Ascomycètes, appartenant à la famille des Xylariaceae, qui peuvent causer une pseudo-pourriture blanche (pourriture molle de type 2 : Blanchette, 1995; Liers et al., 2006). Les champignons de pourriture blanche sont les seuls organismes capables de dégrader complètement la totalité des composants majeurs du bois à savoir la cellulose, l'hémicellulose et surtout la lignine dont ils sont les décomposeurs microbiens les plus efficaces dans la nature (Eriksson et al., 1990). Aucun autre microorganisme en culture pure ne possède cette capacité à

minéraliser les tissus lignifiés (Hatakka, 2001; Kirk et Cullen, 1998). Le bois colonisé est fortement ramolli, de couleur blanchâtre et se décompose en fibrilles (Figure 23).

Figure 23 : Attaque du bois par la pourriture blanche à différentes échelles. **(a)** Morceau de bois attaqué par la pourriture blanche présentant un aspect fibreux. **(b)** Microscopie montrant la dégradation de tout les composant de la paroi cellulaire causant de larges vides au sein du bois attaqué (Blanchette, 2000).

En milieu naturel, on les trouve généralement sur les feuillus plutôt que sur les résineux. Cette préférence d'hôte peut s'expliquer grâce à la composition de la lignine. En effet les feuillus présentent une forte teneur en unités syringyl, qui sont préférentiellement dégradées, contrairement à la lignine des résineux qui présente une forte teneur en unités guaïacyl plus résistantes à la dégradation (Hatakka, 2004). La plupart des champignons de pourriture blanche colonisent la lumière de la cellule et causent une érosion de la paroi cellulaire. Les zones érodées fusionnent au fur et à mesure que progresse la décomposition causant la formation de larges cavités. Ce type de pourriture est appelée non sélective ou encore pourriture simultanée (Figure 24) (Blanchette, 1995). *Trametes versicolor, Fomes fomentarius* et *Phellinus robustus* sont des représentants typiques des organismes générant ce type d'attaque (Eriksson et al., 1990).

Certains champignons de pourriture blanche (appelés pourriture sélective) dégradent préférentiellement la lignine préalablement aux carbohydrates, et causent dans la nature des cavités appelées poches blanches (Figure 25) (Schwarze et al., 2000). *Phellinus nigrolimitatus, Ceriporiopsis subvermispora* et *Phlebia radiata* sont des organismes représentatifs de ce type d'attaque (Blanchette, 1995). La délignification commence à la surface de la lumière, progresse à travers la paroi cellulaire pour atteindre la lamelle moyenne, qui peut être totalement dissoute, et conduit à la formation d'un anneau autour de la paroi majoritairement constituée de cellulose non dégradée (Goddell et al., 2008). Il existe également des champignons capables de produire les deux types d'attaque dans le bois infecté comme par exemple *Heterobasidion annosum* (Eriksson et al., 1990).

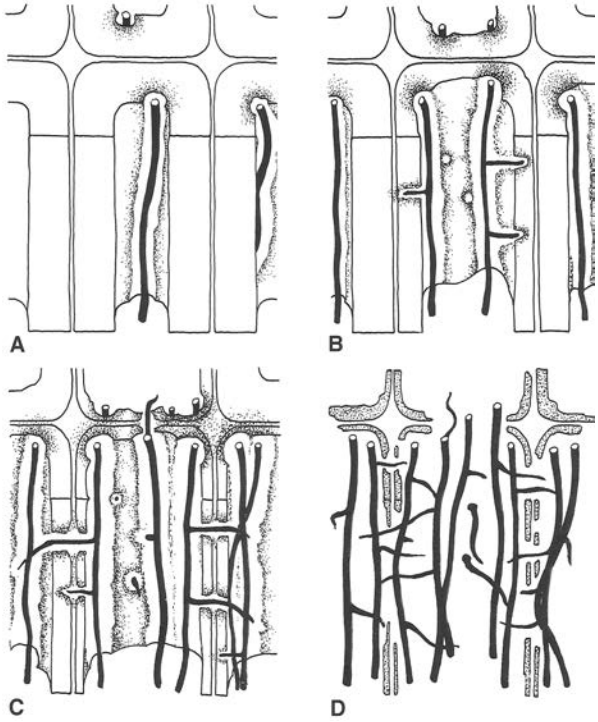


Figure 24 : Stages de développement de la pourriture simultanée. **(A)** Au stade précoce, la dégradation de la paroi cellulaire a lieu dans le voisinage immédiat de l'hyphe. **(B)** La paroi cellulaire est progressivement attaquée depuis l'intérieur vers l'extérieur. Des hyphes individuels pénètrent dans la paroi. **(C)** La paroi cellulaire devient très mince et de nombreuses perforations apparaissent entre deux cellules voisines. **(D)** Au stade tardif, la dégradation de la lamelle moyenne et du restant de la cellule a lieu (Schwarze et al., 2000).

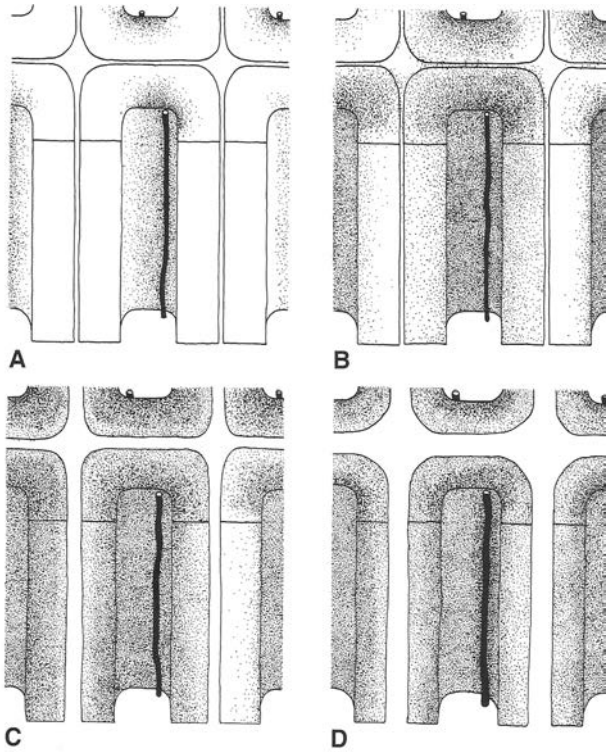


Figure 25 : Stades de progression de la pourriture sélective. **(A),(B)** Au stade précoce les enzymes (représentées par des points) diffusent dans la paroi secondaire depuis l'hyphe en croissance dans la lumière causant la dégradation de la lignine qui s'étend jusqu'à la lamelle moyenne. **(C),(D)** Au stade tardif la dégradation préférentielle de la lignine conduit à la séparation des cellules (Schwarze et al., 2000).

3) Diversité des systèmes enzymatiques impliqués dans la décomposition du bois :

La compréhension des systèmes de dégradation mis en jeu par les différents types de pourriture a fortement évoluée ces dernières années grâce à l'apport du séquençage de plusieurs champignons décomposeurs du bois (Martin et al., 2011), mais aussi grâce aux études d'analyse transcriptomiques et du sécrétome, permettant l'identification de gènes fortement régulés lors de la dégradation du bois (MacDonald et al., 2011; Macdonald et Master, 2012; Martinez et al., 2009). D'une façon générale, la dégradation des différents polymères constitutifs du bois fait appel à l'utilisation d'enzymes spécifiques (cellulases, hémicellulases et oxydases) mais également à des processus oxydatifs. Ces deux systèmes reposent sur la chimie de Fenton, et sur l'utilisation d'enzymes répertoriées dans deux bases de données : les enzymes actives envers les carbohydrates (CAZys, comprenant les hydrolases de glycosides (GH) et les estérases de carbohydrates (CE) (Cantarel et al., 2009)) et les enzymes fongiques oxydatives de la lignine (FOLys) (Levasseur et al., 2008). L'analyse du contenu en CAZys (11 GH et 6 CE) et en oxydoréductases (7 familles) parmi 16 génomes fongiques comprenant 9 pourritures blanches et 7 pourritures brunes est détaillée dans le tableau 4.

Les familles GH6, GH7, (cellobiohydrolases) participent à la dégradation de la cellulose. La famille GH61 comprend des protéines ne possédant pas d'activité hydrolytique liée à la dégradation de la cellulose (Karlsson et al., 2001; Koseki et al., 2008) mais pouvant agir en tant que monooxygénases à cuivre qui catalysent le clivage oxydatif de la cellulose en synergie avec les cellobiose déshydrogénases. Depuis cette découverte, les enzymes appartenant à cette famille on été renommées en monooxygénases de polysaccharide (PMO) (Phillips et al., 2011; Vaaje-Kolstad et al., 2010). La distribution de ces 3 familles, très diversifiées chez les champignons de pourriture blanche et faiblement représentées voire absentes chez les champignons de pourriture brune, suggère que ces deux groupes écologiques utilisent deux mécanismes différents afin de dégrader la cellulose (Floudas et al., 2012).

Les familles GH43, GH74, CE1 et CE12 sont impliquées dans la dégradation de l'hémicellulose, de la cellulose amorphe et des oligosaccharides. La famille GH43 est composée de protéines possédant six activités enzymatiques reconnues liées à la dégradation de l'hémicellulose (Skjøt et al., 2001). La famille GH74 contient des endoglucanases, des cellobiohydrolases et des xyloglucanases tandis que les familles CE1 et CE12 sont des estérases de carbohydrates spécifiques des hémicelluloses (Cantarel et al., 2009).

Tableau 4 : Tableau comparatif du nombre de copies de CAZymes et d'oxydoréductases selon le groupe écologique (adapté de Floudas et al., 2012). Ha : *Heterobasidion annosum* ; Sh : *Stereum hirsutum* ; Pu : *Punctularia strigosozonata* ; Fm *Fomitiporia mediterranea* ; Ad : *Auricularia delicata* ; Tv : *Trametes versicolor* ; Ds : *Dichomitus squalens* ; Pc : *Phanerochaete chrysosporium* ; Sc : *Schizophyllum commune* ; Pp : *Postia placenta* ; Wc : *Wolfiporia cocos* ; Fp : *Fomitopsis pinicola* ; Gt : *Gloeophyllum trabeum* ; Sl : *Serpula lacrymans* ; Cp : *Coniophora puteana* ; Da : *Dacryopinax sp.* GH : glycosyl hydrolases ; CE : carbohydrate esterases ; POD : class II peroxidases ; MCO : multicopper oxidases ; CRO : copper-radical oxidases ; CDH : cellobiose dehydrogenase ; GLP : Fe(III)-reducing glycopeptides ; QRD : quinone reductases.

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

0	1	2	5	10	15	20	25	30

Les familles GH3, GH5, GH10, GH12, GH28, CE8, CE15 et CE16 participent à plusieurs aspects de la dégradation des carbohydrates avec diverses activités comme les endoglucanases (GH12 et GH5 en partie), xylanases (GH10), mannanases (GH5 en partie), enzymes liées à la dégradation de la pectine (CE8, GH28 CEs) et des enzymes impliquées dans la dégradation du cellobiose et du xylobiose (GH3). Globalement, il existe peu de différence de distribution entre ces familles, indiquant leur importance dans l'acquisition de nutriments indépendamment du type écologique (Floudas et al., 2012).

Les peroxydases de classe II, regroupant les lignine peroxydases, les peroxydases à manganèse et les peroxydases versatiles, impliquées dans la dégradation de la lignine (Cf. § 3.C), sont distribuées au sein des pourritures blanches et quasiment absentes chez les pourritures brunes. Cette déficience en peroxydases confirme l'absence de système ligninolytique chez les champignons de pourriture brune. Les autres enzymes oxydatives (à l'exception des cellobiose déshydrogénases) sont distribuées aussi bien chez les champignons de pourriture blanche que chez les champignons de pourriture brune et sont impliquées dans la dégradation du bois par des processus oxydatifs détaillés plus bas.

3.A) Dégradation de la cellulose

Le système cellulolytique des champignons saprophytes se compose principalement d'enzymes sécrétées contrairement au système bactérien qui repose sur l'utilisation de systèmes complexes liés à la membrane connu sous le nom de cellulosome (Lynd et al., 2002). Bien que la dégradation de la cellulose par les champignons soit étudiée depuis les années 50 (Reese et Levinson, 1952), sa compréhension a été fortement améliorée au cours des dernières années ; notamment grâce aux études menées sur la contribution des systèmes oxydatifs dans ce processus (Phillips et al., 2011; Suzuki et al., 2006), la détection d'endoglucanases processives chez les champignons de pourriture brune (Cohen et al., 2005; Yoon et al., 2007), et plus récemment avec la caractérisation des PMO (Žifčáková et Baldrian, 2012). Le séquençage du génome des représentants majeurs des différents types de pourritures tels que *Phanerochaete chrysosporium* (Martinez et al., 2004), *Postia placenta* (Martinez et al., 2009) et *Ceriporiopsis subvermispora* (Fernandez-Fueyo et al., 2012b) ont permis une meilleure compréhension de ces systèmes de dégradation grâce notamment à la génomique comparative (Eastwood et al., 2011; Fernandez-Fueyo et al., 2012a; Floudas et al., 2012). Ces études récentes ont permis de confirmer l'utilisation de deux systèmes enzymatiques majeurs lors de la dégradation de la cellulose par les champignons décomposeurs du bois : un système enzymatique classique (les cellulases) et un autre oxydatif faisant appel à la chimie de Fenton et aux PMO (Figure 26).

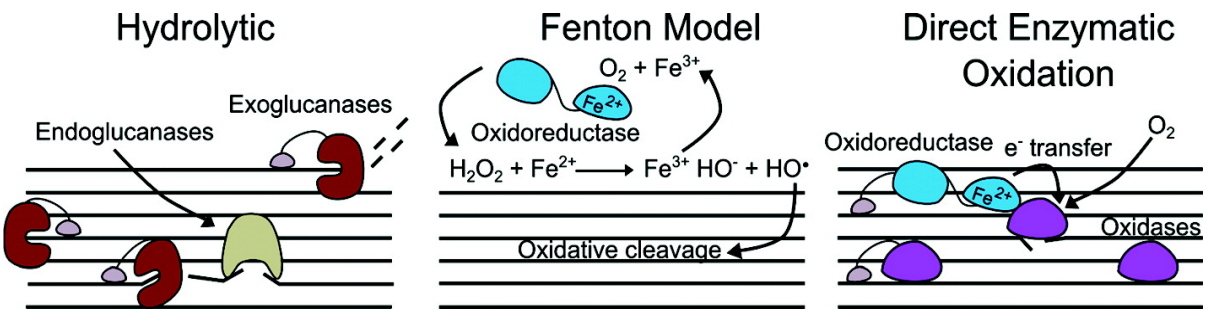


Figure 26 : Représentation schématique des mécanismes hydrolytiques et oxydatifs proposés pour la dégradation de la cellulose (Phillips et al., 2011). (Gauche) Hydrolyse enzymatique : les cellulases agissent en synergie afin d'hydrolyser les liaisons osidiques ; (Centre) Chimie de Fenton : Les radicaux hydroxyles produits via la réaction de Fenton oxydent aléatoirement la cellulose ; (Droite) Oxydation enzymatique : Une combinaison d'oxydases et d'oxydoréductases catalyse l'oxydation directe des liaison osidiques.

3.A.I) Dégradation de la cellulose par l'utilisation d'enzymes hydrolytiques :

Les enzymes dégradant la cellulose, les cellulases, présentent différentes spécificités dans leur capacité à hydrolyser les liaisons glycosidiques ß1→4. Elles sont traditionnellement divisées en trois classes selon leur activité enzymatique (Baldrian et Valaskova, 2008; Goyal et al., 1991; Rabinovich et al., 2002) : les endoglucanases ou endo-1-4-ß-glucanases (EC 3.2.1.4, GH12 et GH5 en partie), les cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91, GH6 et GH7) et les ß-glucosidases (EC 3.2.1.21, GH3 et GH5) qui peuvent être intra- ou extracellulaires (Hatakka et Hammel, 2010). Ces enzymes agissent en synergie. Les endoglucanases (EG) hydrolysent les liaisons glycosidiques internes ß1→4, préférentiellement dans les régions amorphes des microfibrilles de la cellulose, libérant ainsi de nouvelles chaînes de cellulose. Ces nouvelles extrémités vont s'ajouter à celles déjà présentes et servir de substrat aux cellobiohydrolases (CBH). Ces dernières génèrent du cellobiose, ou plus rarement des cello-oligosaccharides (cellodextrines), à partir des extrémités réductrices (CBH I) ou non réductrices (CBH II). Finalement, les ß-glucosidases vont générer du glucose à partir des unités de cellobiose libérées précédemment (Figure 27). La plupart des cellulases possèdent également un petit module de liaison à la cellulose (CBM) indépendamment replié et connecté au domaine catalytique par un linker flexible. Ces CBM sont responsables de la liaison de l'enzyme à la cellulose permettant d'améliorer l'activité de l'enzyme, en favorisant la proximité spatiale de celle-ci avec son substrat (Bayer et al., 1998; Herve et al., 2010).

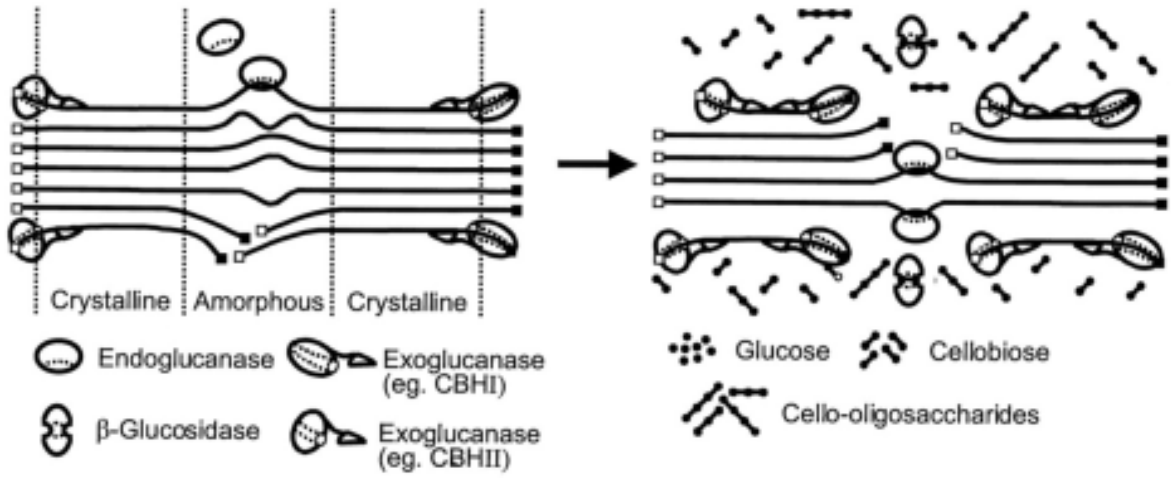


Figure 27 : Représentation schématique de l'hydrolyse synergique de la cellulose amorphe et cristalline. Les carrés pleins représentent les extrémités réductrices et les carrés vides les extrémités non réductrices (Lynd et al., 2002).

Pour pouvoir fonctionner, ce système nécessite une dégradation de la lignine permettant l'exposition et l'accès des polysaccharides constitutifs de la paroi (cellulose et hémicellulose) à ces enzymes. Chez les champignons de pourriture blanche, cette opération est réalisée par les peroxydases extracellulaires. Les champignons de pourriture brune emploient une stratégie différente ; bien qu'ils modifient la lignine, celle-ci reste dans la paroi sous forme d'un résidu polymérique (Niemenmaa et al., 2008; Yelle et al., 2008). Cependant, il semble probable que les deux types de pourriture (brune et blanche) partagent, en partie, certains mécanismes. En effet, la phylogénie moléculaire, les observation morphologiques et la spécificité de substrat suggèrent que les champignons de pourriture brune ont évolué à partir des champignons de pourriture blanche (Hibbett et Donoghue, 2001).

Comme indiqué précédemment, les champignons décomposeurs du bois utilisent des cellulases afin de dégrader la cellulose, cependant peu d'entre elles ont été identifiées chez les champignons de pourriture brune (Baldrian et Valaskova, 2008). De plus, il est depuis longtemps reconnu que la dépolymérisation de la cellulose se produit avant que la porosité du substrat soit suffisante pour permettre l'accès aux cellulases (Cowling et Brown, 1969). Une étude démontre également que le clivage des régions amorphes des microfibrilles de cellulose par le champignon de pourriture brune *Postia placenta* induit une dépolymérisation rapide mais une faible perte massique (Kleman-Leyer et al., 1992).

Les champignons de pourriture brune attaquent la cellulose au moyen d'oxydants de faible poids moléculaire qui agissent en conjonction avec un nombre limité de petites cellulases. La comparaison du contenu en enzymes de différents génomes de champignons décomposeurs du bois démontre l'absence de cellulases conventionnelles, et de la plupart des peroxydases impliquées dans la dégradation de la lignine, mais la présence d'une riche diversité d'enzymes contribuant à ces systèmes oxydatifs chez les champignons de pourriture brune (Floudas et al., 2012). Ces observations supportent l'hypothèse que les champignons de pourriture brune ont mis en place, au cours de leur évolution à partir des champignons de pourriture blanche, de nouveaux mécanismes pour initier la dépolymérisation de la cellulose. Ils se sont également affranchis d'une grande partie du dispositif de dégradation de la lignocellulose qui est maintenu chez les champignons de pourriture blanche comme *Phanerochaete chrysosporium*.

3.A.II) Dégradation de la cellulose par des processus oxydatifs

L'hypothèse d'une dégradation de la cellulose par les champignons décomposeurs du bois grâce à des systèmes non enzymatiques a été émise depuis plusieurs années (Halliwell, 1965) puis confirmée au fur et à mesure des découvertes effectuées dans le domaine. La détection de la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par plusieurs champignons a amené la proposition d'un mécanisme de dégradation basé sur la réaction de Fenton :

$$H_2O_2 + Fe^{2+} + H^+ \rightarrow H_2O + Fe^{3+} + OH\bullet$$

Les champignons décomposeurs du bois qu'ils soient de pourriture brune ou blanche peuvent produire du peroxyde d'hydrogène (Ritschkoff et al., 1991) grâce à l'action de plusieurs enzymes telles que les glyoxal oxydases (Kersten et Kirk, 1987), les glucose oxydases (Kelley et Reddy, 1986) et les aryl alcool oxydase (Guillen et al., 1990; Muheim et al., 1990). Bien que dans la plupart des systèmes biologiques le fer soit séquestré dans des complexes redox inactifs afin de prévenir les dommages oxydatifs, dans le bois non dégradé sa concentration est suffisante (entre 0 et 2 µM) pour permettre la création de radicaux OH• (Koenigs, 1974; Jellison et al., 1993). Cependant, la présence de Fe^{2+} dans les environnements aérobies est rare tandis que l'ion trivalent Fe^{3+} est énergétiquement favorisé. Par conséquent, la réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} est réalisée grâce à la sécrétion de peptides de faible poids moléculaire et de phénolates, à fort pouvoir réducteur (Arantes et al., 2011; Eastwood et al., 2011). Chez *Serpula lacrymans* la présence d'une réductase de fer possédant un CBM, fortement induite en présence de bois, a été détectée. Cette enzyme, également présente chez *P. chrysosporium* mais absente chez *P. placenta*, permet de localiser la réduction du fer, et donc la production de radicaux hydroxyles, à proximité des régions cristallines de la cellulose (Eastwood et al., 2011).

Plusieurs systèmes de décomposition des polysaccharides où les enzymes n'interviennent pas directement sur la cellulose ont été proposés, et trois d'entre eux ont été étayés par un certain nombre de données expérimentales : les réactions catalysées par les cellobiose deshydrogénases (CDH), le cycle redox de quinones de faible poids moléculaire et la production d'OH• catalysée par des petits glycopeptides (Baldrian et Valaskova, 2008; Goodell, 2003; Hammel et al., 2002; Tanaka et al., 2007). Le système de décomposition basé sur les CDH diffère des deux autres car d'une part il dépend de la présence de cellobiose et de ses produits de dégradation, d'autre part, en plus de réaliser le clivage oxydatif des polysaccharides, il peut aussi transformer le cellobiose et les cello-oligosaccharides (Baldrian et Valaskova, 2008).

Dans les trois systèmes, le radical OH• est responsable de la scission des polysaccharides. Ces radicaux libres peuvent extraire les atomes d'hydrogène appartenant aux liaisons osidiques de la cellulose ou des autres polysaccharides avec une efficacité de l'ordre de 10^9 $M^{-1}.s^{-1}$ (Ek et al., 1989) (Figure 28).

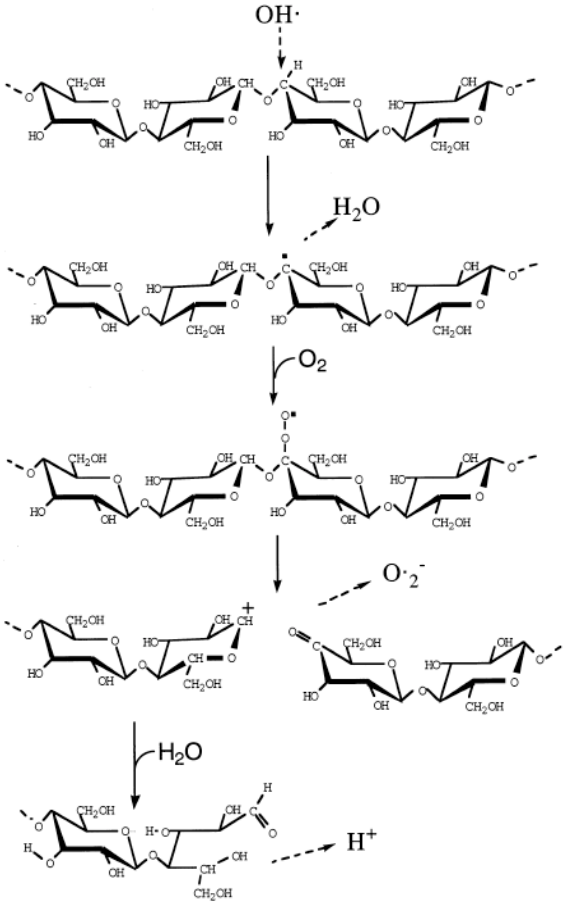


Figure 28 : Mécanisme de scission des polysaccharides par les radicaux hydroxyles générés lors de la réaction de Fenton (ici exemple de la cellulose) (Henriksson et al., 2000). Un atome d'hydrogène est extrait du carbone 4 par le radical hydroxyle créant un radical sur ce dernier. Celui-ci est oxydé avec formation d'un anion superoxyde suivi du clivage de la liaison glycosidique. Un carbonyl et un carbanion sont formés sur les nouvelles extrémités. Ce dernier sera déprotonné avec ouverture du cycle grâce à une molécule d'eau.

Un autre système oxydatif faisant appel à des oxydases a récemment été découvert. Ces enzymes appartiennent à la famille GH61 et ont longtemps été reconnues comme protéines accessoires améliorant la décomposition de la cellulose. La description de leur mécanisme catalytique et de leurs propriétés structurales a permis de les définir comme monooxygénases de polysaccharides dépendantes du cuivre (Phillips et al., 2011). Contrairement aux systèmes oxydatifs basés sur la production du radical OH•, dépolymérisant aléatoirement la cellulose, ces enzymes catalysent l'oxydation directe de la cellulose de façon locale grâce à l'intervention de l'oxygène moléculaire coordonné par un atome de cuivre fortement lié au sein du site actif (Phillips et al., 2011; Quinlan et al., 2011; Westereng et al., 2011).

3.A.II.(1) Cellobiose déshydrogénase

La cellobiose déshydrogénase (CDH) est une enzyme extracellulaire produite par les champignons de pourriture molle et blanche, elle semble absente chez la plupart des champignons de pourriture brune avec quelques exceptions (Schmidhalter et Canevascini, 1993; Henriksson et al., 2000) (Tableau 5).

Tableau 5 : Organismes possédant une activité CDH rapportée ou présente dans le génome.

Organisme	Type de pourriture	Commentaire	Références
I Organismes avec CDH purifiées			
Phanerochaete chrysosporium	Blanche	Oxyde le mannobiose	Westermark et Eriksson, 1974
Trametes versicolor	Blanche		Roy et al., 1996
Schizophyllum commune	Blanche		Fang et al., 1998
Pycnoporus cinnabarinus	Blanche		Temp et Eggert, 1999
Coniophora puteana	Brune	Forme dimérique	Schmidhalter et Canevascini, 1993
Myceliophtore thermophila	Molle	Forme dimérique	Coudray et al., 1982
Humicola insolens	Molle	Oxyde le xylobiose	Shou et al., 1998
II Présence dans le génome			
Heterobasidion annosum	Blanche	1 gène	Floudas et al., 2012
Stereum hirsutum	Blanche	1 gène	Floudas et al., 2012
Punctularia strigosozonata	Blanche	1 gène	Floudas et al., 2012
Auricularia delicata	Blanche	1 gène	Floudas et al., 2012
Fomitiporia mediterranea	Blanche	1 gène	Floudas et al., 2012
Gloeophyllum trabeum	Brune	1 gène	Floudas et al., 2012
Serpula lacrymans	Brune	2 gènes	Floudas et al., 2012
Ceriporiopsis subvermispora	Blanche	1 gène	Fernandez-Fueyo et al., 2012a

Les CDH produites pas les champignons de pourriture blanche sont des enzymes monomériques d'une taille comprise entre 90 et 110 kDa avec un point isoélectrique autour de 4. Elles sont capables d'oxyder efficacement le cellobiose mais aussi les cellodextrines, les mannodextrines ou encore le lactose, en leurs oses constitutifs grâce à une large variété d'accepteurs d'électrons comprenant des quinones, des radicaux phenoxy, le fer (Fe^{3+}), le cuivre (Cu^{2+}), le cytochrome c et l'ion triiodure (Zamocky et al., 2006). Ces substrats ont pour point commun d'être des di- ou oligosaccharides contenant des liaisons ß1→4 ainsi qu'un résidu glycosyl ou mannosyl sur l'extrémité réductrice.

Au niveau structural les CDH présentent deux groupements prosthétiques (FAD et hème) dans deux domaines séparés (Lehrner et al., 1996) (Figure 29).

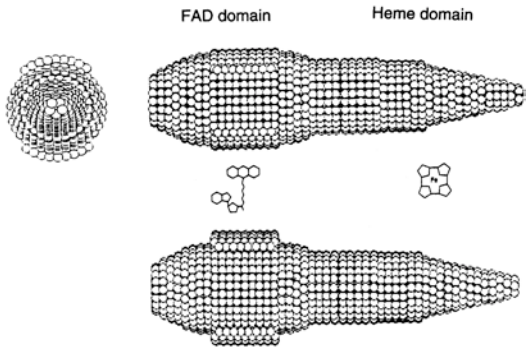


Figure 29 : Forme de la CDH de *Phanerochaete chrysosporium* déterminée par diffusion des rayons X aux petits angles. La longueur de cette protéine est de 180 Å et les deux groupements prosthétiques sont représentés à l'échelle (Lehrner et al., 1996).

La CDH est une oxydoréductase typique catalysant deux réactions spatialement séparées : une oxydation du substrat et une réduction d'un accepteur d'électrons. L'oxydation a lieu sur le carbone C1 d'un disaccharide ; l'hémiacétal généré est alors converti en lactone subissant une hydrolyse spontanée en acide carboxylique. La réduction s'opère via un accepteur de deux électrons ou deux accepteurs d'un électron (Figure 30) (Henriksson et al., 2000). L'oxydation du substrat est catalysée par le groupement FAD qui est alors réduit en $FADH_2$. La réduction des accepteurs d'électrons par la CDH est catalysée par le domaine contenant l'hème selon un transfert intramoléculaire d'électrons flavine à hème. Cependant une réduction directe des accepteurs d'électrons par le cofacteur FAD est aussi possible mais plus lente (Ghisla et Massey, 1989; Zamocky et al., 2006).

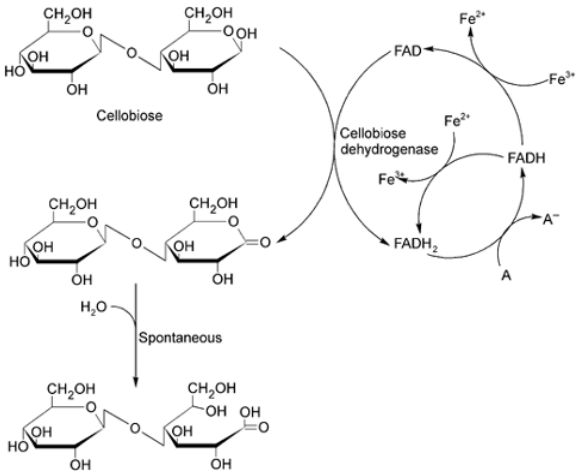


Figure 30 : Réactions de la cellobiose déshydrogénase. 'Fe' représente l'atome de fer lié à l'hème et 'A' représente l'accepteur d'électron (Baldrian et Valaskova, 2008).

3.A.II.(2) Cycle redox des quinones

Ce mécanisme est basé sur la réduction de quinones en leurs hydroquinones correspondantes par le champignon. Ces hydroquinones vont ensuite réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} et générer des radicaux semiquinones qui vont à leur tour réduire l'oxygène pour former la quinone originale et un radical hydroperoxyde OOH•. Ce radical étant une source de peroxyde d'hydrogène, ce cycle génère donc un système complet de Fenton (Kerem et al., 1999) (Figure 31).

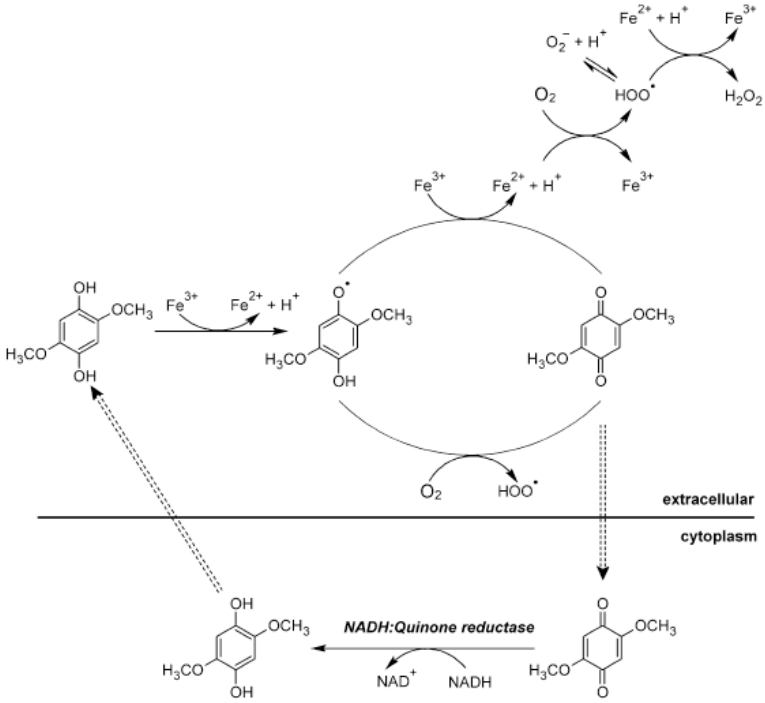


Figure 31 : Réactions impliquées dans le cycle redox des quinones par le champignon de pourriture brune *Gloeophyllum trabeum* (réactions montrées pour la 2,5-DMHQ) (Baldrian et Valaskova, 2008).

Les enzymes potentiellement capables de réaliser la réduction de quinones en hydroquinones sont des benzoquinones réductases intracellulaires (Brock et al., 1995) et des déshydrogénases extracellulaires telles que la CDH qui peut recevoir les quinones comme accepteurs d'électrons alternatifs (Henriksson et al., 2000). Les quinones peuvent également être générées par modification de la lignine lors de la dégradation du bois par les champignons et, dans certains cas, provenir des extractibles du bois (Suzuki et al., 2006).

Les quinones et les hydroquinones produites lors de ce processus peuvent être attaquées par les radicaux libres, par conséquent le champignon doit avoir une source de quinones extracellulaires. Leur production a été identifiée chez *Gloeophyllum trabeum* qui sécrète deux hydroquinones, la 2,5-dimethoxyhydroquinone (2,5-DMHQ) et le 4,5-dimethoxycatechol (4,5-DMC). Ces composés sont capables de réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} avec création concomitante du

radical semiquinone correspondant (Jensen et al., 2001; Kerem et al., 1999; Newcombe et al., 2002; Paszczynski et al., 1999). Les radicaux semiquinones vont réagir avec l'oxygène moléculaire ou le Fe^{3+} pour donner un radical hydroperoxyde OOH•, ou du Fe^{2+}, et les deux quinones 2,5-dimethoxy-1,4-benzoquinone (2,5-DMBQ) et 4,5-dimethoxy-1,2-benzoquinone (4,5-DMBQ). Dans les oxydoréductions subséquentes le couple Fe^{2+}/Fe^{3+} réagit avec le couple OOH•/O_2, tandis que le Fe^{2+} réduit OOH• pour générer du peroxyde d'hydrogène (Figure 31).

La production de 2,5-DMHQ et de 4,5-DMC a été détectée chez le champignon de pourriture brune *Gloeophyllum trabeum* (Suzuki et al., 2006), tandis que *Postia placenta* (Cohen et al., 2002), et *Serpula lacrymans* (Shimokawa et al., 2004) produisent seulement de la 2,5-DMHQ. La capacité à réduire les quinones a aussi été détectée chez les champignons de pourriture blanche bien que leur rôle dans la dégradation de la cellulose ne soit pas clairement défini (Baldrian et Valaskova, 2008).

3.A.II.(3) Réaction de Fenton catalysée par des glycopeptides

Des composés de faible masse moléculaire appelés glycopeptides ont été détectés pour la première fois chez les champignons de pourriture brune dans les années 1980. Ils sont capables de catalyser des réactions redox entre l'oxygène moléculaire et des donneurs d'électrons pour produire des radicaux hydroxyles, mais aussi de réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} et de lier fortement le Fe^{2+}. Ces composés d'une masse moléculaire de 1,5-5 kDa sont décrits comme contenant du fer (22%), des carbohydrates neutres avec une partie protéique (12%) chez *Gloeophyllum trabeum* (Enoki et al., 1992) et *Irpex lacteus* (Tanaka et al., 1993). Le glycopeptide de *Fomitopsis palustris* est décrit avec une masse moléculaire de 7,2 – 12 kDa dont 54-61% de partie protéique (Kaneko et al., 2004). De plus longs glycopeptides ont été détectés chez les champignons de pourriture blanche *Trametes versicolor* et *Phanerochaete chrysosporium*. Le glycopeptide de *Phanerochaete chrysosporium* possède une taille de 14 kDa avec 25% de carbohydrates neutres et 0,04% de fer. Cette glycoprotéine contient une cétoamine (1-amino-1-deoxy-2-ketose) produite par condensation d'une chaîne latérale d'un acide aminé et d'un carbohydrate. La tautomérisation cette structure produit du 2,3-ènediol pouvant réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} et produire de l'H_2O_2 et de l'O_2 (Figure 32) (Tanaka et al., 2007).

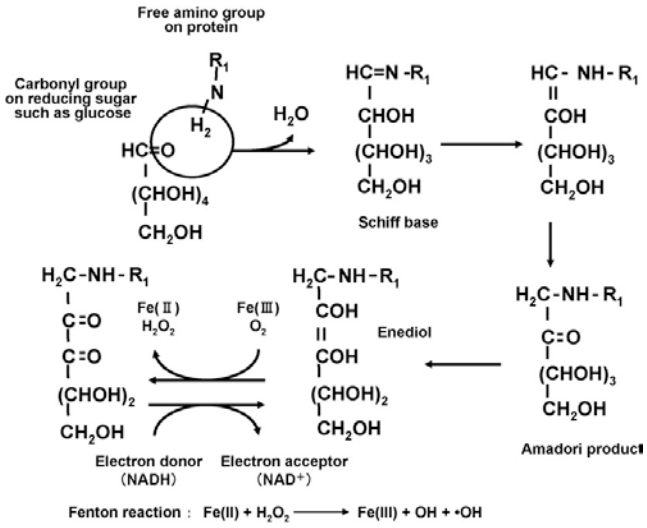


Figure 32 : Mécanisme de génération des radicaux hydroxyles par la glycoprotéine de *P.chrysosporium* (Tanaka et al., 2007).

La taille de ces glycopeptides ne leur permet pas de pénétrer dans la paroi cellulaire et la réduction de leurs substrats se déroulerait à proximité de l'hyphe. Afin d'accomplir complètement le cycle catalytique, les fragments saccharidiques oxydés des glycopeptides doivent être réduits à nouveau. Cette réaction pourrait être réalisée par une réductase associée à la membrane (Enoki et al., 2003). Cependant, l'identité du donneur d'électron est encore inconnue.

3.A.II.(4) Les monooxygénases de polysaccharides (PMO)

Cette famille d'enzymes est distribuée au sein du génome des champignons décomposeurs du bois mais également des champignons pathogènes, symbiotiques et décomposeurs de litière (Žifčáková et Baldrian, 2012). L'expression des PMO est fortement induite (de 5 à 1300 fois) durant la croissance du champignon sur différents substrats lignocellulosiques (Vanden Wymelenberg et al., 2010; Adav et al., 2012; Eastwood et al., 2011; MacDonald et al., 2011). Les transcrits de ces gènes figurent parmi les plus fortement induits chez *P. carnosa* et *S. lacrymans* en présence de bois, indiquant leur importance dans la décomposition de la cellulose chez les champignons de pourriture brune et blanche (Eastwood et al., 2011; MacDonald et al., 2011).

Les PMO sont des petites protéines d'une masse moléculaire comprise entre 20 et 50 kDa (Harris et al., 2010). Leur centre catalytique contient un site hautement conservé de liaison des métaux composé de deux histidines, dont une peut être méthylée, et de deux tyrosines (Quinlan et al., 2011; Westereng et al., 2011). Ces enzymes requièrent de l'oxygène moléculaire et un transfert de deux électrons provenant du domaine contenant l'hème d'une CDH afin

d'effectuer leur cycle catalytique. La première réduction de l'atome de cuivre contenu dans le site actif est suivie de la liaison de l'oxygène moléculaire sur ce dernier. Un transfert d'électron interne a alors lieu, formant l'intermédiaire radicalaire Cu^{+}-superoxo qui va extraire un atome d'hydrogène d'une liaison osidique interne générant l'intermédiaire hydroperoxo et un substrat radicalaire. La seconde réduction facilite le clivage de la liaison O-O de cet intermédiaire, entraînant la formation d'un radical oxo qui va alors se coupler avec le substrat radicalaire hydroxylant ainsi le polysaccharide. Cet atome d'hydrogène supplémentaire déstabilise la liaison osidique amenant l'élimination du glucane adjacent et la formation d'un résidu osidique sous forme lactone ou cétoaldose suivant la position de l'atome où a eu lieu l'hydroxylation (Phillips et al., 2011; Westereng et al., 2011) (Figure 33).

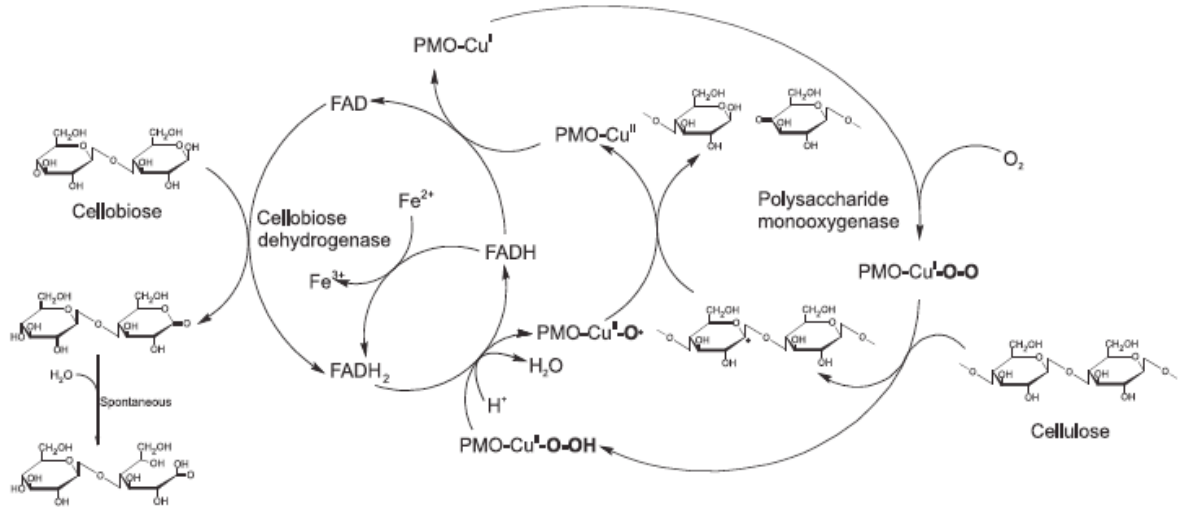


Figure 33 : Schéma représentant les réactions catalysées par les PMO et leur coopération avec les CDH (Žifčáková et Baldrian, 2012).

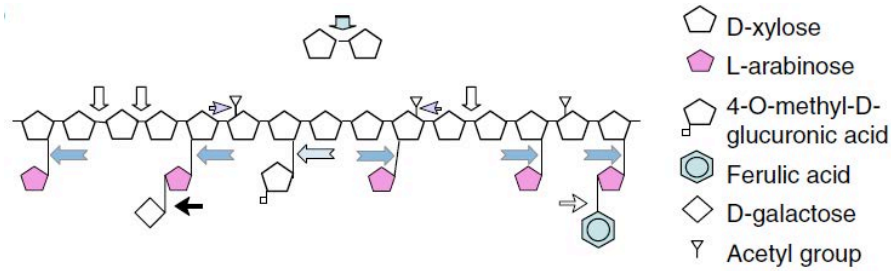
3.B) Dégradation des hémicelluloses

A cause de leur grande hétérogénéité, la dégradation des hémicelluloses requiert la sécrétion de plusieurs enzymes spécifiques agissant en synergie afin de les convertir totalement en oses et en acide acétique. Les hémicellulases sont donc classées en fonction du substrat sur lequel elles agissent, les liaisons qu'elles hydrolysent ainsi que des produits formés. Comme pour les cellulases, les hémicellulases sont des protéines modulaires pouvant posséder un CBM en complément de leur domaine catalytique (Dashtban et al., 2009). Les hémicellulases fongiques appartiennent à 16 familles différentes de GH (1, 2, 3, 5, 10, 11, 26, 27, 36, 39, 43, 51, 53, 54, 62 et 67) et 6 familles différentes de CE (1, 2, 3, 4, 5 et 6), qui hydrolysent les liaisons ester des groupements latéraux (Cantarel et al., 2009; Bourne et Henrissat, 2001; Shallom et Shoham, 2003). Selon qu'elles agissent directement sur la chaîne principale ou sur ses substituants, les hémicellulases peuvent se classer en deux familles : les enzymes de dépolymérisation et les enzymes de débranchement (également appelées enzymes accessoires).

Les enzymes de dépolymérisation hydrolysent la chaîne polyosidique principale et sont généralement classées soit comme endo-agissantes, coupant la chaîne au milieu d'un long polymère, soit comme exo-agissantes, commençant l'hydrolyse à partir de l'extrémité d'une chaîne. Cependant plusieurs enzymes peuvent posséder ces deux types d'activité. Il existe également une série d'enzymes qui agissent sur de petits oligomères issus de la combinaison des activités endo- et exo-, parmi elles notamment les ß-xylosidases ou encore les ß-mannosidases. Pour ces enzymes, le faible degré de polymérisation de leur substrat empêche la distinction entre les activités endo- et exo-.

Les enzymes de débranchement peuvent être subdivisées en deux groupes selon leur action sur les liaisons glycosidiques ou les liaisons ester. Celles agissant sur les liaisons glycosidiques incluent les α-L-arabinofuranosidases et les α-glucuronidases capables d'hydrolyser les chaînes latérales glycosidiques des xylanes (Filho et al., 1996; Kroon et Williamson, 1996). Les estérases incluent l'acétyl xylane estérase et la feruloyl estérase capables d'agir sur le xylane (Faulds et Williamson, 1995). Certaines hémicellulases et enzymes accessoires présentent des réactions croisées à travers les différentes hémicelluloses, alors que certaines sont spécifiques de séquences/conformations précises d'oligomères (Decker et al., 2008). La ß-xylosidase, par exemple, est capable d'hydrolyser préférentiellement le xylobiose mais peut aussi agir sur le xylotriose ou d'autres xylo-oligomères.

Le mode d'action de ces deux types d'enzymes (dépolymérisation et débranchement) se fait également en synergie (Figure 34).



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 34 : Exemple de synergie dans la dégradation des arabinoxylanes (Aro et al., 2005).

Jusqu'à aujourd'hui, peu d'études ont été réalisées sur les hémicellulases des champignons décomposeurs du bois et la connaissance de leurs propriétés reste très partielle. Cependant il est clairement établi que ces champignons possèdent des systèmes responsables de la dégradation des hémicelluloses puisque ceux-ci sont d'une part capables de dégrader efficacement tout les composés du bois (Curling et al., 2002) et d'autre part ils sont capables de pousser sur des substrats hémicellulosiques (Tenkanen et al., 1996). De plus, la comparaison des sécrétomes des champignons de pourriture blanche et brune, respectivement *P. chrysosporium* et *P. placenta*, montre que ceux-ci sécrètent des enzymes spécifiques de la dégradation des hémicelluloses (Vanden Wymelenberg et al., 2010). Finalement, l'analyse comparative de 31 génomes fongiques indique la présence de plusieurs familles spécifiques de la dégradation des hémicelluloses (Floudas et al., 2012).

3.C) Dégradation de la lignine

Les propriétés suivantes de la lignine sont importantes en termes d'attaque microbienne ou enzymatique :

(1) Les polymères de lignine possèdent une structure compacte, sont insolubles dans l'eau et sont difficilement pénétrables pas les bactéries ou les enzymes.

(2) Les liaisons inter-monomériques qui participent à la rigidité de la lignine sont souvent de type C-C ou C-O avec une prédominance de la liaison de type ß-aryl éther.

(3) Ces liaisons intermoléculaires ne sont pas hydrolysables.

De ces propriétés découlent les conclusions suivantes :

(1) La dégradation de la lignine nécessite des enzymes extracellulaires et/ou des médiateurs/facteurs de faible poids moléculaire tels que les espèces radicalaires

(2) Les systèmes de dégradation de la lignine doivent être aspécifiques contrairement aux cellulases et aux hémicellulases

(3) Les enzymes doivent donc être oxydatives et non hydrolytiques. (Hatakka et Hammel, 2010).

Parmi les enzymes ligninolytiques sécrétées par les champignons décomposeurs du bois on distingue les peroxydases à hème et les oxydases (Cullen et Kersten, 2004). Celles-ci se divisent en quatre groupes : les lignines peroxydases (LiP ; EC 1.11.1.14), les peroxydases à manganèse (MnP ; EC 1.11.1.13), les peroxydases versatiles (VP ; EC 1.11.1.16) et les laccases (EC 1.10.3.2). Le processus de dégradation initié par ces enzymes peut être renforcé par la coopération de plusieurs enzymes accessoires qui sont : les glyoxal oxydases, les aryl alcool oxydases, les pyranose 2-oxydases, les quinone réductases et les aryl alcool déshydrogénases.

Les champignons de pourriture blanche possèdent une action ligninolytique largement supérieure à celle des champignons de pourriture brune. En effet ces derniers sont incapables de dégrader la lignine et ne peuvent que la modifier chimiquement par l'intermédiaire des radicaux hydroxyles produits lors de la réaction de Fenton (Hammel et al., 2002). Cette particularité est due au fait que ces derniers ne possèdent aucune peroxydase (enzymes majoritairement responsable de la dégradation de la lignine) au sein de leur génome (Hatakka et Hammel, 2010). Les champignons de pourriture molle ne sont pas aussi adaptés que les champignons de pourriture blanche pour dégrader efficacement la lignine (Rabinovich et al., 2004).

Au sein de la super famille des peroxydases à hème non animales on distingue trois classes : la classe I comprenant les enzymes d'origine procaryotique, la classe II qui inclue les peroxydases fongiques sécrétées et enfin la classe III qui contient les peroxydases sécrétées par les plantes. En se basant sur leurs séquences peptidiques ainsi que sur leurs propriétés catalytiques, les LiP, MnP et VP appartiennent à la classe II des peroxydases au sein cette super famille (Welinder, 1992). Ces enzymes oxydent leurs substrats grâce à un transfert d'électron en plusieurs étapes avec formation d'un cation radicalaire intermédiaire, observé dans la plupart des peroxydases.

Les LiP dégradent les unités non phénoliques de la lignine, les composés phénoliques de type aromatiques ainsi que l'alcool vératryl utilisé en tant que médiateur. Les MnP génèrent des ions Mn^{3+} qui agissent comme oxydant diffusable sur les unités phénoliques ou non phénoliques de la lignine (Jensen et al., 1996). Le troisième type de peroxydase, les VP, est un hybride réunissant les propriétés catalytiques des LiP, des MnP ainsi que des peroxydases de plantes/microbes, oxydent les composés phénoliques (Heinfling et al., 1998).

La Figure 35 présente le mécanisme général de la dégradation de la lignine grâce à la coopération de ces enzymes (peroxydases, laccases, oxydases et deshydrogénases).

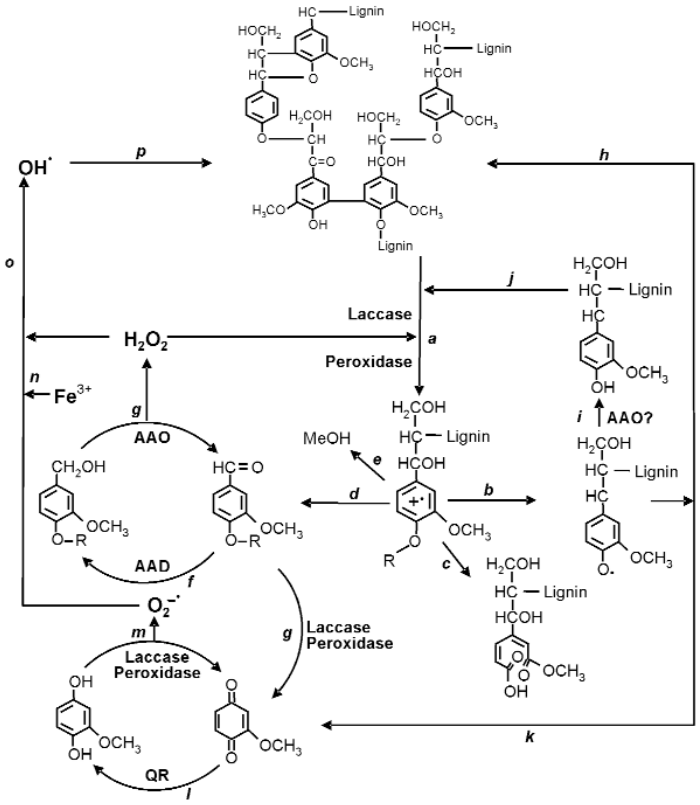


Figure 35 : Schéma de la biodégradation de la lignine incluant les réactions enzymatiques et l'activation de l'oxygène (voir texte pour les détails) (Martinez et al., 2005).

Premièrement, les laccases et les peroxydases (LiP, MnP et VP) produites par le champignon vont oxyder le polymère de lignine, générant ainsi des cations radicalaires aromatiques (**a**) (Eriksson et al., 1990). Ceux-ci vont participer à diverses réactions non enzymatiques incluant la rupture des liaisons C4-éther (**b**), le clivage du noyau aromatique (**c**), la rupture des liaisons Cα-Cß (**d**) et la démethoxylation (**e**). Les aldéhydes aromatiques générés par la rupture des liaisons Cα-Cß, ou synthétisées *de novo* par le champignon (**f, g**) (Gutierrez et al., 1994) servent de substrat à la génération d'H_2O_2 par les aryl-alcool oxydases (AAO) dans le cycle de réactions redox impliquant aussi les aryl-alcool déshydrogénases (AAD) (Guillen et al., 1994). Les radicaux phénoxy issus de la rupture des liaisons C4-éther (**b**) peuvent polymériser à nouveau sur la lignine (**h**) s'ils ne sont pas réduits en composés phénoliques (**i**) grâce à l'AAO (Marzullo et al., 1995). Ces composés phénoliques peuvent être oxydés à nouveau par les laccases ou les peroxydases (**j**). Une rupture des liaisons Cα-Cß au niveau des radicaux phénoxy (**k**), conduit à la formation de *p*-quinones. Les quinones issues de (**g**) et/ou (**k**) contribuent à l'activation de l'oxygène par des réactions redox cycliques impliquant les quinones réductases (QR), les laccases et les peroxydases (**l, m**) (Guillen et al., 1997). Il en résulte une réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) présent dans le bois (**n**) soit par le cation radicalaire superoxyde ou directement par les radicaux semiquinones, permettant ainsi la production de radicaux hydroxyles via la réaction de Fenton (**o**) (Guillen et al., 2000). Ces derniers initient l'attaque sur la lignine (**p**) lors des stages précoces de la dégradation du bois lorsque la petite taille des pores dans la paroi cellulaire intacte prévient la pénétration des enzymes ligninolytiques (Evans et al., 1994). Ensuite, la dégradation de la lignine procède selon des attaques oxydatives effectuées par les enzymes décrites au dessus. Dans les étapes finales, des produits simples issus de la dégradation de la lignine pénètrent dans l'hyphe.

3.C.I) Les lignine peroxydase (LiP)

Ces enzymes catalysent la dépolymérisation oxydative de la lignine grâce au peroxyde d'hydrogène (Hammel et al., 1993; Tien et Kirk, 1983), elles sont relativement peu spécifiques et oxydent des substrats phénoliques de type aromatiques, une variété de composés non phénoliques analogues de la lignine, mais également des composés organiques en présence d'H_2O_2 (Valli et al., 1990). Ce sont des glycoprotéines de masse moléculaire comprise entre 38 et 46 kDa avec un pH optimal très bas aux alentours de 3. Elles sont de forme globulaire avec deux domaines, un proximal (C-terminal) et un distal (N-terminal). Elles contiennent également un

groupement prosthétique hème intégré dans une crevasse à l'interface de ces deux domaines, accessible au solvant via deux petits canaux (Edwards et al., 1993) (Figure 36).

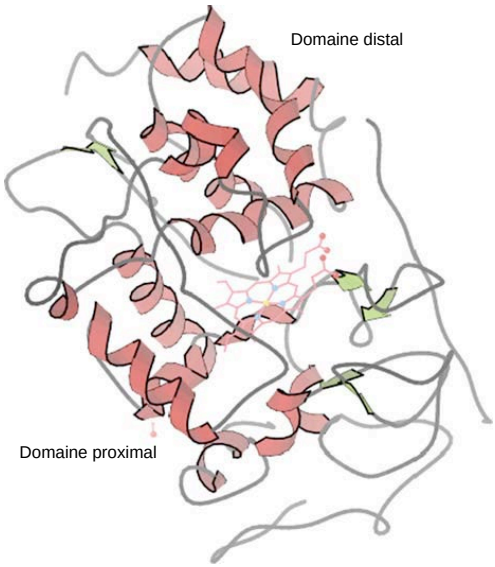


Figure 36 : Structure tridimensionnelle de la LiP-2 de *P.chrysosporium* (adapté de Edwards et al., 1993).

L'atome de fer de l'hème est penta-coordonné avec l'histidine 176 du domaine proximal comme cinquième coordinateur et forme également une liaison hydrogène avec une molécule d'eau elle même stabilisée par l'histidine 47 du domaine distal (Figure 37). La poche de liaison du peroxyde est située sur le site distal de l'enzyme avec un canal s'étendant vers l'extérieur de la protéine. On observe également la présence d'un tryptophane, situé à la surface, impliqué dans la fixation et l'oxydation de l'alcool vératryl via un transfert d'électron longue distance. La substitution de ce résidu par une sérine ou une phényalanine conduisant à la perte totale d'activité des LiP (Wong, 2009).

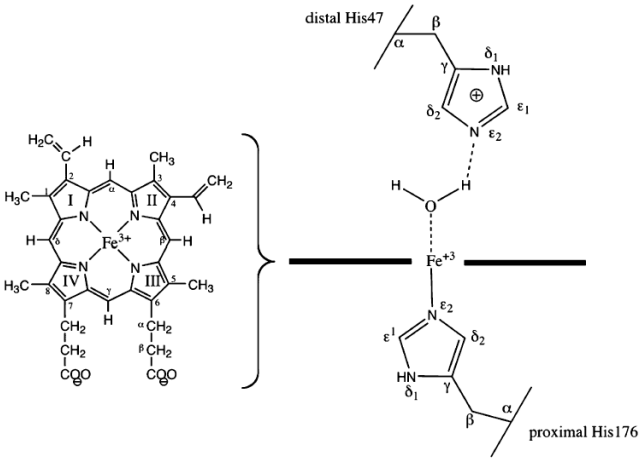


Figure 37 : Environnement de l'atome de fer contenu dans l'hème des LiP (Wong, 2009).

Les LiP possèdent un cycle catalytique similaire en plusieurs points à celui de la peroxydase du raifort, dont le mécanisme général se déroule en deux étapes (Figure 38) (Renganathan et Gold, 1986) :

(1) Une oxydation à deux électrons (e^-) de l'enzyme ferrique native donne le composé I intermédiaire qui contient un centre oxyferrique et un cation radicalaire. Cette réaction est possible grâce au tryptophane situé en surface qui, existant sous forme radicalaire, oxyderait le noyau hème via un transfert d'électrons longue distance (Wong, 2009).

$$LiP[Fe(III)] + H_2O_2 \rightarrow LiP\text{-}I[Fe(IV)= O\bullet^+] + H_2O$$

(2) Deux réductions consécutives à 1 électron de LiP-I par des substrats donneurs d'électrons. La première réduction donne le composé II et un radical cationique ($A\bullet^+$). La seconde réduction rend l'enzyme à sont état natif d'oxydation finissant ainsi le cycle catalytique. Dans certains cas, LiP-I peut également retourner à son état natif directement par une réduction à deux électrons. Comme dans la première étape, le résidu tryptophanyl situé en surface est également impliqué dans le transfert des électrons sur les différents substrats. En effet, les analyses structurales démontrent que le canal conduisant à l'hème est trop étroit pour permettre l'accès aux substrats (Wong, 2009).

$$LiP\text{-}I + AH \rightarrow LiP\text{-}II[Fe(IV)=O] + A\bullet^+$$

$$LiP\text{-}II + AH \rightarrow LiP + A\bullet^+$$

En excès d'H_2O_2 et en absence de substrat réducteur, LiP-II réagit avec H_2O_2 pour donner une forme inactive de l'enzyme connue sous le nom de composé III (Wariishi et Gold, 1990). Le noyau hème existe alors sous la forme superoxo-ferrique. LiP-III peut être convertie en enzyme native par auto oxydation spontanée ou par oxydation grâce à un cation radicalaire $A\bullet^+$ (Figure 38).

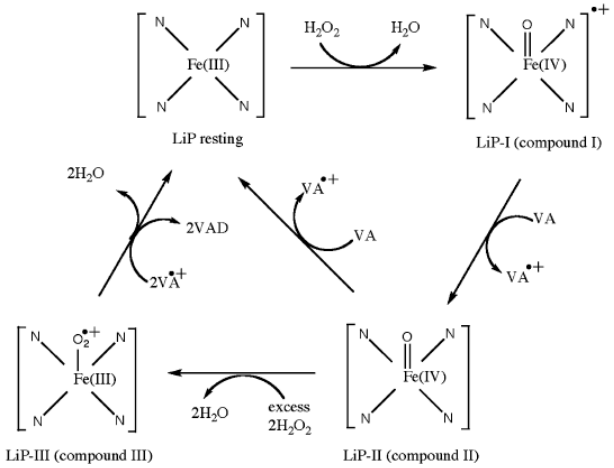


Figure 38 : Cycle catalytique des lignine peroxydases (Wong, 2009).

Comme indiqué précédemment, les LiP dégradent les unités non phénoliques de la lignine par des processus oxydatifs. Des études menées sur des composés modèles de la lignine tels que les dimères diarylpropanes ou les ß-*O*-4 ont montré que leur dégradation implique la formation initiale d'un cation radicalaire via une oxydation à un électron, suivie d'un clivage de la chaîne latérale, d'une déméthylation, d'une addition intramoléculaire et de réarrangements (Lundell et al., 1993; Miki et al., 1986; Renganathan et al., 1985) (Figure 39 et 40). Dans ce mécanisme, seule la formation du radical cationique est catalysée par l'enzyme, les réactions subséquentes étant non enzymatiques.

Les LiP peuvent également oxyder des composés phénoliques issus de la dégradation de la lignine tels que le guaiacol, l'alcool vanillyl, le catéchol, l'acide syringique… Ces substrats sont alors convertis en radicaux phénoxy qui vont réagir avec l'O_2 pour former des produits de clivage du noyau aromatique (Harvey, 1990).

Le médiateur principal des LiP est l'alcool vératryl (VA). C'est un métabolite produit en même temps que ces dernières dont l'addition entraîne une augmentation de l'activité LiP ainsi que de la vitesse de minéralisation de la lignine (Faison et Kirk, 1985; Schoemaker et Leisola, 1990). Le radical catonique $VA\bullet^+$ généré lors des étapes de réduction s'affaiblit par déprotonation du C_α afin de former le vératraldéhyde (Figure 41) (Baciocchi et al., 2002). Le rôle de l'alcool vératryl dans la dégradation de la lignine est sujet à plusieurs propositions. L'une d'elle suggère que la forme cationique radicalaire est un médiateur redox impliqué dans l'oxydation indirecte de la lignine par les LiP. En effet, son temps de demie-vie (47 ms) lui confère un rayon de diffusion (7 µM en solution aqueuse) compatible avec l'oxydation d'un polymère situé à longue distance de l'enzyme (Baciocchi et al., 2002; Candeias et Harvey, 1995). Une autre suggère son implication dans la protection de l'inactivation des LiP par l'H_2O_2. Dans ce cas, il convertit LiP-III en enzyme native via la formation de $VA\bullet^+$, créant potentiellement plus d'enzymes actives (Valli et al., 1990).

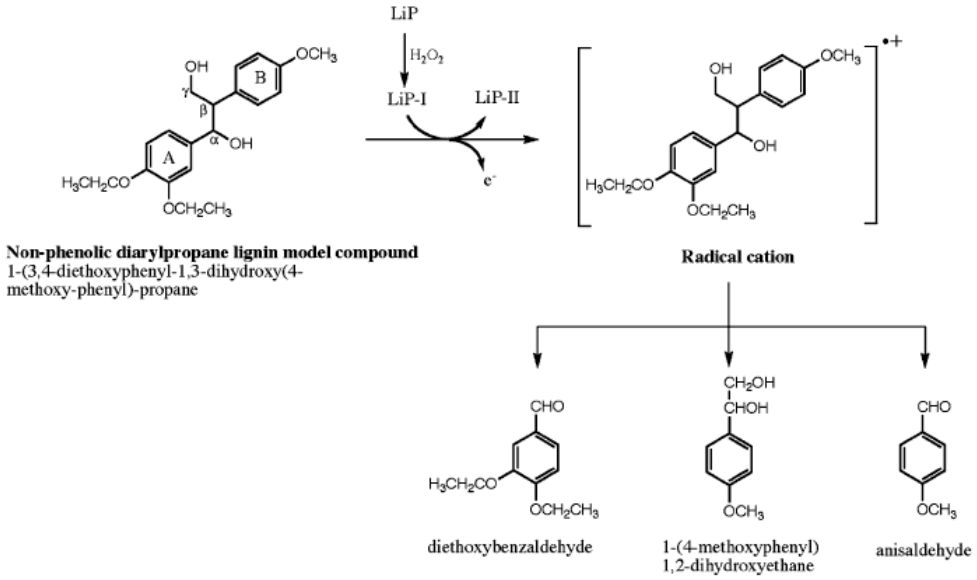


Figure 39 : Oxydation des composés modèles de dimères non phénolique diarypropanes de la lignine catalysée par les LiP. L'oxydation du noyau A donnant lieu au clivage de la liaison Cα-Cß représente la voie majeure (Lundell et al., 1993; Renganathan et al., 1985).

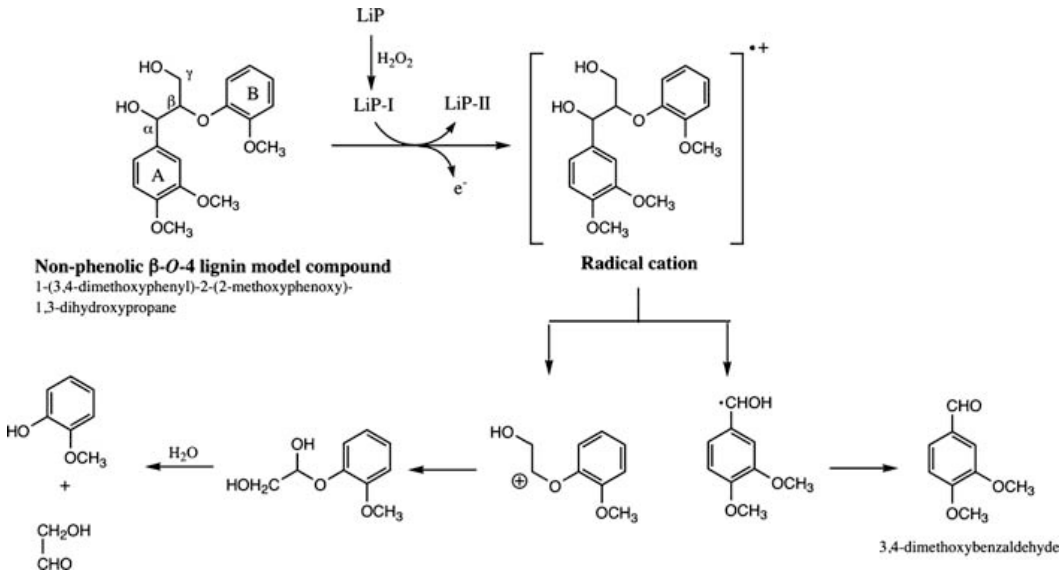


Figure 40 : Oxydation des composés modèles de dimères non phénolique ß-O-4 de la lignine catalysée par les LiP (Lundell et al., 1993; Miki et al., 1986).

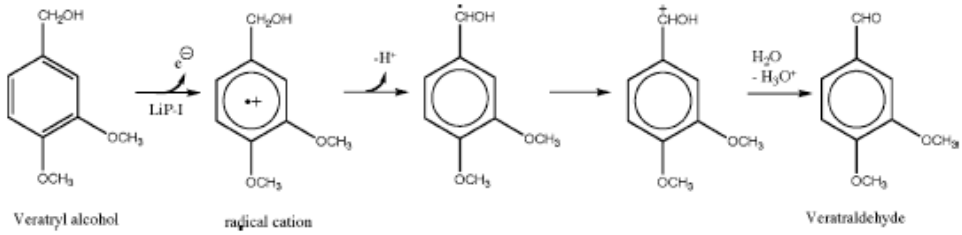


Figure 41 : Déclin du radical cationique de l'alcool vératryl par déprotonation du C_α (Baciocchi et al., 2002).

3.C.II) Les peroxydases à manganèse (MnP)

Les peroxydases à manganèse (MnP) catalysent la réaction :

$$2Mn^{2+} + 2H^{+} + H_2O_2 = 2Mn^{3+} + 2H_2O$$

Leur capacité à utiliser le Mn^{2+} en tant que substrat réducteur est unique. Ce sont des enzymes extracellulaires avec une masse moléculaire comprise entre 38 et 62 kDa et un pI plutôt acide (pH 3-4) (Hofrichter, 2002). Les MnP contiennent un groupement prosthétique hème et exhibent une activité maximale à des concentrations supérieures à 100 µM en Mn^{2+} (Glenn et Gold, 1985). Leur structure générale est similaire à celle des LiP comprenant deux domaines avec le groupement prosthétique hème intégré à l'interface (Figure 42).

Figure 42 : Structure tridimensionnelle de la MnP-I de *P.chrysosporium* (Sundaramoorthy et al., 2005).

Les MnP oxydent le Mn^{2+} en Mn^{3+} qui à son tour va oxyder une variété de composés phénoliques modèles de la lignine. Leur cycle catalytique implique l'oxydation du Mn^{2+} par le composé I (MnP-I) et le composé II (MnP-II) en Mn^{3+} selon un schéma analogue à celui des LiP (Figure 43).

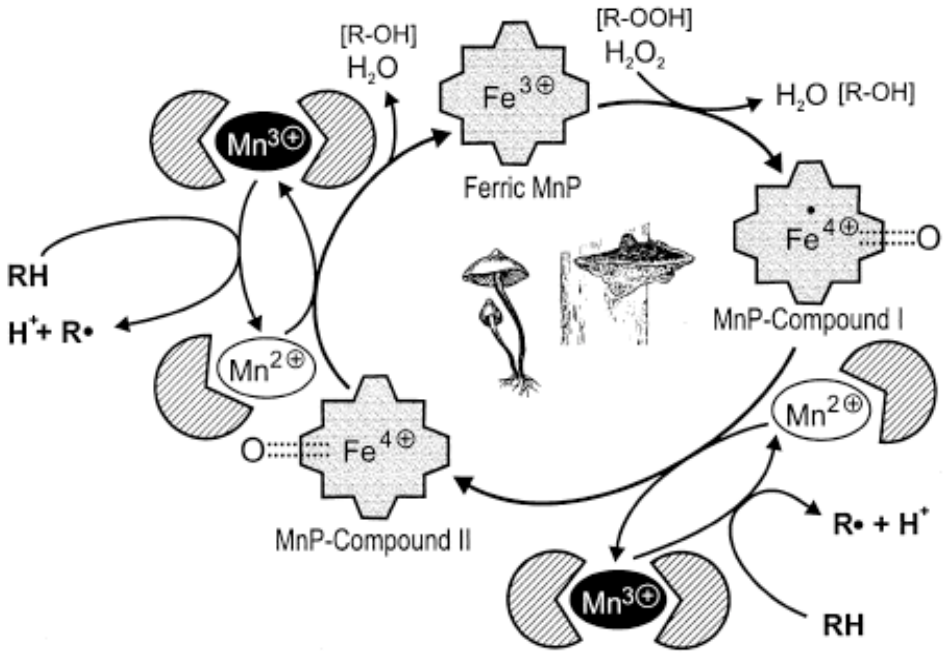


Figure 43 : Cycle catalytique des MnP (Hofrichter, 2002).

$MnP + H_2O_2 \rightarrow MnP\text{-}I + H_2O$

$MnP\text{-}I + Mn^{2+} \rightarrow Mnp\text{-}II + Mn^{3+}$

$MnP\text{-}II + Mn^{2+} \rightarrow MnP + Mn^{3+} + H_2O$

L'oxydation de l'enzyme native par un transfert de deux électrons sur l'H_2O_2 va donner MnP-I qui contient un centre oxyferrique et un cation radicalaire. Le composé I est alors réduit par un équivalent de Mn^{2+} en composé II. Cette réaction peut également s'effectuer via d'autres donneurs d'électrons tels que les composés phénoliques. En revanche, la réduction du composé II en enzyme native est exclusivement effectuée par le Mn^{2+} (Wariishi et al., 1988). Le Mn^{3+} formé est stabilisé via la formation de complexes avec des acides organiques. L'acide oxalique et malonique étant les chélateurs optimaux sécrétés par le champignon en quantités suffisantes (Kishi et al., 1994). Il a également été démontré que les MnP réagissent avec le complexe oxalate-Mn^{2+} plutôt qu'avec le Mn^{2+} libre en tant que vrai substrat (Kuan et al., 1993).

Le complexe Mn^{3+}-chélateur généré par les MnP agit en tant qu'oxydant diffusable sur les phénols simples et les amines phénoliques selon une oxydation à un électron du substrat afin de produire un intermédiaire radicalaire (Figure 44). Ce complexe peut également catalyser l'oxydation de dimères phénoliques de lignine selon une oxydation à un électron afin de produire un intermédiaire radicalaire de type phénoxy qui va subir des réarrangements, des clivages de liaisons et des réactions non enzymatiques afin de générer différents produits de dégradation (Hofrichter, 2002; Tuor et al., 1992) (Figure 45).

Les complexes Mn^{3+}-acide organique peuvent réagir avec des acides carboxyliques convertis en radicaux alkyls. Ces derniers, par une succession de réactions spontanées avec l'O_2 peuvent former des radicaux superoxyde (Figure 44). Ces radicaux sont vus comme sources de peroxydes, générés via des réactions autocatalytiques, qui pourraient être utilisés par les MnP en absence d'H_2O_2.

Le complexe Mn^{3+}-acide organique est un oxydant doux en conditions physiologiques permettant l'oxydation des structures phénoliques de la lignine. Par contre, sa réactivité l'empêche d'oxyder les composés non phénoliques de la lignine (Hammel et al., 1993). C'est pourquoi l'oxydation de ces composés par le complexe Mn^{3+}-acide organique implique la formation de radicaux réactifs dus à la présence d'autre médiateurs (Reddy et al., 2003). Ces seconds médiateurs peuvent être des thiols provenant de peptides issus de la lyse partielle des cellules (Hofrichter, 2002), soit des acides gras insaturés sécrétés par le champignon (Enoki et al., 1999) ou présents dans le bois (Hofrichter et al., 2001) (Figure 44). Dans les deux cas, le système va générer le clivage des liaisons C_α-$C_ß$ ou ß-aryl éther sur des composés modèles de la lignine tels que les diarylpropanes ou les ß-*O*-4 (Figure 46) (Bao et al., 1994; Hofrichter, 2002; Kapich et al., 2005).

Comme pour les LiP, MnP-II en présence d'excès d'H_2O_2 peut évoluer vers une forme inactive connue sous le nom de composé III (MnP-III). Ce composé va pouvoir être oxydé une nouvelle fois par H_2O_2 induisant un blanchiment de l'hème et une inactivation irréversible de l'enzyme (Timofeevski et al., 1998).

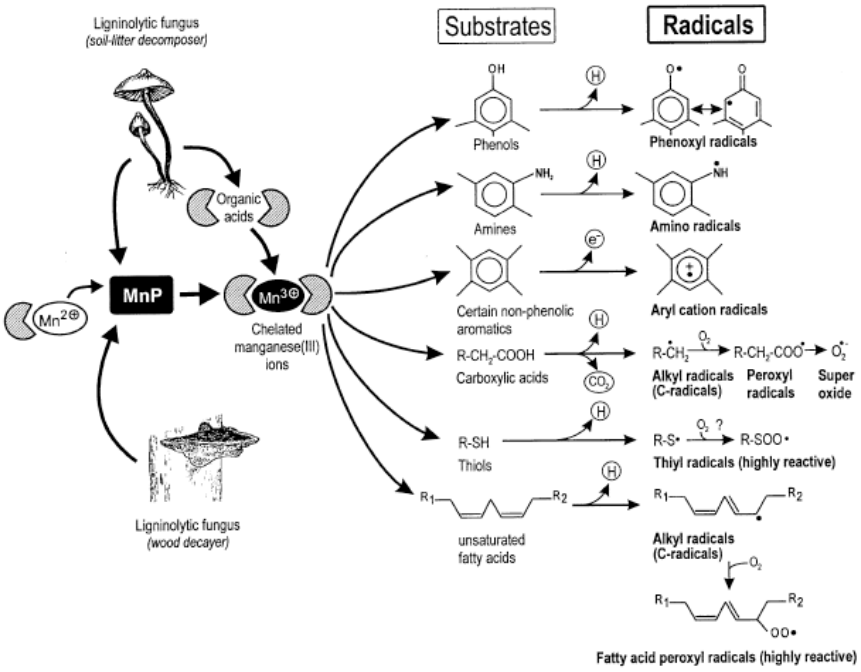


Figure 44 : Substrats cibles du complexe Mn^{3+}-acide organique. (Hofrichter, 2002).

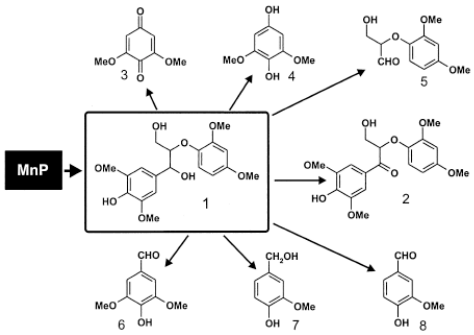


Figure 45 : Produits obtenus à partir de l'oxydation du dimère phénolique modèle de la lignine 1-(3,5-dimethoxy-4-hydroxyphenyl)-2-[4-(hydroxymethyl)-2-methoxyphenoxy]-1,3dihydro-xypropane (**1**) par les MnP (Hofrichter, 2002). (**2**) Forme cétonique de (**1**), (**3**) 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone, (**4**) 2,6-dimethoxy-1,4-dihydroxybenzene, (**5**) 2-(4-(hydroxymethyl)-2-methoxyphenoxy)-3-hydroxypropanal, (**6**) 3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzaldehyde (syringaldehyde), (**7**) 3-methoxy-4-hydroxybenzyl alcool (vanillyl alcool), (**8**) 3-methoxy-4-hydroxy-benzaldehyde (vanilline).

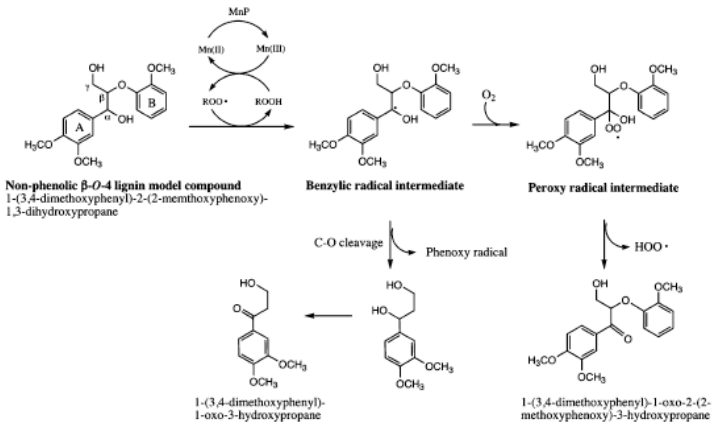


Figure 46 : Oxydation du composé non phénolique modèle de la lignine ß-O-4 catalysé par les MnP (Bao et al., 1994; Kapich et al., 2005).

3.C.III) Les peroxydases versatiles (VP)

Ce groupe d'enzymes présente des activités similaires à celles des LiP et des MnP. Leur structure présente un groupement prosthétique hème ainsi qu'un site de fixation du Mn^{2+}. De plus les résidus impliqués dans la reconnaissance des LiP avec leurs substrats sont également présents (Figure 47) (Camarero et al., 1999). Le cycle catalytique des VP est une combinaison des activités spécifiques des LiP et des MnP du fait qu'elles catalysent le transfert d'un électron à partir d'un substrat oxydable impliquant la formation et la réduction de deux composés (I et II) intermédiaires (Figure 48). Les VP sont capables d'oxyder une variété de composés organiques tels que les composés aromatiques non phénoliques (comme l'alcool vératryl ou le composé modèle de la lignine ß-O-4) ou les composés aromatiques phénoliques en absence de Mn^{2+} (Hofrichter et al., 2010).

L'interconversion structure/fonction entre les LiP et les MnP a été mise en évidence par ingénierie des protéines, fournissant ainsi des preuves supportant le design structural de l'enzyme hybride naturel (Mester et Tien, 2001; Timofeevski et al., 1999).

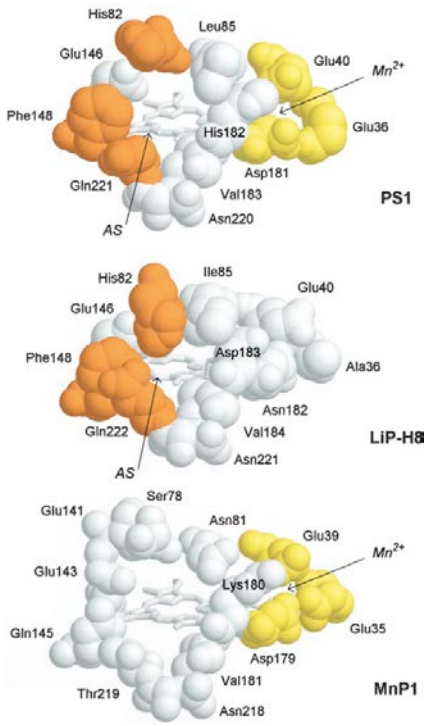


Figure 47 : Comparaison structurale de la LiP de *P.chrysosporium* (LiP-H8), de la MnP de *P.chrysosporium* (MnP1) et de la VP de *Pleurotus eryngii* (PS1). Les résidus impliqués dans la fixation du Mn^{2+} sont colorées en jaune et les résidus impliqués dans la reconnaissance de l'alcool vératryl et des susbtrats aromatiques (AS) sont colorés en orange (Camarero et al., 1999).

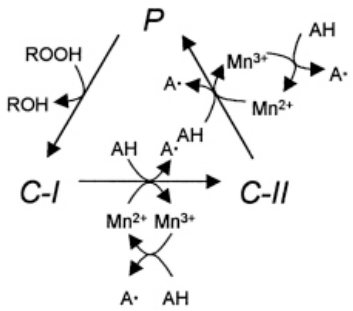


Figure 48 : Cycles catalytique des VP (Camarero et al., 1999).

3.C.IV) Les laccases

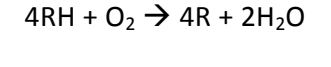
Les laccases sont des enzymes à cuivre catalysant la réaction :

$$4 \text{ benzenediol} + O_2 \leftrightarrow 4 \text{ benzosemiquinone} + 2H_2O$$

Ces enzymes semblent ubiquitaires chez tous les champignons de pourriture blanche. Cependant, *P.chrysosporium* n'en possède aucune, suggérant que leur présence n'est pas indispensable à une dégradation efficace de la lignine (Kersten et Cullen, 2007). Elles jouent un rôle dans la formation des pigments des spores, et dans la détoxication des produits issus de la dégradation de la lignine en agissant en synergie avec les peroxydases et d'autres enzymes dans ce même processus (Youn et al., 1995).

Les laccases fongiques peuvent exister sous forme dimérique ou monomérique, avec une taille comprise entre 50 et 110 kDa pour ces dernières (Thurston, 1994). Elles présentent un taux de glycosylation compris entre 10 et 45%. D'un point de vue structural trois domaines, de type tonneau ß arrangés séquentiellement, sont conservés chez ces enzymes (Figure 49).

Ces enzymes contiennent quatre atomes de cuivre sur trois types de sites différents, le type 1 (T1, un atome de Cu), le type 2 (T2, un atome de Cu) et le type 3 (T3, deux atomes de Cu). A l'état de repos de l'enzyme, les quatre atomes de cuivre sont dans un état d'oxydation Cu^{2+}. Le site T1 est situé dans le domaine 3 de l'enzyme, l'atome de cuivre reposant dans une dépression peu profonde située à la surface. Les sites T2 et T3 forment un groupe trinucléaire (T2/T3) à l'interface entre les domaines 1 et 3, chacun d'eux fournissant les résidus nécessaires à la coordination des atomes de cuivre (Wong, 2009). Les laccases catalysent quatre oxydations à un électron de substrats réducteurs avec réduction concomitante à deux électrons de l'O_2 en H_2O. La stœchiométrie est de quatre molécules de substrat réducteur pour chaque O_2, impliquant au total le transfert de quatre électrons selon l'équation suivante :



$$4RH + O_2 \rightarrow 4R + 2H_2O$$

La première étape de la catalyse est la réduction du substrat par l'atome de cuivre (Cu^{2+} en Cu^{+}) situé en T1 (Huang et al., 1999). Les électrons vont ensuite être transférés au site T2/T3 convertissant progressivement l'enzyme dans un état réduit total. Une oxydation successive de 4 électrons (à partir de 4 molécules de substrat) est requise pour réduire totalement l'enzyme

(Figure 50). L'étape limitante de ce processus est le transfert intramoléculaire des électrons du site T1 vers le site T2/T3. La réduction de l'O_2 se déroule en deux étapes via la formation d'intermédiaires fixant ce dernier. Lors de la première étape, l'O_2 va se fixer au niveau du site T2/T3 et deux électrons sont rapidement transférés depuis les atomes de cuivre du site T3 formant ainsi un intermédiaire peroxyde. Cet intermédiaire subit un clivage réductif à deux électrons entraînant la rupture de la liaison O-O en même temps que le relargage d'une molécule d'eau ainsi que le passage en intermédiaire radicalaire oxy (Lee et al., 2002). Lors de la seconde étape, les quatre atomes de cuivre sont à nouveau oxydés avec relargage d'une deuxième molécule d'eau.

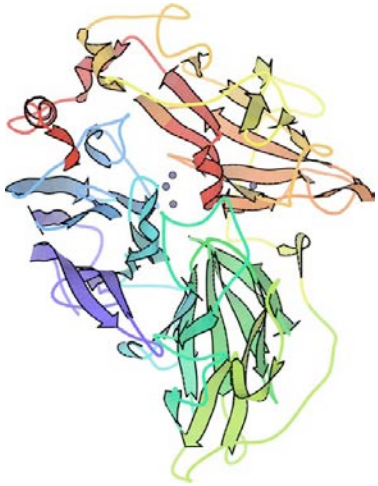


Figure 49 : Structure tridimensionnelle de la laccase-2 de *T.versicolor.* Les atomes de cuivres sont représentés par des points bleus (Piontek et al., 2002).

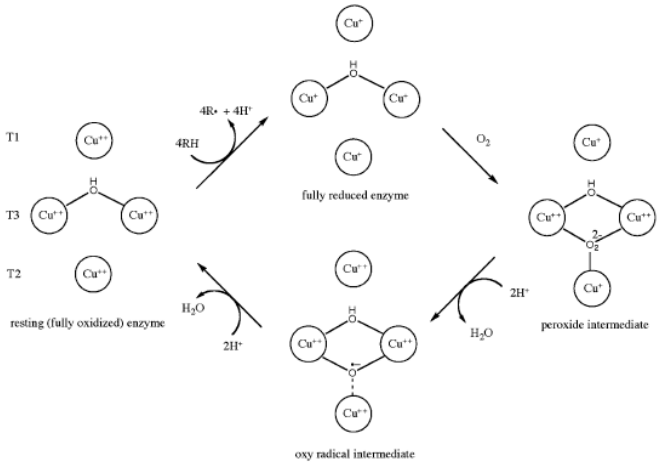


Figure 50 : Cycle catalytique des laccases (Wong, 2009).

Les laccases catalysent la soustraction d'un électron à partir de composés phénoliques modèles de la lignine, afin de former des radicaux phénoxy conduisant au clivage des liaisons C_α-$C_ß$, à l'oxydation du C_α, ou à un clivage alkyl-aryl (Figure 51) (Kawai et al., 1988).

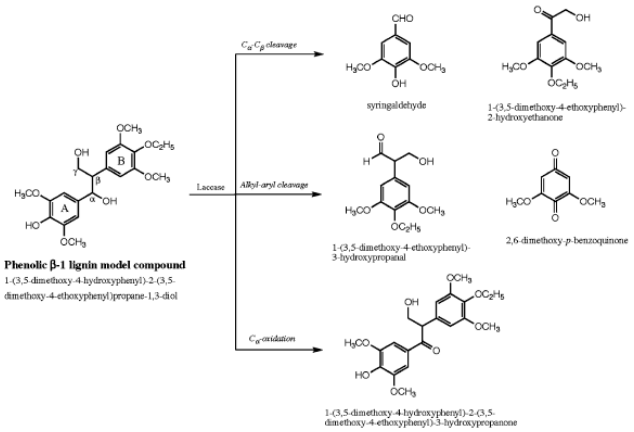


Figure 51 : Oxydation des modèles de dimères phénolique ß-1 de la lignine catalysée par les laccases (Kawai et al., 1988).

Elles peuvent également oxyder les composés non-phénoliques de la lignine, via un médiateur, les impliquant dans la dépolymérisation de cette dernière (Bourbonnais et Paice, 1990). Les médiateurs les plus étudiés ont été le 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) (ABTS) et le 1-hydroxybenzotriazole (HBT), ce dernier étant produit naturellement par le champignon *Pycnoporus cinnabarinus* (Eggert et al., 1996). Le processus d'oxydation est différent pour ces deux composés, l'ABTS implique la formation d'un di-cation tandis que pour l'HBT on observe la formation d'un radical benzotriazolyl-1-oxyde (Bourbonnais et al., 1997) (Figure 52 A et B). L'oxydation de l'alcool vératryl par ces deux médiateurs est présentée en Figure 52 C et D (Fabbrini et al., 2002).

La dégradation des composés non phénolique modèles de la lignine (ß-O-4) par l'HBT peut se faire selon quatre réactions : clivage de la liaison ß-éther, clivage de la liaison C_α-$C_ß$, oxydation du C_α et clivage du noyau aromatique (Figure 53) (Kawai et al., 2004; Kawai et al., 2002).

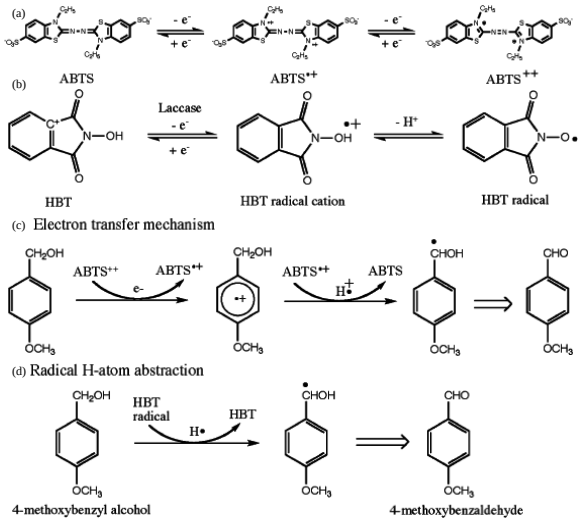


Figure 52 : Mécanismes d'activation de l'ABTS et de l'HBT médiés par les laccases (**A et B)**, et mécanismes d'oxydation de l'alcool vératryl par ces composés **(C et D)** (Wong, 2009). L'ABTS est premièrement oxydé en cation radicalaire ($ABTS^{\bullet+}$) puis en dication ($ABTS^{2+}$) tandis que l'HBT est directement oxydé en cation radicalaire par les laccases ($HBT^{\bullet+}$) puis spontanément déprotoné afin de former le radical HBT•. L'oxydation de l'alcool vératryl grâce à l'ABTS se déroule selon un mécanisme de transfert d'électrons **(C)**. L'HBT quant à lui capte un atome d'hydrogène à partir du substrat le convertissant en radical **(D)**.

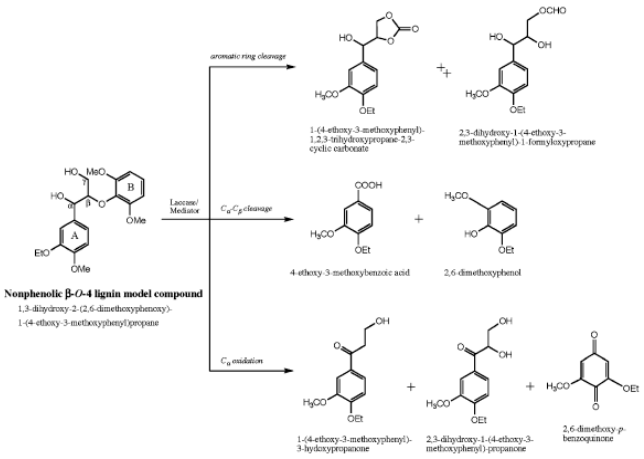


Figure 53 : Oxydation du composé non phénolique modèle de la lignine ß-O-4 catalysé par les laccases et l'HBT (Kawai et al., 2002).

3.C.V) Les enzymes auxiliaires

Pour fonctionner correctement les peroxydases (LiP, MnP et VP) ont besoin d'H_2O_2, celui-ci est généré par des oxydases intra ou extracellulaires : l'aryl alcool oxydase (AAO), la glyoxal oxydase (GOx), l'aryl alcool déshydrogénase (AOx), la pyranose-2-oxydase (POD) et les quinones réductases (QR) (Figure 54) (Shah et Nerud, 2002). Il semble peu probable que les enzymes intracellulaires soient impliquées dans ce processus (Hernández-Ortega et al., 2012).

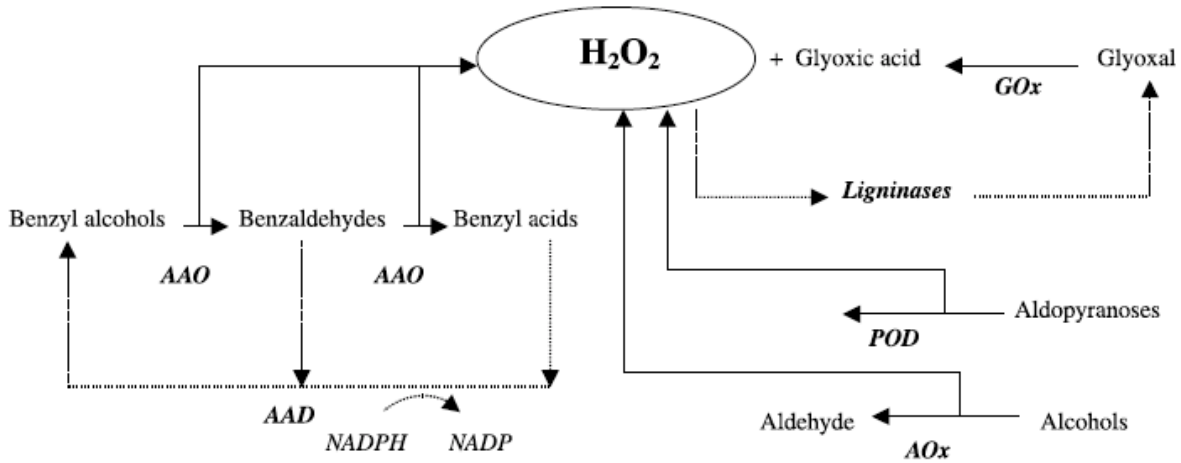


Figure 54 : Représentation schématique des différentes voies de biosynthèse de l'H_2O_2 (Shah et Nerud, 2002). GOx, glyoxal oxydase ; POD, pyranose oxydase ; AOx, alcool oxydase ; AAD, aryl alcool déshydrogénase ; AAO, aryl alcool oxydase.

Une enzyme potentiellement impliquée est la GOx. Elle oxyde une variété de petits aldéhydes tels que le glyoxal et le méthylglyoxal, des métabolites extracellulaires sécrétés par *P. chrysosporium*, et transfert les électrons à l'O_2 afin de générer de l'H_2O_2 (Figure 55 (a)) (Kersten et Kirk, 1987). Un autre candidat est l'AAO qui oxyde les alcools benzyliques en aldéhydes en transférant les électrons sur l'O_2 afin de générer de l'H_2O_2 (Figure 55 (b)). Les champignons de pourriture blanche *Bjerkandera adusta* et *Pleurotus ostreatus* sécrètent différentes mixtures d'alcools benzyliques sous forme chlorée afin que ceux-ci ne soient pas un substrat des LiP mais des AAOs, permettant ainsi au champignon de séparer les voies de génération de l'H_2O_2 des enzymes ligninolytiques (Hammel, 1996).

Plusieurs oxydases d'oses sont également des productrices d'H_2O_2 mais la plupart sont intracellulaires. Cependant, la POD qui oxyde une variété de monosaccharides a été localisée dans la matrice saccharidique extracellulaire qui recouvre le lumen des cellules pendant le processus de pourriture blanche induit par les champignons *P. chrysosporium*, *T. versicolor* et *Oudemansiella mucida* (Daniel et al., 1994).

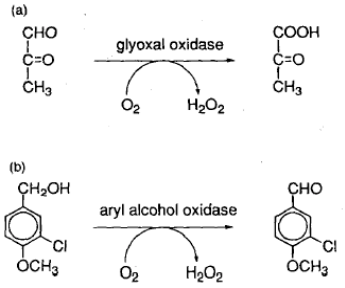


Figure 55 : Production extracellulaire d'H_2O_2 par les glyoxal oxydases (**a**) et les aryl alcool oxydases (**b**) (Hammel, 1996).

3.C.VI) Enzymes d'origine bactérienne

Bien que la dégradation de la lignine ait été étudiée intensément chez les champignons, il existe aussi des bactéries capables de la dégrader (Zimmermann, 1990). Parmi elles, le genre *Streptomyces* est capable de sécréter plusieurs peroxydases catalysant le clivage oxydatif des liaisons ß-aryl éther sur des composés modèles de la lignine (Ramachandra et al., 1988). Plus récemment, deux souches bactériennes ont pu être isolées grâce à des tests spectrophotométriques spécifiques de la dégradation de la lignine : la souche *Pseudomonas putida* mt-2 et la souche *Rhodococcus jostii* RHA1. Cependant l'activité ligninolytique de ces deux souches était beaucoup moins importante que celle détectée chez *P. chrysosporium* (Ahmad et al., 2010). Une peroxydase active sur des composés modèles de la lignine a pu être purifiée à partir de la souche *R.jostii* RHA1 (Ahmad et al., 2011). Elle est activée par les ions Mn^{2+} dont elle possède un site de fixation potentiel (Roberts et al., 2011). La souche la plus étudiée vis à vis de la dégradation de la lignine est *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. Elle est capable de croitre sur des composés de type biphényls, similaires à ceux retrouvés dans la lignine, comme seule source de carbone mais elle est aussi capable d'utiliser une variété de composés de type monoaryles et biaryles retrouvés dans la lignine (Masai et al., 2007). Cette bactérie possède un système unique lui permettant de cliver spécifiquement les liaisons ß-aryl éther (Figure 56).

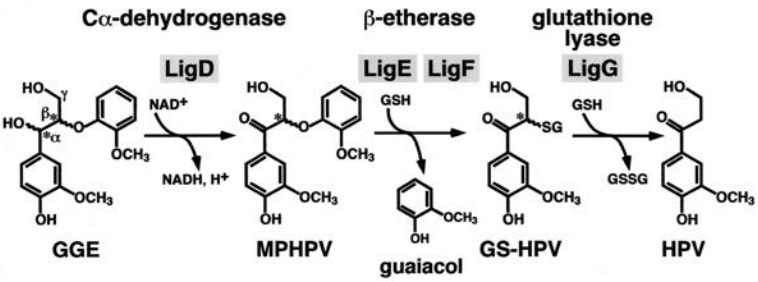


Figure 56 : Schéma de dégradation des liaisons ß-aryl éther par l'opéron LigEFG. GGE : guaiacylglycerol-ß-guaiacyl ether ; GSH : glutathion réduit; GSSG : glutathion oxydé ; MPHPV : α-(2-methoxyphenoxy)-ß-hydroxypropiovanillone ; HPV : α-glutathionyl-ß-hydroxypropiovanillone (Masai et al., 2003).

L'oxydation initiale du groupement hydroxyle situé sur le C_α du composé modèle ß-aryl éther (GGE) en cétone (MPHPV) est catalysée par la déshydrogénase NAD-dépendante LigD (Masai et al., 1993). Ensuite un clivage réductif inhabituel a lieu via des enzymes appartenant à la superfamille des glutathion-S-transférases (GST) (Masai et al., 1989). Les enzymes LigEFG, organisées en opéron, sont responsables de cette transformation : LigE et LigF, nommées ß-éthérases, catalysent l'addition d'une molécule de glutathion réduit (GSH) sur les deux énantiomères du substrat aryl éther pour donner un intermédiaire thio-éther (GS-HPV) (Masai et al., 2003). Finalement LigG va déglutathionyler cet intermédiaire grâce à une seconde molécule de GSH générant du glutathion oxydé (GSSG) (Masai et al., 2003). Chez les champignons, une enzyme extracellulaire serait capable d'hydrolyser spécifiquement cette liaison grâce à la création d'un intermédiaire cationique sur le C_α suivi de l'intervention de deux molécules d'eau (Figure 57) (Otsuka et al., 2003).

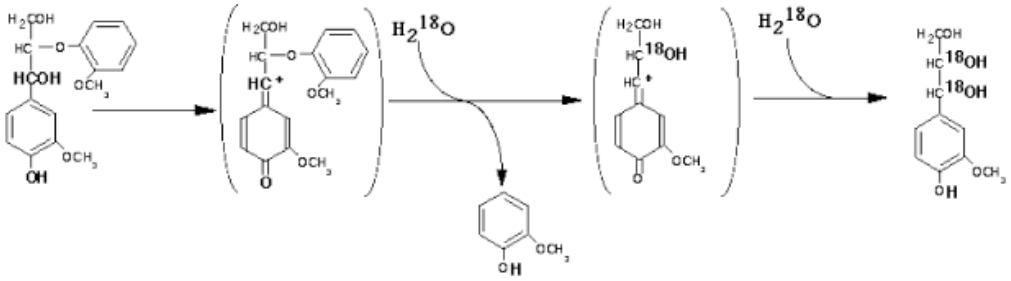


Figure 57 : Hydrolyse des liaisons ß-aryl éther par une éthérase extracellulaire fongique (Otsuka et al., 2003).

Une analyse bioinformatique récente a permis d'identifier une famille de GST intracellulaires chez les champignons décomposeurs du bois ayant une similarité de séquence avec les LIG de *S. paucimobilis*, la famille des glutathion-S-transférases éthérase like (GTE) (Figure 58) (Morel et al., 2009). Cette famille d'enzymes pourrait être impliquée dans la dégradation de composés dérivés de la lignine générés lors de la dégradation de cette dernière et internalisés par les champignons.

A

	PcGTE2	PcGTE3	PcGTE4	PcGTE5	LIG-E	LIG-G	LIG-F
PcGTE1	**74.0**	**59.1**	38.9	29.5	23.7	19.1	11.4
PcGTE2		**58.4**	38.8	32.3	24.7	17.4	14.9
PcGTE3			38.0	33.5	23.4	13.8	13.9
PcGTE4				27.9	16.2	13.5	12.4
PcGTE5					17.1	16.2	14.1
LIG-E						20.3	16.0
LIG-G							16.7

B

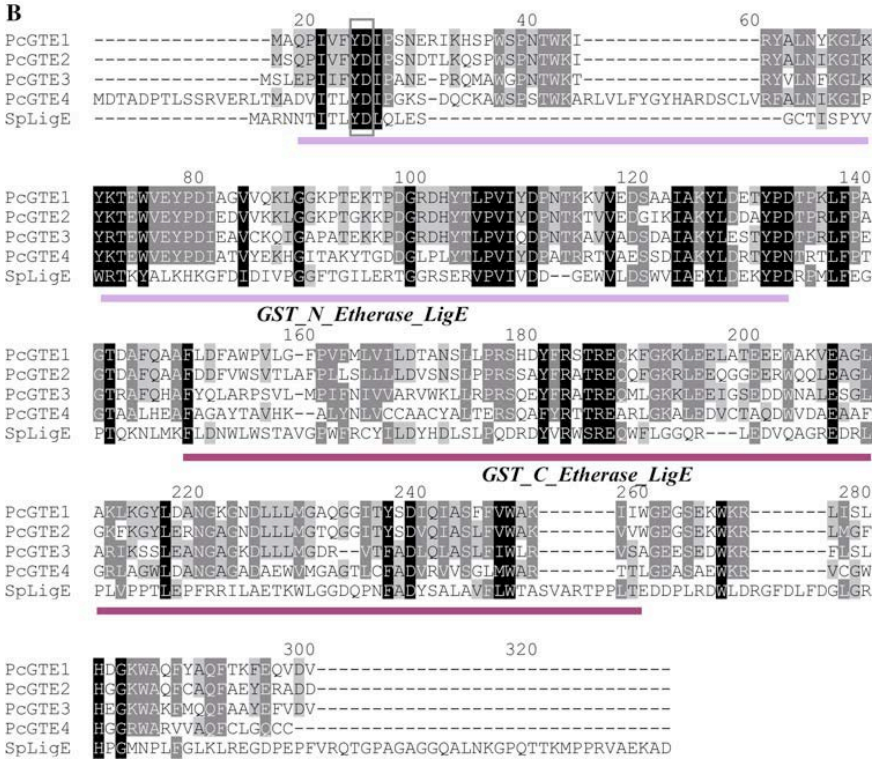


Figure 58 : Comparaison de séquence des GTE de *P. chrysosporium* et des Lig de *S. paucimobilis.* **(A)** Pourcentage d'identité entre les séquences de GTE et des Lig. **(B)** Alignement de séquence des GTE et des Lig (Morel et al., 2009).

4) Diversité des enzymes impliquées dans la détoxication

Lors de la décomposition du bois, les champignons génèrent une grande diversité de composés plus ou moins toxiques (xénobiotiques) via les systèmes oxydatifs extracellulaires (Rabinovich et al., 2004; Wackett et Gibson, 1982) (Figure 59). Les composés phénoliques, par exemple, présentent des propriétés cytotoxiques vis à vis des champignons (pour une revue détaillée voir Lee et al., 2012).

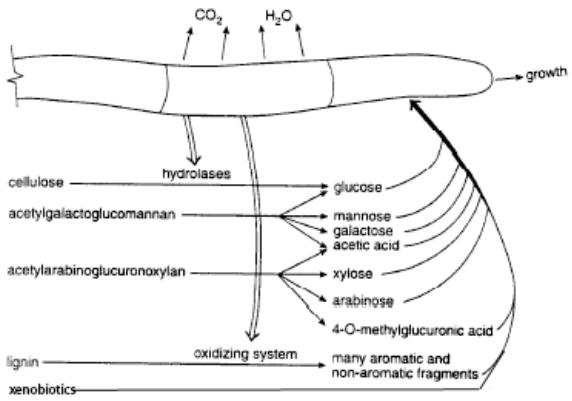


Figure 59 : Illustration schématique de la génération et de l'internalisation de composés nutritifs et/ou toxiques par l'hyphe en croissance (adapté de Kirk et Cullen, 1998).

Ces composés toxiques peuvent être dégradés de manière extracellulaire par les mêmes systèmes oxydatifs que ceux impliqués dans la dégradation du bois (Rabinovich et al., 2004), ou de manière intracellulaire. Cette détoxication, par les systèmes intracellulaires, a pour but de rendre plus solubles ces composés mais aussi d'induire une perte de leurs activités biologiques. Ce processus se déroule en 3 phases (Figure 60) (Harms et al., 2011; Sheehan et al., 2001).

4.A) Phase I

La première phase (phase I) permet la bio activation des composés toxiques faisant intervenir majoritairement des réactions d'oxydation, d'époxydation des doubles liaisons C=C et d'hydroxylation. Un grand nombre de réactions sont catalysées par les cytochromes P450 mono oxygénases nécessitant le NADPH comme cofacteur et l'O_2 afin d'introduire un groupement hydroxyle sur le xénobiotique. Il en résulte un produit activé pouvant parfois être plus toxique que le composé de départ. Ces enzymes peuvent être impliquées dans le métabolisme primaire

(Cresnar et Petric, 2011; Lepesheva et Waterman, 2007), dans le métabolisme secondaire (Cresnar et Petric, 2011; Yu et al., 2004) ou encore dans la détoxication et l'élimination de xénobiotiques (Cresnar et Petric, 2011; Hirosue et al., 2011; Syed et al., 2010). Contrairement aux cytochromes P450 essentiels au métabolisme primaire, les isoformes impliquées dans les voies de détoxication sont moins spécifiques (Cresnar et Petric, 2011).

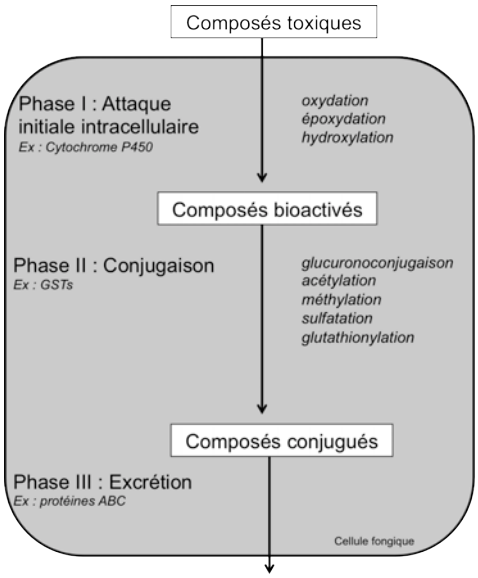


Figure 60 : Systèmes de détoxication des xénobiotiques par les champignons (adapté de Harms et al., 2011).

Les cytochromes P450 sont très largement représentés chez les champignons décomposeurs du bois. Ainsi 154 gènes (soit environ 1% du génome) sont présents chez *P.chrysosporium.* Ils sont répartis en 12 familles exprimées à la fois en conditions ligninolytiques ou non (Doddapaneni et al., 2005; Martinez et al., 2004). Ces cytochromes P450 versatiles ont émergé depuis différents gènes ancestraux grâce à de nombreux évènements de duplication et recombinaison suggérant une évolution dirigée par l'adaptation du champignon à la dégradation du bois (Doddapaneni et al., 2005; Hirosue et al., 2011). Chez *P. chrysosporium*, l'expression de certains de ces gènes est induite par la présence de divers composés aromatiques (Doddapaneni et Yadav, 2004; Ning et al., 2010). Chez un autre champignon de pourriture blanche, *Phanerochaete carnosa,* l'expression de 21 gènes codant pour des cytochromes P450 est différentiellement régulée en fonction de l'essence de bois dégradée (MacDonald et al., 2011). Chez le champignon de pourriture brune *P. placenta,* il existe 250 gènes codant pour des cytochromes P450 répartis en 42 familles (Ide et al., 2012), et l'induction différentielle de 15 d'entre eux a été observée lors de l'ajout de différents extraits de bois (pin et peuplier) (Vanden Wymelenberg et al., 2011).

4.B) Phase II

Lors de la phase II, les molécules toxiques ou les métabolites intermédiaires générés lors de la phase I subissent une conjugaison, avec un groupement polaire, favorisant leur solubilité et diminuant leur toxicité. On distingue plusieurs types de réaction suivant la nature de la molécule à conjuguer :

- L'addition d'oses (glucose, xylose…) comme par exemple la glucuronoconjugaison, catalysée par les UDP-glucuronyl transférases, qui utilisent l'acide UDP-ß-glucuronique comme substrat de conjugaison (King et al., 2000).
- L'acétylation impliquant le transfert de groupements acétyles en présence d'acétyl-CoA grâce aux N-acétyltransférases (Boukouvala et Fakis, 2005).
- Les réactions de méthylation catalysées par des méthyltransférases en utilisant la S-adénosylméthionine comme substrat de conjugaison (Jeffers et al., 1997).
- La sulfatation catalysée par les sulfotransférases en présence de 3-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate (Glatt, 2000).
- Enfin, la mercaptoconjugaison catalysée par la superfamille des GST utilisant le glutathion comme substrat de conjugaison sur des composés de nature électrophile. Cette dernière pourrait être la réaction majoritaire dans un grand nombre d'organismes y compris les champignons (Sheehan et al., 2001).

Les différents conjugués (et/ou les différentes activités) ont été détectés durant la dégradation de nombreux composés chez différentes espèces de champignons décomposeurs du bois (Bezalel et al., 1997; Campoy et al., 2009; Hundt et al., 2000; Reddy et Gold, 2000; Sutherland et al., 1991).

4.C) Phase III

Les composés formés en phase II sont en général trop hydrophiles pour diffuser librement à travers la membrane plasmique. Chez les plantes supérieures et les champignons, ils sont stockés dans la vacuole ou éliminés de la cellule (Harms et al., 2011). La phase III consiste donc en l'excrétion et/ou le stockage des xénobiotiques qui ne peuvent plus alors retraverser la membrane. L'expulsion de ces produits hors du cytoplasme se fait par l'intermédiaire de

transporteurs membranaires de type Multi-Drug Resistance (MDR). Parmi ces transporteurs, les membres de la famille multigénique des protéines ABC (ATP Binding Cassette) jouent un rôle majeur dans le transport de nombreux substrats à travers les membranes biologiques. Ces protéines sont retrouvées chez les bactéries, les plantes, les animaux et les champignons (Kovalchuk et Driessen, 2010). La plupart sont des transporteurs actifs, qui utilisent l'énergie générée par hydrolyse de l'ATP, généralement impliqués dans la résistance aux herbicides, aux pesticides et autres xénobiotiques (Martinoia et al., 2002). La pompe à glutathion (GS-X pump) est le principal transporteur impliqué dans l'excrétion des composés glutathionylés (Ishikawa, 1992).

5) Les Glutathion-S-transférases (GST)

Les GST (E.C.2.5.1.18) sont des enzymes de phase II qui interviennent dans la conjugaison du GSH sur des molécules toxiques, en général hydrophobes, présentant un centre électrophile (carbone, azote ou soufre). Ceci afin de les rendre plus hydrosolubles et favoriser leur séquestration dans la vacuole ou leur excrétion par des enzymes de phase III (Sheehan et al., 2001). Les GST peuvent catalyser un grand nombre de réactions comme la substitution nucléophile aromatique, l'addition de Michael, l'isomérisation et la réduction des hydroperoxydes (Hayes et al., 2005). En dehors des activités de conjugaison, les GST possèdent de nombreuses fonctions dans plusieurs voies de biosynthèse ainsi qu'une fonction de transport nommée « ligandine ».

La réaction de conjugaison catalysée par les GST (Figure 61) est représentée de la manière suivante où R-X représente un substrat électrophile :

$$GSH + R\text{-}X \rightarrow GS\text{-}R\text{–}X\text{-}H$$

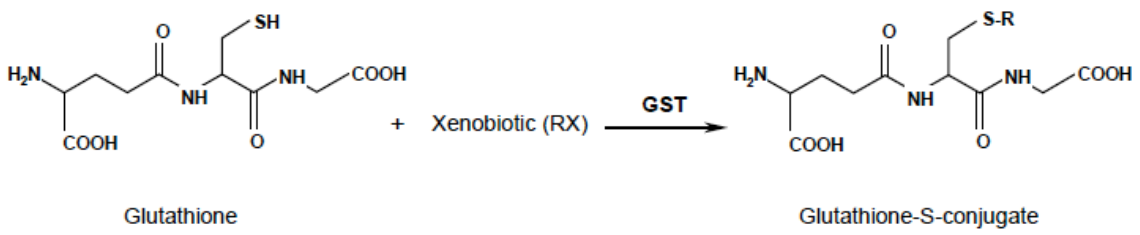


Figure 61 : Activité de conjugaison du GSH sur les xénobiotiques par les GST.

5.A) Classification

Les GST sont classées en 3 groupes majeurs, chacun étant codé par des familles multigéniques distinctes : les GST microsomales, les GST mitochondriales et les GST cytosoliques, ces dernières représentant le groupe le plus important.

Les GST microsomales, aussi appellées MAPEG pour *Membrane Associated Protein in Eicosanoid and Glutathione metabolism,* regroupent des protéines identifiées chez les plantes, les animaux, les bactéries et les champignons (Bresell et al., 2005; Jakobsson et al., 2000). La plupart de ces enzymes sont impliquées dans la synthèse des eicosanoïdes, leukotriènes et prostaglandines, catalysant des réactions de conjugaison ou d'isomérisation dépendantes du GSH (Frova, 2006). Elles sont fortement divergentes des GST cytosoliques avec moins de 10% d'identité de séquence, des sous-unités plus courtes avec une taille moyenne de 150 acides aminés et une topologie complètement différente. En effet, ce sont des protéines transmembranaires dont les parties N et C terminales sont situées dans le lumen, tandis que les sites de fixation du GSH et du substrat sont situés dans des boucles tournées vers le cytosol (Busenlehner et al., 2004; Holm et al., 2006).

Les GST mitochondriales ont été initialement isolées à partir de mitochondries de cellules de foie de rat (Harris et al., 1991), mais elles peuvent aussi être localisées dans les peroxysomes (Morel et al., 2004). Ces enzymes ont d'abord été classées parmi les membres de la famille Thêta sur la base de l'identité de leur séquence N-terminale. Cependant, l'analyse approfondie des séquences nucléiques et peptidiques a fait émerger des différences majeures avec les autres GST de mammifères, entraînant la création d'une nouvelle classe nommée Kappa (Pemble et al., 1996). La caractérisation moléculaire et biochimique des enzymes murine (Jowsey et al., 2003) et humaine (Morel et al., 2004; Robinson et al., 2004), ainsi que la détermination des structures tridimensionnelles des protéines de rat (Ladner et al., 2004) et d'homme (Li et al., 2005) ont permis de définir les caractéristiques de cette nouvelle famille de GST. Ces enzymes présentent des activités de type peroxydase et de conjugaison dépendante du GSH sur des substrats modèles, partageant ainsi des caractéristiques avec les GST cytosoliques. La comparaison des séquences peptidiques montrent que les GST Kappa ne partagent pas d'homologies significatives avec les GST cytosoliques, mais sont proches de DsbA d'*E.coli*, une isomérase des liaisons disulfures, et des 2-hydroxychromène-2-carboxylate (HCCA) isomérase bactériennes, une oxydoréductase dépendante du GSH impliquée dans la dégradation du naphtalène (Ladner et al., 2004; Robinson et al., 2004).

5.B) Les GST cytosoliques (cGST)

Cette famille de GST ubiquitaire est la plus abondante, comptant parfois plus d'une dizaine de membres dans certaines espèces. Par exemple, chez l'homme et d'autres espèces de mammifères, 15 à 20 gènes codants pour des cGST ont été identifiés (Hayes et al., 2005), 43 à 105 chez les plantes (Chi et al., 2011), 10 à 15 chez les bactéries (Vuilleumier et Pagni, 2002), 10 à 40 chez les insectes (Oakeshott et al., 2010) et de 10 à 50 chez les champignons (Morel et al., 2009). Les GST cytosoliques sont classées en fonction de plusieurs critères. Deux GST appartiennent à la même classe si elles partagent plus de 40% d'identité de séquence peptidique (Hayes et al., 2005). Lorsque les pourcentages d'identité sont compris entre 25 et 40%, d'autres facteurs sont pris en compte pour affiner la classification comme par exemple la structure physique des gènes (taille et position des introns/exons), les propriétés immunologiques ou encore les activités enzymatiques. Les différentes classes de cGST ainsi que leur distribution sont répertoriées dans le Tableau 6. Chaque taxon possédant au moins un membre des classes ubiquitaires ainsi qu'une ou plusieurs classes spécifiques.

Tableau 6 : Classification des principales GST cytosoliques.

Taxon	Classes communes	Classes spécifiques
Mammifères	Zêta (Z) Thêta (T) Oméga (O) Sigma (S)	Alpha (A) Mu (M) Pi (P)
Plantes	Zêta (Z) Thêta (T)	Phi (F) Tau (U) Lambda (L) DHAR
Insectes	Zêta (Z) Thêta (T) Oméga (O) Sigma (S)	Delta (D) Epsilon (E)
Bactéries	Thêta (T) Zêta (Z)	Bêta (B) Chi Eta (H)
Champignons	Oméga (O)	EF1Bγ MAK16 GTT1 GTT2 Ure2p GHR GTE

Les mammifères possèdent des GST appartenant à des classes qui leur sont spécifiques (Alpha, Mu et Pi), mais aussi des GST rencontrées chez d'autres organismes (Oméga, Sigma, Thêta et Zêta). Les GST de plantes se regroupent au sein des classes spécifiques Phi, Tau, Lambda et DHAR et des classes communes Thêta et Zêta. Six classes sont reconnues chez les insectes : Delta et Epsilon qui sont spécifiques, puis Thêta, Zêta, Sigma et Oméga. Chez les bactéries, cinq classes de GST ont été identifiées : Bêta, Chi, Thêta, Zêta et Eta. La plupart des GST bactériennes caractérisées appartiennent aux classes Bêta et Eta (Skopelitou et al., 2012). La classification des GST fongiques a été décrite plus tard et ne suit pas la classification classique, définissant ainsi de nouvelles classes : eEF1Bγ, MAK16, GTT1 et 2, Ure2p et GTE (McGoldrick et al., 2005; Morel et al., 2009). Ces GST étant beaucoup moins étudiées que celles des autres organismes, leur classification n'est pas encore définitive et risque d'évoluer avec l'extension des données génomiques. D'autres classes spécifiques ont été identifiées, comme la classe Rho présente uniquement chez les poissons (Konishi et al., 2005) ou la classe Nu qui regroupe les GST de nématodes (Campbell et al., 2001; Schuller et al., 2005).

La grande majorité des cGST est active sous forme de dimères qui sont composés, soit de sous-unités identiques (homodimère), soit différentes (hétérodimère). Cependant cette hétérodimérisation ne peut s'effectuer qu'entre GST appartenant à une même classe car les monomères de classes différentes sont incapables de s'associer en raison de l'incompatibilité entre les résidus situés à l'interface. La classe Lambda peut être active sous forme monomérique, cependant elle ne possède pas d'activité peroxydase ou de conjugaison dépendante du glutathion envers les substrats classiques. Elle reste néanmoins considérée comme GST sur la base de sa similarité séquentielle et structurale, et de par son activité thiol transférase (Dixon et al., 2002).

5.C) Relation structure fonction des GST cytosoliques

Comme indiqué précédemment , les cGST sont de façon générale actives sous forme de dimères constitués de sous-unités dont le poids moléculaire est compris entre 23 et 30 kDa avec une longueur moyenne de 200-250 acides aminés. La résolution de nombreuses structures d'isoformes appartenant à différentes classes et provenant de multiples organismes (plantes, mammifères, insectes, champignons, bactéries) a permis d'approfondir leur mécanisme catalytique ainsi que les bases moléculaires de leur évolution et de leur capacité de détoxication des composés électrophiles endogènes et des xénobiotiques. L'analyse de ces structures

démontre clairement que malgré une forte divergence séquentielle, les GST partagent un fort degré de conservation dans leur architecture tridimensionnelle avec des repliements similaires et une même organisation dimérique (à l'exception des MAPEG) (Oakley, 2011). Chaque sous-unité est composée de deux domaines spatialement distincts : un domaine N-terminal (domaine I) constitué de brins ß et d'hélices α adoptant un repliement typique du motif thiorédoxine responsable de la fixation du GSH, aussi appelé site G, et un domaine C-terminal (domaine II) composé uniquement d'hélices α responsable de la reconnaissance des substrats, aussi appelé site H (Figure 62). Ces deux sites (G et H) forment le site actif des GST.

Figure 62 : Structure tridimensionnelle d'une sous-unité de GST (Sheehan et al., 2001). Le domaine I (partie N-terminale) contenant le site G responsable de la fixation du GSH est coloré en bleu, et le domaine II (partie C-terminale) responsable de la reconnaissance des substrats est coloré en rouge.

5.C.I) Le domaine I : Site G

Le domaine I adopte un repliement typique des thiorédoxines (ßαßαßßα), constitué de deux motifs structuraux : $ß_1α_1ß_2$ en N-ter et $ß_3ß_4α_3$ en C-ter reliés par une longue boucle contenant une hélice α ($α_2$). Ensemble, ces deux motifs forment un feuillet ß composé de trois brins parallèles ($ß_1ß_2ß_4$) et d'un brin anti-parallèle ($ß_3$) (Figure 63).

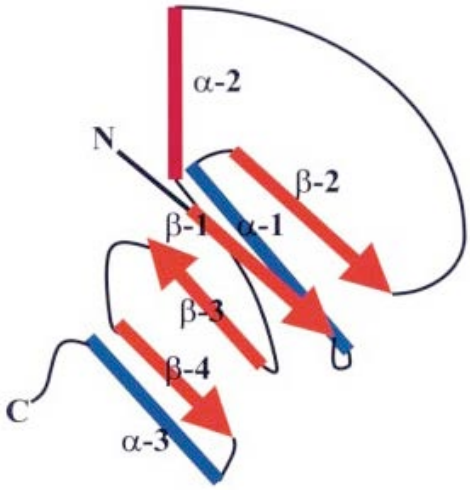


Figure 63 : Représentation schématique du repliement thiorédoxine. Les hélices α sont représentées par des cylindres, tandis que les brins ß sont représentés par des flèches (Sheehan et al., 2001).

L'hélice α_2 et le brin $ß_3$ sont connectés par une boucle contenant une *cis*-proline, hautement conservée dans toutes les classes de GST, formant des liaisons hydrogène avec le groupement amine du résidu cystéinyl du GSH (Oakley, 2011). Cette boucle, bien que non impliquée directement dans la catalyse, est importante pour le maintien de la protéine dans une structure catalytiquement compétente (Allocati et al., 1999). Ce domaine I est connecté au domaine II par une petite séquence linker (Dirr et al., 1994).

Ce repliement se retrouve dans une dizaine de familles de protéines différentes : les thiol transférases (incluant les thiorédoxines et les glutarédoxines), les glutathion peroxydases, les isomérases de liaisons disulfures, les calséquestrines, les phosducines, le domaine N-terminal des protéines ERP29 du réticulum endoplasmique, la protéine U5 du spliceosome, les ferrédoxines 2Fe-2S thiorédoxine-like et l'arsenate réductase ArsC (Nathaniel et al., 2003).

Ce domaine, fortement conservé, contient la majorité des résidus impliqués dans la fixation et la stabilisation du GSH qui est lié dans une conformation étendue avec le résidu γ-glutamyl dirigé vers l'interface du dimère. L'atome de soufre du groupement cystéinyl est dirigé vers la sous-unité à laquelle il est fixé, et le résidu glycyl est localisé près de la surface de l'enzyme. Le GSH est ancré dans la protéine grâce à une douzaine d'interactions électrostatiques, utilisant tout les donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène du peptide. Cette orientation du glutathion est approximativement conservée dans toutes les classes d'enzymes, seuls les résidus impliqués dans les liaisons hydrogènes varient (Armstrong, 1997).

Seule la région contenant l'hélice α_2 exhibe la plus grande variabilité parmi les différentes classes. Cet élément de structure secondaire contient les résidus interagissant avec le résidu glycine du GSH, et également le résidu catalytique responsable de l'activation et/ou de la stabilisation du GSH. Selon les classes de GST ce résidu peut être une sérine, une tyrosine ou une cystéine (Tableau 7).

Lorsqu'une sérine/tyrosine catalytique est présente, le groupement hydroxyle de celles-ci forme une liaison hydrogène avec l'atome de soufre du GSH favorisant la formation et la stabilisation d'un anion thiolate (GS^-). Cet anion hautement réactif est responsable de l'attaque nucléophile sur substrat électrophile (Armstrong, 1997; Dirr et al., 1994). L'importance de ce groupement hydroxyle a été démontrée dans plusieurs études. Par exemple, la mutation de la tyrosine 7 en phénylalanine d'une enzyme humaine de la famille Pi entraîne une forte diminution de son activité (Kong et al., 1992). Des études similaires ont confirmé l'importance du résidu sérine dans les classes Thêta (Tan et al., 1996), Zêta (Fang et al., 2011), Delta (Winayanuwattikun et Ketterman, 2004), et Tau (Zeng et al., 2005).

Lorsque les GST possèdent une cystéine, elles forment un pont disulfure avec le GSH, leur permettant d'effectuer des réactions redox plutôt que des réactions de conjugaison (Board et al., 2000). Cette propriété est partagée par les classes Oméga, Bêta, Lambda, les DHAR, ainsi que les glutarédoxines. Ainsi, à l'instar de ces dernières, les GST Oméga peuvent également catalyser la réduction du déhydroascorbate.

Tableau 7 : Résidu catalytique selon les différentes classes de GST.

Classe	Résidu du site actif
Alpha/Mu/Pi	Tyrosine
Sigma	Tyrosine
Thêta	Sérine
Zêta	Sérine
Delta	Sérine
Phi/Tau	Sérine
Bêta	Cystéine (Sérine)
Lambda/DHAR	Cystéine
Oméga	Cystéine
Eta	Arginine

5.C.II) Le domaine II : Site H

Ce domaine (approximativement 87-210 résidus) est constitué par un nombre variable d'hélices selon les différentes classes, positionnées en aval du motif thiorédoxine et connectées à ce dernier par la séquence linker. Contrairement au domaine I, ce domaine présente de grandes divergences séquentielles et topologiques. Ses résidus contribuant à la reconnaissance des substrats, ces différences sont responsable de la spécificité entre les différentes enzymes (Armstrong, 1997; Wilce et Parker, 1994). Dans la plupart des GST, une crevasse profonde en forme de V accessible au solvant est observée à l'interface avec une surface enfouie de 2700-3400 Angstrom^2 (Frova, 2006). Les différences de surface enfouie et de polarité des résidus du site H contribuent à la spécificité des substrats. Dans la plupart des classes, la présence de boucles et d'hélices supplémentaires, en partie C-terminale, contribuent à la plasticité structurale du site H (Oakley, 2005). Par exemple, les GST Oméga possèdent la capacité de fixer des molécules partiellement hydrophiles et de taille assez importante telles que des protéines. Etant donné la présence d'une cystéine comme résidu catalytique, il est probable que ces enzymes aient un rôle dans la réduction de ponts disulfures inter-protéiques formés lors d'un stress oxydant. Ces GST empêcherait ainsi l'aggrégation des protéines en condition de stress (Board et al., 2000).

5.C.III) Dimérisation

Comme indiqué précédemment, les GST sont actives sous forme homodimérique pour la majorité. Pour toutes les GST, les deux sous-unités sont reliées selon un axe de symétrie de type C2. Les interactions principales entre les deux sous-unités ont lieu entre le domaine I d'une sous-unité et le domaine II de l'autre. Chez les enzymes de classe Thêta, Sigma, Bêta et Tau, l'interaction à l'interface des sous-unités est plutôt hydrophile tandis qu'elle est plutôt de type hydrophobe pour les classes Alpha, Mu, Pi, Oméga, Phi et Zêta (Frova, 2006).

L'interaction hydrophobe est caractérisée par un motif de type « clé-serrure » (aussi appelé « lock and key » ou « ball and socket »), qui s'établit grâce à la chaîne latérale d'un résidu phénylalanine (« clé ») appartenant à la boucle située entre l'hélice α_2 et le brin $ß_3$ du domaine I. Cette boucle est dirigée vers une poche hydrophobe (« serrure ») située entre les hélices α_4 et α_5 du domaine II de l'autre sous-unité. L'interaction hydrophile est possible grâce à un vaste réseau d'interactions polaires causées par l'absence de motif « lock and key » (Stevens et al., 2000; Armstrong, 1997) (Figure 64).

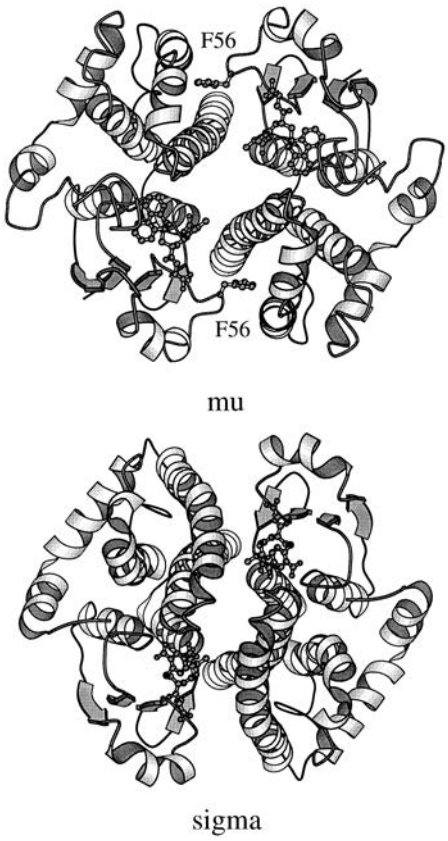


Figure 64 : Vue de l'organisation dimérique des classes Mu et Sigma selon l'axe de symétrie reliant les deux sous-unités. La classe Mu est représentative de l'interaction hydrophobe, tandis que la classe Sigma est représentative de l'interaction hydrophile (Armstrong, 1997).

5.D) Fonctions des GST chez les champignons décomposeurs du bois

Les GST sont des enzymes impliquées dans les mécanismes de défense de la cellule, grâce notamment à leur action coordonnée avec le GSH. Comme leur nom l'indique, leur fonction première est de conjuguer ce dernier sur des molécules toxiques pour favoriser leur élimination. Cependant, le nombre croissant d'études concernant la caractérisation de ces enzymes chez de nombreux organismes a révélé qu'elles pouvaient posséder d'autres propriétés. Au cours de l'évolution, les changements séquentiels et structuraux des GST ont permis une diversification en terme de spécificité de substrat et de fonction. Ainsi les GST sont reconnues comme des enzymes catalysant des conjugaisons, des réductions et des isomérisations, mais également agissant de manière non enzymatique comme ligandines ou modulateurs de la transduction des signaux (Oakley, 2011; Sheehan et al., 2001).

Le nombre de GST fongiques est très variable en fonction des espèces et semble relié à leur « style de vie » : saprophyte, pathogène, symbiotique. Les champignons décomposeurs du bois figurent parmi les organismes fongiques présentant une extension de gènes codant pour les GST (GTO, GTT, Ure2p et Etherase-like) suggérant une connexion entre cette famille et leur écologie (Tableau 8) (Morel et al., 2009).

Tableau 8 : Analyse comparative des gènes codant pour des GST chez les champignons séquencés (Morel et al., 2009). *Asc* : Ascomycète, *Bas* : Basidiomycète, *Zyg* : zygomycète.

		Genome size (Mb)	Gene models	GTT1	GTT2	URE2p	Omega	EFBγ	MAK16	GTE	Others	Total
Schizosaccharomyces pombe	Asc (yeast)	12.50	5,027	1	0	2	1	2	1	0	0	7
Cryptococcus neoformans	Bas (pathogen)	18.87	6,967	0	1	1	3	1	1	0	2	9
Sporobolomyces roseus	Bas	21.20	5,536	0	1	3	3	1	1	1	0	10
Melampsora laricis-populina	Bas (pathogen)	101.10	16,694	0	1	4	1	1	1	0	2	10
Ustilago maydis	Bas (pathogen)	19.68	6,522	2	0	2	3	1	1	1	0	10
Saccharomyces cerevisiae	Asc (yeast)	11.74	5,695	1	1	1	3	4	1	0	0	11
Neurospora crassa	Asc	39.23	9,826	1	0	2	3	3	1	1	1	12
Chaetomium globosum	Asc (saprophyte)	34.89	11,124	1	0	5	3	2	1	1	0	13
Magnaporthe grisea	Asc (pathogen)	41.70	11,074	1	0	2	3	3	1	1	3	14
Rhizopus oryzae	Zyg	45.26	17,459	0	1	0	2	2	2	2	5	14
Mycospherella fijiensis	Asc (pathogen)	73.40	10,327	2	1	4	6	1	0	2	0	16
Candida albicans	Asc (yeast)	14.30	6,177	5	2	2	1	5	1	0	0	16
Phycomyces blakesleeanus	Zyg	55.90	14,792	0	1	0	2	2	1	9	1	16
Mycosphaerella graminicola	Asc (pathogen)	39.70	10,952	2	0	6	4	1	1	3	0	17
Aspergillus clavatus	Asc (pathogen)	27.86	9,121	2	1	4	5	3	1	2	0	18
Aspergillus nidulans	Asc (pathogen)	30.07	10,701	1	0	3	5	5	1	3	0	18
Sclerotinia sclerotiorum	Asc (pathogen)	38.33	14,522	3	1	6	5	1	1	1	0	18
Stagonospora nodorum	Asc (pathogen)	37.10	15,983	3	1	6	5	1	1	2	0	19
Aspergillus terreus	Asc (pathogen)	29.33	10,406	1	2	5	4	3	1	4	0	20
Botrytis cinerea	Asc (pathogen)	42.66	16,448	4	1	5	5	2	1	3	1	22
Fusarium graminearum	Asc (pathogen)	36.45	13,332	2	2	4	5	2	1	3	3	22
Laccaria bicolor	Bas (mycorrhizal)	64.90	20,614	1	11	1	3	2	1	3	1	23
Aspergillus fumigatus	Asc (pathogen)	29.38	9,887	4	1	4	5	3	1	2	3	23
Fusarium verticillioides	Asc (pathogen)	41.78	14,179	3	4	3	5	2	1	3	3	24
Phanerochaete chrysosporium	Bas (saprophyte)	35.10	10,048	0	3	9	8	1	1	5	0	27
Fusarium oxysporum	Asc (pathogen)	61.36	17,735	3	6	4	6	1	1	4	2	27
Coprinus cinereus	Bas (saprophyte)	36.29	13,392	4	5	2	4	1	1	14	1	32
Trichoderma reesei	Asc (saprophyte)	34.10	9,129	1	2	5	7	3	1	4	10	33
Postia placenta	Bas (saprophyte)	90.90	17,173	2	5	17	8	2	1	11	0	46

Chez les champignons décomposeurs du bois, les GST ont été très peu étudiées contrairement aux ascomycètes et en particulier les levures et les champignons pathogènes. Diverses études de transcriptomique ont démontré que certains gènes codant pour des GST fongiques sont spécifiquement induits en fonction de l'essence de bois utilisée, indiquant une corrélation entre cette famille d'enzymes et leur substrat naturel (MacDonald et al., 2011; Macdonald et Master, 2012; Vanden Wymelenberg et al., 2010).

De récents travaux ont permis de mieux comprendre les propriétés des classes Ure2p et GTO étendues chez les champignons décomposeurs du bois.

La classe Ure2p est subdivisée en deux sous classes, Ure2pA et Ure2pB. Le nombre d'isoformes d'Ure2pB varie peu d'un organisme à l'autre tandis que le nombre d'isoformes d'Ure2pA varie fortement. L'extension de cette sous classe, absente chez certains organismes, semble liée à la capacité de décomposition du bois car les champignons saprophytes présentent un grand nombre d'isoformes appartenant à la sous classe Ure2pA. Cette sous-classe possède une activité de glutathionylation et son expression est induite en présence de composés toxiques comme les hydrocarbures aromatiques cycliques (HAP). Cette expression s'accompagne d'une séquestration des HAP dans des vésicules lipidiques suggérant un rôle de cette classe dans la glutathionylation et le transport des HAP. La classe Ure2pB présente une activité thiol transférase et possède une localisation mitochondriale et pourrait avoir un rôle de réduction des molécules toxiques dans cet organelle (Thuillier et al., 2011).

La classe des GTO possède une cystéine comme résidu catalytique et se subdivise en 3 sous classes sur la base de leur identité de séquence peptidique. La sous classe I est apparentée aux GST bactériennes et lambda tandis que les sous classes II et III sont apparentées à la GSTO1-1 humaine. Les enzymes appartenant aux sous classes II et III sont présentes au sein du génome des champignons symbiotiques et saprophytes tandis qu'elles sont absentes des champignons pathogènes suggérant une évolution de ces isoformes induite par l'adaptation des champignons à leur habitat. Chez la bactérie *Sphingobium chlorophenolicum*, une isoforme orthologue de la sous classe I est capable de catalyser la déglutathionylation d'adduits dérivés des hydroquinones et est notamment impliquée dans la détoxication des molécules toxiques telles que le pentachlorophénol (Xun et al., 2010). Par conséquent, cette sous classe d'enzymes a été renommée en glutathionyl hydroquinone réductase (GHR). La caractérisation d'une isoforme appartenant à cette sous classe chez *P.chrysosporium* (PcGHR1) a permis la définition d'une nouvelle classe structurale nommée Xi possédant un nouveau mode de dimérisation et un site catalytique enfoui du à la présence de longues boucles (Meux et al., 2011). Chez

P.chrysosporium, les enzymes de la sous classe II possèdent une activité de déglutathionylation ainsi que la capacité à lier différentes classes de terpènes, tandis que celles appartenant à la sous classe III catalysent le transfert du GSH (Meux et al., 2012).

5.E) Evolution des GST cytosoliques

L'analyse des séquences peptidiques, couplée aux données structurales et biochimiques, a permis d'établir un scénario de l'évolution des GST en relation avec le motif thiorédoxine et des familles protéiques résultantes. En effet un grand nombre de protéines possèdent ce motif et certaines partagent des similarités fonctionnelles. Par exemple, les thiorédoxines, les glutarédoxines et les DsbA sont des protéines rédox catalysant la réduction de ponts disulfures, tandis que les glutathion peroxydases et les peroxyrédoxines sont spécialisées dans la réduction des peroxydes (Copley et al., 2004; Martin, 1995). D'autres ont évolué vers des fonctions spécifiques comme les calséquestrines (liaison des ions calcium), les CLIC (formation de canaux ioniques), les DHARs (réduction du déhydroascorbate), et les eEF1Bγ (facteurs d'élongation de la synthèse protéique). Les GST sont uniques du fait que leurs fonctions sont multiples et diversifiées tout en partageant un certain nombre de liens fonctionnels avec les autres membres de la famille TRX.

L'évolution des GST solubles peut être divisée en deux phases : la phase 1 fait appel aux évènements anciens liés à la famille des thiorédoxines, tandis que la phase 2 correspond à l'apparition et la diversification des différentes classes de GST (Figure 65).

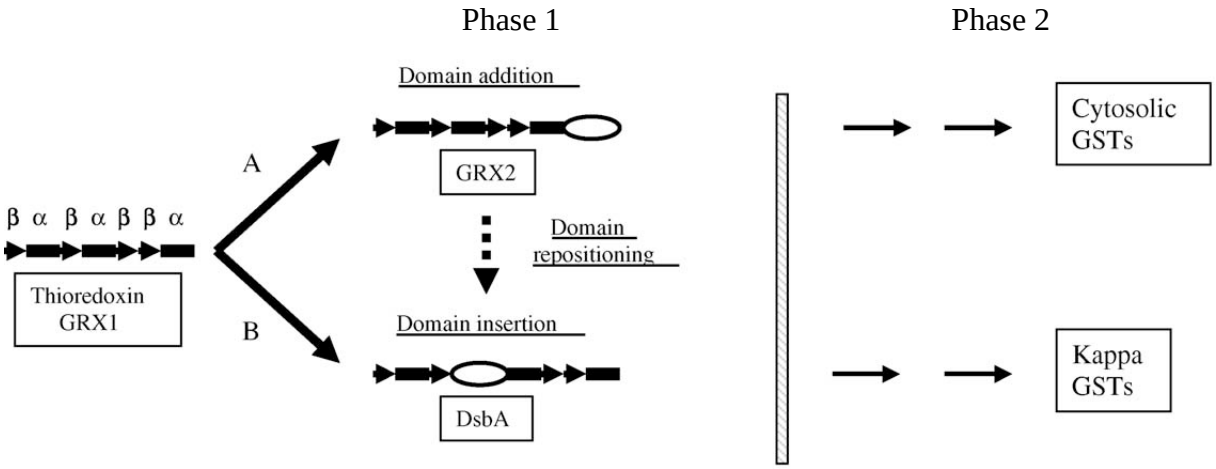


Figure 65 : Modèle d'évolution des GST à partir du motif thiorédoxine (adapté de Frova, 2006).

Ces deux phases sont séparées par une frontière hypothétique. Les enzymes situées à gauche possèdent une activité thiol-transférase avec une cystéine comme résidu catalytique. A contrario, les GST Kappa et cytosoliques, situées à droite de la frontière imaginaire, possédant une sérine ou une tyrosine comme résidu catalytique, ne forment pas de ponts disulfures mixtes avec le glutathion et catalysent alors des réactions de conjugaison. Sur la base de leurs propriétés structurales, il a été proposé que les GST cytosoliques et les GST Kappa ont évoluées respectivement à partir de la glutarédoxine 2 (GRX2) d'*E.coli* et de la DsbA bactérienne par deux voies parallèles indépendantes A et B (Figure 65) (Ladner et al., 2004; Robinson et al., 2004). Une variante de ce schéma évolutif, indiqué par la flèche en pointillés, propose que DsbA dérive de la GRX2 d'*E.coli* via le repositionnement du domaine hélicoïdal de la partie C-terminale vers une position interne au sein du motif TRX (Ladner et al., 2004).

5.E.I) Phase 1

Un large consensus est établi autour du fait que les thiorédoxines et les glutarédoxines sont les ancêtres des GST solubles, i.e. les GST cytosoliques et mitochondriales, ainsi que des autres protéines contenant un motif TRX. Le principal événement de cette phase est le recrutement d'un domaine hélicoïdal (le domaine II), soit en position C-terminale donnant naissance aux GRXs, aux CLIC, aux EF1Bγ et surtout aux GST cytosoliques (Figure 66 (b)) ; soit inséré dans le motif TRX générant les DsbA, les HCCA et les GST Kappa (Figure 66 (c). Les glutathion peroxydases et les peroxyrédoxines possèdent aussi une insertion à la même position que les DsbA, les HCCA et les GST Kappa, mais ce domaine n'est pas entièrement hélicoïdal.

5.E.II) Phase 2

Cette phase correspond à l'évolution des GST cytosoliques à partir de la GRX2 d'*E.coli* (voie A Figure 65). Cette évolution et ses grandes étapes sont illustrées dans la Figure 67.

Les premières classes issues de la GRX2 d'*E.coli* (les CLIC, les DHAR et les GST Lambda) ont conservé la structure monomérique de cette dernière. S'ensuit une étape de dimérisation donnant naissance aux familles Oméga et Bêta actives sous forme dimérique. Jusqu'à ce stade, ces familles/classes ont conservé la cystéine issue de la GRX2 comme résidu catalytique et présentent pas ou peu d'activité de conjugaison. A l'exception des CLIC qui se sont spécialisées dans la formation de canaux ioniques, toutes ces enzymes possèdent une activité thiol-transférase et/ou déhydroascorbate réductase.

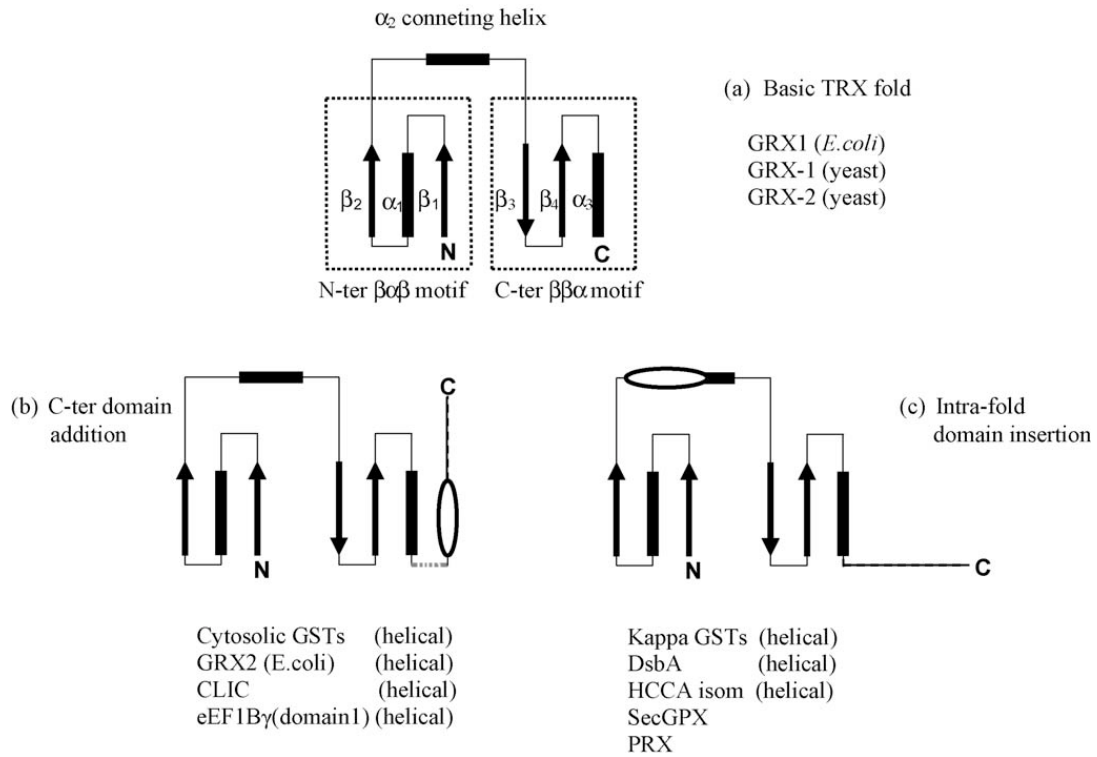


Figure 66 : Représentation schématique de la structure secondaire des protéines contenant un motif thiorédoxine (Frova, 2006). Les brins ß sont représentés par des flèches et les hélices α par des rectangles. Les motifs structuraux N-terminal et C-terminal, connectés par l'hélice α_2 du motif TRX sont encadrés par des pointillés (**a**). En (**b**) et (**c**), l'ovale indique la position du second domaine et la nature de celui-ci est indiquée entre parenthèses sous le diagramme. La ligne pointillée en (**b**) indique le petit linker entre les domaines I et II des GST.

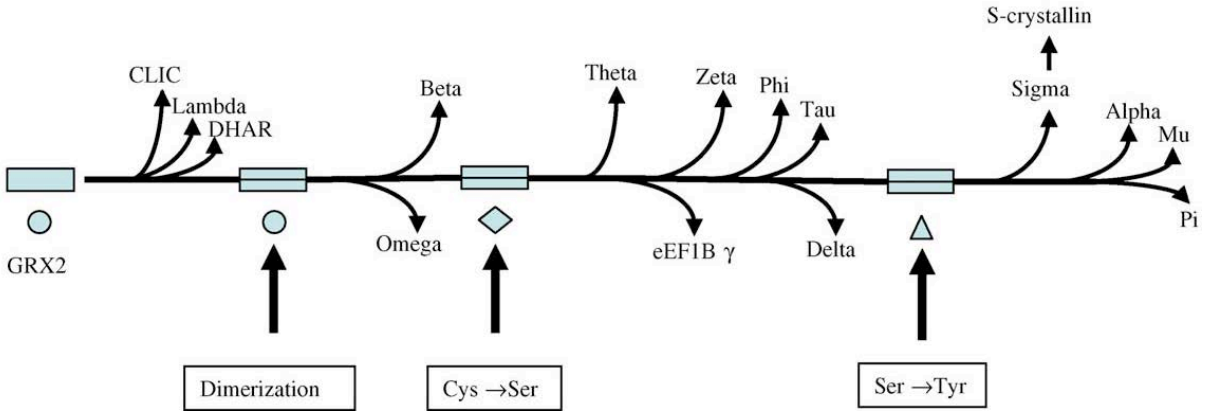


Figure 67 : Représentation schématique des grandes étapes de l'évolution des GST cytosoliques lors de la phase 2 (Frova, 2006). Les flèches indiquent les étapes importantes. Le rond indique la présence d'une cystéine dans le site actif, le losange une sérine et le triangle une tyrosine.

Le deuxième événement majeur est le changement d'une cystéine pour une sérine dans le site catalytique de fixation du GSH donnant naissance aux classes Thêta, Zêta et eEF1Bγ, présentes chez tous les eucaryotes, ainsi qu'aux classes spécifiques des plantes et des insectes Phi, Tau et Delta.

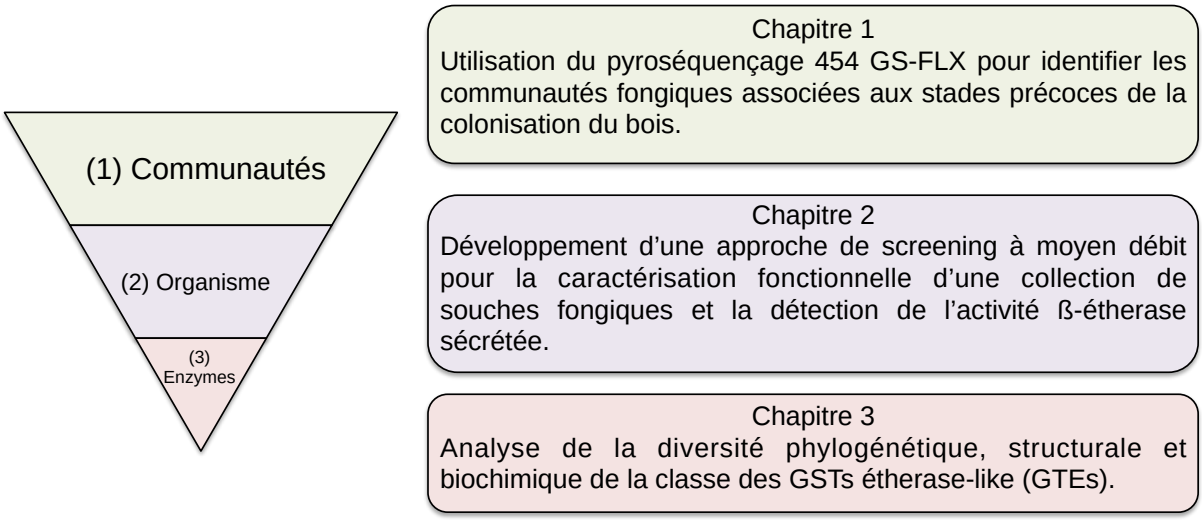
Un second changement de résidu catalytique dans le site G marque une nouvelle étape dans l'évolution des GST. La sérine est remplacée par une tyrosine conduisant à l'apparition des classes Alpha, Mu, Pi et Sigma. Cette séparation est supportée par les analyses phylogénétiques (Board et al., 1997). Chez les céphalopodes il existe deux protéines Sigma avec des fonctions différentes : une possède l'activité de conjugaison classique des GST, et l'autre appellée S-cristalline, est une protéine majeure du cristallin et ne possède pas d'activité enzymatique (Tomarev et al., 1993).

Le fort taux d'évolution des classes de GST spécifiques reflète une réponse adaptative aux contraintes environnementales. Ces classes de GST sont en général impliquées dans la détoxication des xénobiotiques en catalysant les réactions de phase II chez les plantes, les animaux et les champignons. Les avantages adaptatifs de ce système dépendent de leur versatilité, c'est à dire, de leur capacité à détoxifier une large gamme de composés, ainsi que de leur rapidité à neutraliser de nouveaux composés toxiques. Au cours de l'évolution ces besoins ont été satisfaits par deux moyens : une augmentation du nombre de GST grâce à de multiples duplications de gènes et une diversification des ces nouvelles enzymes au regard de leur spécificité vis à vis du second substrat ; ceci tout en conservant la capacité à conjuguer le GSH sur des composés toxiques électrophiles (Frova, 2006). En d'autres termes, les GST évoluent en combinant un site G conservé et un site H hypervariable. Cette variation de spécificité du substrat et/ou de la catalyse peut être atteinte via la substitution d'un nombre limité de résidus au niveau du site H (Frova, 2006; Norrgard et al., 2006; Runarsdottir et Mannervik, 2010).

L'architecture globale des GST est caractérisée par une architecture modulaire dans laquelle les variations de spécificité peuvent survenir sans perturber la fixation du GSH et l'activité catalytique. Cette stratégie combinatoire, permettant d'obtenir une haute plasticité fonctionnelle de manière rapide et « économique », est récurrente dans la nature. En effet, la conservation structurale de domaines fonctionnels, couplée à la multiplicité des chimies employées lors de la catalyse est un thème commun au sein des superfamilles de protéines dans lesquelles les différents membres ont évolués afin d'effectuer un large panel de fonctions (Gerlt et Babbitt, 1998; Nagano et al., 2002).

Objectifs

Les champignons saprophytes jouent un rôle écologique important dans la dégradation du bois mort et sont une composante essentielle des écosystèmes forestiers en influençant le cycle des nutriments et la séquestration du carbone. Le contrôle des dégâts qu'ils occasionnent représente un enjeu majeur pour la filière bois car ils sont la cause première de la dégradation de ce matériau au sein des constructions. Afin de progresser dans la connaissance de ces organismes et des mécanismes physiologiques qu'ils mettent en œuvre lors de la dégradation du bois, j'ai étudié ces derniers avec plusieurs objectifs selon le schéma suivant :



(1) Identifier le ou les facteurs structurant les communautés associées au bois mort.

Cette première partie avait pour objectif d'analyser les communautés fongiques associées au bois et de déterminer plus particulièrement les facteurs biotiques ou abiotiques influant leur structuration, par une approche de séquençage à haut débit (pyroséquençage 454 GS-FLX). Cet examen s'est effectué sur des piquets de bois provenant d'essences différentes et implantés expérimentalement. L'ADN fongique a été extrait puis spécifiquement amplifié. Un pipeline bioinformatique développé au sein du laboratoire a permis le traitement des séquences brutes et l'assignation taxonomique des séquences représentatives des « Unités Taxonomiques Opérationelles Moléculaires » générées, afin d'établir la composition des communautés associées à chaque échantillon.

(2) Déterminer les capacités lignocellulolytiques d'une collection fongique et rechercher une activité extracellulaire spécifiquement impliquée dans la dégradation de la lignine.

Dans une seconde partie de mes travaux, grâce à un substrat fluorescent synthétisé au sein du Laboratoire d'Etude et de Recherche sur le MAtériau Bois (LERMAB), j'ai développé un test enzymatique spécifique de l'hydrolyse de la liaison ß-aryl éther (Otsuka et al., 2003). Celle-ci représente 50 à 60 % des liaisons intermoléculaires existant au sein de la lignine et par conséquent son hydrolyse représente une étape cruciale durant la dégradation du bois par les champignons lignivores. En incluant cette activité spécifique, j'ai mis au point une approche de screening à moyen débit grâce à l'utilisation de tests enzymatiques en microplaque. Ces tests relatifs à la dégradation des différents polymères constitutifs du bois ont permis la caractérisation fonctionnelle d'une collection de souches fongiques représentant les principaux types de pourriture : blanche, brune et molle.

(3) Caractériser une famille de GST fongiques possédant des similitudes de séquence avec une famille de GST bactériennes impliquées dans la dégradation de la liaison ß-aryl éther.

Suite à une analyse phylogénétique des GST fongiques mettant en évidence la présence de plusieurs classes spécifiques chez les champignons saprophytes (Morel et al., 2009), j'ai étudié spécifiquement la classe des GST étherase-like (GTE) présentant une homologie de séquence avec une GST bactérienne (LigE) possédant une activité ß-étherase. Dans un premier temps, l'étude détaillée d'une isoforme issue de *P. chrysosporium* a permis de définir les propriétés fonctionnelles et structurales de cette nouvelle classe d'enzymes grâce (i) à la résolution de sa structure tridimensionnelle, en collaboration avec le laboratoire CRM2 (ii) au développement de sondes fluorescentes spécifiques des sites G et H et (iii) à différents tests enzymatiques caractéristiques des GST et de l'activité ß-étherase réalisés sur la forme native ou mutante du résidu supposé catalytique. Dans un deuxième temps, la variabilité de la distribution de cette classe d'enzymes au sein des champignons saprophytes a été évaluée grâce aux génomes fongiques nouvellement publiés. Puis, la variabilité des propriétés fonctionnelles et structurales d'enzymes recombinantes issues de *P. chrysosporium* et *C. cinereus* a été établie grâce à la résolution des structures tridimensionnelles de plusieurs isoformes de *P. chrysosporium* et aux approches biochimiques développées précédemment.

Les résultats de ces travaux sont regroupés sous forme de trois chapitres, donnant lieu à trois articles (soumis, publiés, en préparation) formant la partie résultats de ce manuscrit.

Résultats

Chapitre 1 : Analyse de la diversité des champignons présents durant les stades précoces de la décomposition du bois

1) Introduction

Les champignons saprophytes sont les agents principaux de la décomposition du bois dans les forêts, dégradant la lignocellulose et les hémicelluloses. Par conséquent, ils jouent un rôle central dans le cycle des nutriments et la dynamique du carbone au sein des écosystèmes forestiers (Harmon et al., 2004). Les constructions en bois fournissent également des niches écologiques et des microclimats favorables à l'implantation, la croissance et la prolifération d'une grande variété d'espèces fongiques (Kumar et Verma, 2010).

La succession des champignons peut être définie comme « un changement directionnel dans la composition, l'abondance relative et le profil spatial des espèces qui composent la communauté » (Frankland, 1992). Pour les espèces saprophytes, la composition du substrat organique, litière foliaire ou bois mort, et les transformations successives de sa composition chimique au cours la décomposition induisent des changements dans la succession des espèces fongiques. En effet, certaines espèces utilisent des substrats spécifiques, dans un temps limité, selon leurs exigences biochimiques (Boddy, 1992; Frankland, 1998). Les facteurs influençant la richesse et l'assemblage des espèces au sein d'un morceau de bois en décomposition, varient en fonction de la disponibilité et du volume des ressources (Hottola et al., 2009), de l'état primaire ou tardif de la dégradation, (Jönsson et al., 2008), et de l'échelle de l'étude (Berglund et al., 2005; Rolstad et al., 2004). Au sein de ces communautés microbiennes, certaines espèces exhibent une préférence de taille vis-à-vis du bois à décomposer (Kubartová et al., 2012; Nordén et al., 2004), la diversité des espèces augmentant avec la taille de l'échantillon (Edman et al., 2004). Les communautés et leur fonctionnement sont également influencés par les conditions environnementales et les interactions biotiques inter- et intra-spécifiques (Boddy, 2000; Johannesson et Stenlid, 2004). La richesse en espèces d'un morceau de bois peut augmenter la vitesse de sa dégradation (Tiunov et Scheu, 2005; Toljander et al., 2006) en raison des exigences nutritives différentes et des patterns d'activité existants parmi les espèces, en relation avec les conditions environnementales (Gessner et al., 2010). Cependant, un des facteurs majeurs influençant la diversité, la richesse, et la dynamique des communautés est la composition chimique du bois. Cette diversité commence à l'échelle de l'arbre qui suivant son espèce va influencer les communautés saprophytiques comme cela a pu être rapporté par les observations

et inventaires de fructifications (Küffer et Senn-Irlet, 2005; Yamashita et al., 2010 ; Buée et al. 2011) ou l'isolement de mycélium (Lumley et al., 2001). Plusieurs auteurs ont également montré que le stade de décomposition est un facteur déterminant dans la composition des communautés fongiques et leur richesse (Heilmann-Clausen et Christensen, 2003; Lumley et al., 2001). Ces travaux suggèrent donc que les communautés fongiques répondent à la composition chimique du substrat, et donc à l'essence sylvicole ainsi que son stade de décomposition (Kebli et al., 2011; Moorhead et Sinsabaugh, 2000).

Jusqu'à récemment, notre compréhension des communautés fongiques vivant sur bois mort, et des processus expliquant leur présence, était essentiellement basée sur les observations des fructifications ou l'isolement de mycélium, et par conséquent restait donc fragmentaire et incomplète. Depuis près de 20 ans, la découverte de barre-code fongique spécifique (Gardes et Bruns, 1993 ; Schoch et al 2012) combiné à l'utilisation de techniques moléculaires telles que le clonage d'ADN, le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (T-RFLP) et l'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE), a révélée que le nombre d'espèces fongiques associées au bois mort est particulièrement important (Allmer et al., 2009; Johannesson et Stenlid, 1999; Kebli et al., 2011; Lindner et al., 2011; Rajala et al., 2010). Dernièrement, le séquençage à haut débit a permis des progrès considérables en écologie moléculaire, induisant une vue quasi exhaustive de la diversité microbienne (Buee et al., 2009; Fuhrman, 2009). Cette technique offre un moyen d'échantillonnage plus large des communautés et permet la détection des taxons possédant de faibles niveaux d'abondance. De plus, elle a été appliquée avec succès à la caractérisation de la dynamique des communautés fongiques associées au bois mort en relation avec son état de décomposition (Kubartová et al., 2012). Mais, malgré la multiplicité des études et la diversité des approches mises en œuvres, peu de recherches ont été réalisées sur les facteurs gouvernant la colonisation du bois matériau en milieu naturel, durant les stades très précoces.

Le but de cette étude était donc d'évaluer la diversité et la structure des communautés fongiques au cours des stades précoces de la colonisation du bois et de rechercher de potentiels indicateurs biologiques des premiers stades de la décomposition selon les essences considérées (chêne, hêtre et pin), par l'exploitation de données issues du séquençage à haut débit de la région ITS (Internal Transcribed Spacer) fongique. Les différentes étapes de ce travail furent (1) de caractériser la source d'inoculum fongique de piquets de bois implantés en milieu naturel, (2) d'identifier le ou les facteurs environnementaux responsables de la sélection des espèces et de la structure de la communautés durant les stades très précoces de la colonisation du bois, et (3)

d'identifier des espèces potentiellement indicatrices des premiers événements de colonisation d'une essence d'arbre, pouvant être suivies *in situ* par des approches moléculaires ou exploitées dans le cadre d'analyses normalisées en conditions contrôlées.

2) Matériel et méthodes

2.A) Site d'étude et stratégie d'échantillonnage

Le site d'étude est localisé sur l'ile d'Oléron au sein duquel la zone d'expérimentation a été divisée en trois blocs (A, B et C). Des piquets de bois (1 m de long) de différentes essences (pin, chêne, hêtre) ont été plantés (50 % enterrés) systématiquement dans ces trois blocs. Un total de 54 piquets a été réparti de façon aléatoire au sein des trois blocs, à raison de 19 piquets de pins, 17 piquets de chêne et 18 piquets de hêtre. Ces piquets ont ensuite été prélevés six et neuf mois après leur mise en place. Aux mêmes périodes, des échantillons de sol ont également été prélevés dans les zones adjacentes aux piquets, ainsi qu'au moment de la mise en place du dispositif (T0) afin d'identifier le pool d'espèces microbiennes présent avant introduction des piquets. Après prélèvement, chaque piquet, a préalablement été débarrassé du sol superficiel avant d'être échantillonné au moyen d'une perceuse en trois point différents : au « collet » (interface sol / air), au milieu et en bas de la partie enterrée (Figure 1). Entre chaque prélèvement, le foret a été soigneusement nettoyé à l'éthanol pour limiter les échanges microbiologiques entre échantillons. La sciure résultante a ensuite été regroupée par essence pour un bloc afin d'obtenir un échantillon composite de 100 mg par essence et par zone. Les échantillons de sol ont été tamisés (0,5 µm de diamètre) pour enlever les débris de matière organique et cailloux. Les échantillons de sol et de sciure de bois ont été congelés à -20 °C avant extraction d'ADN.

2.B) Extraction d'ADN et amplification par PCR en vue du pyroséquençage 454 GS-FLX

Les extractions d'ADN ont été accomplies à l'aide du kit FastDNA® SPIN for soil (MP Biomedicals, LLC, Illkirch, France) à partir des échantillons composites de sciure de bois, suivant les indications du fournisseur avec quelques modifications. Ainsi, des lavages additionnels avec la guanidine isothiocyanate ont été réalisés avant l'étape d'extraction d'ADN dans le but d'enlever les polyphénols résultant de la lyse des échantillons (Luis et al., 2004). Une librairie d'amplicons taggés a été construite grâce aux primers spécifiques ITS1F (5'-xxxxCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') et ITS2 (5'- GCTGCGTTCTTCATCGATGC -3'), ciblant la

région ITS de l'ADN génomique contenant la séquence codante pour l'ARNr 5.8S, couplés aux adaptateurs A et B de la compagnie Roche®. Les quatre nucléotides notés xxxx correspondent au tag moléculaire (MID) permettant l'identification des échantillons lors du pyroséquençage et du traitement bio-informatique (Figure 1 : TAG amorçe forward) (Acosta-Martinez et al., 2008). Les PCR ont été effectuées selon les conditions suivantes : 2 µL d'échantillon d'ADN environnemental, 1 µM de primers, 200 µM de chaque dNTP, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,8 µL de BSA (16 mg/ml) et 0,05 U/µL de Taq polymérase (Sigma) dans un volume total de 20 µL complété à l'eau MilliQ ™. Les conditions PCR utilisées sur un thermocycleur BioRad® ont été les suivantes : 94 °C pendant 3 minutes suivies de 35 cycles [94 ° pendant 30 secondes, 52 °C pendant 45 secondes, 72 °C pendant 1 minute], et une élongation finale de 10 minutes à 72 °C. L'amplification de la région cible a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose et la concentration des amplicons générés a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre nanodrop (Labtech®, France). Finalement un mélange équimolaire de tous les échantillons (bois et sol) a été envoyé à la société Genoscreen (Lille, France) pour la réalisation du pyroséquençage 454 GS-FLX.

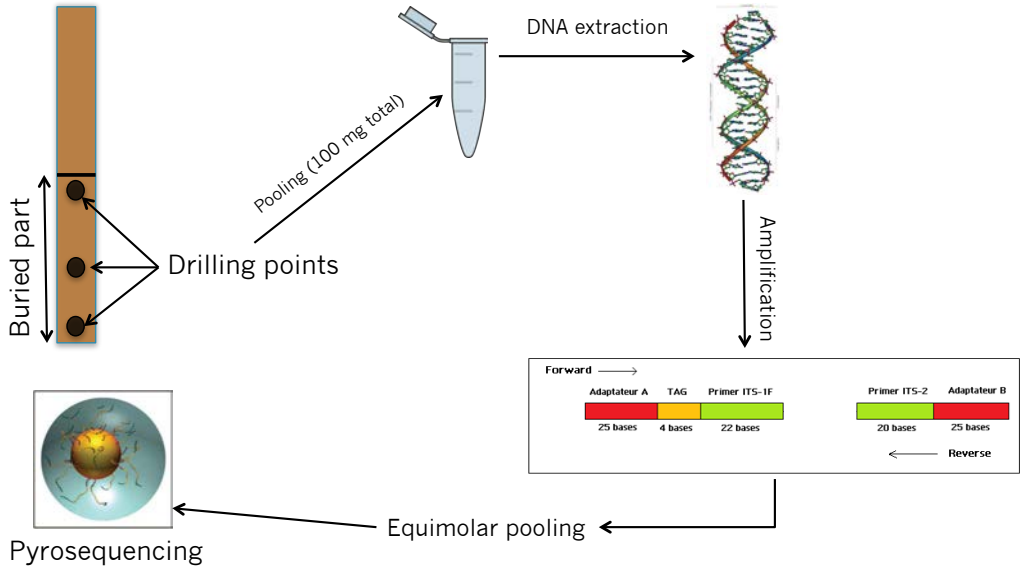


Figure 1 : Démarche globale représentant le protocole d'échantillonnage d'un piquet de bois suivi de l'extraction de l'ADN total et de l'amplification spécifique de la région de l'ADN génomique contenant la séquence codante pour l'ARNr 5.8S en vue du pyroséquençage 454 GS-FLX.

2.C) Traitement bio-informatique des données

Le pipeline bio-informatique utilisé pour le traitement des données est présenté en Figure 2. Les séquences ont d'abord été regroupées selon leur MID, en n'autorisant aucun

mésappariement, grâce au programme sff file, puis celui-ci a été retiré pour les analyses ultérieures. Les séquences ont ensuite été nettoyées (« trimmées » et « dénoisées ») avec le programme trim.flows de la version 1.20.1 de Mothur en utilisant les paramètres par défaut (Schloss et al., 2009). Les séquences correspondant à la région ITS ont ensuite été extraites grâce au programme Fungal ITS extractor version 2 (Nilsson et al., 2009). Les séquences résultantes ont été filtrées afin d'obtenir un longueur minimale de 100 pb. Les Unités Taxonomiques Opérationelles Moléculaires (MOTU) ont été obtenues après 6 regroupements successifs sous Uclust version 3.0 (Usearch version 5.2.32) avec le paramètre iddef = 2 et un minimum de 97% d'identité (Edgar, 2010). Le premier regroupement a été généré à partir de la totalité des séquences et les suivants ont été réalisés avec le lot de séquences consensus issues du premier regroupement, permettant ainsi une diminution de la redondance des MOTU. L'assignation taxonomique des séquences consensus générées par Uclust a été réalisée contre une base de données nettoyée issue de GenBank, excluant les séquences environnementales, en utilisant l'algorithme BLASTn (Basic Local Alignement Search Tool) version 2.2.23 (Altschul et al., 1990) avec un seuil d'e-value de 1e-05. Les MOTU assignées aux mêmes espèces ont ensuite été regroupées par « gi number » similaire, réduisant ainsi leur nombre total. Les MOTU non assignées ont été considérées comme fongiques en raison de la spécificité des primers utilisés envers la détection des dikarya. La matrice de distribution des MOTU a été utilisée, en retirant les singletons (n-1), afin de générer les courbes de raréfactions grâce au logiciel Analytic Rarefaction version 2.0 (http://www.huntmountainsoftware.com). La répartition taxonomique des différentes espèces a été générée grâce au programme MEGAN version 4 (Huson et al., 2011). Après normalisation des données et extraction des singletons, l'analyse de correspondance a été obtenue à partir de la matrice de distribution des MOTU, où le nombre de lectures a été remplacé par un code binaire : 1 pour présence et 0 pour absence.

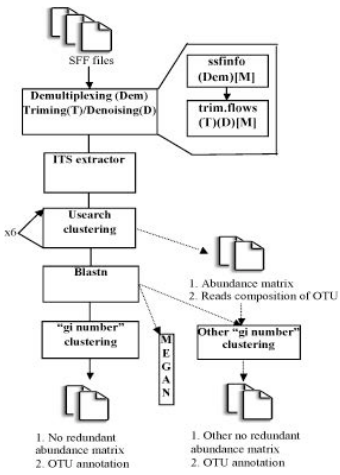


Figure 2 : Pipeline bio-informatique spécifique des régions ITS fongiques.

3) Résultats et discussion

3.A) Distribution des séquences

Sur la totalité des 54 piquets implantés, la majorité présentait un état de dégradation de stade 0 ou 1 selon l'échelle de cotation NF EN 252 (échelle allant de 0 à 4). Mais, une grande partie des piquets de pin était déjà sujette à une attaque de termites, en particulier après neuf mois d'exposition.

A partir des 54 piquets utilisés, un total de 84 686 lectures a été généré par pyroséquençage 454 GS-FLX, avec une longueur moyenne de 300 pb. Après contrôle qualité et détection des chimères, 48 094 lectures ont été retenues (56,79 %), dont 2154 généraient des singletons. Ceux-ci pouvant être considérées comme des artefacts ou « bruits » de pyroséquençage (Tedersoo et al., 2010), ils ont été retirés des analyses suivantes. Sur les 45 940 lectures restantes, 11 774 proviennent des échantillons de sol et 34 166 des échantillons de bois (zones, temps et essences confondus). Le nombre de lectures par échantillon varie entre 548 et 2727 (échantillons de sol et bois confondus). L'analyse de la distribution des séquences selon leur assignation taxonomique, réalisée grâce au logiciel MEGAN, est présentée dans le Tableau 1.

Globalement, la majorité des séquences amplifiées (86.8 % des lectures totales) correspondent à des champignons (46.7% d'ascomycètes, 35.6% de basidiomycètes et 4.6% de zygomycètes), et seulement 1.4 % des lectures proviennent d'autres organismes appartenant à la division des Magnoliophyta (Angiospermes). Les séquences non assignées, quant à elles, représentent 11.8% des lectures totales. Ces résultats confirment donc une bonne spécificité des amorces utilisées vis à vis de l'ARNr 5.8S fongique.

Afin d'identifier une source potentielle d'inoculum des échantillons de bois dans la matrice tellurique, les 50 MOTU les plus abondantes dans les échantillons de sol au temps 0 ont été comparées aux 50 MOTU les plus abondantes dans les échantillons de bois, tout temps et essences confondues (Figure 3). Sur 100 MOTU présentes dans la totalité des échantillons, 30 n'ont pu être assignées taxonomiquement. Seules 7 MOTU sont partagées par les deux matrices (bois et sol), tandis que 26 sont spécifiques du sol, et 37 espèces potentielles sont strictement inféodées au bois. On peut également constater, en moyenne, que le nombre de MOTU est plus important dans les échantillons de pin que dans les autres essences étudiées (Table 1 et Figure 4). Globalement, cette analyse atteste que, malgré le contact prolongé avec le sol (9 mois), la plupart des espèces colonisatrices des stades précoces du bois ne sont pas celles situées dans l'environnement proche et peuvent provenir, par exemple, de sources aériennes. Cela confirme

également que l'ADN génomique extrait à partir du bois n'a pas, ou très peu, été pollué par l'ADN environnemental du sol. Ainsi, les lectures provenant des échantillons de sol ont été écartées pour la suite des analyses.

Tableau 1 : Distribution des séquences obtenues par pyroséquençage 454 GS-FLX.

	Echantillon	Nombre de lectures	Non assignées	Autres	Champignons	Ascomycètes	Basidiomycètes	Zygomycètes	Nombre de MOTU
Sol	S-T0-ZA	548	83 (15.1 %)	0 (0 %)	465 (84.9 %)	76 (13.9 %)	198 (36.1 %)	191 (34.9 %)	50
	S-T0-ZB	1224	235 (19.2 %)	0 (0 %)	989 (80.8 %)	245 (20 %)	688 (56.2 %)	56 (4.6 %)	98
	S-T0-ZC	2727	1398 (51.3 %)	38 (1.4 %)	1291 (47.3 %)	322 (11.8 %)	847 (31.1 %)	122 (4.5 %)	174
	S-T6-ZA	964	70 (7.3 %)	6 (0.6 %)	888 (92.1 %)	181 (18.8 %)	621 (64.4 %)	86 (8.9 %)	72
	S-T6-ZB	1440	141 (9.8 %)	0 (0 %)	1299 (90.2 %)	475 (33 %)	756 (52.5 %)	68 (4.7 %)	106
	S-T6-ZC	1606	174 (10.9 %)	19 (1.2 %)	1413 (88 %)	206 (12.8 %)	1085 (67.6 %)	122 (7.6 %)	84
	S-T9-ZA	1354	445 (32.9 %)	20 (1.5 %)	889 (65.7 %)	113 (8.3 %)	261 (19.3 %)	515 (38 %)	101
	S-T9-ZB	849	110 (13 %)	0 (0 %)	739 (87 %)	163 (19.2 %)	240 (28.3 %)	336 (39.6 %)	85
	S-T9-ZC	1062	63 (5.9 %)	7 (0.7 %)	992 (93.4 %)	420 (39.5 %)	523 (49.2 %)	49 (4.6 %)	65
Chêne	C-T6-ZA	1906	26 (1.4 %)	39 (2 %)	1841 (96.6 %)	1428 (74.9 %)	410 (21.5 %)	3 (0.2 %)	57
	C-T6-ZB	2038	57 (2.8 %)	3 (0.1 %)	1978 (97.1 %)	625 (30.7 %)	1353 (66.4 %)	0 (0 %)	58
	C-T6-ZC	1526	16 (1 %)	80 (5.2 %)	1430 (93.7 %)	1267 (83 %)	163 (10.7 %)	0 (0 %)	52
	C-T9-ZA	1901	45 (2.4 %)	0 (0 %)	1856 (97.6 %)	942 (49.6 %)	914 (48.1 %)	0 (0 %)	64
	C-T9-ZB	1854	51 (2.8 %)	11 (0.6 %)	1792 (96.7 %)	506 (27.3 %)	1286 (69.4 %)	0 (0 %)	56
	C-T9-ZC	1498	12 (0.8 %)	239 (16 %)	1247 (83.2 %)	683 (45.6 %)	561 (37.4 %)	3 (0.2 %)	65
Hêtre	H-T6-ZA	2586	254 (9.8 %)	0 (0 %)	2332 (90.2 %)	1437 (55.6 %)	895 (34.6 %)	0 (0 %)	61
	H-T6-ZB	2378	288 (12.1 %)	0 (0 %)	2090 (97.9 %)	715 (30.1 %)	1368 (57.5 %)	7 (0.3 %)	70
	H-T6-ZC	1815	21 (1.2 %)	108 (6 %)	1686 (92.9 %)	1202 (66.2 %)	457 (25.2 %)	27 (1.5 %)	49
	H-T9-ZA	2554	92 (3.6 %)	5 (0.2 %)	2457 (96.2 %)	2194 (85.9 %)	261 (10.2 %)	2 (0.1 %)	58
	H-T9-ZB	1360	41 (3 %)	0 (0 %)	1319 (97 %)	492 (36.2 %)	827 (60.8 %)	0 (0 %)	44
	H-T9-ZC	2584	162 (6.3 %)	27 (1 %)	2395 (92.7 %)	1655 (64 %)	740 (28.6 %)	0 (0 %)	81
Pin	P-T6-ZA	1623	204 (12.6 %)	9 (0.6 %)	1410 (86.9 %)	940 (57.9 %)	466 (28.7 %)	4 (0.2 %)	117
	P-T6-ZB	1653	142 (8.6 %)	0 (0 %)	1511 (91.4 %)	929 (56.2 %)	267 (16.2 %)	315 (19.1 %)	95
	P-T6-ZC	1936	314 (16.2 %)	14 (0.7 %)	1608 (83.1 %)	1010 (52.2 %)	449 (23.2 %)	149 (7.7 %)	122
	P-T9-ZA	1688	233 (13.8 %)	17 (1 %)	1438 (85.2 %)	1025 (60.7 %)	401 (23.8 %)	12 (0.7 %)	122
	P-T9-ZB	1503	183 (12.2 %)	0 (0 %)	1320 (87.8 %)	1173 (78 %)	116 (7.7 %)	31 (2.1 %)	94
	P-T9-ZC	1763	546 (31 %)	0 (%)	1217 (69 %)	1031 (58.5 %)	184 (10.4 %)	2 (0.1 %)	76
	Total	45940	5406 (11.8 %)	642 (1.4 %)	39892 (86.8 %)	21455 (46.7 %)	16337 (35.6%)	2100 (4.6 %)	770

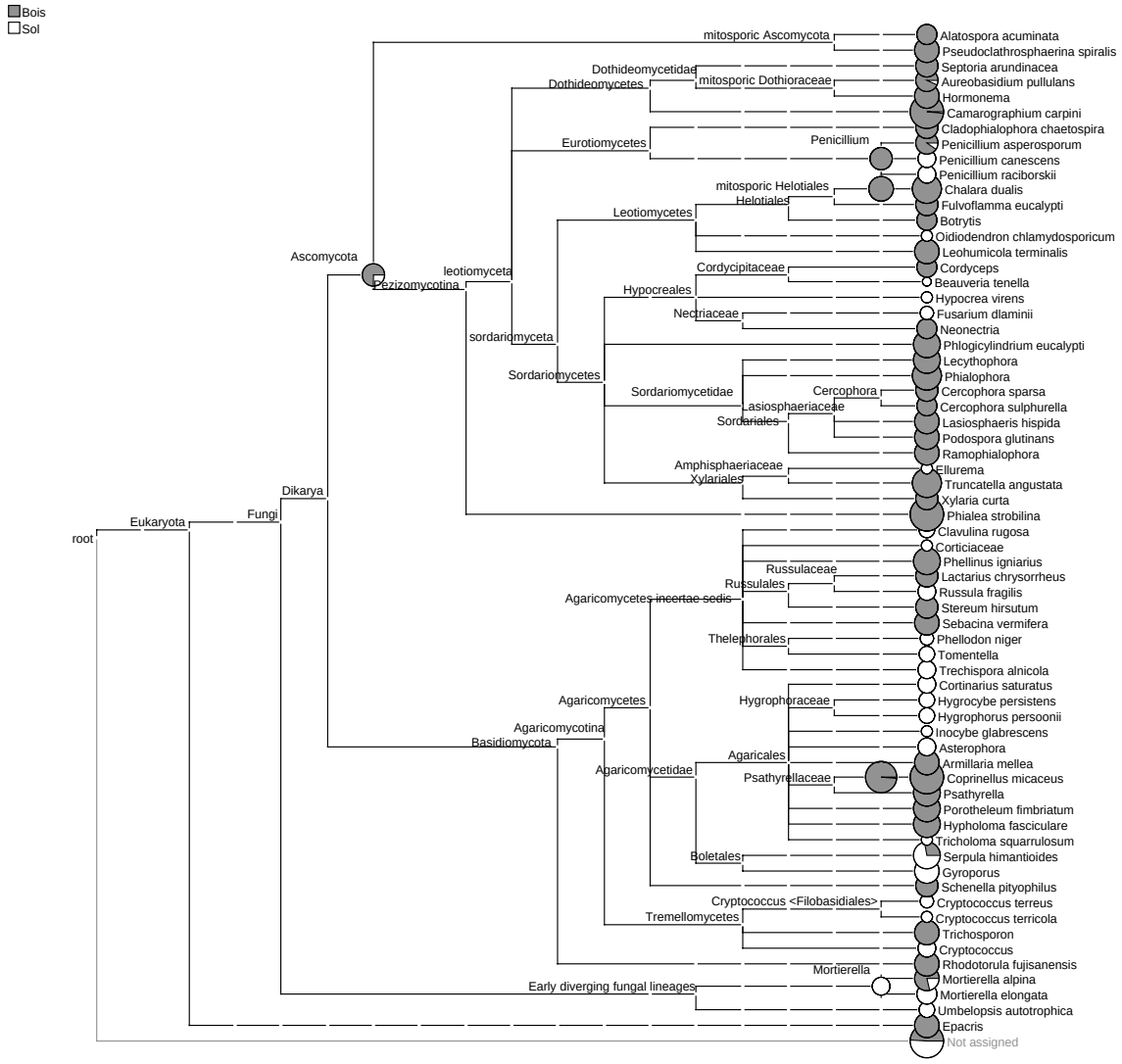


Figure 3 : Comparaison des 50 espèces les plus abondantes dans les échantillons de sol au temps 0 contre les 50 espèces les plus abondantes dans les échantillons de bois. Les lectures correspondant aux échantillons de sol sont en blanc et les lectures correspondant aux échantillons de bois en gris. Trente MOTU n'ont pu être assignées à un taxon (Not assigned).

3.B) Analyse de la richesse et diversité fongique

Afin d'estimer le niveau de saturation de l'inventaire moléculaire et d'estimer une richesse spécifique pour les différents traitements, des courbes de raréfaction ont été générées grâce au logiciel Analytic Rarefaction (Figure 4). On peut constater que le nombre d'espèces (MOTU) estimé par une approche de séquençage à haut débit nous permet d'obtenir une couverture importante de la diversité fongique, puisque nous atteignons un plateau pour tous les échantillons. Deuxièmement, ces courbes montrent clairement que cette diversité est significativement plus importante sur les échantillons de pin (softwood) que sur les échantillons de feuillus (hardwood). Ces résultats attestent donc que malgré une résistance accrue des conifères face aux attaques fongiques, imputable à leur composition en lignine (Hatakka et Hammel, 2010), ceux-ci semblent héberger une plus forte diversité fongique lors des stades précoces de la colonisation du bois.

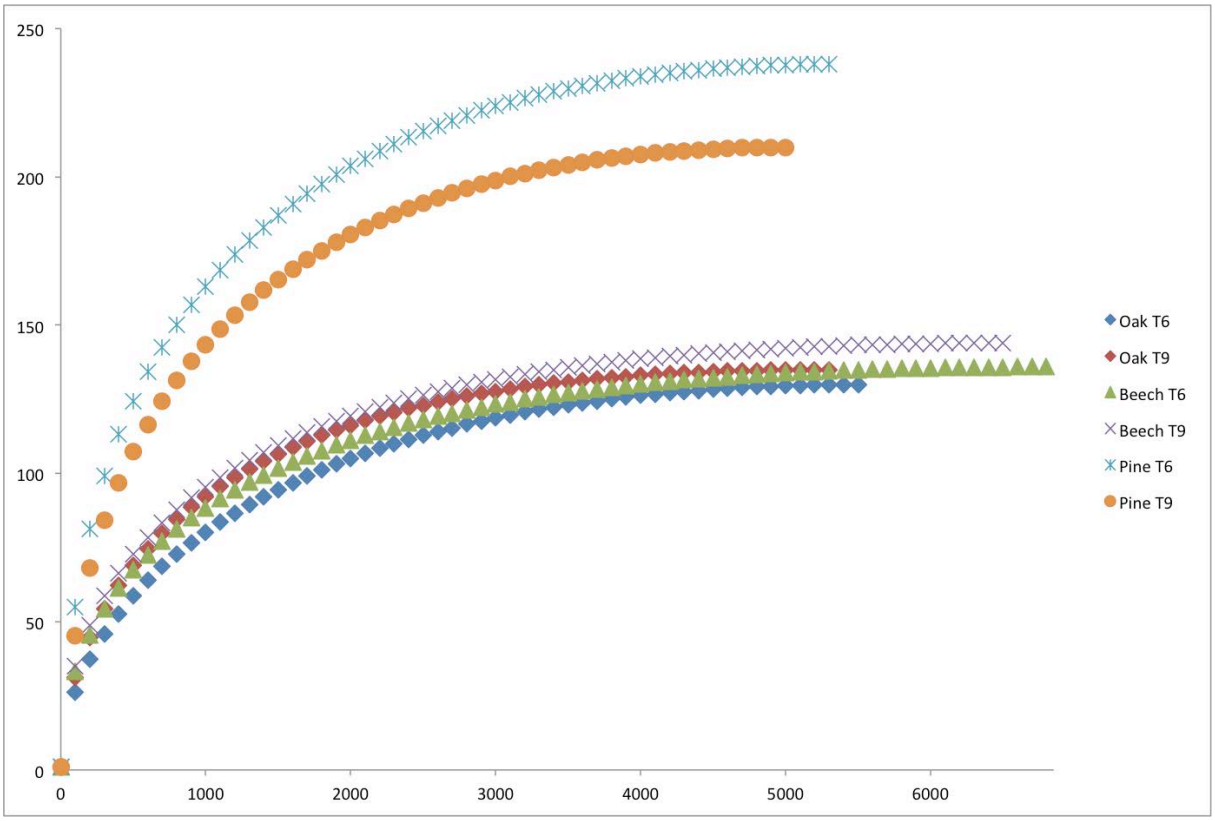


Figure 4 : Courbes de raréfaction représentant l'effet de l'hôte et du temps sur le nombre de MOTU.

La structure des communautés fongiques associées au bois mort est illustrée par l'analyse de correspondance (COA) présentée Figure 5. Les données de cette COA sont parfaitement séparées sur les deux premières dimensions du graphe. En effet, l'axe 1 isole remarquablement les communautés fongiques associées aux piquets de pin (conifère) des communautés colonisant les piquets de *Fagaceae* (hêtre et chêne), tandis que l'axe 2 sépare les communautés fongiques associées aux piquets de hêtre et de chêne. Au sein de ces différents clusters, on peut constater que l'effet temps semble aussi avoir un rôle, bien que moins prédominant, sur la répartition des communautés et ceci même pour les échantillons de feuillus. La projection des dimensions 3 et 4 de cette analyse de correspondance révèle que l'effet zone reste significativement structurant, puisque l'axe 3 ségrége bien les échantillons issus de la zone A des deux autres zones et que l'axe 4 sépare les communautés fongiques des zones C et B. Cette analyse démontre que la présence de certaines espèces, plutôt que leur abondance, permet d'identifier un effet de l'hôte sur la structuration des communautés aux stades précoces de colonisation. Cet effet de l'hôte sur la structure et la dynamique des communautés fongiques a également été mis en évidence sur un site expérimental composé de quatre essences différentes (hêtre, épicéa, chêne, douglas). Les auteurs ont en effet observé que les profils de colonisation et de succession des espèces fongiques sur des morceaux de bois de hêtre enterrés étaient significativement différents selon l'essence sous laquelle ceux-ci étaient enfouis. Lors de cette étude, le temps a également été identifiée comme facteur influençant ces profils mais la durée d'investigation, 2 ans, était beaucoup plus importante que pour nos échantillons (Kulhankova et al., 2006). Cependant, il aurait été intéressant de réaliser la même analyse avec des morceaux de bois issus d'essences différentes que celles déjà présentes sur le site afin d'observer l'influence du substrat sur ces profils. De plus, l'effet hôte identifié peut être imputable à la composition chimique du sol (rapport C/N, pH, concentrations en phosphate, et potassium), ainsi qu'aux conditions microclimatiques (température et humidité de l'air et du sol), résultantes de l'espèce plantée bien que ces facteurs soient moins discriminants que l'essence forestière et le temps. Dans notre cas, le poids relativement important des axes 3 et 4, qui expliquent respectivement 7,7 et 7,1% de la distribution des espèces, suggère que la diversité gamma est notable quand, localement, l'analyse est portée sur les communautés strictement inféodées au bois mort.

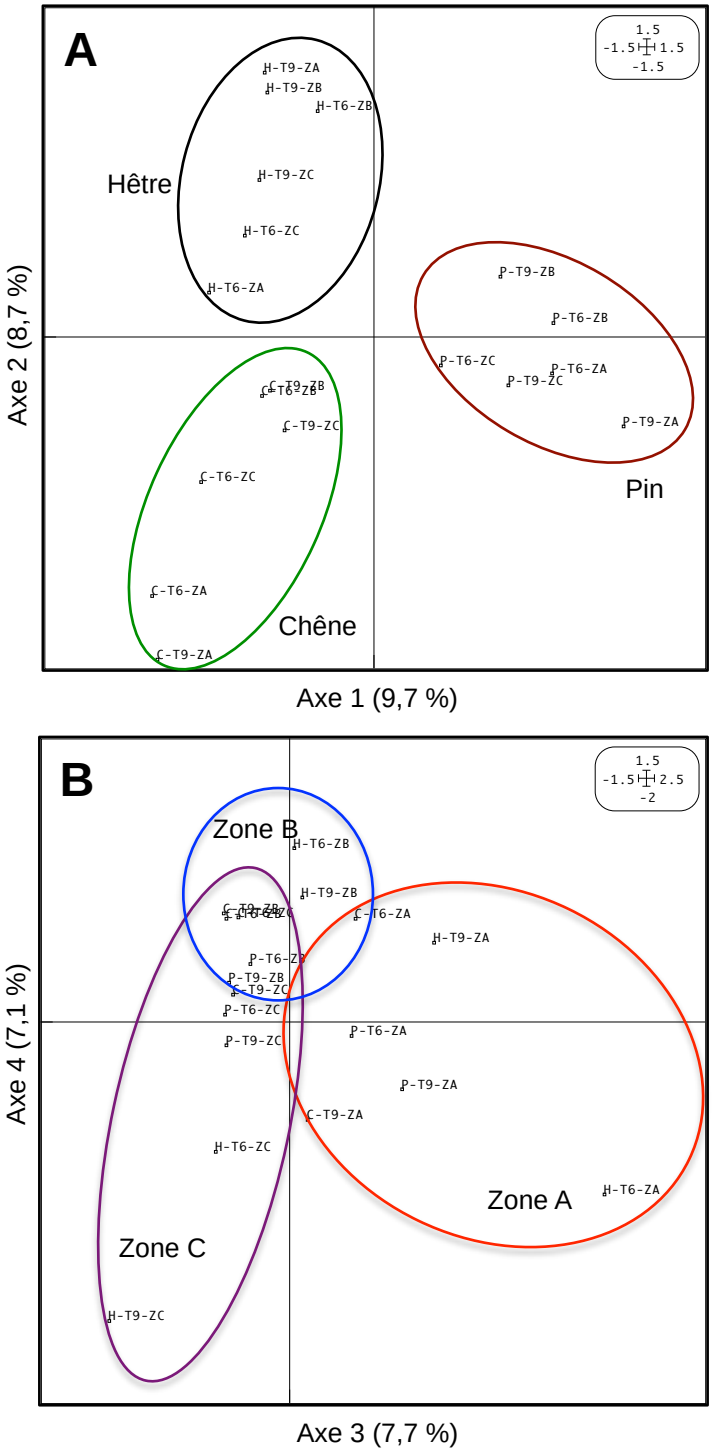


Figure 5 : Distribution des communautés fongiques. **A**. Répartition sur les deux premières dimensions de l'Analyse de correspondance (COA). **B**. Représentation à partir des axes 3 et 4. En fonction de l'absence/présence des espèces fongiques, l'essence sylvicole est le facteur principal qui structure les communautés. P : pin ; C : chêne ; H : hêtre ; ZA : zone A ; ZB : zone B ; ZC : zone C ; T6 : après 6 mois ; T9 : après 9 mois.

3.C) Distribution et succession des différents groupes écologiques

Afin d'évaluer la composition et la succession des groupes écologiques majeurs lors des stades précoces de la dégradation du bois, un tableau des 50 espèces les plus abondantes sur la totalité des échantillons de bois a été réalisée à partir de la matrice de distribution des MOTU, en ayant préalablement supprimé les singletons (Tableau 2). L'assignation du statut écologique de ces espèces a été réalisée grâce aux données bibliographiques et à la base de données taxonomique du NCBI. D'après cette assignation, l'évolution des différents groupes écologiques et/ou taxonomiques, en fonction du temps et des différentes essences, a pu être estimée (Figure 6).

Parmi ces 50 espèces, les ascomycètes sont majoritaires (66,7%) par rapport au basidiomycètes (32,1%), et une seule MOTU est associée aux zygomycètes. Cette prédominance des ascomycètes a déjà été observée lors des stades précoces de la dégradation du bois (Rajala et al., 2011; Rajala et al., 2012). Les ascomycètes sont des espèces pionnières pouvant coloniser rapidement les substrats ligneux (Siitonen, 2001). Ils possèdent un statut écologique de type saprotrophe, avec moins de préférence d'hôte que les basidiomycètes, ne disposent pas de système spécifique de dégradation de la lignine et par conséquent leur attaque reste localisée. Si l'on intègre le statut écologique des espèces, les endophytes représentent la majeure partie des MOTU identifiées. Ces derniers, déjà présents au sein des arbres vivants, pourraient évoluer du statut d'endophytes latents vers saprophytes à la mort de l'hôte (Menkis et al., 2004; Parfitt et al., 2010). Une autre étude effectuée par séquençage de profils d'électrophorèse sur gel en gradient de température (TGGE) réalisée sur des morceaux de bois de hêtre enfouis sur des sites peuplés d'essences forestières différentes a démontré que parmi les 20 espèces les plus abondantes beaucoup appartiennent également à des ascomycètes ou endophytes majoritairement saprophytes (Kulhankova et al., 2006). D'autres groupes écologiques sont également présents comme par exemple les levures, les zygomycètes ou encore les ectomycorhizes (ECM). Ces 3 groupes écologiques n'excédant jamais 10% de la totalité des séquences. La présence d'ECM et leur évolution ont déjà été constatées sur des échantillons de bois, même lors d'une dégradation légère, mais leur rôle dans ce processus, ou leur interaction avec les champignons décomposeurs, reste encore inconnu (Buée et al. 2007 ; Rajala et al., 2012). Ici nous observons leur présence sur des échantillons qui ne montrent pas encore de dégradation, probablement en lien avec l'enfouissement dans le sol des piquets. Cette expérimentation se distingue des autres études ou les échantillons étaient simplement en

contact avec le sol et consécutivement moins contraints en oxygène (Hashimoto et Yoneda, 2006; Rajala et al., 2012; Tedersoo et al., 2008). De manière plus spécifique, des espèces particulières, comme celles associées au genre *Aureobasidium*, sont connues pour être des saprophytes primaires, en particulier au cours de la décomposition des litières. De manière intéressante ceci a été décrit à partir de matière organique de chêne, bouleau, tilleul ou frêne (Frankland, 1998); mais dans notre cas, c'est le bois de pin qui est richement colonisé par *Aureobasidium pullulans*, même si ce dernier est présent sur l'ensemble des essences. A l'inverse, des espèces comme *Armillaria mellea*, connues par être des pathogènes de faiblesse et lignivores, sont strictement présentes sur le chêne, exprimant ainsi une forte préférence d'hôte (Marçais et Bréda, 2006). Parmi les trois groupes écologiques bien connus pour être impliqués dans la décomposition du bois (pourriture molle, brune et blanche), on peut constater que les pourritures molles sont présentes essentiellement sur le pin après six et neuf mois d'incubation sur site, alors que seules les pourritures brunes et blanches colonisent abondement les deux espèces de fagacées sur ces mêmes périodes (Figure 6). Ces deux modèles de colonisation semblent dépendants de l'essence (conifères versus feuillus). Ainsi, les essences de feuillus ne présentent aucune espèce de champignon de pourriture molle, contrairement à l'essence de résineux, comme cela a été rapporté sur les stades très précoces de la décomposition du bois chez l'épicéa (Rajala et al. 2012). Les pourritures brunes et blanches présentent sont plus abondantes sur les essences de feuillus que sur l'essence de résineux et leur proportion augmente au cours du temps au détriment des ascomycètes, au statut écologique inconnu, et des endophytes, jusqu'à occuper plus de la moitié des séquences totales dans le cas du chêne (Figure 6). Dans une revue, Tuor et al. (1995) ont rapporté que les pourritures blanches dégradaient préférentiellement le bois de feuillus et que les pourritures brunes s'attaquaient plus aux conifères. Nos résultats indiquent que, lors des premiers stades de colonisation du bois, la proportion de pourritures brunes sur pin n'est pas significativement supérieure à celle mesurée sur hêtre ou chêne. Au contraire, on pourrait lier la faible abondance relative des pourritures brunes, mais aussi blanches, sur le pin à son caractère résistant à la biodégradation. En effet, le bois de résineux fait parti des matériaux lignocellulosiques les plus récalcitrants aux attaques fongiques. Cette qualité a été expliquée par une forte teneur en lignine, des tailles de pores très faibles et une composition particulière en composés phénoliques (Palonen et al. 2004 ; Mc Donald et al. 2011).

Tableau 2 : Distribution des 50 espèces les plus abondantes sur la totalité des échantillons de bois. As : Ascomycète ; Ba : Basidiomycète ; Br : pourriture brune ; En : endophyte ; Le : levure ; Mo : pourriture molle ; My : ectomycorhizien ; Ot : Autre ; Wh : pourriture blanche ; Zy : Zygomycète.

								Chêne		Hêtre		Pin		
Espèces	gi identifiant	query length	hit length	identity	score	e-value	Total reads	T6	T9	T6	T9	T6	T9	Ecologie
Coprinellus micaceus	gi|299151838	238	1207	99.6	230	1,00E-126	3113	679	310	1322	726	58	18	Br (Jarosz-Wilkolazka et al., 2002)
Phialea strobilina	gi|148541575	159	2780	93.1	107	2,00E-53	2764	1747	568	215	212	21	1	As (NCBI)
Camarographium carpini	gi|370316659	135	915	92.4	46	4,00E-17	2407	499	309	423	545	287	344	As (Crous et al., 2011)
Phialophora sp	gi|237641534	173	501	92.8	104	1,00E-51	1378	13	11	21	13	312	1008	Mo (Nilsson et Bjurman, 1998)
Coprinellus sp	gi|237641551	244	638	99.2	233	1,00E-128	1225	206	922	0	96	1	0	Br (Davison et Tay, 2008)
Chalara dualis	gi|116804970	159	529	96.9	136	8,00E-71	1099	1	0	129	964	4	1	As (Natalia et al., 2009)
Truncatella angustata	gi|22773869	193	561	100	193	1,00E-104	834	34	4	525	215	53	3	As (Casieri et al., 2009)
Porotheleum fimbriatum	gi|94962113	233	577	92.8	54	1,00E-21	765	375	76	65	31	165	53	Wh (Heilmann-Clausen et Christensen, 2005)
Leaf litter	gi|20531666	150	490	99.3	146	8,00E-77	695	15	39	203	67	170	201	As (NCBI)
Phellinus igniarius	gi|21666863	182	604	99.5	175	5,00E-94	685	0	2	285	397	0	1	Wh (Blanchette, 1984)
Phlogicylindrium eucalypti	gi|116294942	156	1727	92.3	95	2,00E-46	591	20	4	252	315	0	0	En (Erwin et Imamura, 2010)
Lecythophora sp	gi|315200946	172	550	99.4	155	4,00E-82	590	25	53	20	272	100	120	En (Wang et al., 1995)
Psathyrella aff gracilis	gi|336285634	265	626	97.7	217	1,00E-119	556	215	2	337	0	1	1	Br (Padamsee et al., 2008)
Hypholoma fasciculare	gi|134274887	238	686	100	238	1,00E-131	532	95	309	2	0	61	65	Wh (Šnajdr et al., 2011)
Ramophialophora sp	gi|282944065	140	564	98.6	126	7,00E-65	485	0	0	376	105	3	1	As (Madrid et al., 2010)
Podospora glutinans	gi|48475412	169	540	97.5	146	1,00E-76	460	0	9	54	225	33	139	As (Schulz et Thormann, 2005)
Hormonema dematioides	gi|12053861	177	546	98.9	163	7,00E-87	427	10	7	1	3	304	102	En (Middelhoven, 1997)
Fungal endophyte	gi|291220198	135	454	96.3	112	1,00E-56	423	1	0	1	7	90	324	En (NCBI)
Armillaria mellea	gi|158934551	255	850	98.8	232	1,00E-128	419	0	406	1	0	3	9	Wh (Rehman et Thurston, 1992)
Rhodotorula fujisanensis	gi|13160792	146	559	99.2	124	1,00E-63	415	224	111	5	0	67	8	Le (Glushakova et Chernov, 2004)
Coprinellus aff radians	gi|225920898	241	3585	100	241	1,00E-133	397	4	393	0	0	0	0	Wh (Anh et al., 2007)
Leohumicola terminalis	gi|51340260	157	484	94.3	118	5,00E-60	387	2	10	60	65	135	115	As (Hambleton et al., 2005)
Pseudoclathrosphaerina spiralis	gi|116804992	164	531	94.8	121	8,00E-62	366	103	134	55	24	27	23	As (Cooper, 2005
Lasiosphaeris hispida	gi|357434442	191	582	98	43	3,00E-15	356	17	4	334	1	0	0	As (Cai et al., 2005)
Trichosporon pullulans	gi|12862874	154	240	99.4	146	9,00E-77	310	2	6	1	0	139	162	Le (González et al., 1989)
Mortierella alpina	gi|11121250	172	1899	99.4	164	2,00E-87	307	3	4	32	0	264	4	Zy (Jayasinghe et Parkinson, 2008
Cercophora sparsa	gi|51104884	137	548	94.9	106	6,00E-53	280	0	0	264	15	0	1	En (Martinez-Luis et al., 2011)
Penicillium asperosporum	gi|2668652	172	1133	100	172	3,00E-92	253	153	91	1	0	6	2	As (Kiser et al., 2011)
Cladophialophora chaetospira	gi|157325602	192	1562	99.5	184	2,00E-99	243	26	60	21	9	78	49	As (Mouhamadou et al., 2011)
Fulvoflamma eucalypti	gi|75857915	153	489	100	153	6,00E-81	229	152	54	18	0	5	0	As (Crous et al., 2006
Chalara sp	gi|300862520	160	559	98.8	152	2,00E-80	221	52	5	91	55	7	11	As (NCBI)
Schenella pityophilus	gi|280967889	253	528	87	29	1,00E-06	218	0	0	0	208	10	0	Ba (NCBI)
Aureobasidium pullulans	gi|4808131	178	505	98.3	163	7,00E-87	209	6	4	9	14	99	77	As (Deshpande et al., 1992)
Chalara sp	gi|237641586	161	500	98.1	142	2,00E-74	204	0	1	1	0	55	147	As (NCBI)
Septoria arundinacea	gi|295814559	175	500	91.7	72	1,00E-32	203	0	0	12	186	1	4	En (Cui et al., 2011)
Penicillium sp	gi|256016345	185	628	98.4	161	1,00E-85	202	25	169	0	0	8	0	As (Baldrian et al., 2011)
Glacial ice	gi|13925665	171	647	100	171	1,00E-91	190	0	0	84	1	50	55	Ba (Ma et al., 2000)
Stereum hirsutum	gi|57232697	185	655	98.9	163	8,00E-87	189	5	33	144	7	0	0	Wh (Traversa et al., 2012)
Xylaria curta	gi|344333757	177	490	99.4	169	2,00E-90	189	0	0	94	94	1	0	En (Okane et al., 2008)
Sebacina vermifera	gi|193885589	173	2298	93	37	1,00E-11	185	1	0	166	4	6	8	My (Basiewicz et al., 2012)
Lactarius chrysorrheus	gi|188496890	171	594	100	171	1,00E-91	180	0	0	0	0	118	62	My (Buscardo et al., 2011)
Sebacina vermifera	gi|99866600	178	3402	92.2	104	1,00E-51	165	0	0	8	102	33	22	My (Basiewicz et al., 2012)
Ascomycota sp	gi|312434332	196	629	86.7	77	2,00E-35	164	0	0	25	138	1	0	As (Rodrigues et al., 2011)
Neonectria radicicola	gi|32966932	134	489	99.3	130	3,00E-67	161	45	10	2	1	72	31	As (Menkis et Vasaitis, 2011)
Alatospora acuminata	gi|28974813	162	714	95.6	105	3,00E-52	156	5	3	33	15	76	24	En (Quilliam et Jones, 2010)
Cercophora sulphurella	gi|51104885	158	582	93.8	113	4,00E-57	155	0	0	19	133	0	3	As (Jaatinen et al., 2008)
Botrytis anthophila	gi|57161884	185	650	98.9	174	2,00E-93	147	0	4	2	8	81	52	En (Wang et al., 2011)
Serpula himantioides	gi|42821218	205	564	98	185	1,00E-100	141	0	23	0	117	0	1	Br (Steenkjær Hastrup Anne et al., 2006)
Cordyceps sinensis	gi|31076025	173	571	100	157	3,00E-83	131	1	1	10	0	72	47	As (Nakamiya et al., 2005)
Sistotrema coronilla	gi|89039340	178	543	97.8	42	1,00E-14	130	0	130	0	0	0	0	Ba (Chaumeton et al., 1993)

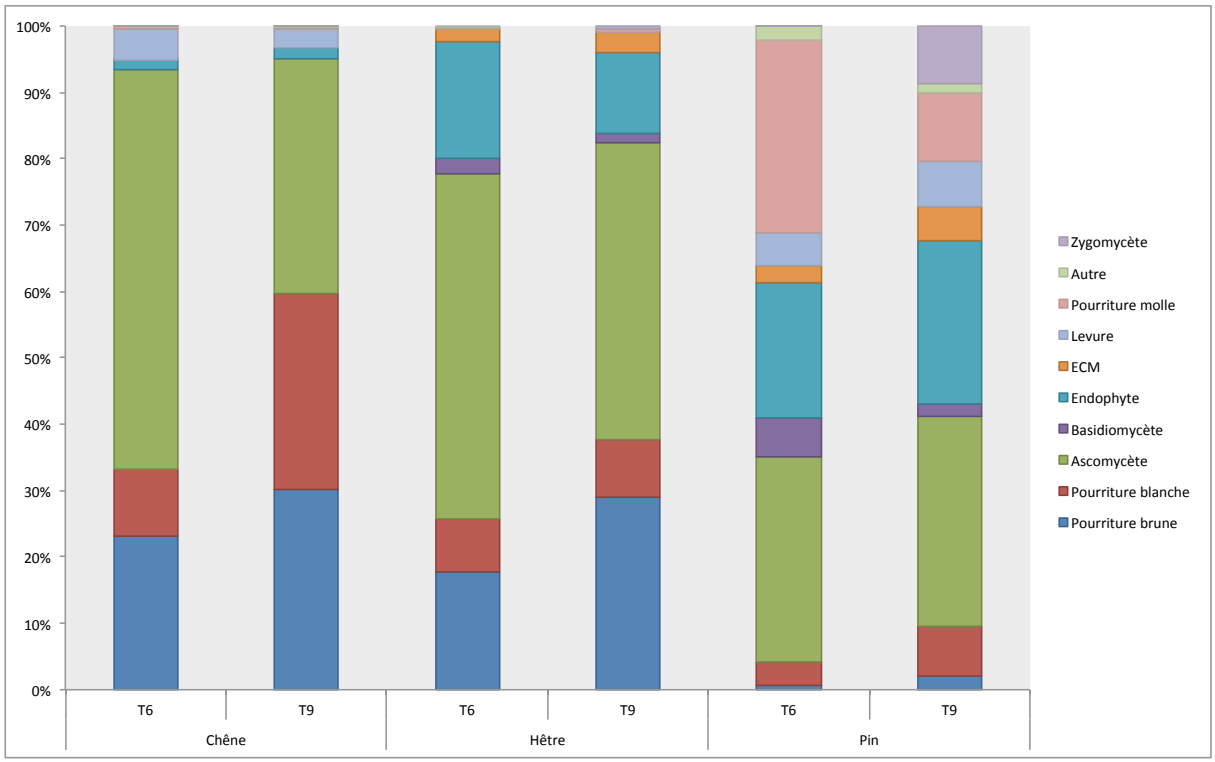


Figure 6 : Statut écologique et évolution en pourcentage de la distribution des 50 espèces les plus abondantes sur la totalité des échantillons de bois.

3.D) Normalisation et recherche d'espèces bio-indicatrices des stades précoces de la dégradation du bois

La norme EN 113 spécifie une méthode de laboratoire déterminant l'efficacité des produits de préservation du bois ou d'autres traitements contre les champignons basidiomycètes lignivores. Les espèces fongiques utilisées dans ce test normatif sont trois champignons de pourriture brune (*Coniophora puteana*, *Gloeophyllum trabeum*, et *Postia placenta)* et un champignon de pourriture blanche, *Trametes versicolor*. De la même manière, *Gloeophyllum trabeum*, *Serpula lacrymans*, *Trametes versicolor* et *Poria placenta* sont quatre espèces fongiques prescrites pour la norme EN 350-1 qui vise à évaluer la durabilité naturelle du bois. Parmi les 50 espèces les plus abondantes dans notre étude, aucune de ces espèces utilisées dans les normes EN 113 et EN 350-1 n'a été identifiée. En regardant plus en profondeur la totalité de la distribution des séquences, on observe que seul *Trametes versicolor* (ou *Coriolus versicolor*) est présent sur un piquet de hêtre avec un total de 9 lectures, soit 0,025% de la totalité des séquences. Ces résultats mettent en lumière le décalage existant entre les approches réalisées *in vitro* et les attaques observées en conditions naturelles, *in situ*. Les espèces utilisées pour évaluer l'efficacité d'un traitement antifongique sont, dans le cas présent, très différentes

de celles que l'on retrouve effectivement sur différentes essences de bois subissant une attaque fongique en milieu naturel. Ainsi, dans la perspective de développer des traitements antifongiques adaptés à la richesse et la diversité des espèces fongiques, les analyses de diversité peuvent se révéler utiles afin d'identifier des espèces modèles ou plus représentatives, voir indicatrices, de la dégradation du matériau bois en conditions normales d'utilisation.

Les espèces fongiques les plus rencontrées dans notre étude sont les *Coprinellus*. Parmi les cinq premiers MOTU, deux sont en effet associées à ce genre. *Coprinellus micaceus*, qui est la MOTU soutenue par le plus grand nombre de lectures, avec près de 9% des séquences obtenues à partir des échantillons de bois. Le coprin micacé est associé au bois mort en milieu naturel et a déjà été exploité dans des études de biodégradation du bois (Oliver et al. 2010). Mais, il n'est pas classiquement utilisé dans les tests normalisés de type EN 350-1 ou EN 113. Deux autres espèces intéressantes pourraient être valorisées pour la réalisation de tests de durabilité naturelle ou de préservation du bois. Il s'agit de *Camarographium carpini*, qui de manière intéressante, a été retrouvé très abondamment sous pin et *Hypholoma fasciculare*, qui est l'une des espèces dominante des deux fagacées.

Par ailleurs, plusieurs facteurs biotiques ou abiotiques ont été proposés comme indicateurs de la dégradation du bois. Par exemple, l'émission acoustique du bois augmente lorsque celui-ci présente une attaque fongique induisant une perte massique inférieure à 1% (Raczkowski et al., 1999). Cependant les facteurs principaux permettant d'évaluer ce type d'attaque (observation visuelle ou perte massique) ne sont pas applicables afin d'évaluer une attaque précoce. Ainsi, la multiplication à l'échelle du territoire d'expérimentations similaires à celle que nous avons mise en place à Oléron, intégrant plusieurs paramètres confondants, comme le climat, les caractères édaphiques ou le type d'essence, permettrait d'identifier une liste de bioindicateurs potentiels des stades précoces de la colonisation/dégradation du bois. Ce type d'approche a pu être appliqué à d'autres filières biotechnologiques et économiques, comme l'utilisation des diatomées dans le diagnostique de la qualité des eaux (Iliopoulou-Georgudaki et al., 2003).

4) Conclusions

Grâce à cette expérience pilote sur l'analyse de la richesse et de la diversité fongique au cours des stades précoces de la colonisation du bois, plusieurs points ont été mis en évidence. La source d'inoculum fongique d'un morceau de bois enterré est peu influencée par la diversité microbienne des sols. En effet, les espèces retrouvées sur les échantillons de bois comportent

peu de similarités avec les espèces fongiques présentes avant implantation des piquets. Ensuite, comme le démontre les analyses de covariance, un fort effet de l'hôte sur la structure de la communauté fongique a été mis en évidence, puis un effet spatial, suggérant une diversité gamma relativement importante sur ce site. Finalement, nous suggérons de faire évoluer certains tests normalisés, comme la norme EN 113 ou EN 350-1, afin que celles-ci incluent des espèces plus représentatives des conditions naturelles et des premiers stades de la dégradation. Enfin, l'élargissement d'études d'écologie des communautés de décomposeurs ou des études à large échelle permettraient peut-être d'identifier des espèces indicatrices des stades précoces de la dégradation du bois, et potentiellement traçables par des approches moléculaires ciblées.

5) Références

Acosta-Martinez V., Dowd S., Sun Y. et Allen V., (2008). Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use. **Soil Biology and Biochemistry**. (40): 2762-2770.

Allmer J., Stenlid J. et Dahlberg A., (2009). Logging-residue extraction does not reduce the diversity of litter-layer saprotrophic fungi in three Swedish coniferous stands after 25 years. **Canadian Journal of Forest Research**. (39): 1737-1748.

Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W. et Lipman D. J., (1990). Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**. (215): 403-410.

Anh D. H., Ullrich R., Benndorf D., Svato A. O., Muck A. et Hofrichter M., (2007). The Coprophilous Mushroom *Coprinus radians* Secretes a Haloperoxidase That Catalyzes Aromatic Peroxygenation. **Applied and Environmental Microbiology**. (73): 5477-5485.

Baldrian P., Voříšková J., Dobiášová P., Merhautová V., Lisá L. et Valášková V., (2011). Production of extracellular enzymes and degradation of biopolymers by saprotrophic microfungi from the upper layers of forest soil. **Plant and Soil**. (338): 111-125.

Basiewicz M., Weiß M., Kogel K.-H., Langen G., Zorn H. et Zuccaro A., (2012). Molecular and phenotypic characterization of *Sebacina vermifera* strains associated with orchids, and the description of *Piriformospora williamsii* sp. nov. **Fungal Biology**. (116): 204-213.

Berglund H. k., Edman M. et Ericson L., (2005). Temporal variation of wood-fungi diversity in boreal old-growth forests: implications for monitoring. **Ecological Applications**. (15): 970-982.

Blanchette R. A., (1984). Screening Wood Decayed by White Rot Fungi for Preferential Lignin Degradation. **Applied and Environmental Microbiology**. (48): 647-653.

Boddy L., (1992). "Development and function of fungal communities in decomposing wood.". In: Carroll C. G. et Wicklow D. T. **The fungal community: its organization and role in the ecosystem**. New York. Marcel Dekker: 749-782.

Boddy L., (2000). Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. **FEMS Microbiol Ecol**. (31): 185-194.

Buée M., Reich M., Murat C., Morin E., Nilsson R. H., Uroz S. et Martin F., (2009). 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. **New Phytol**. (184): 449-456.

Buée M., Maurice JP., Zeller B., Andrianarisoa S., Ranger J., Courtecuisse R., Marçais B. Le Tacon F. (2011). Influence of tree species on richness and diversity of epigeous fungal communities in a French temperate forest stand. **Fungal Ecology.** (4) :22-31.

Buée M., Courty P. E., Mignot D. and Garbaye J., (2007). Soil niche effect on species diversity and catabolic activities in an ectomycorrhizal fungal community. **Soil Biology and Biochemistry**. (39): 1947-1955.

Buscardo E., Freitas H., Pereira J. et De Angelis P., (2011). Common environmental factors explain both ectomycorrhizal species diversity and pine regeneration variability in a post-fire Mediterranean forest. **Mycorrhiza**. (21): 549-558.

Cai L., Jeewon R. et Hyde K. D., (2005). Phylogenetic evaluation and taxonomic revision of *Schizothecium* based on ribosomal DNA and protein coding genes. **Fungal Diversity**. (19): 1-21.

Casieri L., Hofstetter V., Viret O. and Gindro K., (2009). Fungal communities living in the wood of different cultivars of young *Vitis vinifera* plants. **Phytopathologia Mediterranea**. (48): 73-83.

Chaumeton J.-P., Chauveau C. et Chavant L., (1993). Water-soluble polysaccharides excreted by mycelium of higher fungi: Relationship with taxonomy and physiology. **Biochemical Systematics and Ecology**. (21): 227-239.

Cooper J. A., (2005). New Zealand hyphomycete fungi: Additional records, new species, and notes on interesting collections. **New Zealand Journal of Botany**. (43): 323-349.

Crous P. W., Summerell B. A., Shivas R. G., Romberg M., Mel'nik V. A., Verkley G. J. et Groenewald J. Z., (2011). Fungal Planet description sheets: 92-106. **Persoonia**. (27): 130-162.

Crous P. W., Verkley G. J. M. et Groenewald J. Z., (2006). Eucalyptus microfungi known from culture. 1. *Cladoriella* and *Fulvoflamma* genera nova, with notes on some other poorly known taxa. **Studies in Mycology**. (55): 53-63.

Cui J.-l., Guo S.-x., Dong H. et Xiao P., (2011). Endophytic Fungi from Dragon's Blood Specimens: Isolation, Identification, Phylogenetic Diversity and Bioactivity. **Phytotherapy Research**. (25): 1189-1195.

Davison E. M. et Tay F. C. S., (2008). Causes of incipient rot and rot in regrowth *Eucalyptus diversicolor* (karri) trees. **Plant Pathology**. (57): 1097-1102.

Deshpande M. S., Rale V. B. et Lynch J. M., (1992). *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: A status report. **Enzyme and Microbial Technology**. (14): 514-527.

Edgar R. C., (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**. (26): 2460-2461.

Edman M., Kruys N. et Jonsson B. G., (2004). Local dispersal sources strongly affect colonization patterns of woo-decaying fungi on spruce logs. **Ecological Applications**. (14): 893-901.

Erwin S. T. et Imamura Y., (2010). Molecular Identification of Decay Fungi in Xylem of *Yellow Meranti* (*Shorea gibbosa*) Canker. **Wood Research Journal**. (1): 78-82.

Frankland J. C., (1992). "Mechanisms in fungal succession.". In: Wicklow D. T. et Carroll C. G. **The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem**. New York. Marcel Dekker Press: 403-426.

Frankland J. C., (1998). Fungal succession : unravelling the unpredictable. **Mycological Research**. (102): 1-15.

Fuhrman J. A., (2009). Microbial community structure and its functional implications. **Nature**. (459): 193-199.

Gardes M. et Bruns T. D., (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes--application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Mol Ecol**. (2): 113-118.

Gessner M. O., Swan C. M., Dang C. K., McKie B. G., Bardgett R. D., Wall D. H. et Hattenschwiler S., (2010). Diversity meets decomposition. **Trends Ecol Evol**. (25): 372-380.

Glushakova A. M. et Chernov I. Y., (2004). Seasonal Dynamics in a Yeast Population on Leaves of the Common Wood *Sorrel Oxalis acetosella* L. **Microbiology**. (73): 184-188.

González A. E., Martínez A. T., Almendros G. et Grinbergs J., (1989). A study of yeasts during the delignification and fungal transformation of wood into cattle feed in Chilean rain forest. **Antonie Van Leeuwenhoek**. (55): 221-236.

Hambleton S., Seifert K. A. et Nickerson N. L., (2005). *Leohumicola*, a new genus of heat-resistant hyphomycetes. **Studies in Mycology**. (53): 29-52.

Harmon M. E., Franklin J. F., Swanson F. J., Sollins P., Gregory S. V., Lattin J. D., Anderson N. H., Cline S. P., Aumen N. G., Sedell J. R., Lienkaemper G. W., Cromack Jr K. et Cummins K. W., (2004). "Ecology of Coarse Woody Debris in Temperate Ecosystems". In: Caswell H. **Advances in Ecological Research**. Academic Press: 59-234.

Hashimoto Y. et Yoneda I., (2006). Influences of dominant ectomycorrhizal fungi on naturally regenerated conifer seedlings on fallen logs in subalpine forest in Hokkaido, Japan. **Annual Report of Interdisciplinary Research Institue of Environmental Sciences.** (24): 17-22.

Hatakka A. et Hammel K. E., (2010). "Fungal biodegradation of lignocelluloses". In: **Mycota, Vol.10 : Industrial applications: 2nd edition**. Berlin, Heidelberg. Springer: 319-340.

Heilmann-Clausen J. et Christensen M., (2003). Fungal diversity on decaying beech logs – implications for sustainable forestry. **Biodiversity and Conservation**. (12): 953-973.

Heilmann-Clausen J. et Christensen M., (2005). Wood-inhabiting macrofungi in Danish beech-forests: conflicting diversity patterns and their implications in a conservation perspective. Elsevier, Kidlington, ROYAUME-UNI.

Hottola J., Ovaskainen O. et Hanski I., (2009). A unified measure of the number, volume and diversity of dead trees and the response of fungal communities. **Journal of Ecology**. (97): 1320-1328.

Huson D. H., Mitra S., Ruscheweyh H. J., Weber N. et Schuster S. C., (2011). Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4. **Genome Res**. (21): 1552-1560.

Iliopoulou-Georgudaki J., Kantzaris V., Katharios P., Kaspiris P., Georgiadis T. et Montesantou B., (2003). An application of different bioindicators for assessing water quality: a case study in the rivers Alfeios and Pineios (Peloponnisos, Greece). **Ecological Indicators**. (2): 345-360.

Jaatinen K., Laiho R., Vuorenmaa A., Del Castillo U., Minkkinen K., Pennanen T., Penttilä T. et Fritze H., (2008). Responses of aerobic microbial communities and soil respiration to water-level drawdown in a northern boreal fen. **Environmental Microbiology**. (10): 339-353.

Jarosz-Wilkolazka A., Kochmanska-Rdest J., Malarczyk E., Wardas W. et Leonowicz A., (2002). Fungi and their ability to decolourize azo and anthraquinonic dyes. **Enzyme and Microbial Technology**. (30): 566-572.

Jayasinghe B. A. T. D. et Parkinson D., (2008). Actinomycetes as antagonists of litter decomposer fungi. **Applied Soil Ecology**. (38): 109-118.

Johannesson H. et Stenlid J., (1999). Molecular identification of wood-inhabiting fungi in an unmanaged *Picea abies* forest in Sweden. **Forest Ecology and Management**. (115): 203-211.

Johannesson H. et Stenlid J., (2004). Nuclear reassortment between vegetative mycelia in natural populations of the basidiomycete *Heterobasidion annosum*. **Fungal Genet Biol**. (41): 563-570.

Jönsson M. T., Edman M. et Jonsson B. G., (2008). Colonization and extinction patterns of wood-decaying fungi in a boreal old-growth *Picea abies* forest. **Journal of Ecology**. (96): 1065-1075.

Kebli H., Drouin P., Brais S. et Kernaghan G., (2011). Species composition of saproxylic fungal communities on decaying logs in the boreal forest. **Microb Ecol**. (61): 898-910.

Kiser J., Morrell J. J. et Filip G., (2011). Fungal colonization of coastal Douglas-fir following mechanical commercial thinning damage. **Forest Pathology**. (41): 317-324.

Kubartová A., Ottosson E., Dahlberg A. et Stenlid J., (2012). Patterns of fungal communities among and within decaying logs, revealed by 454 sequencing. **Molecular Ecology**. (21): 4514-4532.

Küffer N. et Senn-Irlet B., (2005). Influence of Forest Management on the Species Richness and Composition of Wood-inhabiting Basidiomycetes in Swiss Forests. **Biodiversity and Conservation**. (14): 2419-2435.

Kulhankova A., Béguiristain T., Moukoumi J., Berthelin J. et Ranger J., (2006). Spatial and temporal diversity of wood decomposer communities in different forest stands, determined by ITS rDNA targeted TGGE. **Ann. For. Sci.** (63): 547-556.

Kumar M. et Verma R. K., (2010). Fungi diversity, their effects on building materials, occupants and control: a brief review. **Journal of Scientific & Industrial Research**. (69): 657-661.

Lindner D. L., Gargas A., Lorch J. M., Banik M. T., Glaeser J., Kunz T. H. et Blehert D. S., (2011). DNA-based detection of the fungal pathogen *Geomyces destructans* in soils from bat hibernacula. **Mycologia**. (103): 241-246.

Luis P., Walther G., Kellner H., Martin F. et Buscot F. o., (2004). Diversity of laccase genes from basidiomycetes in a forest soil. **Soil Biology and Biochemistry**. (36): 1025-1036.

Lumley T. C., Gignac L. D. et Currah R. S., (2001). Microfungus communities of white spruce and trembling aspen logs at different stages of decay in disturbed and undisturbed sites in the boreal mixedwood region of Alberta. **Canadian Journal of Botany**. (79): 76-92.

Ma L. J., Rogers S. O., Catranis C. M. et Starmer W. T., (2000). Detection and characterization of ancient fungi entrapped in glacial ice. **Mycologia**. (92): 286-295.

Madrid H., Cano J., Stchigel A., Gené J. et Guarro J., (2010). *Ramophialophora humicola* and *Fibulochlamys chilensis*, two new microfungi from soil. **Mycologia**. (102): 605-612.

Marçais B. et Bréda N., (2006). Role of an opportunistic pathogen in the decline of stressed oak trees. **Journal of Ecology**. (94): 1214-1223.

Martinez-Luis S., Cherigo L., Higginbotham S., Arnold E., Spadafora C., Ibanez A., Gerwick W. H. et Cubilla-Rios L., (2011). Screening and evaluation of antiparasitic and in vitro anticancer activities of Panamanian endophytic fungi. **International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology**. (14): 95-102.

MacDonald J., Doering M., Canam T., Gong Y., Guttman D. S., Campbell M. M. and Master E. R., (2011). Transcriptomic responses of the softwood-degrading white-rot fungus *Phanerochaete carnosa* during growth on coniferous and deciduous wood. **Appl Environ Microbiol**. (77): 3211-3218.

Menkis A., Allmer J., Vasiliauskas R., Lygis V., Stenlid J. et Finlay R., (2004). Ecology and molecular characterization of dark septate fungi from roots, living stems, coarse and fine woody debris. **Mycol Res**. (108): 965-973.

Menkis A. et Vasaitis R., (2011). Fungi in Roots of Nursery Grown *Pinus sylvestris*: Ectomycorrhizal Colonisation, Genetic Diversity and Spatial Distribution. **Microbial Ecology**. (61): 52-63.

Middelhoven W. J., (1997). Identity and biodegradative abilities of yeasts isolated from plants growing in an arid climate. **Antonie Van Leeuwenhoek**. (72): 81-89.

Moorhead D. L. et Sinsabaugh R. L., (2000). Simulated patterns of litter decay predict patterns of extracellular enzyme activities. **Applied Soil Ecology**. (14): 71-79.

Mouhamadou B., Molitor C., Baptist F., Sage L., Clément J.-C., Lavorel S., Monier A. et Geremia R., (2011). Differences in fungal communities associated to *Festuca paniculata* roots in subalpine grasslands. **Fungal Diversity**. (47): 55-63.

Nakamiya K., Hashimoto S., Ito H., Edmonds J. S., Yasuhara A. et Morita M., (2005). Degradation of dioxins by cyclic ether degrading fungus, *Cordyceps sinensis*. **FEMS Microbiology Letters**. (248): 17-22.

Natalia A., Marta N. C. and Angelica M. A., (2009). Diversity of saprotrophic anamorphic ascomycetes from native forests in Argentina : an updated review. **Darwiniana : Revista del Instituto de Botanica Darwinion (IBODA)**. (47): 108-124.

Nilsson K. et Bjurman J., (1998). Chitin as an indicator of the biomass of two wood-decay fungi in relation to temperature, incubation time, and media composition. **Canadian Journal of Microbiology**. (44): 575-581.

Nilsson R. H., Bok G., Ryberg M., Kristiansson E. et Hallenberg N., (2009). A software pipeline for processing and identification of fungal ITS sequences. **Source Code Biol Med**. (4): 1.

Nordén B., Ryberg M., Gotmark F. et Olausson B., (2004). Relative importance of coarse and fine woody debris for the diversity of wood-inhabiting fungi in temperate broadleaf forests. **Biological Conservation**. (117): 1-10.

Okane I., Srikitikulchai P., Toyama K., Læssøe T., Sivichai S., Hywel-Jones N., Nakagiri A., Potacharoen W. et Suzuki K.-i., (2008). Study of endophytic Xylariaceae in Thailand: diversity and taxonomy inferred from rDNA sequence analyses with saprobes forming fruit bodies in the field. **Mycoscience**. (49): 359-372.

Oliver JP, Perkins J, Jellison J. 2010. Effect of fungal pretreatment of wood on successional decay by several inky cap mushroom species. I**nternational Biodeterioration and Biodegradation** (64): 646-651.

Padamsee M., Matheny P. B., Dentinger B. T. M. et McLaughlin D. J., (2008). The mushroom family *Psathyrellaceae* : Evidence for large-scale polyphyly of the genus *Psathyrella*. Elsevier, Amsterdam, PAYS-BAS.

Palonen, H; Thomsen, A; Tenkanen, M; Schmidt, A; Viikari, L. 2004. Evaluation of wet oxidation pretreatment for enzymatic hydrolysis of softwood. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. (117): 1-17.

Parfitt D., Hunt J., Dockrell D., Rogers H. J. et Boddy L., (2010). Do all trees carry the seeds of their own destruction? PCR reveals numerous wood decay fungi latently present in sapwood of a wide range of angiosperm trees. **Fungal Ecology**. (3): 338-346.

Quilliam R. et Jones D., (2010). Fungal root endophytes of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia*. **Mycorrhiza**. (20): 341-348.

Raczkowski J., Lutomski K., Moliński W. et Woś R., (1999). Detection of early stages of wood decay by acoustic emission technique. **Wood Science and Technology**. (33): 353-358.

Rajala T., Peltoniemi M., Hantula J., Mäkipää R. et Pennanen T., (2011). RNA reveals a succession of active fungi during the decay of *Norway spruce* logs. **Fungal Ecology**. (4): 437-448.

Rajala T., Peltoniemi M., Pennanen T. et Makipaa R., (2012). Fungal community dynamics in relation to substrate quality of decaying *Norway spruce* (*Picea abies* [L.] Karst.) logs in boreal forests. **FEMS Microbiol Ecol**. (81): 494-505.

Rajala T., Peltoniemi M., Pennanen T. et Mäkipää R., (2010). Relationship between wood-inhabiting fungi determined by molecular analysis (denaturing gradient gel electrophoresis) and quality of decaying logs. **Canadian Journal of Forest Research**. (40): 2384-2397.

Rehman A. U. et Thurston C. F., (1992). Purification of laccase I from *Armillaria mellea*. **Journal of General Microbiology**. (138): 1251-1257.

Rodrigues A., Mueller U. G., Ishak H. D., Bacci Jr M. et Pagnocca F. C., (2011). Ecology of microfungal communities in gardens of fungus-growing ants (*Hymenoptera: Formicidae*): a year-long survey of three species of attine ants in Central Texas. **FEMS Microbiology Ecology**. (78): 244-255.

Rolstad J., Saetersdal M., Gjerde I. et Storaunet K. O., (2004). Wood-decaying fungi in boreal forest: are species richness and abundances influenced by small-scale spatiotemporal distribution of dead wood? **Biological Conservation**. (117): 539-555.

Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spougea JL, Levesque AC, Chenb W, Fungal Barcoding Consortium, (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences** (109): 6241-6246.

Schloss P. D., Westcott S. L., Ryabin T., Hall J. R., Hartmann M., Hollister E. B., Lesniewski R. A., Oakley B. B., Parks D. H., Robinson C. J., Sahl J. W., Stres B., Thallinger G. G., Van Horn D. J. et Weber C. F., (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Appl Environ Microbiol**. (75): 7537-7541.

Schulz M. et Thormann M., (2005). Functional and taxonomic diversity of saprobic filamentous fungi from *Typha latifolia* from central Alberta, Canada. **Wetlands**. (25): 675-684.

Siitonen J., (2001). Forest management, coarse woody debris and saproxylic organisms: Fennoscandian boreal forests as an example. **Ecol Bull**. (49): 11-41.

Šnajdr J., Dobiášová P., Větrovský T., Valášková V., Alawi A., Boddy L. et Baldrian P., (2011). Saprotrophic basidiomycete mycelia and their interspecific interactions affect the spatial distribution of extracellular enzymes in soil. **FEMS Microbiology Ecology**. (78): 80-90.

Steenkjær Hastrup Anne C., Jensen B., Clausen C. and Green I. I. I. F., (2006). The effect of CaCl2 on growth rate, wood decay and oxalic acid accumulation in Serpula lacrymans and related brown-rot fungi. **Holzforschung**. (60): 339-345.

Tedersoo L., Nilsson R. H., Abarenkov K., Jairus T., Sadam A., Saar I., Bahram M., Bechem E., Chuyong G. et Koljalg U., (2010). 454 Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases. **New Phytol**. (188): 291-301.

Tedersoo L., Suvi T., Jairus T. et Koljalg U., (2008). Forest microsite effects on community composition of ectomycorrhizal fungi on seedlings of *Picea abies* and *Betula pendula*. **Environ Microbiol**. (10): 1189-1201.

Tiunov A. V. et Scheu S., (2005). Facilitative interactions rather than resource partitioning drive diversity-functioning relationships in laboratory fungal communities. **Ecology Letters**. (8): 618-625.

Toljander Y. K., Lindahl B. D., Holmer L. et Hogberg N. O., (2006). Environmental fluctuations facilitate species co-existence and increase decomposition in communities of wood decay fungi. **Oecologia**. (148): 625-631.

Traversa A., Loffredo E., Gattullo C. E. et Senesi N., (2012). Biodecontamination of aqueous substrates from bisphenol A by ligninolytic fungi. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**. (47): 1407-1412.

Tuor, U; Winterhalter, K; Fiechter A. 1995. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **Journal of Biotechnology**. (41): 1-17.

Wang Y., Zeng Q., Zhang Z., Yan R., Wang L. et Zhu D., (2011). Isolation and characterization of endophytic huperzine A-producing fungi from *Huperzia serrata*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. (38): 1267-1278.

Wang Z., Chen T., Gao Y., Breuil C. et Hiratsuka Y., (1995). Biological degradation of resin acids in wood chips by wood-inhabiting fungi. **Applied and Environmental Microbiology**. (61): 222-225.

Yamashita S., Hattori T. et Abe H., (2010). Host preference and species richness of wood-inhabiting aphyllophoraceous fungi in a cool temperate area of Japan. **Mycologia**. (102): 11-19.

Chapitre 2 : Evaluation des capacités lignocellulolytiques d'une collection de souches fongiques et détection de l'activité ß-ethérase sécrétée

La décomposition du bois fait appel à deux types de systèmes enzymatiques extracellulaires : un système hydrolytique responsable de la dégradation des polysaccharides (pourriture blanche) et un système oxydatif unique responsable de la dégradation des polysaccharides (pourriture brune) et de la lignine (pourriture blanche). Cette machinerie de dégradation complexe fait l'objet de nombreux travaux permettant une meilleure compréhension des différents systèmes impliqués selon le type de pourriture, avec pour finalité la conversion de la biomasse lignocellulosique en bio-éthanol (Kubicek, 2012) ou la bio-remédiation des environnement pollués (Kulikova et al., 2011). Afin d'atteindre ces objectifs, les connaissances des capacités lignocellulolytiques de différentes souches doivent être évaluées.

La classification fonctionnelle des champignons saprophytes connaît un nouvel essor grâce à la génomique comparative, suggérant que le contenu en familles de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la dégradation du bois pourrait être utilisé comme indicateur fonctionnel du type de pourriture (Eastwood et al., 2011; Floudas et al., 2012). Cependant ces études restent peu abordables, consomment beaucoup de temps, ne peuvent être extrapolées à un grand nombre d'organismes et ne fournissent pas de données quantitatives contrairement aux approches transcriptomiques ou enzymatiques (Macdonald et Master, 2012; Žifčáková et al., 2011).

C'est pourquoi nous avons cherché à valider des marqueurs fonctionnels spécifiques du type de pourriture au moyen de tests enzymatiques propres à la dégradation des différents constituants du bois. Nous avons également recherché une enzyme extracellulaire clivant spécifiquement la liaison ß-aryl éther prédominante au sein de la lignine. Grâce à une collection de 26 souches fongiques, et sur la base de dix tests enzymatiques nous avons mis en évidence que l'utilisation combinée de seulement 6 d'entre eux permet la séparation entre les pourritures molles et blanches des pourritures brunes. Nous avons également démontré que l'activité ß-ethérase sécrétée n'est pas majoritaire et semble dispensable au sein des champignons décomposeurs du bois. En conclusion, nous proposons que ce set de marqueurs puisse avoir des applications dans les études d'écologie fonctionnelle, ou dans la sélection de souches à potentiel biotechnologique.

Les résultats obtenus sont présentés dans l'article soumis à Journal of Microbiological Methods intitulé : « Selection and validation of enzymatic activities as functional markers in wood biotechnology and fungal ecology » (Article 1).

Article 1 : Selection and validation of enzymatic activities as functional markers in wood biotechnology fungal ecology.

Yann Mathieu[1,2], Eric Gelhaye[3], Stéphane Dumarçay[4], Philippe Gérardin[4], Luc Harvengt[2],

Marc Buée[1*]

(1) INRA, UMR1136 INRA Université de Lorraine "Interactions Arbres/Micro-organismes", IFR110 EFABA, Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France
(2) FCBA, Equipe Génétique et Biotechnologie, Pôle Recherche Forêt-Bois de Pierroton, 71 Route d'Arcachon (RD1250) F-33610 Cestas- France
(3) Université de Lorraine, UMR1136 INRA Université de Lorraine "Interactions Arbres/Micro-organismes", IFR 110 EFABA, Faculté des Sciences BP 239, 54506 Vandoeuvre Cedex, France
(4) LERMAB – Faculté des Sciences et Technologies. Université de Lorraine B.P. 70239 F-54506 Vandoeuvre-lès-Nancy cedex

*Corresponding author Marc BUEE (buee@nancy.inra.fr)

Abstract

The dead wood and forest soils are sources of diversity and under-explored fungal strains with biotechnological potential, which require to be studied. Numerous enzymatic tests have been proposed to investigate the functional potential of the soil microbial communities or to test the functional abilities of fungal strains. Nevertheless, the diversity of these functional markers and their relevance in ecology studies or biotechnological screening does still have not been demonstrated. In this work, we assessed ten different extracellular enzymatic activities involved in the wood decaying process including ß-etherase that specifically cleaves the ß-aryl ether linkages in the lignin polymer. For this purpose, a collection of 26 fungal strains, distributed within three ecological groups (white, brown and soft rot fungi), have been used. Among the ten potential functional markers, the combinatorial use of only six of them allowed separation between the group of white and soft rot fungi from the brown rot fungi. Moreover, our results suggest that extracellular ß-etherase is a rare and dispensable activity among the wood decay fungi. Finally, we propose that this set of markers could be useful for the analysis of fungal communities in functional ecology studies, or for the selection of strains with biotechnological interests.

Introduction

The fungal kingdom is extremely diverse, with a large number of species and functional groups involved in the regulation of energy and nutrient cycling in natural ecosystems. As decomposers, pathogens or mycosymbionts, fungi drive the global carbon cycle. In forest ecosystems, some of these organisms have been catalogued as decomposers with a major role in carbon and nitrogen-rich residues degradation from leaf litter and dead wood mediated by extracellular enzymatic systems. Activities of these degradative systems in forest soils have received extensive studies (Frankenberger Jr et al., 1982; Criquet et al., 2000; Andersson et al., 2004) and, even if the decomposition of litter and dead wood is brought about by combined activities of bacteria and soil eukaryotic communities (Romani et al., 2006), the role of fungi is particularly important because they produce a wide range of extracellular lignocellulolytic enzymes (Caldwell, 2005; Baldrian, 2008; Sinsabaugh, 2010). These heterotrophic microorganisms, which decompose lignocellulose, are divided in three major groups according to their mode of attack on the woody cell walls: soft-rot fungi, brown-rot fungi and white-rot fungi. Soft-rot fungi grow on wood in damp environments, and their hyphae produce fine penetration branches, growing through the cellulose-rich layers of woody cells, where cellulolytic enzymes are secreted. The soft-rot fungi have little effect on lignin, which remains more or less intact. The term 'brown rot' refers to the characteristic colour of the decayed wood, because such as soft-rot fungi, most of the cellulose and hemicelluloses are consumed, leaving the lignin matrix more or less modified as an anamorphous brown residue. This physical change correlates with hydrolysis of cellulose into glucose residues (Hyde et al., 1997). Koenigs (1974) proposed that the early stages of brown rot involve production of free hydroxy radicals (oxidative process). This process is supported by the fact that cellulases from brown-rot fungi have little effect on cellulose *in vitro*, unlike the cellulases of soft-rot fungi. White rot of wood is accomplished by fungal species that completely degrade both cellulose and lignin. The most remarkable feature of this ecological group is their ability to attack lignin by an oxidative process, and so far they are the only known organisms able to perform this degradation. It is admitted that degradation of native lignin is initiated by the attack of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase secreted by white rot fungi (Gold et al., 1993). However, cleavage of the arylglycerol ß-aryl ether linkage (approx. 50% of intermolecular lignin linkages) is the most important process in the biological degradation of this material (Masai et al., 1989). In 2003, Otsuka et al. described and isolated, for the first time, a new extracellular enzyme from a soil fungal strain that specifically cleaves this ß-aryl ether linkage. The sequence of the corresponding 18S rDNA for this strain was strongly homologous to

that of the Ascomycete *Chaetomium elatum*. Interestingly, *Chaetomium* spp are fungi that cause soft rots, as several other Ascomycota and mitosporic species. In the terrestrial ecosystems, white-rot fungi are more numerous than brown-rot fungi (Gilbertson, 1980). They include both Ascomycota, such as *Xylaria longipes* and Basidiomycota such as *Trametes* spp. or *Stereum hirsutum*, and the white rot fungal model *Phanerochaete chrysosporium*.

The functional classification of saprotrophic fungi is linked to species preference niche sharing and functional traits, which are well-defined and measurable properties of organisms. This functional classification is fundamental in fungal community ecology (McGill et al., 2006), but also in the wood industry and biotechnology for wood protection against decay, microbial staining or fungal moulds (Mai et al., 2004). Recent studies in comparative fungal genomics have confirmed that the content of gene families encoding enzymes implicated in wood decay, as Fungal Oxidative Lignin Enzymes (FOLy) (Levasseur et al., 2008) and Carbohydrate-Active Enzyme (CAZy) (Cantarel et al., 2009), could be used like functional indicators for rot fungi (Floudas et al., 2012; Eastwood et al., 2011). Nevertheless, these remarkable studies are still too much time-consuming and extremely expensive to be extrapolated from now on to a wide number of fungal species. Moreover, the measurements of lignocellulolytic functions, through transcriptomic or enzymatic approaches, provide quantitative data of putative functional traits. For these reasons, the enzymatic approaches had, and still have, a lot of success for the functional screening of fungal strains (Peláez et al., 1995; Gramss et al., 1999; Žifčáková et al., 2011). But, the relevance to measure certain enzymes in ecological studies does still not have been demonstrated.

The aims of this study were (i) to functionally characterize a wood decay fungi collection of selected species, largely present in the environment or laboratory models; (ii) to validate a set of fungal extracellular enzymes involved in the wood decaying process and to propose them as measurable functional markers (or functional traits); (iii) and finally, to test a new fungal extracellular enzyme, that specifically cleaves the ß-aryl ether linkage. To reach these objectives, 26 fungal species, belonging to soft rot, white rot and brown rot fungi, were subjected to ten independent extracellular enzymatic assays, including ß-etherase.

Materials and methods

-Fungal strain cultures-

Twenty-six fungal strains, comprising 11 white rot fungi, 9 brown rot fungi and 6 soft rot fungi (Fig. 1), were screened for lignocellulolytic activities. Stock cultures were maintained on Tien and Kirk solid medium (Tien et al., 1988) in darkness at 4°C until experiment. Identities of the isolates were confirmed by sequencing the internal transcribed spacer (ITS) region (Table S1), using the fungal-specific primer pair ITS1F and ITS4 (Gardes et al., 1993), and compared with GenBank database (Sayers et al., 2011).

For enzymatic tests, all strains were transferred in culture tubes containing 20 ml of Tien and Kirk liquid medium in darkness at 25°C without agitation for seven days. After this initial period of culture, extracellular enzymatic activities were measured before addition of 200mg of mixed sawdust (from a mixture of coniferous and deciduous wood) in each tube. Forty-eight hours after incubation with sawdust, extracellular enzymatic activities were measured a second time.

-Enzymatic assays-

Ten enzymatic activities, involved in wood degradation, were assessed. Five enzymatic assays were based on fluorogenic substrate release and the other five were photometric. The fluorogenic assays were based on methylumbelliferone (MU) release upon cleavage by enzymes: MU-ß-D-glucopyranoside (MU-G) for ß-glucosidase (EC 3.2.1.3), MU-ß-D-glucuronide hydrate (MU-GU) for ß-glucuronidase (EC 3.2.1.31), MU-ß-D-xylopyranoside (MU-X) for xylosidase (EC 3.2.1.37), MU-ß-D-cellobioside (MU-C) for cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91). All chemicals were purchased from Sigma Aldrich Chemicals (Lyon, France). For the detection of ß-etherase activity we synthesized Guaiacylglycerol-ß-O-4-methylumbelliferone (GOU) as previously described by Masai et al. (Masai et al., 1989). Stock (5 mM) and calibration (25 mM) solutions were prepared in 2-methoxyethanol (Hoppe, 1983), and substrates were diluted with sterile ultra-pure water (18Ω; Millipore, Billerica, MA, USA) to a final substrate concentration of 500 µM for Glucuronidase, Xylosidase and ß-glucosidase and 400 µM for Cellobiohydrolase assays respectively. Stock and calibration solutions, as well as diluted substrates were kept at -20°C in the dark. The experimental procedure for fluorogenic assays were performed in microplates as follows: 50 µl of culture supernatant were incubated in 50 µl of Na acetate buffer (100 mM), and 50 µl of substrate solution for a total volume of 150 µL per well. The buffer optimum pH (4.5) was determined in a pilot experiment (data not shown). After various incubation times

(depending on enzymatic activity) 100 µl of the reaction mix were added to 100 µl of stopping buffer in a black 96-well microplate before reading. The stopping buffer (Tris 2.5 M, pH 10-11) enabled MU reading and stopped enzyme reactions.

Depending on enzymatic activity, incubation times were 20 min (MU-G), 40 min (MU-C), 60 min (MU-X and MU-GU) or 4h (ß-etherase). Measurements were carried out with a Victor^3 microplate reader (Wallac Perkin-Elmer Life Sciences, Villebon-Sur-Yvette, France) with excitation wavelength set to 360 nm and emission wavelength to 450 nm. Each series of experiment included calibration wells to correlate fluorescence signal to concentration of released MU, which was calculated from the resulting regression lines. Control related to medium auto fluorescence and quenching was subtracted for all measures.

The five other substrates were based on photometric assays: 2, 2'-azino- di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid) (ABTS) (Fluka) for laccase, 3-dimethylaminobenzoic acid (DMAB) (Fluka) and 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride (MBTH) (Fluka) for manganese peroxidase, Azure B (Sigma Aldrich Chemicals, Lyon, France) for lignin peroxidase, Azo-CM-cellulose for cellulase and azo-xylan for hemi-cellulase (Megazyme, Wicklow, Ireland).

Stock solution of ABTS (2 mM) for laccase assay was diluted in Na acetate buffer pH 4,5. For the enzymatic assay, 50 µL of fungal culture supernatant, 50 µL of incubation buffer (Na acetate pH 4,5), and 50 µL of ABTS stock solution were incubated 30 min at 25 °C in a clear flat bottom 96-well microplate (Sarstedt, Newton, NC, USA). Then, absorbance was measured at 420 nm with a Bio-Rad Model 550 microplate reader. Absorptions values were converted into enzymatic activities via the extinction coefficient of the ABTS cation radical formed by laccase activity (36000 M^{-1} cm^{-1}). Manganese peroxidase (Mn-P) assay was based on the oxidative coupling of MBTH and DMAB in the presence of H_2O_2 and Mn^{2+}. Two working solutions (A and B) were made. Solution A contained (final volume 7 mL), 5 ml of sodium lactate and sodium succinate buffer (100 mM each, pH 4,5), 0.5 ml of DMAB solution (50 mM in ultra pure water), 0.5 ml of MBTH solution (1 mM in ultra pure water) and 1 ml $MnSO_4$-$4H_2O$ (1 mM in ultra pure water). The solution B contained the same elements except $MnSO_4$, which was replaced by EDTA (2 mM in ultra pure water).

For the manganese peroxydase (MnP) assay, 140 µl of working solution A or B were added to 50 µl of fungal culture supernatant and 10 µl of H_2O_2 (1 mM in ultra pure water) in a clear 96-well flat bottom microplate. After 1h incubation at 25°C, measurements were made on a Bio-Rad Model 550 microplate reader at 590 nm. Subtracting values obtained by working solution B from A revealed the Mn-P activity since only working solution A contained $MnSO_4$ which is required

for manganese dependent peroxidases. Absorption was then converted into enzymatic activities via the extinction coefficient (32000 M^{-1} cm^{-1}).

Lignin peroxidase (LiP) assay was adapted to microplate from Archibald et al. (1992). Briefly this assay is based on decrease in absorption of Azure B, which is oxidized under lignin peroxidase action. In a clear 96-well flat bottom microplate, 100 µL of buffer (100 mM sodium tartrate pH 4,5) were added to 50 µL of fungal culture supernatant and 30µL of ultra pure water, then 10 µL of Azure B (640 µM in ultra pure water) were added with 10 µL of H_2O_2 (1 mM in ultra pure water) to start the assay. Decrease in absorbance was followed at 650 nm on a Victor^3 microplate reader. For cellulase (endo-1,4-ß-Glucanase) and hemi-cellulase (endo-1,4-ß-Xylanase) assays the procedures were adapted from Megazyme protocols. These assays are based on the release of remazol brilliant blue (RBB) from carboxymethyl cellulose for cellulase assay and from birchwood xylan for hemi-cellulase assay. Preparation of substrates and precipitation buffers were made according to manufacturer's protocol. Assay was adapted to microplate as follows: incubation wells contained 70 µl of supernatant with 70 µl of substrate and were shaken at 40°C during 2h for cellulase and 4h for hemi-cellulase. Another plate (precipitation plate) was prefilled with 250 µl of precipitation solution before addition of 100 µl from incubation wells, with vigorous pipetting, followed by 10 min of static incubation. Then plates were centrifuged at 1000 *g* for 10 min. Finally absorbance was taken with 200 µl of the precipitation plate on a Bio-Rad Model 550 microplate reader at 590 nm. Calibration curve was made from remazol brilliant blue in sodium acetate buffer. The concentrations of released remazol brilliant blue were calculated from the resulting regression lines.

After the second determination of enzymatic activities, fungal materials were dried to evaluate the fungal weight. All activities are expressed in $nM.h^{-1}.mg^{-1}$ of dry matter.

-Statistical analyses and Correspondence Analysis (CoA)-

For each enzymatic assay, a Kruskall-Wallis statistical analysis was performed to compare the three different functional groups (soft, white and brown rot fungi). Only P-values inferior to 0.05 were considered.For CoA, not to give a quantitative advantage to certain test than another, all data were normalized. Using these normalized values we focused on the ones without wood to generate the correspondence analysis with ADE4 (Thioulouse et al., 1997). Analyses were computed with the values obtained from the ten assays, then with the values obtained from six assays previously identified with enough statistical significance.

Results

-Enzymatic activities-

The 26 fungal strains have been selected to cover a large taxonomic diversity within the Dikarya sub-kingdom (Fig. 1). We noticed that, in this selection, all soft rot fungi belonged to the Ascomycota clade whereas all selected brown rot fungi belonged to Basidiomycota. All fungal strains possessed enzymatic activities in relation to wood degradation and all assays gave detectable values for most of them, except ß-etherase (Table S2). For the detection of ß-etherase activity we synthesized Guaiacylglycerol-ß-O-4-methylumbelliferone (GOU) as previously described by Masai et al. (1989) and confirmed the efficiency of the substrate with the strain SYK-6 of *Sphingomonas paucimobilis* (Masai et al., 2003).

The addition of a mixture of wood (sawdust) in the medium did not induce higher enzymatic activities (the increasing values are highlighted in grey in Table S1). Only two enzymatic tests responded positively to wood addition, cellulase and manganese peroxidase, with respectively 18 and 14 strains on 26 that showed an increase of these activities, but not significantly. After, for each assay, data were pooled by functional groups: white, brown and soft rot fungi (Fig.2). As for the species level, when the analyses were made at the functional group level, addition of wood did not induce changes in the general enzymatic profiles (data not shown). For this reason, emphasis has been put on values obtained without wood only for further analysis (Fig. 2 and Fig. 3).

Over the ten assays, six enzymatic allowed significant distinction between the three functional groups: ß-glucosidase, cellobiohydrolase, xylosidase, glucuronidase, manganese peroxidase and laccase (Fig. 2). The four other tests cannot allow separating the different ecological groups, and three of them did not give activity, or not enough: ß-etherase, hemi-cellulase and lignin peroxidase. Four of the ten assays gave similar patterns (Fig. 2): ß-glucosidase, cellobiohydrolase, xylosidase and glucuronidase. For these four assays, brown rot gave the highest values followed by white rot and finally soft rot. Laccase and manganese peroxidase gave the highest values for white rot followed by soft rot and finally brown rot, while cellulase test gave the exact opposite pattern, brown rot fungi expressed the highest cellulase activity, followed by soft rot and finally white rot fungi. Correspondence analyses were generated with data from the ten (Fig 3A) or six (Fig 3B) extracellular enzymatic assays without wood. On both figures, two clusters can be distinguished, one composed of brown rot fungi only, and the other characterized by mixed white rot and soft rot fungi. The two clusters were very well separated

on the first axis (58,68%) with the six significant assays and brown rot fungi were strongly grouped. In this case, only the two white rot Russulales, *Stereum hirsitum* and *Heterobasidion annosum* were not clearly separated by this first axe. Interestingly, *Petriella setifera*, classified in the soft rot fungi, was included in the brown rot cluster.

Discussion

In this work, we studied 26 fungal species for their ability to produce extracellular enzymes involved in wood degradation. We also tested a new activity (ß-etherase) potentially involved in lignin degradation by fungi. The strains identity were confirmed by sequencing the ITS region. For nine of them, the genomes have been recently sequenced (Floudas et al., 2012). Fungal species were chosen for their ability to degrade wood by various enzymatic systems represented by the « rot-type » they belong to. The enzymatic assays were all performed in microplates, from culture supernatant without agitation to focus on extracellular enzymes only. A first series of assays was achieved after seven days of culture to determine basal enzyme production, then sawdust was added and culture was continued for two more days to see potential induction of these enzymatic activities by wood. Surprisingly, this addition did not induce enzyme production as expected, and no significant shift has been measured. Indeed, numerous transcriptomic studies reported up-regulation of genes corresponding to lignocellulolytic enzymes or P450 monooxygenase during the growth of fungi on various wood preparations (Sato et al., 2009, MacDonald et al., 2011). It is likely that the weak period of contact between fungi and sawdust is not rather long for the stimulation. In a recent review on *Phanerochaete* species showing this inducing effect the incubation time was include between 5 days and 12 weeks (MacDonald et al., 2012). Moreover, in controlled conditions, it is known that high levels of fungal enzymatic activities do not always correlate with the extent of initial wood weight or component losses (Machuca et al., 2001). However, it is also possible that in our conditions, a large proportion of fungal secretome precipitated with the sawdust, or that enzymes were adsorbed on this woody matrix. Interestingly, all strains produced extracellular activities linked to wood degradation in a constitutive way, except for ß-etherase. These results confirmed the good physiological state of the strains, their implication in wood decaying process and the sensitivity of assays. Nevertheless, the absence of activity for the putative extracellular fungal ß-etherase was disappointing because the arylglycerol ß-aryl ether linkages represent approximately 50% of intermolecular lignin linkages. Otsuka et al (2003) reported, for the first time, the detection of an extracellular fungal enzyme that catalyses the hydrolytic cleavage of this linkage. To our knowledge, no other publication has reported the measurement of secreted fungal ß-etherase activity. We were not able to obtain the fungal strain “2BW-1”, used by these authors, and isolated from Japanese soil. The 18S rDNA region sequence of this strain revealed a strong similarity with *Chaetomium elatum* and *Chaetomium globosum* (Otsuka et al., 2003). For this

reason, another Japanese strain of *Chaetomium globosum* (strain ATCC) was included in our fungal screening. However, while *C. globosum* expressed the strongest Lip and laccases activities among soft-rot fungi, no extracellular ß-etherase activity was measured in its culture medium. For these reasons, we propose that fungal ß-etherase is a rare and dispensable function in wood decay fungi. On the other hand, numerous authors have previously reported extracellular ß-etherase activity from different bacterial strains belonging to the Genus *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, or *Sphingobium* (Masai et al., 1989, Masai et al., 1993, Masai et al., 2003; Tanamura et al., 2011). In 1971, Greaves (1971) reported that bacteria and actinomycetes were probably the most common wood-inhabiting microorganisms, and consecutively they modify the wood quality and could be involved in its degradation. Since then, numerous authors showed the complementarities of bacteria and fungi, in the organic matter degradation (Gramss et al., 1999). Recently, Bugg et al. (2011) illustrated the role of bacteria in lignin degradation and in its bioconversion to aromatic chemicals. In natural conditions, prokaryotic ß-etherase activitiy could participate significantly, with decaying fungi, in the lignin degradation.

Among the nine other assays, the activities of lignin peroxydase and hemicellulase were relatively low and did not allow separating significantly the three different categories of decomposers: soft, white and brown fungi. On the same way, even if the cellulase activity was expressed in a more important extent by the brown rot fungi, the differences were not significant between the three groups. Cellulases are hydrolytic enzymes, which hydrolyse insoluble cellulose to produce soluble oligosaccharides and the cellulose degradation system is distributed across the entire fungal kingdom (Lynd et al., 2002). But interestingly within this cellulase system, two “functional markers” of the three fundamental enzyme activities involved in cellulose hydrolysis were differentially expressed between the three ecological groups: ß-glucosidase, for the cellobiases, and cellobiohydrolase. Homobasidiomycetes is one of the major class containing over 13,000 cellulolytic species (Hibbett et al., 2001). Indeed, in our study, the ß-glucosidase and cellobiohydrolase activities were significantly higher in the brown rot group, essentially composed by Agaricomycetes. These two activities together with two others (ß-xylosidase and ß-glucuronidase that catalyse breakdown of complex carbohydrates) were expressed differentially, and significantly, in the three fungal groups, with a high level within the brown-rot fungi. On the other hand, laccase and manganese peroxidase activites separated significantly the white rot fungi from soft rot and brown rot fungi. These activity patterns are correlated with the abundance of two oxidoreductase families, the class II peroxidases and the multicopper oxidases (Floudas et al., 2012). White-rot fungi are known to produce a family of

enzymes called lignin peroxidases, or ligninases, which have extensive degradative capacities. These fungi can degrade polyaromatic hydrocarbons (PAHs), chlorinated aromatic hydrocarbons (CAHs), polycyclic aromatics or pesticides (Steffen et al., 2003, Steffen et al., 2007).

This restrictive set of enzymatic activities (ß-glucosidase, cellobiohydrolase, ß-xylosidase, ß-glucuronidase, laccase and manganese peroxydase) could serve as tool for the selection of efficient fungi involved in organic soil contaminant remediation (Steffen et al., 2003), fungal strains producing cell wall degrading hydrolytic enzymes or novel strains with improved processing capabilities such as resistance to fermentation inhibitors during the steps of the conversion of biomass into ethanol (Sanderson 2011).

Independently of biotechnological applications, these six functional markers should allow studying functional diversity in wood during the different stages of decay (Lekounougou et al., 2008). Indeed, the number of available enzymatic assays is very important (Žifčáková et al., 2011, Baldrian, 2009, Caldwell, 2005), and new activities were also proposed (Otsuka et al., 2003). We showed in this study that a reduced set of functional markers is sufficient to study the functional diversity of the wood degrading fungal communities (Rajala et al., 2012) or those involved in the degradation of soil organic matter (Setala et al., 2004).

Interestingly, in this study, the three white rots Polyporales, *Ganoderma applanatum*, *Trametes hirsute* and *Trametes versicolor*, were grouped together within the correspondence analysis. However, our results revealed that the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, recently classed in this order (Hibbett et al., 2007), possessed a functional pattern very close to *Humicola grisea*, a white rot Ascomycota. On all data, we confirmed the absence of correlation between taxonomic distribution and ecological groups (white rot versus brown rot fungi) within Agaricomycetes, which emerged around the end of the Carboniferous period (Floudas et al., 2012). Another interesting result of this study concerns the ecological status of *Petriella setifera*, for which little reference is available. This ascomycete has been isolated from the sapwood of dead spruce trees, with other fungi such as *G. ipidophilum*, *Cerocorticium* cf. notabile or *Trichoderma* spp, the latter has been classified in the soft rot fungi (Jankowiak, 2005; Ważny et al., 1990). Nevertheless, the functional pattern of our strain was identical to those of the brown rot fungi and the Covariance analysis clustered *P. setifera* with the nine brown rot strains. Even if this strain (MG50) has been classified within soft rot fungi (Becker et al., 1976), we showed that its decaying activities seem very close to those of brown rot basidiomycetes, and, according to the EN 113 procedure (ECS 1989), a thorough and controlled study would be necessary to check the capacities of wood degradation of this atypical soft rot strain.

In conclusion, a collection of 26 fungal species distributed within three ecological groups (white, brown and soft rot fungi), have been functionally characterized using a set of fungal extracellular enzymes involved in wood degradation. Among ten potential functional markers, the combinatorial use of only six allowed very fine separation between the white and soft rot fungi from the brown rot fungi. This study also suggests that fungal secreted ß-etherase, which cleaves the ß-aryl ether linkage, is a rare and dispensable function in decay fungi. Finally, we propose that these six markers could be useful for studying fungal degradation activities in soil and woody debris, or for the selection of fungal strains with biotechnological interests.

Acknowledgements

Yann Mathieu was funded by a PhD CIFRE grant from FCBA. The research was supported by an ANR project (ANR-09-BLAN-0012) and the Genoscope French project “A Speed-ID”. We thank Jacqueline Tournut (ANSES) and Isabelle Lebayon (FCBA) who supplied some of the fungal strains used in this study.

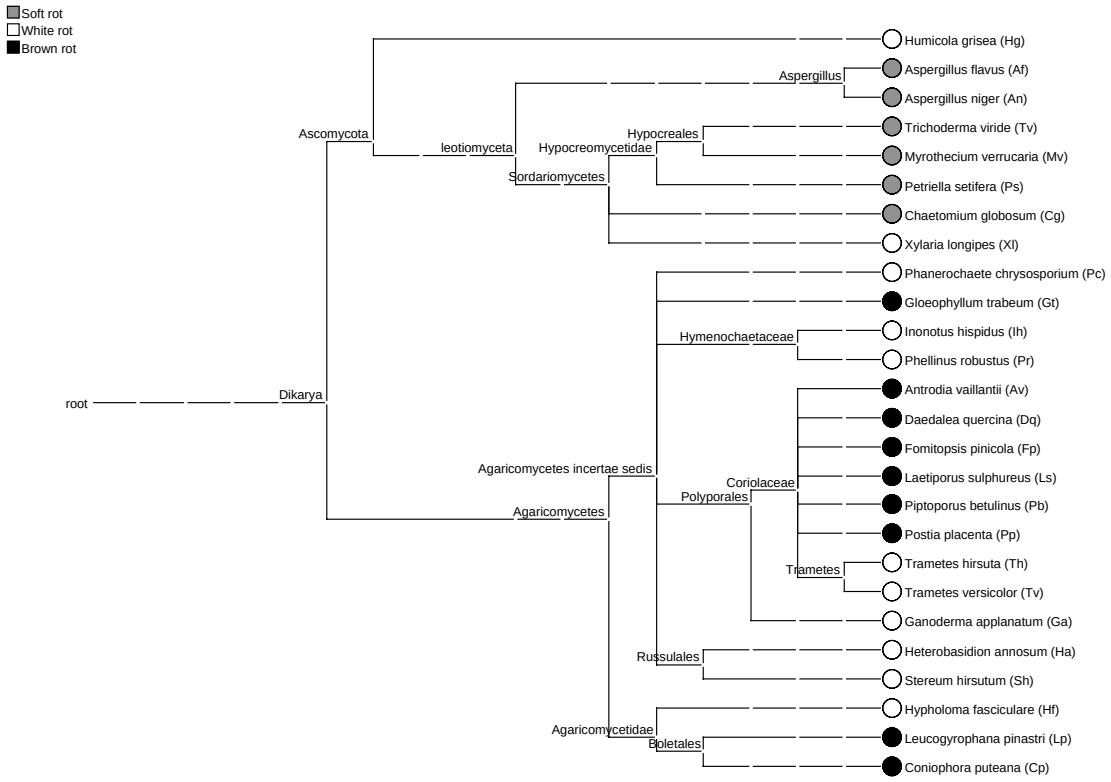


Figure 1: Taxonomic distribution of fungal strains used in this study.

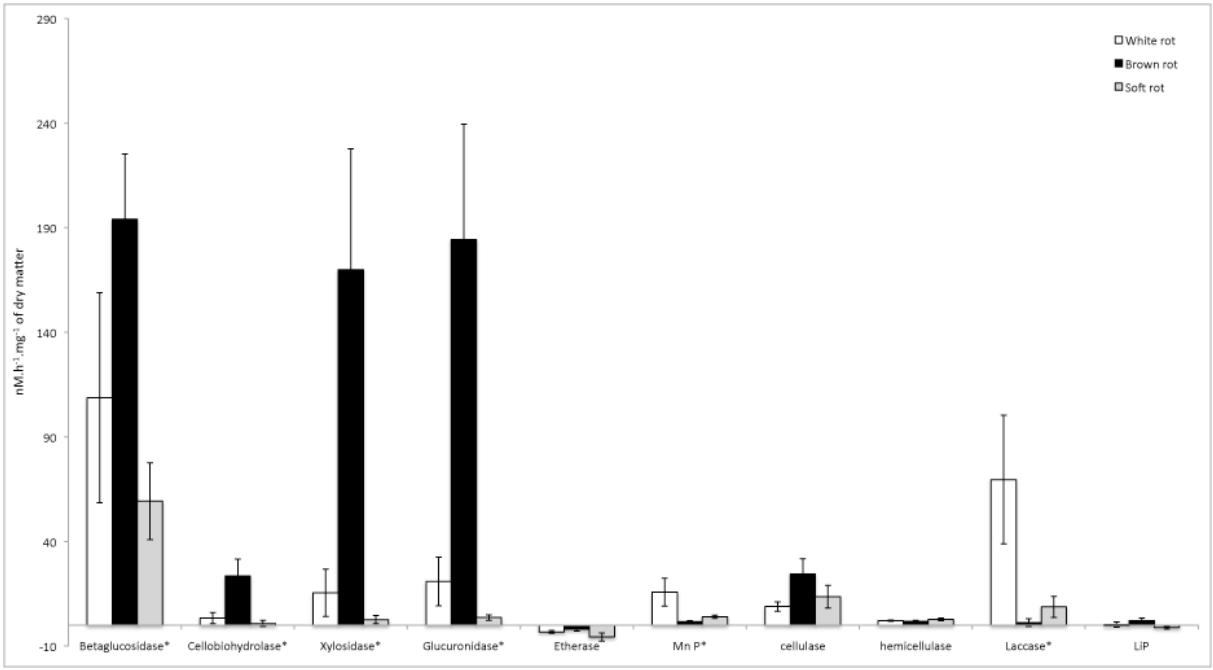


Figure 2: Contribution of the three ecological groups to the different tests in pure culture, without wood. * Tests showing significant difference between the three ecological groups; P-value < 0,05, by Kruskal-Wallis statistical test.

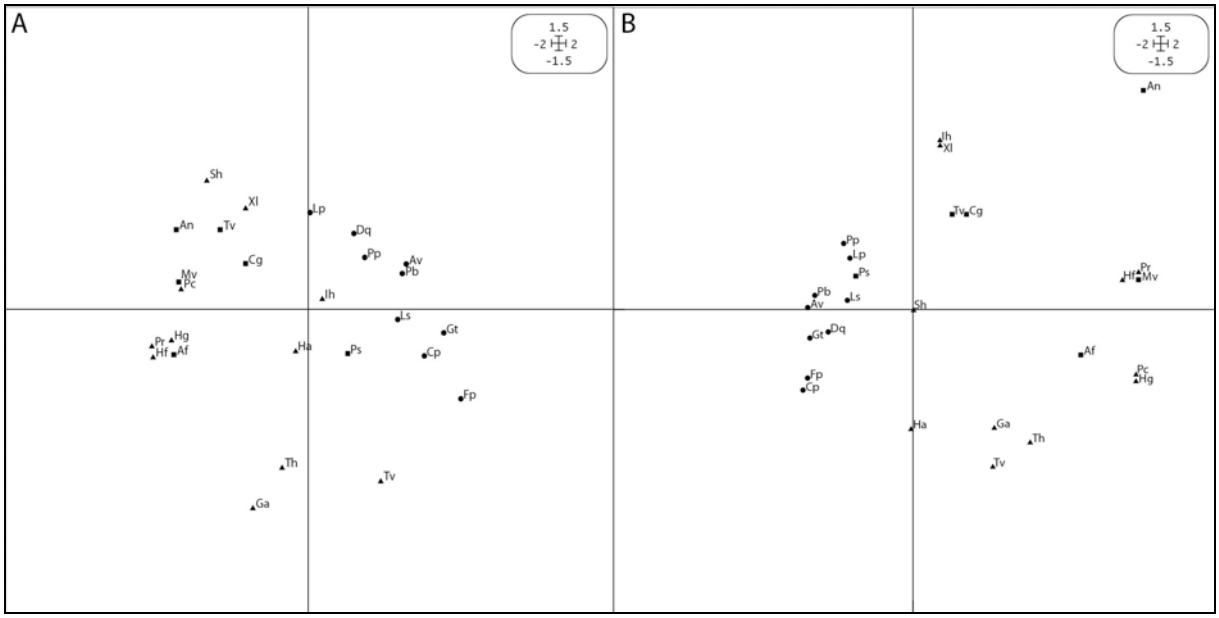


Figure 3: Correspondence analysis of the three ecological groups grown without wood. A) With ten enzymatic assays, B) With six statistically significant enzymatic assays. (▲) White rot fungi, (●) brown rot fungi, (■) soft rot fungi. Values were distributed with 56.68 % and 45.61 % along the axis I and with 20.15 % and 17.7 % along the axis II for A and B respectively. The correspondence of abbreviations (Fungal species) is detailed in Figure 1.

Table S1: Values obtained for assays with or without wood.

Fungal taxa	Rot-type	ß-Glucosidase		Cellobiohydrolase		Xylosidase		Glucuronidase		Etherase		Mn Peroxidase		Cellulase		Hemi-cellulase		Laccase		Lignin Peroxidase	
	Wood	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Ganoderma applanatum	white	114,2 ± 40,3	63,7 ± 18,4	1,7 ± 0,6	0,3 ± 1,1	15,7 ± 5,5	7,7 ± 2,1	130,4 ± 14	84,5 ± 5,8	N.D	N.D	9,4 ± 1,3	9,7 ± 0,2	N.D	2,9 ± 1,7	0,4 ± 0,2	2,2 ± 0,7	130,4 ± 34,9	11,1 ± 3,2	N.D	1,9 ± 0,5
Heterobasidion annosum	white	517,5 ± 39,2	256,2 ± 10,6	3,8 ± 1,6	2,1 ± 0,8	127,7 ± 0,6	93,4 ± 0,3	32,2 ± 2,8	15,4 ± 0,1	N.D	N.D	1,3 ± 0,4	3,2 ± 1,2	11,7 ± 1,4	36,7 ± 1,7	3,5 ± 0,6	N.D	285,3 ± 10,9	252,5 ± 87,1	N.D	1,5 ± 0,5
Humicola grisea	white	16,6 ± 0,6	15,6 ± 0,1	1,4 ± 1,5	1,4 ± 0,3	1 ± 1,3	0,5 ± 0,8	1,4 ± 0,6	0,7 ± 1	N.D	N.D	4,3 ± 0,1	4,8 ± 1,4	8,1 ± 0,6	27,4 ± 2,6	2,8 ± 0,6	N.D	23,6 ± 2,2	3,2 ± 1,1	N.D	0,8 ± 0,3
Hypholoma fasciculare	white	5,2 ± 2,	N.D	N.D	N.D	1 ± 1,4	N.D	0,3 ± 1	N.D	N.D	N.D	43,8 ± 6,9	37,4 ± 3,3	13,9 ± 1,8	33 ± 4,7	1,6 ± 0,7	1,4 ± 0,4	26,2 ± 3,7	28,8 ± 11,2	N.D	1,2 ± 0,4
Inonotus hispidus	white	332,4 ± 21,2	173,1 ± 0,8	27,8 ± 4,1	12,3 ± 0,2	10,6 ± 0,6	4,4 ± 0,1	2,3 ± 0,7	2,4 ± 1,3	N.D	1,3 ± 1,5	35,7 ± 17	31,5 ± 15,6	7,2 ± 1,3	9,3 ± 4,3	2,9 ± 0,5	2,8 ± 0,5	6,2 ± 1,3	0,2 ± 0,1	5,9 ± 1,5	0,9 ± 0,1
Phanerochaete chrysosporium	white	6,0 ± 3,6	3,7 ± 1,5	N.D	0,2 ± 0,4	2,1 ± 2,1	0,1 ± 0,5	2,2 ± 0,6	1,7 ± 0,9	N.D	N.D	2,2 ± 0,9	1,4 ± 0,3	9,3 ± 4,5	N.D	2,3 ± 1,1	N.D	13,1 ± 0,1	N.D	N.D	0,6 ± 0,1
Phellinus robustus	white	10,0 ± 0,2	9,8 ± 0,7	N.D	N.D	2,1 ± 1	N.D	1,6 ± 0,1	0,4 ± 1,2	N.D	N.D	64,8 ± 6	87,6 ± 2,5	16,8 ± 7,5	N.D	2,4 ± 0,6	N.D	29,3 ± 0,4	25,1 ± 9,4	N.D	0,5 ± 0,3
Stereum hirsutum	white	7,8 ± 4	5 ± 0,3	N.D	1 ± 0,4	2,3 ± 0,7	1,1 ± 0,6	4,6 ± 0,5	2,2 ± 1,2	N.D	N.D	N.D	1,4 ± 0,8	12,8 ± 4,1	N.D	1,9 ± 0,5	N.D	5,8 ± 1,5	0,4 ± 0,3	N.D	0,5 ± 0,2
Trametes hirsuta	white	36,7 ± 11	4,3 ± 1,8	N.D	N.D	4,1 ± 0,4	1,8 ± 0,6	38,4 ± 3,8	7,1 ± 1	N.D	N.D	4,7 ± 1,2	20,5 ± 2,4	10,1 ± 1,4	24,7 ± 9,4	0,9 ± 0,1	4,2 ± 1,8	236,8 ± 116,2	65,8 ± 42,4	7,7 ± 2,3	3,2 ± 1,6
Trametes versicolor	white	33,6 ± 13,4	51,9 ± 31,4	0,2 ± 0,3	N.D	2,7 ± 0,2	1,7 ± 0,1	6,4 ± 0,6	2 ± 2,1	0,9 ± 0,6	N.D	1,8 ± 0,9	9,2 ± 4,1	5,1 ± 3,1	6,3 ± 0,8	1 ± 0,1	N.D	13 ± 5,3	11,6 ± 9,9	6,2 ± 1,6	1,4 ± 0,9
Xylaria longipes	white	115,7 ± 18,3	79,2 ± 13,5	9,7 ± 1,2	4,5 ± 0,3	0,9 ± 0,2	N.D	9,6 ± 0,3	2,4 ± 0,8	N.D	4,7 ± 1,8	5,5 ± 0,5	3,1 ± 0,9	14,4 ± 3,9	N.D	3,4 ± 1,4	0,2 ± 0,5	N.D	N.D	N.D	1,1 ± 0,4
Antrodia vaillantii	brown	326,1 ± 21,9	211 ± 6,4	40,5 ± 5,1	36,5 ± 0,5	299,8 ± 8,8	269,9 ± 15,3	479,1 ± 51,5	482,8 ± 43,5	N.D	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,3	1,9 ± 0,2	20,4 ± 3,6	25,9 ± 0,3	1,8 ± 0,6	4,9 ± 0,5	N.D	N.D	0,9 ± 1,2	0,6 ± 0,4
Coniophora puteana	brown	166,9 ± 11,2	62,6 ± 2,9	N.D	N.D	271,6 ± 19,4	227,5 ± 22,5	65,5 ± 2,4	64,9 ± 0,2	N.D	0,9 ± 1,2	0,9 ± 0,5	7,9 ± 1,5	1 ± 1,7	1,5 ± 0,9	0,6 ± 0,1	3 ± 0,6	0,3 ± 2	N.D	4,1 ± 1,6	1,7 ± 1
Daedalea quercina	brown	146,4 ± 13,2	150,3 ± 7	10,9 ± 0,6	12,8 ± 0,9	546,4 ± 29,7	511,8 ± 65,2	258 ± 13	226 ± 16	N.D	N.D	3,9 ± 0,8	1,5 ± 0,5	52,9 ± 8,6	18,8 ± 1,2	2,7 ± 0,8	N.D	N.D	N.D	N.D	0,3 ± 0,3
Fomitopsis pinicola	brown	140,7 ± 16,1	85,5 ± 5,2	N.D	0,4 ± 1,5	36,1 ± 4,2	32,1 ± 4	29,9 ± 2,1	29,5 ± 3,5	N.D	N.D	1 ± 0,7	5,8 ± 0,9	5,2 ± 1,9	9,2 ± 0,9	0,4 ± 0,2	1,7 ± 0,5	N.D	N.D	6,4 ± 2,3	2,9 ± 1,5
Gloeophyllum trabeum	brown	221,2 ± 52,3	78,4 ± 3,1	5,2 ± 1,8	3,2 ± 1,8	110,6 ± 7,4	37 ± 2,5	191,3 ± 29,7	189,5 ± 17,5	0,1 ± 1,2	0,5 ± 1,8	1,3 ± 0,8	N.D	2,7 ± 0,8	1,8 ± 1,5	1,3 ± 0,3	3 ± 0,3	1,9 ± 1	8,5 ± 4,3	6,4 ± 2	6 ± 2,1
Laetiporus sulphureus	brown	78,6 ± 16,7	66,4 ± 16,9	19,7 ± 6,4	22 ± 4,2	42,8 ± 7,2	39,6 ± 1,9	37,2 ± 4,2	45,5 ± 2,9	N.D	N.D	1,3 ± 0,5	1,5 ± 1,9	4,2 ± 1,4	10,7 ± 3,4	2,5 ± 0,2	5,6 ± 1,5	14,4 ± 1,5	N.D	1,1 ± 0,4	0,7 ± 0,2
Leucogyrophana pinastri	brown	124,4 ± 38,6	96,1 ± 3,3	17,5 ± 2,1	22,4 ± 2,8	27,6 ± 0,5	15,2 ± 4,1	155,4 ± 23,9	103,6 ± 3,8	N.D	N.D	2,8 ± 0,1	3,1 ± 0,6	45,8 ± 6,6	19,3 ± 0,9	2,9 ± 0,9	1,5 ± 0,2	4,9 ± 1,9	N.D	N.D	0,6 ± 0,3
Piptoporus betulinus	brown	360,1 ± 43,9	296,7 ± 41,2	55,4 ± 7,9	45,1 ± 5,1	138,5 ± 23,8	119,3 ± 19,6	398,7 ± 38,2	394,9 ± 60,1	N.D	N.D	1,4 ± 0,1	6,7 ± 0,5	40,1 ± 14,9	55,1 ± 19,8	3,8 ± 0,2	3,4 ± 1	N.D	N.D	4,5 ± 2,4	2,7 ± 1,3
Postia placenta	brown	182,3 ± 30,4	147,7 ± 23,1	64,6 ± 5	60,5 ± 4,5	56 ± 8,6	43,7 ± 5,4	43,8 ± 7,1	45,7 ± 5,9	N.D	1,2 ± 2	2,3 ± 0,5	2,2 ± 1,1	47 ± 5,7	51,8 ± 16,3	0,8 ± 0,1	2,7 ± 1,2	N.D	N.D	1,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1
Aspergillus flavus	soft	35,3 ± 1,8	27,8 ± 2,6	N.D	1,1 ± 0,2	N.D	1,6 ± 0,9	2,1 ± 1,5	N.D	N.D	N.D	4,8 ± 1,9	1,4 ± 1	2,7 ± 0,7	55,6 ± 4,1	5,4 ± 0,2	0,6 ± 0,4	29,9 ± 10,3	5,9 ± 2	N.D	1 ± 0,7
Aspergillus niger	soft	30,6 ± 10,5	32,5 ± 4	N.D	0,5 ± 0,1	N.D	N.D	3,9 ± 0,1	1 ± 1,7	N.D	N.D	5,3 ± 1	3,4 ± 0,1	8,7 ± 0,9	30,9 ± 1,1	2,3 ± 0,9	2,1 ± 0,1	1 ± 0,5	1 ± 0,3	N.D	0,8 ± 0,1
Chaetomium globosum	soft	74,6 ± 6,6	3,4 ± 0,8	7,8 ± 0,4	0,2 ± 0,1	0,9 ± 1,8	N.D	4,1 ± 1	N.D	N.D	N.D	5,6 ± 1,9	6,8 ± 0,9	15,9 ± 0,8	25,2 ± 0,8	2 ± 0,4	N.D	15,6 ± 7	7,5 ± 3,1	N.D	0,9 ± 0,1
Myrothecium verrucaria	soft	28,3 ± 5,5	19,4 ± 3	N.D	0,3 ± 0,1	11,7 ± 0,8	25,6 ± 0,2	1,5 ± 0,4	N.D	N.D	1,2 ± 0,5	5,1 ± 0,3	3,6 ± 1,1	39,2 ± 2,4	N.D	2,3 ± 0,9	1,1 ± 0,4	9 ± 2,6	14,9 ± 5,4	N.D	1 ± 0,5
Petriella setifera	soft	42,5 ± 7,7	36,8 ± 5,9	1,4 ± 0,1	0,6 ± 0,9	N.D	0,1 ± 0,3	0,4 ± 0,9	1,7 ± 1,4	N.D	N.D	0,5 ± 0,2	3,2 ± 0,1	6,4 ± 0,9	6,9 ± 2,4	1,6 ± 0,6	N.D	N.D	N.D	1,2 ± 0,3	0,9 ± 0,3
Trichoderma viride	soft	144,2 ± 23,4	174,9 ± 34,9	1 ± 0,9	2,2 ± 0,3	4 ± 1,9	0,4 ± 0,1	9,8 ± 2,1	6,3 ± 1,3	N.D	N.D	2,6 ± 0,4	1,8 ± 1	8,7 ± 0,7	38,4 ± 2,5	2,9 ± 0,7	N.D	N.D	N.D	N.D	1,1 ± 0,5

References

Andersson M., Kjøller A. and Struwe S., (2004). Microbial enzyme activities in leaf litter, humus and mineral soil layers of European forests. **Soil Biology and Biochemistry**. (36): 1527-1537.

Archibald F. S., (1992). A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye azure B. **Appl Environ Microbiol**. (58): 3110-3116.

Baldrian P., (2008). Wood-inhabiting ligninolytic basidiomycetes in soils: Ecology and constraints for applicability in bioremediation. **Fungal Ecology**. (1): 4-12.

Baldrian P., (2009). Microbial enzyme-catalyzed processes in soils and their analysis. **Plant Soil Environ**. (9):370-378.

Becker G. and Lenz M., (1976). Einfluß von Moderfäulepilzen in Holz auf Fraßtätigkeit, Galeriebau und Entwicklung einiger Termiten-Arten. **Zeitschrift für Angewandte Entomologie**. (80): 232-261.

Bugg T. D., Ahmad M., Hardiman E. M. and Rahmanpour R., (2011). Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. **Nat Prod Rep**. (28): 1883-1896.

Caldwell B. A., (2005). Enzyme activities as a component of soil biodiversity: A review. **Pedobiologia**. (49): 637-644.

Cantarel B. L., Coutinho P. M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V. and Henrissat B., (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic Acids Res**. (37): D233-238.

Criquet S., Farnet A. M., Tagger S. and Le Petit J., (2000). Annual variations of phenoloxidase activities in an evergreen oak litter: influence of certain biotic and abiotic factors. **Soil Biology and Biochemistry**. (32): 1505-1513.

Eastwood D. C., Floudas D., Binder M., Majcherczyk A., Schneider P., Aerts A., Asiegbu F. O., Baker S. E., Barry K., Bendiksby M., Blumentritt M., Coutinho P. M., Cullen D., de Vries R. P., Gathman A., Goodell B., Henrissat B., Ihrmark K., Kauserud H., Kohler A., LaButti K., Lapidus A., Lavin J. L., Lee Y. H., Lindquist E., Lilly W., Lucas S., Morin E., Murat C., Oguiza J. A., Park J., Pisabarro A. G., Riley R., Rosling A., Salamov A., Schmidt O., Schmutz J., Skrede I., Stenlid J., Wiebenga A., Xie X., Kues U., Hibbett D. S., Hoffmeister D., Hogberg N., Martin F., Grigoriev I. V. and Watkinson S. C., (2011). The plant cell wall-decomposing machinery underlies the functional diversity of forest fungi. **Science**. (333): 762-765.

ECS, European Committee fo Standardization (1989) Wood preservatives; Determination of the toxic values against wood destroying basidiomycetes cultured in agar medium. EN 113. Brussel, 14.

Floudas D., Binder M., Riley R., Barry K., Blanchette R. A., Henrissat B., Martinez A. T., Otillar R., Spatafora J. W., Yadav J. S., Aerts A., Benoit I., Boyd A., Carlson A., Copeland A., Coutinho P. M., de Vries R. P., Ferreira P., Findley K., Foster B., Gaskell J., Glotzer D., Gorecki P., Heitman J., Hesse C., Hori C., Igarashi K., Jurgens J. A., Kallen N., Kersten P., Kohler A., Kues U., Kumar T. K., Kuo A.,

LaButti K., Larrondo L. F., Lindquist E., Ling A., Lombard V., Lucas S., Lundell T., Martin R., McLaughlin D. J., Morgenstern I., Morin E., Murat C., Nagy L. G., Nolan M., Ohm R. A., Patyshakuliyeva A., Rokas A., Ruiz-Duenas F. J., Sabat G., Salamov A., Samejima M., Schmutz J., Slot J. C., St John F., Stenlid J., Sun H., Sun S., Syed K., Tsang A., Wiebenga A., Young D., Pisabarro A., Eastwood D. C., Martin F., Cullen D., Grigoriev I. V. and Hibbett D. S., (2012). The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. **Science**. (336): 1715-1719.

Frankenberger Jr W. T. and Johanson J. B., (1982). Effect of pH on enzyme stability in soils. **Soil Biology and Biochemistry**. (14): 433-437.

Gardes M. and Bruns T. D., (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes--application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Mol Ecol**. (2): 113-118.

Gilbertson R. L., (1980). Wood-rotting fungi of north america. **Mycologia**. (72): 1-49.

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

Gramss G., Ziegenhagen D. and Sorge S., (1999). Degradation of Soil Humic Extract by Wood- and Soil-Associated Fungi, Bacteria, and Commercial Enzymes. **Microb Ecol**. (37): 140-151.

Greaves H., (1971). The bacterial factor in wood decay. **Wood Science and Technology**. (5): 6-16.

Hibbett D. S., Binder M., Bischoff J. F., Blackwell M., Cannon P. F., Eriksson O. E., Huhndorf S., James T., Kirk P. M., Lucking R., Thorsten Lumbsch H., Lutzoni F., Matheny P. B., McLaughlin D. J., Powell M. J., Redhead S., Schoch C. L., Spatafora J. W., Stalpers J. A., Vilgalys R., Aime M. C., Aptroot A., Bauer R., Begerow D., Benny G. L., Castlebury L. A., Crous P. W., Dai Y. C., Gams W., Geiser D. M., Griffith G. W., Gueidan C., Hawksworth D. L., Hestmark G., Hosaka K., Humber R. A., Hyde K. D., Ironside J. E., Koljalg U., Kurtzman C. P., Larsson K. H., Lichtwardt R., Longcore J., Miadlikowska J., Miller A., Moncalvo J. M., Mozley-Standridge S., Oberwinkler F., Parmasto E., Reeb V., Rogers J. D., Roux C., Ryvarden L., Sampaio J. P., Schussler A., Sugiyama J., Thorn R. G., Tibell L., Untereiner W. A., Walker C., Wang Z., Weir A., Weiss M., White M. M., Winka K., Yao Y. J. and Zhang N., (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycol Res**. (111): 509-547.

Hibbett D. S. and Donoghue M. J., (2001). Analysis of character correlations among wood decay mechanisms, mating systems, and substrate ranges in homobasidiomycetes. **Syst Biol**. (50): 215-242.

Hoppe H. G., (1983). Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. **Marine Ecology Progress Series**. (11): 299-308.

Hyde S. M. and Wood P. M., (1997). A Mechanism for Production of Hydroxyl Radicals by the Brown-Rot Fungus Coniophora Puteana: Fe(III) Reduction by Cellobiose Dehydrogenase and Fe(II) Oxidation at a Distance from the Hyphae. **Microbiology**. (143): 259-266.

Jankowiak R., (2005). Fungi associated with *Ips typographus* on *Picea abies* in southern Poland and their succession into the phloem and sapwood of beetle-infested trees and logs. **Forest Pathology**. (35): 37-55.

Koenigs J. W., (1974). Production of hydrogen peroxide by wood-rotting fungi in wood and its correlation with weight loss, depolymerization, and pH changes. **Archives of Microbiology**. (99): 129-145.

Lekounougou S., Mounguengui S., DumarVßay S., Rose C., Courty P. E., Garbaye J., Gérardin P., Jacquot J. P. and Gelhaye E., (2008). Initial stages of *Fagus sylvatica* wood colonization by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*: Enzymatic characterization. **International Biodeterioration & Biodegradation**. (61): 287-293.

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

Lynd L. R., Weimer P. J., van Zyl W. H. and Pretorius I. S., (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiol Mol Biol Rev**. (66): 506-577, table of contents.

Machuca A. and 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.

MacDonald J., Doering M., Canam T., Gong Y., Guttman D.S., Campbell M.M., and Master E R. (2011). Transcriptomic responses of the softwood-degrading white rot fungus *Phanerochaete carnosa* during growth on coniferous and deciduous wood. **Applied ans Environmental Microbiology.** (77):3211-3218.

MacDonald J., Suzuki H., and Master E R. (2012). Expression and regulation of genes encoding lignocellulose-degrading activity in the genus *Phanerochaete*. **Appl. Microbiol. Biotehnol.** (94):339-351.

Mai C., Kues U. and Militz H., (2004). Biotechnology in the wood industry. **Appl Microbiol Biotechnol**. (63): 477-494.

Masai E., Ichimura A., Sato Y., Miyauchi K., Katayama Y. and Fukuda M., (2003). Roles of the enantioselective glutathione S-transferases in cleavage of beta-aryl ether. **J Bacteriol**. (185): 1768-1775.

Masai E., Katayama Y., Nishikawa S., Yamasaki M., Morohoshi N. and Haraguchi T., (1989). Detection and localization of a new enzyme catalyzing the beta-aryl ether cleavage in the soil bacterium (*Pseudomonas paucimobilis* SYK-6). **FEBS Lett**. (249): 348-352.

Masai E., Kubota S., Katayama Y., Kawai S., Yamasaki M. and Morohoshi N., (1993). Characterization of the C alpha-dehydrogenase gene involved in the cleavage of beta-aryl ether by *Pseudomonas paucimobilis*. **Biosci Biotechnol Biochem**. (57): 1655-1659.

McGill B. J., Enquist B. J., Weiher E. and Westoby M., (2006). Rebuilding community ecology from functional traits. **Trends in Ecology & Evolution**. (21): 178-185.

Otsuka Y., Sonoki T., Ikeda S., Kajita S., Nakamura M. and Katayama Y., (2003). Detection and characterization of a novel extracellular fungal enzyme that catalyzes the specific and hydrolytic cleavage of lignin guaiacylglycerol beta-aryl ether linkages. **Eur J Biochem**. (270): 2353-2362.

Peláez F., Martínez M. J. and Martínez A. T., (1995). Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. **Mycological Research**. (99): 37-42.

Rajala T., Peltoniemi M., Pennanen T. and Makipaa R., (2012). Fungal community dynamics in relation to substrate quality of decaying Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) logs in boreal forests. **FEMS Microbiol Ecol**. (81): 494-505.

Romani A. M., Fischer H., Mille-Lindblom C. and Tranvik L. J., (2006). Interactions of bacteria and fungi on decomposing litter: differential extracellular enzyme activities. **Ecology**. (87): 2559-2569.

Sanderson K. (2011). A chewy problem. **Nature.** 474: S12-S14.

Sato S.F.., Iyer P., and Tien M. (2009). The first genome-level transcriptome of the wood-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown on red oak. **Curr. Genetic. (**55):273-286.

Sayers E. W., Barrett T., Benson D. A., Bolton E., Bryant S. H., Canese K., Chetvernin V., Church D. M., DiCuccio M., Federhen S., Feolo M., Fingerman I. M., Geer L. Y., Helmberg W., Kapustin Y., Landsman D., Lipman D. J., Lu Z., Madden T. L., Madej T., Maglott D. R., Marchler-Bauer A., Miller V., Mizrachi I., Ostell J., Panchenko A., Phan L., Pruitt K. D., Schuler G. D., Sequeira E., Sherry S. T., Shumway M., Sirotkin K., Slotta D., Souvorov A., Starchenko G., Tatusova T. A., Wagner L., Wang Y., Wilbur W. J., Yaschenko E. and Ye J., (2011). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Res**. (39): D38-51.

Setala H. and McLean M. A., (2004). Decomposition rate of organic substrates in relation to the species diversity of soil saprophytic fungi. **Oecologia**. (139): 98-107.

Sinsabaugh R. L., (2010). Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. **Soil Biology and Biochemistry**. (42): 391-404.

Steffen K. T., Hatakka A. and Hofrichter M., (2003). Degradation of benzo[a]pyrene by the litter-decomposing basidiomycete *Stropharia coronilla*: role of manganese peroxidase. **Appl Environ Microbiol**. (69): 3957-3964.

Steffen K. T., Schubert S., Tuomela M., Hatakka A. and Hofrichter M., (2007). Enhancement of bioconversion of high-molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated non-sterile soil by litter-decomposing fungi. **Biodegradation**. (18): 359-369.

Tanamura K., Abe T., Kamimura N., Kasai D., Hishiyama S., Otsuka Y., Nakamura M., Kajita S., Katayama Y., Fukuda M. and Masai E., (2011). Characterization of the third glutathione S-transferase gene involved in enantioselective cleavage of the beta-aryl ether by *Sphingobium* sp. strain SYK-6. **Biosci Biotechnol Biochem**. (75): 2404-2407.

Thioulouse J., Chessel D., Dole´dec S. and Olivier J.-M., (1997). ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. **Statistics and Computing**. (7): 75-83.

Tien M. and Kirk T. K., (1988). "Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*". In: Willis A. Wood S. T. K. **Methods in Enzymology.** Academic Press: 238-249.

Žifčáková L., Dobiášová P., Kolářová Z., Koukol O. and Baldrian P., (2011). Enzyme activities of fungi associated with *Picea abies* needles. **Fungal Ecology**. (4): 427-436.

Chapitre 3 : Analyse de la diversité biochimique et fonctionnelle des GTE

1) Caractérisation de la GSTFuA1 de *P. chrysosporium* :

Dans le chapitre précédent nous avons démontré que l'activité ß-ethérase sécrétée était dispensable durant la dégradation de la lignine par les champignons décomposeurs du bois. Cependant, il existe une famille d'enzymes bactérienne capable de réaliser ce clivage spécifique : les LIG (Masai et al., 2003). Ces enzymes appartiennent à la superfamille des GST et utilisent le GSH afin de cliver spécifiquement la liaison ß-aryl éther. Dans une analyse bio-informatique portant sur les premiers génomes fongiques disponibles, il a été démontré que les GST sont une classe étendue au sein des champignons saprophytes. De plus cette étude a également révélé une identité de séquence entre les enzymes bactériennes LIG et une famille de GST fongiques nommée GTE (Glutathione Transferase Etherase-like) (Morel et al., 2009). La suite de cette analyse repose sur l'étude des propriétés fonctionnelles et biochimiques de ces différentes classes. Jusqu'à présent, seules les classes Ure2p et GTO ont fait l'objet de travaux visant à comprendre leur mécanisme catalytique ainsi que leur rôle physiologique (Meux et al., 2011; Thuillier et al., 2011). La suite de mon travail a donc été d'étudier plus en détail les caractéristiques biochimiques et structurales de la classe des GTE au sein du champignon de pourriture blanche : *P. chrysosporium.*

J'ai étudié en détail l'enzyme présentant la plus grande homologie de séquence avec la famille de LIG bactériennes, la GST5118. Au moyen de tests enzymatiques caractéristiques des GST, j'ai démontré la versatilité de cette enzyme en comparant les activités enzymatiques de la protéine native à celles de deux protéines mutantes. Par ailleurs, en collaboration avec le laboratoire CRM2, nous avons mis en évidence des caractéristiques structurales spécifiques comme un mode de dimérisation atypique, l'existence d'un ß-hairpin supplémentaire et la présence d'un site de liaison du sulfate localisé à proximité du site de fixation du GSH. L'utilisation de sondes fluorescentes nous a alors permis de décrire les propriétés de ce site de fixation et de démontrer, qu'en plus d'être responsable de la reconnaissance du GSH, celui-ci est également à l'origine d'une propriété ligandine envers des composés issus de la dégradation du bois. Ces données structurales et biochimiques nous ont permis de proposer une nouvelle classe fonctionnelle au sein des GST que nous avons nommée GSTFuA pour Fungal specific class A.

Les résultats obtenus dans cette partie sont présentés sous forme d'un article sous presse dans *Journal of Biological Chemistry* (doi : 10.1074/jbc.M112.402776) intitulé : « Characterization of a *Phanerochaete chrysosporium* glutathione transferase reveals a novel structural and functional class with ligandin properties».

Article 2 : Characterization of a Phanerochaete chrysosporium glutathione transferase reveals a novel structural and functional class with ligandin properties.

balt3/zbc-bc/zbc-bc/zbc04812/zbc2983-12z ZSUBMIT 12 xppws S=3 5/10/12 11:33 | 4/Color Figure(s) F1,2 | ARTNO: M112.402776

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 287, NO. ??, pp. 1–xxx, ???? ??, 2012
© 2012 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Published in the U.S.A.

Characterization of a *Phanerochaete chrysosporium* Glutathione Transferase Reveals a Novel Structural and Functional Class with Ligandin Properties*[S]

Received for publication, July 20, 2012, and in revised form, September 7, 2012 Published, JBC Papers in Press, September 24, 2012, DOI 10.1074/jbc.M112.402776

Yann Mathieu[‡§¶1], **Pascalita Prosper**[‖**1], **Marc Buée**[§], **Stéphane Dumarçay**[‡‡], **Frédérique Favier**[‖**], **Eric Gelhaye**[‡§], **Philippe Gérardin**[‡‡], **Luc Harvengt**[¶], **Jean-Pierre Jacquot**[‡§], **Tiphaine Lamant**[‡§], **Edgar Meux**[‡§], **Sandrine Mathiot**[‖**], **Claude Didierjean**[‖**2], **and Mélanie Morel**[‡§3]

From the [‡]*Université de Lorraine, Interactions Arbre-Microorganismes, UMR 1136, L'Institut Fédératif de Recherche 110 EFABA, Vandoeuvre-les-Nancy F-54506, France,* [§]*Institut National de la Recherche Agronomique, Interactions Arbre-Microorganismes, UMR 1136, Vandoeuvre-les-Nancy F-54506, France,* [‖]*Université de Lorraine, CRM2, UMR 7036, Vandoeuvre-les-Nancy F-54506, France, **CNRS, CRM2, UMR 7036, Vandoeuvre-les-Nancy F-54506, France,* [‡‡]*Université de Lorraine, Laboratoire d'Etudes et de Recherche sur le Matériau Bois, EA 1093, Vandoeuvre-les-Nancy F-54506, France, and the* [¶]*Laboratoire de Biotechnologie, Pole Biotechnologie et Sylviculture Avancée, Institut Technologique Forêt Cellulose Bois-construction Ameublement, Campus Foret-Bois de Pierroton, 33610 Cestas, France*

Background: GSTs are detoxification enzymes poorly characterized in fungi.
Results: *GSTFuA1* possesses a unique three-dimensional structure and binds wood degradation compounds at or near the glutathione binding pocket.
Conclusion: This GST is a new fungal isoform that we name *GSTFuA1*.
Significance: GSTs with binding properties could be of great interest in various biotechnological applications.

Glutathione *S*-transferases (GSTs) form a superfamily of multifunctional proteins with essential roles in cellular detoxification processes. A new fungal specific class of GST has been highlighted by genomic approaches. The biochemical and structural characterization of one isoform of this class in *Phanerochaete chrysosporium* revealed original properties. The three-dimensional structure showed a new dimerization mode and specific features by comparison with the canonical GST structure. An additional β-hairpin motif in the N-terminal domain prevents the formation of the regular GST dimer and acts as a lid, which closes upon glutathione binding. Moreover, this isoform is the first described GST that contains all secondary structural elements, including helix α4′ in the C-terminal domain, of the presumed common ancestor of cytosolic GSTs (*i.e.* glutaredoxin 2). A sulfate binding site has been identified close to the glutathione binding site and allows the binding of 8-anilino-1-naphtalene sulfonic acid. Competition experiments between 8-anilino-1-naphtalene sulfonic acid, which has fluorescent properties, and various molecules showed that this GST binds glutathionylated and sulfated compounds but also wood extractive molecules, such as vanillin, chloronitrobenzoic acid, hydroxyacetophenone, catechins, and aldehydes, in the glutathione pocket. This enzyme could thus function as a classical GST through the addition of glutathione mainly to phenethyl isothiocyanate, but alternatively and in a competitive way, it could also act as a ligandin of wood extractive compounds. These new structural and functional properties lead us to propose that this GST belongs to a new class that we name GSTFuA, for fungal specific GST class A.

Glutathione *S*-transferases (GSTs) are a superfamily of proteins widespread in animals, plants, fungi, and bacteria. From a functional point of view, GSTs usually catalyze glutathione (GSH) transfer onto hydrophobic molecules (glutathionylation activity) or GSH removal from specific substrates (deglutathionylation) (1). These enzymes have broad substrate acceptance, although each GST possesses its own specific catalytic profile. Most GSTs are dimeric proteins. Each monomer is composed of a conserved thioredoxin domain containing the GSH binding pocket (G site) and a more variable α-helical domain (H site) containing the binding site for the GSH acceptor substrate (2). Most studies have focused on the GSH-dependent catalytic activities involved both in detoxification processes and endogenous metabolism. However, some GSTs have also been identified as proteins that selectively bind organic anions such as tetrapyrroles in mammals and plants (3–5). This "ligandin" property has been defined as the capacity of the protein to bind nonsubstrate ligands (3). In plants, it could be involved in the intracellular transport of hydrophobic compounds, such as pigments, and in temporary storage of phytohormones (6, 7). Fungal GSTs have been less studied than their plant or animal

* This work was supported by CIFRE and Agence Nationale de la Recherche (ANR) Research Grant ANR-09-BLAN-0012; the Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche, et de la Technologie; the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA); and CNRS.
[S] This article contains supplemental Table 1 and Figs. S1–S11.
The atomic coordinates and structure factors (codes 4F03 and 4G19) have been deposited in the Protein Data Bank (http://wwpdb.org/).
The nucleotide sequence(s) reported in this paper has been submitted to the GenBank™/EBI Data Bank with accession number(s) JQ974949
[1] Both authors contributed equally to this work.
[2] To whom correspondence may be addressed: Université de Lorraine, UMR 7036 CRM2 Institut Jean Barriol, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France. Tel.: 33-3-83-68-48-79; E-mail: Claude.Didierjean@crm2.uhp-nancy.fr.
[3] To whom correspondence may be addressed: Université de Lorraine, UMR 1136 "Interactions Arbres/Micro-organismes," Faculté des Sciences et Technologies BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France. Tel.: 33-3-83-68-42-28; E-mail: mmorel@scbiol.uhp-nancy.fr.

balt3/zbc-bc/zbc-bc/zbc04812/zbc2983-12z ZSUBMIT 12 xppws S=3 5/10/12 11:33 4/Color Figure(s) F1,2 ARTNO: M112.402776

counterparts. Nevertheless, the recent burst of fungal genome sequencing programs has highlighted evolutionary specificities of GSTs in these organisms (8–10). Currently, at least seven different classes of cytosolic GSTs have been defined in fungi: MAK16, EFBγ, Ure2p, Omega, *S*-glutathionyl-(chloro)hydroquinone reductase, GTT, and etherase-like. Although some isoforms from the Ure2p, Omega, *S*-glutathionyl-(chloro)hydroquinone reductase, and GTT have been characterized in yeast (11–13), *Aspergillus* sp. (14, 15), and *Phanerochaete chrysosporium* (9, 16), the etherase-like class has never been studied to date. Etherase-like GSTs are fungal specific, although they show weak homology with LigE, a bacterial protein responsible for the cleavage of β-aryl ether linkages of lignin in *Sphingobium* sp. SYK-6 (8, 17). The etherase-like class is expanded in wood decaying fungi, because, for instance, 11 etherase-like encoding genes are present in the genome of *Postia placenta*. Although less expanded, they are, however, present in pathogenic fungi as *Aspergillus* sp. or *Fusarium* sp. for example (8).

P. chrysosporium is a white rot fungus able to completely mineralize lignocellulose by degrading recalcitrant compounds. During the wood decaying process, phenolic acids and phenolic aldehydes are released. These compounds are problematic in biofuel production, but at the same time, they can have beneficial properties for human health. As an example, vanillin possesses antimicrobial activity, antioxidant properties, antimutagenic effects, and chemoprotective activity in inflammation and cancer (for a review, see Ref. 18). Syringaldehyde is also a naturally occurring aromatic compound, which exhibits both a detrimental action on cellulose hydrolysis and fermentation processes and a good antioxidant activity, being 2- and 10-fold more effective than quercetin and trolox, respectively (19).

In this study, we describe for the first time the biochemical and structural characterization of a GST belonging to the previously named "etherase-like" class in *P. chrysosporium* and demonstrate the ligandin property of this enzyme toward compounds derived from lignin degradation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—Hydroxyethyl disulfide was from Pierce. α-*O*-Methylumbelliferyl-β-hydroxylpropiovanillone was a gift from Dr. Masai (Nagaoka University of Technology, Japan). *S*-(phenylacetophenone)-glutathione and 2-methyl-*S*-glutathionylnaphtoquinone were synthesized as described previously (16). *para*-Nitrophenyl sulfate potassium salt was from Acros Organics. 5-Chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA)[4] was from Invitrogen. All other reagents were from Sigma-Aldrich.

Cloning of GST5118, GST5118-S22A, and GST5118-S22C—The enzyme studied here is referred to as GST5118 based on its protein identification number in the Joint Genome Institute database. The open reading frame sequence encoding *P. chrysosporium* GST5118 was amplified from a *P. chrysosporium* cDNA library using GST5118 forward and reverse primers (5′-CCCCCATGGCTCAGCCCATCGTGTT-3′ and 5′-CCCGGATCCCTATACATCAACCTGCT3′, respectively) and cloned into the NcoI and BamHI restriction sites (underlined in the primers) of pET-3d (Novagen). The amplified sequence encodes a protein in which an alanine has been inserted after the initiator methionine to improve protein production. Two mutants of the putative catalytic Ser-22 into Ala or Cys residues were also generated using two complementary mutagenic primers (supplemental Table 1).

Expression and Purification of the Recombinant Proteins—For protein production, the *Escherichia coli* BL21(DE3) strain, containing the pSBET plasmid, was co-transformed with the different recombinant plasmids (20). Cultures were progressively amplified up to 2 liters in LB medium supplemented with ampicillin and kanamycin at 37 °C. Protein expression was induced at exponential phase by adding 100 μM isopropyl β-D-thiogalactopyranoside for 4 h at 37 °C. The cultures were then centrifuged for 15 min at 4400 × *g*. The pellets were resuspended in 30 ml of TE NaCl (30 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl) buffer. Cell lysis was performed on ice by sonication (3 × 1 min with intervals of 1 min), and the soluble and insoluble fractions were separated by centrifugation for 30 min at 27,000 × *g* at 4 °C. All subsequent steps were performed in the cold. The soluble part was then fractionated with ammonium sulfate in two steps, and the protein fraction precipitating between 40 and 80% of saturation contained the recombinant protein, as estimated by 15% SDS-PAGE. The protein was purified by size exclusion chromatography after loading on an ACA44 (5 × 75-cm) column equilibrated in TE NaCl buffer. The fractions containing the protein were pooled, dialyzed by ultrafiltration to remove NaCl, and loaded onto a DEAE-cellulose column (Sigma) in TE (30 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) buffer. The proteins were eluted using a 0–0.4 M NaCl gradient. Finally, the fractions of interest were pooled, dialyzed, concentrated by ultrafiltration under nitrogen pressure (YM10 membrane; Amicon), and stored in TE buffer at −20 °C. Purity was checked by SDS-PAGE. Protein concentrations were determined spectrophotometrically using a molar extinction coefficient at 280 nm of 68,870 M^{-1} cm^{-1}.

For the production of the selenomethionine-substituted GST5118, a methionine auxotroph strain, BL21(DE3)Met^-, was cotransformed with pET-GST5118 and pSBET. Cultures were done as described previously (21), and the labeled protein was purified following a procedure identical to that described for unlabeled GST5118.

Activity Measurements—The activity measurements of GST5118, GST5118-S22C, and GST5118-S22A proteins in thiol transferase activity with a hydroxyethyl disulfide assay or for reduction of dihydroascorbate were performed as described by Couturier *et al.* (22). The GSH transferase activity was assessed with phenethyl isothiocyanate (phenethyl-ITC) prepared in 2% (v/v) acetonitrile, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), and 4-nitrophenyl butyrate (PNP-butyrate) prepared in DMSO. For these three substrates, the reactions were monitored at 274, 340, and 412 nm, respectively, following the increase in absorbance arising from the formation of the *S*-glutathionylated adduct. The reactions with CDNB and PNP-butyrate were performed in 100 mM phosphate buffer, pH 7.5, in the presence of GSH (5 mM), whereas the reaction with phen-

[4] The abbreviations used are: CMFDA, 5-chloromethylfluorescein diacetate; ANS, 8-anilino-1-naphtalene sulfonic acid; CDNB, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene; ITC, isothiocyanate; PNP-butyrate, paranitrophenyl butyrate.

balt3/zbc-bc/zbc-bc/zbc04812/zbc2983-12z ZSUBMIT 12 xppws S=3 5/10/12 11:33 4/Color Figure(s) F1,2 ARTNO: M112.402776

ethyl-ITC was performed at pH 6.5 with an identical GSH concentration. Esterase activity was measured in microplates using CMFDA as substrate, which releases fluorescence upon activation by esterases (23). Experiments were performed in 50 mM phosphate buffer, pH 8.0, in a total volume of 200 μl. The reactions were started by the addition of the purified enzyme, and fluorescence was measured every minute for 1 h with excitation at 485 nm and emission at 535 nm on a VICTOR^{TM} *X*5 plate reader (PerkinElmer Life Sciences). Catalytic parameters were calculated using the GraphPad® software from steady state experiments performed using 0–25 μM CMFDA and 5 mM GSH.

Peroxidase activities were monitored as follows. 1 mM peroxide (hydrogen peroxide, *tert*-butyl hydroperoxide, and cumene hydroperoxide) in 30 mM Tris-HCl, pH 8.0, was incubated in the presence of 2 mM GSH, 200 μM NADPH, 0.5 IU of glutathione reductase. The activity was followed by monitoring the decrease in absorbance arising from NADPH oxidation in this coupled enzyme assay system, showing the formation of oxidized glutathione (GSSG). The reactions were started by the addition of the purified enzyme and monitored with a Cary 50 UV-visible spectrophotometer (VARIAN). To determine the catalytic properties of the enzyme, steady state assays were performed using variable substrate concentrations (from 10 μM to 10 mM), and the catalytic parameters were calculated using the GraphPad® software. Etherase activity was assessed according to Masai *et al.* (17). Sulfatase activity was performed with *para*-nitrophenyl sulfate potassium salt as described by Kim *et al.* (24).

Mass Spectrometry Analysis—GST5118 wild type and mutants were analyzed by Q-TOF MS as described by Koh *et al.* (25). When oxidation or reduction was required, proteins were treated at 25 °C for 60 min, whatever the reductant (dithiothreitol (DTT)) or the oxidant (GSSG) used. Excess of oxidant/reductant was removed using a Sephadex® G25 (GE Healthcare) gel filtration column.

8-Anilino-1-naphtalene Sulfonic Acid (ANS) Binding and Ligand Screening—All binding and competition experiments were performed in TE buffer, pH 8.0. ANS binding onto GST5118 and GST5118-S22C (DTT-treated or not) was investigated by monitoring fluorescence upon the addition of 50 μM ANS to 3 μM protein using a Cary Eclipse (VARIAN) fluorescence spectrophotometer. The excitation wavelength was set at 385 nm, and the emission spectra were recorded from 400 to 700 nm. Additional tryptophan-based fluorescence experiments were performed with GST5118 and GST5118-S22C in the presence or absence of 50 μM ANS. After excitation at 290 nm, emission spectra were recorded from 305 to 560 nm. The ANS binding site was investigated in the same conditions with 1 mM GSH, 5 mM phenethyl-ITC, or 50 μM CMFDA.

The correlation between ANS concentration and fluorescence yield was obtained by incubating 100 μM GST5118 with 1 μM ANS, giving the maximal value for 1 μM ANS bound onto the protein. Fluorescence from samples containing ANS alone was subtracted as a background. GST5118 was then incubated at a concentration of 3 μM with increasing concentrations of ANS ranging from 0 to 1 mM. To determine the dissociation constant of ANS, the following equation (Equation 1) was applied.

$$y = B_{max} \times [\text{Free ANS}]/(K_d + [\text{Free ANS}]) \quad \text{(Eq. 1)}$$

where y represents the specific binding (*i.e.* the concentration of ANS bound/protein) and B_{max} is the number of maximum specific binding sites.

Competition experiments were performed in a total volume of 250 μl containing 3 μM enzyme, 50 μM ANS, and various putative ligands (from 1 μM to 10 mM). Fluorescence emission from protein-free samples containing ANS and potential ligand were subtracted as background. A decrease in fluorescence, indicating competition between ligand and ANS, was measured after 10 min of incubation with excitation at 355 nm and emission at 460 nm on a VICTOR^{TM} *X*5 plate reader (PerkinElmer Life Sciences). IC_{50} values were obtained by fitting data to Equation 2,

$$Y = Bottom + (Top - Bottom)/(1 + 10^{(\text{Log[Ligand]} - \text{Log IC}_{50})}) \quad \text{(Eq. 2)}$$

where Y represents the fluorescence signal observed after background subtraction, *Top* is the fluorescence signal of ANS bound onto GST5118 without any ligand, and *Bottom* is the fluorescence signal of ANS at the highest ligand concentration.

Inhibition Kinetics—Competition tests between ANS and phenethyl-ITC or CMFDA were performed by measuring GSH transferase and esterase activities. Activity with phenethyl-ITC was monitored in a total volume of 500 μl containing 50 μM GSH, 50 μM ANS, and 10 μM to 10 mM phenethyl-ITC. Inhibition tests of esterase activity with CMFDA by ANS or vanillin were performed in a total volume of 200 μl with or without 50 μM GSH, 50 μM ANS, or 300 μM vanillin and CMFDA (0 μM to 25 μM). Similar tests were performed with 25 μM CMFDA, 300 μM vanillin, and 0–5 mM GSH. The reactions were started by the addition of the purified enzyme, and the catalytic parameters were calculated using the GraphPad® software.

Crystallization—Two different samples were crystallized, the selenomethionine derivative protein (apoGST5118) and the native protein with bound GSH (holoGST5118). The crystallization experiments were set up using the microbatch under oil (paraffin) method at 277 K. Selenomethionine-apoGST5118 crystals appeared after 4–5 days from droplets containing 2 μl of protein solution (15–20 mg/ml protein in TE buffer) and 2 μl of precipitating solution (30% PEG 8000, 200 mM sodium acetate, and 100 mM sodium cacodylate, pH 6.5). Crystals of GST5118 in complex with GSH (holoGST5118) were obtained in co-crystallization experiments. The best crystals grew after 2 months in droplets containing a mixture of 485 μM protein solution (14 mg/ml) and 6 mM GSH in TE buffer and precipitating solution (30% PEG 8000, 200 mM sodium acetate, and 100 mM HEPES, pH 7.0). Prior to data collection, the crystals were transferred to a cryosolution containing 20% glycerol with mother liquor and flash-cooled to 100 K.

Data Collection and Processing, Structure Solutions, and Refinements—ApoGST5118 diffraction data were collected on the synchrotron beamline PX1 at SOLEIL (France) at 0.97918 Å, and holoGST5118 x-ray data were measured on the beam-

balt3/zbc-bc/zbc-bc/zbc04812/zbc2983-12z ZSUBMIT 12 xppws S=3 5/10/12 11:33 **4/Color Figure(s) F1,2** ARTNO: M112.402776

TABLE 1
Statistics of x-ray diffraction data collection and model refinement

	ApoGST5118	HoloGST5118
Data collection		
Beam line	PX1, SOLEIL	BM30A/FIP, ESRF
Space group	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
No. of dimers in the asymmetric unit	2	2
Cell dimensions *a*, *b*, *c* (Å)	86.05 88.46 157.16	86.57 88.15 156.49
Resolution (Å)	44.23–1.80 (1.89–1.80)[a]	48.48–2.00 (2.11–2.00)
R_{merge}	0.08 (0.619)	0.069 (0.375)
Mean $I/\sigma(I)$	22.2 (3.6)	20.0 (4.7)
Completeness (%)	99.7 (98.1)	100.0 (99.9)
n observations	1,443,573 (112,670)	555,508 (71,179)
Redundancy	12.8 (7.2)	6.8 (6.0)
Wilson *B* factor (Å^2)	20.1	21.8
Phasing method	**SAD**[b]	
Refinement		
Resolution (Å)	42.54–1.80 (1.84–1.80)	44.90–2.00 (2.02–2.00)
n reflections	111,495 (7,219)	81,509 (2,780)
Cut-off	$F > 0\sigma(F)$	$F > 0\sigma(F)$
R_{all} (%)[c]	19.3	17.8
R_{free} (%)[d]	22.7 (30.1)	22.1 (32.5)
Average *B*-factor (Å^2)		
Protein atoms	25.1	24.6
Ligand atoms	28.1	30.6
Solvent atoms	29.7	31.2
Ramachandran statistics (%)		
Residues in preferred regions	98.5	98.6
Residues in allowed regions	1.1	1.0
Outlier residues	0.4	0.4
Root mean square deviations		
Bond length (Å)	0.007	0.007
Bond angle (degrees)	1.025	1.034

[a] Values in parentheses are for highest resolution shell.
[b] Single-wavelength anomalous dispersion.
[c] R_{all} was determined from all of the reflections (working set + test set), whereas R_{free} corresponds to a subset of reflections (test set).

line BM30A/FIP at the European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, France) at 0.97854 Å. The data sets were processed with XDS (26) and scaled with SCALA (27) from the CCP4 package (28). The molecular replacement method failed to solve the protein structure, probably because the best templates share less than 30% sequence identity with GST5118. The apoGST5118 structure was solved by the single-wavelength anomalous dispersion method using Phenix AutoSol (29). The eight expected selenium atoms were found using SOLVE (30), and resulting single-wavelength anomalous dispersion phases had a figure of merit of 0.38. A nearly complete backbone trace was obtained automatically with RESOLVE (30). ApoGST5118 and holoGST5118 models were refined using PHENIX (29) and manually corrected using COOT (31). The validations of GST5118 crystal structures were automatically performed with MOLPROBITY (32) from PHENIX (29). Final model statistics are shown in Table 1.

ApoGST5118 and holoGST5118 crystals belonged to the space group $P2_12_12_1$, and the asymmetric unit consisted of four polypeptide chains. Non-denaturant liquid chromatography and crystal packing analysis using PISA (33) showed that both proteins are homodimeric. The asymmetric unit content corresponds to two dimers where the two protomers are related to each other by a noncrystallographic 2-fold symmetry axis. The electron density maps of holoGST5118 revealed unambiguously the presence of one GSH molecule per monomer. In the apo structure, an electron density peak was found in the active site, identified as a sulfate ion arising most probably from the ammonium fractionation step used during purification. In the holo structure, the corresponding electron density peak was clearly weaker and was interpreted as an acetate ion from the crystallization solution (supplemental Fig. S1). The quality of the final electron density maps is shown in supplemental Fig. S2.

Structural comparisons were done using the DALI structural alignment server (34) and the program Strap (35). Figures of molecular models were prepared with PyMOL. The root mean square deviations between protein structures were calculated with PyMOL or DALI. Secondary structure predictions were carried out with the server Jpred3 (36). The multiple-sequence alignment figure was prepared using Espript (37).

RESULTS

GST5118 X-ray Structures—Two structures of GST5118 (apo and holo with bound GSH) were solved by using the single-wavelength anomalous diffraction data collected from crystals of the selenomethionylated protein. Each corresponded to the same local packing with two homodimers arranged similarly in the asymmetric units. In each structure, the four monomers adopted quite similar structures. Mean root mean square deviations of the six possible superpositions are 0.34 and 0.27 Å for apo and holo structures, respectively. Root mean square deviations increased by at least 0.2 Å when apo and holo monomers were compared. This increase is mainly contributed by the displacement of β-hairpin $\beta2'\beta2''$ during the apo-holo transition (see below).

The GST5118 monomer adopts the GST canonical fold, which consists of an N-terminal thioredoxin-like motif ($\beta1\alpha1\beta2\alpha2\beta3\beta4\alpha3$) and a C-terminal domain of at least four helices ($\alpha4\alpha5\alpha6\alpha7$). The two most conserved residues in GST

balt3/zbc-bc/zbc-bc/zbc04812/zbc2983-12z ZSUBMIT 12 xppws S=3 5/10/12 11:33 **4/Color Figure(s) F1,2** ARTNO: M112.402776

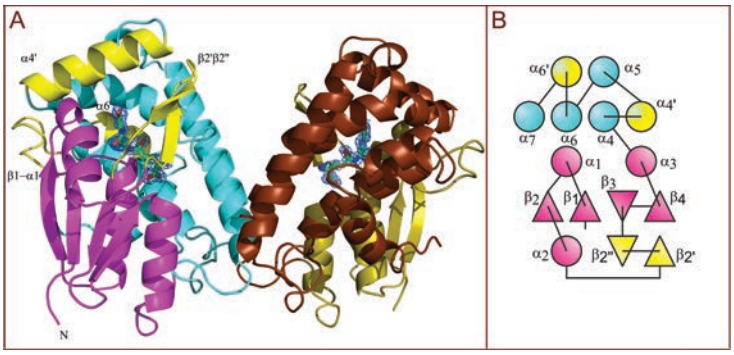


FIGURE 1. **Unique dimeric organization of GST5118.** *A*, view of the original dimer of GST5118. The additional secondary structures, highlighted in *yellow* in the *left* monomer, include an elongation of the β1-α1 loop, a β-hairpin motif in the α2-β3 loop, and the α-helices α4′ and α6′. In the *left* monomer, the N- and C-terminal domains are *colored* in *magenta* and *cyan*, respectively; in the *right* monomer they are *colored* in *olive* and *chocolate*, respectively. Both monomers have the ability to bind one glutathione molecule, depicted as *green sticks*, with corresponding $2F_o - F_c$ electron density (contour level 1.2 σ). *B*, topology diagrams of GST5118 (*circles*, helices; *triangles*, strands). The regular secondary structures of GSTs are *colored cyan* and *magenta*, whereas original elements are *colored yellow*.

are present in GST5118: *cis*-Pro-74 in the N-terminal domain, which is assumed to maintain the enzyme in a catalytically competent structure (38), and Asp-205, which is important for the C-terminal domain cohesion through its participation in the N-capping box (39). Nevertheless, the GST5118 structure contains unique features in both N- and C-terminal domains (Fig. 1). The first one is an elongation of about 8 residues of the loop β1-α1 (11–22) when compared with almost all GSTs. Only GST-like chloride intracellular channel proteins and the recently characterized GST from *Agrobacterium tumefaciens* (40) exhibit this property. In both GST5118 and *A. tumefaciens* GST structures, this long β1-α1 loop closes one part of the electrophilic substrate pocket (H site). In addition, a β-hairpin motif (β2′β2″) between α2 and β3 is observed for the first time in a GST fold. This motif hinders the formation of the regular GST dimer and partially covers the GSH binding site (G site). The C-terminal domain includes two extra helices: α4′, which follows α4 in an antiparallel way, and α6′ located between α6 and α7. This second supplementary helix is a characteristic of plant Phi GSTs (41). As for helix α4′, to the best of our knowledge, it has been observed only in GRX2 (glutaredoxin 2) (Protein Data Bank entries 3ir4 and 1g7o (42)). This protein is assumed to be the common ancestor of GSTs (43). Furthermore, α4′ lies in a position similar to the C-terminal helix of the human Alpha and Theta GSTs (supplemental Fig. S3). It has been proposed that a secondary structure in this position covers the H site and reduces its accessibility (44, 45).

GST5118 exhibits a new dimerization mode with an accentuated open V-shape where both subunits are related by a *C2* symmetry. In the canonical GST assembly, the α4 and α5 helices of one monomer pack against the N-terminal domain of its partner. In GST5118, the additional β-hairpin prevents this proximity. Helix α4 of one subunit packs in the groove between helices α4 and α5 of the other protomer (Fig. 1 and supplemental Fig. S4). Interestingly, this new oligomeric structure conserves a large cleft in the center of the dimer facing both of the active sites. The size of the buried interface (1850 Å^2) is significant and comparable with that observed in the "open" classical GST dimers like in human Omega GST (46) or in *Drosophila* Sigma GST (47). There are five hydrogen bonds and a hydrophobic lock-and-key motif that hold the two protomers together. The key residue of the lock-and-key motif is Phe-113 from helix α4. It fits in the pocket of the other subunit formed by Pro-107 from loop α3-α4; Gln-114 and Phe-117 from helix α4; Leu-195, Met-196, and Thr-203 from the α5-α6 loop; and Ser-205 from helix α6 (supplemental Fig. S5). Interestingly, this motif is present in Alpha, Mu, and Pi GSTs (48), where the lock is also located between helices α4 and α5. However, in the latter cases, the key is located in loop α2-β3, which is replaced by the protruding β-hairpin in GST5118.

In the catalytic center of the holo structure, the GSH molecule fits in the canonical G site, where the anchoring motifs for the γ-glutamyl and cysteinyl moieties are conserved in GSTs from this class. The imidazole group of His-70, from the β-hairpin motif, interacts via a water molecule with the carbonyl group of the γ-glutamyl moiety and with the amide group of the glycyl moiety (Fig. 2). Its carboxylate group is stabilized by the side chains of Tyr-148 and Arg-153 from α4′. The thiol sulfur of GSH forms a hydrogen bond with the hydroxyl group of the putative catalytic Ser-22, which is located at the N-terminal end of α1 in the thioredoxin domain. This Ser-22 occupies the same position as the catalytic residue of the Cys/Ser-GSTs (supplemental Fig. S3). The two residues Trp-21 and Pro-23, which surround the above-mentioned catalytic serine and take part in the H site, are invariant in GSTs from this class (supplemental Fig. S6). Trp-21 is a very well conserved residue in thioredoxins that is involved in enzyme substrate recognition (49), and Pro-23 is a well conserved residue in the active site motif in the class I glutaredoxins (50).

Upon GSH binding, significant conformational changes occur in the GST5118 structure. In the G site, the β-hairpin motif comes closer to the glycyl moiety, allowing its interaction with the side chain of His-70, which adopts a new rotamer (from m-70 to t60). The side chain conformation of Asp-87 also changes to stabilize the N-terminal end of GSH (from t70 to t0). In the H site, Trp-122 and Phe-127 from α4 undergo confor-

balt3/zbc-bc/zbc-bc/zbc04812/zbc2983-12z ZSUBMIT 12 xppws S=3 5/10/12 11:33 **4/Color Figure(s) F1,2** ARTNO: M112.402776

mational changes that could improve the electrophilic substrate accessibility (Fig. 2).

In the apoGST5118 form, a heavy residual peak of electron density was found in the vicinity of the putative catalytic Ser-22. It was assigned to a sulfate ion, which is stabilized by the side chains of Tyr-46 (α2) and Arg-153 (α4′). In a similar position, a sulfate binding site was reported in the crystal structures of human Theta GST (45), human Zeta GST (51), and yeast elongation factor 1Bγ (52). In order to stabilize the sulfate anion, the role of Arg-153 (α4′) of GST5118 is played by Arg-239 of human Theta GST located in the C-terminal helix (supplemental Fig. S3). It is important to stress that both residues are located roughly in the same spatial position although not in the same secondary structure. A catalytic role was attributed to the anion binding site in human GST T2-2, which displayed a sulfatase activity toward aralkylsulfates (45).

GST5118 Activities—Glutathionylation activity of GST5118 has been tested using CDNB, phenethyl-ITC, 4-nitrophenyl butyrate (PNP-butyrate), and CMFDA as substrates (Table 2). CMFDA is a molecule releasing fluorescence upon activation by esterases (23). GST5118 is active at transferring GSH onto phenethyl-ITC and PNP-butyrate but not CDNB. Surprisingly, GST5118 also exhibits two types of esterase activity on CMFDA, one with and another one without GSH (Table 2). Still, in the absence of GSH, the activity remains weak, with a catalytic efficiency 12-fold lower than in the presence of GSH. By contrast, no thiol transferase activity could be detected with hydroxyethyl disulfide, and the enzyme was also inactive in the reduction of dehydroascorbate. In addition, no peroxidase activity could be detected with either hydrogen peroxide, *tert*-butyl hydroperoxide, or cumene hydroperoxide. Etherase activity was also tested using the synthetic substrate α-*O*-methylumbelliferyl-β-hydroxylpropiovanillone. This compound is an analog of lignin fragments containing an ether linkage that can be cleaved by Lig proteins (17). Using LigF from *Sphingobium* sp. SYK-6 as control (53), we showed that GST5118 does not possess etherase activity with α-*O*-methylumbelliferyl-β-hydroxylpropiovanillone. GST5118 does not display sulfatase activity using *para*-nitrophenyl sulfate potassium, although a sulfate binding site has been identified in the structure.

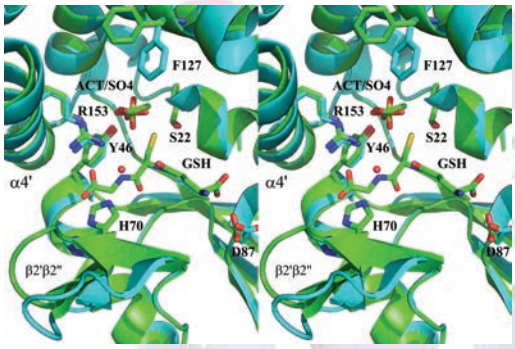


FIGURE 2. **Stereo view of the active site of GST5118.** The apo and holo forms are shown *superimposed* in order to highlight the conformational changes upon GSH binding. The anion binding site of GST5118 contains a sulfate ion in the apo form and an acetate ion in the holo form. The carbon atoms of the GSH-liganded and unliganded forms are *colored cyan* and *green*, respectively. Other atoms are *colored* according to their types. For clarity, only selected residues of the active site are shown and labeled.

Based on sequence alignments and structural data, we postulated that Ser-22 (GST5118 numbering) could be the catalytic residue responsible for GST5118 activity. Two directed mutations have been performed replacing Ser-22 by an alanine (GST5118-S22A) or a cysteine (GST5118-S22C). Both proteins lost GSH transferase activity using phenethyl-ITC. Surprisingly, GST5118-S22A gained activity with CDNB, hydroxyethyl disulfide, and cumene hydroperoxide (Table 2). On the other hand, GST5118-S22C was inactive with all substrates used in this study (data not shown).

ANS Binding Site—ANS is an environment-sensitive fluorescent dye, the fluorescence quantum yield of which increases upon binding to hydrophobic sites of proteins (54). ANS binding onto GST5118 was accompanied by the appearance of a characteristic fluorescence emission spectrum with a maximum at 475 nm, the excitation wavelength being fixed at 385 nm (Fig. 3*A*). The fluorescence signal, resulting from the interaction between the protein and ANS, was established rapidly in less than 30 s and increased with the molar ratio of ANS to GST5118, revealing a saturation curve. For concentrations

TABLE 2

Kinetic parameters of GST5118 and GST5118-S22A in enzymatic assays

The apparent K_m values for all compounds were determined using a concentration range of 0.1–10 mM in the presence of 2 mM GSH for GST5118 and 5 mM for GST5118-S22A. The K_m value for GSH was determined with 600 μM Phenethyl-ITC for GST5118 and 1 mM PNP-butyrate for GST5118-S22A and a concentration range of 0.01–10 mM GSH. The apparent K_m and k_{cat} values were calculated by nonlinear regression using the Michaelis-Menten equation ($r^2 > 0.99$). Data are represented as mean ± S.D. (n ± 3). ND, not detected. The detection limit was estimated at 0.5 mIU. GOUαO, α-*O*-methylumbelliferyl-β-hydroxyl-propiovanillone.

Substrate	K_m		k_{cat}		k_{cat}/K_m	
	GST5118	GST5118-S22A	GST5118	GST5118-S22A	GST5118	GST5118-S22A
	μM		min^{-1}		min^{-1} μM^{-}	
CDNB	ND	653.8 ± 49.4	ND	1765.0 ± 115.6	ND	2.69 ± 0.02
HED	ND	178.6 ± 7.8	ND	57.3 ± 6.8	ND	0.32 ± 0.02
DHA	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Phenethyl-ITC	119.0 ± 14.4	ND	510.9 ± 16.0	ND	4.3 ± 0.3	ND
H_2O_2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tertbutyl-OOH	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cu-OOH	ND	3767.0 ± 437.0	ND	62.6 ± 1.5	ND	0.011 ± 0.002
GOUαO	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PNP-butyrate	774.3 ± 88.3	190.7 ± 24.1	165.0 ± 5.6	17.6 ± 0.5	0.21 ± 0.01	0.092 ± 0.005
CMFDA without GSH	3.6 ± 0.6	1.1 ± 0.1	0.0060 ± 0.0002	0.27 ± 0.01	0.0017 ± 0.0002	0.24 ± 0.01
CMFDA with GSH	8.0 ± 0.8	1.5 ± 0.1	0.17 ± 0.04	1.20 ± 0.06	0.021 ± 0.002	0.80 ± 0.02
GSH	216.4 ± 34.9	615.4 ± 44.2	662.0 ± 14.2	13.8 ± 0.6	3.1 ± 0.4	0.022 ± 0.002

balt3/zbc-bc/zbc-bc/zbc04812/zbc2983-12z ZSUBMIT 12 xppws S=3 5/10/12 11:33 | 4/Color Figure(s) F1,2 | ARTNO: M112.402776

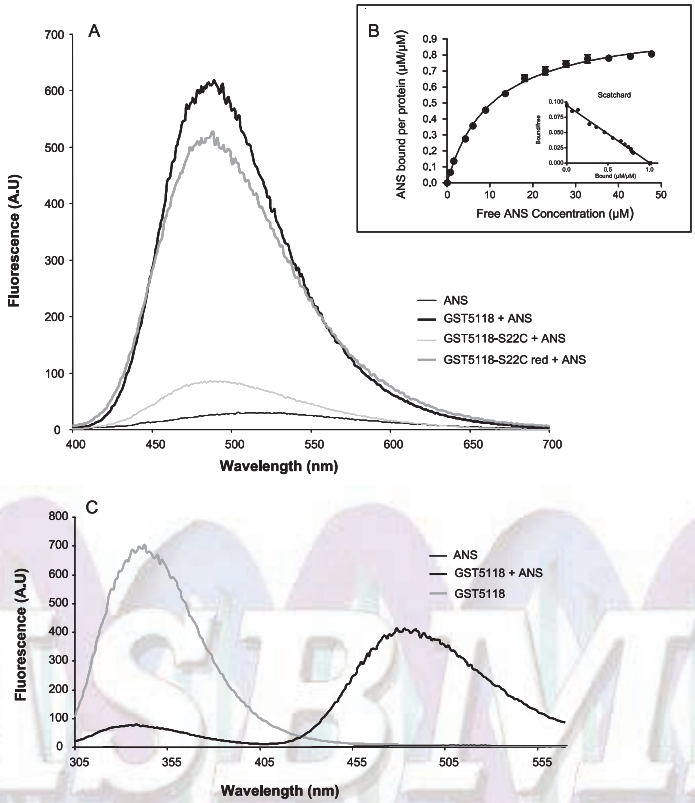


FIGURE 3. **ANS binding onto GST5118.** *A*, comparison of the fluorescence spectra (excitation at 385 nm) of 50 μM ANS bound onto GST5118 and GST5118-S22C DTT-treated (reduced) or not. Emission spectrum of 50 μM ANS alone is reported. *B*, binding saturation of GST5118 with ANS and Scatchard plot. *C*, tryptophan-based fluorescence (excitation at 290 nm, emission at 340 nm) of GST5118 alone and upon the addition of ANS. The emission spectrum of 50 μM ANS alone is reported. Data are represented as mean $\pm$ S.D. ($n \pm 3$). *A.U.*, absorbance units.

higher than 50 μM ANS, a loss of signal was observed as previously shown for BSA or MurA interaction with ANS (54). A dissociation constant of 10.65 $\pm$ 0.5 μM was obtained by plotting the concentration of ANS bound onto GST5118 against the concentration of free ANS. Data were fitted to Equation 1. The number of ANS binding sites, determined as described under "Experimental Procedures," was 1.008 $\pm$ 0.015, suggesting the binding of only one ANS molecule per monomer (Fig. 3*B*).

In additional experiments, tryptophan-based fluorescence of GST5118 was measured using 290 and 340 nm as excitation and emission wavelengths, respectively, in the presence or absence of ANS (Fig. 3*C*). Fluorescence resonance energy transfer (FRET), revealed by the appearance of a signal at 475 nm, was observed between Trp and ANS, confirming the binding of ANS onto the protein, the energy transfer being highly dependent on the distance between the donor and acceptor molecules (Fig. 3*C*). This result is in accordance with the presence of four Trp residues in the vicinity of the Ser-22 (Trp-21, Trp-26, Trp-122, and Trp-215).

Similar experiments have been performed using the mutated protein GST5118-S22C. Interestingly, the GST5118-S22C mutant is able to bind ANS only after reduction with DTT (Fig. 3*A*). Besides giving information about the ANS binding site in GST5118, these data demonstrate the robustness of the method. Mass spectrometry experiments performed on GST5118-S22C showed that it covalently binds a GSH adduct. Indeed, purified GST5118-S22C exhibited a molecular mass of 29,033 Da, whereas the previously DTT-treated protein exhibited the expected molecular mass calculated from the primary sequence of 28,728 Da. Additionally, after treatment with GSSG, *S*-(phenylacetophenone)-glutathione, and 2-methyl-*S*-glutathionyl-naphtoquinone, the mass of the reduced protein increased by 305 Da (29,033 Da), which corresponds to a GSH adduct. By contrast, no GSH adduct was detected on the wild type protein, suggesting that the mutated protein is able to bind GSH covalently at the newly added cysteinyl residue, this addition preventing ANS binding onto the protein. ANS binding onto GST5118 was investigated in the presence of various GSH concentrations (up to 10 mM), demonstrating that GSH inhibits

balt3/zbc-bc/zbc-bc/zbc04812/zbc2983-12z ZSUBMIT 12 xppws S=3 5/10/12 11:33 **4/Color Figure(s) F1,2** ARTNO: M112.402776

TABLE 3

Competition experiments between ANS and various compounds

Values given are IC_{50} fluorescence inhibition obtained by fitting data to Equation 2. Menadione-SG, 2-methyl-*S*-glutathionyl-naphtoquinone.

	GST5118
K_d ANS	10.6 ± 0.5 μM
No. of fixation sites at 50 μM ANS	1.008 ± 0.015
Glutathione	261.5 ± 39.8 μM
Beech compounds	
Coniferaldehyde	61.3 ± 1.2 μM
Vanillin	216.6 ± 8.5 μM
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone	–
4-Chloro-3-nitrobenzoic acid	1.5 ± 0.1 mM
4′-Hydroxyacetophenone	2.3 ± 0.4 mM
Gallic acid	
Vanillic acid	
Epicatechin	1.7 ± 0.1 mM
Syringaldehyde	79.4 ± 1.6 μM
Catechin hydrate	584.3 ± 98.7 μM
3-Hydroxy-4-methoxycinnamic acid, predominantly *trans*	
Glutathionylated compounds	
2-Bromo-4′-phenylacetophenone	
Phenylacetophenone-SG	99.7 ± 46.5 μM
Menadione	
Menadione-SG	83.7 ± 38.4 μM
Sulfated compounds	
1,2-Naphtoquinone-4-sulfonic acid	334.5 ± 56.8 μM
p-Xylene-2-sulfonic acid hydrate	928.7 ± 258.8 μM
p-Xylene	
4-Aminotoluene-3-sulfonic acid	1.6 ± 0.5 mM
4-Methylumbelliferyl-sulfate	223.6 ± 25.3 μM
4-Methylumbelliferone	

ANS binding. The obtained data were fitted to Equation 2, leading to an IC_{50} value of 261.5 ± 39.8 μM (supplemental Fig. S7). This measured value is in accordance with the K_m for GSH (216.4 ± 34.89 μM) found in the enzymatic assays. Additionally, excitation transfer between Trp and bound ANS was fully abolished in the presence of 1 mM GSH (supplemental Fig. S8). *S*-(phenylacetophenone)-Glutathione and 2-methyl-*S*-glutathionyl-naphtoquinone were also able to inhibit ANS binding, whereas the same compounds deprived of the GSH adduct could not (Table 3). Taking together, these data suggest strongly that in GST5118, the ANS binding site overlaps at least in part the glutathione binding site (G site).

In the vicinity of catalytic Ser-22, a sulfate/acetate binding site has been detected in the GST5118 structure. Because ANS possesses a sulfonic acid motif, various sulfated compounds were tested for their ability to interact with the ANS binding site in GST5118. ANS binding is inhibited in the presence of 4-aminotoluene-3-sulfonic acid, *p*-xylene-2-sulfonic acid hydrate, 1,2-naphtoquinone-4-sulfonic acid sodium, and also 4-methylumbelliferyl sulfate potassium (Table 3). Moreover, this inhibition seems to be sulfate/sulfonate-dependent because 4-methylumbelliferone and *p*-xylene do not compete with ANS, suggesting that the ANS binding site also overlaps with the sulfate-binding site in GST5118.

Competition experiments between ANS and various substrates have been performed in order to investigate possible overlapping between the substrate binding site and the ANS binding site. As shown above, GST5118 exhibits a relatively high affinity for CMFDA, phenethyl-ITC, and PNP-butyrate with and without GSH (Table 3). ANS binding onto GST5118 remained mainly unaltered in the presence of either phenethyl-ITC or CMFDA (supplemental Fig. S9). Moreover, GST5118

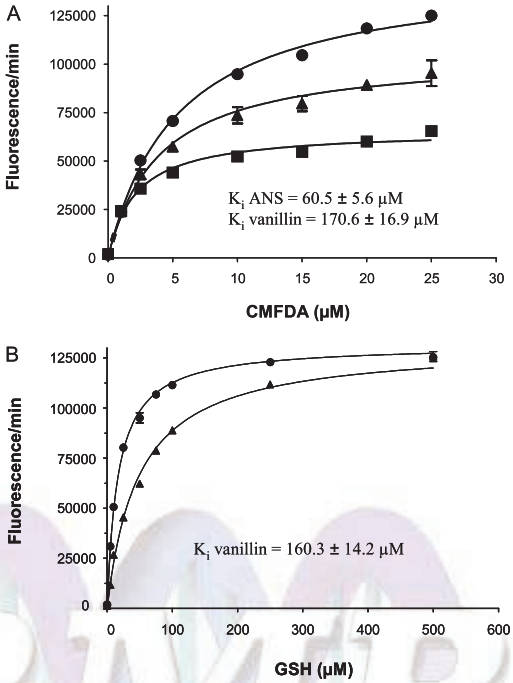


FIGURE 4. **Inhibition of GSH-dependent esterase activity by ANS or vanillin.** Data are represented as mean ± S.D. (n ± 3). *A*, noncompetitive inhibition of esterase activity against CMFDA without inhibitor (●) or in the presence of 50 μM ANS (■) or 300 μM vanillin (▲). K_i values were calculated resolving to the non-linear noncompetitive inhibition equation ($r^2 > 0.99$): $V_{maxinh} = V_{max}/(1 + I/K_i)$; $Y = V_{maxinh} \times X/(K_m + X)$. V_{max} and K_m represent the maximum enzyme velocity and the Michaelis-Menten constant without inhibitor, whereas V_{maxinh} represents the maximum enzyme velocity for one concentration of inhibitor, and K_i is the inhibition constant. *B*, competitive inhibition of esterase activity GSH-dependent against GSH without inhibitor (●) or in the presence of 300 μM vanillin (▲). The K_i value was calculated resolving to the non-linear competitive inhibition equation ($r^2 > 0.99$): $K_{m(obs)} = K_m \times (1 + [I]/K_i)$; $Y = V_{max} \times X/(K_{m(obs)} + X)$. V_{max} and K_m represent the maximum enzyme velocity and the Michaelis-Menten constant without inhibitor, whereas $K_{m(obs)}$ represents the Michaelis-Menten constant in the presence of inhibitor, and K_i is the inhibition constant.

activity against phenethyl-ITC is inhibited in the presence of ANS (supplemental Fig. S10). Concerning CMFDA, only esterase activity with GSH is inhibited by ANS (Fig. 4*A*). Due to quenching phenomena, PNP-butyrate was not used in this test.

Taken together, these data suggest that the ANS binding site does not overlap with the substrate binding site because the probe does not compete with hydrophobic substrates as phenethyl-ITC or CMFDA for binding. By contrast, the competition between ANS and GSH (Fig. 4*B*) and the inhibition of GSH-requiring activities show an overlap between ANS and the G site of GST5118.

Ligand Screening—Using ANS as a screening tool, competition experiments have been performed with 11 structurally variable beech compounds (supplemental Fig. S11). Seven of them were recognized by GST5118 (Table 3). Among these products, those exhibiting the better affinity for GST5118 are

balt3/zbc-bc/zbc-bc/zbc04812/zbc2983-12z ZSUBMIT 12 xppws S=3 5/10/12 11:33 **4/Color Figure(s) F1,2** ARTNO: M112.402776

either aldehydes or compounds harboring electrophilic motifs or atoms such as chlorine or nitrogen. Steric hindrance is not a factor influencing ligand binding because epicatechin and catechin hydrate, two of the largest compounds used, are both bound by GST5118.

To confirm the interaction between these compounds and GST5118, additional experiments were conducted using vanillin and testing the ability of GST5118 to react with CFMDA in the presence and absence of glutathione. Vanillin strongly inhibited the activity in the presence of GSH (Fig. 4) but had no effect in the absence of GSH (data not shown). Kinetic experiments revealed, as expected, a non-competitive inhibition against CFMDA (*i.e.* different binding sites for vanillin and CFMDA) and a competitive inhibition against GSH (*i.e.* overlapping binding sites for vanillin and GSH). In both cases, the K_i value (K_i around 200 μM) is in accordance with the IC_{50} value calculated from the experiments performed with ANS (216.6 ± 8.5 μM).

As summarized in Fig. 5, all of these data suggest that GSH, ANS, sulfate/acetate, and ligands such as vanillin bind to GST5118 through overlapping binding sites, which are different from the substrate-binding site.

DISCUSSION

GST5118 is a newly identified fungal GST with unique properties both in terms of structural organization and biochemistry. GST5118 monomer exhibits two extra secondary structures in addition to the canonical GST framework: 1) the β-hairpin $\beta2'\beta2''$ in the N-terminal domain, which hinders the formation of the regular GST dimer and which may be described as a shield covering the G site once GSH is bound, and 2) the helix $\alpha4'$, which closes the presumed electrophilic substrate binding site and involves a basic side chain in the anion binding site of the enzyme. Based on structural alignments, all five PcGSTs from this class should share the same original properties, allowing us to define a new structural GST class with a novel dimerization mode. This class holds the unique property of having conserved all the secondary structures of monomeric glutaredoxin 2, which is the presumed common ancestor of the cytosolic GSTs (43). All other structures solved so far lost at least helix $\alpha4'$. The catalytic Ser-22 is in hydrogen-bonding contact with the thiol sulfur atom of the cysteinyl moiety of GSH and thus could participate in the stabilization of the thiolate anion. The GST5118-S22A mutant retains the ability to conjugate GSH onto electrophilic substrates and exhibits weak peroxidase and thiol transferase activities. This suggests that another residue could stabilize the thiolate form of GSH and thus lower its pK_a. In the vicinity of GSH, Asn-24 which is invariant in isoforms of this class (supplemental Fig. S6) could fulfill this role with few conformational changes. In accordance, this Asn residue is conserved in Ure2p class and has been shown to be crucial for peroxidase activity of *Saccharomyces cerevisiae* Ure2p (55). This observation could explain why GST5118-S22A shows such an activity pattern.

A sulfate binding pocket was identified in the N-terminal domain of GST5118 structure, close to the GSH binding site. This could explain the binding of ANS, which possesses a sulfonic acid moiety, at the G site and the competition between ANS and GSH. The unique binding mode of ANS onto GST5118 allowed us to use it as a ligand screening tool. Glutathionylated and sulfur-containing compounds as well as products resulting from wood degradation compete with ANS, suggesting that all of them bind at the G site. This is in accordance with the structural data concerning glutathionylated and sulfated compounds; however, it was unexpected for wood compounds because the recognition of hydrophobic substrates has never been described to occur at the G site.

The consequence of binding wood compounds at the G site is the inability of GST5118 to accept and therefore transfer GSH anymore. This enzyme could thus have two functions, possibly depending on the intracellular concentration of GSH and wood compounds: a classical GSH transferase activity, especially with phenethyl-ITC as substrate, and a ligandin property toward wood extractive compounds. The affinity for ligand binding is likely to be driven by very fine interactions. An example of this fine ligand specificity is the pair vanillin/vanillic acid, in which

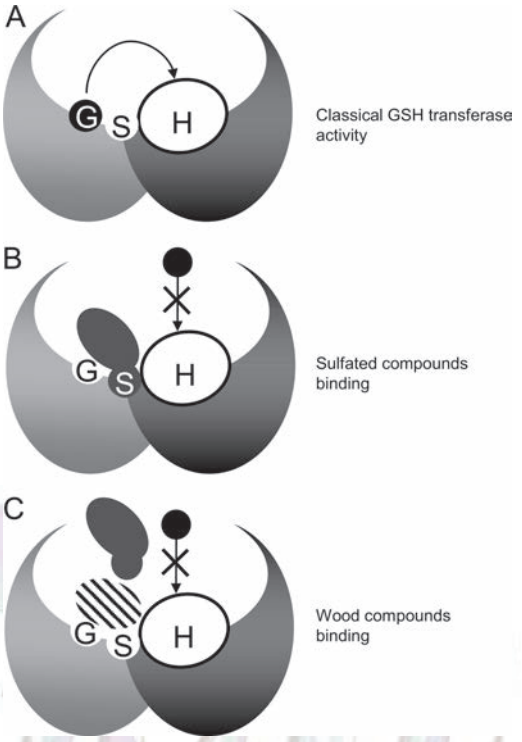


FIGURE 5. **Schematic representation of compounds binding onto GST5118 monomer.** The N-terminal domain containing the GSH binding site (*G*) as well as the ANS and sulfated compound binding site (*S*) is depicted in *light gray* (on the *left*), whereas the C-terminal domain containing the substrate binding site (*H*) is depicted in *dark gray* (on the right). Binding of both GSH (*black*) and substrate (*white*) in their respective sites (*A*) enables the classical GSH transferase activity of the enzyme. Binding of ANS and sulfated compounds in the S site (*B*) or binding of non-substrate wood compounds (*striped*) in the N-terminal domain (*C*) inhibits the GSH binding but does not affect substrate binding and alters the GSH transferase activity of the enzyme.

balt3/zbc-bc/zbc-bc/zbc04812/zbc2983-12z ZSUBMIT 12 xppws S=3 5/10/12 11:33 | 4/Color Figure(s) F1,2 | ARTNO: M112.402776

the first compound is well recognized by GST5118, whereas the latter cannot displace ANS. The only difference between these two molecules is the addition of a single atom of oxygen, transforming the aldehyde function into an acidic one. Vanillin is known to be one of the key intermediates found during wood decay, and it was shown to be taken up by fungal cells (56). However, vanillin is not a nutrient substrate but rather acts as a chemical stress on fungal cells (57). It has also been suggested that it can be responsible for activation of fungal metabolic pathways for phenolic compounds (58). This ligandin property of GST5118 could thus be helpful to protect the cell against highly reactive xenobiotics or secondary metabolites. Similar functions were assigned to plant Phi and Tau GSTs that participate in the transport of highly reactive products to the vacuole without catalyzing their conjugation and thus sequestering them away from critical intracellular targets (59, 60).

In conclusion, the structural and functional properties of GST5118 allow us to define a new GST class that we name GSTFuA (for fungal specific class A). Accordingly, GST5118 from *P. chrysosporium* can thus be renamed GSTFuA1.

Acknowledgments—We thank the staffs of the BM30A beamline at the European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, France) and the Proxima 1 beamline at SOLEIL (Gif-sur-Yvette, France) for kind assistance during data collection.

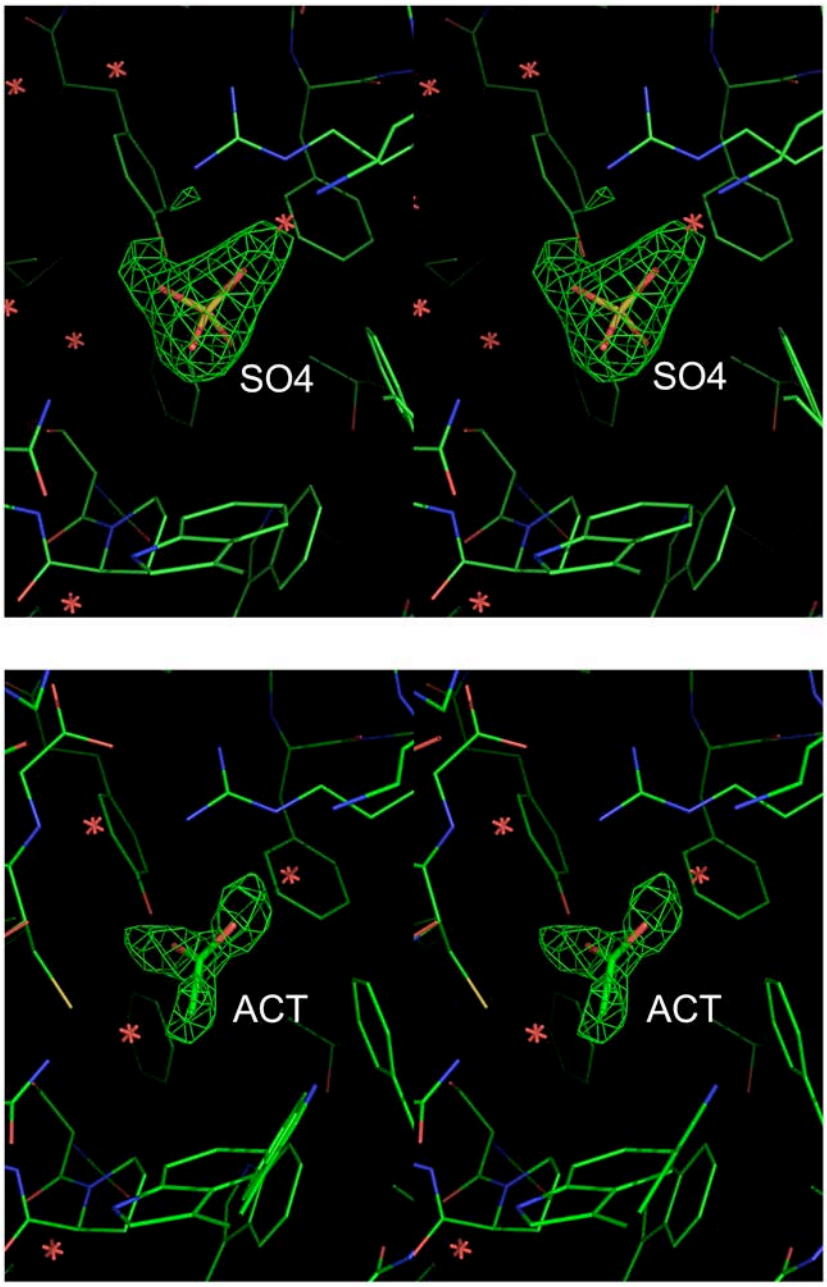
REFERENCES

1. Hayes, J. D., Flanagan, J. U., and Jowsey, I. R. (2005) Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45,** 51–88
2. Mannervik, B. (2012) Five decades with glutathione and the GSTome. *J. Biol. Chem.* **287,** 6072–6083
3. Oakley, A. J., Lo Bello, M., Nuccetelli, M., Mazzetti, A. P., and Parker, M. W. (1999) The ligandin (non-substrate) binding site of human Pi class glutathione transferase is located in the electrophile binding site (H-site). *J. Mol. Biol.* **291,** 913–926
4. Lederer, B., and Böger, P. (2003) Binding and protection of porphyrins by glutathione *S*-transferases of *Zea mays* L. *Biochim. Biophys. Acta* **1621,** 226–233
5. Dixon, D. P., Lapthorn, A., Madesis, P., Mudd, E. A., Day, A., and Edwards, R. (2008) Binding and glutathione conjugation of porphyrinogens by plant glutathione transferases. *J. Biol. Chem.* **283,** 20268–20276
6. Bilang, J., Macdonald, H., King, P. J., and Sturm, A. (1993) A soluble auxin-binding protein from *Hyoscyamus muticus* is a glutathione *S*-transferase. *Plant Physiol.* **102,** 29–34
7. Conn, S., Curtin, C., Bézier, A., Franco, C., and Zhang, W. (2008) Purification, molecular cloning, and characterization of glutathione *S*-transferases (GSTs) from pigmented *Vitis vinifera* L. cell suspension cultures as putative anthocyanin transport proteins. *J. Exp. Bot.* **59,** 3621–3634
8. Morel, M., Ngadin, A. A., Droux, M., Jacquot, J. P., and Gelhaye, E. (2009) The fungal glutathione *S*-transferase system. Evidence of new classes in the wood-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Cell Mol. Life Sci.* **66,** 3711–3725
9. Thuillier, A., Ngadin, A. A., Thion, C., Billard, P., Jacquot, J. P., Gelhaye, E., and Morel, M. (2011) Functional diversification of fungal glutathione transferases from the ure2p class. *Int. J. Evol. Biol.* **2011,** 938308
10. McGoldrick, S., O'Sullivan, S. M., and Sheehan, D. (2005) Glutathione transferase-like proteins encoded in genomes of yeasts and fungi. Insights into evolution of a multifunctional protein superfamily. *FEMS Microbiol. Lett.* **242,** 1–12
11. Lian, H. Y., Jiang, Y., Zhang, H., Jones, G. W., and Perrett, S. (2006) The yeast prion protein Ure2. Structure, function, and folding. *Biochim. Biophys. Acta* **1764,** 535–545
12. Garcerá, A., Barreto, L., Piedrafita, L., Tamarit, J., and Herrero, E. (2006) *Saccharomyces cerevisiae* cells have three Omega class glutathione *S*-transferases acting as 1-Cys thiol transferases. *Biochem. J.* **398,** 187–196
13. Choi, J. H., Lou, W., and Vancura, A. (1998) A novel membrane-bound glutathione *S*-transferase functions in the stationary phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273,** 29915–29922
14. Fraser, J. A., Davis, M. A., and Hynes, M. J. (2002) A gene from *Aspergillus nidulans* with similarity to URE2 of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a glutathione *S*-transferase which contributes to heavy metal and xenobiotic resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* **68,** 2802–2808
15. Burns, C., Geraghty, R., Neville, C., Murphy, A., Kavanagh, K., and Doyle, S. (2005) Identification, cloning, and functional expression of three glutathione transferase genes from *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet. Biol.* **42,** 319–327
16. Meux, E., Prosper, P., Ngadin, A., Didierjean, C., Morel, M., Dumarçay, S., Lamant, T., Jacquot, J. P., Favier, F., and Gelhaye, E. (2011) Glutathione transferases of *Phanerochaete chrysosporium*. *S*-Glutathionyl-*p*-hydroquinone reductase belongs to a new structural class. *J. Biol. Chem.* **286,** 9162–9173
17. Masai, E., Ichimura, A., Sato, Y., Miyauchi, K., Katayama, Y., and Fukuda, M. (2003) Roles of the enantioselective glutathione *S*-transferases in cleavage of β-aryl ether. *J. Bacteriol.* **185,** 1768–1775
18. Lee, S., Monnappa, A. K., and Mitchell, R. J. (2012) Biological activities of lignin hydrolysate-related compounds. *BMB Rep.* **45,** 265–274
19. Lee, C. Y., Sharma, A., Cheong, J. E., and Nelson, J. L. (2009) Synthesis and antioxidant properties of dendritic polyphenols. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19,** 6326–6330
20. Schenk, P. M., Baumann, S., Mattes, R., and Steinbiss, H. H. (1995) Improved high level expression system for eukaryotic genes in *Escherichia coli* using T7 RNA polymerase and rare ArgtRNAs. *BioTechniques* **19,** 196–198, 200
21. D'Ambrosio, K., Kauffmann, B., Rouhier, N., Benedetti, E., Jacquot, J. P., Aubry, A., and Corbier, C. (2003) Crystallization and preliminary x-ray studies of the glutaredoxin from poplar in complex with glutathione. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr* **59,** 1043–1045
22. Couturier, J., Koh, C. S., Zaffagnini, M., Winger, A. M., Gualberto, J. M., Corbier, C., Decottignies, P., Jacquot, J. P., Lemaire, S. D., Didierjean, C., and Rouhier, N. (2009) Structure-function relationship of the chloroplastic glutaredoxin S12 with an atypical WCSYS active site. *J. Biol. Chem.* **284,** 9299–9310
23. Zhang, J., Shibata, A., Ito, M., Shuto, S., Ito, Y., Mannervik, B., Abe, H., and Morgenstern, R. (2011) Synthesis and characterization of a series of highly fluorogenic substrates for glutathione transferases, a general strategy. *J. Am. Chem. Soc.* **133,** 14109–14119
24. Kim, D. E., Kim, K. H., Bae, Y. J., Lee, J. H., Jang, Y. H., and Nam, S. W. (2005) Purification and characterization of the recombinant arylsulfatase cloned from *Pseudoalteromonas carrageenovora*. *Protein Expr. Purif.* **39,** 107–115
25. Koh, C. S., Navrot, N., Didierjean, C., Rouhier, N., Hirasawa, M., Knaff, D. B., Wingsle, G., Samian, R., Jacquot, J. P., Corbier, C., and Gelhaye, E. (2008) An atypical catalytic mechanism involving three cysteines of thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **283,** 23062–23072
26. Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66,** 125–132
27. Evans, P. (2006) Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **62,** 72–82
28. Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leslie, A. G., McCoy, A., McNicholas, S. J., Murshudov, G. N., Pannu, N. S., Potterton, E. A., Powell, H. R., Read, R. J., Vagin, A., and Wilson, K. S. (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **67,** 235–242
29. Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C., and Zwart, P. H. (2010) PHENIX. A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66,** 213–221
30. Terwilliger, T. (2004) SOLVE and RESOLVE. Automated structure solution, density modification, and model building. *J. Synchrotron Radiat.* **11,** 49–52

balt3/zbc-bc/zbc-bc/zbc04812/zbc2983-12z ZSUBMIT 12 xppws S=3 5/10/12 11:33 4/Color Figure(s) F1,2 ARTNO: M112.402776

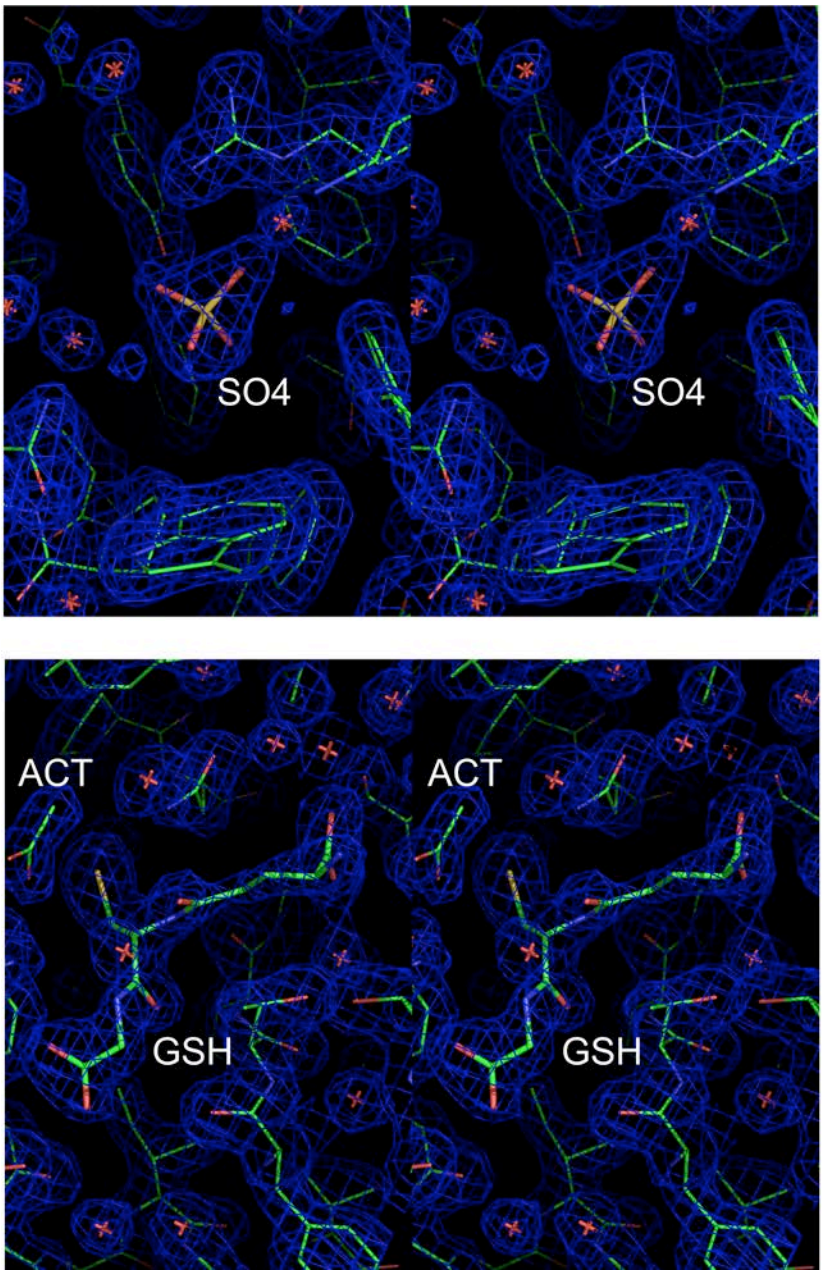
31. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., and Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66,** 486–501
32. Chen, V. B., Arendall, W. B., 3rd, Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (2010) MolProbity. All-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66,** 12–21
33. Krissinel, E., and Henrick, K. (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* **372,** 774–797
34. Holm, L., and Rosenström, P. (2010) Dali server. Conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res.* **38,** W545–W549
35. Gille, C. (2006) Structural interpretation of mutations and SNPs using STRAP-NT. *Protein Sci.* **15,** 208–210
36. Cole, C., Barber, J. D., and Barton, G. J. (2008) The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res.* **36,** W197–W201
37. Gouet, P., Robert, X., and Courcelle, E. (2003) ESPript/ENDscript. Extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* **31,** 3320–3323
38. Allocati, N., Casalone, E., Masulli, M., Ceccarelli, I., Carletti, E., Parker, M. W., and Di Ilio, C. (1999) Functional analysis of the evolutionarily conserved proline 53 residue in *Proteus mirabilis* glutathione transferase B1-1. *FEBS Lett.* **445,** 347–350
39. Cocco, R., Stenberg, G., Dragani, B., Rossi Principe, D., Paludi, D., Mannervik, B., and Aceto, A. (2001) The folding and stability of human Alpha class glutathione transferase A1-1 depend on distinct roles of a conserved N-capping box and hydrophobic staple motif. *J. Biol. Chem.* **276,** 32177–32183
40. Skopelitou, K., Dhavala, P., Papageorgiou, A. C., and Labrou, N. E. (2012) A glutathione transferase from *Agrobacterium tumefaciens* reveals a novel class of bacterial GST superfamily. *PLoS ONE* **7,** e34263
41. Reinemer, P., Prade, L., Hof, P., Neuefeind, T., Huber, R., Zettl, R., Palme, K., Schell, J., Koelln, I., Bartunik, H. D., and Bieseler, B. (1996) Three-dimensional structure of glutathione *S*-transferase from *Arabidopsis thaliana* at 2.2 Å resolution. Structural characterization of herbicide-conjugating plant glutathione *S*-transferases and a novel active site architecture. *J. Mol. Biol.* **255,** 289–309
42. Xia, B., Vlamis-Gardikas, A., Holmgren, A., Wright, P. E., and Dyson, H. J. (2001) Solution structure of Escherichia coli glutaredoxin-2 shows similarity to mammalian glutathione *S*-transferases. *J. Mol. Biol.* **310,** 907–918
43. Frova, C. (2006) Glutathione transferases in the genomics era. New insights and perspectives. *Biomol. Eng.* **23,** 149–169
44. Sinning, I., Kleywegt, G. J., Cowan, S. W., Reinemer, P., Dirr, H. W., Huber, R., Gilliland, G. L., Armstrong, R. N., Ji, X., and Board, P. G. (1993) Structure determination and refinement of human Alpha class glutathione transferase A1-1 and a comparison with the Mu and Pi class enzymes. *J. Mol. Biol.* **232,** 192–212
45. Rossjohn, J., McKinstry, W. J., Oakley, A. J., Verger, D., Flanagan, J., Chelvanayagam, G., Tan, K. L., Board, P. G., and Parker, M. W. (1998) Human Theta class glutathione transferase. The crystal structure reveals a sulfate-binding pocket within a buried active site. *Structure* **6,** 309–322
46. Board, P. G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Easteal, S., Jermiin, L. S., Schulte, G. K., Danley, D. E., Hoth, L. R., Griffor, M. C., Kamath, A. V., Rosner, M. H., Chrunyk, B. A., Perregaux, D. E., Gabel, C. A., Geoghegan, K. F., and Pandit, J. (2000) Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *J. Biol. Chem.* **275,** 24798–24806
47. Agianian, B., Tucker, P. A., Schouten, A., Leonard, K., Bullard, B., and Gros, P. (2003) Structure of a *Drosophila* Sigma class glutathione *S*-transferase reveals a novel active site topography suited for lipid peroxidation products. *J. Mol. Biol.* **326,** 151–165
48. Dirr, H., Reinemer, P., and Huber, R. (1994) X-ray crystal structures of cytosolic glutathione *S*-transferases. Implications for protein architecture, substrate recognition, and catalytic function. *Eur. J. Biochem.* **220,** 645–661
49. Menchise, V., Corbier, C., Didierjean, C., Jacquot, J. P., Benedetti, E., Saviano, M., and Aubry, A. (2000) Crystal structure of the W35A mutant thioredoxin h from *Chlamydomonas reinhardtii*. The substitution of the conserved active site Trp leads to modifications in the environment of the two catalytic cysteines. *Biopolymers* **56,** 1–7
50. Lillig, C. H., Berndt, C., and Holmgren, A. (2008) Glutaredoxin systems. *Biochim. Biophys. Acta* **1780,** 1304–1317
51. Polekhina, G., Board, P. G., Blackburn, A. C., and Parker, M. W. (2001) Crystal structure of maleylacetoacetate isomerase/glutathione transferase Zeta reveals the molecular basis for its remarkable catalytic promiscuity. *Biochemistry* **40,** 1567–1576
52. Jeppesen, M. G., Ortiz, P., Shepard, W., Kinzy, T. G., Nyborg, J., and Andersen, G. R. (2003) The crystal structure of the glutathione *S*-transferase-like domain of elongation factor 1Bγ from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **278,** 47190–47198
53. Masai, E., Katayama, Y., Kubota, S., Kawai, S., Yamasaki, M., and Morohoshi, N. (1993) A bacterial enzyme degrading the model lignin compound β-etherase is a member of the glutathione *S*-transferase superfamily. *FEBS Lett.* **323,** 135–140
54. Schonbrunn, E., Eschenburg, S., Luger, K., Kabsch, W., and Amrhein, N. (2000) Structural basis for the interaction of the fluorescence probe 8-anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS) with the antibiotic target MurA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97,** 6345–6349
55. Zhang, Z. R., Bai, M., Wang, X. Y., Zhou, J. M., and Perrett, S. (2008) "Restoration" of glutathione transferase activity by single-site mutation of the yeast prion protein Ure2. *J. Mol. Biol.* **384,** 641–651
56. Shimizu, M., Kobayashi, Y., Tanaka, H., and Wariishi, H. (2005) Transportation mechanism for vanillin uptake through fungal plasma membrane. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68,** 673–679
57. Shimizu, M., Yuda, N., Nakamura, T., Tanaka, H., and Wariishi, H. (2005) Metabolic regulation at the tricarboxylic acid and glyoxylate cycles of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* against exogenous addition of vanillin. *Proteomics* **5,** 3919–3931
58. Nakamura, T., Ichinose, H., and Wariishi, H. (2012) Flavin-containing monooxygenases from *Phanerochaete chrysosporium* responsible for fungal metabolism of phenolic compounds. *Biodegradation* **23,** 343–350
59. Marrs, K. A., Alfenito, M. R., Lloyd, A. M., and Walbot, V. (1995) A glutathione *S*-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*. *Nature* **375,** 397–400
60. Kitamura, S., Shikazono, N., and Tanaka, A. (2004) TRANSPARENT TESTA 19 is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in *Arabidopsis*. *Plant J.* **37,** 104–114

SUPPLEMENTAL DATA



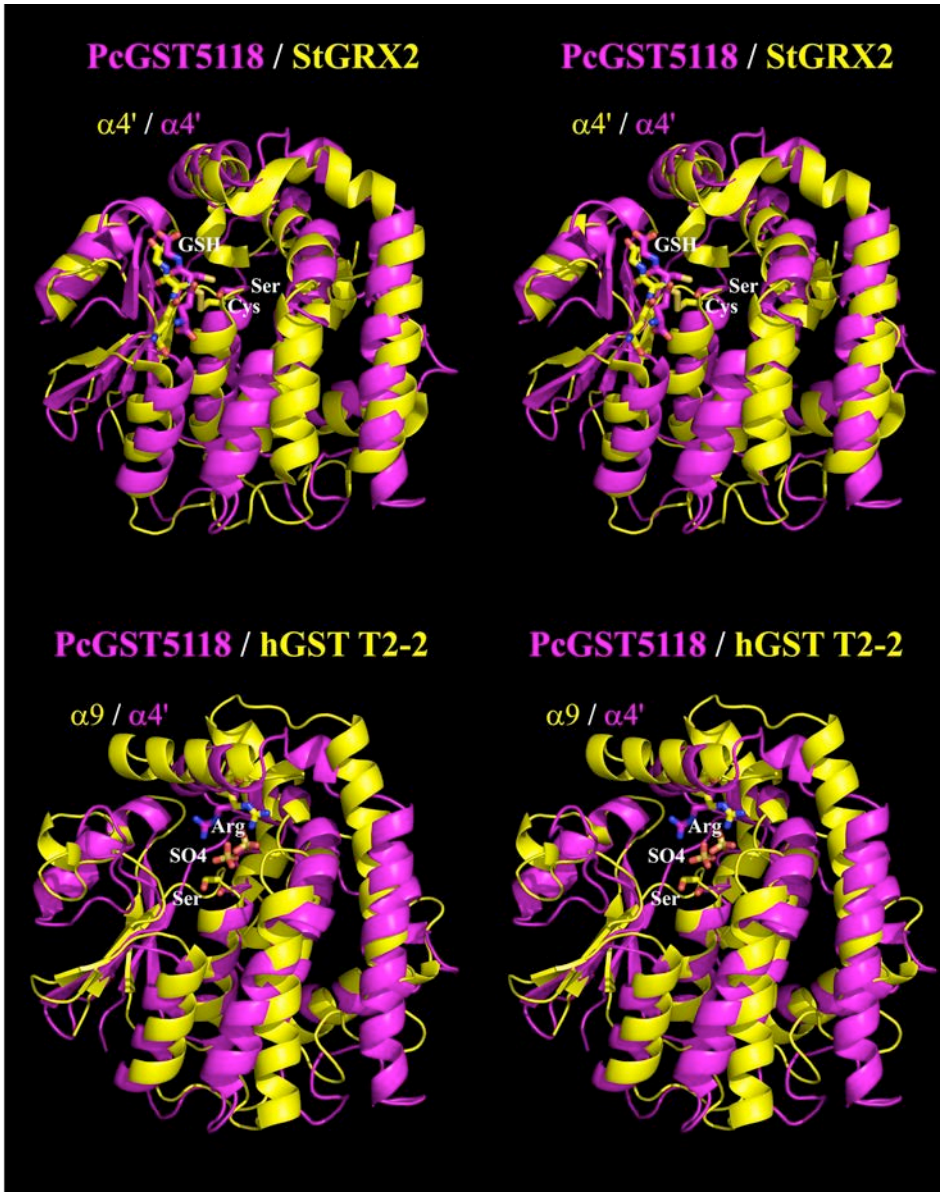
Supplemental Figure S1. Stereo views of difference maps (3σ contour level, mFo-DFc maps) in the region of the catalytic active site of apoGST5118 (top) and holoGST5118 (bottom).

The positive peak was assigned to a sulfate ion in the apo structure (top) and to an acetate ion in the holo structure (bottom). The coordinates of the structures are shown as sticks



Supplemental Figure S2. Stereo views of final SIGMAA-weighted 2mFo-DFc maps (1.2σ contour level) in the region of the catalytic active site of apoGST5118 (top) and holoGST5118 (bottom).

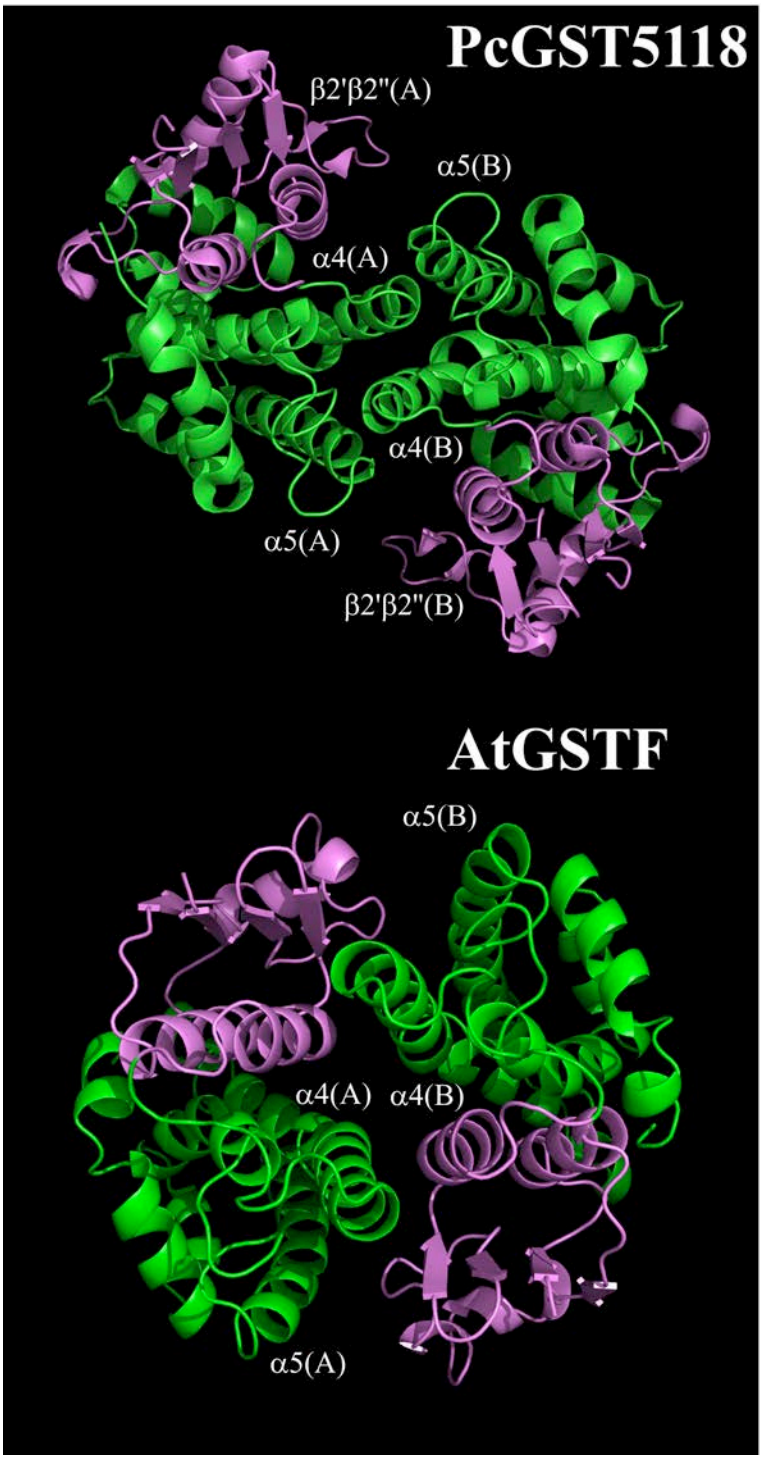
The coordinates of the structures are shown as sticks



Supplemental Figure S3. Stereo views of the superpositions of GST5118 onto glutaredoxin 2 from *Salmonella typhimurium* (top) and theta class GST from human (bottom).

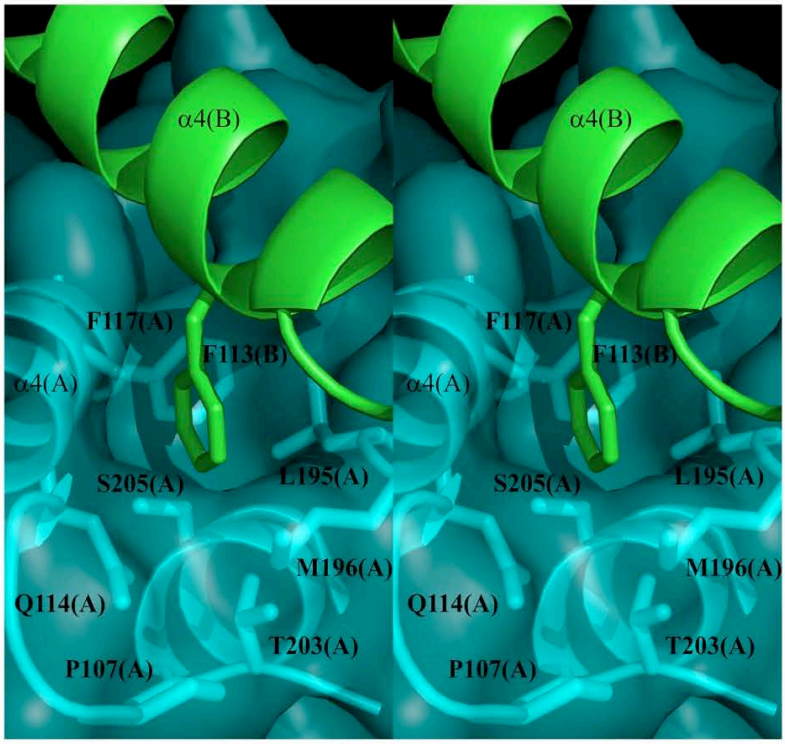
Top : GST5118 and StGrx2 (pdb entry 3IR4) are represented in cartoon ribbon style and colored in magenta and yellow, respectively. The stereo view highlights the good superimposition between the GST5118 and GRX2 structures and in particular the presence of the helix α4' in both structures. The number of atoms used in the superposition was 198 CA atoms and the resulting rmsd was 2.9 Å. In both structures, the glutathione and the catalytic residue are shown as sticks.

Bottom : GST5118 and hGST T2-2 (pdb entry 3LJR) are represented in cartoon ribbon style and colored in magenta and yellow, respectively. The stereo view highlights the superimposition of the helix α4' of GST5118 and the C-terminal helix of hGST T2-2. Both helices involve an arginine (shown as sticks) to stabilize an anion in the active site. The number of atoms used in the superposition was 192 CA atoms and the resulting rmsd was 3.2 Å. In both structures, a sulfate anion and the catalytic serine are shown as sticks.



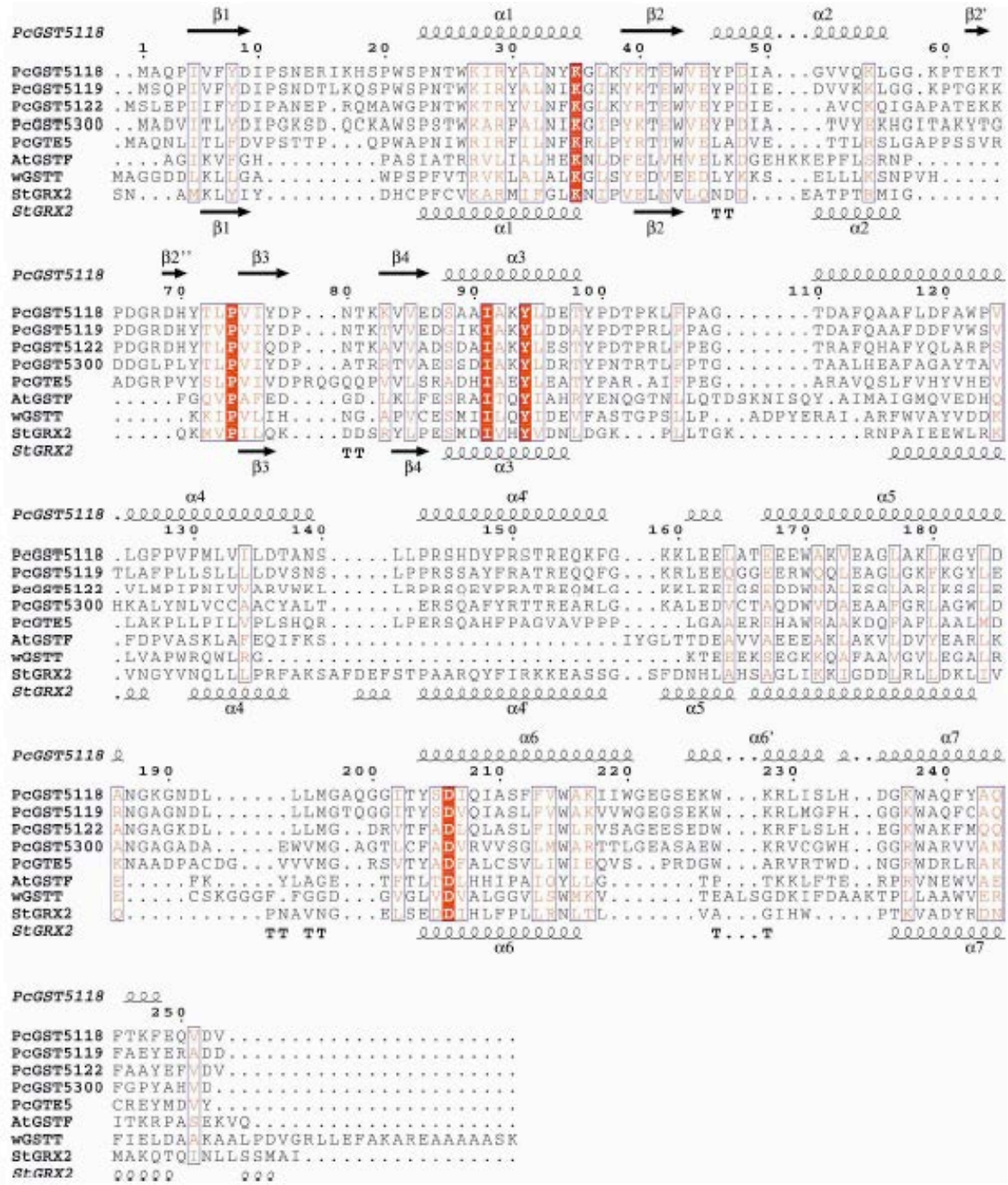
Supplemental Figure S4. Views of the GST5118 dimer and of the canonical GST dimer.

GST5118 (top) and Phi GST from *A. thaliana* (bottom, pdb entry 1GNW) are represented in cartoon ribbon style and their N-ter and C-ter domains are colored magenta and green, respectively. In the regular GST dimer such as in AtGSTF, the helices α4 and α5 of one monomer pack against the N-terminal domain of the other monomer. In GST5118 the β2'β2" motif hinders this proximity, the helix α4 of one subunit packs in the groove between helices α4 and α5 of the other protomer.



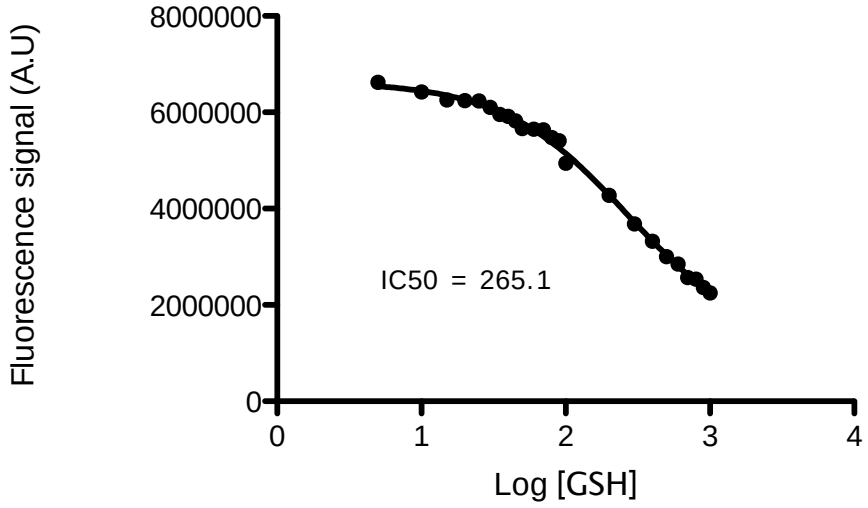
Supplemental Figure S5. Stereo view of the lock and key motif in the GST5118 dimer.

The monomers A and B are represented in cartoon ribbon style and colored cyan and green, respectively. The key (Phe-113), and the residues forming the lock are shown as sticks and are labeled. The transparency surface highlights the pocket hosting the key.



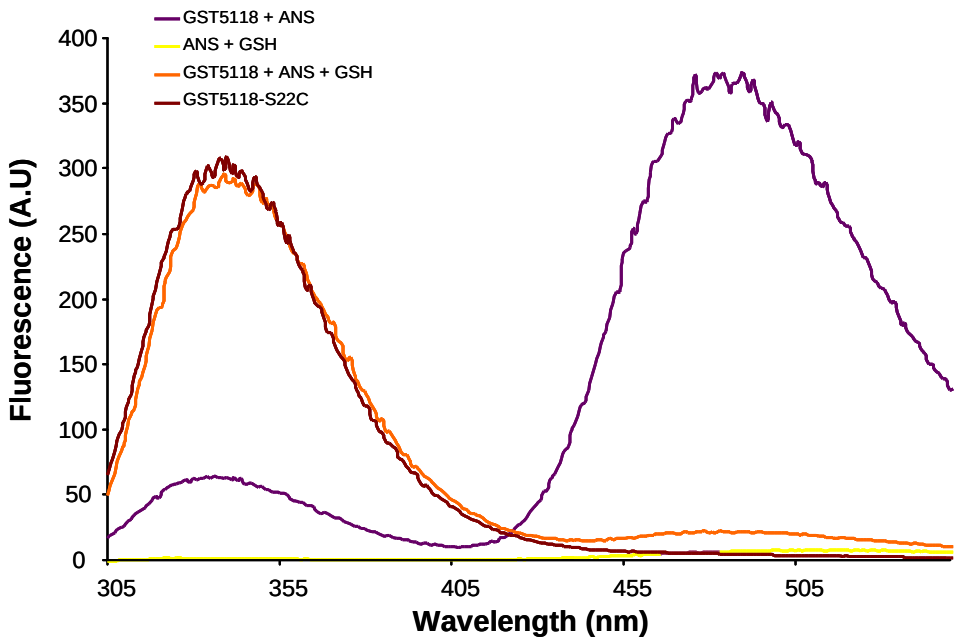
Supplemental Figure S6. Sequence alignment based on the structural superimposition of GST5118 and representatives of different GST (or GST-like) classes found by DALI to be the closest structural neighbors of GST5118.

AtGSTF : a Phi class GST from *Arabidopsis thaliana* (PDB ID 1GNW ; UniProKB P46422) ; wGSTT : a tau class GST from bread wheat (*Aegilops tauschii*) (PDB ID 1GWC ; UniProKB O04941) ; StGRX2 : GRX2 from *Salmonella typhimurium* (PDB ID 3IR4 ; UniProKB Q7CQR3).
The sequence alignment was generated with the programs STRAP and ESPript. GST5118 and StGRX2 secondary structure elements are shown above and below the sequence alignment, respectively.



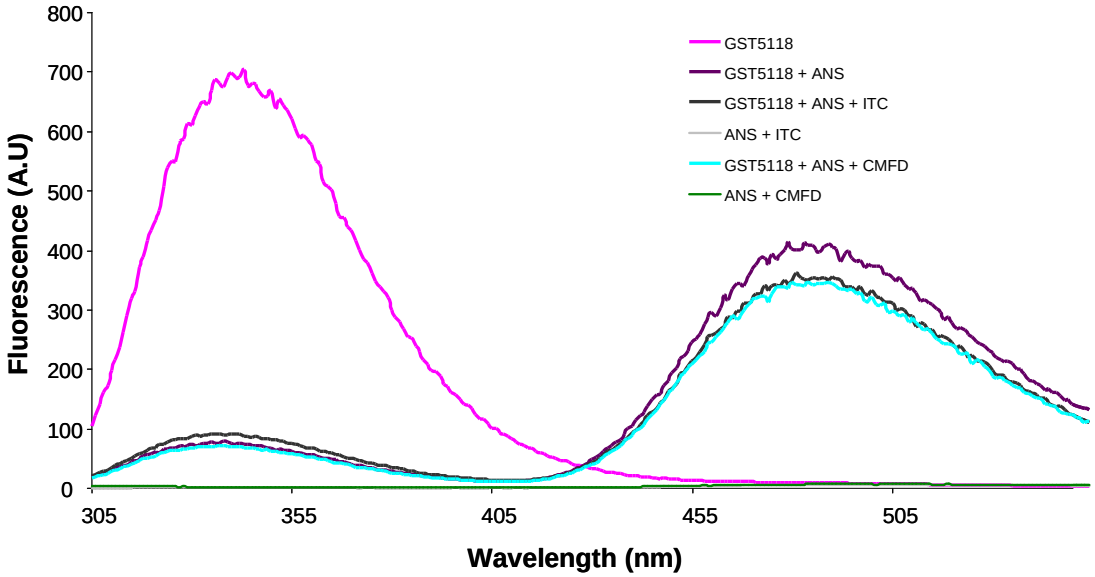
Supplemental Figure S7. Competition experiment between ANS and GSH binding.

ANS fluorescence signal decreases upon increasing GSH concentration. Experiment was performed with 50 µM ANS in triplicate and results were least square fitted to the equation 2 described in material and methods to obtain IC50 value.



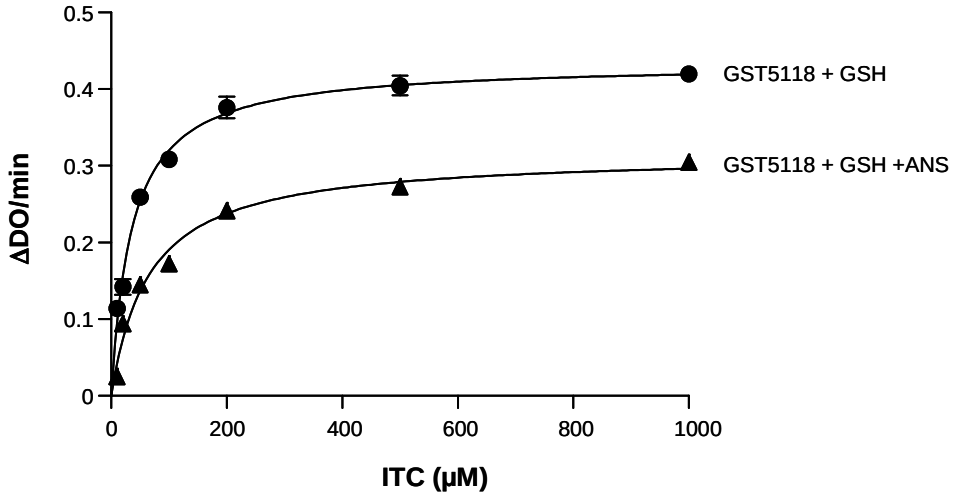
Supplemental Figure S8. Tryptophan based fluorescence experiments illustrating ANS displacement upon GSH addition.

Upon tryptophan excitation at 290 nm, FRET between 50 µM ANS and 3 µM GST5118 (purple), is inhibited with addition of 1 mM GSH (orange). Emission spectra of 50 µM ANS with 1 mM GSH is in yellow while GST5118-S22C is in brown.



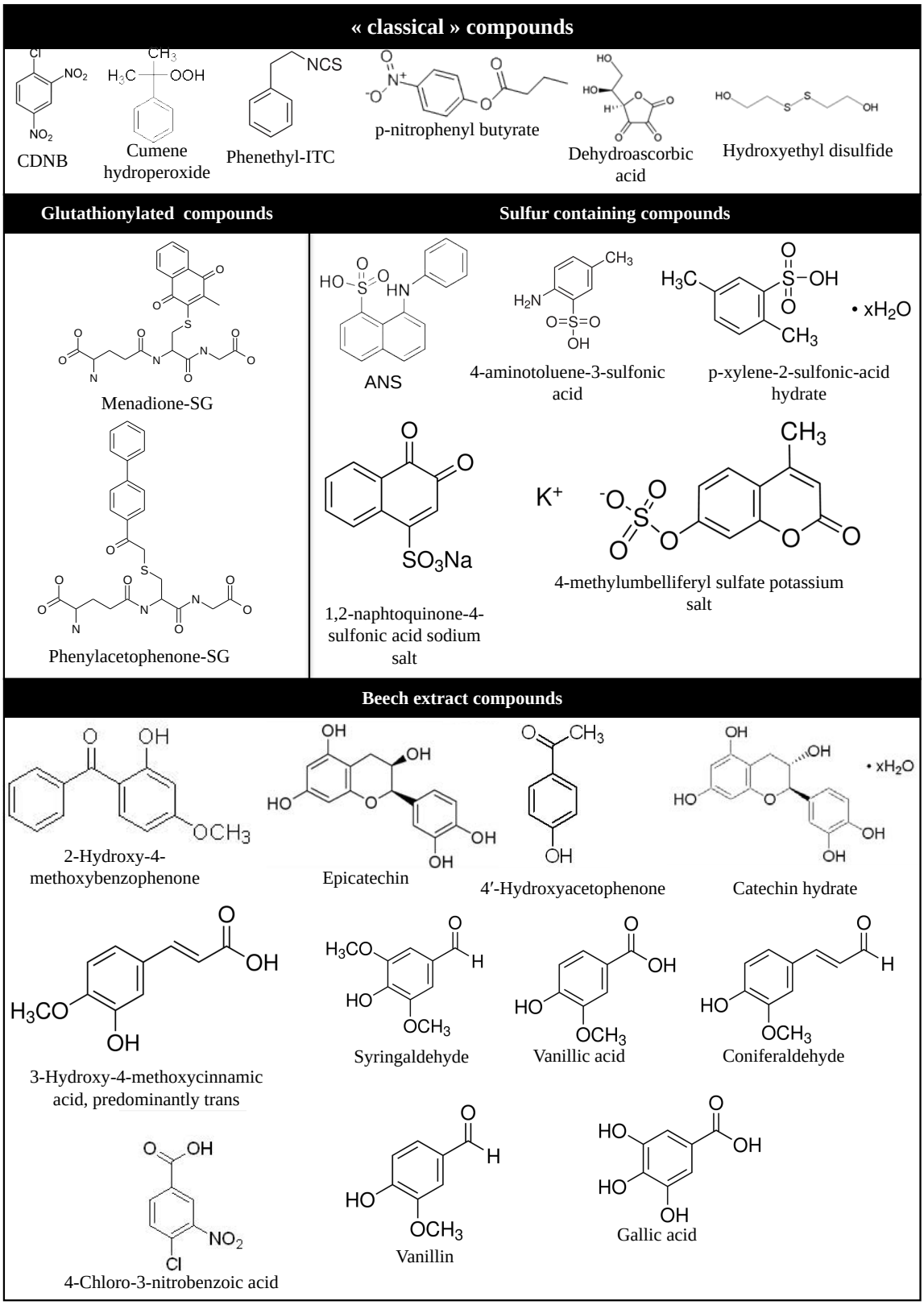
Supplemental Figure S9. Tryptophan based fluorescence experiments illustrating ANS binding upon addition of substrates.

Upon tryptophan excitation at 290 nm, FRET between 50 µM ANS and 3 µM GST5118 (purple) is not altered in presence of 5 mM phenetyl-ITC (black) or 50 µM CMFDA (cyan). Emission spectra of 5 mM phenetyl-ITC or 50 µM CMFDA with 50 µM ANS are in grey and dark green respectively. Emission spectrum of GST5118 alone is in pink.



Supplemental Figure S10. Inhibition of GSH transferase activity against ITC by ANS.

GSH transferase activity was monitored at 274 nm without (•) or with (▲) 50 µM ANS. Data is represented as mean ± S.D. (n ± 3).



Supplemental Figure S11. Compounds used in this study.

Supplemental Table 1: Primers used in this study.

The *Nco*I and *Bam*HI cloning restriction sites are underlined in the primers. The mutagenic codons are in bold.

	Sequence
GST5118 for	5' CCCCCCATGGCTCAGCCCATCGTGTTC 3'
GST5118 rev	5' CCCCGGATCCCTATACATCAACCTGCTC 3'
GST5118-S22A for	5' AAGCACTCACCGTGG**G**CTCCCAATACCTGGAAA 3'
GST5118-S22A rev	5' TTTCCAGGTATTGGGAG**C**CCACGGTGAGTGCTT 3'
GST5118-S22C for	5' AAGCACTCACCGTGGT**G**TCCCAATACCTGGAAA 3'
GST5118-S22C rev	5' TTTCCAGGTATTGGGA**C**ACCACGGTGAGTGCTT 3'

2) Diversité fonctionnelle et structurale des GSTFuA :

Suite aux résultats obtenus dans la première partie de ce chapitre, j'ai voulu approfondir la connaissance des propriétés fonctionnelles et biochimiques de la classe des GSTFuA au sein des champignons saprophytes.

Dans un premier temps, j'ai évalué la distribution de cette classe d'enzymes au sein des basidiomycètes, démontrant que celle-ci est espèce-dépendante à l'exception d'une isoforme prédite comme étant mitochondriale. La présence de cette isoforme chez la majorité des champignons saprophytes suggère une fonction fortement conservée au sein de cet organite. La distribution espèce-dépendante de cette classe sous-entend, quant à elle, une divergence fonctionnelle entre les différents champignons, indépendamment de leur phylogénie, ainsi qu'une récente diversification de cette classe.

Cette diversification est en corrélation avec les patterns d'activités enzymatique exhibés par les différentes enzymes recombinantes issues de *P. chrysosporium* et *C.cinereus* étudiées, démontrant ainsi la diversité catalytique de cette classe d'enzymes. Les données cristallographiques de trois isoformes de *P. chrysosporium* démontrent que cette diversité catalytique est en relation avec la variabilité structurale de ces enzymes. Les expériences de fixation et de compétition réalisées à l'aide de plusieurs sondes fluorescentes spécifiques du site G ou H ont permis de mettre également en évidence une diversité de la propriété ligandine au sein de la classe GSTFuA entre isoformes issues d'une même espèce mais également entre isoformes d'espèces différentes.

La combinaison des données phylogénétiques, biochimiques et structurales nous permet de suggérer un rôle fonctionnel de cette classe d'enzymes dans l'adaptation des champignons décomposeurs du bois à leur substrat et notamment à la séquestration de composés toxiques via la variabilité de la propriété ligandine des différentes isoformes.

Les résultats obtenus dans cette partie sont présentés sous forme d'un article en préparation intitulé : « Diversity of fungal specific class A glutathione transferases among saprotrophic fungi reveals a putative strategy to wood adaptation».

Article 3 : Diversity of fungal specific class A glutathione transferases among saprotrophic fungi reveals a putative strategy to wood adaptation.

Yann Mathieu[1,2,5], Pascalita Prosper[3,4], Frédérique Favier[3,4], Luc Harvengt[5], Claude Didierjean[3,4], Mélanie Morel[1,2], Eric Gelhaye[1,2*].

1 : Université de Lorraine, IAM, UMR 1136, IFR 110 EFABA, Vandoeuvre-les-Nancy, F-54506, France
2 : INRA, IAM, UMR 1136, Champenoux, 54280, France
3 : Université de Lorraine, CRM2, UMR 7036, Vandoeuvre-les-Nancy, F-54506, France
4 : CNRS, CRM2, UMR 7036, Vandoeuvre-les-Nancy, F-54506, France
5 : Laboratoire de biotechnologie, Pôle Biotechnologie et Sylviculture Avancée, FCBA, Campus Forêt-Bois de Pierroton, 33610 Cestas, France

Running title: Diversity among GSTFuAs

*Address correspondence to : Gelhaye Eric, Université de Lorraine, UMR 1136 “Interactions Arbres-Microorganismes”, Faculté des Sciences et Technologies BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France; Tel + 33 3 83 68 42 28; E-mail : Eric.Gelhaye@lcb.uhp-nancy.fr

Keywords : glutathione transferases ; ligandin ; saprophytic fungi

Abstract

Glutathione transferases (GSTs) form a superfamily of multifunctional proteins with essential roles in cellular detoxification processes. The distribution of the fungal specific class A GST (GSTFuA) was investigated among saprotrophic fungi revealing a recent diversification within this class. Biochemical characterization of eight isoforms belonging to this class in *Phanerochaete chrysosporium* and *Coprinus cinereus* demonstrated functional divergence among wood decomposing fungi. The three-dimensional structure of three isoforms belonging to *P. chrysosporium* exhibited structural differences explaining the functional diversity of these enzymes. Competition experiments between two fluorescent probes, and various molecules, showed that these GSTs display high versatility of their ligandin property. These enzymes were able to bind various wood extractives molecules in the glutathione pocket together with different catalytic patterns. By combining the genomic data with structural and biochemical properties we propose that this class of GST has evolved in response to environmental constraints induced by wood chemistry.

Introduction

Glutathione-S-transferases (GSTs; EC 2.5.1.18) constitute a large superfamily of multifunctional enzymes that are involved in phase II of xenobiotic detoxification by catalysing the conjugation of glutathione (GSH) to a variety of electrophilic compounds (Hayes et al., 2005; McGoldrick et al., 2005). Most GSTs are dimeric proteins. Each monomer harbors a more or less conserved GSH binding domain (G site) and a more variable α-helical domain (H site) usually involved in the binding of the GSH acceptor compound (Mannervik, 2012). Besides their catalytic activities in

detoxification and endogenous metabolism processes, GSTs can also act as binding proteins. This ligandin property has been defined as the capacity to bind non-substrate ligands (Oakley, 2011). In plants GSTs could be involved in transport of hydrophobic compounds such as pigments (Conn et al., 2008) and in fungi it was proposed that some isoforms are able to bind toxic compounds resulting from wood degradation (Mathieu et al., 2012).

GSTs are widespread in animals, plants, bacteria and fungi and several classes have been defined from nucleotide and amino acids sequence homologies, as well as from their structural and biochemical properties. Some classes are present in all life forms; for instance, it is the case of the omega class found in animals, plants and some microbial species. In contrary, several classes are more specific and present for instance, only in plants for the Tau class (Edwards and Dixon, 2005) or only in insects for the Epsilon and Delta classes (Ketterman et al., 2011). Several studies are available for plant or animal GSTs but their counterpart in fungi are less documented. The recent release of fungal genomes has however allowed different phylogenetic analysis suggesting a specific evolution of cytosolic GSTs in these organisms (McGoldrick et al., 2005; Morel et al., 2009). Fungal cytosolic GSTs can be divided into seven classes; MAK16, EFBgamma, Ure2p, omega, GTT1, GTT2 and GSTFuA, the latter five being found largely extended in some species (Morel et al., 2009). The diversity of fungal GSTs has been investigated considering zygo-, asco- and basidiomycetes, suggesting a link between the fungal way of life and the number of GSTs encoding sequences (Morel et al., 2009). Indeed, saprotrophic fungi such as *Phanerochaete chrysosporium* or the litter decomposing fungus *Coprinus cinereus* (27 and 32 GSTs encoding genes in their genomes respectively) exhibit a high number of GST encoding genes in comparison with symbiotic fungi or biotrophic pathogens. The fungal specific class GSTFuA is particularly concerned by these extensions. For instance, *Coprinus cinereus* possesses a high number of GSTFuA with 14 isoforms representing nearly the half of the total GST content with 32 coding sequences found in the genome of this fungus. In a recent study, we have characterized biochemically and structurally for the first time a member of this fungal specific class (PcGSTFuA1). PcGSTFuA1 displays unique structural and biochemical features, in particular ligandin properties linked to the G-site (Mathieu et al., 2012).

In this paper we report further investigation of the GSTFuA class. We have explored the diversity among this class using comparative genomic coupled to structural and biochemical approaches, and then demonstrate that the observed extension within this class is linked to evolutionnary adaptation to wood toxic compounds, at least in the both studied fungi, *Phanerochaete chrysosporium* and *Coprinus cinereus*.

Material and methods

- *Material* - Hydroxyethyldisulfide (HED) was from Pierce. 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA) was from Invitrogen. S-(phenylacetophenone)-glutathione (PAP-SG) and 2-methyl-S-glutathionyl-naphtoquinone (Menadione-SG) were synthesized as previously described (Meux et al., 2011). All other reagents were from Sigma-Aldrich.

- *Cloning of fungal GSTFUAs* - The open reading frame sequences encoding *P. chrysosporium* and *C. cinereus* proteins were amplified from cDNA libraries using forward and reverse primers in (Table 1), and cloned into the NcoI and BamHI restriction sites (underlined in the primers) of pET-3d (Novagen). The amplified sequence encodes a protein in which an alanine has been inserted after the initiator methionine to improve protein production.

- *Expression and purification of the recombinant proteins* - For protein production, the *Escherichia coli* BL21(DE3) strain, containing the pSBET plasmid, was co-transformed with the different recombinant plasmids (Schenk et al., 1995). Cultures were progressively amplified up to 2 L in LB medium supplemented with ampicillin and kanamycin at 37 °C. Protein expression was induced at exponential phase by adding 100 µM isopropyl β-D-thiogalactopyranoside for 4 h at 37 °C. The cultures were then centrifuged for 15 min at 4400 × *g*. The pellets were resuspended in 30 mL of TE NaCl (30 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl) buffer. Cell lysis was performed on ice by sonication (3 × 1 min with intervals of 1 min), and the soluble and insoluble fractions were separated by centrifugation for 30 min at 27,000 × *g* at 4°C. All subsequent steps were performed in the cold. The soluble part was then fractionated with ammonium sulfate in two steps, and the protein fraction precipitating between 40 and 80 % of the saturation contained the recombinant protein, as estimated by 15 % SDS-PAGE. The protein was purified by size exclusion chromatography after loading on an ACA44 (5 × 75 cm) column equilibrated in TE NaCl buffer. The fractions containing the protein were pooled, dialyzed by ultrafiltration to remove NaCl, and loaded onto a DEAE-cellulose column (Sigma) in TE (30 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) buffer. The proteins were eluted using a 0 – 0.4 M NaCl gradient. Finally, the fractions of interest were pooled, dialyzed, concentrated by ultrafiltration under nitrogen pressure (YM10 membrane; Amicon), and stored in TE buffer at -20 °C. Purity was checked by SDS-PAGE. Protein concentrations were determined spectrophotometrically using a molar extinction coefficient at 280 nm of 68870 $M^{-1}.cm^{-1}$ for PcGSTFuA1, 67380 $M^{-1}.cm^{-1}$ for PcGSTFuA2, 58900 $M^{-1}.cm^{-1}$ for PcGSTFuA3, 75860 $M^{-1}.cm^{-1}$ for PcGSTFuA4, 68410 $M^{-1}.cm^{-1}$ for CcGSTFuA2461, 67380 $M^{-1}.cm^{-1}$ for CcGSTFuA6800, 69900 $M^{-1}.cm^{-1}$ for CcGSTFuA6801 and 66350 $M^{-1}.cm^{-1}$ for CcGSTFuA 6820.

- *Sequence analysis* - All sequences were retrieved from the Joint Genome Institute (JGI) database (http://genome.jgi-psf.org/programs/fungi/index.jsf) from the fungal genomic program MycoCosm. The sequences have been obtained with Blastp using all P. chrysosporium PcGSTFuA sequences as template. Fungi showed in the phylogenetic analysis have been chosen according to their saprophytic properties. Sequence alignments have been done using ClustalW and phylogenetic analysis were conducted using ClustalW and MEGA5 (Neighbour-joining) programs respectively (Tamura et al., 2011).

- *Activity measurements* - The activities of purified proteins in in thiol transferase activity with hydroxyethyldisulfide (HED) assay or for reduction of dihydroascorbate (DHA) were performed as described by Couturier and coworkers (Couturier et al., 2009). The GSH transferase activity was assessed with phenethyl isothiocyanate (phenethyl-ITC) prepared in 2% (v/v) acetonitrile, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) and 4-nitrophenyl butyrate (PNP-butyrate) prepared in DMSO. For these three substrates the reactions were monitored respectively at 274 nm, 340 nm and 412 nm following the increase in absorbance arising from the formation of the S-glutathionylated adduct. The reactions with CDNB and PNP-butyrate were performed in 100 mM phosphate buffer, pH 7.5, in presence of GSH (5 mM) while the reaction with phenethyl-ITC was performed at pH 6.5 with an identical GSH concentration. Peroxidase activities were monitored as follows: 1 mM peroxide (hydrogen peroxide, terbutyl hydroperoxide and cumene hydroperoxide) in 30 mM Tris-HCl, pH 8.0, was incubated in presence of 2 mM GSH, 200 µM NADPH, 0.5 IU glutathione reductase. The activity was followed by monitoring the decrease in

absorbance arising from NADPH oxidation in this coupled enzyme assay system showing the formation of oxidized glutathione (GSSG). All the reactions were started by addition of the purified enzyme and monitored with a Cary 50 UV-Visible spectrophotometer (VARIAN). To determine the catalytic properties of the enzyme, steady state assays were performed using variable substrate concentrations (from 10 µM to 10 mM) and the catalytic parameters were calculated using the GraphPad® software.

- *8-anilino-1-naphtalene sulfonic acid (ANS) binding and ligand screening* – All binding and competition experiments were performed in TE buffer pH 8.0. ANS binding onto purified proteins was investigated by monitoring fluorescence upon addition of various ANS concentrations, depending on the enzyme, to 3 µM of protein using a fluorescence spectrophotometer Cary Eclipse (VARIAN). The excitation wavelength was set at 385 nm and the emission spectra recorded from 400 to 700 nm. Additional tryptophan-based fluorescence experiments were performed in presence or absence of ANS. After excitation at 290 nm, emission spectra were recorded from 305 to 550 nm. ANS binding into the H-site site was investigated in the same conditions with 50 µM CMFDA.

The correlation between ANS concentration and fluorescence yield was obtained by incubating, 100 µM of enzyme with 1 µM ANS, giving the maximal value for 1 µM ANS bound onto the protein. Fluorescence from samples containing ANS alone was subtracted as a background. Proteins were then incubated at a concentration of 3 µM with increasing ANS concentrations ranging from 0 to 1 mM. To determine the dissociation constant of ANS the following equation (Equation 1) was applied y = Bmax * [Free ANS]/(Kd + [Free ANS]) where y is the specific binding, i.e. the concentration of ANS bound per protein and Bmax the number of maximum specific binding sites.

Competition experiments were performed in a total volume of 250 µL containing 3 µM enzyme, ANS concentration depending on the enzyme, and various putative ligands (from 1 µM to 10 mM). Fluorescence emission from protein-free samples containing ANS and potential ligand were subtracted as background. A decrease in fluorescence, indicating competition between ligand and ANS, was measured after 10 min of incubation with excitation at 385 nm and emission at 475 nm on a VICTOR™ *X*5 plate reader (PerkinElmer). IC50 values were obtained by fitting data to the equation (Equation 2) Y=Bottom+(Top-Bottom)/(1+10^(Log[Ligand]-Log IC50)) where Y is the fluorescence signal observed after background subtraction, Top is the fluorescence signal of ANS without ligand and Bottom the fluorescence signal of ANS at the highest ligand concentration.

- *Esterase activity fluorescence based assays* - Esterase activity was measured in microplates using 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA) or 4-Methylumbelliferyl acetate (MUA) as substrates, whose cleavage release the fluorescent compounds fluorescein and 4-methylumbelliferone respectively. Experiments were performed on a VICTOR™ *X*5 plate reader (PerkinElmer) in 50 mM phosphate buffer pH 8.0 for CMFDA and 30 mM Tris-HCl buffer pH 8 for MUA. Both assays were carried out in a total volume of 200 µL. The reactions were started by addition of the purified enzyme and fluorescence was measured every minute for 1 hour with excitation at 485 nm and emission at 535 nm for CMFDA. For MUA, excitation and emission were at 355 nm and 460 nm respectively. Catalytic parameters were calculated using the GraphPad® software from steady state experiments performed without or with 5 mM GSH using substrate range from 0,25 to 50 µM for CMFDA and 100 to 800 µM for MUA.

- *Crystallization, Data Collection, Structure Determination, and Crystallographic Refinement* - Crystallization experiments of PcGSTFuA2 and PcGSTFuA3 were performed by the microbatch under oil (paraffin) method at 4°C and 20°C, respectively. Drops were prepared by mixing equal volumes (2 µl) of protein and precipitating agent solutions. TE buffered solutions of PcGSTFuA2 and PcGSTFuA3 had protein concentrations of 20 $mg.ml^{-1}$ and 28.3 $mg.ml^{-1}$, respectively. Suitable crystals for x-ray diffraction were obtained without optimization using Hampton crystallization screen 1. PcGSTFuA2 crystallized in condition 9 (0.2 M ammonium acetate, 0,1 M sodium citrate tribasic dehydrate, pH 5,6 and 30% w/v polyethylene glycol 4,000) and PCGSTFuA3 crystals were obtained in condition 34 (0.1 M sodium acetate trihydrate, pH 4.6, 2.0 M sodium formate solution). X-ray diffraction experiments were performed at 100 K where crystals were soaked briefly in crystallization solution supplemented with 20% (v/v) glycerol prior to flash cooling.

X-ray data sets were collected on beamline PROXIMA-1 at the French national Synchrotron facility SOLEIL (Gif-sur-Yvette, France). The data were indexed and processed using XDS (Kabsch, 2010) and scaled and merged with SCALA from the CCP4 program package (Evans, 2006; Winn et al., 2011). Both structures were solved by molecular replacement with MOLREP (Vagin and Teplyakov, 2010) using the coordinates of PcGSTFUA1 in unliganded form (Protein Data Bank code 4F03). The models were refined using PHENIX (Adams et al., 2010) interspersed with manual inspection and corrections using COOT (Emsley et al., 2010). The validation of both crystal structures was performed with MOLPROBITY (Chen et al., 2010). All figures were prepared with PyMOL. All statistics are available in Table 2.

Results

- *Evolutionary analysis of GSTFUA coding sequences* - The fungal genomic program Mycocosm on JGI is currently providing an increasing dataset of fungal genome sequences. GSTFuA coding sequences have been collected from JGI database in all available genomes of chytridiomycotina, mucoromycotina, saccharomycotina, pezizomycotina, puccinomycotina, ustilagomycotina and agaricomycotina. The number of GSTFuA sequences is highly variable between and inside fungal phyla and is not related to the number of predicted gene models in the genome (Supplemental table 1). Among ascomycotina, no GSTFuA sequence was identified in saccharomycotina genomes, while 0 to 6 sequences were found in pezizomycotina genomes. The same observation can be made for basidiomycotina, where GSTFuA sequences were only present in agaricomycotina genomes (from 0 to 17 sequences). The distribution of this GST class is thus not correlated to fungal taxonomy but more to fungal way of life since, for instance, wood interacting fungi exhibit 2 to 17 GSTFuA sequences according to the species, whereas pathogens display no GSTFuA sequences. Agaricomycotina species are distinguishable in particular by their way of life; some of them are quite simple organic matter decomposers and others are able to degrade more recalcitrant materials as wood (white rot or brown rot) and a few of them are symbiotic. A phylogenetic analysis of GSTFuA sequences has focused on these saprophytic basidiomycetes (Figure 1) as they exhibit huge difference in GSTFuA numbers. Since these sequences display homology with bacterial etherases (Lig) involved in lignin beakdown (Masai et al., 2003; Morel et al., 2009), Lig homologues from *Sphingomonas paucimobilis* have also been integrated in the analysis. Globally, the sequences cluster according to the organism and no specific subclass could be identified except for PcGSTFuA5 homologues. One

isoform has been identified for all species except *G. trabeum* and *P. strigosozonata.* Almost all the putative proteins of this group are predicted to be located to mitochondria, suggesting that they could have an important function in this organelle, which has been maintained during evolution. Conserved residues corresponding to the putative active sites are reported on figure 1. Most of the sequences exhibit a serine, which is known to be involved in the classical glutathionylation activity (Cummins et al., 2011). However, PcGSTFuA3, CcGSTFuA6820, PcGSTFuA5 and homologues possess instead a glycine, an asparagine and an alanine respectively, suggesting functional divergence (Figure 2). In previous work a sulfate binding pocket, involved in ANS recognition, has been identified in the crystal structure of PcGSTFuA1. The sulphate ion was located near the catalytic residue Ser-22 and was stabilised by the side chains of Tyr-46 and Arg-153. Globally these residues are well conserved among PcGSTFuAs except for PcGSTFuA5 and its homologues where they are absent and CcGSTFu2461 where the tyrosinyl residue has been replaced by a phenylalanine (Figure 2).

The main result of this phylogenetic analysis is that the GSTFuA content seems to be at least interspecific without any clear relationship with fungal taxonomy but rather to their way of life. Moreover, analysis of the putative GSTFuA content suggests that at least in some species, it could be intraspecific as observed for instance for Trichoderma sp (4 isoforms found in *T. reesei*, 6 in *T. viridens*). Additional investigation on the global GST content of *S. lacrymans*, which comprises two subgroups, (*S. lacrymans* var *shastensis* and *S. lacrymans* var *lacrymans*) reveals a possible compensatory effect between the GSTFuA and GST Phi classes. These two phylogenetically related fungi, which live in different habitats, harbour respectively 20/5 for var *lacrymans,* and 7/10 for var *shastensis,* GSTFuA/GST Phi sequences (Morel et al., unpublished). This variation might reflect an adaptation to wood construction materials of *var lacrymans* since its presence has only been signalled in buildings in temperate regions of Asia, Europe, North America and Oceania and is more aggressive than *var shastensis* (Schmidt, 2006).

- *Structural diversity of PcGSTFuAs* - PcGSTFuA2 crystallized in the space group $C222_1$ with three dimers in the asymmetric unit. Global NCS restraints were imposed during refinement because diffraction limit of the crystals was 3.1 Å. The structure of PcGSTFuA3 was solved at high resolution (2.1 Å) from crystals having the $P6_122$ space group with one polypeptide chain in the asymmetric unit. As assumed in our recent report (Mathieu et al., 2012) PcGSTFuA2, PcGSTFuA3 and PcGSTFuA1 share the same structure, which contains distinctive features when compared with canonical GST structure (Oakley, 2011) (Figure 3) : (*i*) a new mode of dimerization, (*ii*) an original β-hairpin (β2'β2'') that inhibits the formation of the regular GST dimer and acts as a lid over the G-site and (*iii*) a supplementary helix (α4'), between helices α4 and α5, that closes the presumed H-site.

In our recent report (Mathieu et al., 2012), we described the crystal structures of PcGSTFuA1 with and without GSH named apo and holo forms, respectively. The analysis of the models revealed significant conformational changes of the enzyme during GSH binding. On one hand the β-hairpin (β2'β2'') closes the G-site and a number of residues modify their side-chain conformations to interact with the glutathione. On the other hand two residues open slightly within the H-site by changing their lateral-chain conformations. Structural superimpositions of apo/holo PcGSTFuA1, PcGSTFuA2 and PcGSTFuA3 unambiguously showed that PcGSTFuA2 and PcGSTFuA3 were in the holo conformation in the conditions used. However, in both

structures, the electron density maps revealed no peak assignable to glutathione. The observed holo conformation can be explained by the presence of crystallization agent molecules in the G sites, which mimics the GSH bound. A citrate moiety and 3 formate molecules were assigned in the PcGSTFuA2 and PcGSTFuA3 structures, respectively.

The distance plot, which compares superposed structures of holo PcGSTFuA1 and PcGSTFuA2 (Supplemental Figure 1), reveals no big differences. The largest is localized in the center of the helix α4 where a residue is inserted in PcGSTFuA2 sequence (Figures 2 and 3). This difference results in a disruption of helix α4 continuity. This secondary structure must be considered as two helices in PcGSTFuA2 (α4A and α4B, Figure 3). It is worth noting that the disruption region is near the presumed enzyme H-site. This structural diversity could explain functional varieties between PcGSTFuA1 and PcGSTFuA2. The distance plot, which compares holo PcGSTFuA1 and PcGSTFuA3, revealed a significant difference in the β1-α1 loop. This structural diversity can be attributed to the low sequence identity between PcGSTFuA1 and PcGSTFuA3 in this region and to a one-residue shorter loop in PcGSTFuA3 (Figures 2 and 3). The β1-α1 loop in PcGSTFuA3 is longer than that of almost all GSTs and reduces the solvent accessibility of the H-site as observed for β1-α1 loop in PcGSTFuA1 (Mathieu et al., 2012).

The comparison of the quaternary structures of PcGSTFuA1 and PcGSTFuA2 revealed no significant difference. However, the V-shaped PcGSTFuA3 dimer is roughly 5° smaller than that observed in PcGSTFuA1. Among the two hydrophilic patches involved in dimer stabilization, only one consists of residues conserved in both isoforms. The consequence is an increase of the number of intermolecular hydrogen bonds from 5 (in PcGSTFuA1 dimer) to 12 (in PcGSTFuA3) and therefore an assumed increase of the dimer stability. The residues involved in the hydrophobic lock-and-key motif are well conserved in PcGSTFuA1, PcGSTFuA2 and PcGSTFuA3.

In the active site, Ser-22 (PcGSTFuA1 numbering), which catalyses the GSH addition on ITC in PcGSTFuA1, is present in PcGSTFuA2 but absent in PcGSTFuA3 (Figure 2). However, Asn-24 (PcGSTFuA1 numbering), which has been assumed to be involved in the peroxidase activity of PcGSTFuA1, is conserved in the three isoforms. This residue exhibits the same conformation in all three structures (Figure 4). Comparison of the active sites revealed that the residues involved in the GSH and in the sulphate binding sites are well conserved and could play the same role in the three isoforms. In the structure of PcGSTFuA2, a citrate molecule mimics the binding of GSH glycyl moiety. The citrate stabilization involve the main chains of Tyr-71 and Val-73 and the side-chains of Tyr-46, His-70 and Arg154 (Figure 4B). In PcGSTFuA3, four formate ions mimic the binding of the two GSH carboxylate groups, the GSH thiolate group and the sulphate ion (Figure 4C). The structural variability is rather localized in the presumed electrophilic substrate binding site even though most of the residues are hydrophobic in the three isoforms. The local structure diversity is highlighted in figures 4A-C.

- *Diversity of GSTFuAs activities* - To investigate the function of this GST class, *P. chrysosporium*, which possess 5 isoforms, and *C. cinereus* have been chosen. In this latter, we purified 4 isoforms over the 14 encoded in the genome, these isoforms being chosen to represent the general diversity observed in primary sequence. PcGSTFuA1 and PcGSTFuA2 genes are tandemly organized in the genome as CcGSTFuA6800 and CcGSTFuA6801 encoding genes arising from recent duplication events. The enzymes were produced in *E.*coli and purified except PcGSTFuA5 since no expression of the

corresponding gene was obtained whatever the tested culture conditions (solid or liquid cultures, static or agitated conditions, rich (malt) or minimal medium, wood or anthracene as substrate).

Glutathionylation activity of the recombinant enzymes have been tested using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), phenethyl isothiocyanate (phenethyl-ITC), 4-nitrophenyl butyrate (PNP-butyrate) and 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA) as substrates. CMFDA is a molecule releasing fluorescence upon activation by esterases (Zhang et al., 2011). PcGSTFuAs, although clustering together in the phylogenetic tree, exhibited various catalytic patterns, especially PcGSTFuA1 and PcGSTFuA2 that share 74% of sequence identity (Table 3). Indeed, PcGSTFuA1 displayed various activities contrary to PcGSTFuA2 who was weakly active only towards CMFDA in presence of GSH. Moreover, PcGSTFuA1 and PcGSTFuA3 were active as GSH transferase with phenetyl-isothiocyanate and PNP-butyrate. None of PcGSTFuAs exhibited thiol transferase activity using HED and DHA as substrates. PcGSTFuA3 exhibited a different pattern of activities being also able to act specifically against cumene hydroperoxide. As shown by previous work (Mathieu et al., 2012), PcGSTFuA1 displayed two types of esterase activity on CMFDA, one with and another one without GSH. This feature is no more shared by the others PcGSTFuAs as they exhibited this esterase activity only in presence of GSH (Table 3).

As for PcGSTFuAs, activities of CcGSTFuA against classical GST substrates and CMFDA have been tested (Table 3). CcGSTFuA2461, CcGSTFuA6800 and CcGSTFuA6801 were active as GSH transferase against phenethyl-ITC, but only CcGSTFuA2461 and CcGSTFuA6801 were active with the universal GST substrate CDNB. None of the recombinant enzymes were active as thiol transferase against HED or DHA. Interestingly only CcGSTFuA6801 was able to cleave the ester linkage of PNP-butyrate. As for PcGSTFuA1, CcGSTFuA6800 and CcGSTFuA6801 were able to act against CMFDA in absence or presence of GSH. Intriguingly, CcGSTFuA6820 remained inactive whatever the substrate assessed, but was correctly folded as shown by ANS binding test (Figure 5).

Unfortunately, even if the homologue of PcGSTFuA5 (CcGSTFuA6672) was successfully amplified and expressed in *E.coli*, the resulting protein remained insoluble despite various tested protocols, avoiding biochemical characterization of any isoform belonging to this subclass.

These results illustrate that, although clustering together by organism after phylogenetic analysis, the GSTFuAs display various catalytic patterns suggesting functional divergence within this class in saprotrophic fungi.

- *ANS binding* - 8-anilino-1-naphtalene sulfonic acid (ANS) is an environment sensitive fluorescent dye, the fluorescence quantum yield of which increases upon binding to hydrophobic sites of proteins (Schonbrunn et al., 2000). This probe has been successfully used to characterize the ligandin properties of PcGSTFuA1 (Mathieu et al., 2012). Using a similar approach, we have tested ANS binding onto the different produced proteins. In all cases, ANS binding onto GSTFuAs was accompanied by the appearance of a characteristic fluorescence emission spectrum with a maximum at 475 nm, the excitation wavelength being fixed at 385 nm. The fluorescence signal, resulting from the interaction between GSTFuAs and ANS, was established rapidly in less than 30 seconds and increased with the molar ratio of ANS revealing a saturation curve. For higher ANS concentrations, depending on the isoform investigated, a loss of signal was observed as previously shown using PcGSTFuA1 (Mathieu et al., 2012) or for BSA and MurA (Schonbrunn et al., 2000). Dissociation constants were obtained by plotting concentration of ANS bound onto GSTFuAs against concentration of free ANS

and the number of binding sites was determined by fitting data to Equation 1 detailed in materials and methods section (Figure 5). Globally, all GSTFuAs were able to bind ANS, however with some particularities depending on the considered isoform. For PcGSTFuAs the number of binding sites was approximately equal to 1, demonstrating the binding of one ANS molecule per monomer, whereas CcGSTFuAs exhibited values below 0,70 suggesting a lower affinity of these *C. cinereus* isoforms towards the probe.

ANS binding site onto PcGSTFuA1 has been shown to overlap the glutathione binding site (Mathieu et al., 2012). In a same way, GSH presence inhibits ANS binding onto PcGSTFUAs and CcGSTFuA6801. The IC50 values determined after having fitted the obtained data to equation 2 (see in materials and methods section) are reported in figure 5. These measured values are in accordance with the Km of GSH found in the enzymatic assays for PcGSTFUA1/3 and CcGSTFUA6801. In addition, PAP-SG and Menadione- SG were able to inhibit ANS binding only for PcGSTFuAs, while the same compound deprived of the GSH adduct could not. These results demonstrate that ANS binding overlap at least partially the glutathione binding site onto PcGSTFuAs while for CcGSTFuAs this peculiar feature is not conserved anymore since, except for CcGSTFuA6801, GSH or glutathionylated compounds did not inhibit ANS binding.

To pursue the characterization of the ANS binding site onto PcGSTFuA, we used the fluorescence properties of tryptophan (Figure 6). Tryptophan fluorescence of PcGSTFuAs was measured using 290 nm and 340 nm as excitation and emission wavelengths respectively in presence or absence of ANS. Fluorescence resonance energy transfer (FRET), revealed by the appearance of a signal at 475 nm, was observed between Trp and ANS confirming the binding of ANS onto the proteins, the energy transfer being highly dependent on the distance between the donor and acceptor molecules. Taking advantage of the FRET phenomena in presence of ANS, competition experiments have been performed to investigate possible overlapping between the H-site and ANS binding site. As shown by enzymatic activities all PcGSTFuAs exhibit a high affinity for CMFDA with GSH (Table 3). ANS binding onto PcGSTFuAs remained unaltered in presence of CMFDA demonstrating the ANS binding site does not interfere with substrate (as CFMDA) binding site. (Figure 6). Taken together these results suggest that specific ANS binding into the G-site, as described previously for PcGSTFuA1, is a well-conserved feature among this class in *P.chrysosporium.* For PcGSTFUAs, ANS does indeed not compete with the substrate binding site, but overlaps the G-site as demonstrated using GSH and glutathionylated compounds competition experiments. In contrast, for CcGSTFUAs, this feature is not so conserved as shown by the lack of competition for protein binding between GSH and ANS in these isoforms, except for CcGTSFuA7903, or between ANS and glutathionylated compounds.

- *Diversity of PcGSTFuAs Ligandin properties* - Using ANS as a screening tool, competition experiments have been performed with 11 structurally variable beech compounds. As for enzymatic activites, PcGSTFuAs exhibited various ligandin profiles (Table 4). PcGSTFuA1 was able to bind 7 compounds; PcGSTFuA4 was able to bind 3 of them while PcGSTFuA2/3 were able to bind 4. Among these products, those recognized by all PcGSTFuAs are small aldehydes. Steric hindrance is indeed a factor influencing ligand binding since epicatechin and catechin hydrate, two of the largest compounds used, are both bound by PcGSTFuA1 but not by other PcGSTFuAs.

- *Diversity of GSTFuAs Ligandin properties* - 4-Methylumbelliferyl acetate (MUA) requires the cleavage of one ester bond

before its detection by fluorescence. Interestingly, all GSTFuAs were able to activate MUA exhibiting also esterase activity without glutathione, however with a very small catalytic efficiency (Table 5). Moreover, the only enzyme inactive in enzymatic assays (CcGSTFUA7927) turned out to be active against this compound without GSH, demonstrating that it still possess the ability to recognize hydrophobic compounds. Addition of glutathione with MUA led to two distinct behaviours; (i) a lost of the ability to cleave ester bond (CcGSTFuA2842, CcGSTFuA7927 and PcGSTFuA4), or a strong alteration of their affinity towards MUA, as shown by the increase from 4 to 10 fold of the Km apparent values (Table 5) (ii) a strong increase in catalytic efficiency upon GSH addition without alteration of the apparent affinity towards MUA (CcGSTFuA7903, PcGSTFuA1).

These results demonstrate that excepting CcGSTFuA7903 and PcGSTFuA1, MUA and glutathione binding sites overlap at least partially onto the tested proteins. Taking together, with the notable exception of CcGSTFuA7903, our results suggest that the ligandin function linked to the G-site is conserved in the GSTFu class.

Discussion

In this paper, we showed by comparative genomics that the GSTFuA class is widely distributed among Agaromycotina. However no clear relationship could be established linking the saprophytic properties nor the wood decaying machinery of the fungi (brown rot versus white rot) and the extension of this class. Among saprotrophic basidiomycetes, GSTFuAs cluster according to the taxonomy suggesting a recent diversification of this fungal class as it was already observed for the Ure2p class (Thuillier et al., 2011). Nevertheless, the ubiquity of GSTFuAs among saprotrophic basidiomycetes could suggest putative conservation among these organisms requiring further functional investigations. For this purpose we purified 8 isoforms from the white rot *P.chrysosporium* and the litter decomposing fungi *C.cinereus*. The crystallographic structures of three isoforms of *P.chrysosporium* were investigated and enzymatic assays were performed on the 8 proteins. These studies demonstrated a huge catalytic versatility of GSTFuAs with a small structural diversity, which nevertheless, can explain the large enzymatic spectrum.

Indeed GSTFuAs exhibited different catalytic profiles being able to act as GSH transferases, peroxidases and also esterases. However none presented thiol transferase activity. Surprisingly, three isoforms were inactive against the classical tested GSTs substrates, with nevertheless a weak esterase activity against CMFDA for two of them. Sequence alignment of these three isoforms indicates a conserved serine/asparagine at the same position than the GSTFuA1 catalytic serine. This residue is involved in glutathionylation activity of GSTFuA1 (Mathieu et al., 2012), while the asparagine might be involved in the peroxidase activity of *Saccharomyces cerevisiae* Ure2p (Zhang et al., 2008). The inability of these enzymes to act efficiency as transferases raises the question of their function in the fungal cell.

One particular feature of PcGSTFuA1 is the presence of a ligand binding site overlapping the G-site (Mathieu et al., 2012). Here we show by ANS binding and competition experiments that this ability has been retained in the studied PcGSTFuAs. Indeed for all PcGSTFuAs the stoichiometry of ANS bound per monomer (determined after Scatchard analysis) was close to unity. Moreover, competition experiments demonstrated that GSH, glutathionylated compounds and wood degradation products were able to displace ANS demonstrating its location onto the G-site as in PcGSTFuA1. Additional, tryptophan based fluorescence

experiments demonstrated that substrate binding site and ANS binding site did not overlap in PcGSTFuAs. As for enzymatic activities, PcGSTFuAs exhibited versatility in this ligandin property. Variations of this ligandin property were also highlighted by addition of GSH with the substrate MUA. All GSTFuAs in this study recognized this compound, and addition of GSH increased from 4 to 10 fold the apparent Km of the probe indicating a several alteration of the recognition. In some cases a total inhibition of esterase activity towards MUA was observed demonstrating an overlap between MUA and GSH for the G-site in a same way as for ANS and GSH onto GSTFuAs.

These results demonstrate that evolution of multigenic families, and especially GSTs, implies a specialization of the various isoforms. Indeed, GSTs are often referred to as promiscuous enzymes with low specificity. Here our data suggest one clear primary function (conjugation of GSH towards phenethyl-ITC) together with some other low levels activities (peroxidase or esterase), which can be regarded as a vestige of the broad specificity of ancestors or as a diversification resulting from recent mutational events. Another conserved function among GSTFuAs is the ligandin property of the G-site towards various compounds with promiscuity as well as versatility. GSTs being detoxification enzymes, they reflect the varying nature of the environment in which organisms need to survive. This statement is especially true for saprophytic fungi since wood is a complex substrate. Its decomposition by fungi leading to numerous phenolic compounds originated from lignin are influenced by wood chemical and anatomical traits (Cornwell et al., 2009). These changes in chemical composition and their heterogeneity implies that fungi must develop a way to respond to the myriad of toxic wood compounds resulting from the variability observed from one tree to another. For this purpose, GSTFuAs seems to adopt a strategy based on the recognition more than conjugation of these compounds. Indeed, some isoforms were unable to conjugate GSH into the tested hydrophobic compounds and possessed only a ligandin property. This variability observed among GSTFuAs might have been driven by survival strategies to provide a superior metabolic system to degrade/cope plant-related compounds including lignin and/or its derivatives as it has already been observed for cytochromes P450 monooxygenases (P450) of *P. chrysosporium* (Hirosue et al., 2011). Another example of driven evolution concerns the plant-insect P450s. Plants have evolved P450s implicated in biosynthesis pathways of secondary metabolites as defence against insects while insects have evolved P450s to counter the toxic effects of these plants metabolites. Both evolutionary pathways involve intensive gene duplications and mutations resulting in alteration of substrate range and catalytic properties (Schuler, 2011).

In conclusion, we postulate that the versatility and promiscuity of the extended GSTFuA class in saprotrophic fungi reflects the adaptation of these organisms to ecological pressure induced by chemical variability observed in wood.

Acknowledgments – The authors would like to thank the staff of the the Proxima 1 beamline at SOLEIL (Gif-sur-Yvette, France) for their kind assistance during data collection.

REFERENCES

Adams P. D., Afonine P. V., Bunkóczi G., Chen V. B., Davis I. W., Echols N., Headd J. J., Hung L. W., Kapral G. J., Grosse-Kunstleve R. W., McCoy A. J., Moriarty N. W., Oeffner R., Read R. J., Richardson D. C., Richardson J. S., Terwilliger T. C. and Zwart P. H., (2010). PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**. (66): 213-221.

Chen V. B., Arendall Iii W. B., Headd J. J., Keedy D. A., Immormino R. M., Kapral G. J., Murray L. W., Richardson J. S. and Richardson D. C., (2010). MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**. (66): 12-21.

Conn S., Curtin C., Bezier A., Franco C. and Zhang W., (2008). Purification, molecular cloning, and characterization of glutathione S-transferases (GSTs) from pigmented *Vitis vinifera* L. cell suspension cultures as putative anthocyanin transport proteins. **J Exp Bot**. (59): 3621-3634.

Cornwell W. K., Cornelissen J. H. C., Allison S. D., Bauhus J., Eggleton P., Preston C. M., Scarff F., Weedon J. T., Wirth C. and Zanne A. E., (2009). Plant traits and wood fates across the globe: rotted, burned, or consumed? **Global Change Biology**. (15): 2431-2449.

Couturier J., Koh C. S., Zaffagnini M., Winger A. M., Gualberto J. M., Corbier C., Decottignies P., Jacquot J. P., Lemaire S. D., Didierjean C. and Rouhier N., (2009). Structure-function relationship of the chloroplastic glutaredoxin S12 with an atypical WCSYS active site. **J Biol Chem**. (284): 9299-9310.

Cummins I., Dixon D. P., Freitag-Pohl S., Skipsey M. and Edwards R., (2011). Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. **Drug Metab Rev**. (43): 266-280.

Edwards R. and Dixon D. P., (2005). "Plant Glutathione Transferases". In: Helmut S. and Lester P. Methods in Enzymology. Academic Press: 169-186.

Emsley P., Lohkamp B., Scott W. G. and Cowtan K., (2010). Features and development of Coot. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**. (66): 486-501.

Evans P., (2006). Scaling and assessment of data quality. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**. (62): 72-82.

Hayes J. D., Flanagan J. U. and Jowsey I. R., (2005). Glutathione transferases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. (45): 51-88.

Hirosue S., Tazaki M., Hiratsuka N., Yanai S., Kabumoto H., Shinkyo R., Arisawa A., Sakaki T., Tsunekawa H., Johdo O., Ichinose H. and Wariishi H., (2011). Insight into functional diversity of cytochrome P450 in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of versatile monooxygenase. **Biochem Biophys Res Commun**. (407): 118-123.

Kabsch W., (2010). XDS. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**. (66): 125-132.

Ketterman A. J., Saisawang C. and Wongsantichon J., (2011). Insect glutathione transferases. **Drug Metabolism Reviews**. (43): 253-265.

Mannervik B., (2012). Five decades with glutathione and the GSTome. **J Biol Chem**. (287): 6072-6083.

Masai E., Ichimura A., Sato Y., Miyauchi K., Katayama Y. and Fukuda M., (2003). Roles of the enantioselective glutathione S-transferases in cleavage of beta-aryl ether. **J Bacteriol**. (185): 1768-1775.

Mathieu Y., Prosper P., Buee M., Dumarcay S., Favier F., Gelhaye E., Gerardin P., Harvengt L., Jacquot J. P., Lamant T., Meux E., Mathiot S., Didierjean C. and Morel M., (2012). Characterization of a *Phanerochaete chrysosporium* glutathione transferase reveals a novel structural and functional class with ligandin properties. **J Biol Chem**.

McGoldrick S., O'Sullivan S. M. and Sheehan D., (2005). Glutathione transferase-like proteins encoded in genomes of yeasts and fungi: insights into evolution of a multifunctional protein superfamily. **FEMS Microbiol Lett**. (242): 1-12.

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

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

Oakley A., (2011). Glutathione transferases: a structural perspective. **Drug Metab Rev**. (43): 138-151.

Schenk P. M., Baumann S., Mattes R. and Steinbiss H. H., (1995). Improved high-level expression system for eukaryotic genes in *Escherichia coli* using T7 RNA polymerase and rare ArgtRNAs. **Biotechniques**. (19): 196-198, 200.

Schmidt O., (2006). Wood and Tree Fungi. Springer Verlag, Berlin/Heidelberg, Germany.

Schonbrunn E., Eschenburg S., Luger K., Kabsch W. and Amrhein N., (2000). Structural basis for the interaction of the fluorescence probe 8-anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS) with the antibiotic target MurA. **Proc Natl Acad Sci U S A**. (97): 6345-6349.

Schuler M. A., (2011). P450s in plant-insect interactions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**. (1814): 36-45.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. and Kumar S., (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Mol Biol Evol**. (28): 2731-2739.

Thuillier A., Ngadin A. A., Thion C., Billard P., Jacquot J. P., Gelhaye E. and Morel M., (2011). Functional diversification of fungal glutathione transferases from the ure2p class. **Int J Evol Biol**. (2011): 938308.

Vagin A. and Teplyakov A., (2010). Molecular replacement with MOLREP. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**. (66): 22-25.

Winn M. D., Ballard C. C., Cowtan K. D., Dodson E. J., Emsley P., Evans P. R., Keegan R. M., Krissinel E. B., Leslie A. G. W., McCoy A., McNicholas S. J., Murshudov G. N., Pannu N. S., Potterton E. A., Powell H. R., Read R. J., Vagin A. and Wilson K. S., (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**. (67): 235-242.

Zhang J., Shibata A., Ito M., Shuto S., Ito Y., Mannervik B., Abe H. and Morgenstern R., (2011). Synthesis and Characterization of a Series of Highly Fluorogenic Substrates for Glutathione Transferases, a General Strategy. **Journal of the American Chemical Society**. (133): 14109-14119.

Zhang Z. R., Bai M., Wang X. Y., Zhou J. M. and Perrett S., (2008). "Restoration" of glutathione transferase activity by single-site mutation of the yeast prion protein Ure2. **J Mol Biol**. (384): 641-651.

FOOTNOTES

* This work was supported by CIFRE and the Agence Nationale de la Recherche (ANR) research grant (ANR-09-BLAN-0012), the Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de la Technologie, the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

The abbreviations used are: ANS, 8-anilino-1-naphtalene sulfonic acid; CDNB, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene; CMFDA, 5-chloromethylfluorescein diacetate; DHA, dihydroascorbate; DMSO, dimethyl sulfoxide, GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; GST, glutathione-S-transferase; GSTFuA, glutathione-S-transferase Fungal specific class A; HED, hydroxyethyldisulfide; JGI, Joint Genome Institute; MUA, 4-methylumbelliferyl acetate; NADPH, reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; phenethyl-ITC, phenethyl isothiocyanate; PAP-SG, S-(phenylacetophenone)-glutathione; PNP-butyrate, paranitrophenyl butyrate

TABLES

Table 1. Primers used in this study.

The *Nco*I and *Bam*HI cloning restriction sites are underlined in the primers.

	Sequence
PcGSTFUA1 for	5' CCCCCCATGGCTCAGCCCATCGTGTTC 3'
PcGSTFUA1 rev	5' CCCCGGATCCCTATACATCAACCTGCTC 3'
PcGSTFUA2 for	5' CCCCCATGGCTTCCCAGCCCATTGTCTTC 3'
PcGSTFUA2 rev	5' CCCCGGATCCTTAGTCATCTGCCCGCTC 3'
PcGSTFUA3 for	5' CCCCCATGGCTTCCCTCGAGCCCATCATC 3'
PcGSTFUA3 rev	5' CCCCGGATCCCTAGACGTCTACGAACTC 3'
PcGSTFUA4 for	5' CCCCCATGGCCGATGTTATCACCCTGTACG 3'
PcGSTFUA4 rev	5' CCCCGGATCCCTACAGGTCTACATGCGC 3'
CcGSTFUA2842 for	5' CCCCCCCATGGCAATAACCTTCTACGACCTA 3'
CcGSTFUA2842 rev	5' CCCCCGGATCCTACAATTTACTTCCCGT 3'
CcGSTFUA7902 for	5' CCCCCCCATGGCAATTATACTATACGACCTC 3'
CcGSTFUA7902 rev	5' CCCCCGGATCCTTACACAACAGTAGTATA 3'
CcGSTFUA7903 for	5' CCCCCCCATGGCAATCACCTTCTACGATATC 3'
CcGSTFUA7903 rev	5' CCCCCGGATCCTTATGCGACAGTGTGATA 3'
CcGSTFUA7927 for	5' CCCCCCCATGGCAATCACCCTCTACGACTCC 3'
CcGSTFUA7927 rev	5' CCCCCGGATCCTAATGAACAGCCTGATA 3'

Table 2. Statistics of X-ray diffraction data collection and model refinement

	PcGSTFuA2	PcGSTFuA3
Data collection		
Beam line	PX1, SOLEIL	PX1, SOLEIL
Space group	$C222_1$	$P2_12_12_1$
Number of dimers in the ASU [a]	3	0.5
Cell dimensions a, b, c (Å)	100.28 202.19 192.49	87.00 87.00 225.70
Resolution (Å)	48.89-3.07 (3.24-3.07) [b]	45.16-2.10 (2.21-2.10)
Rmerge	0.12 (0.85)	0.064 (0.51)
Mean I/σ (I)	16.1 (2.7)	25.1 (4.0)
Completeness (%)	100.0 (100.0)	99.5 (99.4)
n observations	250,783 (37,085)	441,971 (42,972)
Redundancy	6.8 (6.2)	14.5 (10.2)
Wilson B factor (Å^2)	85.2	35.5
Phasing method [c]	**MR**	**MR**
Refinement		
Resolution (Å)	48.96-3.20 (3.30-3.20)	45.16-2.10 (2.17-2.10)
n reflections	32,676 (2,679)	30,346 (2,576)
Cutoff	$F > 0\sigma(F)$	$F > 0\sigma(F)$
Rall (%) [d]	20.6	22.2
Rfree (%) [d]	24.6 (32.9)	25.9 (39.7)
Average B-factor (Å^2)		
Protein atoms	53.5	34.3
Ligand atoms	50.1	45.3
Solvent atoms	-	37.3
Ramachandran statistics (%)		
Residues in preferred regions	95.4	96.4
Residues in allowed regions	4.00	3.2
Outlier residues	0.6	0.4
R.m.s.[e] deviations		
Bond length (Å)	0.016	0.008
Bond angle (°)	1.467	1.165

[a] ASU : Asymmetric unit.
[b] Values in parentheses are for highest resolution shell.
[c] MR : Molecular Replacement.
[d] *R*all was determined from all the reflections (working set + test set), whereas *R*free corresponds to a subset of reflections (test set).
[e] R.m.s. : Root mean square.

Table 3. Kinetic parameters of PcGSTFuAs and CcGSTFuAs in enzymatic assays.

The apparent Km values for all compounds were determined using a concentration range of 0.1-10 mM in the presence of 5 mM GSH. The Km value for GSH was determined with 1 mM Phenethyl-ITC for PcGSTFuA1, PcGSTFuA3, CcGSTFuA2461, CcGSTFuA6801 and 50 µM CMFDA for CcGSTFuA6800 with a concentration range of 0.01 to 10 mM GSH. The apparent K_m and k_{cat} values were calculated by nonlinear regression using the Michaelis-Menten equation (r^2>0.99). Data are represented as mean ± S.D. (n ± 3). ND: Not Detected. The detection limit was estimated at 0.5 mUI.

Km (µM)	PcGSTFuA1	PcGSTFuA2	PcGSTFuA3	PcGSTFuA4	CcGSTFuA2461	CcGSTFuA6800	CcGSTFuA6801	CcGSTFuA6820
CDNB	ND	ND	ND	ND	4205 ± 557	ND	1172 ± 84.96	ND
Tertbutyl	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cumen	ND	ND	2037 ± 556	ND	ND	ND	ND	ND
H2O2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
HED	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
DHA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ITC	119.0 ± 14.4	ND	53.16 ± 5.37	ND	191.2 ± 17.8	2431 ± 254	41.56 ± 3.73	ND
PNP-butyrate	774.3 ± 88.3	ND	612.6 ± 81.1	ND	ND	ND	177.7 ± 8.9	ND
CMFDA (-GSH)	3.6 ± 0.6	ND	ND	ND	ND	0.153 ± 0.023	0.945 ± 0.074	ND
CMFDA (+GSH)	8.0 ± 0.8	1.07 ± 0.16	5.1 ± 0.5	1.442 ± 0.07	ND	5.05 ± 1.29	3.13 ± 0.73	ND
GSH	216.4 ± 34.9	ND	21.1 ± 3.6	ND	435.0 ± 29.4	474.9 ± 43.8	167.3 ± 10.5	ND

kcat (min^{-1})	PcGSTFuA1	PcGSTFuA2	PcGSTFuA3	PcGSTFuA4	CcGSTFuA2461	CcGSTFuA6800	CcGSTFuA6801	CcGSTFuA6820
CDNB	ND	ND	ND	ND	443.2 ± 39.6	ND	251.9 ± 8.1	ND
Tertbutyl	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cumen	ND	ND	76.70 ± 9.78	ND	ND	ND	ND	ND
H2O2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
HED	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
DHA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ITC	510.9 ± 16.0	ND	130.9 ± 2.9	ND	368.1 ± 10.3	469.2 ± 29.9	1065.0 ± 20.2	ND
PNP-butyrate	165.0 ± 5.6	ND	246.5 ± 10.2	ND	ND	ND	115.7 ± 1.4	ND
CMFDA (-GSH)	0.006 ± 0.0002	ND	ND	ND	ND	0.123 ± 0.003	0.343 ± 0.005	ND
CMFDA (+GSH)	0.17 ± 0.04	0.033 ± 0.001	0.65 ± 0.02	0.002 ± 0.0001	ND	0.39 ± 0.05	0.85 ± 0.08	ND
GSH	662.0 ± 14.2	ND	52.33 ± 1.68	ND	46.01 ± 2.45	37.15 ± 1.6	31.95 ± 0.53	ND

kcat/Km ($min^{-1}/\mu M^{-1}$)	PcGSTFuA1	PcGSTFuA2	PcGSTFuA3	PcGSTFuA4	CcGSTFuA2461	CcGSTFuA6800	CcGSTFuA6801	CcGSTFuA6820
CDNB	ND	ND	ND	ND	0.11 ± 0.07	ND	0.21 ± 0.09	ND
Tertbutyl	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cumen	ND	ND	0.037 ± 0.017	ND	ND	ND	ND	ND
H2O2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
HED	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
DHA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ITC	4.3 ± 0.3	ND	2.46 ± 0.54	ND	1.92 ± 0.58	0.19 ± 0.11	25.62 ± 5.41	ND
PNP-butyrate	0.21 ± 0.01	ND	0.40 ± 0.12	ND	ND	ND	0.65 ± 0.16	ND
CMFDA (-GSH)	0.0017 ± 0.0002	ND	ND	ND	ND	0.82 ± 0.13	0.36 ± 0.06	ND
CMFDA (+GSH)	0.021 ± 0.002	0.031 ± 0.006	0.13 ± 0.04	$1.39*10^{-3}$ ± $0.14*10^{-3}$	ND	0.077 ± 0.038	0.27 ± 0.11	ND
GSH	3.1 ± 0.4	ND	2.48 ± 0.47	ND	0.11 ± 0.08	0.078 ± 0.036	0.19 ± 0.05	ND

Table 4. Competition experiments between ANS and wood compounds.

Values given are IC50 fluorescence inhibition obtained by fitting data to equation 2 described in material and methods.

	PcGSTFUA1	PcGSTFUA2	PcGSTFUA3	PcGSTFUA4
Coniferaldehyde	62.3 ± 1.2 µM	115.6 ± 44.1 µM	68.4 ± 25.3 µM	146.6 ± 5.1 µM
Vanillin	217.8 ± 8.5 µM	84.7 ± 5.2 µM	134.0 ± 7.6 µM	308.9 ± 29.3 µM
Methoxybenzophenone	-	-	-	-
4-chloro-3-nitrobenzoic acid	1.5 ± 0.1 mM	1.3 ± 0.2 mM	234.7 ± 56.7 µM	-
4'-hydroxyacetophenone	2.2 ± 0.4 mM	-	-	-
Gallic acid	-	-	-	-
Vanillic acid	-	-	-	-
Epicatechin	1.6 ± 0.1 mM	-	-	-
Syringaldehyde	62.5 ± 1.6 µM	89.3 ± 2.8 µM	37.2 ± 3.8 µM	198.5 ± 25.2 µM
Catechin hydrate	575.3 ± 98.7 µM	-	-	-
Metoxycinnamic	-	-	-	-

Table 5. Kinetic parameters of PcGSTFuAs and CcGSTFuAs towards MUA in absence or presence of GSH.

The apparent Km values were determined using a concentration range of 100-800 µM in absence (-GSH) or presence of 5 mM GSH (+ GSH). The apparent K_m and k_{cat} values were calculated by nonlinear regression using the Michaelis-Menten equation (r^2>0.99). Data are represented as mean ± S.D. (n ± 3). ND: Not Detected. The detection limit was estimated at 0.5 mUI.

Km (µM)	PcGSTFUA1	PcGSTFUA2	PcGSTFUA3	PcGSTFUA4
MUA (-GSH)	262.8 ± 33.7	23.5 ± 6.2	33.89 ± 4.78	51.56 ± 7.09
MUA (+GSH)	206.7 ± 23.3	216.1 ± 45.2	372.1 ± 53.9	N.D

kcat (min^{-1})	PcGSTFUA1	PcGSTFUA2	PcGSTFUA3	PcGSTFUA4
MUA (-GSH)	0.095 ± 0.004	0.302 ± 0.006	0.182 ± 0.003	0.208 ± 0.004
MUA (+GSH)	57.83 ± 2.90	1.27 ± 0.14	29.65 ± 2.36	N.D

kca/Km (min^{-1}/um^{-1})	PcGSTFUA1	PcGSTFUA2	PcGSTFUA3	PcGSTFUA4
MUA (-GSH)	$0.36*10^{-3} \pm 0.12*10^{-3}$	0.0128 ± 0.0001	$5.37*10^{-3} \pm 0.62*10^{-3}$	$4.03*10^{-3} \pm 0.56*10^{-3}$
MUA (+GSH)	0.28 ± 0.12	$5.87\ 10^{-3} \pm 3.1\ 10^{-3}$	0.079 ± 0.044	N.D

Km (µM)	CcGSTFuA2461	CcGSTFuA6800	CcGSTFuA6801	CcGTSFuA6820
MUA (-GSH)	38.7 ± 7.1	25.39 ± 4.37	182.3 ± 29.4	16.9 ± 2.1
MUA (+GSH)	N.D	111.7 ± 11.1	189.7 ± 7.3	N.D

kcat (min^{-1})	CcGSTFuA2461	CcGSTFuA6800	CcGSTFuA6801	CcGTSFuA6820
MUA (-GSH)	0.026 ± 0.001	0.065 ± 0.002	0.070 ± 0.004	0.078 ± 0.002
MUA (+GSH)	N.D	5.10 ± 0.18	7.79 ± 0.13	N.D

kca/Km (min^{-1}/um^{-1})	CcGSTFuA2461	CcGSTFuA6800	CcGSTFuA6801	CcGTSFuA6820
MUA (-GSH)	$0.67*10^{-3} \pm 0.14*10^{-3}$	$2.56*10^{-3} \pm 0.46*10^{-3}$	$0.38*10^{-3} \pm 0.13*10^{-3}$	$4.61*10^{-3} \pm 0.9*10^{-3}$
MUA (+GSH)	N.D	0.046 ± 0.016	0.041 ± 0.017	N.D

FIGURES

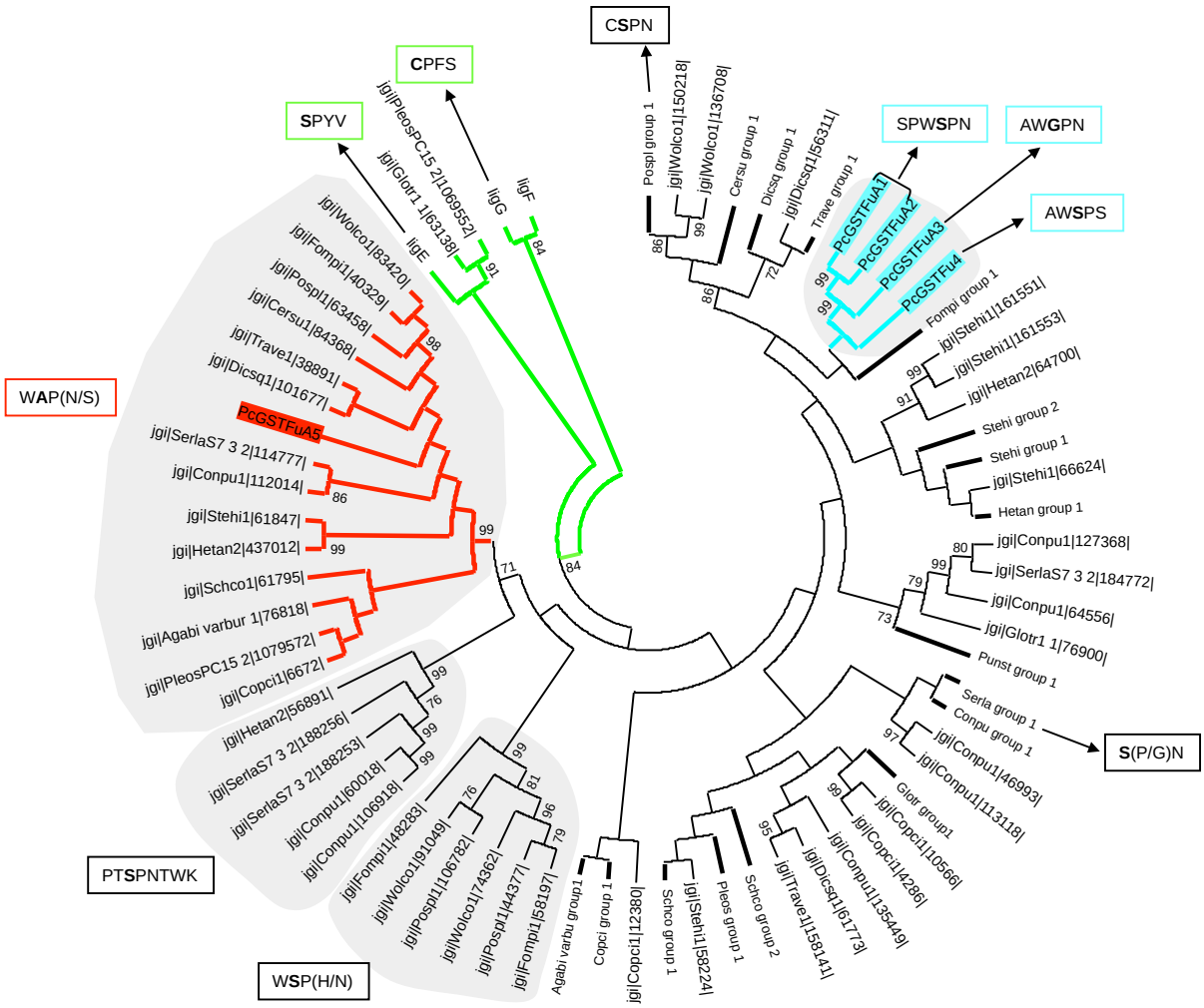


FIGURE 1. Phylogenetic distribution of GSTFuA sequences from saprotrophic basidiomycetes among Agaromycotina. The alignment was performed with ClustalW and phylogenetic tree using the neighbor-joining (NJ) method implemented in MEGA5 software, with the pairwise deletion option for handling alignment gaps, and with the Poisson correction model for distance computation. Bootstrap tests were conducted using 1,000 replicates and values are indicated at nodes. Sequences were obtained from JGI (http://genome.jgi-psf.org). Bold branches indicates clusters of GSTFuAs, boxes indicates putative catalytic residue in bold. PcGSTFuAs are highlighted in blue while the PcGSTFuA5 group of putative mitochondrial GSTFuAs is highlighted in red. LigEFG are highlighted in green.

Agabi_varbu : *Agaricus bisporus* ; Cersu1 : *Ceriporiopsis subvermispora* ; Conpu1 : *Coniophora puteana* ; Copci1 : *Coprinopsis cinerea* ; Dicsq1 : *Dichomitus squalens* ; Fompi1 : *Fomitopsis pinicola* ; Glotr1_1 : *Gloeophyllum trabeum* ; Hetan2 : *Heterobasidion annosum* ; Phcr1 : *Phanerochaete chrysosporium* ; PleosPC15_2 : *Pleurotus ostreatus* ; Pospl1 : *Postia placenta* ; Punst1 : *Punctularia strigosozonata* ; Scho2 : *Schizophyllum commune* ; SerlaS7_9_2 : *Serpula lacrymans* var *lacrymans* ; Stehi1 : *Stereum hirsutum* ; Trave1 : *Trametes versicolor* ; Wolco1 : *Wolfiporia cocos*.

```
CcGSTFuA6820   - - - - M I T L Y D S - R L T H L Q A - - W N P T T W K A R F V L N Y K N L P Y K T E W T P Y H D I A S V Y H K H N L Q  53
CcGSTFuA6801   - - - - M I T F Y D I P S T T S L N S - - W S P N G W K T R Y T L N F K G L P Y K T E W V E Y P D I A A L Y Q K N N V P  54
CcGSTFuA6800   - - - - M I I L Y D L P S N L P T Q A - - W S G N T W K A R F C L N Y K G L P Y K T E W V E Y P D V P S I Y K K H G I S  54
CcGSTFuA2461   - - - - M I T F Y D L P S I L P E N D - - W S P N T W R T R L C L D Y K G L D Y K T E W V E F P D I A K V C Q E Q G I A  54
PcGSTFuA1      - M A Q P I V F Y D I P S N E R I K H S P W S P N T W K I R Y A L N Y K G L K Y K T E W V E Y P D I A G V V Q K L G G K  59
PcGSTFuA2      - M S Q P I V F Y D I P S N D T L K Q S P W S P N T W K I R Y A L N I K G I K Y K T E W V E Y P D I E D V V K K L G G K  59
PcGSTFuA3      M S L E P I I F Y D I P A N E - P R Q M A W G P N T W K T R Y V L N F K G L K Y R T E W V E Y P D I E A V C K Q I G A P  59
PcGSTFuA4      - M A D V I T L Y D I P G K S - D Q C K A W S P S T W K A R F A L N I K G I P Y K T E W V E Y P D I A T V Y E K H G I T  58
                         *   : * *             .         *   .   .   *   :   *   *   :   *   .   :   *   :   *   : * *   .   :   *   :   :   . : .

CcGSTFuA6820   P V C S R T D P S T G K E E P Y Y T I P V I F D D S T G K A I A D S L E I A K Y L D E T Y P D T P K V V P E T G E D G V 113
CcGSTFuA6801   A P A K Q S D G S - - - - - P Y Y S L P L I H D S K T N T F V A D S L E I A K Y L D K T Y P D T P K V L P D G E E - - - 106
CcGSTFuA6800   P V C S F G E G G - - - - - K Y Y S L P V I H D T S T G T T I A E S L E I A K Y L D A T Y P D A P S V L P K V V E G S A 109
CcGSTFuA2461   A T A T W R D G S - - - - - P Y F S V P A I V D V Q E S T A L A E S F E I A K Y L D A A Y P N T K R V I P E G A D A E R 109
PcGSTFuA1      P T E K T P D G R - - - - - D H Y T L P V I Y D P N T K K V V E D S A A I A K Y L D E T Y P D T P K L F P A G T D - - - 111
PcGSTFuA2      P T G K K P D G R - - - - - D H Y T V P V I Y D P N T K T V V E D G I K I A K Y L D D A Y P D T P R L F P A G T D - - - 111
PcGSTFuA3      A T E K K P D G R - - - - - D H Y T L P V I Q D P N T K A V V A D S D A I A K Y L E S T Y P D T P R L F P E G T R - - - 111
PcGSTFuA4      A K Y T G D D G L - - - - - P L Y T L P V I Y D P A T R R T V A E S S D I A K Y L D R T Y P N T R T L F P T G T A - - - 110
               .       .   :                 : : : *   *   *               :   :   .     * * * * *   :   : * *   : :       : . *

CcGSTFuA6820   D A K Q Q V D T F M G V M Y G A L G P L V L P V F Q Q S Y Q H V E E E S K P F F A E A R T K D F G A W F G N P K S L L D 173
CcGSTFuA6801   - G L A K T T Q F L G E L G G T M F P L F P I I F Q A T V P I L N E V S K D H F K V A R A K N L V S V F N N I K S I D E 165
CcGSTFuA6800   E A L S D Q A E V V K I I D G D Y P L V L P I T L H S V G K I L N P P S K A H V V Q T R A Q I L G L F G - - - V G T I E 166
CcGSTFuA2461   F Q R E F P L E F R - - - K L V F L P F C R I F W A K V M T I L N P V S R P Y F T R A R A S L M F E K E - - - - S L D E 162
PcGSTFuA1      - A F Q A A F L D F A W P V L G - F P V F M L V I L D T A N S L L P R S H D Y F R S T R E Q K F G K K L E - - - - - - - 162
PcGSTFuA2      - A F Q A A F D D F V W S V T L A F P L L S L L L L D V S N S L P P R S S A Y F R A T R E Q Q F G K R L E - - - - - - - 163
PcGSTFuA3      - A F Q H A F Y Q L A R P S V L - M P I F N I V V A R V W K L L R P R S Q E Y F R A T R E Q M L G K K L E - - - - - - - 162
PcGSTFuA4      - A L H E A F A G A Y T A V H K - - A L Y N L V C C A A C Y A L T E R S Q A F Y R T T R E A R L G K A L E - - - - - - - 160
                                                 .                           :   *   .       : *       :

CcGSTFuA6820   L L P L K K E D E D K G W E A A E K T F A G L D A R V P - - G R G K E V G W Y L G G E S P T F V D F V L G G F L I Y L K 231
CcGSTFuA6801   I Q L S E K E V E E R - W E Q V R A G F Q G L D S K F G - - G E G K E L A W F A G - D K I T F A D F A L A G M L L W I K 221
CcGSTFuA6800   E F K F S E E D V N K G W D H L K S I F D A L D K K F G - - G E D G K F G W Y L G - A R I S F A D F A L G G S L L F L K 223
CcGSTFuA2461   V A V K T D E E R E K I W G D L R E G L K A I D R Y Y K - - E T D E A G P W M L G - K T V S F A D F V V V A F L V A L K 219
PcGSTFuA1      - - - - - E L A T E E E W A K V E A G L A K L K G Y L D A N G K G N D L L L M G A Q G G I T Y S D I Q I A S F F V W A K 217
PcGSTFuA2      - - - - - E Q G G E E R W Q Q L E A G L G K F K G Y L E R N G A G N D L L L M G T Q G G I T Y S D V Q I A S L F V W A K 218
PcGSTFuA3      - - - - - E I G S E D D W N A L E S G L A R I K S S L E A N G A G K D L L L M G D R - - V T F A D L Q L A S L F I W L R 215
PcGSTFuA4      - - - - - D V C T A Q D W V D A E A A F G R L A G W L D A N G A G A D A E W V M G A G T L C F A D V R V V S G L M W A R 215
                                     *           .     :     :                 .                         :   *   .   :   .   : :     :

CcGSTFuA6820   S I Y G E E S E G W K R I V G W N E G K W G A F L D K L S A Y Q A V H -                                             266
CcGSTFuA6801   L V W G E E S A E W K R V S G W N N G K W A T M L K K L E A Y H T V A -                                             256
CcGSTFuA6800   T A W G E D S S E W A K V K N W H N G K W V A A L N A L D S Y T T V V -                                             258
CcGSTFuA2461   R V F G E E S E E W R T V K G W D D G R W G H L L Q K T A E L T G S K L                                             255
PcGSTFuA1      I I W G E G S E K W K R L I S L H D G K W A Q F Y A Q F T K F E Q V D V                                             253
PcGSTFuA2      V V W G E G S E K W K R L M G F H G G K W A Q F C A Q F A E Y E R A D D                                             254
PcGSTFuA3      V S A G E E S E D W K R F L S L H E G K W A K F M Q Q F A A Y E F V D V                                             251
PcGSTFuA4      T T L G E A S A E W K R V C G W H G G R W A R V V A N F G P Y A H V D -                                             250
                     * *   *     *       .   .     * : *
```

FIGURE 2. Sequence alignment of GSTFuAs investigated in this study. Alignment was performed with ClustalW. Catalytic residues are highlighted in red while the residues involved in the sulfate binding site are highlighted in green.

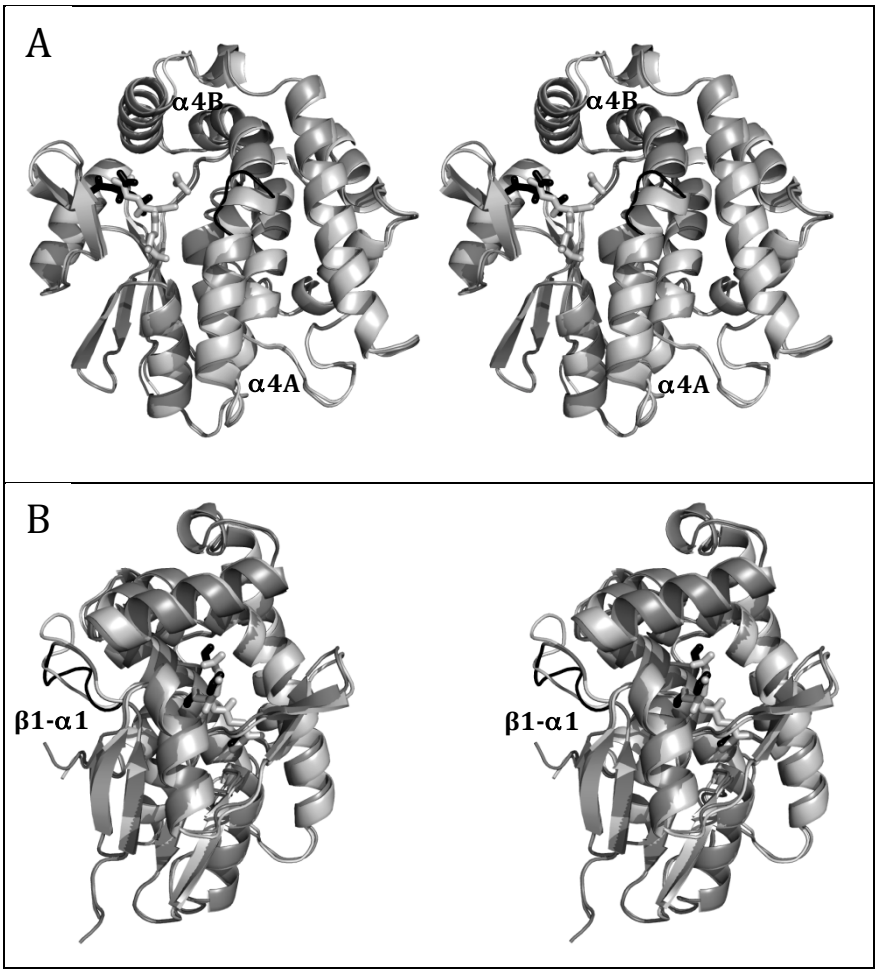


FIGURE 3. Stereo views of the superpositions of PcGSTFuA1 and PcGSTFuA2 monomers (A) and PcGSTFuA1 and PcGSTFuA3 monomers (B). PcGSTFuA1 cartoon is colored light grey while PcGSTFuA2-3 cartoons are colored dark grey. The 'fold diversities' in PcGSTFuA1-3 isoforms are highlighted in black : (A) the disruption of the helix α4 in PcGSTFuA2 leading to helices α4A and α4B ; (B) the loop β1-α1. Ligands are shown in stick mode. Glutathione and acetate molecules bound in PcGSTFuA1 are colored light grey. Citrate (A) and formate (B) molecules bound in PcGSTFuA2 and 3, respectively, are colored black.

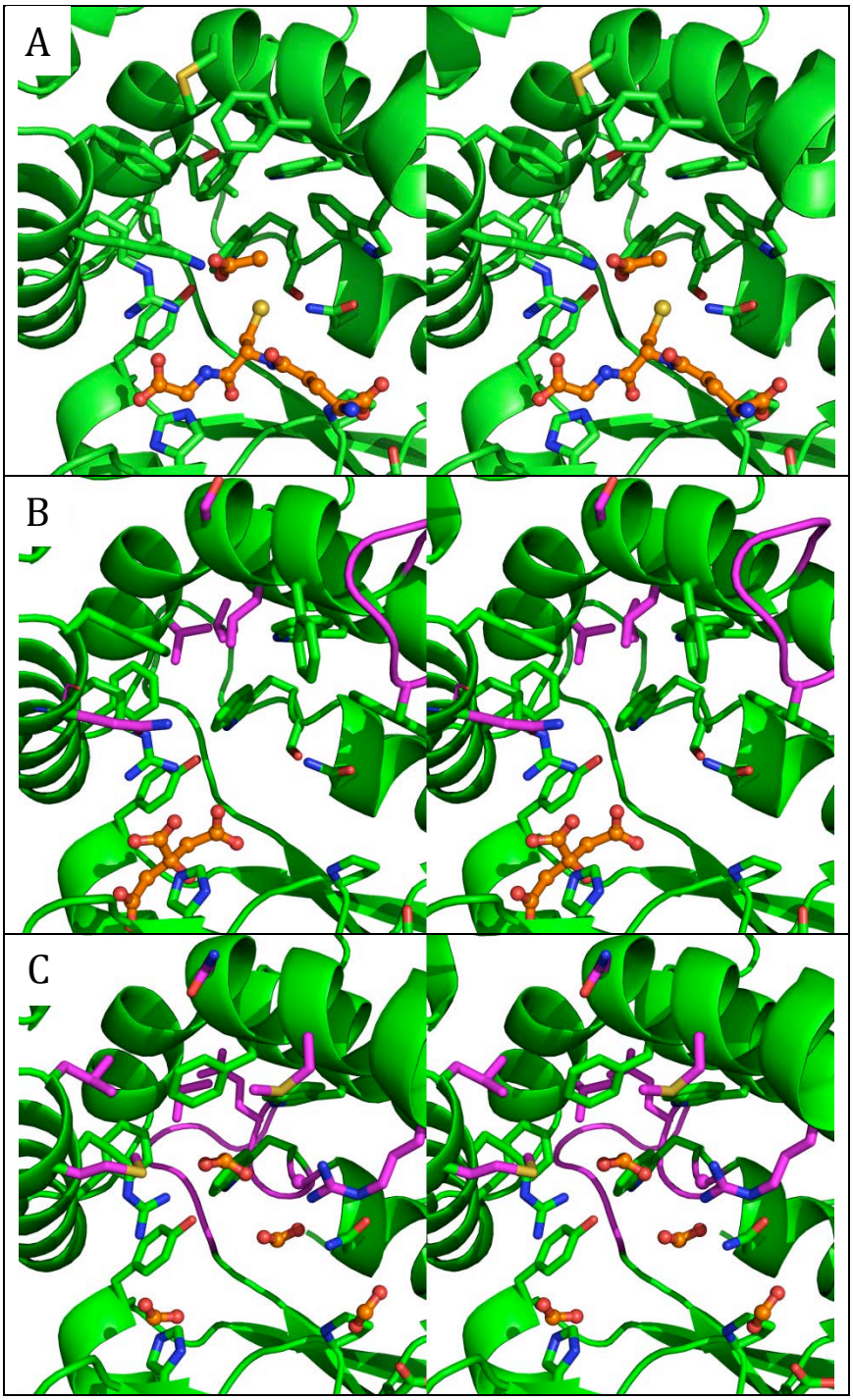


FIGURE 4. Stereo views of the active sites of PcGSTFuA1 (A), PcGSTFuA2 (B) and PcGSTFuA3 (C). The carbon atoms of the ligands are colored orange : (A) a glutathione and an acetate molecules ; ()B a citrate molecule ; (C) four formate molecules. Most of the carbon atoms are colored green. The carbon atoms, which are colored magenta, highlight structural diversities in PcGSTFuA2 (B) and in PcGSTFuA3 (C) in relation to PcGSTFuA1. Other atoms are colored according to their types.

	PcGSTFUA 1	PcGSTFUA 2	PcGSTFUA 3	PcGSTFUA 4	CcGSTFuA2461	CcGSTFuA6800	CcGSTFuA6801	CcGSTFuA6820
Kd at ANS saturation (µM)	10.6 ± 0.5	7.23 ± 0.58	13.75 ± 1.56	144.5 ± 36.2	32.1 ± 3.1	17.03 ± 2.24	9.19 ± 0.31	5.24 ± 0.33
ANS saturation (µM)	50	100	75	250	100	100	75	75
Glutathione (µM)	272.2 ± 31.5	25.7 ± 3.6	62.1 ± 5.8	39.2 ± 4.8	-	-	199.9 ± 45.6	-
Menadione	-	-	-	-	-	-	-	-
Menadione-SG (µM)	87.3 ± 38.4	150.7 ± 35.3	147.7 ± 49.8	52.72 ± 19.2	-	-	-	-
2-Bromo-4'-phenylacetophenone	-	-	-	-	-	-	-	-
Phenylacetophenone-SG (µM)	99.7 ± 46.5	286.4 ± 29.3	27.7 ± 3.6	142.2 ± 41.6	-	-	-	-

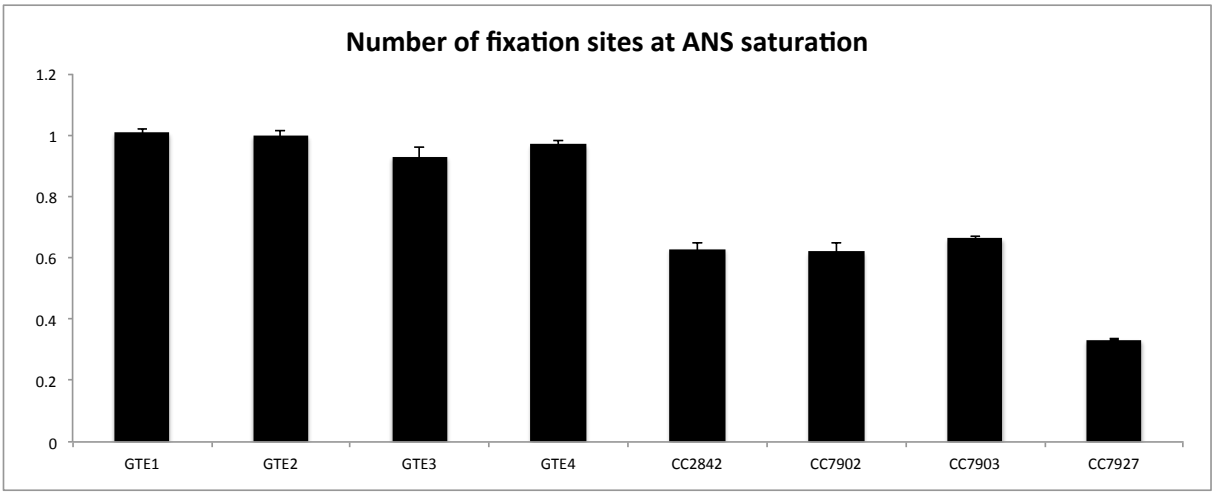


FIGURE 5. ANS binding and competition experiments onto PcGSTFuAs and CcGSTFuAs. (A) Kd values were determined by plotting concentration of ANS bound onto GSTFuAs against concentration of free ANS. Values given for glutathione, Menadione-SG and Phenylacetophenone-SG are IC50 fluorescence inhibition obtained by fitting data to equation 2 described in material and methods. (B) Number of binding sites for PcGSTFuAs and CcGSTFuA determined by fitting data to Equation 1.

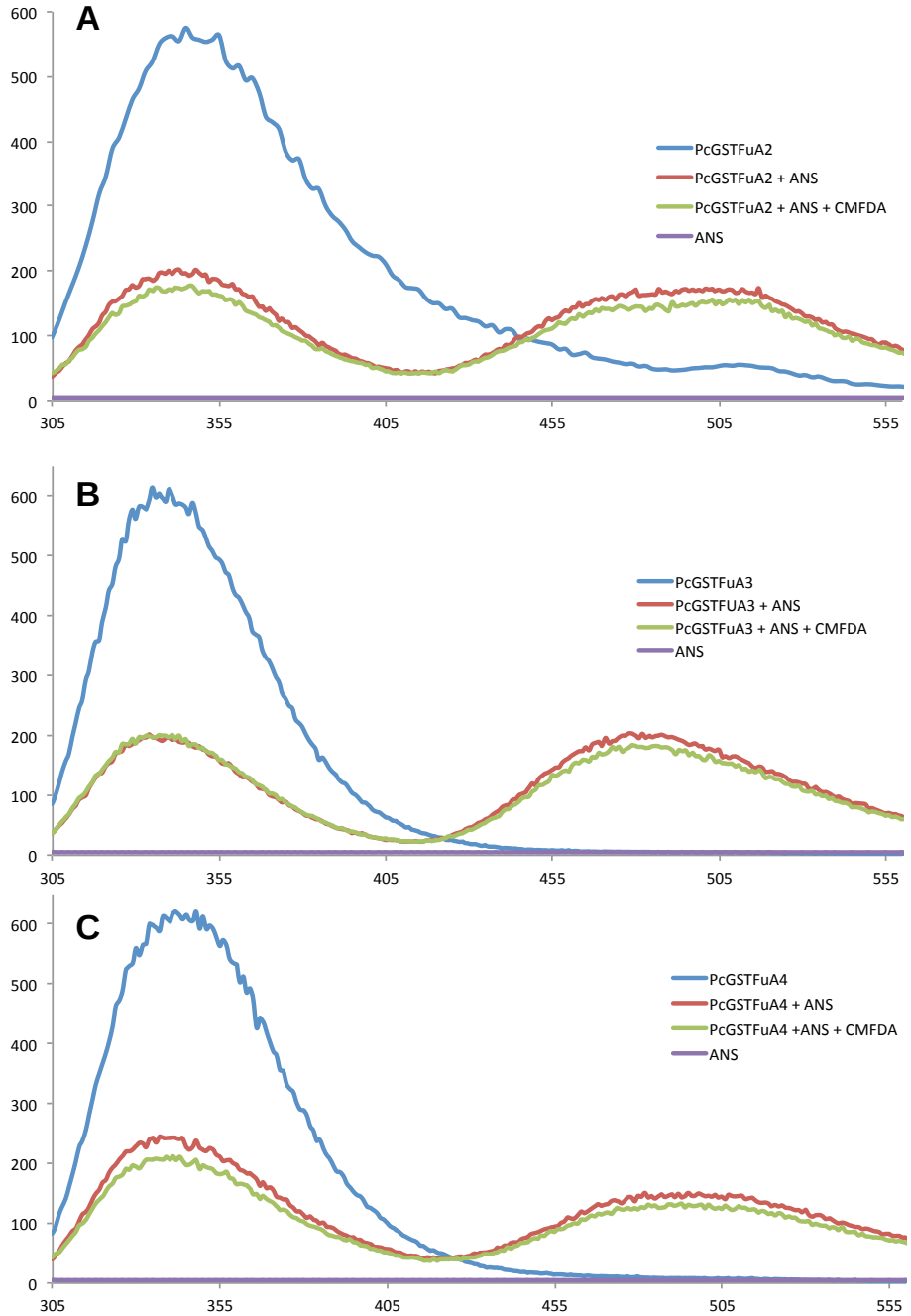
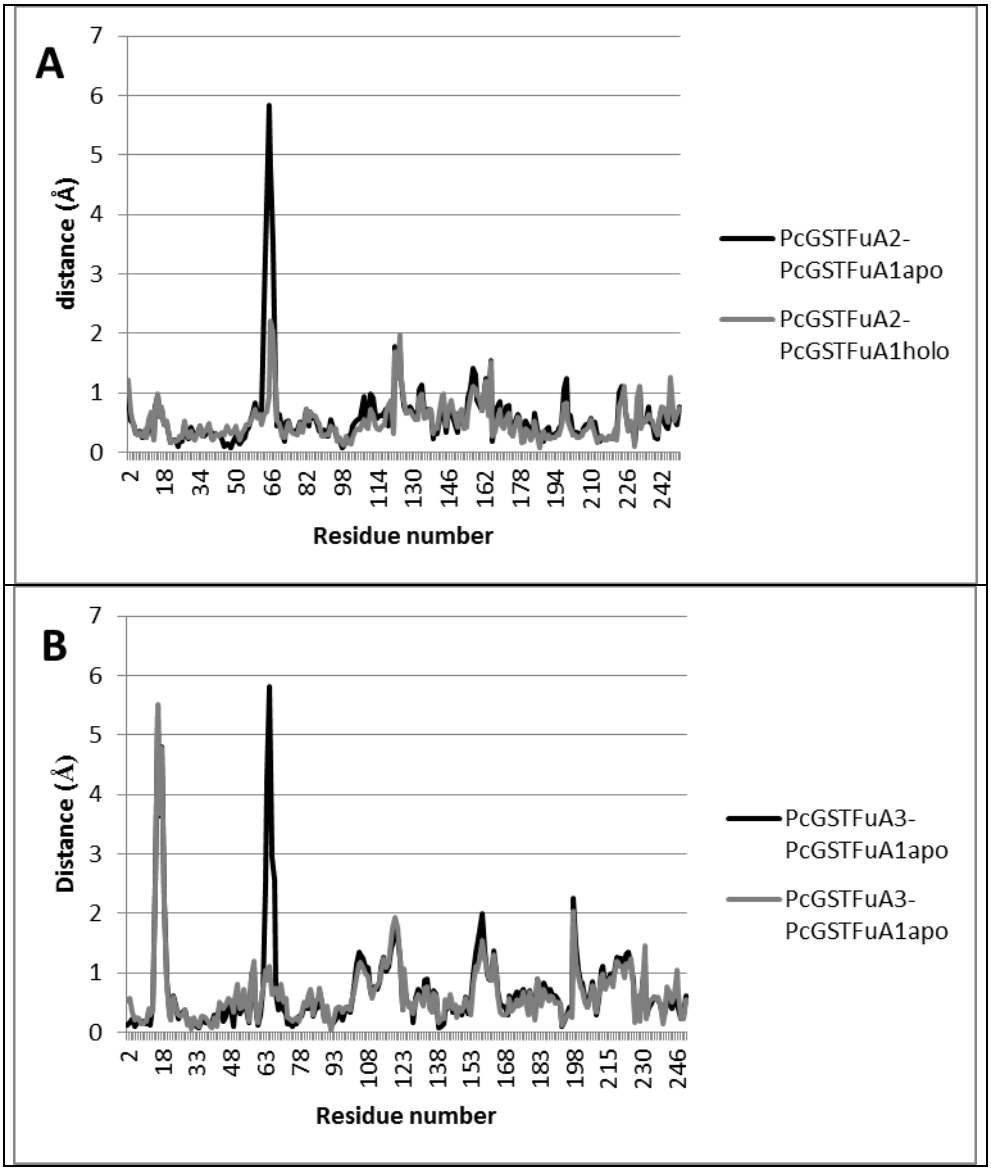


FIGURE 6. Tryptophan based fluorescence experiments illustrating ANS binding site upon addition of substrate onto (A) PcGSTFuA2, (B) PcGSTFuA3, (C) PcGSTFuA4. Upon tryptophan excitation at 290 nm, FRET between 100/75/250 µM ANS and 3 µM PcGSTFuA2/3/4 is characterized by the apparition of a signal at 475 nm (red) and is not altered in presence of 50 µM CMFDA (green). Emission spectra of ANS alone and PcGSTFuAs alone are colored in purple and blue respectively.

SUPPLEMENTAL DATA



Supplemental Figure S1. Distance between equivalent Cα positions after superposition of apo/holo PcGSTFuA1, PcGSTFuA2 and PcGSTFuA3.

Pair-wise RMS deviation of corresponding Cα atoms after superposition of apo PcGSTFuA1 and PcGSTFuA2 is 0.84 Å and after superposition of holo PcGSTFuA1 and PcGSTFuA2 is 0.61 Å.
Pair-wise RMS deviation of corresponding Cα atoms after superposition of apo PcGSTFuA1 and PcGSTFuA3 is 1.04 Å and after superposition of holo PcGSTFuA1 and PcGSTFuA3 is 0.88 Å.

Supplemental Table1. Distribution of GSTFuAs.

Sequences were obtained from the Joint Genome Institute with Blastp using all *P. chrysosporium* PcGSTFuA sequences as template in all available genomes of chytridiomycotina, mucoromycotina, saccharomycotina, pezizomycotina, puccinomycotina, ustilagomycotina and agaricomycotina.

		gene models	GSTFuA	Wood degrader
Agaricomycotina	Agaricus bisporus	10438	15	WD
	Ceriporiopsis subvermispora	12125	4	WD
	Coniophora puteana	13761	14	WD
	Coprinopsis cinerea	13342	14	WD
	Cryptococcus neoformans	6967	0	-
	Dacryopinax sp	10242	2	-
	Dichomitus squalens	12290	6	WD
	Fomitopsis pinicola	14724	10	WD
	Gloeophyllum trabeum	11846	7	WD
	Heterobasidion annosum	13405	7	WD
	Laccaria bicolor	23132	3	-
	Paxillus involutus	17968	6	-
	Phanerochaete chrysosporium	10048	5	WD
	Pleurotus ostreatus Pc 15	12330	6	WD
	Postia placenta	17173	11	WD
	Punctularia strigosozonata	11538	5	WD
	Schizophyllum commune	13210	7	WD
	Serpula lacrymans var lacrymans S7,9	12789	20	WD
	Serpula lacrymans var shastensis	13805	7	WD
	Stereum hirsutum	14072	12	WD
	Trametes versicolor	14296	6	WD
	Wolfiporia cocos	12746	5	WD
Ustilaginomycotina	Ustilago maydis	6902	1	
Puccinomycotina	Puccinia graminis	20567	0	
	Melampsora laricis	16694	0	
	Sporobolomyces roseus	5536	1	
Pezizomycotina	Aspergillus carbonarius	11624	3	
	Magnaporthe grisea	11054	2	
	Trichoderma atroviride	11863	3	
	Trichoderma virens	12427	2	
	Neurospora discreta	10620	1	
	Neurospora tetrasperma	10380	0	
	Neurospora crassa	9733	1	
	Chaetomium globosum	11124	1	
	Cochliobus heterostrophus	13336	2	
	Aspergillus clavatus	9121	2	
	Aspergillus fumigatus	9887	2	
	Aspergillus nidulans	10701	3	
	Fusarium verticilliodes	14179	3	
	Fusarium graminearum	13332	3	
	Mycosphaerella fijensis	10327	3	
	Sclerotinia sclerotinum	14522	1	
	Aspergillus terreus	10406	4	
	Botrytis cinera	16448	3	
	Mycosphaerella graminicola	10952	3	
	Cryphonectria parasitica	11609	3	
	Trichoderma reesei	9129	4	
Saccharomycotina	Spathaspora panalidarum	5983	0	
	Pichia stipitis	5841	0	
	Candida tenuis	5533	0	
	Saccharomyces cerevisiae	5695	0	
Mucoromycotina	Mucor circinelloides	11719	1	
	Phycomyces blakesleeanus	14792	9	
	Rhizopus oryzae	17459	2	
Chytridiomycota	Batrachochytrium dendrobatidis	8732	0	

Discussion générale

Les travaux présentés dans ce manuscrit, fruit des mes trois années de thèse, avaient pour objectifs d'évaluer, sous plusieurs aspects, la diversité des champignons décomposeurs du bois. En couplant des approches metagénomiques, génomiques, enzymatiques, structurales et biochimiques j'ai pu appréhender la grande diversité écologique et fonctionnelle des champignons saprophytes et la relation complexe qu'ils entretiennent avec le substrat bois. Les résultats obtenus ont permis de dégager plusieurs hypothèses, discutées ci-dessous, quant aux mécanismes de sélection des communautés, de dégradation du substrat, d'adaptation de ces organismes, et d'évolution des enzymes impliquées dans les systèmes de détoxication.

1) Le bois, bien plus qu'un simple substrat : un facteur de sélection des communautés

La compréhension des processus dirigeant l'assemblage des communautés au sein d'un écosystème est et reste un défi majeur en écologie (Jamil et al., 2012).

A l'échelle globale, le climat est le facteur majeur déterminant les profils de biodiversité (Currie et al., 2004; Hawkins et al., 2003). Les informations sur la diversité des organismes le long de gradients climatiques permet la prédiction de la réponse des espèces et des communautés aux changements climatiques (Grytnes et McCain, 2007). A l'échelle locale, les profils de distribution des microorganismes fournissent des indices importants sur les mécanismes sous-jacents permettant la structuration des communautés ainsi que leur rôle fonctionnel au sein des écosystèmes (Cardinale et al., 2006; Ettema et Wardle, 2002; Loreau et al., 2001).

Au sein d'un écosystème donné les interactions entre espèces sont fondamentales dans les processus de coévolution (Thompson, 2005), d'adaptation locale (Johnson et al., 2010) et de maintenance de la biodiversité (Laine, 2009). La variation génétique d'une seule espèce peut influencer un grand nombre d'aspects des communautés écologiques et du fonctionnement de l'écosystème (Figure 68) (Whitham et al., 2006). De ce fait, on peut s'attendre à observer, au sein des communautés écologiques, des régulations liées à cette variabilité génétique découlant de la variété d'interactions existantes entre espèces (Bailey et al., 2012).

Les écosystèmes forestiers sont une bonne illustration des interactions positives ou négatives pouvant exister entre espèces. Par exemple, les effets de divers composants des communautés du sol interagissant avec les plantes vivantes (incluant les herbivores, les pathogènes et les mutualistes), ou mortes (décomposeurs hétérotrophiques), peuvent aboutir à des régulations positives ou négatives sur les performances et/ou la persistance des organismes en corrélation avec le temps (Van der Putten et al., 2001).

On constate donc qu'il existe un dialogue perpétuel entre les différentes espèces existantes au sein d'un écosystème donné, ces mêmes espèces étant influencées d'une part par leur patrimoine génétique mais également par les conditions environnementales (Whitham et al., 2012).

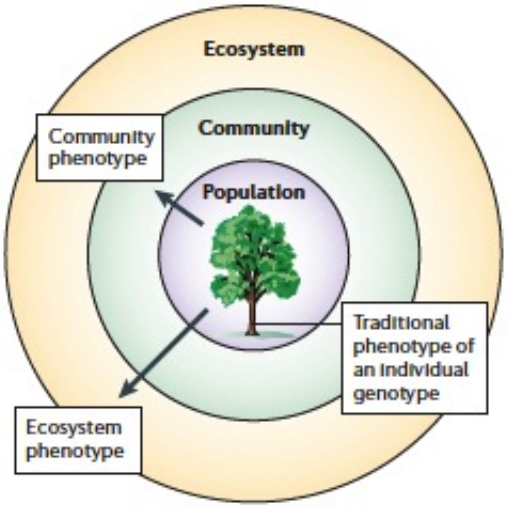


Figure 68 : Schéma illustrant comment la variabilité génétique rencontrée au sein d'une population, exprimée à travers son phénotype, lui-même influencé entre autres par les conditions environnementales, affecte le phénotype des communautés qui lui sont associées mais également le phénotype de l'écosystème dans lequel il évolue (Whitham et al., 2006).

Les nouvelles techniques de séquençage à haut débit permettent une meilleure appréciation de la diversité écologique des microorganismes dans différents biotopes comme la flore intestinale humaine, les mangroves ou l'océan profond (Andersson et al., 2008; Arfi et al., 2012; Sogin et al., 2006). Grâce à cette approche, le profil de distribution et de succession des communautés fongiques associées au bois a été évalué en relation avec son état de décomposition (Kubartová et al., 2012). Un fort effet spatial sur la composition des communautés ainsi qu'une forte variabilité au sein d'un même échantillon ont été observés. Ainsi, les espèces présentes à la surface de bois en décomposition sont différentes de celles trouvées à l'intérieur. Les changements d'état physique et chimique du bois, dus notamment à l'action des champignons saprophytes, sont à l'origine du profil de succession des communautés (Kubartová et al., 2012). En effet, quand un arbre meurt, certaines espèces fongiques sont déjà présentes dans l'aubier, l'écorce ou le bois de cœur. Les autres espèces s'établissent seulement après sa mort, arrivant par voie aérienne sous forme de spores ou par diffusion dans le sol grâce au mycélium ; cette seconde stratégie étant la plus efficace pour l'occupation des ressources (Holmer et Stenlid, 1996). Les changements dans la composition chimique du bois, résultant de l'action de ces différents organismes, conduisent à des transitions entre différents groupes écologiques mieux adaptés au substrat, induisant ainsi une succession des communautés jusqu'à la décomposition totale du bois (Rajala et al., 2011). Afin d'identifier le ou les facteurs influençant la structuration des communautés fongiques associées au bois durant les stades précoces de la dégradation, la distribution de celles-ci a été évaluée lors des phases initiales de la colonisation du bois (Chapitre 1).

Les courbes de raréfaction obtenues reflétant l'abondance relative, ont permis une première distinction entre les deux principaux types d'essences forestières, feuillus et conifères. Durant les stades précoces, le pin héberge une plus grande diversité fongique par rapport au chêne ou au hêtre. L'analyse plus fine de la répartition de ces différentes espèces au sein des échantillons a révélé qu'en fonction des différentes essences, ce ne sont pas les mêmes communautés qui sont observées. On observe donc un effet de l'hôte sur la structuration des communautés qui lui sont associées. La composition chimique d'un arbre variant en fonction de l'espèce considérée et des facteurs environnementaux qui ont influencé sa croissance (Chave et al., 2009), on peut avancer un parallèle entre celle-ci et la sélection des communautés, de la même manière que la composition chimique de la litière influence la communauté microbienne responsable de sa dégradation (Aneja et al., 2006; Šnajdr et al., 2011) ou que les signaux chimiques existant au sein des océans régulent des aspects cruciaux du comportement des organismes, structurent les populations, l'organisation des communautés marines de la bactérie au phytoplancton jusqu'aux invertébrés benthiques et aux poissons (Hay, 2009). Dans le même ordre d'idée, on observe également que la variabilité de la composition chimique de l'espèce d'arbre dominante au sein d'un écosystème est responsable de la diversité des espèces qui lui sont associées (Figure 69) (Iason et al., 2005; Kulhankova et al., 2006; Whitham et al., 2006; Whitham et al., 2008).

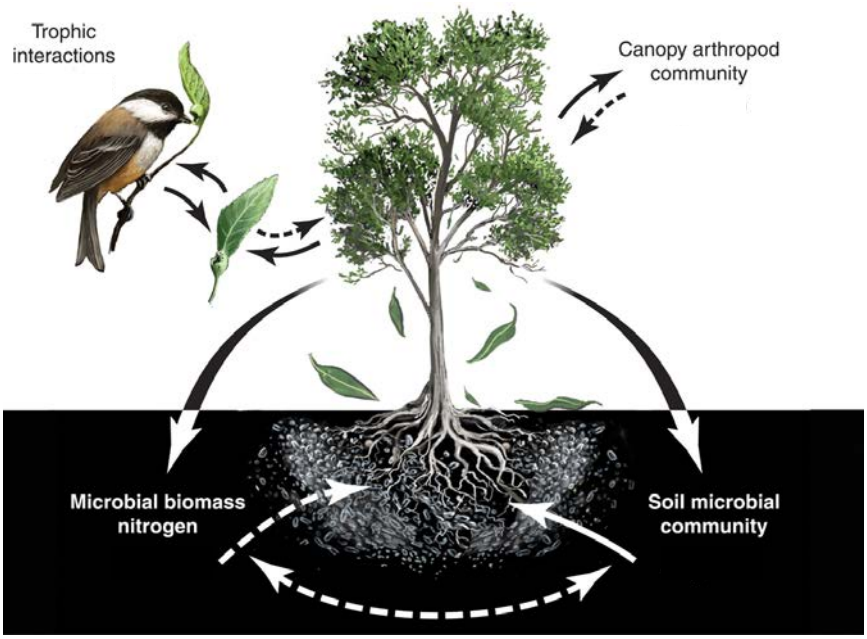


Figure 69 : Illustration du phénomène de dialogue entre une espèce d'arbre dominante et les communautés qui lui sont associées. Ici, le phénotype de l'arbre influence la communauté des arthropodes associés à la canopée, les interactions trophiques entre les insectes et les oiseaux, la communauté microbienne tellurique, et les réservoirs de nutriments disponibles dans le sol. Certaines de ces communautés, particulièrement les microorganismes, vont en retour affecter la physiologie de l'arbre créant ainsi un écosystème complexe. Les flèches pleines indiquent les interactions connues et les flèches en pointillés indiquent les interactions possibles. (adapté de Whitham et al., 2008)

La répartition écologique des espèces les plus abondantes durant ces stades initiaux illustre quant à elle la diversité des stratégies nutritionnelles utilisées par les différents champignons. Nous avons en effet mis en évidence une proportion importante de champignons ascomycètes, parfois endophytes, décomposeurs de matière organique, dont le rôle écologique et le potentiel lignocellulolytique ne sont pas clairement définis. La présence de ces champignons durant les stades intermédiaires de la décomposition du bois a déjà été rapportée dans d'autres études indiquant une fonction encore méconnue des ces organismes dans le processus de colonisation et de dégradation (Rajala et al., 2011; Rajala et al., 2012). Une hypothèse envisageable est que ces champignons induisent des poches de dégradation au sein du bois facilitant ainsi la colonisation par d'autres champignons plus adaptés et spécialisés. La présence d'ECM sur nos échantillons a aussi été détectée et ce même sur des piquets ne présentant aucune attaque visible. Cette observation est à corréler aux résultats d'autres études, illustrant la présence de ce groupe écologique lors des stades intermédiaires mais également lors des stades avancés de la décomposition du bois. Ces travaux suggèrent que les ECM peuvent supplanter les champignons de pourriture brune et blanche durant les phases tardives lorsque les composés organiques sont peu abondants (Hashimoto et Yoneda, 2006; Rajala et al., 2012; Tedersoo et al., 2008). Une autre étude a par ailleurs démontré que les ECM colonisent rapidement des souches de bois introduites expérimentalement en forêt boréale (Olsson et al., 2011). Le rôle de ces ECM en tant que décomposeurs facultatifs a été suggéré puisque certaines espèces possèdent des gènes codant pour des enzymes impliqués dans la dégradation du bois par des processus oxydatifs dont l'activité a été détectée *in vitro* (Bodeker et al., 2009; Chambers et al., 1999; Rineau et al., 2012). Une autre hypothèse suggère que ces champignons seraient opportunistes et capturent les nutriments depuis le mycélium des espèces saprophytes mortes ou vivantes et non depuis le bois mort (Buée et al., 2007; Lindahl et al., 1999), cependant leur présence durant les stades initiaux reste un résultat intriguant.

Cette analyse nous a donc permis de mettre en évidence le rôle important de la composition chimique du bois mort dans la sélection des communautés fongiques qui lui sont inféodées, mais également la grande diversité écologique impliquée dans la dégradation de celui-ci. Cependant si le séquençage à haut débit permet une profondeur de lecture largement supérieure aux autres techniques d'identification moléculaire (électrophorèse sur gel en gradient dénaturant et polymorphisme de longueur des fragments de restriction), il ne rend pas forcément compte de la diversité des champignons réellement actifs dans le processus de dégradation. En effet, en extrayant l'ADN total d'un échantillon environnemental la plupart des organismes vivants sont

détectés. Cependant, cet ADN peut également provenir d'organismes dormants sous forme de spores voire morts (Demaneche et al., 2001; England et al., 1997). C'est pourquoi certains auteurs suggèrent qu'en complément de l'ADN comme source d'identification des espèces présentes il faut également extraire l'ARN ribosomique (ARNr) ou l'ARN messager (ARNm) afin d'identifier les espèces métaboliquement actives (Anderson et Parkin, 2007; Damon et al., 2010; Rajala et al., 2011). Dans ce cas, il faut tenir compte du fait que le nombre de copies de gènes d'ARNr varie considérablement, de une à plusieurs milliers, au sein des champignons (Rooney et Ward, 2005). De plus il faut également prendre en considération que la dégradation du bois ou de la litière est un processus complexe résultant de l'action concertée de plusieurs microorganismes dont les bactéries (Romani et al., 2006) qui n'ont pas été étudiées lors de notre analyse.

Plus globalement, ce type d'approche expérimentale à haut débit pourrait être appliquée à la recherche d'espèces bio-indicatrices des stades précoces de la dégradation du bois en augmentant la durée d'implantation des échantillons, mais également en étendant ce dispositif expérimental à des zones géographiques soumises à d'autres conditions environnementales. De telles études pourraient également permettre l'identification de biomarqueurs spécifiques d'une essence dans un environnement donné. Cependant, beaucoup d'espèces identifiées par cette approche sont encore mal étudiées, voire inconnues, au niveau fonctionnel et leur rôle dans le processus de dégradation du bois reste encore à étudier en détail grâce notamment à des approches enzymatiques.

2) Diversité des activités enzymatique : vers la recherche de marqueurs fonctionnels spécifiques

La décomposition du bois par les champignons est un processus complexe nécessitant la sécrétion de plusieurs systèmes enzymatiques hydrolytiques et oxydatifs en même temps qu'une variété d'effecteurs de faible masse moléculaire. Les caractéristiques macroscopiques de l'attaque sur le bois, résultant de ces différents systèmes, permet la définition des principaux types de pourriture : blanche, brune et molle (Hatakka et Hammel, 2010). Parmi les constituants du bois la lignine, de par sa nature, est un polymère récalcitrant dont la dégradation complète est restreinte aux basidiomycètes de pourriture blanche. Pour réaliser ce processus, ces champignons sécrètent des peroxydases ligninolytiques, appartenant à la classe II de la superfamille des peroxydases à hème (Zamocky et Obinger, 2010). Parmi elles on distingue les peroxydases à manganèse (MnP), les lignine peroxydases (LiP) et les peroxydases versatiles (VP) (Hofrichter et al., 2010). Les laccases constituent un autre groupe d'oxydoréductases extracellulaires qui, contrairement aux peroxydases ligninolytiques, sont fréquemment rencontrées chez les basidiomycètes et les ascomycètes. L'action de ces enzymes (LiP, MnP, VP et laccases) aboutissant à la production d'une variété d'espèces radicalaires responsables d'attaques aspécifiques envers les diverses liaisons existantes au sein de la lignine (Wong, 2009). Inversement, la dégradation de la cellulose et de l'hémicellulose est initiée par des espèces radicalaires, notamment le radical hydroxyle généré via la chimie de fenton, ou des enzymes oxydatives spécifiques, et se poursuit via des enzymes hydrolytiques, spécifiques d'une liaison au sein d'un motif saccharidique donné, agissant en synergie (Eastwood et al., 2011; Žifčáková et Baldrian, 2012). On constate donc que les champignons saprophytes utilisent une grande diversité d'enzymes lignocellulolytiques, cette diversité reflétant celle rencontrée au sein de la paroi cellulaire végétale (King et al., 2011).

Au sein du polymère de lignine il existe une liaison prédominante, la liaison ß-aryl éther comptant jusqu'à 50% des liaison intermoléculaires (Masai et al., 1999), dont la dégradation est l'objet d'attaques aspécifiques réalisées par les composés radicalaires générées par les différentes peroxydases fongiques (Wong, 2009). Chez *Sphingomonas paucimobilis*, il existe deux enzymes énantiosélectives, appartenant à la famille des GST, capables de cliver spécifiquement cette liaison au sein de dimères synthétiques grâce au pouvoir réducteur du GSH (Masai et al., 2003). Cependant, ces enzymes sont incapables d'attaquer les liaisons ß-aryl éther

au sein de composés de plus grande taille *in vivo* car elles agissent uniquement sur des dimères synthétiques et par conséquent ne peuvent accéder aux liaisons ß-aryl éther présentes dans la lignine de haut poids moléculaire du fait de leur encombrement stérique (Otsuka et al., 2003). Une étude a démontré l'existence d'une enzyme sécrétée par un champignon du genre *Chaetomium,* isolé à partir d'un extrait de sol japonais, capable de réaliser le clivage hydrolytique de telles liaisons (Otsuka et al., 2003). Plus récemment, des champignons poussant sur lignine comme seule source de carbone ont été isolés à partir d'échantillons de sol. La caractérisation des produits de dégradation d'un composé modèle comportant une liaison ß-aryl éther a mis en évidence la présence de produits résultant de l'hydrolyse de cette liaison. Cependant les auteurs n'ont pas spécifié si ces composés étaient issus d'une activité enzymatique de type ß-éthérase, ou de la réaction du composé modèle avec des radicaux hydroxyles, car aucune enzyme n'a été isolée (Bi et al., 2012).

Comme l'avons souligné précédemment, le séquençage à haut débit permet une meilleure appréciation de la diversité des microorganismes présents dans un écosystème donné, mais en contrepartie, ne fournit pas de renseignements précis sur leur statut écologique dans le cadre des champignons saprophytes. Afin de réaliser une assignation fonctionnelle des organismes identifiés par cette technique, une meilleure connaissance des systèmes enzymatiques impliqués est nécessaire. L'utilisation de traits fonctionnels en écologie moléculaire permet une meilleure appréciation de la diversité des microorganismes présents et surtout une meilleure compréhension du fonctionnement d'une communauté en ciblant l'expression de gènes spécifiques du métabolisme en relation avec l'écosystème étudié (Figure 70) (Barberan et al., 2012; Cullings et Courty, 2009; Gamper et al., 2010; Lilleskov et al., 2011).

Les informations provenant d'organismes modèles, représentant les principaux groupes écologiques, permettent de définir des traits fonctionnels caractéristiques d'un type de pourriture. Dans le cadre des champignons saprophytes, ces traits fonctionnels font référence à l'arsenal enzymatique utilisé par un individu ou une communauté afin d'en décomposer la totalité des polymères constitutifs. Le contenu en CAZymes et en FOLymes, en relation avec leurs propriétés structurales et fonctionnelles, permet l'assignation d'un champignon à un type de pourriture (Floudas et al., 2012). Cependant beaucoup d'organismes n'ont pas été séquencés et seuls ceux cultivables en laboratoire peuvent faire l'objet de telles analyses.

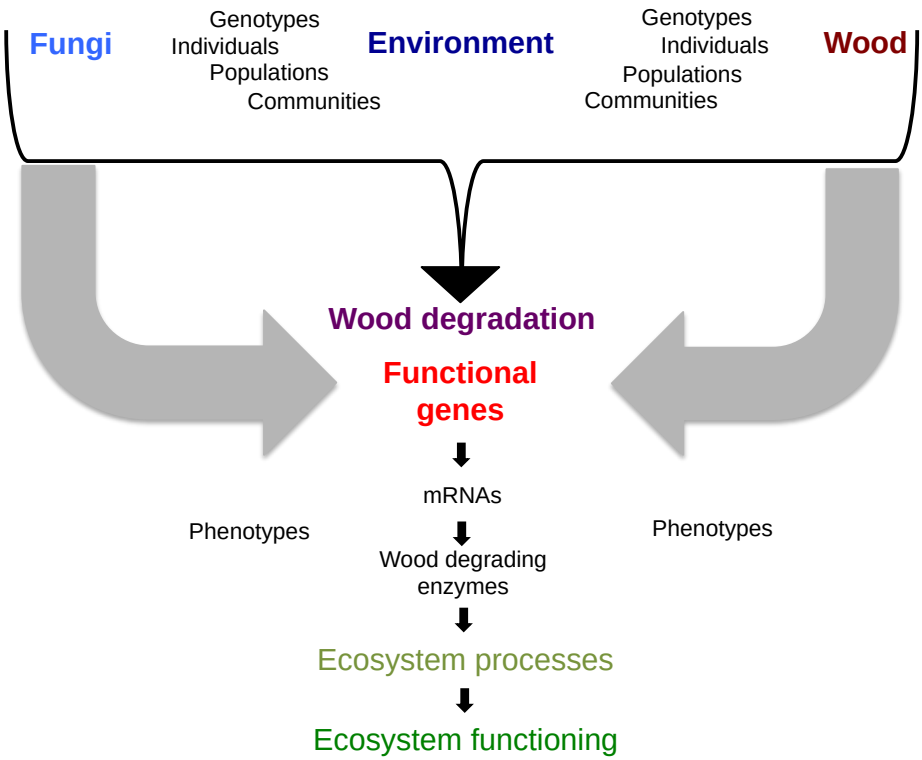


Figure 70 : Modèle conceptuel reliant les influences issues de l'environnement, des champignons et du bois avec l'expression de gènes marqueurs fonctionnels (traits fonctionnels). L'activité physiologique des produits résultant de l'expression de ces traits fonctionnels contribue aux processus et au fonctionnement global de l'écosystème au sein duquel sont intégrés ces organismes (adapté de Gamper et al., 2010).

C'est pourquoi, dans une seconde étude nous avons voulu développer des marqueurs fonctionnels permettant (i) une séparation efficace entre les différents types de pourriture sur la base de tests enzymatiques ; (ii) l'évaluation des capacités lignocellulolytiques de différentes souches ; (iii) la validation d'une nouvelle enzyme extracellulaire impliquée dans le clivage spécifique de la liaison ß-aryl-éther (Chapitre 2 - Article 1).

Grâce à une collection de souches fongiques, représentant les trois groupes écologiques existants, nous avons mis au point une batterie de dix tests enzymatiques (incluant l'activité ß-étherase) afin d'apprécier le potentiel lignocellulolytique des différents individus et d'en dégager un ou plusieurs marqueurs fonctionnels. La totalité des souches étudiées présentait des activités enzymatiques relatives à la dégradation du bois et la plupart des tests exhibaient des valeurs détectables à l'exception de l'activité ß-étherase. Par la suite, un criblage de l'activité ß-étherase plus large a été effectué sur une autre collection fongique composée d'une trentaine de souches incluant 3 *Chaetomium* d'origine japonaise. Ce dernier a été réalisé en absence ou en présence d'un mélange de sciure issue de conifères et de feuillus afin de vérifier l'induction de cette activité en présence de composés spécifiques du bois. Malgré l'introduction de souches

japonaises phylogénétiquement proches de celles utilisées par Otsuka et al., au sein de cette collection étendue et la présence de sciure de bois, l'activité ß-étherase n'a pas été détectée. Ces résultats nous permettent donc d'affirmer que l'activité spécifique détectée par ces auteurs ne s'avère pas répandue chez les champignons saprophytes et qu'elle semble dispensable pour une dégradation optimale de la lignine par les champignons. L'oxydation de la lignine et de ses différentes liaisons, médiée par les enzymes oxydatives, a fait l'objet d'études intensives relatives aux différents produits de dégradation (Wong, 2009). Plus particulièrement, la dégradation de la liaison ß-aryl éther catalysée par les LiP (Lundell et al., 1993; Miki et al., 1986), les MnP (Bao et al., 1994; Kapich et al., 2005), les VP (Caramelo et al., 1999) et les laccases (Kawai et al., 2002) a été documentée sur le composé non phénolique modèle de la lignine ß-O-4 impliquant la dispensabilité d'une activité spécifique (Cf. § 3.C).

Sur la base des dix tests enzymatiques, relatifs à la dégradation des différents polymères constitutifs du bois, nous avons mis en évidence que l'utilisation combinée de six d'entre eux permet d'opérer une distinction entre les champignons de pourriture brune et les champignons de pourriture blanche ou molle. En effet sur les dix tests utilisés seuls six permettaient de séparer significativement les trois groupes écologiques testés. Par conséquent, en rassemblant ces six tests dans une analyse de covariance, nous avons observé un regroupement des champignons de pourriture brune tandis que les champignons de pourriture blanche et molle formaient un groupe plus disparate. La même analyse menée avec la totalité des dix tests ou différentes combinaisons de plusieurs d'entre eux n'a pas permis une séparation optimale entre les trois groupes écologiques. Ces résultats sont en accord avec les différents systèmes de dégradation employés par ces groupes distincts. En effet, à la différence des champignons de pourriture blanche et molle, les champignons de pourriture brune sont incapables de dégrader la lignine (Arantes et al., 2011; Hatakka, 2001). Cette observation implique donc que l'on retrouve des potentiels lignocellulolytiques différents ou similaires pour ces trois groupes écologiques, ce que nous confirmons grâce à nos données.

Cependant, certains substrats utilisés lors de cette étude négligent l'implication des effecteurs de faible masse moléculaire utilisés par les champignons de pourriture brune afin de dépolymériser la cellulose et l'hémicellulose. En effet, la dégradation de ces deux polymères fait appel à une superfamille d'enzymes actives envers les carbohydrates : les CAZymes ainsi qu'une grande variété d'effecteurs de faible masse moléculaire (Cf. § 3.A). Les différentes familles des CAZymes, GH et CE, sont classées en fonction de leur séquence protéique, de leur activité enzymatique et de leurs propriétés structurales, définissant ainsi plusieurs sous classes. Bien que

cette classification permette d'appréhender la distribution de ces différentes enzymes, beaucoup d'entre elles n'ont jamais été caractérisées (Aspeborg et al., 2012). L'identification de leur spécificité de substrat, de leur mécanisme catalytique et de leurs conditions inductrices devrait permettre le développement d'essais enzymatiques plus spécifiques et favoriser la classification fonctionnelle des champignons saprophytes comme cela a été récemment suggéré pour la famille des PMO (Žifčáková et Baldrian, 2012).

Les résultats de cette étude nous ont donc permis de proposer un « set » de marqueurs enzymatiques pouvant être utilisés lors d'études d'écologie moléculaire afin de réaliser l'assignation écologique de souches isolées ou l'identification de souches métaboliquement actives et impliquées dans le processus de dégradation du bois. Ces marqueurs peuvent permettre un diagnostic rapide et efficace afin d'évaluer leur agressivité mais ils peuvent également être appliqués au suivi de profils enzymatiques spécifiques de la dégradation du bois en relation avec les facteurs environnementaux comme cela a déjà été effectué par exemple pour les ECM (Courty et al., 2005). L'intégration du suivi de ces activités dans la norme EN113 peut aussi être envisagée afin de mieux appréhender l'effet de différents biocides sur le métabolisme et la sécrétion d'enzyme lignocellulolytiques des principaux agents de pourriture (Lekounougou et al., 2008). Plus globalement, ces marqueurs permettent également d'apprécier la capacité lignocellulolytique à l'échelle de la communauté ou de l'organisme afin d'évaluer leur potentiel dégradatif pour d'éventuelles applications biotechnologiques notamment en bioraffinerie (Kubicek, 2012; Pu et al., 2011).

3) La diversité du xénome fongique : un reflet de l'adaptation des champignons au substrat bois ?

La diversité du substrat bois influence la diversité des communautés qui lui sont associées et des systèmes enzymatiques responsables de sa dégradation. Cependant, la myriade de composés toxiques générés par la dégradation du bois sous l'action des peroxydases et des radicaux hydroxyles (Lee et al., 2012), ou synthétisés par certains arbres comme moyen de défense (Danielsson et al., 2011; Ralph et al., 2006), implique que ces champignons aient développé un moyen de défense contre ces composés. Chez les champignons, la détoxication de ces composés est divisée en trois étapes distinctes. La première (phase I) correspond à l'activation de la molécule par une étape d'oxydation, la seconde (phase II) à une étape de conjugaison et le troisième (phase III) à une étape de transport ou de stockage (Harms et al., 2011).

A partir des génomes fongiques nouvellement séquencés (Martin et al., 2011), nous avons voulu évaluer la variabilité et l'adaptation des systèmes de détoxication fongiques (le xénome, Edwards et al., 2005), en relation avec l'environnement, au sein des basidiomycètes. Afin de faire face aux composés toxiques, les champignons présentent un grand nombre de copies de gènes d'enzymes responsables de la phase I, les cytochromes P450 monooxygénases (CytP450), mais également de la phase II, les GST. En évaluant la distribution globale de ces enzymes au sein des basidiomycètes représentant divers groupes fonctionnels (saprophytes, symbiotiques, pathogènes) nous avons mis en évidence une relation étroite entre la variation du nombre de copies de CytP450 et de GST au sein des champignons saprophytes, suggérant un lien fonctionnel entre ces deux familles. Nous soulignons également le rôle important de la néo-fonctionnalisation dans le processus d'évolution de ces familles d'enzymes reflétant l'adaptation des champignons à leur environnement.

Les données obtenues sont présentées dans la revue soumise à Microbial Biotechnology intitulé : « Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi». (Article 4)

Article 4 : Xenomic networks variabilty and adaptation traits in wood decaying fungi.

Running title: fungal xenomic networks

Mélanie Morel[ab*], Edgar Meux[ab], Yann Mathieu[ab], Anne Thuillier[ab], Kamel Chibani[ab], Luc Harvengt[c], Jean-Pierre Jacquot[ab], Eric Gelhaye[ab].

a : Université de Lorraine, IAM, UMR 1136, IFR 110 EFABA,Vandoeuvre-lès-Nancy, F-54506, France
b : INRA, IAM, UMR 1136, Vandoeuvre-lès-Nancy, F-54506, France
c: Laboratoire de biotechnologie, Pôle Biotechnologie et Sylviculture Avancée, FCBA, Campus Foret-Bois de Pierroton, 33610 Cestas, France

Corresponding author: Mélanie Morel, Université de Lorraine, « Interactions Arbres/Micro-organismes » (IAM), UMR 1136, IFR 110 EFABA, Faculté des Sciences et Technologies, Bld des Aiguillettes, BP 70239, Vandoeuvre-lès-Nancy, F-54506, France. Telephone: +33 3 83 68 4228. Fax: + 33 3 68 42 28. E-mail: mmorel@scbiol.uhp-nancy.fr

Summary

Fungal degradation of wood is mainly restricted to basidiomycetes, these organisms having developed complex oxidative and hydrolytic enzymatic systems. Besides these systems, wood-decaying fungi possess intracellular networks allowing them to deal with the myriad of potential toxic compounds resulting at least in part from wood degradation but also more generally from recalcitrant organic matter degradation. The members of the detoxification pathways constitute the xenome. Generally, they belong to multigenic families such as the cytochrome P450 monooxygenases and the glutathione transferases. Taking advantage of the recent release of numerous genomes of basidiomycetes, we show here that these multigenic families are extended and functionally related in wood-decaying fungi. Furthermore, we postulate that these rapidly evolving multigenic families could reflect the adaptation of these fungi to the diversity of their substrate and provide keys to understand their ecology.

Introduction

Understanding the evolution of organisms and their adaptation to environmental constraints remains a major challenge for biologists. The recent development of sequencing technologies has led to a new science "Comparative genomics". Gene copy number variation (CNVs) has been observed from yeast (Carreto et al., 2008) to human (Redon et al., 2006). These CNVs result from duplication/deletion events. Duplication events can also be followed by functional diversification, this process being one of the most important mechanisms leading to new functions (Ohta, 1991, Force et al., 1999). The correlation between these genetic variations and phenotypic consequences remains often unclear. The most ambitious studies associating genetic and phenotypic variations are currently conducted in mammals in connection with the important implications in human health (Zhang et al., 2009, Yalcin et al., 2011). In contrast few studies have been devoted to fungal CNVs (Tirosh and Barkai, 2007, Liti et al., 2009, Ellison et al., 2011, Taylor, 2011). During the last years, several programs have been launched to describe the functional genomic diversity of fungi, the relatively small size of their genome being compatible with the development of environmental genomic approaches (Sharpton et al., 2009, Martin, 2010, Neafsey et al., 2010, Ohm et al., 2010, Duplessis et al., 2011, Murat et al., 2011).

Fungi are major actors in global geochemical cycles, particularly in the carbon and nitrogen cycles, because of their involvement in organic matter recycling. Fungi play also major roles in different ecosystems through their symbiotic or pathogenic interactions with other organisms.
During the last few years, many sequencing programs have been devoted to wood-decaying fungi (Martinez et al., 2004, Martinez et al., 2009, Eastwood et al., 2011), due to their potential applications in white biotechnology in general, and in bioenergy production from biomass in particular. Comparative genomic has confirmed the extraordinary diversity of enzymatic mechanisms developed by these fungi to degrade recalcitrant organic matter and in particular lignocellulose. Recent research has mainly focused on the oxidative systems secreted by white-rot and brown-rot fungi, and also on the myriad of fungal enzymes involved in the polysaccharide-degrading enzymes (Cazymes). Besides these extracellular systems, it appears that gene families involved in the detoxification pathways are particularly extended in wood-decaying fungi. These genes constitute the xenome, being defined as the biosystem responsible for the detection, transport and metabolism of xenobiotics (Edwards et al., 2005). Fungi as other organisms have to deal with potential toxic compounds resulting from organic matter degradation, secondary metabolism of antagonist organisms, human activities. It is particularly

true for wood-interacting fungi, which are able to degrade recalcitrant lignin and to cope with the myriad of complex compounds synthesized by plant species.

In this paper we propose, from comparative genomic evidence and also from biochemical and physiological studies that the variability of xenomic multigenic families found in wood decaying fungi could reflect their adaptation to their way of life governed at least in part by the heterogeneity of the wood chemical composition.

Wood composition and degradation

Wood is mainly constituted of cellulose, a variety of hemicelluloses, lignin and to a lesser extent of secondary chemicals (wood extractives). Wood decomposition is a complex process, which, like litter degradation, involves biotic and abiotic factors (Cornwell et al., 2009, Weedon et al., 2009, Freschet et al., 2010). Numerous studies suggest that plant traits have predictable long-term effects on litter decomposition (Hobbie, 1996, Cornwell et al., 2008) and wood degradation (Cornwell et al., 2009, Weedon et al., 2009, Cornelissen et al., 2012). Among the factors, which lead to “afterlife effects” on its degradation, wood chemical and anatomical traits are probably important (Cornwell et al., 2009). For instance, the decomposition of softwood is slower than hardwood in a given environment, suggesting that the chemical composition, which is highly variable between these wood types could be an important factor governing wood decay (Weedon et al., 2009, Freschet et al., 2012). Wood is a complex structure, its composition depending both on the species considered and on environmental factors, which have influenced the tree growth (Chave et al., 2009). Wood susceptibility to fungal degradation is indeed governed at least in part, by its high content in lignin and other phenolic derivatives compounds.

The efficient fungal degradation of lignin is mainly restricted to specialized basidiomycetes. These latter are able to modify/decompose lignin through oxidative processes (see below), which could lead to aromatic radicals catalyzing subsequent degradation and also formation of potential toxic molecules. Besides the well-known effect linked to lignin, secondary metabolites involved in plant defence could also play a major role in the durability of the various wood species (Chave et al., 2009, Freschet et al., 2012). The tree primary defence involves usually bark that provides a physical and chemical barrier against abiotic and biotic stresses. Besides these constitutive defences, induced systems are activated after injury or infection (Franceschi et al., 2005). For instance in conifers, induced defence concerns cell wall re-enforcements and production of secondary metabolites as terpenes, phenols, stilbenes, flavonoids and lignans (Ralph et al., 2006, Danielsson et al., 2011). These changes in chemical composition and their

heterogeneity have potentially important "afterlife" effects on the fungal efficiency in wood degradation.

Fungal Xenome: The phase I network

Facing this large diversity of nutriments and potential toxic component sources, fungi, which mainly control wood decomposition in forest ecosystems, have also concomitantly evolved modified detoxification pathways, defining the xenome (Figure 1) (Edwards et al., 2005). As in other eukaryotic organisms, the detoxification pathways dealing with recalcitrant/toxic compounds can be divided into three different steps in fungi, the first one corresponding to an activation of the molecule often through an oxidation stage, the second one to a conjugation stage, and the third one either to transport or storage. In this paper, we will focus mainly on the oxidation and conjugation steps found in wood-decaying fungi through the determination of their xenomic gene content in relation to their environment.

The extracellular network

In the case of wood decaying fungi, the first phase could be mediated by the extracellular oxidative network involved in lignin/wood modification. Wood-decaying fungi could be mainly divided into two main functional groups, brown and white rot, depending on their ability to degrade /mineralize lignin. The brown-rot fungi are able to modify lignin to gain access to cellulose and hemicellulose. The recent release of the genomes of *Postia placenta* and *Serpula lacrymans* has confirmed previous biochemical works demonstrating that this step is mainly mediated by non-enzymatic reactions in these fungi (Martinez et al., 2009, Eastwood et al., 2011). Brown-rot fungi use small phenolic compounds to reduce iron and produce hydrogen peroxide, prerequisite steps to form hydroxyl radicals via the Fenton reaction (Goodell et al., 1997, Eastwood et al., 2011). These radicals are involved in lignin modification and in polysaccharide degradation. In contrast, white-rot fungi are able to mineralize lignin, the oxidative degradation of the polymer being mainly mediated through the production of various oxidases and peroxidases (Hofrichter et al., 2010, Harms et al., 2011). Glycosyl hydrolases are mainly involved in polysaccharide degradation through hydrolytic processes (Martinez et al., 2004, Martinez et al., 2009). Whatever the functional group considered, the oxidative stage exhibits low substrate specificity, explaining the well-studied potential of these fungi for bioremediation purposes (Harms et al., 2011). In particular, white-rot basidiomycetes are able to degrade a large panel of environmental pollutants (Asgher et al., 2008). Further information

concerning the extracellular enzymatic networks involved in lignin breakdown can be obtained in recent reviews dealing with this topic (Sanchez, 2009, Wong, 2009, Hofrichter et al., 2010, Bugg et al., 2011, Hernandez-Ortega et al., 2012).

The cytochrome P450 monooxygenases

The oxidative degradation of wood components leads to the formation of a variety of compounds with potential toxic effects depending on the initial substrate composition and also on the oxidative attack. To deal with these compounds, fungi possess a large number of cytochrome P450 monooxygenases (CytP450). These enzymes, found in all life forms, are able to catalyze various reactions as hydroxylation, dealkylation, sulfoxidation etc… and could be involved in primary, secondary and detoxification metabolisms. These heme-thiolate proteins have first been discovered in liver microsomes (Omura and Sato, 1962) through their involvement in complex insertions of molecular oxygen into different substrates. General reviews on CytP450s have been recently published (Paine, 1995, Mizutani and Ohta, 2010, Nelson and Werck-Reichhart, 2011, Schuler, 2011, Ichinose, 2012).

In fungi as well as in other organisms, CytP450s have been shown to be involved in primary metabolism as CYP61 and CYP51 in ergosterol biosynthesis (Lepesheva and Waterman, 2007) and also in secondary metabolism as for instance in aflatoxin synthesis in aspergilli (Yu et al., 2004). Fungal CytP450s are also involved in detoxification pathways as shown in the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* where various isoforms have been shown to be involved in polycyclic aromatic hydrocarbon oxidation (Syed et al., 2010, Hirosue et al., 2011). In basidiomycetes, the CytP450ome ranges from 4 (the pathogen *Cryptococcus neoformans*) to over 250 sequences (the brown-rot *P. placenta*), the number of isoforms apparently increasing with the ability to form mycorrhizae and to degrade plant litter (Cresnar and Petric, 2011). It is assumed that the high number of CytP450 isoforms found in wood decaying fungi could reflect the ability of these fungi to metabolize and mineralize aromatic compounds resulting from wood extracellular oxidation. The functional diversity of CytP450s has been investigated in particular in *P. chrysosporium*, where 154 CytP450 encoding genes have been identified in this white-rot basidiomycete (Martinez et al., 2004, Doddapaneni and Yadav, 2005, Chigu et al., 2010, Hirosue et al., 2011). Fourteen PcCytP450s isoforms are able to oxidize anthracene to anthroquinone and numerous isoforms are versatile enzymes accepting a broad range of substrates with varying three-dimensional structures (Hirosue et al., 2011). In contrast to CytP450 essential to primary metabolism, the isoforms involved in detoxification pathways are usually less specific (Cresnar

and Petric, 2011). In *P. chrysosporium*, it is assumed that these versatile CytP450s have emerged from different ancestral genes due to extensive gene duplication events and intragenomic recombinations suggesting an evolution driven by the adaptation of the fungus to wood degradation (Doddapaneni and Yadav, 2005, Hirosue et al., 2011). From a general point of view mainly resulting from genomic data, it is now becoming obvious that the number and range of CytP450s within an individual organism reflect, to some extent, its lifestyle (Schuler, 2011). Transcriptional analyses confirm the role of various CytP450s in wood degradation/mineralization for both white-rot and brown-rot fungi. For instance, in the brown-rot *P. placenta*, where 230 genes are related to CytP450, differential induction of 15 encoding CytP450 genes was observed depending of the wood species incubated with the fungal culture (aspen versus pine) (Vanden Wymelenberg et al., 2010). In a similar way, in the white-rot *Phanerochaete carnosa*, 21 genes encoding CytP450s are found strongly regulated according to wood species (coniferous or deciduous wood) (MacDonald et al., 2011). All these data are in agreement with the following statement made by Hirosue and co-workers: “molecular evolution of basidiomycetous CytP450 has been, at least in part, vigorously driven by survival strategies to provide a superior metabolic system to degrade exogenous chemicals, presumably involving plant-related compounds including lignin and/or its derivatives” (Hirosue et al., 2011).

Fungal Xenome: The phase II network

To cope with the compounds resulting from the activity of phase I enzymes, fungi possess large networks of phase II conjugative enzymes. It is widely admitted that conjugation enhances compound solubility and usually decreases their reactivity. The resulting conjugates could be excreted, further degraded or stored. These phase II enzymes catalyze the formation of sugar (glucoside, xyloside or glucuronide), sulphate, glutathione, acetyl or methyl conjugates. The different conjugates (and/or the different activities) have been detected during the degradation of various compounds in various fungal species (Sutherland et al., 1991, Bezalel et al., 1997, Hundt et al., 2000, Reddy and Gold, 2000, Myung et al., 2008, Campoy et al., 2009, Ning et al., 2010). Furthermore, as proposed for their plant counterparts, the different conjugates could be rapidly processed preventing their detection (Dixon et al., 2010). Conjugation enzymes exhibit a broad specificity accepting various substrates, which are structurally different. Despite this low specificity, transferases belong to multigenic families suggesting a specialization of the various isoforms. For instance, more than 100 putative glycosyltransferase encoding genes are found in the brown-rot *P. placenta* (Eastwood et al., 2011). Nevertheless, such a high number of

glycosyltransferases is not specific to wood-decaying basidiomycetes since similar contents are found in pathogenic/symbiotic ascomycetes (Klosterman et al., 2011), with nevertheless differential distribution within specific classes according to the way of life (Sprockett et al., 2011). Similarly, glutathione transferases (GST) form a large ubiquitous multigenic family. The number of isoforms found in fungi range from 6 in *Saccharomyces cerevisiae* to more than 50, the highest number being found in the wood/litter decaying fungi (Morel et al., 2009). Besides these large families, the number of fungal arylamine N-acetyltransferases (NAT) ranged from 1 to 5 paralogs in fungi, NAT genes being lost in many species of the higher agaricomycotina (Martins et al., 2010). Concerning sulfotransferases, few studies have been devoted to the diversity of these enzymes in fungi, but nevertheless this detoxification pathway seems to be restricted to ascomycetes.

Fungal glutathione transferases

Soluble GSTs are usually dimeric enzymes, each monomer being composed of two domains. The N-terminal domain, which is more or less conserved, is involved in glutathione binding (G-site). The C-terminal domain is more variable and is involved in the binding of substrates (H-site). The nomenclature of cytosolic GSTs is based on amino acid sequence identity and at least eight classes have been described to date in fungi and named GTT1, GTT2, URE2p, MAK16, EFb1, Etherase-like, GSTO and GHR (McGoldrick et al., 2005, Morel et al., 2009) (Figure 2). Traditionally, two proteins belong to the same class if they share more than 40% identity and isoenzymes belonging to different classes share less than 20% (Hayes et al., 2005). Nevertheless, based on these primary sequence criteria only, many “non-canonical” GST groups have emerged especially in bacteria and fungi, increasing the complexity of the GSTs classification. A few protein families are usually classified as GSTs (EF1Bγ, MAK16), but this is rather based on structural similarities, not on the existence of a glutathione-dependent activity. In addition, further immunologic, genetic, structural and functional investigations could reveal unexpected similarities between enzymes first listed in different groups (Meux et al in press, 2012). This emphasizes the challenge of GST classification.

It is largely admitted than the main activity of these enzymes is the catalysis of a glutathione adduct onto electrophilic molecules, the specificity of these enzymes remaining usually very weak. However, two classes of GSTs called omega (GSTO) and glutathionyl hydroquinone reductase (GHR) possess in their catalytic site a cysteinyl residue conferring to these proteins the ability to remove glutathione from various structurally different molecules (Garcera et al., 2006,

Xun et al., 2010, Meux et al., 2011). These enzymes are highly versatile being able to switch activity when changing only one or few amino acids in the protein sequence (Mannervik et al., 2009). This property results in a large diversity of activities even within a single class, the enzymes being able to exhibit glutathionylation, deglutathionylation or peroxidase activity with various structurally different substrates.

Taking advantage of the recent release of several basidiomycete genome sequences provided by the Joint Genome Institute (www.jgi.doe.gov), we describe in this review the occurrence of the main fungal cytosolic GSTs classes within fungi with various ways of life. Some selected species and their GST distribution are shown in figure 3. We have investigated the diversity of GSTs in saprophytic, symbiotic and pathogenic fungi (sequences and number of genes are given in supplementary data) and highlighted a huge diversity in term of GST number and repartition within the different classes. While the number of GST is higher in saprophytic fungi, no correlation could be established between the trophic mode of the fungi and their GST content.

GTTs and phi classes

The GTT class has been defined for GlutaThione Transferase, since they correspond to the first characterized GST in *S. cerevisiae* (Choi et al., 1998). In yeast, it is composed of GTT1 and GTT2. Both proteins exhibit activity against classical GST substrates as 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB). ScGTT2 also catalyzes the formation of glutathione-Cd conjugates (Adamis et al., 2004), while ScGTT1 catalyzes the reduction of hydroperoxides, in particular cumene hydroperoxide probably in the endoplasmic reticulum (Choi et al., 1998, Herrero et al., 2006). ScGTT1 and ScGTT2 have overlapping functions with glutaredoxins (ScGrx1 and ScGrx2) being involved in the response to oxidative stress (Mariani et al., 2008). Phylogenetic analyses concerning ascomycetes, zygomycetes and basidiomycetes have shown that GTT1 and GTT2 homologues cluster separately (Figure 2) (Choi et al., 1998, McGoldrick et al., 2005, Morel et al., 2009). The number of GTT1 and GTT2 isoforms ranges from 0 to 4 for GTT1 and 0 to 5 for GTT2 (supplemental Table 1).

A separate cluster has been identified in the present phylogenetic analysis (Figure 2). Since the amino-acid sequences show similarity to the plant-related phi class, we named this new group GSTF for phi. In particular, the N-terminal part of some basidiomycete sequences exhibit around 75% of similarity with Poplar and Arabidopsis GSTFs. In fungi, the number of GSTF encoding genes differs considerably depending on the genome considered, ranging from 0 to 10. The higher number (10 isoforms) is found in *Botryobasidium botryosum, Hydnomerulius pinastri,*

Coniophora puteana and Serpula lacrymans (supplemental Table 1). A proteomic study revealed up-regulation of *P. chrysosporium* phi isoform upon addition of exogenous application of vanillin, one of the key intermediates found during lignin degradation (Shimizu et al, 2005). However, since no isoform of GTT and phi has been characterized to date in basidiomycetes, their physiological role remains unclear.

Ure2p class

GSTs belonging to this class have been found only in fungi and bacteria (except in Stramenopiles and Dictyosteliida). In *S. cerevisiae*, Ure2p acts both as a regulator of nitrogen catabolic repression, and as a stress-responsive protein (Coschigano and Magasanik, 1991, Blinder et al., 1996, Cooper, 2002). The protein has been well studied in yeast for its particularity to form prions (Wickner et al., 1994). The additional amino acids in the N-terminal part of the protein responsible for this property have been exclusively found in some yeast species, suggesting functional specialization of Ure2p in these organisms.

By analysing Ascomycete and Basidiomycete sequences, it has been shown that this class could be split into two subclasses called Ure2pA and Ure2pB. In each subclass, the sequences cluster according to the taxonomy suggesting a recent diversification of Ure2p sequences (Thuillier et al., 2011). The analysis of the fungal genomes reveals that only *Schizophyllum commune* does not possess any Ure2 sequence, suggesting an important role of this class among Basidiomycetes (supplemental Table 1). Ure2pA is fungal specific and the number of isoforms is highly variable among species ranging from 0 in many species to 20 in *P. carnosa*. It is also interesting to note that species with the higher number of Ure2pA isoforms are saprophytic fungi. Ure2p4 and Ure2p6 of *P. chrysosporium* have been biochemically characterized (Thuillier et al., 2011). The corresponding genes are recent duplicates, the sequences being tandemly organized in the genome with 83 % amino acid sequence identity. However the proteins do not exhibit the same activity pattern, Ure2p6 being much more active than Ure2p4 in both GST and thiol disulfide oxidoreductase activities.

Ure2pB is less expanded and more ubiquitous than Ure2pA (from 1 in most of the organisms to 4 sequences in *Agaricus bisporus, Coniophora puteana, Phlebia brevispora* and *Botryobasidium botryosom*) and is also present in bacterial genomes. Two isoforms (YfcG and YchU) have been characterized in *Escherichia coli* (Kanai et al., 2006). Both have thiol disulfide oxidoreductase activity and contrary to the yeast isoform, weak GST and peroxidase activities (Wadington et al., 2009, Stourman et al., 2011).

The expansion and diversification of Ure2p in Agaricomycotina could be linked to environmental conditions. Transcriptomic analyses revealed specific up-regulation of some Ure2p encoding genes in response to various wood species or aromatic compounds. As examples, *P. chrysosporium* Ure2p9 and Ure2p6 gene expression is induced in presence of aspen and pine respectively (Vanden Wymelenberg et al., 2011). In the same species Ure2p4 and Ure2p6 show specific expression after polycyclic aromatic compound treatments (Thuillier et al., 2011). Similarly, 8 Ure2p genes are up-regulated by fir in *P. carnosa* (MacDonald et al., 2011).

Etherase-like class

This class is only found in microbes (bacteria and fungi) (Morel et al., 2009). The proteins are related to Lig proteins of *Sphingobium* sp. SYK-6 (Masai et al., 1989). The Lig coding genes are organized in operons, which contains LigE, LigF and LigG. The corresponding proteins are involved in the cleavage of ß-aryl ether linkages, which is the most abundant bond found in lignin. SpLigE and SpLigF are enantioselective GSTs involved in cleavage of ß-aryl ether compounds, like guaiacylglycerol ß-O-4-methylumbelliferone (GOU) to produce ß-hydroxypropiovanillone and 4-methylumbelliferone *in vitro* (Otsuka et al., 2003). SpLigG is a glutathione lyase catalyzing glutathione removal from the glutathione conjugate produced by SpLigF (Masai et al., 2003).

The number of isoforms is highly variable between and inside fungal phyla and its distribution is not correlated to fungal taxonomy but rather to the trophic state of fungi. This class is indeed highly represented (between 4 to 19 isoforms) in wood interacting fungi (saprotrophic, litter-decomposing and necrotrophic fungi) whereas it is absent in the analysed biotrophic pathogens (Supplemental Table 1). Interestingly ectomycorrhizal fungi also exhibit a high number of isoforms (from 3 to 10) in accordance with the observation that some of these fungi may live as facultative saprobes (Talbot et al., 2008). Unlike other fungal GSTs depicted here, the sequences cluster according to the organism and no specific subclass could be identified (Figure 2).

Cysteine-containing GSTs

Cysteine-containing GSTs are relatively ancient members of the cytosolic GST superfamilly widespread in several kingdoms and phyla (Omega (O) in mammals, fungi and insect; S-glutathionyl hydroquinone reductase (GHR) in fungi and prokaryotes; Lamda (L) and DHAR in plants). Although they exhibit the canonical thioredoxin fold, all these subclasses have a cysteine residue in their active site, where other GSTs exhibit a serine or a tyrosine. This cysteine changes

dramatically the reactivity profiles of these enzymes compared to the classical GSTs. They do not catalyze conventional conjugation reactions and instead use GSH as a cofactor rather than co-substrate. Cysteine-containing GSTs have been described to catalyze glutathione dependent reductions and thiol transferase reactions. They have been identified in all basidiomycete genomes studied here, whatever their trophic properties.

GSTOs are subdivided into 2 subclasses (II and III) and sequences are found in all symbiotic and saprophytic basidiomycete genomes with variability in their isoform number, while they were not detected in biotrophic fungi like *M. larici-populina*, *P. graminis* or *M. Globosa* suggesting an evolution of the GST driven by the adaptation of the fungus to its habitat (supplemental Table 1). GHR sequences cluster separately and have been recently described as a new subclass of enzymes catalyzing the removal of glutathione from hydroquinone conjugates (Xun et al., 2010, Belchik and Xun, 2011, Meux et al., 2011). One to 4 GHR isoforms have been detected in the studied fungal genomes, except for *M. globosa* and *P. graminis*, for which no GHR sequence has been found (supplemental Table 1).

In contrast to higher eukaryotes, fungal cysteine-containing GSTs have been poorly studied, and most of the investigations have focused on yeast. The *S. cerevisiae* genome encodes three proteins called GTO1, GTO2 and GTO3 that display similarities with human omega class GST (Garcera et al., 2006). These enzymes are active as thiol transferases, dehydroascorbate reductases and as dimethylarsinic reductases trough a monothiol mechanism (Garcera et al., 2006). Other experiments suggest a role of ScGTO1 in sulphur metabolism in the peroxisomes, which could be related to the redox regulation of the Str3 cystathionine β-lyase protein (Barreto et al., 2006). ScGTO2 is active toward several hydroquinone derivates (Lam et al., 2012) and its expression is strongly induced after exposure with stress agents, such as cadmium, hydroperoxide or diamide (Barreto et al., 2006), suggesting an involvement in oxidative stress response. Based on sequence similarity and functional data obtained with quinone derivatives, the yeast GSTOs isoforms, first described as omega GST, could in fact be part of the glutathionyl hydroquinone reductases.

A direct link between GSTome and P450ome

Comparative analysis of genome sequence data is an important tool to reveal adaptation of organisms to specific environments. Networks involved in drug metabolism and by extension in recalcitrant compound degradation/detoxification are particularly concerned by CNVs. Exploiting the recent release of numerous fungal genomes and the data obtained from the Fungal

Cytochrome P450 database (http://p450.riceblast.snu.ac.kr/species.php), a direct correlation between P450ome and GSTome contents was observed demonstrating a close link between phase I and phase II detoxification processes (Figure 4). However, this correlation with CytP450 does not exist when considering the GST classes individually. This suggests that there are compensatory effects between GST gene copy numbers to relay the first detoxification step. Both protein families are largely expanded in wood-interacting fungi. These expansions are clearly not related to the phylogeny but rather connected to the ability to cope with recalcitrant compounds resulting from wood degradation. For instance, the symbiotic *Laccaria bicolor* exhibits a weak ability to degrade recalcitrant organic matter in correlation with relatively restricted xenomic content. In contrast, *Paxillus involutus*, another symbiotic basidiomycete, possesses an extracellular oxidative system (Rineau et al., 2012) and also an expanded xenome. The most expanded xenomes are found in fungi interacting with wood as the necrotrophic *Heterobasidion annosum* and of course the white and brown-rot fungi.

As proposed for CytP450s, the diversification of GSTs is also recent and could be driven by the adaptation of the fungi to their environment. An analysis of the rapid divergent genes associated in particular with duplication/deletion events has been conducted in various isolated strains of the symbiotic fungus *P. involutus* (Le Quere et al., 2006). Among the identified CNVs, the authors reported at least three CytP450 and one GST encoding genes demonstrating that the variation in gene copy number occurring in this fungus at the isolate level concerns these gene families (Hedh et al., 2009). In other organisms, CytP450s and GSTs are also concerned by CNVs as shown for instance for the human cytochrome P450 2D6, this polymorphism being associated with drug metabolizing systems (He et al., 2011). In a similar way, the human genome encodes 17 soluble GSTs, two of them missing in some individuals (Mannervik, 2012). All these data agree with a rapid evolution of the xenomic network driven by the molecular environment of the organisms.

Coexpression of P450ome and GSTome

The direct correlation between the P450ome and GSTome was also investigated using the growing number of transcriptional studies. For example, specific CytP450 encoding genes found in *P. chrysosporium* are induced in presence of polycyclic aromatic hydrocarbons (Syed et al., 2010) and it is also the case for two Ure2p isoforms (Thuillier et al., 2011). In the same fungus, nonylphenol induces strongly three CytP450 and an Ure2p encoding genes (Subramanian and Yadav, 2009). In the context of wood degradation, induction of different CytP450s encoding genes has been observed in *P. chrysosporium* and *P. placenta* in a wood species dependent

manner (Vanden Wymelenberg et al., 2011) and *P. carnosa* (MacDonald et al., 2011). In *P. carnosa*, heat maps revealed variable expression of CytP450 and GST genes during growth on fir, pine, spruce or maple (Figure 5 adapted from MacDonald et al., 2011). Some transcripts have been found to be abundant in all wood degrading conditions, while others seem to accumulate in specific ones. As an example CytP450 (Gene ID 516) and GST (Gene ID 1262) exhibit the same transcript profile i.e an induction by all wood substrates. Similarly, CytP450 (Gene ID 3626) and GST (Gene ID 2315) are both induced specifically by fir (Figure 5). Concomitant analysis of CytP450 and GST expression could be a starting point to establish a functional link between isoforms.

Functional links between GSTome and P450ome

The direct correlation observed between the CytP450 and GST contents raises the question of the functions of the different isoforms. CytP450 are usually involved in the catalysis of redox reactions leading to the production of oxidized products. These oxidation steps could be associated with biosynthetic pathways in particular of secondary metabolites. The activities of CytP450 could lead to the formation of potential GST substrates containing electrophilic and unstable centres such as epoxides. In plants, the xenobiotic glutathionylation is relatively well documented, the GSH-conjugates being imported into the vacuole through ABC transporters before degradation (Grzam et al., 2006, Grzam et al., 2007, Rea, 2007). A non-vacuolar degradation pathway of GSH conjugates has been also shown in *Arabidopsis thaliana* (Blum et al., 2007). The catabolism of glutathione conjugates has been studied in yeast showing the potential involvement of vacuolar serine carboxypeptidases (Wunschmann et al., 2010). In fungi, besides the role of GTT in peroxide detoxification (Herrero et al., 2006) the functions of the different GST remain essentially elusive. As stated for plant GSTs, these proteins could be involved of course in glutathione conjugation but also in the transport of unstable metabolic intermediates using GSH as a stabilising partner (Dixon et al., 2010). For instance, exposure to HAP in different fungi leads both to the accumulation of toxic compounds in intracellular vesicles and to specific GST gene induction supporting the hypothesis of their involvement in intracellular transport (Verdin et al., 2005, Thuillier et al., 2011, Thion et al., 2012).

Besides the formation of glutathionylated conjugates, different isoforms are able to catalyze the reverse reactions. This is particularly true for cysteine containing GSTs as GSTOs but also for several isoforms of Ure2p. As stated before, the activities of CytP450 lead in numerous cases to unstable intermediates, which could react spontaneously with the intracellular reduced

glutathione (present at a millimolar range in fungi). In addition to the potential mechanistic role of GSTs in deglutathionylation (thiol transferase activity), these enzymes could also restore the initial compound allowing the pursuit of the following metabolic/catabolic steps.

Xenomic genes and neo-functionalisation

Enzymes involved in detoxification pathways are usually able to accept various substrates exhibiting a broad specificity. Nevertheless, the expansion of xenomic genes found in particular in wood decaying fungi suggests a more specific function for each isoform. In both cases (CytP450s and GSTs), small changes in substrate binding sites alter strongly the specificity of the resulting enzymes. The evolution of these protein superfamilies is complex, involving gene duplication, followed by mutations of the primary structure.

Concerning fungal GSTs, few biochemical data are available in particular for basidiomycetes. An illustration is the recent evolution of PcUre2p4 and PcUre2p6 isoforms, which have gained or lost functions in spite of a very similar sequence (Thuillier et al., 2011). Another example concerns etherase-like GSTs. Most of the sequences exhibit a serine at the putative active site, which is known to be involved in glutathionylation activity. However some isoforms possess a glycine or an alanine instead of a serine suggesting functional divergence. Site directed mutagenesis performed on one *P. chrysosporium* isoform has demonstrated that changing this serinyl residue into an alanine alters strongly the activity of the resulting protein conferring for instance a new thiol transferase activity to the mutated protein (Mathieu et al., 2012). Similarly, a functionomic approach resulted in highlighting the versatility of CytP450s from *P. chrysosporium* by screening a wide variety of compounds as substrates (Hirosue et al., 2011).

Fungal GSTs and CytP450s are thus very interesting models to understand protein evolution through promiscuous catalytic activities, using for instance the mutational approaches developed by Mannervik and coworkers for the characterization of mammals GSTs (Mannervik, 2012). On the other hand, distinct structural classes of fungal GSTs exhibit similar patterns of activities. It is the case for instance for some etherase-like and Ure2p isoforms of *P. chrysosporium* suggesting a potential functional convergence between these classes (Mathieu and Thuillier, personnal communication). A similar convergence has been also observed for versatile CytP450, which are able to catalyze similar reactions without significant sequence similarity (Hirosue et al., 2011).

Xenomic genes and fungal adaptation

Globally, the xenome, described in this paper through CytP450ome and GSTome analysis, is a rapidly evolving network. It is particularly true in wood decaying fungi where both families are largely expanded. The factors driving this evolution remain unclear but we postulate that these expansions should be correlated with the extraordinary ability of these fungi to deal with (and to catabolise in numerous cases) recalcitrant compounds. As for other organisms, fungal genomes display duplication regularly, and only duplications that increase fitness are selected and persist (Taylor, 2011). Concerning CytP450, a well-documented example concerns the co-evolution of plant and insect CytP450omes (Schuler, 2011). Plant CytP450s are involved in secondary metabolism leading to the production of compounds involved in plant protection, whereas insect CytP450 are mainly responsible for the catabolism of these toxic compounds. We postulate that similar relationships between trees and wood-degrading fungi could at least in part govern the evolution of xenomes of wood-degrading fungi. The wood susceptibility to degradation is complex and depends of many factors. Among them, the wood chemical composition plays a predominant role, depending of course on the considered tree species, but also on the considered tree part and on environmental factors (biotic and abiotic) which influence the tree life.

On the other hand, wood decomposers are more or less specific for wood species and act differentially along the degradation process (Bässler et al., 2012). Fungal decay of wood could thus be seen as a succession of heterotrophic events mediated by various fungal populations, which have adapted their xenome to various wood features. Besides the ability to degrade/modify wood components and in particular lignin, through extracellular oxidative and hydrolytic networks, interactions of wood-decaying fungi with their environment could be also considered through their xenomic contents.

Fungal CytP450s and GSTs are involved in numerous catabolic pathways allowing wood-decaying fungi to cope with their specific way of life. The xenome could also be a major factor governing the ability of fungi to colonize specific habitats. A recent comparative genomic analysis revealed that *P. carnosa* is highly enriched with genes encoding CytP450 compared to *P. chrysosporium* (nearly double) (Suzuki et al., 2012). *P. carnosa*, has been isolated almost exclusively from softwood, which is the most recalcitrant biomass resources, while *P. chrysosporium* was mainly isolated from hardwoods. Comparative growth studies on model compounds and chemical analyses of decomposed wood components showed greater tolerance of *P. carnosa* than *P. chrysosporium* to various substrates including coniferous heartwood. The significant expansion

of CytP450s and GSTs in *P. carnosa* could thus be correlated with its ability to cope with the recalcitrant softwood compounds.

As demonstrated in plants, these gene families are also involved in the production of secondary metabolites, which play a key role in biotic interactions. Accordingly, beside their involvement in wood decay, xenomic fungal enzymes could have implications for the establishment of symbiotic and pathogenic interactions.

Conclusion

Numerous studies are devoted to the description and the characterization of extracellular enzymes involved in lignocellulose breakdown. In wood decaying fungi, the oxidative and hydrolytic systems are particularly extended demonstrating the adaptation of these fungi to the diversity of their substrates. This adaptation occurs at least in part through the development of multigenic families (Cazymes or Transporters for instance). From the recent release of basidiomycete genomes, we postulate that xenomic genes could also reflect the adaptation of these fungi to their way of life and could be used as markers to correlate genomic to phenotypic variations in a context of environmental adaptation. In fact, behind the versatility of the enzymes described in this paper, we postulate that some specificity drive the extension of these families. Since wood chemical composition is a major factor governing its own microbial degradation, it could play a major role in xenome variability. The next challenge will be to connect this xenomic variability to the ecology of these wood-decaying fungi to better understand how they can both degrade complex compounds and resist to the associated toxic molecules. This could have promising implications in biotechnological purposes such as wood preservation, fungicide resistance or biomass valorisation.

Acknowledgments

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR) research grant (ANR-09-BLAN-0012).

References

Adamis, P.D., Gomes, D.S., Pinto, M.L., Panek, A.D., and Eleutherio, E.C. (2004) The role of glutathione transferases in cadmium stress, *Toxicol Lett* **154**: 81-88.

Asgher, M., Bhatti, H.N., Ashraf, M., and Legge, R.L. (2008) Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system, *Biodegradation* **19**: 771-783.

Barreto, L., Garcera, A., Jansson, K., Sunnerhagen, P., and Herrero, E. (2006) A peroxisomal glutathione transferase of *Saccharomyces cerevisiae* is functionally related to sulfur amino acid metabolism, *Eukaryot Cell* **5**: 1748-1759.

Bässler, C., Müller, J., Svoboda, M., Lepšová, A., Hahn, C., Holzer, H., and Pouska, V. (2012) Diversity of wood-decaying fungi under different disturbance regimes—a case study from spruce mountain forests, *Biodivers Conserv* **21**: 33-49.

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

Bezalel, L., Hadar, Y., and Cerniglia, C.E. (1997) Enzymatic Mechanisms Involved in Phenanthrene Degradation by the White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*, *Appl Environ Microbiol* **63**: 2495-2501.

Blinder, D., Coschigano, P.W., and Magasanik, B. (1996) Interaction of the GATA factor Gln3p with the nitrogen regulator Ure2p in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Bacteriol* **178**: 4734-4736.

Blum, R., Beck, A., Korte, A., Stengel, A., Letzel, T., Lendzian, K., and Grill, E. (2007) Function of phytochelatin synthase in catabolism of glutathione-conjugates, *Plant J* **49**: 740-749.

Bugg, T.D., Ahmad, M., Hardiman, E.M., and Rahmanpour, R. (2011) Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi, *Nat Prod Rep* **28**: 1883-1896.

Campoy, S., Alvarez-Rodriguez, M.L., Recio, E., Rumbero, A., and Coque, J.J. (2009) Biodegradation of 2,4,6-TCA by the white-rot fungus *Phlebia radiata* is initiated by a phase I (O-demethylation)-phase II (O-conjugation) reactions system: implications for the chlorine cycle, *Environ Microbiol* **11**: 99-110.

Carreto, L., Eiriz, M.F., Gomes, A.C., Pereira, P.M., Schuller, D., and Santos, M.A. (2008) Comparative genomics of wild type yeast strains unveils important genome diversity, *BMC Genomics* **9**: 524.

Chave, J., Coomes, D., Jansen, S., Lewis, S.L., Swenson, N.G., and Zanne, A.E. (2009) Towards a worldwide wood economics spectrum, *Ecol Lett* **12**: 351-366.

Chigu, N.L., Hirosue, S., Nakamura, C., Teramoto, H., Ichinose, H., and Wariishi, H. (2010) Cytochrome P450 monooxygenases involved in anthracene metabolism by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl Microbiol Biotechnol* **87**: 1907-1916.

Choi, J.H., Lou, W., and Vancura, A. (1998) A novel membrane-bound glutathione S-transferase functions in the stationary phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *J Biol Chem* **273**: 29915-29922.

Cooper, T.G. (2002) Transmitting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to the GATA factors: connecting the dots, *FEMS Microbiol Rev* **26**: 223-238.

Cornelissen, J.H., Sass-Klaassen, U., Poorter, L., van Geffen, K., van Logtestijn, R.S., van Hal, J., et al. (2012) Controls on coarse wood decay in temperate tree species: birth of the LOGLIFE experiment, *Ambio* **41 Suppl 3**: 231-245.

Cornwell, W.K., Cornelissen, J.H., Amatangelo, K., Dorrepaal, E., Eviner, V.T., Godoy, O., et al. (2008) Plant species traits are the predominant control on litter decomposition rates within biomes worldwide, *Ecol Lett* **11**: 1065-1071.

Cornwell, W.K., Cornelissen, J.H.C., Allison, S.D., Bauhus, J., Eggleton, P., Preston, C.M., et al. (2009) Plant traits and wood fates across the globe: rotted, burned, or consumed?, *Global Change Biology* **15**: 2431-2449.

Coschigano, P.W., and Magasanik, B. (1991) The URE2 gene product of *Saccharomyces cerevisiae* plays an important role in the cellular response to the nitrogen source and has homology to glutathione s-transferases, *Mol Cell Biol* **11**: 822-832.

Cresnar, B., and Petric, S. (2011) Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom, *Biochim Biophys Acta* **1814**: 29-35.

Danielsson, M., Lunden, K., Elfstrand, M., Hu, J., Zhao, T., Arnerup, J., et al. (2011) Chemical and transcriptional responses of Norway spruce genotypes with different susceptibility to *Heterobasidion* spp. infection, *BMC Plant Biol* **11**: 154.

Dixon, D.P., Skipsey, M., and Edwards, R. (2010) Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism, *Phytochemistry* **71**: 338-350.

Doddapaneni, H., and Yadav, J.S. (2005) Microarray-based global differential expression profiling of P450 monooxygenases and regulatory proteins for signal transduction pathways in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Mol Genet Genomics* **274**: 454-466.

Duplessis, S., Cuomo, C.A., Lin, Y.C., Aerts, A., Tisserant, E., Veneault-Fourrey, C., et al. (2011) Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi, *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 9166-9171.

Eastwood, D.C., Floudas, D., Binder, M., Majcherczyk, A., Schneider, P., Aerts, A., et al. (2011) The plant cell wall-decomposing machinery underlies the functional diversity of forest fungi, *Science* **333**: 762-765.

Edwards, R., Del Buono, D., Fordham, M., Skipsey, M., Brazier, M., Dixon, D.P., and Cummings, I. (2005) Differential induction of glutathione transferases and glucosyltransferases in wheat, maize and *Arabidopsis thaliana* by herbicide safeners, *Z Naturforsch C* **60**: 307-316.

Ellison, C.E., Hall, C., Kowbel, D., Welch, J., Brem, R.B., Glass, N.L., and Taylor, J.W. (2011) Population genomics and local adaptation in wild isolates of a model microbial eukaryote, *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 2831-2836.

Force, A., Lynch, M., Pickett, F.B., Amores, A., Yan, Y.L., and Postlethwait, J. (1999) Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations, *Genetics* **151**: 1531-1545.

Franceschi, V.R., Krokene, P., Christiansen, E., and Krekling, T. (2005) Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests, *New Phytol* **167**: 353-375.

Freschet, G.T., Cornelissen, J.H., van Logtestijn, R.S., and Aerts, R. (2010) Substantial nutrient resorption from leaves, stems and roots in a subarctic flora: what is the link with other resource economics traits?, *New Phytol* **186**: 879-889.

Freschet, G.T., Weedon, J.T., Aerts, R., van Hal, J.R., and Cornelissen, J.H.C. (2012) Interspecific differences in wood decay rates: insights from a new short-term method to study long-term wood decomposition, *Journal of Ecology* **100**: 161-170.

Garcera, A., Barreto, L., Piedrafita, L., Tamarit, J., and Herrero, E. (2006) *Saccharomyces cerevisiae* cells have three Omega class glutathione S-transferases acting as 1-Cys thiol transferases, *Biochem J* **398**: 187-196.

Goodell, B., Jellison, J., Liu, J., Daniel, G., Paszczynski, A., Fekete, F., et al. (1997) Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood, *Journal of Biotechnology* **53**: 133-162.

Grzam, A., Tennstedt, P., Clemens, S., Hell, R., and Meyer, A.J. (2006) Vacuolar sequestration of glutathione S-conjugates outcompetes a possible degradation of the glutathione moiety by phytochelatin synthase, *FEBS Lett* **580**: 6384-6390.

Grzam, A., Martin, M.N., Hell, R., and Meyer, A.J. (2007) gamma-Glutamyl transpeptidase GGT4 initiates vacuolar degradation of glutathione S-conjugates in *Arabidopsis*, *FEBS Lett* **581**: 3131-3138.

Harms, H., Schlosser, D., and Wick, L.Y. (2011) Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals, *Nat Rev Micro* **9**: 177-192.

Hayes, J.D., Flanagan, J.U., and Jowsey, I.R. (2005) Glutathione transferases, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**: 51-88.

He, Y., Hoskins, J.M., and McLeod, H.L. (2011) Copy number variants in pharmacogenetic genes, *Trends Mol Med* **17**: 244-251.

Hedh, J., Johansson, T., and Tunlid, A. (2009) Variation in host specificity and gene content in strains from genetically isolated lineages of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* s. lat, *Mycorrhiza* **19**: 549-558.

Hernandez-Ortega, A., Ferreira, P., and Martinez, A.T. (2012) Fungal aryl-alcohol oxidase: a peroxide-producing flavoenzyme involved in lignin degradation, *Appl Microbiol Biotechnol* **93**: 1395-1410.

Herrero, E., Ros, J., Tamarit, J., and Belli, G. (2006) Glutaredoxins in fungi, *Photosynth Res* **89**: 127-140.

Hirosue, S., Tazaki, M., Hiratsuka, N., Yanai, S., Kabumoto, H., Shinkyo, R., et al. (2011) Insight into functional diversity of cytochrome P450 in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of versatile monooxygenase, *Biochem Biophys Res Commun* **407**: 118-123.

Hobbie, S.E. (1996) Temperature and Plant Species Control Over Litter Decomposition in Alaskan Tundra, *Ecological Monographs* **66**: 503-522.

Hofrichter, M., Ullrich, R., Pecyna, M.J., Liers, C., and Lundell, T. (2010) New and classic families of secreted fungal heme peroxidases, *Appl Microbiol Biotechnol* **87**: 871-897.

Hundt, K., Martin, D., Hammer, E., Jonas, U., Kindermann, M.K., and Schauer, F. (2000) Transformation of triclosan by *Trametes versicolor* and *Pycnoporus cinnabarinus*, *Appl Environ Microbiol* **66**: 4157-4160.

Ichinose, H. (2012) Molecular and functional diversity of fungal cytochrome P450s, *Biol Pharm Bull* **35**: 833-837.

Kanai, T., Takahashi, K., and Inoue, H. (2006) Three distinct-type glutathione S-transferases from *Escherichia coli* important for defense against oxidative stress, *J Biochem* **140**: 703-711.

Klosterman, S.J., Subbarao, K.V., Kang, S., Veronese, P., Gold, S.E., Thomma, B.P., et al. (2011) Comparative genomics yields insights into niche adaptation of plant vascular wilt pathogens, *PLoS Pathog* **7**: e1002137.

Lam, L.K., Zhang, Z., Board, P.G., and Xun, L. (2012) Reduction of benzoquinones to hydroquinones via spontaneous reaction with glutathione and enzymatic reaction by S-glutathionyl-hydroquinone reductases, *Biochemistry* **51**: 5014-5021.

Le Quere, A., Eriksen, K.A., Rajashekar, B., Schutzendubel, A., Canback, B., Johansson, T., and Tunlid, A. (2006) Screening for rapidly evolving genes in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* using cDNA microarrays, *Mol Ecol* **15**: 535-550.

Lepesheva, G.I., and Waterman, M.R. (2007) Sterol 14alpha-demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms, *Biochim Biophys Acta* **1770**: 467-477.

Liti, G., Carter, D.M., Moses, A.M., Warringer, J., Parts, L., James, S.A., et al. (2009) Population genomics of domestic and wild yeasts, *Nature* **458**: 337-341.

MacDonald, J., Doering, M., Canam, T., Gong, Y., Guttman, D.S., Campbell, M.M., and Master, E.R. (2011) Transcriptomic responses of the softwood-degrading white-rot fungus *Phanerochaete carnosa* during growth on coniferous and deciduous wood, *Appl Environ Microbiol* **77**: 3211-3218.

Mannervik, B., Runarsdottir, A., and Kurtovic, S. (2009) Multi-substrate-activity space and quasi-species in enzyme evolution: Ohno's dilemma, promiscuity and functional orthogonality, *Biochem Soc Trans* **37**: 740-744.

Mannervik, B. (2012) Five decades with glutathione and the GSTome, *J Biol Chem* **287**: 6072-6083.

Mariani D., Mathias C. J., da Silva C. G., Herdeiro Rda S., Pereira R., Panek A. D., Eleutherio E. C. and Pereira M. D., (2008). Involvement of glutathione transferases, Gtt1and Gtt2, with oxidative stress response generated by H2O2 during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **Redox Rep**. (13): 246-254.

Martin, F. (2010) Parlez-vous effectors?, *New Phytol* **187**: 877-879.

Martinez, D., Larrondo, L.F., Putnam, N., Gelpke, M.D., Huang, K., Chapman, J., et al. (2004) Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78, *Nat Biotechnol* **22**: 695-700.

Martinez, D., Challacombe, J., Morgenstern, I., Hibbett, D., Schmoll, M., Kubicek, C.P., et al. (2009) Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion, *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 1954-1959.

Martins, M., Dairou, J., Rodrigues-Lima, F., Dupret, J.M., and Silar, P. (2010) Insights into the phylogeny or arylamine N-acetyltransferases in fungi, *J Mol Evol* **71**: 141-152.

Masai, E., Katayama, Y., Nishikawa, S., Yamasaki, M., Morohoshi, N., and Haraguchi, T. (1989) Detection and localization of a new enzyme catalyzing the beta-aryl ether cleavage in the soil bacterium (*Pseudomonas paucimobilis* SYK-6), *FEBS Lett* **249**: 348-352.

Masai, E., Ichimura, A., Sato, Y., Miyauchi, K., Katayama, Y., and Fukuda, M. (2003) Roles of the enantioselective glutathione S-transferases in cleavage of beta-aryl ether, *J Bacteriol* **185**: 1768-1775.

Mathieu Y., Prosper P., Buee M., Dumarcay S., Favier F., Gelhaye E., Gerardin P., Harvengt L., Jacquot J. P., Lamant T., Meux E., Mathiot S., Didierjean C. and Morel M., (2012). Characterization of a *Phanerochaete chrysosporium* glutathione transferase reveals a novel structural and functional class with ligandin properties. **J Biol Chem**.

McGoldrick, S., O'Sullivan, S.M., and Sheehan, D. (2005) Glutathione transferase-like proteins encoded in genomes of yeasts and fungi: insights into evolution of a multifunctional protein superfamily, *FEMS Microbiol Lett* **242**: 1-12.

Meux, E., Prosper, P., Ngadin, A., Didierjean, C., Morel, M., Dumarcay, S., et al. (2011) Glutathione transferases of *Phanerochaete chrysosporium*: S-glutathionyl-p-hydroquinone reductase belongs to a new structural class, *J Biol Chem* **286**: 9162-9173.

Mizutani, M., and Ohta, D. (2010) Diversification of P450 genes during land plant evolution, *Annu Rev Plant Biol* **61**: 291-315.

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

Murat, C., Zampieri, E., Vallino, M., Daghino, S., Perotto, S., and Bonfante, P. (2011) Genomic suppression subtractive hybridization as a tool to identify differences in mycorrhizal fungal genomes, *FEMS Microbiol Lett* **318**: 115-122.

Myung, K., Narciso, J.A., and Manthey, J.A. (2008) Removal of furanocoumarins in grapefruit juice by edible fungi, *J Agric Food Chem* **56**: 12064-12068.

Neafsey, D.E., Barker, B.M., Sharpton, T.J., Stajich, J.E., Park, D.J., Whiston, E., et al. (2010) Population genomic sequencing of *Coccidioides* fungi reveals recent hybridization and transposon control, *Genome Res* **20**: 938-946.

Nelson, D., and Werck-Reichhart, D. (2011) A P450-centric view of plant evolution, *Plant J* **66**: 194-211.

Ning, D., Wang, H., and Zhuang, Y. (2010) Induction of functional cytochrome P450 and its involvement in degradation of benzoic acid by *Phanerochaete chrysosporium*, *Biodegradation* **21**: 297-308.

Ohm, R.A., de Jong, J.F., Berends, E., Wang, F., Wosten, H.A., and Lugones, L.G. (2010) An efficient gene deletion procedure for the mushroom-forming basidiomycete *Schizophyllum commune*, *World J Microbiol Biotechnol* **26**: 1919-1923.

Ohta, T. (1991) Multigene families and the evolution of complexity, *J Mol Evol* **33**: 34-41.

Omura, T., and Sato, R. (1962) A new cytochrome in liver microsomes, *J Biol Chem* **237**: 1375-1376.

Otsuka, Y., Sonoki, T., Ikeda, S., Kajita, S., Nakamura, M., and Katayama, Y. (2003) Detection and characterization of a novel extracellular fungal enzyme that catalyzes the specific and hydrolytic cleavage of lignin guaiacylglycerol beta-aryl ether linkages, *Eur J Biochem* **270**: 2353-2362.

Paine, A.J. (1995) Heterogeneity of cytochrome P450 and its toxicological significance, *Hum Exp Toxicol* **14**: 1-7.

Ralph, S.G., Yueh, H., Friedmann, M., Aeschliman, D., Zeznik, J.A., Nelson, C.C., et al. (2006) Conifer defence against insects: microarray gene expression profiling of *Sitka spruce* (*Picea sitchensis*) induced by mechanical wounding or feeding by spruce budworms (*Choristoneura occidentalis*) or white pine weevils (Pissodes strobi) reveals large-scale changes of the host transcriptome, *Plant Cell Environ* **29**: 1545-1570.

Rea, P.A. (2007) Plant ATP-binding cassette transporters, *Annu Rev Plant Biol* **58**: 347-375.

Reddy, G.V., and Gold, M.H. (2000) Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: intermediates and reactions involved, *Microbiology* **146 (Pt 2)**: 405-413.

Redon, R., Ishikawa, S., Fitch, K.R., Feuk, L., Perry, G.H., Andrews, T.D., et al. (2006) Global variation in copy number in the human genome, *Nature* **444**: 444-454.

Rineau, F., Roth, D., Shah, F., Smits, M., Johansson, T., Canback, B., et al. (2012) The ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* converts organic matter in plant litter using a trimmed brown-rot mechanism involving Fenton chemistry, *Environ Microbiol* **14**: 1477-1487.

Sanchez, C. (2009) Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi, *Biotechnol Adv* **27**: 185-194.

Schuler, M.A. (2011) P450s in plant-insect interactions, *Biochim Biophys Acta* **1814**: 36-45.

Sharpton, T.J., Stajich, J.E., Rounsley, S.D., Gardner, M.J., Wortman, J.R., Jordar, V.S., et al. (2009) Comparative genomic analyses of the human fungal pathogens *Coccidioides* and their relatives, *Genome Res* **19**: 1722-1731.

Shimizu M., Yuda N., Nakamura T., Tanaka H. and Wariishi H., (2005). Metabolic regulation at the tricarboxylic acid and glyoxylate cycles of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* against exogenous addition of vanillin. **PROTEOMICS**. (5): 3919-3931.

Sprockett, D.D., Piontkivska, H., and Blackwood, C.B. (2011) Evolutionary analysis of glycosyl hydrolase family 28 (GH28) suggests lineage-specific expansions in necrotrophic fungal pathogens, *Gene* **479**: 29-36.

Stourman, N.V., Branch, M.C., Schaab, M.R., Harp, J.M., Ladner, J.E., and Armstrong, R.N. (2011) Structure and function of YghU, a nu-class glutathione transferase related to YfcG from *Escherichia coli*, *Biochemistry* **50**: 1274-1281.

Subramanian, V., and Yadav, J.S. (2009) Role of P450 monooxygenases in the degradation of the endocrine-disrupting chemical nonylphenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl Environ Microbiol* **75**: 5570-5580.

Sutherland, J.B., Selby, A.L., Freeman, J.P., Evans, F.E., and Cerniglia, C.E. (1991) Metabolism of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl Environ Microbiol* **57**: 3310-3316.

Suzuki, H., Macdonald, J., Syed, K., Salamov, A., Hori, C., Aerts, A., et al. (2012) Comparative genomics of the white-rot fungi, *Phanerochaete carnosa* and *P. chrysosporium*, to elucidate the genetic basis of the distinct wood types they colonize, *BMC Genomics* **13**: 444.

Syed, K., Doddapaneni, H., Subramanian, V., Lam, Y.W., and Yadav, J.S. (2010) Genome-to-function characterization of novel fungal P450 monooxygenases oxidizing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), *Biochem Biophys Res Commun* **399**: 492-497.

Talbot, J.M., Allison, S.D., and Treseder, K.K. (2008) Decomposers in disguise: mycorrhizal fungi as regulators of soil C dynamics in ecosystems under global change, *Functional Ecology* **22**: 955-963.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods, *Mol Biol Evol* **28**: 2731-2739.

Taylor, J.W. (2011) The poetry of mycological accomplishment and challenge, *Fungal Biology Reviews* **25**: 3-13.

Thion, C., Cebron, A., Beguiristain, T., and Leyval, C. (2012) Long-term in situ dynamics of the fungal communities in a multi-contaminated soil are mainly driven by plants, *FEMS Microbiol Ecol*.

Thuillier, A., Ngadin, A.A., Thion, C., Billard, P., Jacquot, J.P., Gelhaye, E., and Morel, M. (2011) Functional diversification of fungal glutathione transferases from the ure2p class, *Int J Evol Biol* **2011**: 938308.

Tirosh, I., and Barkai, N. (2007) Comparative analysis indicates regulatory neofunctionalization of yeast duplicates, *Genome Biol* **8**: R50.

Vanden Wymelenberg, A., Gaskell, J., Mozuch, M., Sabat, G., Ralph, J., Skyba, O., et al. (2010) Comparative transcriptome and secretome analysis of wood decay fungi *Postia placenta* and *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl Environ Microbiol* **76**: 3599-3610.

Vanden Wymelenberg, A., Gaskell, J., Mozuch, M., BonDurant, S.S., Sabat, G., Ralph, J., et al. (2011) Significant alteration of gene expression in wood decay fungi *Postia placenta* and *Phanerochaete chrysosporium* by plant species, *Appl Environ Microbiol* **77**: 4499-4507.

Verdin, A., Lounes-Hadj Sahraoui, A., Newsam, R., Robinson, G., and Durand, R. (2005) Polycyclic aromatic hydrocarbons storage by *Fusarium solani* in intracellular lipid vesicles, *Environ Pollut* **133**: 283-291.

Wadington, M.C., Ladner, J.E., Stourman, N.V., Harp, J.M., and Armstrong, R.N. (2009) Analysis of the structure and function of YfcG from *Escherichia coli* reveals an efficient and unique disulfide bond reductase, *Biochemistry* **48**: 6559-6561.

Weedon, J.T., Cornwell, W.K., Cornelissen, J.H., Zanne, A.E., Wirth, C., and Coomes, D.A. (2009) Global meta-analysis of wood decomposition rates: a role for trait variation among tree species?, *Ecol Lett* **12**: 45-56.

Wickner R. B., (1994). [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. **Science**. (264): 566-569.

Wong, D.W. (2009) Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes, *Appl Biochem Biotechnol* **157**: 174-209.

Wunschmann, J., Krajewski, M., Letzel, T., Huber, E.M., Ehrmann, A., Grill, E., and Lendzian, K.J. (2010) Dissection of glutathione conjugate turnover in yeast, *Phytochemistry* **71**: 54-61.

Xun, L., Belchik, S.M., Xun, R., Huang, Y., Zhou, H., Sanchez, E., et al. (2010) S-Glutathionyl-(chloro)hydroquinone reductases: a novel class of glutathione transferases, *Biochem J* **428**: 419-427.

Yalcin, B., Wong, K., Agam, A., Goodson, M., Keane, T.M., Gan, X., et al. (2011) Sequence-based characterization of structural variation in the mouse genome, *Nature* **477**: 326-329.

Yu, J., Chang, P.K., Ehrlich, K.C., Cary, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., et al. (2004) Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis, *Appl Environ Microbiol* **70**: 1253-1262.

Zhang, W., Duan, S., Bleibel, W.K., Wisel, S.A., Huang, R.S., Wu, X., et al. (2009) Identification of common genetic variants that account for transcript isoform variation between human populations, *Hum Genet* **125**: 81-93.

FIGURES

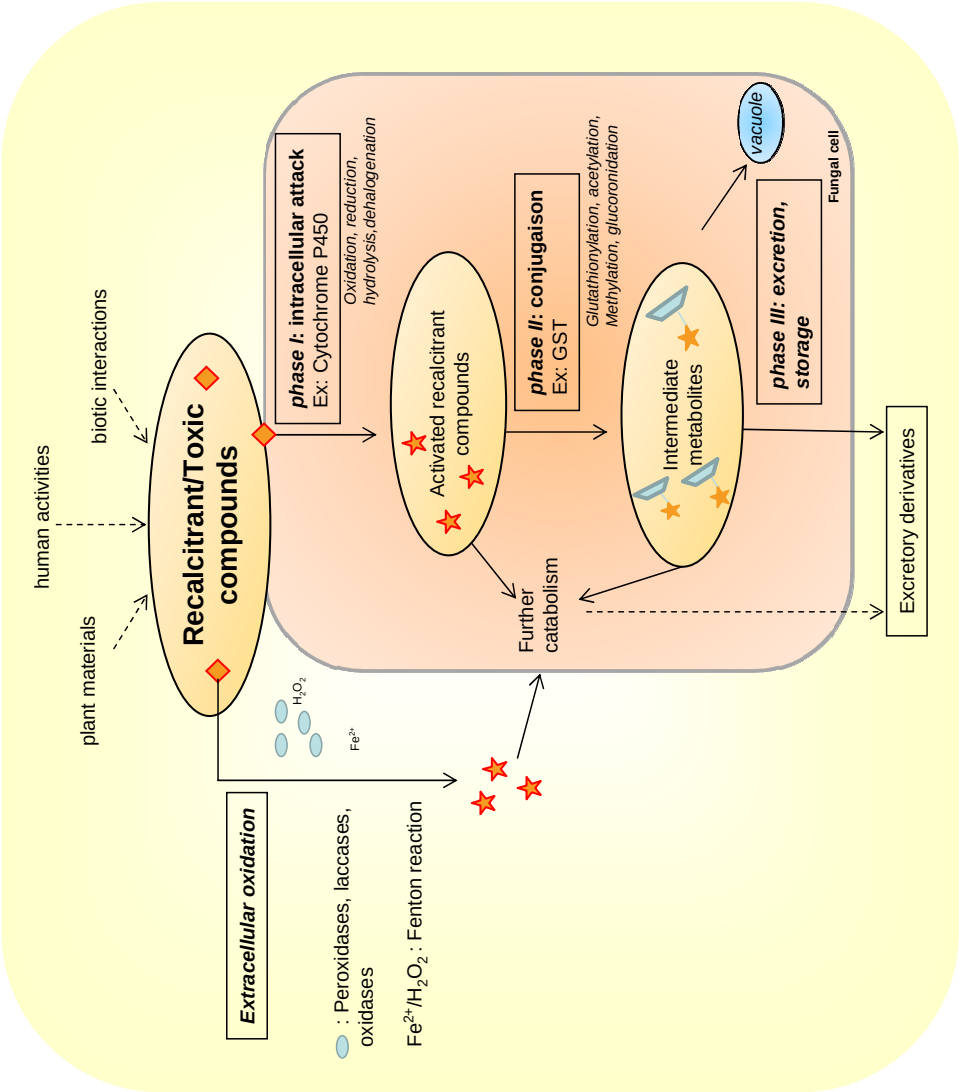


Figure 1

Figure 1. The fungal detoxification system defined as "xenome".

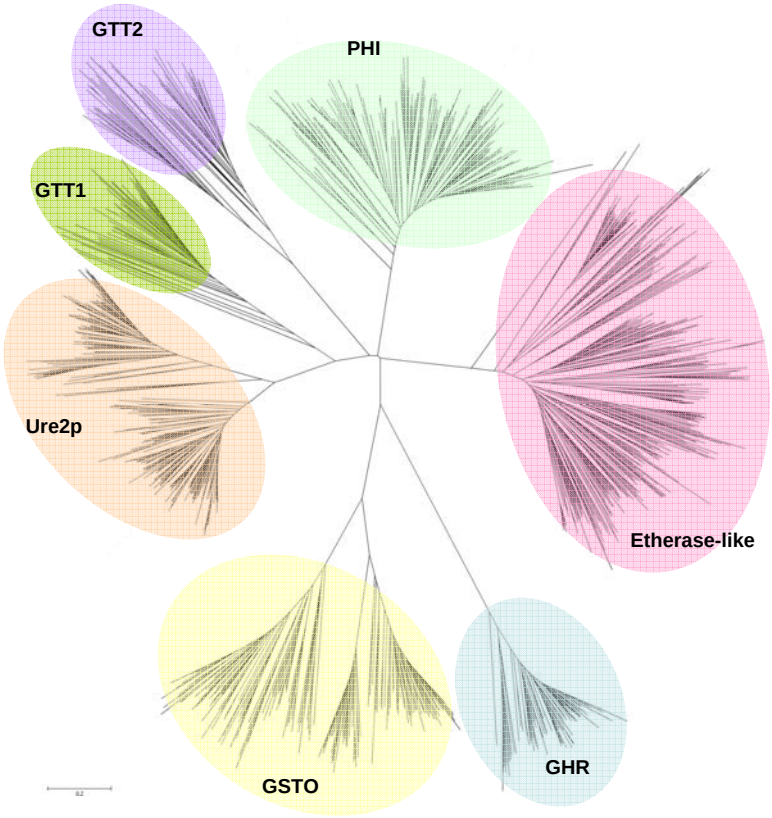


Figure 2

Figure 2. Phylogenetic tree of glutathione transferases from Basidiomycetes.

Various subclasses could be distinguished: Ure2p, etherase-like, Omega (GSTO), Glutathionyl Hydroquinone Reductase (GHR), Phi, GTT1 and GTT2. The sequences were retrieved from genomes available on the Joint Genome Institute (www.jgi.doe.gov/). Sequence alignments were done by ClustalW and the tree was constructed with the neighbor-joining method in MEGA 5.0 software (Tamura et al., 2011). The robustness of the branches was assessed by the bootstrap method with 500 replications. The scale marker represents 0.2 substitutions per residue.

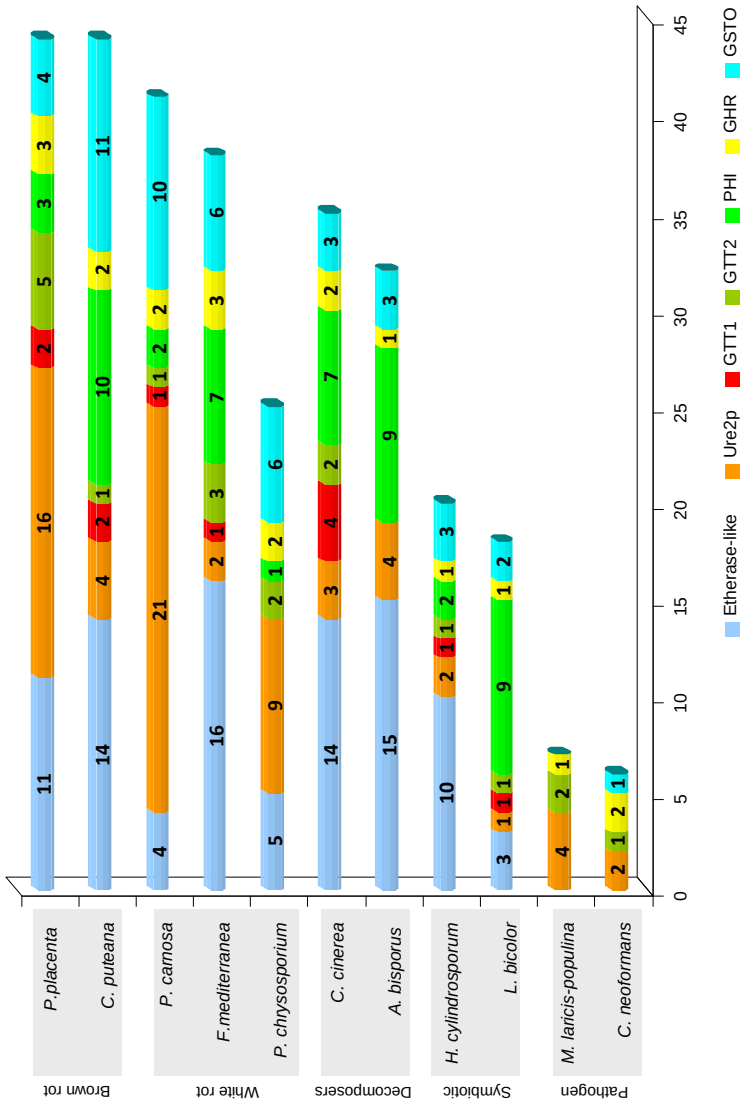


Figure 3

Figure 3. Organization of the GSTome in selected fungi.

GST isoform numbers for each subclass are reported. The repartition has been done based on the sequences retrieved from the JGI coupled to phylogenetic analyses.

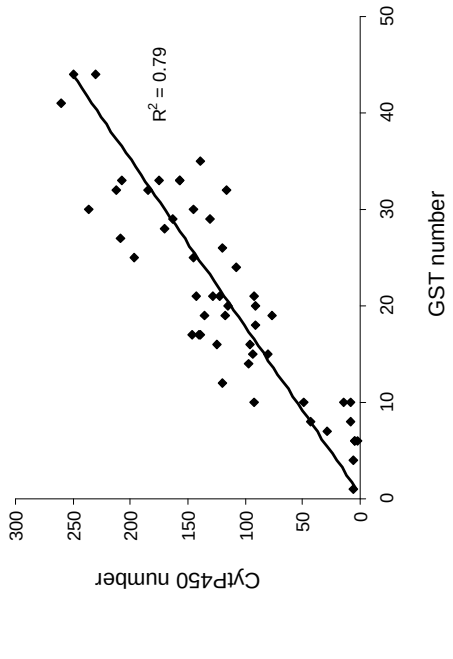


Figure 4. Relationship between GST and CytP450 copy numbers in basidiomycetes and ascomycetes, which genomes are available at the JGI. Among the 56 genomes included in this analysis, 5 from *Fomitiporia mediterranea*, *Phlebia brevispora*, *Paxillus involutus*, *Trichoderma reseei* and *Gymnopus luxurians* were not considered because they did not follow the general tendency.

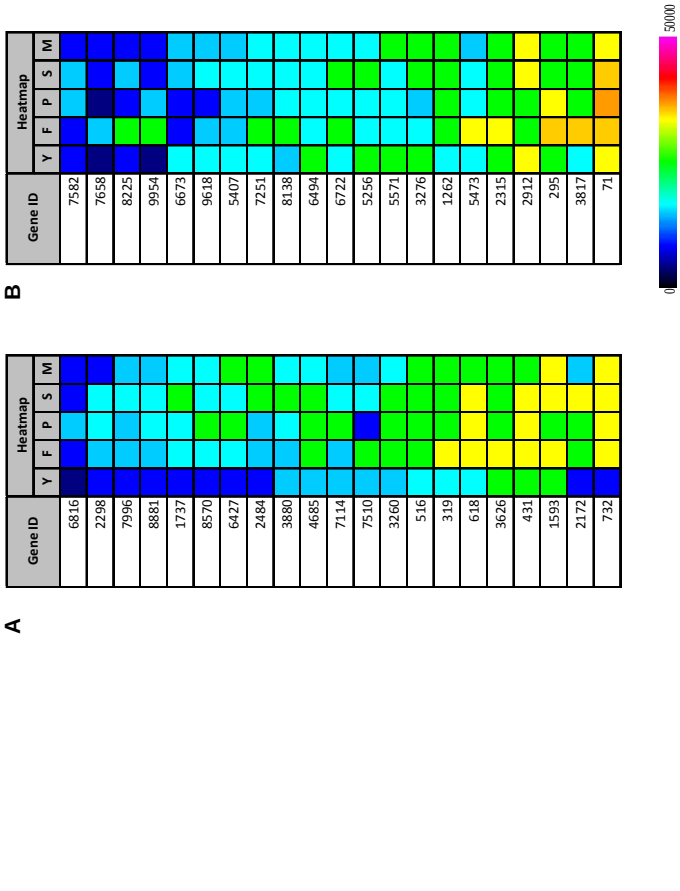


Figure 5: Heat maps for selected *P. carnosa* transcripts coding for CytP450 (A) and GSTs (B), during growth on YMPG (Y) or medium containing wood from fir (F), pine (P), spruce (S), or maple (M), as determined by mRNA-Seq. The colour scale represents the reads per kilobase of gene model per million mapped reads. The figure has been adapted from (MacDonald et al., 2011).

SUPPLEMENTAL DATA

Supplemental Table 1: Basidiomycete GST isoform number and repartition within the various subclasses. Sequences were retrieved by BLAST search from the JGI database and the repartition was done by a phylogenetic analysis using MEGA5.

Fungal specie	etherase-like	Ure2p		GTT1	GTT2	PHI	GHR	GSTO
		Ure2pA	Ure2pB					
Agaricus bisporus	15	0	4	0	0	9	1	3
Auricularia delicata	13	0	1	3	1	5	3	4
Bjerkandera adusta	6	16	2	1	2	1	1	3
Botryobasidium botryosum	12	0	4	1	2	10	1	0
Ceriporiopsis subvermispora	4	6	3	4	2	2	1	10
Coniophora puteana	14	0	4	2	1	10	2	11
Coprinopsis cinerea	14	0	3	4	2	7	2	3
Cryptococus neoformans	0	0	2	0	1	0	2	1
Dacryopinax sp	2	6	3	4	2	1	1	2
Dichomitus squalens	6	6	2	1	1	5	2	10
Fomitiporia mediterranea	16	0	2	1	3	7	3	6
Fomitopsis pinicola	10	5	2	1	2	2	2	4
Galerina marginata	13	0	3	3	2	4	1	3
Ganoderma sp	5	3	2	1	2	5	2	7
Gloeophyllum trabeum	7	7	1	1	2	2	3	3
Gymnopus luxurians	10	0	3	2	2	2	1	5
Hebeloma cylindrosporum	10	0	2	1	1	2	1	3
Heterobasidion annosum	7	0	2	1	3	2	2	4
Hydnomerulius pinastri	8	0	2	1	1	10	1	6
Hypholoma sublateritium	18	0	2	0	1	6	2	4
Jaapia argillacea	5	3	1	2	4	2	2	5
Laccaria bicolor	3	0	1	1	1	9	1	2
Malassezia globosa	0	0	1	0	0	0	0	0
Melampsora laricis-populina	0	3	1	0	2	0	1	0
Paxillus involutus	6	0	1	0	2	5	1	3
Phanerochate carnosa	4	20	1	1	1	2	2	10
Phanerochate chrysosporium	5	8	1	0	2	1	2	6
Phlebia brevispora	9	4	4	0	2	1	1	3
Phlebiopsis gigantea	7	6	1	1	1	1	2	5
Pleurotus ostreatus	6	0	1	1	2	2	1	4
Plicaturopsis crispa	6	0	2	2	4	2	3	2
Postia Placenta	11	13	3	2	5	3	3	4
Puccinia graminis	0	0	1	0	0	0	0	0
Punctularia strigosozonata	5	1	1	1	2	2	4	3
Rhodotorula graminis	0	1	0	2	2	0	1	1
Schizophyllum commune	7	0	0	3	2	4	3	1
Serpula lacrymans	20	0	2	1	1	5	1	3
Serpula lacrymans var-shastensis	7	0	2	1	1	10	1	2
Sporobolomyces roseus	0	1	0	0	1	0	1	1
Stereum hirsutum	12	0	3	1	3	7	2	5
Trametes versicolor	6	8	2	1	2	0	3	10
Tremella mesenterica Fries	0	0	1	1	3	4	1	0
Ustilago maydis	0	0	3	2	1	0	2	0
Wallemia sebi	0	0	2	1	1	0	2	0
Wolfiporia cocos	5	7	2	1	2	2	2	4

4) Promiscuité, néofonctionalisation, et convergence fonctionnelle : importance de la post-génomique

Les enzymes sont traditionnellement considérées comme des catalyseurs spécifiques, capables de convertir un seul substrat en un produit donné avec une grande efficacité (Fischer, 1894; Koshland, 1958; Lichtenthaler, 1995; Nath et Atkins, 2007). Cependant, certaines peuvent également effectuer d'autres fonctions souvent non enzymatiques mais plutôt structurales ou régulatrices. Par exemple, la phosphoglucoisomérase, catalysant l'interconversion du glucose 6-phosphate en en fructose 6-phosphate durant la glycolyse et la néoglucogenèse, est sécrétée chez les mammifères et agit alors en tant que neuroleukine (Faik et al., 1988), facteur de motilité autocrine (Watanabe et al., 1996) ou médiateur de la différentiation et de la maturation (Xu et al., 1996). Ces enzymes sont regroupées sous le terme « moonlighting » (Gupta et al., 2011). De plus, beaucoup d'enzymes peuvent agir sur des substrats structuralement distincts ou alors catalyser deux réactions chimiques différentes définissant différents types de promiscuité (Babtie et al., 2010; Copley, 2003; Hult et Berglund, 2007; Khersonsky et Tawfik, 2010; O'Brien et Herschlag, 1999) :

(i) La promiscuité de substrat : caractérise les enzymes présentant une large spécificité de substrat

(ii) La promiscuité catalytique : caractérise une enzyme catalysant des réactions chimiques différentes, c'est à dire que les types de liaisons créées et/ou clivées sont différentes

Des exemples de promiscuité de substrat sont représentés par les lipases qui acceptent une large gamme d'esters (Hult et Berglund, 2007), ou les prényltransférases qui peuvent accepter une série de dérivés du tryptophane contenant différentes substitutions sur la chaîne latérale ou le noyau indole (Zou et al., 2008). Un exemple de promiscuité catalytique est représenté par la tétrachlorohydroquinone déhalogénase de *Sphingobium chlorophenolicum* qui en plus de catalyser la déshalogénation du pentachlorophenol grâce à une activité GST peut également agir en tant qu'isomérase via une activité maleylacetoacetate isomérase (Anandarajah et al., 2000). Pour d'autres exemples d'enzymes présentant une promiscuité catalytique voir la revue de Khersonsky et Tawfik, 2010.

Les enzymes de détoxication, de par leur rôle, figurent parmi les enzymes exhibant une grande promiscuité (Ekroos et Sjogren, 2006; Redinbo, 2004). Plus spécifiquement, les GST

constituent une famille possédant le même repliement structural mais présentant différents niveaux de promiscuité variables, par conséquent, elles sont un excellent modèle pour l'étude de l'évolution de la promiscuité ou de la spécificité (Figure 66) (Coles et Kadlubar, 2005; Hayes et al., 2005).

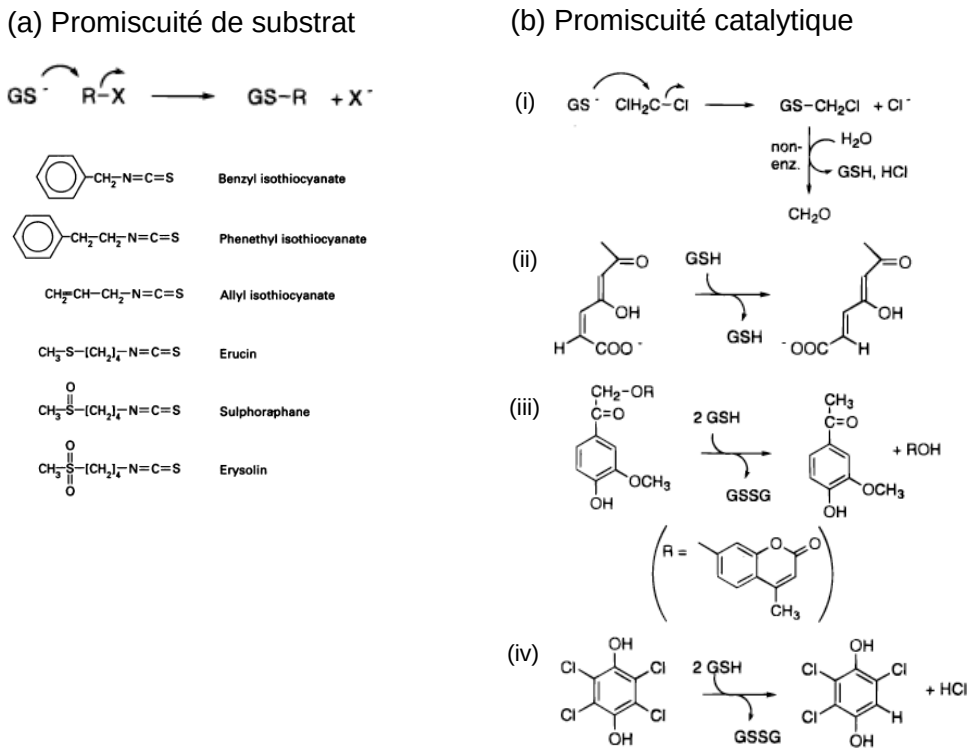


Figure 66 : Exemples de promiscuités des enzymes appartenant à la superfamille des GST (adapté d'après Anandarajah et al., 2000 et Kolm et al., 1995). **(a)** Promiscuité de substrat de l'activité transférase envers différents isothiocyanates **(b)** Promiscuité catalytique : **(i)** déshalogénation du dichlorométhane ; **(ii)** isomérisation ; **(iii)** clivage réductif de la liaison ß-aryl éther ; **(iV)** déshalogénation réductive de la tétrachlorohydroquinone.

En effet, cette famille d'enzymes présente une large spécificité de substrat, mais néanmoins chaque isoforme possède son propre profil catalytique (Nath et Atkins, 2007; Runarsdottir et Mannervik, 2010). L'évolution de cette famille est complexe, impliquant la duplication de gènes suivie par des mutations dans leur structure primaire. Ces éléments sont cruciaux pour l'émergence de nouvelles fonctions enzymatiques comme illustrée dans nos travaux où la mutation du résidu Sérine-22 en alanine de l'enzyme PcGSTFuA1 confère une nouvelle activité thiol transférase et modifie la spécificité de l'activité glutathion transférase (Chapitre 3 - Article 2 : Mathieu et al., 2012). Ce processus de néo-fonctionnalisation, est le moteur de l'évolution des protéines et les GST illustrent parfaitement comment ces changements aboutissent à un groupe d'enzymes possédant une myriade de fonctions (da Fonseca et al., 2010) (Figure 67).

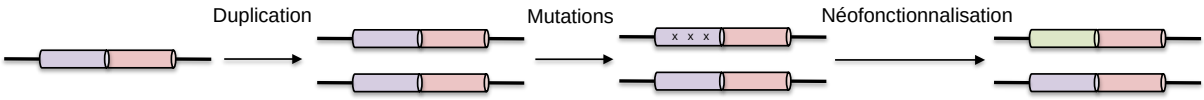


Figure 67 : Processus d'acquisition de nouvelles fonctions enzymatiques d'une famille de gènes. Les croix indiquent l'apparition de mutations ponctuelles.

Au delà de leur activité de conjugaison du GSH ces enzymes interviennent dans la biosynthèse d'hormones, le catabolisme de la tyrosine, la réduction du déhydroascorbate ou l'inhibition de l'activité de signalisation de la kinase terminale c-Jun (Adler et al., 1999; Hayes et al., 2005; Oakley, 2011). Les GST possèdent également une propriété ligandine contribuant à la séquestration et au transport des xénobiotiques et des hormones. La localisation du site à l'origine de cette propriété varie suivant la nature chimique du ligand et la classe de GST concernée. Par exemple, la GST humaine Pi 1-1 possède trois sites de reconnaissance des xénobiotiques à proximité du site de liaison du GSH (Ralat et Colman, 2004), la GST Alpha 3-3 de rat possède un site ligandine situé à l'interface dimérique (Vargo et Colman, 2001) et peut également lier le D5-androstène-3,17-dione sur son site H (Oakley, 2011), tandis qu'une GST de calamar appartenant à la classe sigma reconnaît le S-(3-iodobenzyl)-GSH à l'interface dimérique en complément des sites G et H (Ji et al., 1996). Ces données suggèrent donc que la propriété ligandine d'une classe de GST ne peut être facilement extrapolée aux autres classes.

La résolution de la structure de la GSTFuA1 de *P. chrysosporium* nous a permis d'identifier un site responsable de la fixation d'un anion sulfate à proximité du site de liaison du GSH (Chapitre 3 - Article 2 Mathieu et al., 2012). Cette particularité est partagée avec le facteur d'élongation 1Bγ de levure (Jeppesen et al., 2003), et les enzymes humaines de la classe Zêta (Polekhina et al., 2001) et Thêta où chez ces dernières, celui-ci est à l'origine d'une activité sulfatase envers les aralkylsulfates (Rossjohn et al., 1998). Dans notre cas, ce site de reconnaissance du sulfate est à l'origine de la fixation d'une sonde fluorescente, le 8-anilino-1-naphtalene-sulfonic acid (ANS). Les propriétés de fixation de cette sonde nous ont permis de mettre en évidence une propriété ligandine du site G vis-à-vis d'extractibles issus de bois de hêtre, toxiques pour les cellules fongiques et synthétisés par les arbres en réponse aux attaques biotiques (Danielsson et al., 2011; Lee et al., 2012). Sur la base de ces résultats, nous avons élargi l'investigation des propriétés de cette nouvelle classe structurale et fonctionnelle en déterminant sa distribution au sein des basidiomycètes saprophytes grâce aux génomes nouvellement séquencés, mais également en comparant leurs propriétés biochimiques et structurales (Chapitre 3 - Article 3). Nous avons mis en évidence une distribution espèce dépendante des GSTFuA, reflétant une diversification récente de ces séquences, ainsi qu'une conservation de la propriété ligandine du

site-G au détriment de l'activité transférase. Par exemple, PcGSTFuA1 et PcGSTFuA2 présentant 76% d'identité de séquence sont organisées en tandem sur le génome, reflétant un événement de duplication récent. Ces enzymes présentent des patterns d'activité différents, notamment PcGSTFuA2 qui était inactive dans la plupart des tests, mais ont conservé la propriété ligandine du site G soulignant l'importance de celle-ci au sein de cette classe.

Par ailleurs, l'analyse de la variation du nombre de copies de gènes codant les cytochromes P450 et les GST a démontré l'existence d'une corrélation entre ces deux familles impliquées respectivement dans la phase I et la phase II du processus de détoxication des xénobiotiques (Harms et al., 2011). Cependant, cette corrélation n'existe plus lorsque l'on considère les classes de GST individuellement. Ces observations suggèrent donc la présence d'un effet compensatoire entre les différentes classes de GST afin de relayer la première étape de détoxication (Article 4). La caractérisation des propriétés enzymatiques et ligandines des classes GSTFuA et Ure2p, particulièrement étendues chez les champignons saprophytes, démontre l'existence d'une convergence fonctionnelle entre ces 2 classes illustrant ainsi les bases biochimiques de cet effet compensatoire. Ces deux classes structuralement distinctes possèdent des profils fonctionnels fortement similaires comme par exemple PcGSTFuA1 et PcUre2p5 (Figure 68). Une convergence similaire a été observée pour les cytochromes P450 qui sont également capables de catalyser des réactions similaires sans similarité de séquence significative (Hirosue et al., 2011).

Ces résultats démontrent l'importance de la caractérisation biochimique en aval des études génomiques et soulignent qu'il est parfois trompeur d'assigner une fonction à une enzyme uniquement sur la base de sa similarité de séquence. En effet, dans l'ère de la post génomique, l'accès à une grande quantité de séquences de gènes et de structures protéiques est devenu la norme. A la mi-2011 on recensait 16 millions de séquences protéiques dans la base de données UniProt/TrEMBL (Consortium, 2011), tandis que le nombre de structures protéiques contenues dans la Protein Data Bank avoisinait les 73 000 (Dutta et al., 2009). Des millions de séquences additionnelles viennent continuellement s'ajouter grâce aux nouveaux projets de séquençage génomique et métagénomique comme par exemple le microbiome humain avec 3.3 millions de séquences bactériennes supplémentaires (Qin et al., 2010). Dans le cadre de l'étude des superfamilles, telles que les GST, l'annotation fonctionnelle devient un challenge car comme nous venons de le démontrer ces enzymes font preuve d'une grande promiscuité, sont très versatiles, avec des rôles biologique variés comme la signalisation cellulaire, le métabolisme de composés endogènes, de xénobiotiques, mais également avec des fonctions non enzymatiques (Oakley, 2011).

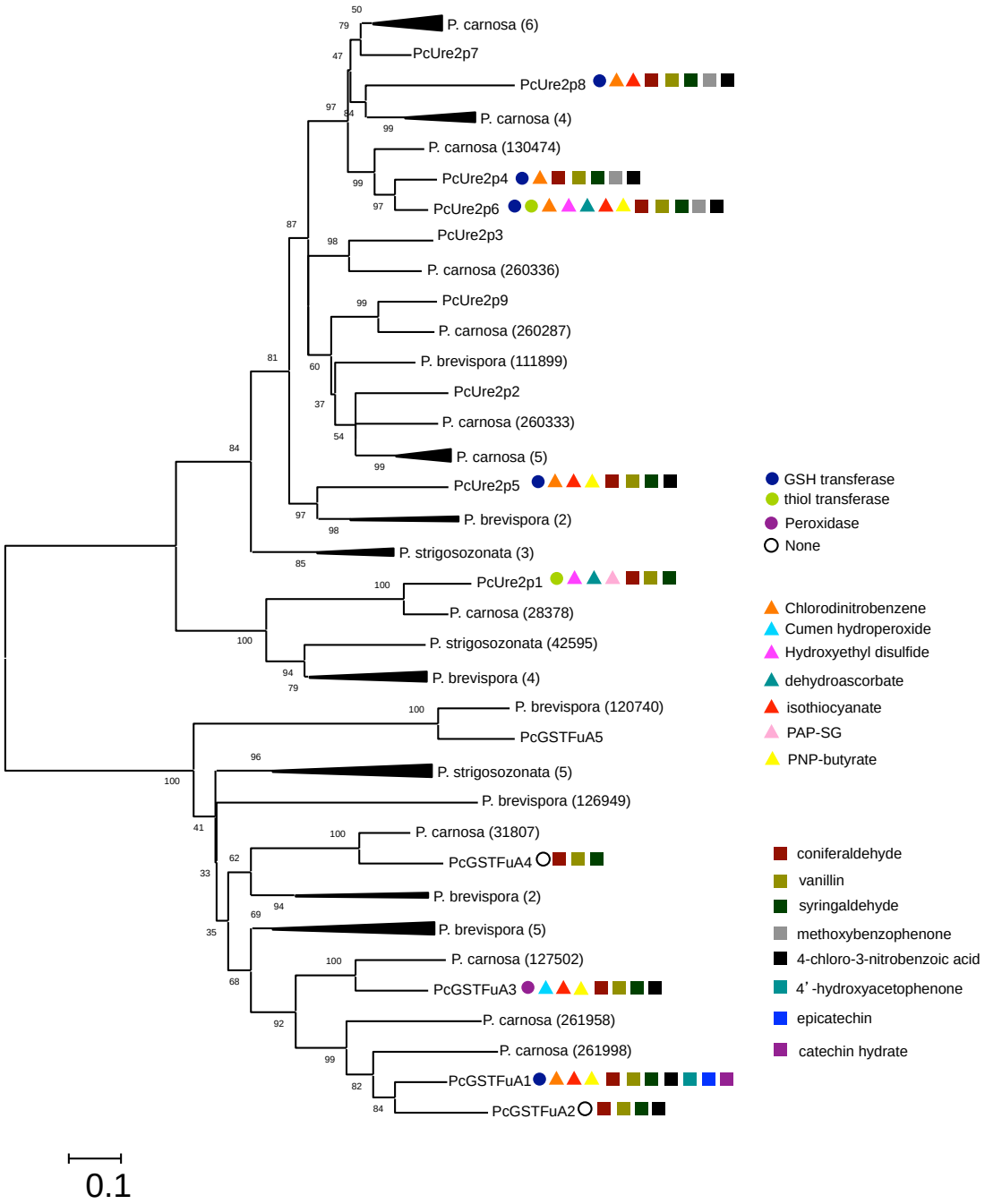


Figure 68 : Arbre phylogénétique illustrant la convergence fonctionnelle entre Ure2p et GSTFuA. Les enzymes ont été caractérisés pour leurs activités (cercles) à l'aide de différents substrats (triangles). La propriété ligandine envers différents composée est illustrée par des carrés (Données non publiées).

Bien qu'un grand nombre de GST aient été caractérisées expérimentalement, les substrats physiologiques et les réactions spécifiques d'une petite minorité seulement sont connus (Brown et Babbitt, 2012). La bio-informatique permet une appréhension globale des relations fonctionnelles existant au sein des superfamilles grâce aux réseaux de similarité de séquence (Atkinson et al., 2009). Ce genre de visualisation, initialement utilisé pour comparer les réseaux d'interaction entre protéines à large échelle (Shannon et al., 2003), réuni les informations structurales, séquentielles et phylogénétiques en une seule figure et permet le développement d'hypothèses sur les frontières fonctionnelles existant au sein d'une superfamille (Atkinson et al., 2009). A titre d'exemple, un réseau de similarité de séquence comparant 622 GST (représentant plus de 6000 séquences) issues de tout les organismes vivants (procaryotes et eucaryotes) montrent qu'elles peuvent être divisées en deux groupes majeurs, identifiables par leurs similarités structurales et séquentielles ainsi que par la variation des résidus au sein de leur site actif (Figure 69) (Atkinson et Babbitt, 2009). Cette carte montre les séquences pouvant être classées en tant que membres d'une classe majeure connue (nœuds colorés) ainsi que celles qui n'ont pas encore été assignées (nœuds en gris foncé et clair), démontrant clairement que malgré des années d'études la grande majorité des GST n'a jamais été caractérisée. De plus, la position de certains nœuds dans la topologie globale suggère qu'un certain nombre de classes additionnelles restent à définir. Ce genre d'analyse fournit donc une base quant au choix d'enzymes pour lesquelles une caractérisation structurale et fonctionnelle peut permettre la prédiction de nouvelles classes fonctionnelles. Cependant, c'est seulement par des investigations expérimentales que les fonctions *in vitro* et *in vivo* de telles protéines peuvent être validées confirmant ainsi l'importance des études post-génomiques.

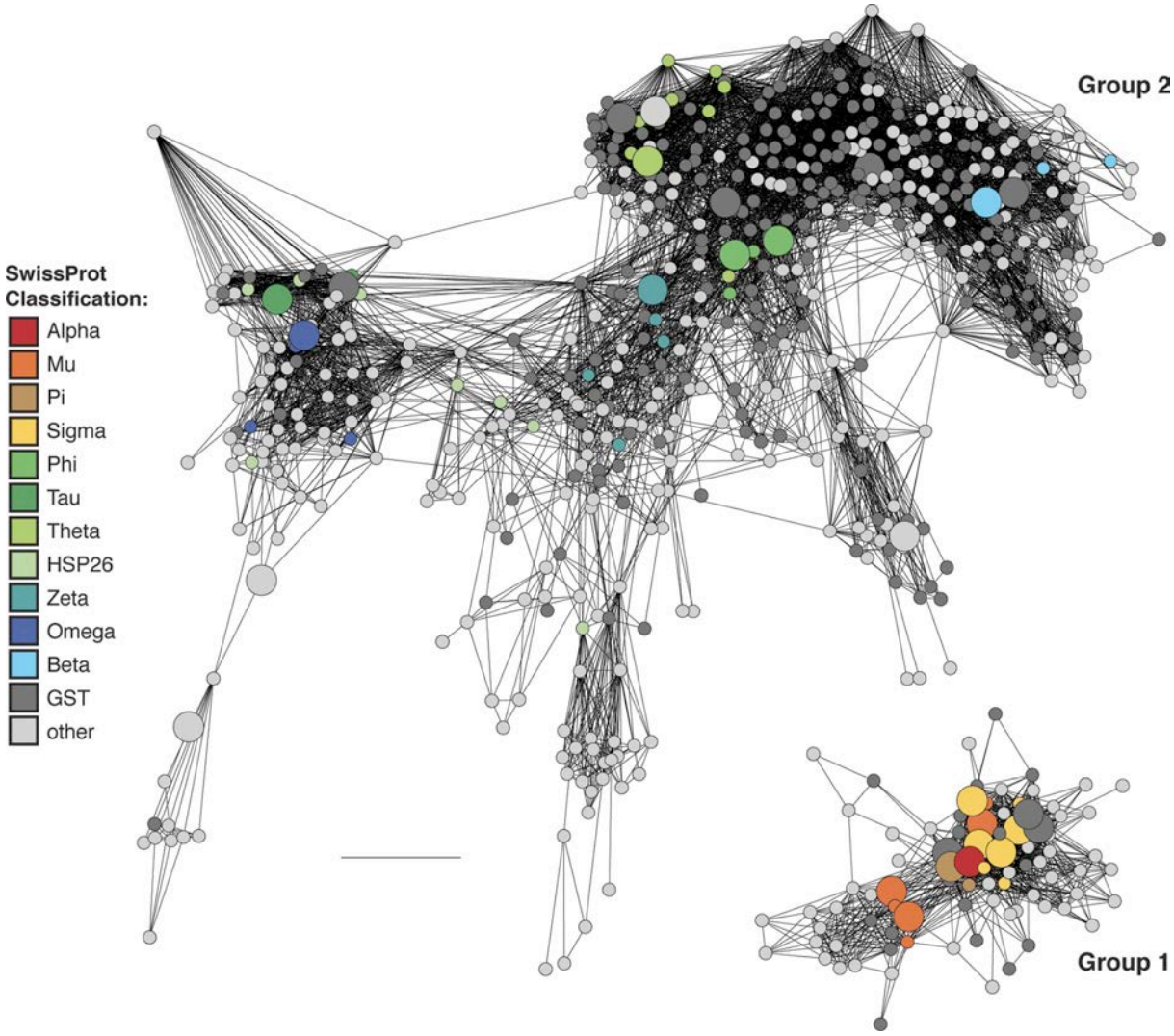


Figure 69 : Réseau de similarité de séquence des GST cytosoliques. 622 séquences représentatives ayant un maximum d'identité de 40% et regroupant plus de 6000 séquences de GST sont montrées. Les 40 nœuds les plus importants désignent les séquences pour lesquelles des structures sont associées (Atkinson et Babbitt, 2009).

Conclusions et perspectives

La compréhension des relations existantes entre un organisme et son environnement est la pierre angulaire de la biologie moderne. Afin d'appréhender ces mécanismes, les connaissances écologiques, physiologiques, fonctionnelles et biochimiques doivent être combinées dans le but d'en dresser un portait global le plus complet possible. Grâce à ce genre d'approche « multi échelle » (de la communauté à l'enzyme) nous avons mis en évidence plusieurs aspects gouvernant la sélection et l'adaptation des champignons décomposeurs du bois à leur environnement.

Premièrement, nous avons démontré qu'il existait un lien entre la composition chimique du bois et les communautés, qui lui sont associées (Chapitre 1). En perspectives de ce travail il serait intéressant d'appliquer la même stratégie d'échantillonnage dans différentes régions géographiques afin de mieux évaluer la composition et la succession des différents groupes écologiques en fonction des conditions climatiques. Il faudrait également introduire un plus grand nombre d'essences, et évaluer l'évolution de leur composition chimique en parallèle, afin d'apprécier comment la proportion des différents constituants du bois affecte la sélection des communautés. Finalement, l'élargissement de ce dispositif avec un plus grand nombre d'échantillons permettrait l'identification d'espèces bio-indicatrices des stades précoces de la décomposition du bois et dans le but de confirmer cette recherche, l'introduction de piquets ayant subis différents traitements antifongiques permettrait la validation de ces espèces.

L'analyse fonctionnelle des différents groupes écologiques, et des enzymes extracellulaires impliquées dans la décomposition du bois, d'une collection de souches fongiques nous a permis de proposer un « set » de marqueurs fonctionnels et d'invalider l'activité spécifique ß-étherase comme essentielle au processus de dégradation de la lignine (Chapitre 2 - Article 1). Ces marqueurs peuvent trouver des applications lors d'études d'écologie moléculaire ou être associés aux observations macroscopiques lors du test normatif EN 113. Afin de poursuivre ce travail, nous proposons le développement de tests plus spécifiques des familles d'enzymes (GH et CE) responsables de la dégradation de la cellulose et de l'hémicellulose. Le couplage d'études de génomique comparative avec des études transcriptomiques permettrait l'identification des classes d'enzymes responsables de l'initiation de la dégradation du bois, pour un type de pourriture, et favoriserait le développement de nouveaux biocides, ciblant spécifiquement ces activités, plus respectueux de l'environnement.

L'étude de la famille GSTFuA, étendue chez les champignons saprophytes, a révélé une propriété ligandine unique impliquée dans la séquestration des composés toxiques générés lors de la dégradation du bois. De plus, la distribution de cette classe suggère la présence d'une isoforme mitochondriale présente chez la majorité des champignons saprophytes indiquant une fonction conservée au sein de cet organite (Chapitre 3 - Article 3). En complément de ces travaux, il serait donc intéressant de produire des isoformes issues de plusieurs champignons représentatifs des divers groupes écologiques et d'examiner leurs propriétés structurales et biochimiques en comparaison avec les isoformes cytosoliques afin d'établir son rôle au sein de la mitochondrie.

Finalement, nous avons démontré l'importance du rôle de la machinerie de détoxication cellulaire des champignons décomposeurs du bois dans l'adaptation de ces organismes à leur substrat (Chapitre 3 - Article 4). La suite de ce travail serait la caractérisation fine des propriétés biochimiques des différentes classes au sein de plusieurs champignons provenant de différents groupes trophiques (saprophyte, pathogène, symbiotique) afin de corréler ces caractéristiques à l'évolution phylogénétiques des champignons en relation avec leur comportement écologique vis à vis du bois.

Tout au long de ces travaux nous avons donc démontré comment le substrat bois influe sur les champignons décomposeurs du bois en structurant leurs communautés et leur succession mais également comment ceux-ci ont développé une machinerie de dégradation complexe permettant l'extraction des substances nutritives de manière efficace ou le développement de symbiose. La dégradation du bois implique également une machinerie de détoxication efficace et malléable face à la diversité de composés toxiques générés en relation avec la variabilité chimique existante au sein des arbres. Une perspective plus globale de ces travaux serait donc de comprendre comment cette composition chimique influe sur sa susceptibilité aux attaques fongiques en reliant les informations écologiques, génomiques, physiologiques, fonctionnelles et biochimiques d'une large collection fongique prélevée *in situ* et d'établir une relation entre ces diverses données et l'environnement moléculaire.

Références

Adav S. S., Ravindran A. et Sze S. K., (2012). Quantitative proteomic analysis of lignocellulolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium* on different lignocellulosic biomass. **J Proteomics**. (75): 1493-1504.

Adler V., Yin Z., Fuchs S. Y., Benezra M., Rosario L., Tew K. D., Pincus M. R., Sardana M., Henderson C. J., Wolf C. R., Davis R. J. et Ronai Z., (1999). Regulation of JNK signaling by GSTp. **EMBO J**. (18): 1321-1334.

Ahmad M., Roberts J. N., Hardiman E. M., Singh R., Eltis L. D. et Bugg T. D., (2011). Identification of DypB from *Rhodococcus jostii* RHA1 as a lignin peroxidase. **Biochemistry**. (50): 5096-5107.

Ahmad M., Taylor C. R., Pink D., Burton K., Eastwood D., Bending G. D. et Bugg T. D., (2010). Development of novel assays for lignin degradation: comparative analysis of bacterial and fungal lignin degraders. **Mol Biosyst**. (6): 815-821.

Allen R. B., Buchanan P. K., Clinton P. W. et Cone A. J., (2000). Composition and diversity of fungi on decaying logs in a New Zealand temperate beech *Nothofagus*) forest. **Can J For Res**. (30): 1025-1033.

Allmer J., Vasiliauskas R., Ihrmark K., Stenlid J. et Dahlberg A., (2006). Wood-inhabiting fungal communities in woody debris of *Norway spruce* (*Picea abies* (L.) Karst.), as reflected by sporocarps, mycelial isolations and T-RFLP identification. **FEMS Microbiol Ecol**. (55): 57-67.

Allocati N., Casalone E., Masulli M., Ceccarelli I., Carletti E., Parker M. W. et Di Ilio C., (1999). Functional analysis of the evolutionarily conserved proline 53 residue in *Proteus mirabilis* glutathione transferase B1-1. **FEBS Lett**. (445): 347-350.

Anandarajah K., Kiefer P. M., Donohoe B. S. et Copley S. D., (2000). Recruitment of a Double Bond Isomerase To Serve as a Reductive Dehalogenase during Biodegradation of Pentachlorophenol. **Biochemistry**. (39): 5303-5311.

Anderson I. C. et Parkin P. I., (2007). Detection of active soil fungi by RT-PCR amplification of precursor rRNA molecules. **J Microbiol Methods**. (68): 248-253.

Andersson A. F., Lindberg M., Jakobsson H., Bäckhed F., Nyren P. et Engstrand L., (2008). Comparative Analysis of Human Gut Microbiota by Barcoded Pyrosequencing. **PLoS One**. (3): e2836.

Aneja M. K., Sharma S., Fleischmann F., Stich S., Heller W., Bahnweg G., Munch J. C. et Schloter M., (2006). Microbial colonization of beech and spruce litter--influence of decomposition site and plant litter species on the diversity of microbial community. **Microb Ecol**. (52): 127-135.

Arantes V. et Milagres A., (2009). The relevance of low molecular weight compounds in wood biodegradation by fungi. **Quim Nova**. (30): 1586-1595.

Arantes V., Milagres A. M., Filley T. R. et Goodell B., (2011). Lignocellulosic polysaccharides and lignin degradation by wood decay fungi: the relevance of nonenzymatic Fenton-based reactions. **J Ind Microbiol Biotechnol**. (38): 541-555.

Arfi Y., Buee M., Marchand C., Levasseur A. et Record E., (2012). Multiple markers pyrosequencing reveals highly diverse and host-specific fungal communities on the mangrove trees *Avicennia marina* and *Rhizophora stylosa*. **FEMS Microbiol Ecol**. (79): 433-444.

Armstrong R. N., (1997). Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. **Chem Res Toxicol**. (10): 2-18.

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

Aspeborg H., Coutinho P., Wang Y., Brumer H. et Henrissat B., (2012). Evolution, substrate specificity and subfamily classification of glycoside hydrolase family 5 (GH5). **BMC Evolutionary Biology**. (12): 186.

Atkinson H. J. et Babbitt P. C., (2009). Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold. **Biochemistry**. (48): 11108-11116.

Atkinson H. J., Morris J. H., Ferrin T. E. et Babbitt P. C., (2009). Using Sequence Similarity Networks for Visualization of Relationships Across Diverse Protein Superfamilies. **PLoS One**. (4): e4345.

Babtie A., Tokuriki N. et Hollfelder F., (2010). What makes an enzyme promiscuous? **Current Opinion in Chemical Biology**. (14): 200-207.

Baciocchi E., Bietti M., Gerini M. F. et Lanzalunga O., (2002). The mediation of veratryl alcohol in oxidations promoted by lignin peroxidase: the lifetime of veratryl alcohol radical cation. **Biochem Biophys Res Commun**. (293): 832-835.

Bailey J. K., Genung M. A., O'Reilly-Wapstra J., Potts B., Rowntree J., Schweitzer J. A. et Whitham T. G., (2012). New frontiers in community and ecosystem genetics for theory, conservation, and management. **New Phytologist**. (193): 24-26.

Baldrian P. et Valaskova V., (2008). Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. **FEMS Microbiol Rev**. (32): 501-521.

Bao W., Fukushima Y., Jensen K. A., Jr., Moen M. A. et Hammel K. E., (1994). Oxidative degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase. **FEBS Lett**. (354): 297-300.

Barberan A., Fernandez-Guerra A., Bohannan B. J. M. et Casamayor E. O., (2012). Exploration of community traits as ecological markers in microbial metagenomes. **Molecular Ecology**. (21): 1909-1917.

Bayer E. A., Chanzy H., Lamed R. et Shoham Y., (1998). Cellulose, cellulases and cellulosomes. **Curr Opin Struct Biol**. (8): 548-557.

Bezalel L., Hadar Y. et Cerniglia C. E., (1997). Enzymatic Mechanisms Involved in Phenanthrene Degradation by the White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*. **Appl Environ Microbiol**. (63): 2495-2501.

Bi R., Spadiut O., Lawoko M., Brumer H. et Henriksson G., (2012). Isolation and identification of microorganisms from soil able to live on lignin as a carbon source and to produce enzymes which cleave beta-O-4 bond in a lignin model compound. **Cellulose Chemistry and Technology**. (46): 227-242.

Blanchette R. A., (1995). Degradation of the lignocellulose complex in wood. **Can J Bot**. (73): 999-1010.

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

Blanchette R. A., Krueger E. W., Haight J. E., Akhtar M. et Akin D. E., (1997). Cell wall alterations in loblolly pine wood decayed by the white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora.* **Journal of Biotechnology**. (53): 203-213.

Board P. G., Baker R. T., Chelvanayagam G. et Jermiin L. S., (1997). Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. **Biochem J**. (328 (Pt 3)): 929-935.

Board P. G., Coggan M., Chelvanayagam G., Easteal S., Jermiin L. S., Schulte G. K., Danley D. E., Hoth L. R., Griffor M. C., Kamath A. V., Rosner M. H., Chrunyk B. A., Perregaux D. E., Gabel C. A., Geoghegan K. F. et Pandit J., (2000). Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. **J Biol Chem**. (275): 24798-24806.

Bodeker I. T., Nygren C. M., Taylor A. F., Olson A. et Lindahl B. D., (2009). ClassII peroxidase-encoding genes are present in a phylogenetically wide range of ectomycorrhizal fungi. **ISME J**. (3): 1387-1395.

Boukouvala S. et Fakis G., (2005). Arylamine N-acetyltransferases: what we learn from genes and genomes. **Drug Metab Rev**. (37): 511-564.

Bourbonnais R. et Paice M. G., (1990). Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. **FEBS Lett**. (267): 99-102.

Bourbonnais R., Paice M. G., Freiermuth B., Bodie E. et Borneman S., (1997). Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. **Appl Environ Microbiol**. (63): 4627-4632.

Bourne Y. et Henrissat B., (2001). Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. **Curr Opin Struct Biol**. (11): 593-600.

Bresell A., Weinander R., Lundqvist G., Raza H., Shimoji M., Sun T. H., Balk L., Wiklund R., Eriksson J., Jansson C., Persson B., Jakobsson P. J. et Morgenstern R., (2005). Bioinformatic and enzymatic characterization of the MAPEG superfamily. **FEBS J**. (272): 1688-1703.

Brock B. J., Rieble S. et Gold M. H., (1995). Purification and Characterization of a 1,4-Benzoquinone Reductase from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl Environ Microbiol**. (61): 3076-3081.

Brown S. D. et Babbitt P. C., (2012). Inference of functional properties from large-scale analysis of enzyme superfamilies. **J Biol Chem**. (287): 35-42.

Buée M., Courty P. E., Mignot D. et Garbaye J., (2007). Soil niche effect on species diversity and catabolic activities in an ectomycorrhizal fungal community. **Soil Biology and Biochemistry**. (39): 1947-1955.

Buee M., Reich M., Murat C., Morin E., Nilsson R. H., Uroz S. et Martin F., (2009). 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. **New Phytol**. (184): 449-456.

Busenlehner L. S., Codreanu S. G., Holm P. J., Bhakat P., Hebert H., Morgenstern R. et Armstrong R. N., (2004). Stress sensor triggers conformational response of the integral membrane protein microsomal glutathione transferase 1. **Biochemistry**. (43): 11145-11152.

Camarero S., Sarkar S., Ruiz-Duenas F. J., Martinez M. J. et Martinez A. T., (1999). Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. **J Biol Chem**. (274): 10324-10330.

Campbell A. M., Teesdale-Spittle P. H., Barrett J., Liebau E., Jefferies J. R. et Brophy P. M., (2001). A common class of nematode glutathione S-transferase (GST) revealed by the theoretical proteome of the model organism *Caenorhabditis elegans*. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**. (128): 701-708.

Campoy S., Alvarez-Rodriguez M. L., Recio E., Rumbero A. et Coque J. J., (2009). Biodegradation of 2,4,6-TCA by the white-rot fungus *Phlebia radiata* is initiated by a phase I (O-demethylation)-phase II (O-conjugation) reactions system: implications for the chlorine cycle. **Environ Microbiol**. (11): 99-110.

Candeias L. P. et Harvey P. J., (1995). Lifetime and reactivity of the veratryl alcohol radical cation. Implications for lignin peroxidase catalysis. **J Biol Chem**. (270): 16745-16748.

Cantarel B. L., Coutinho P. M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V. et Henrissat B., (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic Acids Res**. (37): D233-238.

Caramelo L., Martinez M. J. et Martinez A. T., (1999). A search for ligninolytic peroxidases in the fungus *Pleurotus eryngii* involving alpha-keto-gamma-thiomethylbutyric acid and lignin model dimers. **Appl Environ Microbiol**. (65): 916-922.

Cardinale B. J., Srivastava D. S., Emmett Duffy J., Wright J. P., Downing A. L., Sankaran M. et Jouseau C., (2006). Effects of biodiversity on the functioning of trophic groups and ecosystems. **Nature**. (443): 989-992.

Chambers S. M., Burke R. M., Brooks P. R. et Cairney J. W. G., (1999). Molecular and biochemical evidence for manganese-dependent peroxidase activity in *Tylospora fibrillosa*. **Mycological Research**. (103): 1098-1102.

Chave J., Coomes D., Jansen S., Lewis S. L., Swenson N. G. et Zanne A. E., (2009). Towards a worldwide wood economics spectrum. **Ecol Lett**. (12): 351-366.

Chi Y., Cheng Y., Vanitha J., Kumar N., Ramamoorthy R., Ramachandran S. et Jiang S. Y., (2011). Expansion mechanisms and functional divergence of the glutathione s-transferase family in sorghum and other higher plants. **DNA Res**. (18): 1-16.

Cohen R., Jensen K. A., Houtman C. J. et Hammel K. E., (2002). Significant levels of extracellular reactive oxygen species produced by brown rot basidiomycetes on cellulose. **FEBS Lett**. (531): 483-488.

Cohen R., Suzuki M. R. et Hammel K. E., (2005). Processive endoglucanase active in crystalline cellulose hydrolysis by the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. **Appl Environ Microbiol**. (71): 2412-2417.

Coles B. F. et Kadlubar F. F., (2005). "Human Alpha Class Glutathione S-Transferases: Genetic Polymorphism, Expression, and Susceptibility to Disease". In: Helmut S. et Lester P. **Methods in Enzymology**. Academic Press: 9-42.

Consortium T. U., (2011). Ongoing and future developments at the Universal Protein Resource. **Nucleic Acids Research**. (39): D214-D219.

Copley S. D., (2003). Enzymes with extra talents: moonlighting functions and catalytic promiscuity. **Curr Opin Chem Biol**. (7): 265-272.

Copley S. D., Novak W. R. et Babbitt P. C., (2004). Divergence of function in the thioredoxin fold suprafamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor. **Biochemistry**. (43): 13981-13995.

Coudray M. R., Canevascini G. et Meier H., (1982). Characterization of a cellobiose dehydrogenase in the cellulolytic fungus *Sporotrichum* (*Chrysosporium*) *thermophile*. **Biochem J**. (203): 277-284.

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

Cowling E. B. et Brown W., (1969). "Structural Features of Cellulosic Materials in Relation to Enzymatic Hydrolysis". In: Cellulases and Their Applications. AMERICAN CHEMICAL SOCIETY: 152-187.

Cresnar B. et Petric S., (2011). Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom. **Biochim Biophys Acta**. (1814): 29-35.

Cullen D. et Kersten P. J., (2004). "Enzymology and molecular biology of lignin degradation.". In: Brambl R. et Marzluf G. A. **The mycota III; Biochemistry and molecular biology, 2nd edition**. Berlin-Heidelberg. Springer-Verlag: 249-273.

Cullings K. et Courty P. E., (2009). Saprotrophic capabilities as functional traits to study functional diversity and resilience of ectomycorrhizal community. **Oecologia**. (161): 661-664.

Curling S. F., Clausen C. A. et Winandy J. E., (2002). Experimental method to quantify progressive stages of decay of wood by basidiomycete fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**. (49): 13-19.

Currie D. J., Mittelbach G. G., Cornell H. V., Field R., Guégan J.-F., Hawkins B. A., Kaufman D. M., Kerr J. T., Oberdorff T., O'Brien E. et Turner J. R. G., (2004). Predictions and tests of climate-based hypotheses of broad-scale variation in taxonomic richness. **Ecology Letters**. (7): 1121-1134.

da Fonseca R. R., Johnson W. E., O'Brien S. J., Vasconcelos V. et Antunes A., (2010). Molecular evolution and the role of oxidative stress in the expansion and functional diversification of cytosolic glutathione transferases. **BMC Evol Biol**. (10): 281.

Damon C., Barroso G., Ferandon C., Ranger J., Fraissinet-Tachet L. et Marmeisse R., (2010). Performance of the COX1 gene as a marker for the study of metabolically active *Pezizomycotina* and *Agaricomycetes* fungal communities from the analysis of soil RNA. **FEMS Microbiol Ecol**. (74): 693-705.

Daniel G. et Nilsson T., (1998). "Developments in the study of soft rot and bacterial decay.**"**. In: Bruce A. et Palfreyman J. W. **Forest Products Biotechnology**. London. Taylor et Francis: 37-62.

Daniel G., Volc J. et Kubatova E., (1994). Pyranose Oxidase, a Major Source of H(2)O(2) during Wood Degradation by *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, and *Oudemansiella mucida*. **Appl Environ Microbiol**. (60): 2524-2532.

Danielsson M., Lunden K., Elfstrand M., Hu J., Zhao T., Arnerup J., Ihrmark K., Swedjemark G., Borg-Karlson A. K. et Stenlid J., (2011). Chemical and transcriptional responses of *Norway spruce* genotypes with different susceptibility to *Heterobasidion* spp. infection. **BMC Plant Biol**. (11): 154.

Dashtban M., Schraft H. et Qin W., (2009). Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. **Int J Biol Sci**. (5): 578-595.

Decker S. R., Siika-Aho M. et Viikari L., (2008). "Enzymatic depolymerization of plant cell wall hemicelluloses.**"**. In: Himmel M. E. **Biomass recalcitrance : Deconstruction of the plant cell wall for bioenergy**. London. Blackwell: 353-373.

Demaneche S., Jocteur-Monrozier L., Quiquampoix H. et Simonet P., (2001). Evaluation of biological and physical protection against nuclease degradation of clay-bound plasmid DNA. **Appl Environ Microbiol**. (67): 293-299.

Ding S. Y. et Himmel M. E., (2008). "Anatomy and ultrastructure of maize cell walls: an example of energy plants.**"**. In: Himmel M. E. **Biomass recalcitrance : Deconstruction of the plant cell wall for bioenergy**. London. Blackwell: 38-60.

Dirr H., Reinemer P. et Huber R., (1994). X-ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferases. Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function. **Eur J Biochem**. (220): 645-661.

Dixon D. P., Davis B. G. et Edwards R., (2002). Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. Identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. **J Biol Chem**. (277): 30859-30869.

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

Doddapaneni H. et Yadav J. S., (2004). Differential regulation and xenobiotic induction of tandem P450 monooxygenase genes pc-1 (CYP63A1) and pc-2 (CYP63A2) in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl Microbiol Biotechnol**. (65): 559-565.

Dutta S., Burkhardt K., Young J., Swaminathan G., Matsuura T., Henrick K., Nakamura H. et Berman H., (2009). Data Deposition and Annotation at the Worldwide Protein Data Bank. **Molecular Biotechnology**. (42): 1-13.

Eastwood D. C., Floudas D., Binder M., Majcherczyk A., Schneider P., Aerts A., Asiegbu F. O., Baker S. E., Barry K., Bendiksby M., Blumentritt M., Coutinho P. M., Cullen D., de Vries R. P., Gathman A., Goodell B., Henrissat B., Ihrmark K., Kauserud H., Kohler A., LaButti K., Lapidus A., Lavin J. L., Lee Y. H., Lindquist E., Lilly W., Lucas S., Morin E., Murat C., Oguiza J. A., Park J., Pisabarro A. G., Riley R., Rosling A., Salamov A., Schmidt O., Schmutz J., Skrede I., Stenlid J., Wiebenga A., Xie X., Kues U., Hibbett D. S., Hoffmeister D., Hogberg N., Martin F., Grigoriev I. V. et Watkinson S. C., (2011). The plant cell wall-decomposing machinery underlies the functional diversity of forest fungi. **Science**. (333): 762-765.

Eckardt N. A., (2002). Probing the mysteries of lignin biosynthesis: the crystal structure of caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-O-methyltransferase provides new insights. **Plant Cell**. (14): 1185-1189.

Edwards R., Del Buono D., Fordham M., Skipsey M., Brazier M., Dixon D. P. et Cummings I., (2005). Differential induction of glutathione transferases and glucosyltransferases in wheat, maize and *Arabidopsis thaliana* by herbicide safeners. **Z Naturforsch C**. (60): 307-316.

Edwards S. L., Raag R., Wariishi H., Gold M. H. et Poulos T. L., (1993). Crystal structure of lignin peroxidase. **Proc Natl Acad Sci U S A**. (90): 750-754.

Eggert C., Temp U., Dean J. F. et Eriksson K. E., (1996). A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. **FEBS Lett**. (391): 144-148.

Ek M., Gierer J. et Jansbo K., (1989). Study on the selectivity of bleaching with oxygen-containing species. **Holzforschung**. (43): 391-396.

Ekroos M. et Sjogren T., (2006). Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. (103): 13682-13687.

England L. S., Lee H. et Trevors J. T., (1997). Persistence of *Pseudomonas aureofaciens* strains and DNA in soil. **Soil Biology and Biochemistry**. (29): 1521-1527.

Enoki A., Hirano T. et Tanaka H., (1992). Extracellular substance from the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum* that produces and reduces hydrogen peroxide. **Mater Organism**. (27): 247-261.

Enoki A., Tanaka H. et Itakura S., (2003). "Physical and chemical characteristics of glycopeptides from wood decay fungi.". In: Goodell B., Nicholas D. D. et Schultz T. P. **Wood Deterior Preserv**. Washington. Oxford University Press: 140-153.

Enoki M., Watanabe T., Nakagame S., Koller K., Messner K., Honda Y. et Kuwahara M., (1999). Extracellular lipid peroxidation of selective white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. **FEMS Microbiol Lett**. (180): 205-211.

Eriksson K. E., Blanchette R. A. et Ander P., (1990). **Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components**. Springer-Verlag, Berlin, New York, 407 pages.

Ettema C. H. et Wardle D. A., (2002). Spatial soil ecology. **Trends in Ecology & Evolution**. (17): 177-183.

Evans C. S., Dutton M. V., Guillen F. et VEness R. G., (1994). Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. **FEMS Microbiol Rev**. (13): 235-240.

Fabbrini M., Galli C. et Gentili P., (2002). Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. **Journal of Molecular Catalysis**. (16): 231-240.

Faik P., Walker J. I. H., Redmill A. A. M. et Morgan M. J., (1988). Mouse glucose-6-phosphate isomerase and neuroleukin have identical 3[prime] sequences. **Nature**. (332): 455-456.

Faison B. D. et Kirk T. K., (1985). Factors Involved in the Regulation of a Ligninase Activity in *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl Environ Microbiol**. (49): 299-304.

Fang J., Liu W. et Gao P. J., (1998). Cellobiose dehydrogenase from *Schizophyllum commune*: purification and study of some catalytic, inactivation, and cellulose-binding properties. **Arch Biochem Biophys**. (353): 37-46.

Fang T., Li D.-F. et Zhou N.-Y., (2011). Identification and clarification of the role of key active site residues in bacterial glutathione S-transferase zeta/maleylpyruvate isomerase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. (410): 452-456.

Faulds C. B. et Williamson G., (1995). Release of ferulic acid from wheat bran by a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*. **Appl Microbiol Biotechnol**. (43): 1082-1087.

Fernandez-Fueyo E., Ruiz-Duenas F. J., Ferreira P., Floudas D., Hibbett D. S., Canessa P., Larrondo L. F., James T. Y., Seelenfreund D., Lobos S., Polanco R., Tello M., Honda Y., Watanabe T., Ryu J. S., Kubicek C. P., Schmoll M., Gaskell J., Hammel K. E., St John F. J., Vanden Wymelenberg A., Sabat G., Splinter BonDurant S., Syed K., Yadav J. S., Doddapaneni H., Subramanian V., Lavin J. L.,

Oguiza J. A., Perez G., Pisabarro A. G., Ramirez L., Santoyo F., Master E., Coutinho P. M., Henrissat B., Lombard V., Magnuson J. K., Kues U., Hori C., Igarashi K., Samejima M., Held B. W., Barry K. W., LaButti K. M., Lapidus A., Lindquist E. A., Lucas S. M., Riley R., Salamov A. A., Hoffmeister D., Schwenk D., Hadar Y., Yarden O., de Vries R. P., Wiebenga A., Stenlid J., Eastwood D., Grigoriev I. V., Berka R. M., Blanchette R. A., Kersten P., Martinez A. T., Vicuna R. et Cullen D., (2012a). Comparative genomics of *Ceriporiopsis subvermispora* and *Phanerochaete chrysosporium* provide insight into selective ligninolysis. **Proc Natl Acad Sci U S A**. (109): 5458-5463.

Fernandez-Fueyo E., Ruiz-Duenas F. J., Miki Y., Martinez M. J., Hammel K. E. et Martinez A. T., (2012b). Lignin-degrading peroxidases from genome of selective ligninolytic fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. **J Biol Chem**. (287): 16903-16916.

Filho E. X., Puls J. et Coughlan M. P., (1996). Purification and characterization of two arabinofuranosidases from solid-state cultures of the fungus *Penicillium capsulatum*. **Appl Environ Microbiol**. (62): 168-173.

Fischer E., (1894). Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**. (27): 2985-2993.

Floudas D., Binder M., Riley R., Barry K., Blanchette R. A., Henrissat B., Martinez A. T., Otillar R., Spatafora J. W., Yadav J. S., Aerts A., Benoit I., Boyd A., Carlson A., Copeland A., Coutinho P. M., de Vries R. P., Ferreira P., Findley K., Foster B., Gaskell J., Glotzer D., Gorecki P., Heitman J., Hesse C., Hori C., Igarashi K., Jurgens J. A., Kallen N., Kersten P., Kohler A., Kues U., Kumar T. K., Kuo A., LaButti K., Larrondo L. F., Lindquist E., Ling A., Lombard V., Lucas S., Lundell T., Martin R., McLaughlin D. J., Morgenstern I., Morin E., Murat C., Nagy L. G., Nolan M., Ohm R. A., Patyshakuliyeva A., Rokas A., Ruiz-Duenas F. J., Sabat G., Salamov A., Samejima M., Schmutz J., Slot J. C., St John F., Stenlid J., Sun H., Sun S., Syed K., Tsang A., Wiebenga A., Young D., Pisabarro A., Eastwood D. C., Martin F., Cullen D., Grigoriev I. V. et Hibbett D. S., (2012). The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. **Science**. (336): 1715-1719.

Frova C., (2006). Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. **Biomol Eng**. (23): 149-169.

Fukasawa Y., Osono T. et Takeda H., (2009a). Dynamics of physicochemical properties and occurrence of fungal fruit bodies during decomposition of coarse woody debris of *Fagus crenata*. **Journal of Forest Research**. (14): 20-29.

Fukasawa Y., Osono T. et Takeda H., (2009b). Microfungus communities of Japanese beech logs at different stages of decay in a cool temperate deciduous forest. **Canadian Journal of Forest Research**. (39): 1606-1614.

Gamper H. A., van der Heijden M. G. A. et Kowalchuk G. A., (2010). Molecular trait indicators: moving beyond phylogeny in arbuscular mycorrhizal ecology. **New Phytologist**. (185): 67-82.

Gerlt J. A. et Babbitt P. C., (1998). Mechanistically diverse enzyme superfamilies: the importance of chemistry in the evolution of catalysis. **Curr Opin Chem Biol**. (2): 607-612.

Gershenzon J. et Dudareva N., (2007). The function of terpene natural products in the natural world. **Nat Chem Biol**. (3): 408-414.

Ghisla S. et Massey V., (1989). Mechanisms of flavoprotein-catalyzed reactions. **Eur J Biochem**. (181): 1-17.

Girio F. M., Fonseca C., Carvalheiro F., Duarte L. C., Marques S. et Bogel-Lukasik R., (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresour Technol**. (101): 4775-4800.

Glatt H., (2000). Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics. **Chem Biol Interact**. (129): 141-170.

Glenn J. K. et 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.

Goddell B., Qian Y. et Jellison J., (2008). "Fungal decay of wood - soft rot - brown rot - white rot.". In: **Development of Commercial Wood Preservatives**. ACS Symposium Series: 9-31.

Goodell B., (2003). Brown-rot fungal degradation of wood: our evolving view. **Wood Deterior Preserv**. (845): 97-118.

Goyal A., Ghosh B. et Eveleigh D., (1991). Characteristics of fungal cellulases. **Bioresour Technol**. (36): 37-50.

Green F. I. et Highley T. L., (1996). Mechanism of brown-rot decay: Paradigm or paradox? **International Biodeterioration & Biodegradation**. (39): 113-124.

Grytnes J. A. et McCain C. M., (2007). "Elevational trends in biodiversity.". In: Levins S. **Encyclopedia of biodiversity**. New York. Elsevier Science Publishers, 4666 pages.

Guillen F., Gomez-Toribio V., Martinez M. J. et Martinez A. T., (2000). Production of hydroxyl radical by the synergistic action of fungal laccase and aryl alcohol oxidase. **Arch Biochem Biophys**. (383): 142-147.

Guillen F., Martinez A. T. et Martinez M. J., (1990). Production of hydrogen peroxide by aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii.* **Appl Microbiol Biotechnol**. (32): 465-469.

Guillen F., Martinez A. T., Martinez M. J. et 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., Martinez M. J., Munoz C. et 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.

Gupta M. N., Kapoor M., Majumder A. B. et Singh V., (2011). Isozymes, moonlighting proteins and promiscous enzymes. **Current Science**. (100): 1152-1162.

Gutierrez A., Caramelo L., Prieto A., Martinez M. J. et Martinez A. T., (1994). Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi of the genus *Pleurotus*. **Appl Environ Microbiol**. (60): 1783-1788.

Hallac B. B. et Ragauskas A. J., (2011). Analyzing cellulose degree of polymerization and its relevancy to cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**. (5): 215-225.

Hallberg B. M., Henriksson G., Pettersson G. et Divne C., (2002). Crystal structure of the flavoprotein domain of the extracellular flavocytochrome cellobiose dehydrogenase. **J Mol Biol**. (315): 421-434.

Halliwell G., (1965). Catalytic Decomposition of Cellulose under Biological Conditions. **Biochem J**. (95): 35-40.

Hammel K. E., (1996). "Fungal degradation of lignin**"**. In: Cadisch G. et Giller K. E. **Driven by nature: plant litter quality and decomposition**. 33-45.

Hammel K. E., Jensen K. A., Jr., Mozuch M. D., Landucci L. L., Tien M. et Pease E. A., (1993). Ligninolysis by a purified lignin peroxidase. **J Biol Chem**. (268): 12274-12281.

Hammel K. E., Kapich A. N., Jensen K. A. et Ryan Z. C., (2002). Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. **Enzyme Microb Technol**. (30): 445-453.

Harms H., Schlosser D. et Wick L. Y., (2011). Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. **Nat Rev Microbiol**. (9): 177-192.

Harris J. M., Meyer D. J., Coles B. et Ketterer B., (1991). A novel glutathione transferase (13-13) isolated from the matrix of rat liver mitochondria having structural similarity to class theta enzymes. **Biochem J**. (278 (Pt 1)): 137-141.

Harris P. V., Welner D., McFarland K. C., Re E., Navarro Poulsen J. C., Brown K., Salbo R., Ding H., Vlasenko E., Merino S., Xu F., Cherry J., Larsen S. et Lo Leggio L., (2010). Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family. **Biochemistry**. (49): 3305-3316.

Harvey P. J., (1990). Oxidation of phenolic compounds by ligninase. **Journal of Biotechnology**. (13): 169-179.

Hashimoto Y. et Yoneda I., (2006). Influences of dominant ectomycorrhizal fungi on naturally regenerated conifer seedlings on fallen logs in subalpine forest in Hokkaido, Japan. **Annual Report of Interdisciplinary Research Institue of Environmental Sciences.** (24): 17-22.

Hatakka A., (2001). "Biodegradation of lignin.**"**. In: Hofrichter M. et Steinbüchel A. **Biopolymers, vol1: Lignin, humic substances and coal**. Weinheim. Wiley-VCH: 129-180.

Hatakka A., (2004). "Biodegradation of lignin**"**. In: Hofrichter M. et Steinbüchel A. **Lignin, Humic Substances and Coal**. Wiley: 129-167.

Hatakka A. et Hammel K. E., (2010). "Fungal biodegradation of lignocelluloses". In: **Mycota, Vol.10 : Industrial applications: 2nd edition**. Berlin, Heidelberg. Springer: 319-340.

Hawkins B. A., Field R., Cornell H. V., Currie D. J., Guégan J.-F., Kaufman D. M., Kerr J. T., Mittelbach G. G., Oberdorff T., O'Brien E. M., Porter E. E. et Turner J. R. G., (2003). Energy, water, and broad-scale geographic patterns of species richness. **Ecology**. (84): 3105-3117.

Hay M. E., (2009). Marine chemical ecology: chemical signals and cues structure marine populations, communities, and ecosystems. **Ann Rev Mar Sci**. (1): 193-212.

Hayes J. D., Flanagan J. U. et Jowsey I. R., (2005). Glutathione transferases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. (45): 51-88.

Heinfling A., Ruiz-Duenas F. J., Martinez M. J., Bergbauer M., Szewzyk U. et Martinez A. T., (1998). A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from Pleurotus eryngii and *Bjerkandera adusta*. **FEBS Lett**. (428): 141-146.

Henriksson G., Ander P., Pettersson B. et Pettersson G., (1995). Cellobiose dehydrogenase (cellobiose oxidase) form *Phanerochaete chrysosporium* as a wood degrading enzyme - studies on cellulose, xylan and synthetic lignin. **Appl Microbiol Biotechnol**. (42): 790-796.

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

Henriksson G., Salumets A., Divne C. et Pettersson G., (1997). Studies of cellulose binding by cellobiose dehydrogenase and a comparison with cellobiohydrolase 1. **Biochem J**. (324 (Pt 3)): 833-838.

Hernández-Ortega A., Ferreira P. et Martínez A., (2012). Fungal aryl-alcohol oxidase: a peroxide-producing flavoenzyme involved in lignin degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. (93): 1395-1410.

Herve C., Rogowski A., Blake A. W., Marcus S. E., Gilbert H. J. et Knox J. P., (2010). Carbohydrate-binding modules promote the enzymatic deconstruction of intact plant cell walls by targeting and proximity effects. **Proc Natl Acad Sci U S A**. (107): 15293-15298.

Hibbett D. S. et Donoghue M. J., (2001). Analysis of character correlations among wood decay mechanisms, mating systems, and substrate ranges in homobasidiomycetes. **Syst Biol**. (50): 215-242.

Hirosue S., Tazaki M., Hiratsuka N., Yanai S., Kabumoto H., Shinkyo R., Arisawa A., Sakaki T., Tsunekawa H., Johdo O., Ichinose H. et Wariishi H., (2011). Insight into functional diversity of cytochrome P450 in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of versatile monooxygenase. **Biochem Biophys Res Commun**. (407): 118-123.

Hofrichter M., (2002). Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme Microb Technol**. (30): 454-466.

Hofrichter M., Lundell T. et Hatakka A., (2001). Conversion of milled pine wood by manganese peroxidase from *Phlebia radiata*. **Appl Environ Microbiol**. (67): 4588-4593.

Hofrichter M., Ullrich R., Pecyna M. J., Liers C. et Lundell T., (2010). New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. **Appl Microbiol Biotechnol**. (87): 871-897.

Holm P. J., Bhakat P., Jegerschold C., Gyobu N., Mitsuoka K., Fujiyoshi Y., Morgenstern R. et Hebert H., (2006). Structural basis for detoxification and oxidative stress protection in membranes. **J Mol Biol**. (360): 934-945.

Holmer L. et Stenlid J., (1996). Diffuse competition for heterogeneous substrate in soil among six species of wood-decomposing basidiomycetes. **Oecologia**. (106): 531-538.

Hon D. N.-S. et Minemura N., (2001). "Color and Discoloration". In: Hon D. N.-S. et Shiraishi N. **Wood and Cellulosic Chemistry, Second Edition, Revised, and Expanded**. New York. Marcel Dekker: 385-443.

Howard R. L., Abotsi E., Jansen van Rensburg E. L. et Howard S., (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**. (2): 602-619.

Huang H., Zoppellaro G. et Sakurai T., (1999). Spectroscopic and kinetic studies on the oxygen-centered radical formed during the four-electron reduction process of dioxygen by *Rhus vernicifera* laccase. **J Biol Chem**. (274): 32718-32724.

Hult K. et Berglund P., (2007). Enzyme promiscuity: mechanism and applications. **Trends Biotechnol**. (25): 231-238.

Hundt K., Martin D., Hammer E., Jonas U., Kindermann M. K. et Schauer F., (2000). Transformation of triclosan by *Trametes versicolor* and *Pycnoporus cinnabarinus*. **Appl Environ Microbiol**. (66): 4157-4160.

Iason G. R., Lennon J. J., Pakeman R. J., Thoss V., Beaton J. K., Sim D. A. et Elston D. A., (2005). Does chemical composition of individual Scots pine trees determine the biodiversity of their associated ground vegetation? **Ecology Letters**. (8): 364-369.

Ide M., Ichinose H. et Wariishi H., (2012). Molecular identification and functional characterization of cytochrome P450 monooxygenases from the brown-rot basidiomycete *Postia placenta*. **Arch Microbiol**. (194): 243-253.

Ishikawa T., (1992). The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. **Trends Biochem Sci**. (17): 463-468.

Jakobsson P. J., Morgenstern R., Mancini J., Ford-Hutchinson A. et Persson B., (2000). Membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism (MAPEG). A widespread protein superfamily. **Am J Respir Crit Care Med**. (161): S20-24.

Jamil T., Opdekamp W., van Diggelen R. et ter Braak C. J. F., (2012). Trait-Environment Relationships and Tiered Forward Model Selection in Linear Mixed Models. **International Journal of Ecology**. (2012): 12 pages.

Jeffers M. R., McRoberts W. C. et Harper D. B., (1997). Identification of a phenolic 3-O-methyltransferase in the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Microbiology**. (143 (Pt 6)): 1975-1981.

Jeffries T. W., (1994). "Biodegradation of lignin and hemicelluloses.". In: Ratledge C. **Biochemistry of Microbial degradation**. Kluwer Academic Publishers: 233-277.

Jensen K. A., Bao W., Kawai S., Srebotnik E. et Hammel K. E., (1996). Manganese-Dependent Cleavage of Nonphenolic Lignin Structures by *Ceriporiopsis subvermispora* in the Absence of Lignin Peroxidase. **Appl Environ Microbiol**. (62): 3679-3686.

Jensen K. A., Jr., Houtman C. J., Ryan Z. C. et Hammel K. E., (2001). Pathways for extracellular Fenton chemistry in the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. **Appl Environ Microbiol**. (67): 2705-2711.

Jeppesen M. G., Ortiz P., Shepard W., Kinzy T. G., Nyborg J. et Andersen G. R., (2003). The crystal structure of the glutathione S-transferase-like domain of elongation factor 1Bgamma from *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**. (278): 47190-47198.

Ji X., von Rosenvinge E. C., Johnson W. W., Armstrong R. N. et Gilliland G. L., (1996). Location of a potential transport binding site in a sigma class glutathione transferase by x-ray crystallography. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. (93): 8208-8213.

Johnson N. C., Wilson G. W., Bowker M. A., Wilson J. A. et Miller R. M., (2010). Resource limitation is a driver of local adaptation in mycorrhizal symbioses. **Proc Natl Acad Sci U S A**. (107): 2093-2098.

Jönsson M. T., Edman M. et Jonsson B. G., (2008). Colonization and extinction patterns of wood-decaying fungi in a boreal old-growth *Picea abies* forest. **Journal of Ecology**. (96): 1065-1075.

Jowsey I. R., Thomson R. E., Orton T. C., Elcombe C. R. et Hayes J. D., (2003). Biochemical and genetic characterization of a murine class Kappa glutathione S-transferase. **Biochem J**. (373): 559-569.

Kaneko S., Hirano T., Tanaka H. et Enoki A., (2004). Physical and chemical properties of an extracellular low-molecular-weight substance from the brown rot basidiomycete *Fomitopsis palustris.* **Biocontr Sci**. (9): 11-19.

Kapich A. N., Steffen K. T., Hofrichter M. et Hatakka A., (2005). Involvement of lipid peroxidation in the degradation of a non-phenolic lignin model compound by manganese peroxidase of the litter-decomposing fungus *Stropharia coronilla*. **Biochem Biophys Res Commun**. (330): 371-377.

Karlsson J., Saloheimo M., Siika-Aho M., Tenkanen M., Penttila M. et Tjerneld F., (2001). Homologous expression and characterization of Cel61A (EG IV) of *Trichoderma reesei*. **Eur J Biochem**. (268): 6498-6507.

Kawai S., Iwatsuki M., Nakagawa M., Inagaki M., Hamabe A. et Ohashi H., (2004). An alternative ß-ether cleavage pathway for a non-phenolic ß-*O*-4 lignin model dimer catalyzed by a laccase-mediator system. **Enzyme Microb Technol**. (35): 154-160.

Kawai S., Nakagawa M. et Ohashi H., (2002). Degradation mechanisms of nonphenolic ß-*O*-4 lignin model dimer by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. **Enzyme Microb Technol**. (30): 482-489.

Kawai S., Umezawa T. et Higuchi T., (1988). Degradation mechanisms of phenolic ß-1 lignin substructure model compounds by laccase of *Coriolus versicolor.* **Archives of Biochemistry and Biophysics**. (262): 99-110.

Kebli H., Drouin P., Brais S. et Kernaghan G., (2011). Species composition of saproxylic fungal communities on decaying logs in the boreal forest. **Microb Ecol**. (61): 898-910.

Kelley R. L. et Reddy C. A., (1986). Identification of glucose oxidase activity as the primary source of hydrogen peroxide production in ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium.* **Archiv Microbiol**. (144): 248-253.

Kerem Z., hammel et Hammel K. E., (1999). Biodegradative mechanism of the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*: evidence for an extracellular hydroquinone-driven fenton reaction. **FEBS Lett**. (446): 49-54.

Kersten P. et Cullen D., (2007). Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Fungal Genet Biol**. (44): 77-87.

Kersten P. J. et Kirk T. K., (1987). Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H2O2 production by *Phanerochaete chrysosporium*. **J Bacteriol**. (169): 2195-2201.

Khanbabaee K. et van Ree T., (2001). Tannins: classification and definition. **Nat Prod Rep**. (18): 641-649.

Khersonsky O. et Tawfik D. S., (2010). Enzyme promiscuity: a mechanistic and evolutionary perspective. **Annu Rev Biochem**. (79): 471-505.

King B. C., Waxman K. D., Nenni N. V., Walker L. P., Bergstrom G. C. et Gibson D. M., (2011). Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi. **Biotechnol Biofuels**. (4): 4.

King C. D., Rios G. R., Green M. D. et Tephly T. R., (2000). UDP-glucuronosyltransferases. **Curr Drug Metab**. (1): 143-161.

Kirk T. K. et Cullen D., (1998). "Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi.". In: Young R. A. et Akthar M. **Environmentally Friendly Technologies for the pulp and paper industry**. New York. John Wiley & Sons: 273-307.

Kishi K., Wariishi H., Marquez L., Dunford H. B. et Gold M. H., (1994). Mechanism of manganese peroxidase compound II reduction. Effect of organic acid chelators and pH. **Biochemistry**. (33): 8694-8701.

Kleman-Leyer K., Agosin E., Conner A. H. et Kirk T. K., (1992). Changes in Molecular Size Distribution of Cellulose during Attack by White Rot and Brown Rot Fungi. **Appl Environ Microbiol**. (58): 1266-1270.

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

Kolm R. H., Danielson U. H., Zhang Y., Talalay P. et Mannervik B., (1995). Isothiocyanates as substrates for human glutathione transferases: structure-activity studies. **Biochem J**. (311 (Pt 2)): 453-459.

Kong K. H., Nishida M., Inoue H. et Takahashi K., (1992). Tyrosine-7 is an essential residue for the catalytic activity of human class PI glutathione S-transferase: chemical modification and site-directed mutagenesis studies. **Biochem Biophys Res Commun**. (182): 1122-1129.

Konishi T., Kato K., Araki T., Shiraki K., Takagi M. et Tamaru Y., (2005). A new class of glutathione S-transferase from the hepatopancreas of the red sea bream Pagrus major. **Biochem J**. (388): 299-307.

Koseki T., Mese Y., Fushinobu S., Masaki K., Fujii T., Ito K., Shiono Y., Murayama T. et Iefuji H., (2008). Biochemical characterization of a glycoside hydrolase family 61 endoglucanase from *Aspergillus kawachii*. **Appl Microbiol Biotechnol**. (77): 1279-1285.

Koshland D. E., (1958). Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. (44): 98-104.

Kovalchuk A. et Driessen A. J., (2010). Phylogenetic analysis of fungal ABC transporters. **BMC Genomics**. (11): 177.

Kroon P. A. et Williamson G., (1996). Release of ferulic acid from sugar-beet pulp by using arabinanase, arabinofuranosidase and an esterase from *Aspergillus niger*. **Biotechnol Appl Biochem**. (23 (Pt 3)): 263-267.

Kuan I. C., Johnson K. A. et Tien M., (1993). Kinetic analysis of manganese peroxidase. The reaction with manganese complexes. **J Biol Chem**. (268): 20064-20070.

Kubartová A., Ottosson E., Dahlberg A. et Stenlid J., (2012). Patterns of fungal communities among and within decaying logs, revealed by 454 sequencing. **Molecular Ecology**. (21): 4514-4532.

Kubicek C. P., (2012). Fungi and lignocellulosic biomass. John Wiley & Sons, 304 pages.

Kulhankova A., Béguiristain T., Moukoumi J., Berthelin J. et Ranger J., (2006). Spatial and temporal diversity of wood decomposer communities in different forest stands, determined by ITS rDNA targeted TGGE. **Ann. For. Sci.** (63): 547-556.

Kulikova H. A., Kliain O. I., Stepanova E. V. et Koroleva O. V., (2011). [Use of basidiomycetes in industrial waste processing and utilization technologies: fundamental and applied aspects (review)]. **Prikl Biokhim Mikrobiol**. (47): 619-634.

Ladner J. E., Parsons J. F., Rife C. L., Gilliland G. L. et Armstrong R. N., (2004). Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanism of the mitochondrial class kappa enzyme rGSTK1-1. **Biochemistry**. (43): 352-361.

Laine A. L., (2009). Role of coevolution in generating biological diversity: spatially divergent selection trajectories. **J Exp Bot**. (60): 2957-2970.

Lee S., Monnappa A. K. et Mitchell R. J., (2012). Biological activities of lignin hydrolysate-related compounds. **BMB Rep**. (45): 265-274.

Lee S. K., George S. D., Antholine W. E., Hedman B., Hodgson K. O. et Solomon E. I., (2002). Nature of the intermediate formed in the reduction of O(2) to H(2)O at the trinuclear copper cluster active site in native laccase. **J Am Chem Soc**. (124): 6180-6193.

Lehrner D., Zipper P., Henriksson G. et Pettersson G., (1996). Small-angle X-ray scattering studies on cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium.* **Biochim Biophys Acta**. (1293): 161-169.

Lekounougou S., Jacquot J.-P., Gérardin P. et Gelhaye E., (2008). Effects of propiconazole on extra-cellular enzymes involved in nutrient mobilization during *Trametes versicolor* wood colonization. **Wood Science and Technology**. (42): 169-177.

Lepesheva G. I. et Waterman M. R., (2007). Sterol 14alpha-demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. **Biochim Biophys Acta**. (1770): 467-477.

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

Li J., Xia Z. et Ding J., (2005). Thioredoxin-like domain of human kappa class glutathione transferase reveals sequence homology and structure similarity to the theta class enzyme. **Protein Sci**. (14): 2361-2369.

Lichtenthaler F. W., (1995). 100 Years “Schlüssel-Schloss-Prinzip”: What Made Emil Fischer Use this Analogy? **Angewandte Chemie International Edition in English**. (33): 2364-2374.

Liers C., Ullrich R., Steffen K. T., Hatakka A. et Hofrichter M., (2006). Mineralization of 14C-labelled synthetic lignin and extracellular enzyme activities of the wood-colonizing ascomycetes *Xylaria hypoxylon* and *Xylaria polymorpha*. **Appl Microbiol Biotechnol**. (69): 573-579.

Lilleskov E. A., Hobbie E. A. et Horton T. R., (2011). Conservation of ectomycorrhizal fungi: exploring the linkages between functional and taxonomic responses to anthropogenic N deposition. **Fungal Ecology**. (4): 174-183.

Lindahl B., Stenlid J. A. N., Olsson S. et Finlay R., (1999). Translocation of 32P between interacting mycelia of a wood-decomposing fungus and ectomycorrhizal fungi in microcosm systems. **New Phytologist**. (144): 183-193.

Lindahl B. D., Ihrmark K., Boberg J., Trumbore S. E., Högberg P., Stenlid J. et Finlay R. D., (2007). Spatial separation of litter decomposition and mycorrhizal nitrogen uptake in a boreal forest. **New Phytologist**. (173): 611-620.

Loreau M., Naeem S., Inchausti P., Bengtsson J., Grime J. P., Hector A., Hooper D. U., Huston M. A., Raffaelli D., Schmid B., Tilman D. et Wardle D. A., (2001). Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges. **Science**. (294): 804-808.

Lumley T. C., Gignac L. D. et Currah R. S., (2001). Microfungus communities of white spruce and trembling aspen logs at different stages of decay in disturbed and undisturbed sites in the boreal mixedwood region of Alberta. **Canadian Journal of Botany**. (79): 76-92.

Lundell T., Wever R., Floris R., Harvey P., Hatakka A., Brunow G. et Schoemaker H., (1993). Lignin peroxidase L3 from *Phlebia radiata*. Pre-steady-state and steady-state studies with veratryl alcohol and a non-phenolic lignin model compound 1-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-(2-methoxyphenoxy)propane-1,3-diol. **Eur J Biochem**. (211): 391-402.

Lynd L. R., Weimer P. J., van Zyl W. H. et Pretorius I. S., (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiol Mol Biol Rev**. (66): 506-577, table of contents.

MacDonald J., Doering M., Canam T., Gong Y., Guttman D. S., Campbell M. M. et Master E. R., (2011). Transcriptomic responses of the softwood-degrading white-rot fungus *Phanerochaete carnosa* during growth on coniferous and deciduous wood. **Appl Environ Microbiol**. (77): 3211-3218.

Macdonald J. et Master E. R., (2012). Time-dependent profiles of transcripts encoding lignocellulose-modifying enzymes of the white rot fungus *Phanerochaete carnosa* grown on multiple wood substrates. **Appl Environ Microbiol**. (78): 1596-1600.

Mansfield S. D., De Jong E. et Saddler J. N., (1997). Cellobiose dehydrogenase, an active agent in cellulose depolymerization. **Appl Environ Microbiol**. (63): 3804-3809.

Martin F., Cullen D., Hibbett D., Pisabarro A., Spatafora J. W., Baker S. E. et Grigoriev I. V., (2011). Sequencing the fungal tree of life. **New Phytol**. (190): 818-821.

Martin J. L., (1995). Thioredoxin--a fold for all reasons. **Structure**. (3): 245-250.

Martinez A. T., Speranza M., Ruiz-Duenas F. J., Ferreira P., Camarero S., Guillen F., Martinez M. J., Gutierrez A. et del Rio J. C., (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **Int Microbiol**. (8): 195-204.

Martinez D., Challacombe J., Morgenstern I., Hibbett D., Schmoll M., Kubicek C. P., Ferreira P., Ruiz-Duenas F. J., Martinez A. T., Kersten P., Hammel K. E., Vanden Wymelenberg A., Gaskell J., Lindquist E., Sabat G., Bondurant S. S., Larrondo L. F., Canessa P., Vicuna R., Yadav J.,

Doddapaneni H., Subramanian V., Pisabarro A. G., Lavin J. L., Oguiza J. A., Master E., Henrissat B., Coutinho P. M., Harris P., Magnuson J. K., Baker S. E., Bruno K., Kenealy W., Hoegger P. J., Kues U., Ramaiya P., Lucas S., Salamov A., Shapiro H., Tu H., Chee C. L., Misra M., Xie G., Teter S., Yaver D., James T., Mokrejs M., Pospisek M., Grigoriev I. V., Brettin T., Rokhsar D., Berka R. et Cullen D., (2009). Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. **Proc Natl Acad Sci U S A**. (106): 1954-1959.

Martinez D., Larrondo L. F., Putnam N., Gelpke M. D., Huang K., Chapman J., Helfenbein K. G., Ramaiya P., Detter J. C., Larimer F., Coutinho P. M., Henrissat B., Berka R., Cullen D. et Rokhsar D., (2004). Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. **Nat Biotechnol**. (22): 695-700.

Martinoia E., Klein M., Geisler M., Bovet L., Forestier C., Kolukisaoglu U., Muller-Rober B. et Schulz B., (2002). Multifunctionality of plant ABC transporters--more than just detoxifiers. **Planta**. (214): 345-355.

Marzullo L., Cannio R., Giardina P., Santini M. T. et 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.

Masai E., Ichimura A., Sato Y., Miyauchi K., Katayama Y. et Fukuda M., (2003). Roles of the enantioselective glutathione S-transferases in cleavage of beta-aryl ether. **J Bacteriol**. (185): 1768-1775.

Masai E., Katayama Y. et Fukuda M., (2007). Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin-derived aromatic compounds. **Biosci Biotechnol Biochem**. (71): 1-15.

Masai E., Katayama Y., Nishikawa S. et Fukuda M., (1999). Characterization of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 genes involved in degradation of lignin-related compounds. **J Ind Microbiol Biotechnol**. (23): 364-373.

Masai E., Katayama Y., Nishikawa S., Yamasaki M., Morohoshi N. et Haraguchi T., (1989). Detection and localization of a new enzyme catalyzing the beta-aryl ether cleavage in the soil bacterium (*Pseudomonas paucimobilis* SYK-6). **FEBS Lett**. (249): 348-352.

Masai E., Kubota S., Katayama Y., Kawai S., Yamasaki M. et Morohoshi N., (1993). Characterization of the C alpha-dehydrogenase gene involved in the cleavage of beta-aryl ether by *Pseudomonas paucimobilis*. **Biosci Biotechnol Biochem**. (57): 1655-1659.

Mathieu Y., Prosper P., Buee M., Dumarcay S., Favier F., Gelhaye E., Gerardin P., Harvengt L., Jacquot J. P., Lamant T., Meux E., Mathiot S., Didierjean C. et Morel M., (2012). Characterization of a *Phanerochaete chrysosporium* glutathione transferase reveals a novel structural and functional class with ligandin properties. **J Biol Chem**.

McGoldrick S., O'Sullivan S. M. et Sheehan D., (2005). Glutathione transferase-like proteins encoded in genomes of yeasts and fungi: insights into evolution of a multifunctional protein superfamily. **FEMS Microbiol Lett**. (242): 1-12.

Menkis A., Allmer J., Vasiliauskas R., Lygis V., Stenlid J. et Finlay R., (2004). Ecology and molecular characterization of dark septate fungi from roots, living stems, coarse and fine woody debris. **Mycol Res**. (108): 965-973.

Mester T. et Tien M., (2001). Engineering of a manganese-binding site in lignin peroxidase isozyme H8 from *Phanerochaete chrysosporium.* **Biochem Biophys Res Commun**. (284): 723-728.

Meux E., Morel M. l., Lamant T., Gérardin P., Jacquot J.-P., Dumarçay S. p. et Gelhaye E., New substrates and activity of Phanerochaete chrysosporium Omega glutathione transferases. **Biochimie**.

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

Miki K., Renganathan V. et Gold M. H., (1986). Mechanism of ß-aryl ether dimeric lignin model compound oxidation by lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemistry**. (25): 4790-4796.

Morel F., Rauch C., Petit E., Piton A., Theret N., Coles B. et Guillouzo A., (2004). Gene and protein characterization of the human glutathione S-transferase kappa and evidence for a peroxisomal localization. **J Biol Chem**. (279): 16246-16253.

Morel M., Ngadin A. A., Droux M., Jacquot J. P. et Gelhaye E., (2009). The fungal glutathione S-transferase system. Evidence of new classes in the wood-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Cell Mol Life Sci**. (66): 3711-3725.

Muheim A., Waldner R., Leisola M. S. A. et Fiechter A., (1990). An extracellular aryl alcohol oxidase from the white rot fungus *Bjerkandera adusta.* **Enzyme Microb Technol**. (12): 204-209.

Nagano N., Orengo C. A. et Thornton J. M., (2002). One fold with many functions: the evolutionary relationships between TIM barrel families based on their sequences, structures and functions. **J Mol Biol**. (321): 741-765.

Nakamura T., Ichinose H. et Wariishi H., (2012). Flavin-containing monooxygenases from *Phanerochaete chrysosporium* responsible for fungal metabolism of phenolic compounds. **Biodegradation**. (23): 343-350.

Nath A. et Atkins W. M., (2007). A Quantitative Index of Substrate Promiscuity. **Biochemistry**. (47): 157-166.

Nathaniel C., Wallace L. A., Burke J. et Dirr H. W., (2003). The role of an evolutionarily conserved cis-proline in the thioredoxin-like domain of human class Alpha glutathione transferase A1-1. **Biochem J**. (372): 241-246.

Newcombe D., Paszczynski A., Gajewska W., Kroger M., Feis G. et Crawford R., (2002). Production of small molecular weight catalysts and the mechanism of trinitrotoluene degradation by several *Gloeophyllum* species. **Enzyme Microb Technol**. (30): 506-517.

Niemenmaa O., Uusi-Rauva A. et Hatakka A., (2008). Demethoxylation of [O14CH3]-labelled lignin model compounds by the brown-rot fungi *Gloeophyllum trabeum* and *Poria* (*Postia*) *placenta*. **Biodegradation**. (19): 555-565.

Nilsson T., Daniel G., Kirk T. K. et Obst J. R., (1989). Chemistry and microscopy of wood decay by some higher *Ascomycetes*. **Holzforschung**. (43): 11-18.

Ning D., Wang H. et Zhuang Y., (2010). Induction of functional cytochrome P450 and its involvement in degradation of benzoic acid by *Phanerochaete chrysosporium*. **Biodegradation**. (21): 297-308.

Nordén B., Ryberg M., Götmark F. et Olausson B., (2004). Relative importance of coarse and fine woody debris for the diversity of wood-inhabiting fungi in temperate broadleaf forests. **Biological Conservation**. (117): 1-10.

Norrgard M. A., Ivarsson Y., Tars K. et Mannervik B., (2006). Alternative mutations of a positively selected residue elicit gain or loss of functionalities in enzyme evolution. **Proc Natl Acad Sci U S A**. (103): 4876-4881.

O'Brien P. J. et Herschlag D., (1999). Catalytic promiscuity and the evolution of new enzymatic activities. **Chem Biol**. (6): R91-R105.

O'Sullivan A., (1997). Cellulose: the structure slowly unravels. **Cellulose**. (4): 173-207.

Oakeshott J. G., Johnson R. M., Berenbaum M. R., Ranson H., Cristino A. S. et Claudianos C., (2010). Metabolic enzymes associated with xenobiotic and chemosensory responses in *Nasonia vitripennis*. **Insect Mol Biol**. (19 Suppl 1): 147-163.

Oakley A., (2011). Glutathione transferases: a structural perspective. **Drug Metab Rev**. (43): 138-151.

Oakley A. J., (2005). Glutathione transferases: new functions. **Curr Opin Struct Biol**. (15): 716-723.

Olsson J., Jonsson B. G., Hjältén J. et Ericson L., (2011). Addition of coarse woody debris - The early fungal succession on *Picea abies* logs in managed forests and reserves. **Biological Conservation**. (144): 1100-1110.

Otsuka Y., Sonoki T., Ikeda S., Kajita S., Nakamura M. et Katayama Y., (2003). Detection and characterization of a novel extracellular fungal enzyme that catalyzes the specific and hydrolytic cleavage of lignin guaiacylglycerol beta-aryl ether linkages. **Eur J Biochem**. (270): 2353-2362.

Ovaskainen O., Nokso-Koivisto J., Hottola J., Rajala T., Pennanen T., Ali-Kovero H., Miettinen O., Oinonen P., Auvinen P., Paulin L., Larsson K.-H. et Mokipoo R., (2010). Identifying wood-

inhabiting fungi with 454 sequencing: what is the probability that BLAST gives the correct species? **Fungal Ecology**. (3): 274-283.

Parfitt D., Hunt J., Dockrell D., Rogers H. J. et Boddy L., (2010). Do all trees carry the seeds of their own destruction? PCR reveals numerous wood decay fungi latently present in sapwood of a wide range of angiosperm trees. **Fungal Ecology**. (3): 338-346.

Paszczynski A., Crawford R., Funk D. et Goodell B., (1999). De novo synthesis of 4,5-dimethoxycatechol and 2, 5-dimethoxyhydroquinone by the brown rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. **Appl Environ Microbiol**. (65): 674-679.

Pemble S. E., Wardle A. F. et Taylor J. B., (1996). Glutathione S-transferase class Kappa: characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue. **Biochem J**. (319 (Pt 3)): 749-754.

Pereira H., Graça J. et Rodrigues J. C., (2003). "Wood chemistry in relation to quality". In: John B. et George J. **Wood quality and its biological basis**. Oxford. Blackwell Publishing: 30-52.

Perez J., Munoz-Dorado J., de la Rubia T. et Martinez J., (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **Int Microbiol**. (5): 53-63.

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

Piontek K., Antorini M. et Choinowski T., (2002). Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-A resolution containing a full complement of coppers. **J Biol Chem**. (277): 37663-37669.

Polekhina G., Board P. G., Blackburn A. C. et Parker M. W., (2001). Crystal structure of maleylacetoacetate isomerase/glutathione transferase zeta reveals the molecular basis for its remarkable catalytic promiscuity. **Biochemistry**. (40): 1567-1576.

Prida A., Ducousso A., Petit R. m., J., Nepveu G. r. et Puech J.-L., (2007). Variation in wood volatile compounds in a mixed oak stand: strong species and spatial differentiation in whisky-lactone content. **Ann. For. Sci.** (64): 313-320.

Prida A. et Puech J. L., (2006). Influence of geographical origin and botanical species on the content of extractives in American, French, and East European oak woods. **J Agric Food Chem**. (54): 8115-8126.

Pu Y., Kosa M., Kalluri U. C., Tuskan G. A. et Ragauskas A. J., (2011). Challenges of the utilization of wood polymers: how can they be overcome? **Appl Microbiol Biotechnol**. (91): 1525-1536.

Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K. S., Manichanh C., Nielsen T., Pons N., Levenez F., Yamada T., Mende D. R., Li J., Xu J., Li S., Li D., Cao J., Wang B., Liang H., Zheng H., Xie Y., Tap J., Lepage P., Bertalan M., Batto J.-M., Hansen T., Le Paslier D., Linneberg A., Nielsen H. B., Pelletier E., Renault P., Sicheritz-Ponten T., Turner K., Zhu H., Yu C., Li S., Jian M., Zhou Y., Li Y., Zhang X., Li S., Qin N., Yang H., Wang J., Brunak S., Dore J., Guarner F., Kristiansen K., Pedersen O., Parkhill J.,

Weissenbach J., Bork P., Ehrlich S. D. et Wang J., (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**. (464): 59-65.

Quinlan R. J., Sweeney M. D., Lo Leggio L., Otten H., Poulsen J. C., Johansen K. S., Krogh K. B., Jorgensen C. I., Tovborg M., Anthonsen A., Tryfona T., Walter C. P., Dupree P., Xu F., Davies G. J. et Walton P. H., (2011). Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. **Proc Natl Acad Sci U S A**. (108): 15079-15084.

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

Rabinovich M. L., Melnick M. S. et Bolobova A. V., (2002). The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. **Biochemistry (Mosc)**. (67): 850-871.

Rajala T., Peltoniemi M., Hantula J., Mäkipää R. et Pennanen T., (2011). RNA reveals a succession of active fungi during the decay of *Norway spruce* logs. **Fungal Ecology**. (4): 437-448.

Rajala T., Peltoniemi M., Pennanen T. et Makipaa R., (2012). Fungal community dynamics in relation to substrate quality of decaying *Norway spruce* (*Picea abies* [L.] Karst.) logs in boreal forests. **FEMS Microbiol Ecol**. (81): 494-505.

Rajala T., Peltoniemi M., Pennanen T. et Mäkipää R., (2010). Relationship between wood-inhabiting fungi determined by molecular analysis (denaturing gradient gel electrophoresis) and quality of decaying logs. **Canadian Journal of Forest Research**. (40): 2384-2397.

Ralat L. A. et Colman R. F., (2004). Glutathione S-transferase Pi has at least three distinguishable xenobiotic substrate sites close to its glutathione-binding site. **J Biol Chem**. (279): 50204-50213.

Ralph S. G., Yueh H., Friedmann M., Aeschliman D., Zeznik J. A., Nelson C. C., Butterfield Y. S., Kirkpatrick R., Liu J., Jones S. J., Marra M. A., Douglas C. J., Ritland K. et Bohlmann J., (2006). Conifer defence against insects: microarray gene expression profiling of *Sitka spruce* (*Picea sitchensis*) induced by mechanical wounding or feeding by spruce budworms (*Choristoneura occidentalis*) or white pine weevils (*Pissodes strobi*) reveals large-scale changes of the host transcriptome. **Plant Cell Environ**. (29): 1545-1570.

Ramachandra M., Crawford D. L. et Hertel G., (1988). Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete *Streptomyces viridosporus*. **Appl Environ Microbiol**. (54): 3057-3063.

Reddy G. V. et Gold M. H., (2000). Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: intermediates and reactions involved. **Microbiology**. (146 (Pt 2)): 405-413.

Reddy G. V., Sridhar M. et Gold M. H., (2003). Cleavage of nonphenolic beta-1 diarylpropane lignin model dimers by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Eur J Biochem**. (270): 284-292.

Redinbo M. R., (2004). Promiscuity: what protects us, perplexes us. **Drug Discovery Today**. (9): 431-432.

Reese E. T. et Levinson H. S., (1952). A comparative study of the breakdown of cellulose by microorganisms. **Physiolog Plantar**. (5): 345-366.

Renganathan V. et Gold M. H., (1986). Spectral characterization of the oxidized states of the lignin peroxidase, an extracellular heme enzyme from the white rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium.* **Biochemistry**. (25): 1626-1631.

Renganathan V., Miki K. et Gold M. H., (1985). Multiple molecular forms of diarylpropane oxygenase, an H2O2-requiring, lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*. **Arch Biochem Biophys**. (241): 304-314.

Renganathan V., Usha S. N. et Lindenburg F., (1990). Cellobiose oxidizing enzymes from the lignocellulose-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* - interaction with microcrystalline cellulose. **Appl Microbiol Biotechnol**. (32): 609-613.

Rineau F., Roth D., Shah F., Smits M., Johansson T., Canback B., Olsen P. B., Persson P., Grell M. N., Lindquist E., Grigoriev I. V., Lange L. et Tunlid A., (2012). The ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* converts organic matter in plant litter using a trimmed brown-rot mechanism involving Fenton chemistry. **Environ Microbiol**. (14): 1477-1487.

Ritschkoff A. C., Buchert J. et Viikari L., (1991). The production of extracellular hydrogen peroxide by brown rot fungi. **Mater Organism**. (26): 157-167.

Roberts J. N., Singh R., Grigg J. C., Murphy M. E., Bugg T. D. et Eltis L. D., (2011). Characterization of dye-decolorizing peroxidases from *Rhodococcus jostii* RHA1. **Biochemistry**. (50): 5108-5119.

Robinson A., Huttley G. A., Booth H. S. et Board P. G., (2004). Modelling and bioinformatics studies of the human Kappa-class glutathione transferase predict a novel third glutathione transferase family with similarity to prokaryotic 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerases. **Biochem J**. (379): 541-552.

Romani A. M., Fischer H., Mille-Lindblom C. et Tranvik L. J., (2006). Interactions of bacteria and fungi on decomposing litter: differential extracellular enzyme activities. **Ecology**. (87): 2559-2569.

Rooney A. P. et Ward T. J., (2005). Evolution of a large ribosomal RNA multigene family in filamentous fungi: birth and death of a concerted evolution paradigm. **Proc Natl Acad Sci U S A**. (102): 5084-5089.

Rossjohn J., McKinstry W. J., Oakley A. J., Verger D., Flanagan J., Chelvanayagam G., Tan K. L., Board P. G. et Parker M. W., (1998). Human theta class glutathione transferase: the crystal structure reveals a sulfate-binding pocket within a buried active site. **Structure**. (6): 309-322.

Roy B. P., Dumonceaux T., Koukoulas A. A. et Archibald F. S., (1996). Purification and Characterization of Cellobiose Dehydrogenases from the White Rot Fungus *Trametes versicolor*. **Appl Environ Microbiol**. (62): 4417-4427.

Runarsdottir A. et Mannervik B., (2010). A novel quasi-species of glutathione transferase with high activity towards naturally occurring isothiocyanates evolves from promiscuous low-activity variants. **J Mol Biol**. (401): 451-464.

Sanchez C., (2009). Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnol Adv**. (27): 185-194.

Sangha A. K., Parks J. M., Standaert R. F., Ziebell A., Davis M. et Smith J. C., (2012). Radical Coupling Reactions in Lignin Synthesis: A Density Functional Theory Study. **J Phys Chem B**. (116): 4760-4768.

Sarko A., (1978). What is the crystalline structure of cellulose? **Tappi**. (61): 59-61.

Schmidhalter D. R. et Canevascini G., (1993). Isolation and characterization of the cellobiose dehydrogenase from the brown-rot fungus *Coniophora puteana* (Schum ex Fr.) Karst. **Arch Biochem Biophys**. (300): 559-563.

Schoemaker H. et Leisola M. S. A., (1990). Degradation of lignin by *Phanerochaete chrysosporium.* **Journal of Biotechnology**. (13): 101-109.

Schuller D. J., Liu Q., Kriksunov I. A., Campbell A. M., Barrett J., Brophy P. M. et Hao Q., (2005). Crystal structure of a new class of glutathione transferase from the model human hookworm nematode *Heligmosomoides polygyrus*. **Proteins**. (61): 1024-1031.

Schwarze F. W. M. R., Engels J. et Mattheck C., (2000). Fungal strategies of wood decay in trees. Springer, Berlin.

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

Shallom D. et Shoham Y., (2003). Microbial hemicellulases. **Curr Opin Microbiol**. (6): 219-228.

Shannon P., Markiel A., Ozier O., Baliga N. S., Wang J. T., Ramage D., Amin N., Schwikowski B. et Ideker T., (2003). Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. **Genome Research**. (13): 2498-2504.

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

Shimizu M., Yuda N., Nakamura T., Tanaka H. et Wariishi H., (2005). Metabolic regulation at the tricarboxylic acid and glyoxylate cycles of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* against exogenous addition of vanillin. **Proteomics**. (5): 3919-3931.

Shimokawa T., Nakamura M., Hayashi N. et Ishihara M., (2004). Production of 2,5-dimethoxyhydroquinone by the brown-rot fungus *Serpula lacrymans* to drive extracellular Fenton reaction. **Holzforschung**. (58): 305-310.

Shou C., Christensen M. H. et Schülein M., (1998). Characterization of a cellobiose dehydrogenase from *Humicola insolens.* **Biochem J**. (330): 565-571.

Simon B. F. d., Cadahia E., Conde E. et Garcia-Vallejo M. C., (1996). Low Molecular Weight Phenolic Compounds in Spanish Oak Woods. **J Agric Food Chem**. (44): 1507-1511.

Skjøt M. S., Kauppinen S. K., Kofod L. K., Fuglsang C. F., Pauly M. P., Dalbøge H. D. et Andersen L. A., (2001). Functional cloning of an endo-arabinanase from *Aspergillus aculeatus* and its heterologous expression in *A. oryzae* and tobacco. **Molecular Genetics and Genomics**. (265): 913-921.

Skopelitou K., Dhavala P., Papageorgiou A. C. et Labrou N. E., (2012). A Glutathione Transferase from *Agrobacterium tumefaciens* Reveals a Novel Class of Bacterial GST Superfamily. **PLoS One**. (7): e34263.

Šnajdr J., Cajthaml T., Valášková V., Merhautová V., Petránková M., Spetz P., Leppänen K. et Baldrian P., (2011). Transformation of *Quercus petraea* litter: successive changes in litter chemistry are reflected in differential enzyme activity and changes in the microbial community composition. **FEMS Microbiology Ecology**. (75): 291-303.

Sogin M. L., Morrison H. G., Huber J. A., Welch D. M., Huse S. M., Neal P. R., Arrieta J. M. et Herndl G. J., (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". **Proceedings of the National Academy of Sciences**. (103): 12115-12120.

Stevens J. M., Armstrong R. N. et Dirr H. W., (2000). Electrostatic interactions affecting the active site of class sigma glutathione S-transferase. **Biochem J**. (347 Pt 1): 193-197.

Sundaramoorthy M., Youngs H. L., Gold M. H. et Poulos T. L., (2005). High-resolution crystal structure of manganese peroxidase: substrate and inhibitor complexes. **Biochemistry**. (44): 6463-6470.

Sutherland J. B., Selby A. L., Freeman J. P., Evans F. E. et Cerniglia C. E., (1991). Metabolism of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl Environ Microbiol**. (57): 3310-3316.

Suzuki M. R., Hunt C. G., Houtman C. J., Dalebroux Z. D. et Hammel K. E., (2006). Fungal hydroquinones contribute to brown rot of wood. **Environ Microbiol**. (8): 2214-2223.

Syed K., Doddapaneni H., Subramanian V., Lam Y. W. et Yadav J. S., (2010). Genome-to-function characterization of novel fungal P450 monooxygenases oxidizing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **Biochem Biophys Res Commun**. (399): 492-497.

Tan K. L., Chelvanayagam G., Parker M. W. et Board P. G., (1996). Mutagenesis of the active site of the human Theta-class glutathione transferase GSTT2-2: catalysis with different substrates involves different residues. **Biochem J**. (319 (Pt 1)): 315-321.

Tanaka H., Hirano T. et Enoki A., (1993). Extracellular substance from the white rot basidiomycete *Irpex lacteus* for production and reduction of H2O2 during wood degradation. **Journal of the Japan Wood Research Society**. (39): 493-499.

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

Tedersoo L., Suvi T., Jairus T. et Koljalg U., (2008). Forest microsite effects on community composition of ectomycorrhizal fungi on seedlings of *Picea abies* and *Betula pendula*. **Environ Microbiol**. (10): 1189-1201.

Temp U. et Eggert C., (1999). Novel interaction between laccase and cellobiose dehydrogenase during pigment synthesis in the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. **Appl Environ Microbiol**. (65): 389-395.

Tenkanen M., Siika-aho M., Hausalo T., Puls J. et Viikari L., (1996). "Synergism between xylanolytic enzymes of *Trichoderma reesei* in the degradation of acetyl-4-O-methylglucuronoxylan.". In: Srebotnik E. et Messner K. **Biotechnology in the pulp and paper industry: advances in applied and fundamental research**. Vienna. Facultas-Universitatsverlog: 503-508.

Thompson J. N., (2005). Coevolution: the geographic mosaic of coevolutionary arms races. **Curr Biol**. (15): R992-994.

Thuillier A., Ngadin A. A., Thion C., Billard P., Jacquot J. P., Gelhaye E. et Morel M., (2011). Functional diversification of fungal glutathione transferases from the ure2p class. **Int J Evol Biol**. (2011): 938308.

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

Tien M. et Kirk T. K., (1983). Lignin-Degrading Enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. **Science**. (221): 661-663.

Timofeevski S. L., Nie G., Reading N. S. et Aust S. D., (1999). Addition of veratryl alcohol oxidase activity to manganese peroxidase by site-directed mutagenesis. **Biochem Biophys Res Commun**. (256): 500-504.

Timofeevski S. L., Reading N. S. et Aust S. D., (1998). Mechanisms for protection against inactivation of manganese peroxidase by hydrogen peroxide. **Arch Biochem Biophys**. (356): 287-295.

Tomarev S. I., Zinovieva R. D., Guo K. et Piatigorsky J., (1993). Squid glutathione S-transferase. Relationships with other glutathione S-transferases and S-crystallins of cephalopods. **J Biol Chem**. (268): 4534-4542.

Tuor U., Wariishi H., Schoemaker H. E. et Gold M. H., (1992). Oxidation of phenolic arylglycerol beta-aryl ether lignin model compounds by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: oxidative cleavage of an alpha-carbonyl model compound. **Biochemistry**. (31): 4986-4995.

Vaaje-Kolstad G., Westereng B., Horn S. J., Liu Z., Zhai H., Sorlie M. et Eijsink V. G., (2010). An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. **Science**. (330): 219-222.

Valli K., Wariishi H. et Gold M. H., (1990). Oxidation of monomethoxylated aromatic compounds by lignin peroxidase: role of veratryl alcohol in lignin biodegradation. **Biochemistry**. (29): 8535-8539.

Van der Putten W. H., Vet L. E. M., Harvey J. A. et Wäckers F. L., (2001). Linking above- and belowground multitrophic interactions of plants, herbivores, pathogens, and their antagonists. **Trends in Ecology & Evolution**. (16): 547-554.

Vanden Wymelenberg A., Gaskell J., Mozuch M., BonDurant S. S., Sabat G., Ralph J., Skyba O., Mansfield S. D., Blanchette R. A., Grigoriev I. V., Kersten P. J. et Cullen D., (2011). Significant alteration of gene expression in wood decay fungi *Postia placenta* and *Phanerochaete chrysosporium* by plant species. **Appl Environ Microbiol**. (77): 4499-4507.

Vanden Wymelenberg A., Gaskell J., Mozuch M., Sabat G., Ralph J., Skyba O., Mansfield S. D., Blanchette R. A., Martinez D., Grigoriev I., Kersten P. J. et Cullen D., (2010). Comparative transcriptome and secretome analysis of wood decay fungi *Postia placenta* and *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl Environ Microbiol**. (76): 3599-3610.

Vargo M. A. et Colman R. F., (2001). Affinity Labeling of Rat Glutathione S-Transferase Isozyme 1-1 by 17ß-Iodoacetoxy-estradiol-3-sulfate. **Journal of Biological Chemistry**. (276): 2031-2036.

Vuilleumier S. et Pagni M., (2002). The elusive roles of bacterial glutathione S-transferases: new lessons from genomes. **Appl Microbiol Biotechnol**. (58): 138-146.

Wackett L. P. et Gibson D. T., (1982). Metabolism of xenobiotic compounds by enzymes in cell extracts of the fungus *Cunninghamella elegans*. **Biochem J**. (205): 117-122.

Wariishi H., Akileswaran L. et Gold M. H., (1988). Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: spectral characterization of the oxidized states and the catalytic cycle. **Biochemistry**. (27): 5365-5370.

Wariishi H. et Gold M. H., (1990). Lignin peroxidase compound III. Mechanism of formation and decomposition. **J Biol Chem**. (265): 2070-2077.

Watanabe H., Takehana K., Date M., Shinozaki T. et Raz A., (1996). Tumor cell autocrine motility factor is the neuroleukin/phosphohexose isomerase polypeptide. **Cancer Res**. (56): 2960-2963.

Welinder K. G., (1992). Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. **Curr Opin Struct Biol**. (2): 388-393.

Westereng B., Ishida T., Vaaje-Kolstad G., Wu M., Eijsink V. G., Igarashi K., Samejima M., Stahlberg J., Horn S. J. et Sandgren M., (2011). The putative endoglucanase PcGH61D from *Phanerochaete chrysosporium* is a metal-dependent oxidative enzyme that cleaves cellulose. **PLoS One**. (6): e27807.

Westermark U. et Eriksson K. E., (1974). Carbohydrate-dependent enzymatic quinone reduction during lignin degradation. **Acta Chem Scand**. (B28): 204-208.

Whitham T. G., Bailey J. K., Schweitzer J. A., Shuster S. M., Bangert R. K., LeRoy C. J., Lonsdorf E. V., Allan G. J., DiFazio S. P., Potts B. M., Fischer D. G., Gehring C. A., Lindroth R. L., Marks J. C., Hart S. C., Wimp G. M. et Wooley S. C., (2006). A framework for community and ecosystem genetics: from genes to ecosystems. **Nat Rev Genet**. (7): 510-523.

Whitham T. G., Difazio S. P., Schweitzer J. A., Shuster S. M., Allan G. J., Bailey J. K. et Woolbright S. A., (2008). Extending genomics to natural communities and ecosystems. **Science**. (320): 492-495.

Whitham T. G., Gehring C. A., Lamit L. J., Wojtowicz T., Evans L. M., Keith A. R. et Smith D. S., (2012). Community specificity: life and afterlife effects of genes. **Trends Plant Sci**. (17): 271-281.

Wilce M. C. et Parker M. W., (1994). Structure and function of glutathione S-transferases. **Biochim Biophys Acta**. (1205): 1-18.

Winandy J. E. et Morrel J. J., (1993). Relationship between incipient decay, strength and chemical composition of Douglas-fir heartwood. **Wood Fiber Science**. (25): 278-288.

Winayanuwattikun P. et Ketterman A. J., (2004). Catalytic and structural contributions for glutathione-binding residues in a Delta class glutathione S-transferase. **Biochem J**. (382): 751-757.

Wong D. W., (2009). Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. **Appl Biochem Biotechnol**. (157): 174-209.

Xu W., Seiter K., Feldman E., Ahmed T. et Chiao J. W., (1996). The differentiation and maturation mediator for human myeloid leukemia cells shares homology with neuroleukin or phosphoglucose isomerase. **Blood**. (87): 4502-4506.

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

Yelle D. J., Ralph J., Lu F. et Hammel K. E., (2008). Evidence for cleavage of lignin by a brown rot basidiomycete. **Environ Microbiol**. (10): 1844-1849.

Yoon J. J., Cha C. J., Kim Y. S., Son D. W. et Kim Y. K., (2007). The brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris* has the endo-glucanases capable of degrading microcrystalline cellulose. **J Microbiol Biotechnol**. (17): 800-805.

Youn H. D., Hah Y. C. et Kang S. O., (1995). Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi. **FEMS Microbiol Lett**. (132): 183-188.

Yu J., Chang P. K., Ehrlich K. C., Cary J. W., Bhatnagar D., Cleveland T. E., Payne G. A., Linz J. E., Woloshuk C. P. et Bennett J. W., (2004). Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. **Appl Environ Microbiol**. (70): 1253-1262.

Zamocky M., Ludwig R., Peterbauer C., Hallberg B. M., Divne C., Nicholls P. et Haltrich D., (2006). Cellobiose dehydrogenase--a flavocytochrome from wood-degrading, phytopathogenic and saprotropic fungi. **Curr Protein Pept Sci**. (7): 255-280.

Zamocky M. et Obinger C., (2010). "Molecular Phylogeny of Heme Peroxidases". In: Torres E. et Ayala M. **Biocatalysis Based on Heme Peroxidases**. Springer Berlin Heidelberg: 7-35.

Zeng Q. Y., Lu H. et Wang X. R., (2005). Molecular characterization of a glutathione transferase from *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae). **Biochimie**. (87): 445-455.

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

Žifčáková L., Dobiášová P., Kolářová Z., Koukol O. et Baldrian P., (2011). Enzyme activities of fungi associated with *Picea abies* needles. **Fungal Ecology**. (4): 427-436.

Zimmermann W., (1990). Degradation of lignin by bacteria. **Journal of Biotechnology**. (13): 119-130.

Zou H., Zheng X. et Li S.-M., (2008). Substrate Promiscuity of the Cyclic Dipeptide Prenyltransferases from *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Natural Products**. (72): 44-52.

Communications scientifiques

Publications :

Mathieu Y., Prosper P., Buee M., Dumarcay S., Favier F., Gelhaye E., Gerardin P., Harvengt L., Jacquot J. P., Lamant T., Meux E., Mathiot S., Didierjean C. et Morel M., (2012).
Characterization of a Phanerochaete chrysosporium glutathione transferase reveals a novel structural and functional class with ligandin properties. **J Biol Chem, sous presse.**

Mathieu Y., Gelhaye E., Dumarçay S., Gérardin P., Harvengt L., et Buée M. (2012).
Selection and validation of enzymatic activities as functional markers in wood biotechnology and fungal ecology. **Journal of Microbiological Methods.**

Mathieu Y., Prosper P., Favier F., Harvengt L., Didierjean C., Morel M. et Gelhaye E. (2012).
Diversity of fungal specific class A glutathione transferases among saprotrophic fungi reveals a putative strategy to wood adaptation. **PLoS One, en préparation.**

Morel M., Meux E., **Mathieu Y**., Thuillier A., Chibani K., Harvengt L. et Gelhaye E. (2012).
Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi. **Microbial Biotechnology.**

Mathieu Y., Harvengt L., Gelhaye E. et Buée M. (2011).
Diversité phylogénétique et fonctionnelle des champignons décomposeurs du bois. Séminaire 2011 de l'Ecole Doctorale RP2E "Ingénierie des Ressources, Procédés, Produits et Environnement". **ISBN 2-9518564-9-0**.

Posters :

Mathieu Y., Harvengt L., Gelhaye E. et Buée M.
Caractérisation phylogénétique et fonctionnelle des champignons décomposeurs du bois. **Journées Jean Chevaugeon, 9èmes Rencontres de Phytopathologie-Mycologie de la Société Française de Phytopathologie. Aussois, France, 16-20 janvier 2012.**

Mathieu Y., Thuillier A., Meux E., Dumarçais S., Gérardin P., Gelhaye E., Buée M., Harvengt L., Jacquot J.P. et Morel M.
Fungal glutathione transferases: targets for evolutionary innovations. **11TH European Conference on Fungal Genetics. Marburg, Germany, April 2012.**

Résumé : Les champignons saprophytes sont les acteurs principaux du recyclage de la matière organique morte au sein des écosystèmes forestiers. Ces microorganismes possèdent la capacité unique de dégrader la totalité des polymères constitutifs du bois grâce à la sécrétion de systèmes enzymatiques oxydatifs et hydrolytiques complexes. L'analyse de la structuration des communautés durant les stades initiaux de la colonisation du bois par séquençage à haut débit a révélé qu'au delà d'être une ressource nutritive, celui-ci influence la distribution et la dynamique des communautés qui lui sont associées de par sa grande variabilité chimique. A l'échelle de l'organisme, les différents groupes écologiques de champignons décomposeurs du bois (pourriture brune, blanche et molle) possèdent des systèmes de dégradation extracellulaires également reflétant cette complexité chimique. Le séquençage du génome d'un grand nombre de ces organismes a permis l'identification de superfamilles d'enzymes impliqués dans les mécanismes de résistance et de détoxication des composés toxiques exogènes. Parmi elles, la superfamille des glutathion transférases présente une extension de classes spécifiques au sein des champignons basidiomycètes décomposeurs du bois. La détermination des propriétés biochimiques et structurales d'une isoforme, issue d'une de ces classes spécifique (les Etherase-like), présente chez *Phanerochaete chrysosporium* a révélé des caractéristiques particulières. Cette enzyme possède un mode de dimérisation atypique ainsi que la capacité à séquestrer des composés phénoliques toxiques générés lors de la dégradation du bois via une propriété ligandine unique. La comparaison des propriétés de plusieurs isoformes de cette classe d'enzymes appartenant aux champignons *C. cinereus* et *P. chrysosporium* a démontré que celle-ci exhibe une grande versatilité intra- et interspécifique, de leurs activités enzymatiques et de leur propriété ligandine en réponse à des contraintes environnementales liées principalement à la grande hétérogénéité chimique de la composition des arbres.

Mots clés : champignons saprophytes, Glutathion transférases, xénobiotiques, enzymes extracellulaires, communautés

Abstract : Saprophytic fungi are key players of dead organic matter recycling in forest ecosystems. These microorganisms possess the unique ability to degrade the integrality of wood constitutive polymers by secretion of complex oxydative and hydrolytic enzymatic systems. Communities structuration analysis during the initial stages of wood colonisation by high throughput sequencing revealed that the latter beyond being a source of nutrients, influences the distribution and dynamic of communities by its broad chemical variability. At the organism level, the different ecological groups of wood decomposing fungi (brown, white and soft rot) possess extracellular degradation systems reflecting this chemical complexity. Genome sequencing of these organisms allowed the identification of enzymes superfamilies involved in resistance and detoxification mechanisms towards exogenous toxic compounds. Among them, the glutathione transferases superfamily exhibit extension of specific classes in wood decaying basidiomycetes. Biochemical and structural properties determination of one isoform belonging to one of these specific classes (the Etherase-like), found in *Phanerochaete chrysosporium* revealed unusual characteristics. This enzyme possesses an atypical dimerization mode as well as the ability to sequestrate toxic phenolic compounds resulting from wood degradation through a unique ligandin property. Properties comparison of several isoforms from this class belonging to *C. cinereus* and *P.chrysosporium* demonstrated a huge intra- and interspecific versatility of their enzymatics activities and ligandin property in response to environmental constraints arising from the great chemical heterogeneity of wood composition.

Keywords : saprophytic fungi, glutathione transferases, xenobiotics, extracellular enzymes, communities