HAL
open science

Diversité fonctionelle des Glutation Transférases fongiques : caractérisation des classes Ure2p et GTT2 de Phanerochaete chrysosporium

Anne Thuillier

To cite this version:

Anne Thuillier. Diversité fonctionelle des Glutation Transférases fongiques : caractérisation des classes Ure2p et GTT2 de Phanerochaete chrysosporium. Sylviculture, foresterie. Université de Lorraine, 2013. Français. NNT : 2013LORR0219 . tel-01750515

HAL Id: tel-01750515

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750515

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

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

SF Ecosystèmes Forestiers, Agroressources, Bioprocédés et Alimentation
Unité Mixte de Recherche INRA/UL-1136
Interaction Arbres-Microorganismes

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

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

Par

Anne THUILLIER

Diversité fonctionnelle des Glutathion Transférases fongiques: caractérisation des classes Ure2p et GTT2 de *Phanerochaete chrysosporium*

Soutenance publique le 31 Octobre 2013

Membres du Jury :

Rapporteurs :
Stéphane VUILLEUMIER, Professeur, Université de Strasbourg
Thomas GUILLEMETTE, Maître de Conférences, Université d'Angers

Examinateurs
Frédéric BOURGAUD, Professeur, Université de Lorraine
Bello MOUHAMADOU, Maître de Conférences, Université Joseph Fourier, Grenoble

Directeurs de thèse :
Eric GELHAYE, Professeur, Université de Lorraine
Mélanie MOREL-ROUHIER, Maître de Conférences, Université de Lorraine

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, Stéphane Vuilleumier, Thomas Guillemette, Bello Mouhamadou et Frédéric Bourgaud pour avoir accepté de lire ce manuscrit et d'évaluer mes travaux de thèse. Je souhaite également remercier les équipes et les personnes avec qui j'ai pu collaborer, notamment Claude, Thomas, Stéphane, Joëlle, Alexandre et François.

Ma plus grande reconnaissance revient à mes directeurs de thèse, Eric Gelhaye et Mélanie Morel-Rouhier, qui ont su me guider tout au long de ces travaux de thèse. Merci pour votre savoir, votre gentillesse, votre soutien et vos encouragements particulièrement pour les fois où j'ai pu perdre confiance en moi. Merci également pour toute l'aide que vous m'avez apportée lors de la rédaction des publications et de ce manuscrit et la préparation de mes présentations orales. Vous avez fait un boulot énorme qui m'a aidée à être là où j'en suis maintenant. Pour votre générosité, vos conseils, votre écoute et surtout, votre disponibilité sans pareille, MERCI !

J'aimerai également remercier tous les autres membres de l'équipe, présents et passés : Merci Jean-Pierre pour tes blagues plus ou moins drôles, ta connaissance de mots français presque oubliés, et ta sympathie malgré ton envie irrésistible de me tirer les cheveux (!!!!). Merci Nico, pour ton professionnalisme, notamment dans la spécialité « BBQ ». Merci Arnaud, Jérémie, Kamel, pour vos conseils constructifs sur beaucoup de sujets, pour tous les services rendus et coups de pouces expérimentaux. Un grand merci à Aurélie pour ton enthousiasme et toutes ces discussions « chiffon » et culinaires qui manquaient au labo et qui ont contribué à féminiser un peu l'équipe. Merci Tiphaine, grande prêtresse des poissons, pour partager tes aventures de nouvelle mère ce qui met de la fraîcheur dans les discussions, merci Chantal qui fait des pieds et des mains pour résoudre les divers problèmes administratifs mais aussi à Antoine et Elisabeth pour les discussions vraiment variées que l'on a pu avoir !

Mes remerciements s'adressent particulièrement à mes « coloc » qui ont 'égayé' le bureau : Merci Benji pour le bon plan de la voiture (qui a passé le CT avec succès), pour ta bonne humeur, et tes blagues plus que douteuses! Merci Edgar pour ta gentillesse, ta musique, et tes conseils techniques malgré l'entêtement que j'ai pu parfois montrer ! Merci Yann, l'autre

« coloc » chevelu au casque greffé sur les oreilles pour ta sympathie et tes pistes pour les expériences « victoriennes » ! Merci Henri, l'astronaute du labo, qui m'a aidée à déstresser parfois lors de la rédaction de ce manuscrit tout en supportant (sans nous détester) les gentilles blagues qui t'ont été faites ! Merci PA, le dieu de l'aquarium, pour ton humour subtil et tes coups de main dominicaux !
Merci à tous ceux qui sont passés au labo, chercheurs, ATER, anciens doctorants, stagiaires…

Merci à tous les collègues des autres équipes et de l'INRA, en particulier ceux avec qui j'ai pu partager séminaires, enseignements, expériences, tranches de rire, bonne humeur ou autres discussions : Alice, Aurore, Cendrella, Vincent, Yohann, Michael, Nico, Aude, Thomas, Laurence, J-B, Morgane, Juliette, Loïc, Jaime, Laura, mais aussi Annick, Claire, Pascale, Pascal, Marc, Sébastien, Stéphane, Valérie, Damien, Michèle, et tous ceux avec qui j'ai pu interagir, de près ou de loin, durant ces 3 dernières années.

Un grand merci à tous mes amis « extérieurs », musiciens, danseurs, luthier, artistes en tous genres (dans la vie réelle ou dans la tête), aux amoureux de la nature, de la littérature ou du spectacle, français ou étrangers, avec qui j'ai pu décompresser, me permettant de conserver un certain équilibre durant ces trois années de vie finalement un peu déjantée. Merci aussi à ceux et celles qui ont pu m'accueillir ou m'accompagner lors de ma réflexion sur mon parcours professionnel. Un merci tout particulier aux copines, à « Binôme » et à Ben qui m'ont soutenue au cours de ces trois ans, malgré mon manque de disponibilité durant cette dernière année.

Enfin, à tout ceux qui m'ont aidée à préparer cette journée, à toute ma famille, mes parents, mes frangins, ma frangine, grands-parents, oncles, tantes, cousins et cousines, aux « pièces rapportées », mais aussi à Victor, né le premier jour de ma thèse et que j'ai vu grandir très (trop ?) vite, et surtout à toi, Gauthier, pour tes grands sourires,

Un ENORME MERCI !

Abréviations

ADN : acide desoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
APO : peroxygénase aromatique
ARN : acide ribonucléique
BPA : bisphénol A
CAZy : Carbohydrate Active enZyme
CBH : cellbiohydrolase
CBM : carbohydrate binding module
CDH : cellobiose déshydrogénase
CDNB : 1,2-chloro-4-dinitrobenzène
CLIC: canal intracellulaire ionique de chlore
cGST: glutathion transferase cytosolique
CoA : acétyl coenzyme A
CRO : oxydase à radical de cuivre
Cyt b5 : cytochrome b5
Cyt b5r : Cyt b5 réductase
CytP450 : cytrochrome P450 monooxygénase
DHA : déhydroascorbate
DyP : peroxydase « dye-decolorizing »
ERO : espèce réactive oxygénée
FAD : flavine adénine dinucléotide
FGP : fungal genomic program
FMN : flavine mononucléotide
G : guaiacyle
GH : glycoside hydrolase
GHR : S-glutathionyl-*p*-hydroquinone réductase
GLX : glyoxal oxydase
GSH : glutathion (réduit)
GSSG : glutathion oxydé
GST : glutathion transferase
GSTK : GST kappa
H : p-hydroxyphényl
HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique
HCCA : 2-hydroxychromene-2-carboxylate
HED : hydroxyéthyl disulfide
HNE : 4-hydroxynonenal
LiP : lignine peroxydase
MAPEG : membrane associated protein in eicosanoids and glutathion metabolism
MDR : Multi-Drug Resistance
mGST : GST microsomale (ancien nom des MAPEG)
MRP : protéine associée MDR
MnP : manganèse peroxydase
NAD(P)H : Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)
NCR : nitrogen catabolite repression
P450foxy : protéines fusionnées oxydoréductases-P450
PAPS : phosphoadénosine phosphosulfate
PAP-SG : phénylacétophénone glutathionylée
PBA : acide 4-propylbenzoïque
PCB : biphényle polychloré
PMO : monooxygénase de polysaccharides
POR : P450 oxydoréductase
RDX : hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine
S : syringyle
SAM : coenzyme S-adénosylméthionine
TCHQ : tétrochlorohydroquinone déhalogénase
TDR : réductase thiol-dépendante
TNT : 2,4,6-trinitrotoluène
UDP : uridine diphosphate
UV : ultraviolet

Table des Matières

Table des Matières **1**

Introduction **5**

Synthèse Bibliographique **9**

I. Les champignons : généralités **11**

II. Taxonomie des champignons **12**

III. Les différents types trophiques des champignons **14**

A. Les champignons pathogènes **14**
B. Les champignons symbiotiques **15**
C. Les champignons saprophytes **15**
C.1. Les champignons décomposeurs de matière organique 16
C.2. Les champignons ligninolytiques 16

IV. Les systèmes de dégradation du bois **24**

A. Les systèmes extracellulaires **24**
A.1. Les enzymes hydrolytiques impliquées dans la dégradation du bois 25
A.2. Les systèmes oxydatifs impliqués dans la dégradation de la lignine 28
A.3. Potentiel biotechnologique des systèmes de dégradation extracellulaires 40
A.4. Les systèmes extracellulaires de *Phanerochaete chrysosporium* et leur régulation 44
B. Les systèmes intracellulaires **45**
B.1. Phase I de détoxication : activation du composé par les cytochromes P450 monooxygénases 46
B.2. Phase II de détoxication : étape de conjugaison 50
B.3. Phase III : Elimination / neutralisation du composé 51
B.4. La détoxication chez *Phanerochaete chrysosporium* 52

V. Les Glutathion Transférases (GST) **58**

A. Historique et classification **58**
B. Structure **62**
C. Fonctions **66**
C.1. Rôles dans le fonctionnement cellulaire 66
C.2. Détoxication, résistance contre les molécules toxiques 69
C.3. Protection contre le stress oxydant 70
D. Evolution **71**
E. Les GST fongiques **74**

Objectifs **79**

Résultats **83**

Chapitre 1 : Diversité des Ure2p fongiques **85**

Article 1 : Functional Diversification of Fungal Glutathione Transferase from the Ure2p Class **85**

Chapitre 2 : Diversité biochimique, structurale et fonctionnelle au sein de la classe des Ure2p 97

A : Caractérisation de Ure2pB1 de *Phanerochaete chrysosporium* 97
Article 2 : Atypical features of a Ure2p glutathione transferase from Phanerochaete chrysosporium 97
B : Caractérisation des isoformes Ure2pA de *Phanerochaete chrysosporium*. 117
***Article 3 : Structural and functional variability within the Ure2pA subclass of Phanerochaete chrysosporium : insight into evolutionary mechanisms* 119**

Chapitre 3 : Les enzymes de détoxication dans le contexte de la dégradation du bois : caractérisation de la PcGTT2.1 145

***Article 4 : Emerging function for a glutathione transferase in response to wood extractives toxicity* 147**

Discussion générale 171

I. Influence du mode de vie des champignons sur l'évolution des GST au sein du système de détoxication 173

A. Le génome des champignons répond à un milieu de contraintes 173
B. Les capacités d'adaptation des champignons au substrat lignocellulosique nécessitent une plasticité du xénome 176
Article 5 : Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi 176

II. Convergence fonctionnelle et évolution, l'exemple des Ure2p 195

A. Complémentarité génomique des classes Ure2p/GSTFuA et des cytochrome P450 monooxygénases. 195
B. Convergence fonctionnelle des GSTFuA et des Ure2p : promiscuité et multispécificité 197
C. L'extension d'une famille d'enzyme et la diversification fonctionnelle sont moteurs de l'évolution enzymatique 200

Conclusions et perspectives 203

Références 207

Communications scientifiques 241

Introduction

De nos jours, la problématique énergétique est d'actualité. En effet, les besoins croissants en énergie ainsi que la dépendance envers les pays possédant les stocks d'énergie fossile amène à considérer de plus en plus les sources d'énergies renouvelables comme l'utilisation de la biomasse végétale qui est une des ressources les plus importantes sur terre et est déjà utilisée comme quatrième ressource d'énergie après le pétrole, le gaz et le charbon. De même, la problématique de la pollution industrielle et domestique est également fortement considérée du fait de l'impact négatif qu'elle engendre sur l'environnement. Elle concerne notamment le rejet de produits chimiques par les eaux usées. Des réponses à ces questions peuvent être apportées par les champignons saprophytes qui sont des organismes importants dans le recyclage des matières organiques et possèdent donc un grand rôle au sein des cycles biogéochimiques. De part leurs capacités dégradatives, ils sont de plus en plus étudiés pour la production de bioéthanol à partir de biomasse végétale mais aussi pour leur aptitude à transformer des composés chimiques. Les récentes avancées dans le domaine de la génomique ont pu mettre en lumière la diversité des systèmes enzymatiques impliqués dans la dégradation. De plus, la grande variabilité et l'étendue des acteurs enzymatiques engagés dans les voies de détoxication en réponse à un environnement hostile (composés toxiques issus de la dégradation, polluants) attirent également l'attention. C'est dans ce cadre que s'inscrit ce travail de doctorat qui concerne la compréhension d'une famille d'enzyme de détoxication en relation avec le mode de vie du champignon étudié : *Phanerochaete chrysosporium*.

Ces travaux se sont déroulés au sein de l'unité mixte de recherche UMR 1136 « Interactions arbres-microorganismes » dont les recherches sont focalisées sur la compréhension du rôle des microorganismes au sein de l'écosystème forestier. L'équipe d'accueil « Réponses aux stress et régulation rédox » a permis d'aborder cette thèse par des approches incluant la biochimie, la biologie moléculaire, la microbiologie et la physiologie.

Cette thèse de doctorat développe tout d'abord les connaissances actuelles sur les champignons, en particulier les saprophytes puis les systèmes de dégradation fongique et enfin, les glutathion transférases. Les résultats de mes travaux de recherche sont présentés ensuite et sont répartis en trois chapitres. D'abord une mise en évidence de la diversité des enzymes Ure2p fongiques, puis la caractérisation biochimique, structurale et fonctionnelle de certaines isoformes, et enfin une partie plus physiologique considérant les enzymes de détoxication exprimées lorsque le champignon est soumis à des extraits de bois. Ces résultats

sont ensuite discutés en prenant en compte l'aspect évolutif et adaptatif du xénome dans son ensemble.

Synthèse Bibliographique

I. Les champignons : généralités

Les champignons représentent un des groupes d'organismes vivants les plus abondants mais dont il reste beaucoup à découvrir, autant du point de vue de la diversité que de leurs applications possibles pour la société et les écosystèmes. En effet, un peu plus de 99 000 espèces seulement sur 3,5 à 5,1 millions estimées en 2005 auraient été décrites (O'Brien 2005; Blackwell 2011). Le règne fongique comprend les moisissures, les lichens, les rouilles et les levures. Ils présentent des structures et modes de vie différents et possèdent un rôle important dans les écosystèmes. Dans la mesure où ils peuvent être utilisés pour des applications industrielles ou médicales, ils font l'objet de nombreuses études. Les champignons sont des Eucaryotes possédant une paroi constituée de chitine qui est un polysaccharide composé de résidus N-acétylglucosamine, de glucanes et de mannoprotéines variées (Vega 2012). Ils sont en général aérobies même si certaines levures peuvent être aéro-anaérobies lors de processus fermentaires (Carlile 1994). Leur structure cellulaire varie et deux catégories principales sont distinguables : la forme unicellulaire, c'est le cas des levures, et la forme mycélienne pluricellulaire constituée d'hyphes. Parfois, des espèces dites « dimorphiques » peuvent présenter les deux formes selon les conditions environnementales, ce qui présente des avantages pour la colonisation de certains milieux. Ainsi, par exemple, la forme mycélium est plus adaptée à une croissance dans un milieu donné tandis que la forme levure est plus adaptée à la colonisation d'un tissu animal et ce, dépendamment de la température. Les organismes unicellulaires ont l'avantage de pouvoir subir une pression osmotique plus forte, tandis que les mycéliens peuvent coloniser très rapidement un milieu du fait de leur surface de contact optimale pour la recherche et l'assimilation de nutriments (Jennings 1996). Le mycélium est donc constitué d'hyphes ramifiés et peut générer un tissu macroscopique appelé « thalle » qui peut s'étendre parfois sur plusieurs centaines d'hectares (Ferguson 2003). Leur croissance se réalise par l'allongement de leurs hyphes grâce à une extension de la paroi au niveau de l'apex par un apport continu de chitine (Carlile 1994; Glass 2004). Possédant un génome de petite taille comparé à d'autres Eucaryotes (30 à 40 Mb en moyenne), la plupart a été rapidement séquencé lors du projet « 1000 génomes fongiques » du Joint Genome Institute (Grigoriev 2011). Certaines espèces étant faciles à cultiver et connaissant leur patrimoine génomique, les champignons sont aussi beaucoup étudiés pour comprendre les processus moléculaires du fonctionnement cellulaire des Eucaryotes.

II. Taxonomie des champignons

Les champignons furent d'abord classés dans le groupe des Plantes (Whittaker 1969). Grâce à l'analyse et la comparaison de séquences nucléiques et protéiques, il a été établi que le règne fongique est un groupe monophylétique faisant partie des Opisthocontes parmi lesquels se trouvent les animaux et des protistes (Keeling 2009; Kumar 2009) (Figure 1). La séparation avec les animaux daterait d'environ 1,7 milliard d'années plus ou moins 300 millions d'années (Berbee 2010).

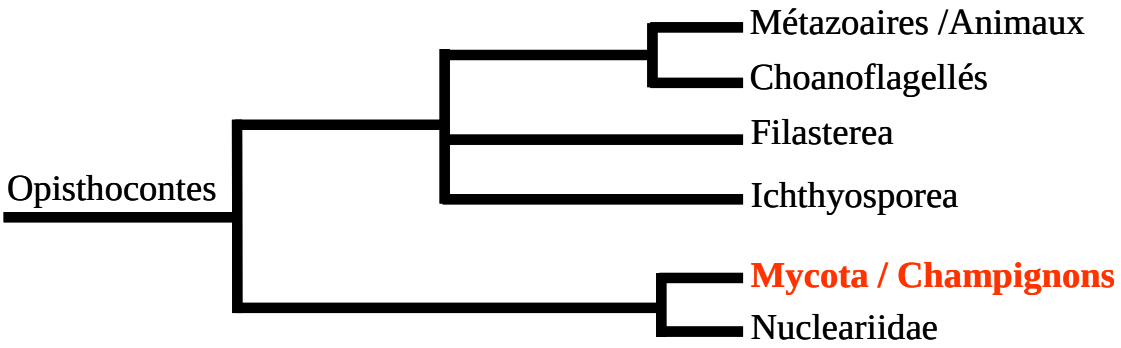


Figure 1 : Place des champignons parmi les Opisthocontes adapté de Keeling, 2009.

La classification des champignons, d'abord basée sur leur morphologie, a été remise en cause par l'arrivée de données phylogénétiques, ce qui a été essentiel dans le cas où les caractéristiques morphologiques manquaient, convergeaient ou étaient réduites dans les taxa considérés. Cela a permis par exemple de replacer des espèces qui ne se reproduisent jamais sexuellement et dont le caractère a été une base de la classification morphologique (Blackwell 2011; Blackwell 2012). Ainsi, 10 phyla ont été mis en évidence grâce aux dernières avancées technologiques dans le domaine des analyses de génomes (Figure 2).

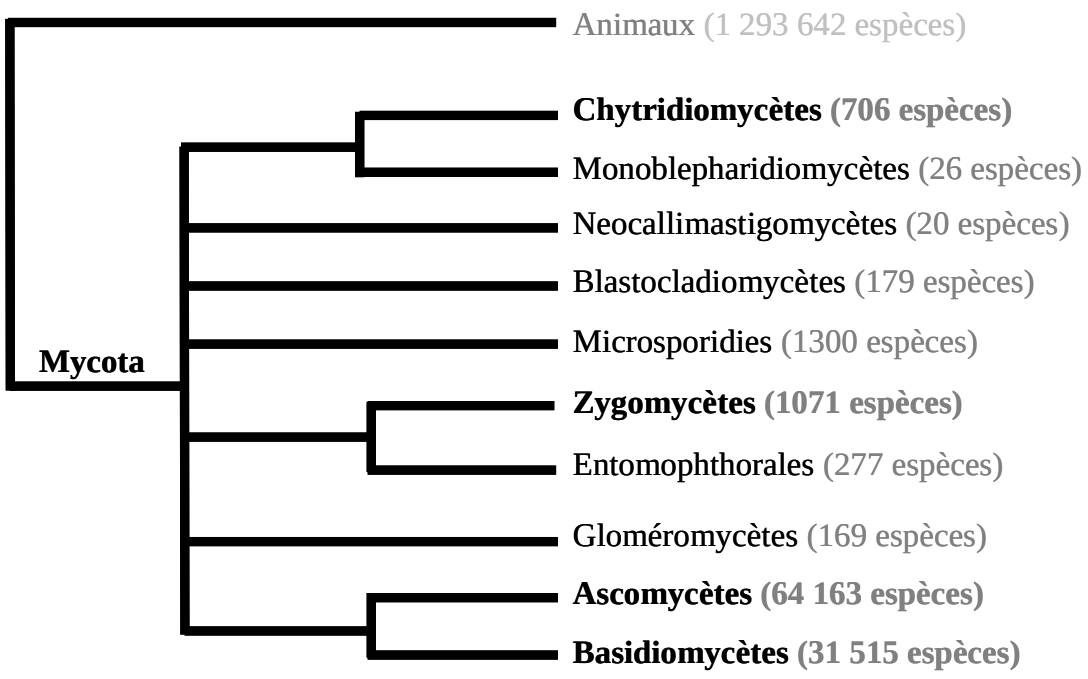


Figure 2 : Présentation des phyla fongiques avec pour chacune le nombre d'espèces connues adapté de Blackwell, 2011.

Ci-après sont présentées quelques caractéristiques des Phyla les plus connus :

- Les chytridiomycètes se trouvent dans les milieux aqueux et ont la particularité de posséder des spores flagellées (appelées aussi zoospores). Ils sont étudiés surtout parce qu'ils sont une cause du déclin des amphibiens (Berger 1998).

- Les zygomycètes possèdent, comme les chytridiomycètes, un mycélium coenocytique (sans séparation cellulaire, avec plusieurs noyaux dans le même compartiment) mais n'ont pas de spores mobiles. Ils possèdent un cycle de reproduction « asexuée » lors duquel des sporocytes (sacs contenant puis dispersant les spores) sont différenciés. Le cycle de reproduction « sexuée » implique la formation d'une zygospore très résistante subissant la caryogamie puis la méiose et la différenciation d'un sporocyte. Ils font partie des moisissures alimentaires communes (cas de *Rhizopus stolonifer*) et certains sont utilisés dans l'industrie chimique, pharmaceutique ou agroalimentaire. Ils peuvent également être pathogènes.

- les ascomycètes regroupent le plus grand nombre d'espèces décrites (Figure 2). Ils possèdent un mycélium « cloisonné », un cycle de reproduction asexué générant des spores appelées conidies et un cycle de reproduction sexuée au cours duquel les (asco)spores sont différenciées dans une « cellule-sac » appelée asque. Ces asques sont en général disposés sur une surface fertile appelée hyménium qui se trouve sur une fructification souvent macroscopique, parfois consommée dans l'alimentation humaine (morille, truffe). La levure

est également classée parmi les ascomycètes du fait de la différenciation d'asques. Les ascomycètes peuvent être des moisissures communes, sont parfois pathogènes et sont beaucoup utilisés dans l'industrie chimique, pharmaceutique et agroalimentaire. Deux genres représentatifs du phyla sont *Aspergillus* et *Penicillium*.

- Les basidiomycètes regroupent environ 1/3 des champignons décrits (Figure 2) et peuvent avoir une reproduction asexuée bien que ce phénomène soit assez rare. Lors de la reproduction sexuée, après fusion des cellules haploïdes de types sexuels différents, l'hyphe dicaryotique qui en résulte peut générer une structure macroscopique qui est communément appelée « champignon ». La caryogamie a alors lieu et la méiose se déroule dans des cellules appelées basides. Les noyaux issus de la méiose migrent à la surface de cette cellule sur des tiges appelées stérigmates et différencient les basidiospores. Parmi les basidiomycètes modèles utilisés en génétique se trouvent *Coprinus cinereus* (coprin) ou encore *Ustilago maydis* (champignon responsable du charbon de maïs). Les basidiomycètes ont souvent des applications gastronomiques et ont une grande importance dans le fonctionnement des écosystèmes.

III. Les différents types trophiques des champignons

Les champignons sont généralement des chimiohétérotrophes, utilisant du carbone organique comme source d'énergie. Trois types trophiques majeurs sont observés chez les champignons.

A. Les champignons pathogènes

Les parasites ou pathogènes concernent au moins les quatres phyla principaux et s'attaquent à des êtres vivants, entraînant une maladie, un dépérissement voire leur mort. Différents types de parasitisme peuvent être rencontrés : les parasites stricts qui ne se développent que chez une seule espèce hôte, les parasites obligatoires qui ne colonisent que du tissu vivant, les parasites facultatifs qui n'ont pas besoin de l'hôte pour réaliser leur cycle de vie, et les opportunistes qui infectent principalement des organismes affaiblis et qui peuvent devenir saprophytes. D'autres dénominations peuvent caractériser les champignons pathogènes parmi lesquelles sont distinguées : les nécrotrophes qui tuent les tissus de leur hôte afin de s'en nourrir, souvent via la production de toxines ; les biotrophes qui se

développent au sein du tissu vivant en s'en nourrissant, générant une infection (Dodds 2010) ; et les hémi-biotrophes pouvant posséder les capacités des biotrophes et des nécrotrophes selon les conditions ou l'étape du cycle de vie dans lesquelles ils se trouvent.

B. Les champignons symbiotiques

Les champignons symbiotiques établissent une association à bénéfices réciproques avec un hôte, la symbiose la plus répandue étant l'association champignons-plantes par la mise en place de liens étroits entre le mycélium et les racines de la plante : les mycorhizes. Deux grands types de mycorhizes sont observables : l'ectomycorhize lorsque le champignon s'insinue entre les cellules du cortex sans les pénétrer et l'endomycorhize lorsque le mycélium pénètre dans les cellules racinaires. Ces deux cas impliquent généralement des ascomycètes, des gloméromycètes et des basidiomycètes. La symbiose plante-champignon est un phénomène très étendu. En effet, au moins 86% des plantes à fleurs sont mycorhizées (Brundrett 2009). Ainsi, le champignon, du fait de son réseau mycélien très étendu, participe à la nutrition des plantes par apports de nutriments minéraux, tels que de l'azote ou du phosphore, tandis que la plante lui fournit des nutriments organiques, généralement des photosynthétats comme des sucres simples (Marschner 1994). Un rôle de protection contre certains pathogènes a également été suggéré grâce à une compétition possible avec le symbiote, à la présence d'une barrière physique due au manteau fongique établi par le champignon symbiotique, ou à la production de métabolites par la plante induite par la présence du symbiote (Azcon-Aguilar 1997; Stenström 1997). D'autres types de symbioses peuvent être observés telles que les lichens qui résultent d'une association avec un partenaire photosynthétique (algue par exemple) ou une cyanobactérie (Singer 1954; Ahmadjian 1993).

C. Les champignons saprophytes

Les champignons saprophytes jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement des écosystèmes notamment le recyclage de la matière organique morte dont ils se nourrissent. Ils participent donc ainsi aux cycles biogéochimiques notamment ceux de l'azote et du carbone.

C.1. Les champignons décomposeurs de matière organique

Selon leur substrat ou le lieu colonisé, quelques adjectifs permettent de situer les champignons décomposeurs de matière organique dans leur contexte écologique comme par exemple : les humicoles, présents sur l'humus, les follicoles qui colonisent les feuilles, les pyrophiles, observables sur du bois brûlé, les grammicoles ou practicoles, présents dans les prairies, les kératinophiles dont le substrat est principalement constitué de kératine (corne, poils, plumes), les fumicoles ou coprophiles, qui se nourrissent d'excréments et les lignicoles ou ligninolytiques qui se nourrissent de biomasse lignocellulosique (bois, débris végétaux). Ces derniers sont très étudiés de part leur importance dans la filière bois mais aussi pour des applications biotechnologiques telles que la production de bioéthanol de deuxième génération (à partir de biomasse lignocellulosique) ou pour des applications de bioremédiation.

C.2. Les champignons ligninolytiques

C.2.a. La biomasse lignocellulosique

La paroi des végétaux est principalement constituée de polysaccharides structuraux (tels que la cellulose, l'hémicellulose ou la pectine), de lignine, de lipides et de protéines. Elle est également composée de substances de faible poids moléculaire telles que des composés phénoliques (aldéhydes, acides benzoïques, flavonoïdes, stilbénoïdes, tannins), des « extractibles » comme les résines, glycérides, cires, terpènes et terpénoïdes (Pereira 2009), et des éléments dits « inertes » tels que les minéraux. (Figure 3)

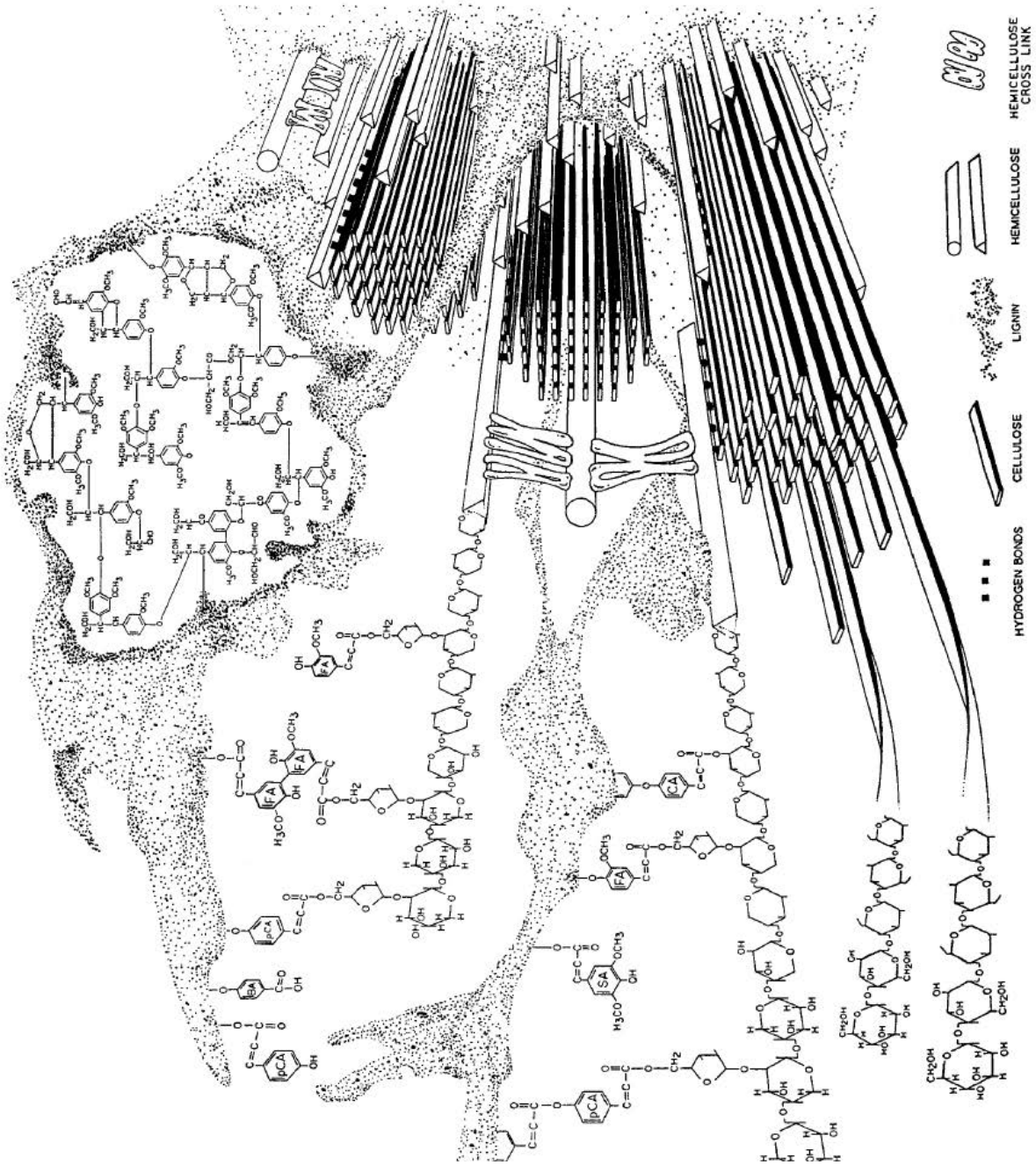


Figure 3 : Structure de la paroi secondaire des végétaux. La lignine se structure comme un ciment, possédant des acides *p*-coumariques (*p*CA), feruliques (FA), *p*-hydroxybenzoiques (BA), sinapiques (SA) et cinnamiques (CA) permettant l'établissement de liaisons covalentes avec l'hémicellulose, (Bidlack 1992)

Parmi les composants majeurs, la cellulose est un polymère composé de résidus β-D-glucopyranosyl liés en β-(1,4) (Figure 4) qui représente environ 45% de la matière sèche du bois et est ainsi le polysaccharide le plus abondant dans la nature. Ces chaines de celluloses s'associent en microfibrilles, grâce aux groupements hydroxyles qui forment des liaisons hydrogènes. Elles peuvent être associées de façon ordonnée (région cristalline) ou moins ordonnées (régions amorphes) pour former des fibres ayant une exceptionnelle rigidité et résistance chimique (O'Sullivan 1997 ; Klemm 2005).

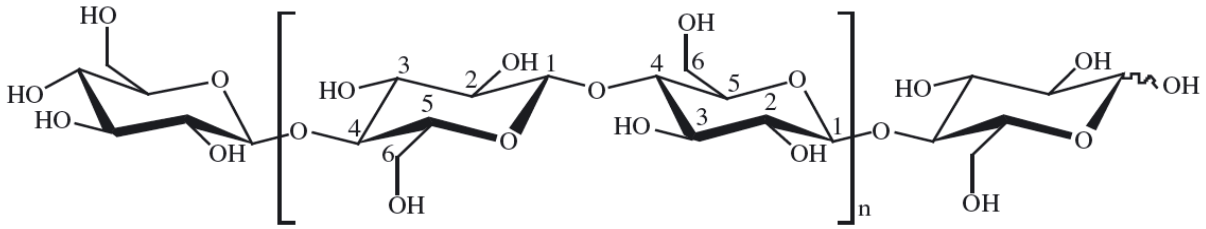


Figure 4 : Structure moléculaire de la cellulose, un polymère de résidus β-(1,4)-D-glucopyranosyl (Hallac 2011)

Les hémicelluloses représentent environ 25 à 35% de la matière sèche du bois. Ce sont des polymères présentant une chaine principale de glucides (xylose le plus souvent), pouvant être ramifiée par des unités osidiques parfois modifiés, ou par des acides hydroxycinnamiques, jouant un rôle dans la liaison à la lignine (Ralph 2010). La chaîne principale est généralement un homopolymère mais peut également être un hétéropolymère. Le type d'hémicellulose peut varier au sein d'une même espèce également. Chez les feuillus, par exemple, les xylanes sont les plus représentés (Jeffries 1994; Sanchez 2009). Ils sont constitués d'une chaine principale de résidus xylopyranosyls et de chaînes secondaires constituées d'unités arabinopyranosyls, galacturonoyls et/ou glucuronoyls. Les xylanes sont donc classés selon leur type de ramification. Les hémicelluloses interagissent avec les différents composants de la paroi cellulaire ce qui leur confère une grande importance dans l'intégrité structurale des plantes (Thomson 1993).

La lignine est un polymère formé principalement de trois alcools phényl-propanoïques dont les unités sont connues sous le nom de p-hydroxyphényle (H), guaiacyle (G) et syringyle (S). Ces unités peuvent se lier de façons très variées via les hydroxycinnamates, souvent par liaisons beta-aryl éther (Figure 5). Il s'agit d'un composant résistant qui contribue au port de la plante et à sa tolérance face à différents facteurs environnementaux. Elle interagit

généralement avec la cellulose par liaisons faibles et avec les hémicelluloses par liaisons covalentes (Whetten 1998; Boerjan 2003; Wong 2009).

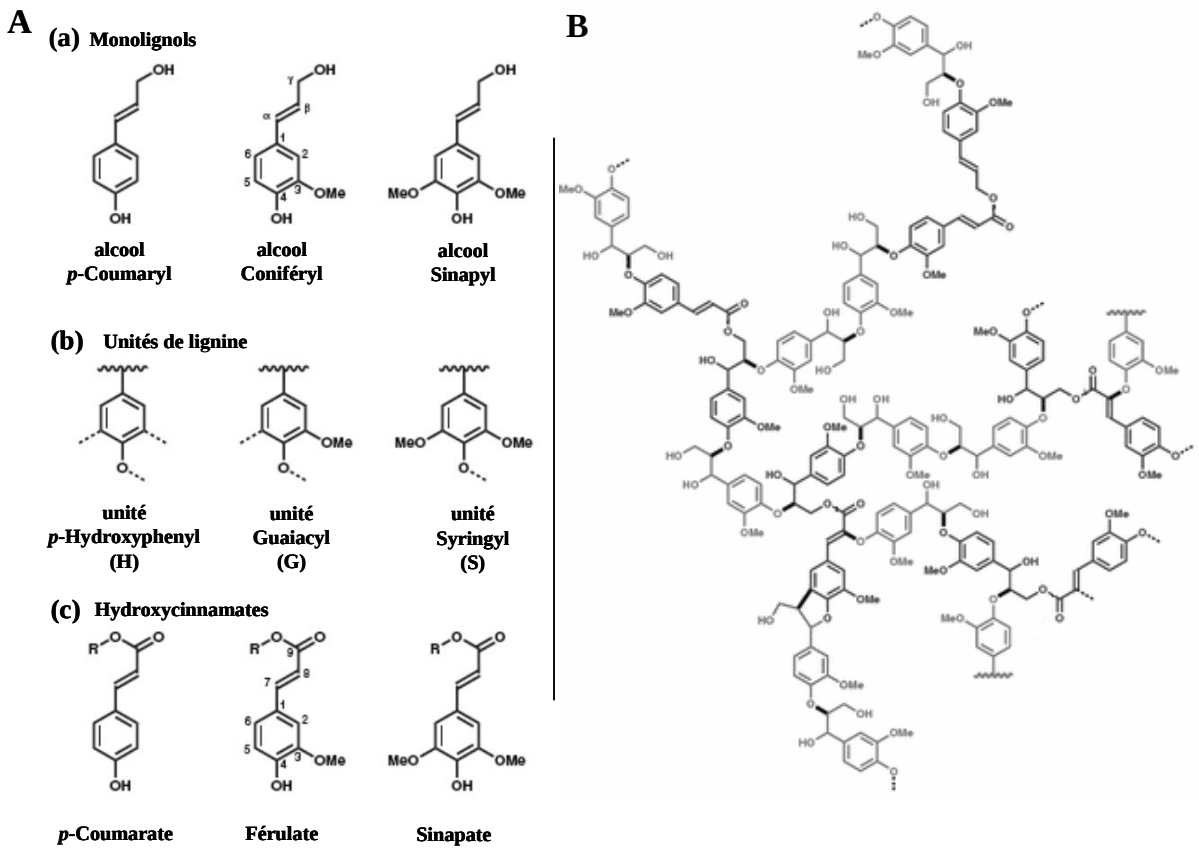


Figure 5 : A : (a) monomères primaires de la lignine, (b) unités du polymère de la lignine, (c) les trois analogues hydroxycinnamate (adapté de Ralph, 2010), **B** : Un modèle hypothétique de la lignine résultat de la copolymérisation de l'alcool coniféryl et du ferulate coniféryl (adapté de Ralph, 2010)

Les trois principaux composants du bois sont insolubles et forment une structure très résistante du fait des interactions impliquées. C'est pourquoi il est difficile de les exploiter pour certaines applications industrielles. Pourtant, les études pour la production de bioéthanol de deuxième génération (à partir de biomasse lignocellulosique) sont déjà bien avancées. Il s'agit de récupérer de façon enzymatique les sucres de la cellulose et de l'hémicellulose pour les intégrer dans un processus de fermentation. Cependant, la présence de la lignine est un véritable frein à l'action des enzymes qui peuvent par exemple s'y adsorber et/ou ne pas atteindre leurs substrats (Sutcliffe 1986). Un prétraitement comme l'explosion à la vapeur et la catalyse à l'acide est donc nécessaire mais représente une barrière économique et écologique. Une solution économiquement réaliste doit donc être envisagée.

C.2.b. Les différents types de pourriture

Parmi les champignons ligninolytiques, 3 groupes fonctionnels sont observables : les champignons de pourriture brune, les champignons de pourriture molle et les champignons de pourriture blanche.

C.2.b.1. Les champignons de pourriture brune

Appelés également champignons de pourriture cubique (rouge ou rouille), les champignons de pourriture brune représentent environ 7% des basidiomycètes et quelques ascomycètes. Ils poussent généralement sur bois de conifères et sont distribués au nord du tropique du cancer (Martinez 2005; Sigoillot 2012). Au cours de la décomposition du bois, les hémicelluloses sont d'abord dégradées avant la disparition de la cellulose, ce qui laisse ensuite le polymère de lignine riche en cycles aromatiques. Ces champignons ont une faible capacité à dégrader la lignine et attaquent le bois essentiellement grâce à un système oxydatif. La lignine est ainsi modifiée, ce qui confère une couleur rouge ou rouille au système, (Yelle 2008; Hatakka 2010). Le bois devient donc sombre, se casse en fragments cubiques ou rectangulaires (Figure 6) et peut être aisément réduit en poudre brune, ce qui en fait des champignons très destructeurs pour les constructions à base de bois (Blanchette 1995).

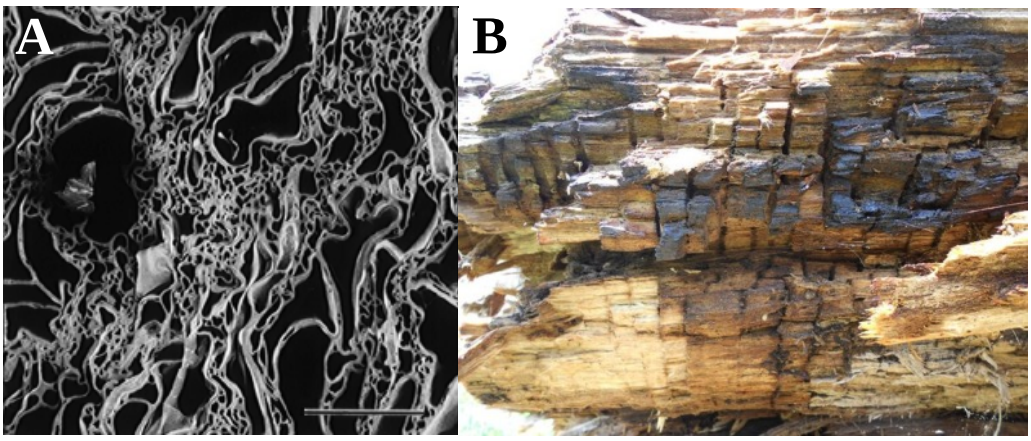


Figure 6 : (A) La dégradation de la cellulose laisse un réseau résiduel de lignine, fragilisant la paroi cellulaire qui apparait déformée (barre = 100 µm) (Blanchette 2000). (B) Aspect cubique de la dégradation d'un morceau de bois, probablement par un champignon de pourriture brune.

C.2.b.2. Les champignons de pourriture molle

Les champignons de pourriture molle concernent principalement les ascomycètes. Ils se trouvent sur bois humide le rendant mou, sombre et friable lorsqu'il devient sec (Figure 7) (Eriksson 1990). Ceci est dû à la dégradation de la cellulose et de l'hémicellulose et à la dégradation partielle de la lignine. La nature du substrat détermine deux formes de pourriture molles : le type I formant des cavités typiques biconiques et cylindriques dans la paroi secondaire et le type II qui est une forme érodée de dégradation de la paroi secondaire mais qui n'attaque pas la lamelle moyenne (Blanchette 2000). Ils se trouvent plutôt sur bois de feuillus. Cependant, les systèmes enzymatiques et non enzymatiques impliqués sont peu connus (Nilsson 1989; Blanchette 1995; Daniel 1998).

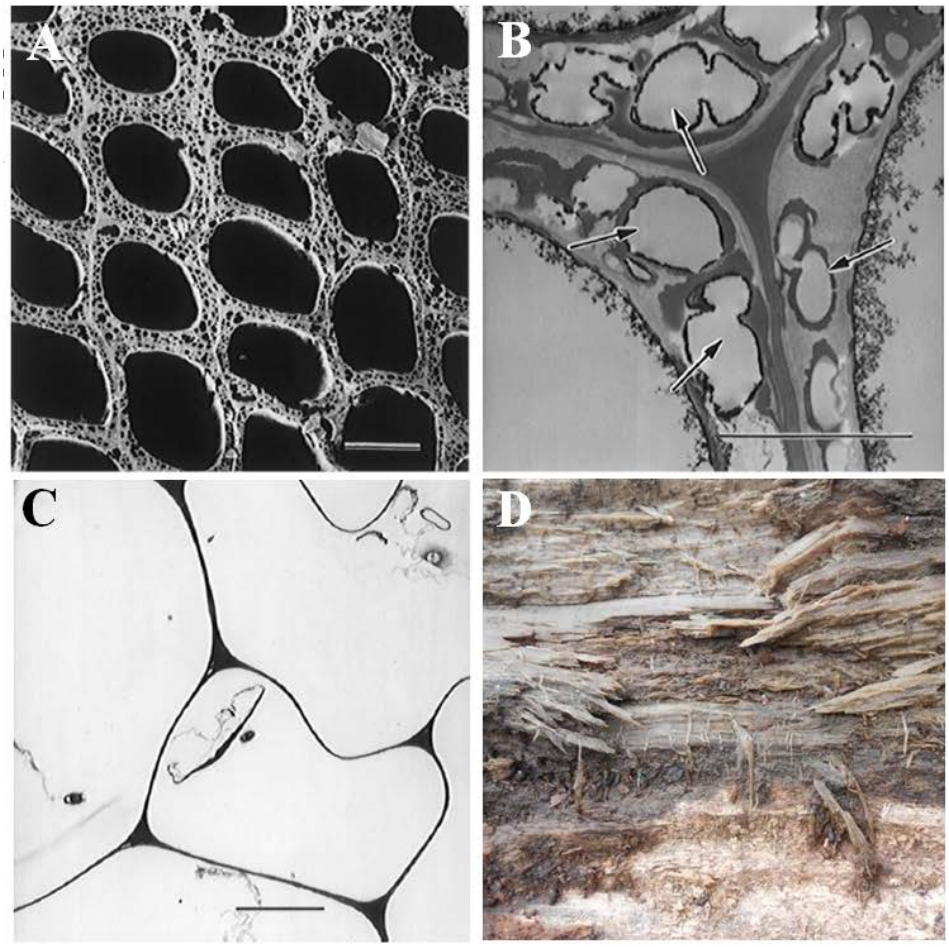


Figure 7 : (**A-B**) Mise en évidence des cavités (flèches) dans les parois secondaires des cellules du bois, typiques de la dégradation par des champignons de pourriture molle de type I. (**C**) Attaque de type II par érosion de la paroi secondaire ne laissant que la lamelle moyenne intacte (barres = 50 µm pour A, 5µm pour B et C) (Blanchette 2000). (**D**) Aspect d'un morceau de bois humide et mou, probablement attaqué par un champignon de pourriture molle.

C.2.b.3. Les champignons de pourriture blanche

Les champignons de pourriture blanche, principalement des basidiomycètes, sont les seuls microorganismes capables de minéraliser complétement la lignine, le composé le plus dur du bois, en plus de la cellulose et l'hémicellulose (Kirk 1998) avec, pour certaines espèces, une préférence pour la dégradation de la lignine (Blanchette 2000). Plus de 90% des basidiomycètes dégradeurs du bois sont des champignons de pourriture blanche. Ils colonisent les angiospermes plutôt que les gymnospermes (Kirk 1975; Kirk 1987). Leurs hyphes envahissent rapidement les cellules du bois et longent les parois du lumen tout en secrétant leur système de dégradation. Leur dénomination provient du fait que le bois se décolore progressivement durant sa dégradation (Figure 8). La vitesse de dégradation de ces composés varie beaucoup selon les espèces de champignon, selon le tissu du bois et le polymère attaqué (Blanchette 1995) et se fait généralement par érosion progressive de toutes les couches de la paroi cellulaire, dont la lamelle moyenne (Blanchette 2000). Certains attaquent peu la cellulose, entraînant des tâches blanches, ce qui est le cas du processus de délignification dit de « dégradation sélective » (Eriksson 1990; Kirk 1998) alors que d'autres attaquent simultanément les trois types de polymères, c'est le cas de la « dégradation simultanée » (Eriksson 1990; Kirk 1998; Sigoillot 2012). Parfois, le même champignon est capable de réaliser les deux types de dégradation (Sigoillot 2012). Cependant, le ratio de dégradation des différents polymères peut différer énormément selon les espèces, même entre différentes souches d'une même espèce (Blanchette 1988; Eriksson 1990).

Ces champignons, du fait de leur capacité à dégrader sélectivement la lignine, font l'objet de nombreuses études pour leurs applications variées impliquant la transformation de la lignine. C'est en effet elle qui est responsable de la coloration du papier mais aussi de l'inhibition des cellulases lors de la production de biocarburant. La recherche des meilleures souches capables de traiter la lignine ainsi que leurs conditions de culture pour de tels processus est donc nécessaire. Ainsi, parmi les champignons de pourriture blanche, *Phanerochaete chrysosporium* a été le plus étudié, et de nombreuses données physiologiques et moléculaires sont disponibles dans la littérature (Kirk 1987; Eriksson 1990; Gold 1993).

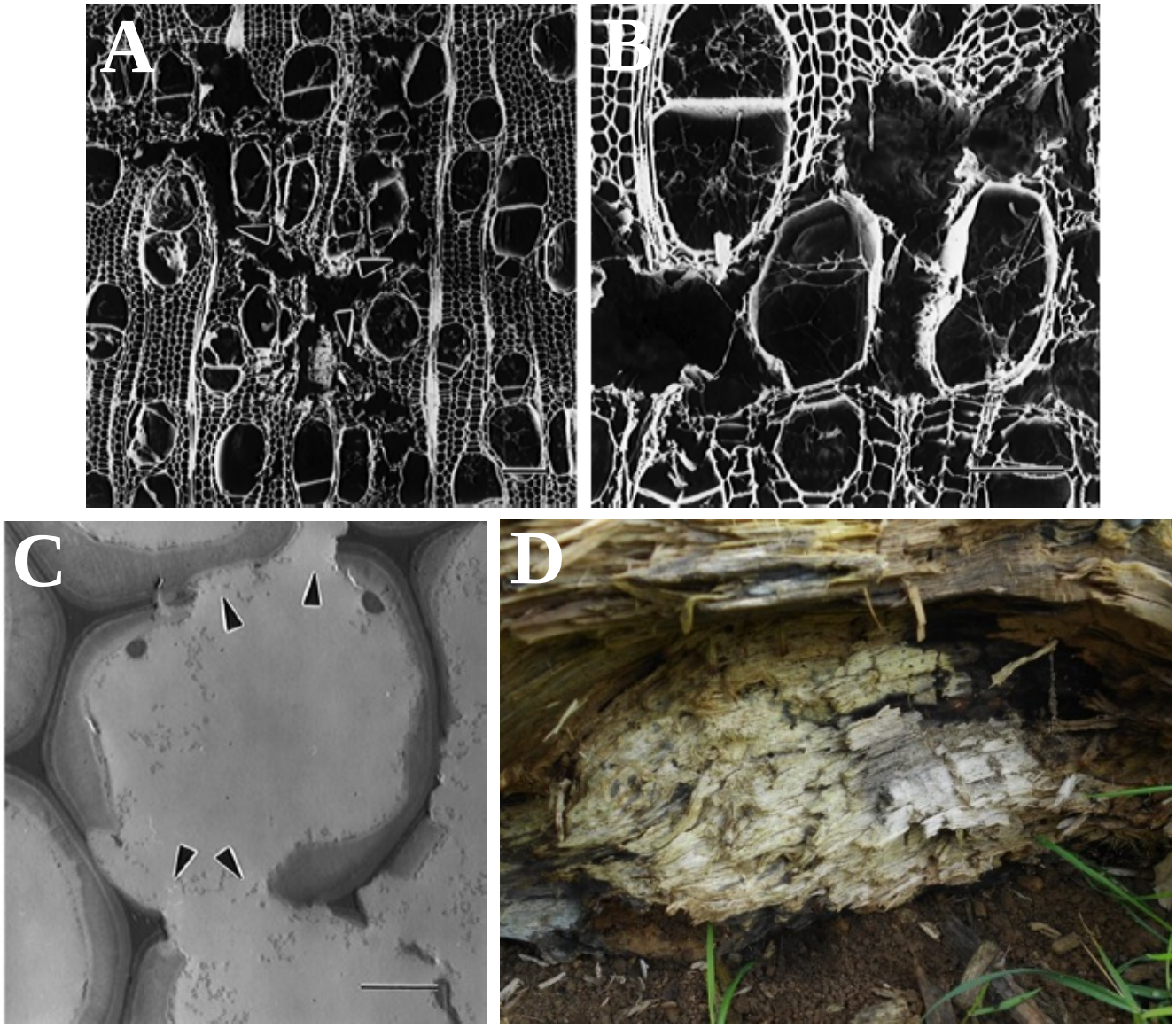


Figure 8 : (**A,B**) Dégradation de tous les composants de la paroi par érosion locale progressive à partir de la paroi secondaire (**C**) générant l'apparition d'espaces dans la structure (barre = 100 µm pour A et B, 5µm pour C) (Blanchette 2000). (**D**) : Aspect d'un morceau de bois probablement attaqué par un champignon de pourriture blanche et présentant un aspect blanc fibreux.

C.2.b.4. Phanerochaete chrysosporium, un champignon de pourriture blanche modèle

P. chrysosporium est un champignon forestier de pourriture blanche faisant partie des basidiomycètes, plus précisément des Corticiales. Dans les années 60, du fait d'études simultanées sur des isolats récoltés principalement en Amérique du Nord et de son cycle de vie particulier, il a obtenu plusieurs noms tels que *Chrysosporium pruinosum*, *C. lignorum*, *Sporotrichum pruinosum* et *S. pulverulentum* avant d'avoir le nom définitif de *P. chrysosporium* (Burdsall 1974). Il décompose la lignine, grâce notamment à l'excrétion d'enzymes oxydantes non sélectives lui permettant d'être également capable de dégrader certains polluants et déchets toxiques. De plus, son optimum de croissance à 40°C (Burdsall 1974) lui permet de croître sur des substrats dans des conditions où la température est assez élevée tels que le compost ou sur copeaux de bois colonisés par d'autres organismes comme les bactéries. C'est pourquoi il est l'objet de nombreuses recherches pour des applications en bioremédiation ou nécessitant la décomposition de matériaux organiques. Ainsi, *P. chrysosporium* est le premier basidiomycète à avoir été séquencé révélant un génome d'environ 30 millions de paires de base réparties sur 10 chromosomes et présentant 10048 prédictions de gènes (Martinez 2004).

IV. Les systèmes de dégradation du bois

A. Les systèmes extracellulaires

Deux grands types d'activités fongiques de dégradation sont observables chez les champignons saprophytes pour la dégradation du bois : l'activité hydrolytique et l'activité oxydante (Figure 9).

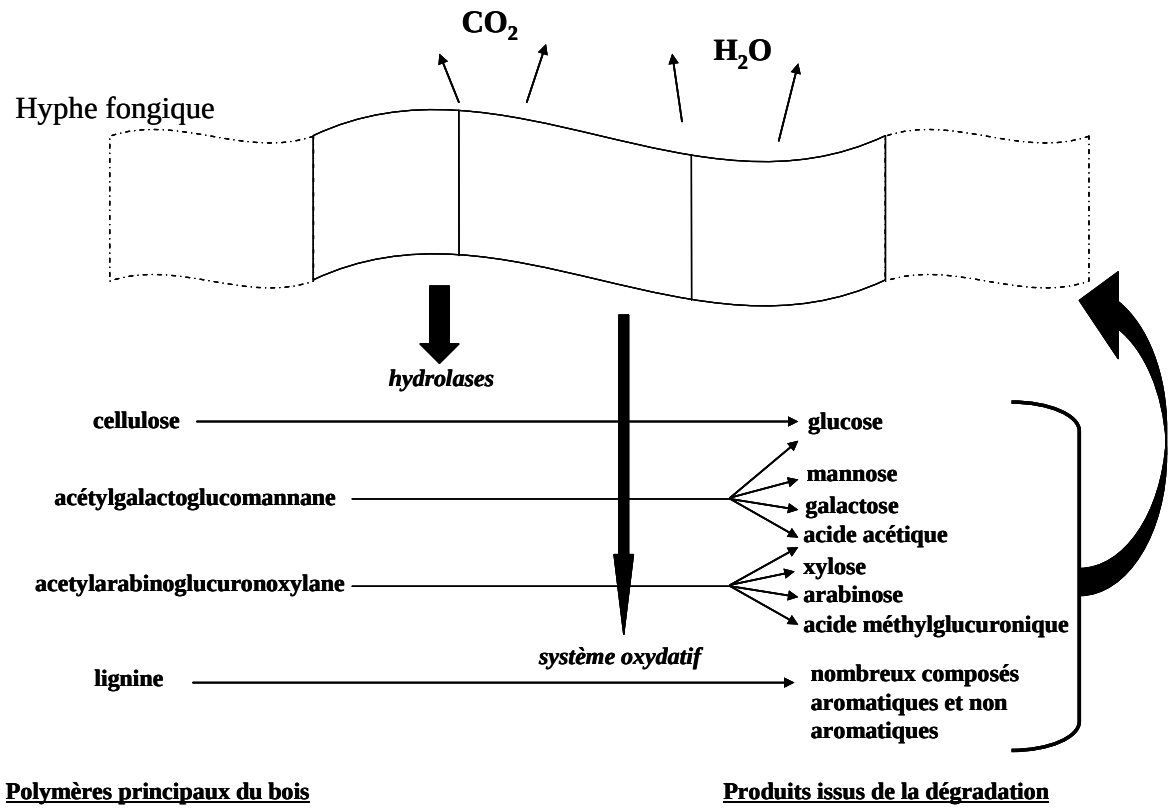


Figure 9 : Représentation schématique de la dégradation des polymères du bois par des systèmes hydrolytiques et oxydatifs, libérant des composés assimilables par le champignon adapté de Kirk, 1998.

A.1. Les enzymes hydrolytiques impliquées dans la dégradation du bois

Les enzymes hydrolytiques impliquées dans la dégradation du bois sont essentiellement des cellulases et des hémicellulases. Elles agissent généralement en synergie. La plupart sont classées parmi les glycoside hydrolases (GH), une grande famille d'enzymes qui hydrolysent les liaisons glycoside. Elles sont classées par leur mode d'action et leur spécificité de substrat et référencées dans une base de données appelée CAZy (Carbohydrate Active enZyme, http://www.cazy.org/, (Cantarel 2009)). Aujourd'hui, près de 132 classes de GH sont identifiées contre 115 en 2010, attestant de l'évolution de la classification selon les nouvelles avancées dans le domaine. Les hydrolases sont généralement accompagnées d'un module de liaison à la cellulose appelé CBM (Carbohydrate Binding Module) qui est nécessaire à la reconnaissance et à l'ancrage au substrat (Boraston 2004; Guillén 2010; Hervé 2010).

Excepté les cellulases et hémicellulases, d'autres enzymes hydrolytiques impliquées dans la dégradation du bois ont également été montrées chez *P. chrysosporium* telles que les glycosyltransferases, les acylhydrolases ou encore les dienelactone hydrolases (Manavalan 2011).

A.1.a. Cellulases

Trois grands types de cellulases sont généralement distingués : les endoglucanases, les cellobiohydrolases et les β-glucosidases (Lynd 2002; Biely 1997; Mathew 2008) (Figure 10).

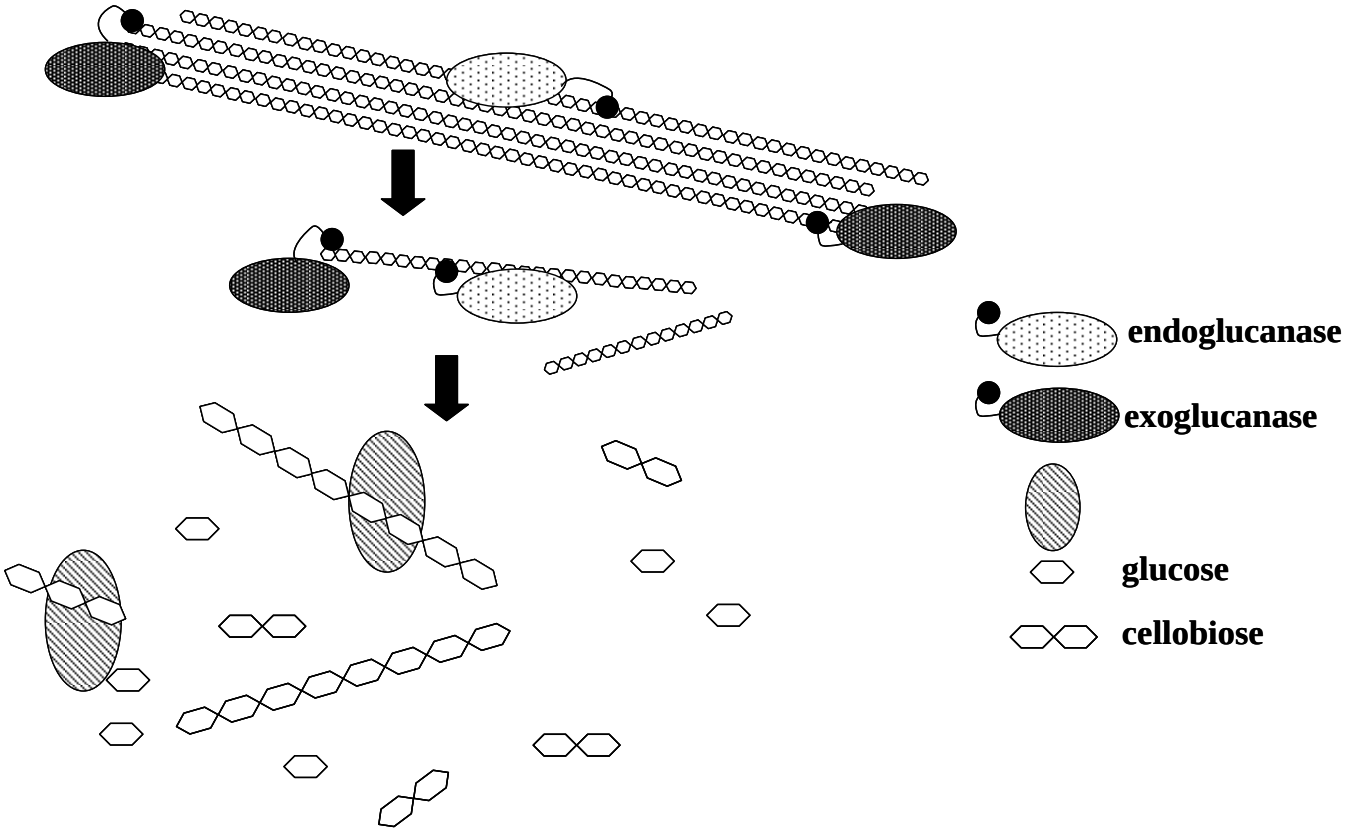


Figure 10 : Représentation schématique de l'hydrolyse de la cellulose par les trois grands types de cellulases. Les ronds noirs correspondent aux CBM potentiels, adapté de Mathew, 2008.

- Les endoglucanases (EC 3.2.1.4), attaquent principalement les liaisons glycosidiques internes en β-(1,4) de la cellulose, libérant du cellobiose, du cellotriose et d'autres oligomères de glucose. Ces enzymes sont généralement actives sur de la cellulose non cristalline.

- Les exoglucanases, dont les cellobiohydrolases (CBH) (EC 3.2.1.91) libèrent du cellobiose et parfois des cellodextrines à partir des extrémités réductrices (CBH I) ou non réductrices (CBH II) de la cellulose et agit préférentiellement sur de la cellulose cristalline.

- Les glucosidases (EC 3.2.1.21) coupent le cellobiose en deux molécules de glucose qui peuvent donc être ensuite assimilées par le champignon.

A.1.b. Hémicellulases

Les hémicellulases ont généralement deux fonctions connues pouvant les classer en deux catégories d'enzymes :

Les enzymes de dépolymérisation dépolymérisent la chaîne principale de l'hémicellulose. Elles peuvent être dites « endo » si elles agissent au milieu d'un polymère ou « exo » lorsqu'elles agissent aux extrémités.

Les enzymes de débranchement dites également « enzymes accessoires » dépolymérisent les ramifications de l'hémicellulose selon les substituants qui les composent. Certaines agissent sur les liaisons glycosidiques tandis que celles agissant sur les liaisons ester sont généralement appelées « estérases ».

Parmi les hémicellulases, trois types d'enzymes sont majoritaires, et retrouvées notamment lors de la dégradation d'hémicelluloses formées de xyloses en tant que chaîne principale : les xylanases, les xylosidases et les estérases (Figure 11)

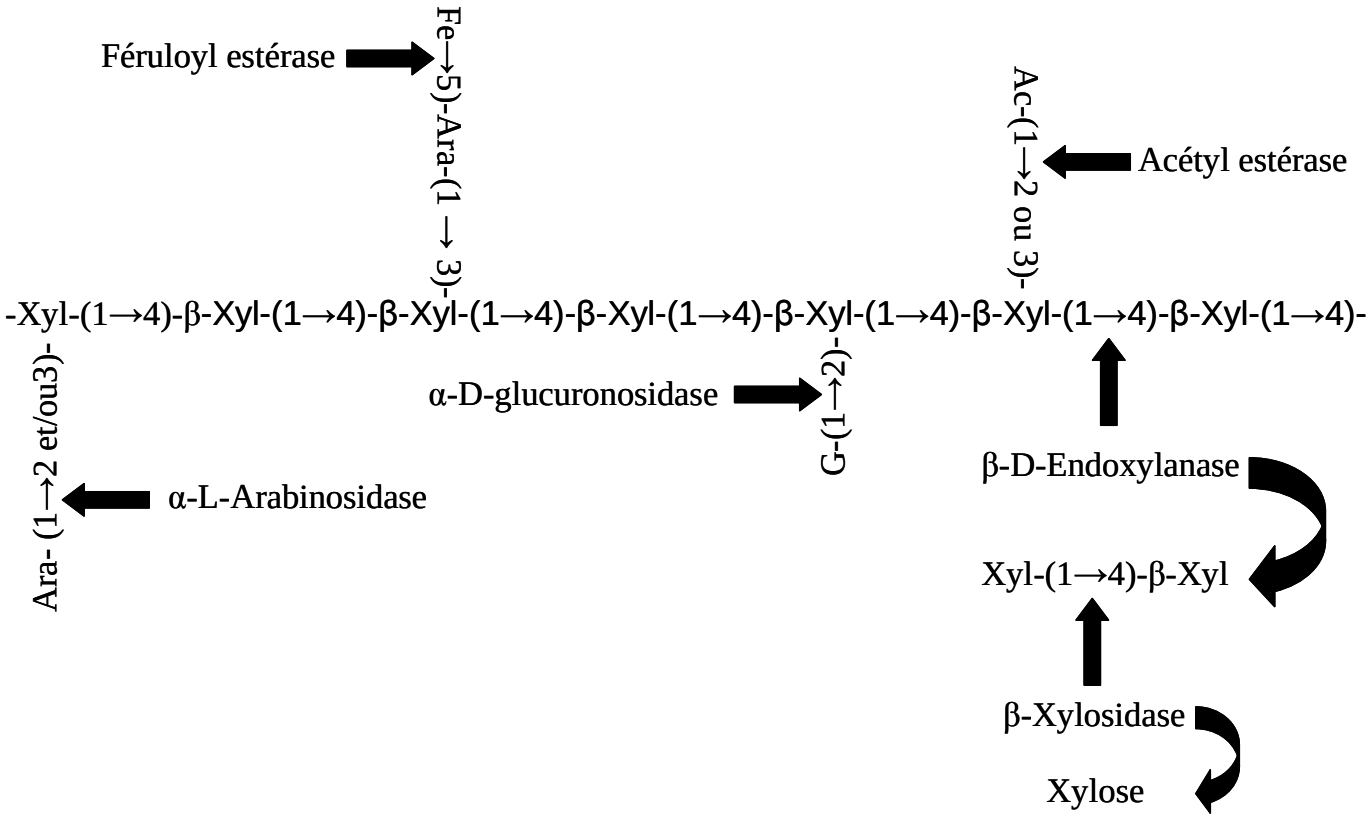


Figure 11 : Schéma d'un hétéroxylane présentant les sites de clivage des enzymes impliquées dans sa dégradation. G = acide glucuronique, Ara = arabinofuranosyl, Fe = acide férulique, Ac = groupement acétyl, Xyl = unité de xylose.

- Les endoxylanases hydrolysent les liaisons internes dans les chaînes principales de xylanes. Elles peuvent avoir différentes spécificités de substrats dans la mesure où certaines tolèrent la présence de substitutions particulières tandis que d'autres non comme il l'a été montré pour des xylanases de la classe GH10 et de la classe GH11 (Biely 1997).

- Les xylosidases (EC 3.2.1.37) hydrolysent les petits xylo-oligosaccharides, principalement du xylobiose, à partir de l'extrémité réductrice.

- Parmi les estérases, les acétyl-estérases (EC 3.1.16) sont capables de libérer les groupes acétyl qui se trouvent sur les carbones C2 et C3 des résidus xylose (Biely 1985; Biely 1998), ce qui augmente l'accessibilité des enzymes dégradant le xylane. Les féruloyl estérases (EC 3.1.12) attaquent les liaisons entre les groupements acide férulique et arabinose, ce qui affaibli les interactions lignine-hémicellulose. Deux glucuronoyl estérases ont également été caractérisées chez *P. chrysosporium*, dont une possédant un domaine CBM. Elles hydrolyseraient les liaisons ester entre les résidus méthylés d'acide glucuronique et les glucuronoxylanes (Duranova 2009).

- D'autres hémicellulases incluent les α-L-arabinofuranosidases (EC3.2.2.55) qui sont des exo-enzymes hydrolysant les résidus α-L-arabinofuranosyl, les galacturonases, les arabinases, les galactosidases, les mannosidases, les mannanases ou encore les rhamnosidases, agissant selon la composition de la chaîne principale et des substituants de l'hémicellulose.

A.2. Les systèmes oxydatifs impliqués dans la dégradation de la lignine

Les systèmes oxydatifs peuvent être enzymatiques ou non enzymatiques. Ils peuvent également être plus ou moins spécifiques ce qui leur confère la possibilité d'agir sur les polysaccharides et sur la lignine (Figure 12).

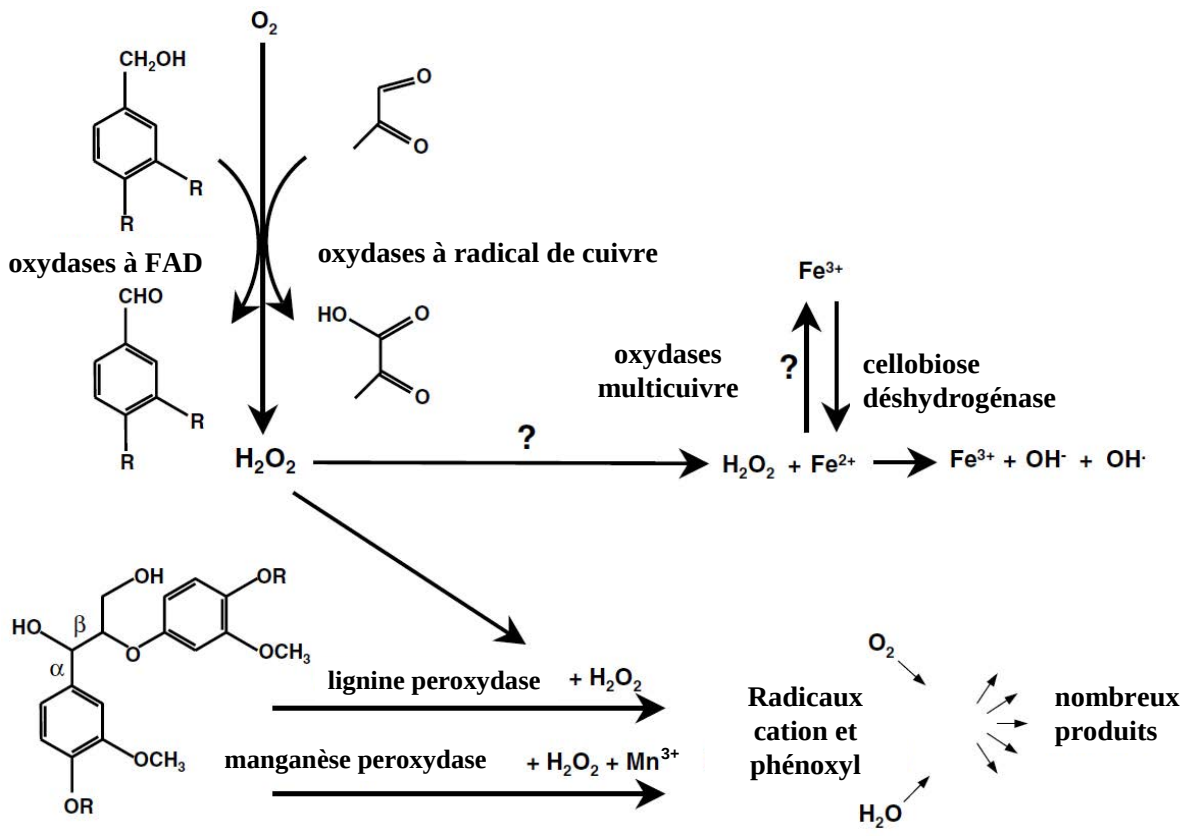


Figure 12 : Système oxydatif extracellulaire de *P. chrysosporium* proposé par Kersten, 2007.

A.2.a. Les systèmes enzymatiques

Les enzymes oxydantes extracellulaires regroupent généralement une diversité d'oxydases et de peroxydases et peuvent être responsables de la formation de radicaux libres réactifs et non spécifiques. Ceux-ci peuvent également contribuer à la dégradation de la lignine. Les glyoxal oxydases (Kersten 1987), les glucoses oxydases (Kelley 1986) ou encore les aryl alcool oxydases (Muheim 1991; Guillén 2010) sont quelques exemples d'enzymes génératrices de radicaux libres mais aussi de peroxydes. Les lignines peroxydases et les manganèse peroxydases sont les enzymes ligninolytiques les plus caractérisées.

- Les Lignine Peroxydases (LiP) (EC 1.11.1.14) sont des enzymes de dépolymérisation de la lignine dépendantes du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Tien 1983; Hammel 1991; Hammel 1993). Elles ont été découvertes pour la première fois chez *P. chrysosporium*. La structure de la LiP-2 de *P. chrysosporium* révèle la présence d'un hème contenant un atome de fer et qui est logé dans une crevasse entre deux domaines (Figure 13). Les LiP sont également glycosylées, ce qui jouerait un rôle de protection contre la protéolyse (Edwards 1993; Poulos 1993).

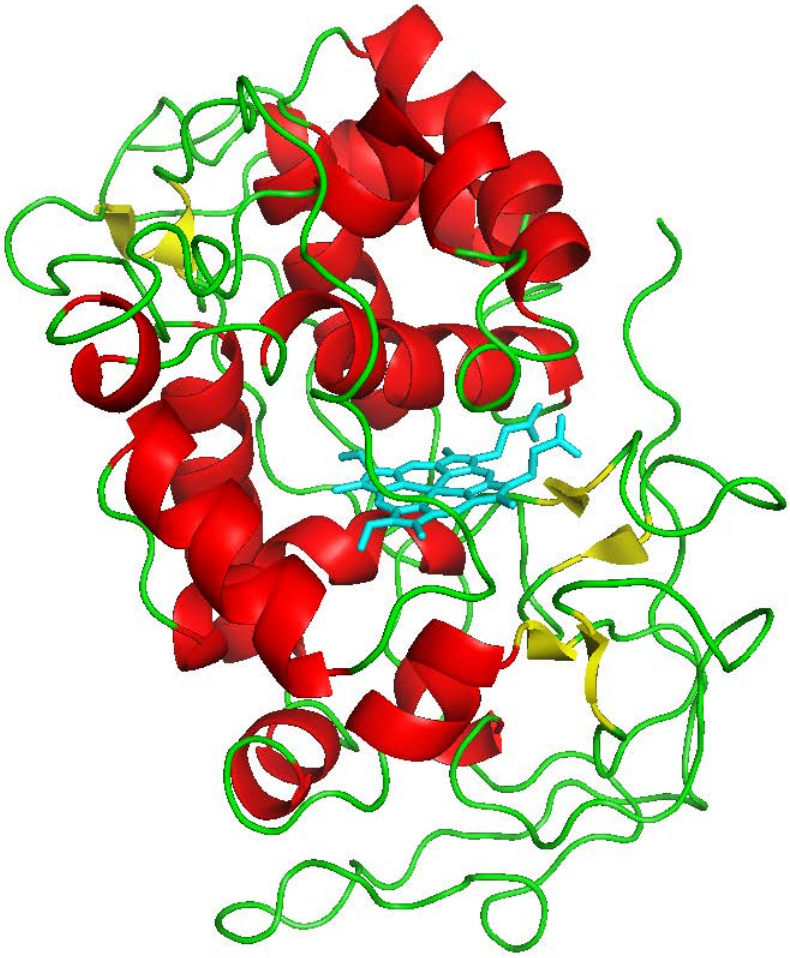


Figure 13 : Structure tridimensionnelle de la LiP-2 de *P. chrysosporium*. En bleu, l'hème logé dans la crevasse (Poulos, 1993, PDB #1LGA).

Les lignine peroxydases catalysent de façon relativement non spécifique l'oxydation de composés non phénoliques et de composés aromatiques. Les composés phénoliques issus de la dégradation de la lignine tels que le guaiacol, l'alcool vanillyl, le catechol ou encore l'acide syringique peuvent également être transformés en radicaux phénoxy- et former des produits de clivage du noyau aromatique par réaction avec l'O_2 (Harvey 1990). Le cycle catalytique se déroule en deux étapes selon l'équation suivante (Figure 14) (Cameron 2000).

$$LiP + H_2O_2 \rightarrow LiP\ I + H_2O$$

$$LiP\ I + R \rightarrow LiP\ II + R^{+\cdot}$$

$$LiP\ II + R \rightarrow LiP + R^{+\cdot} + H_2O$$

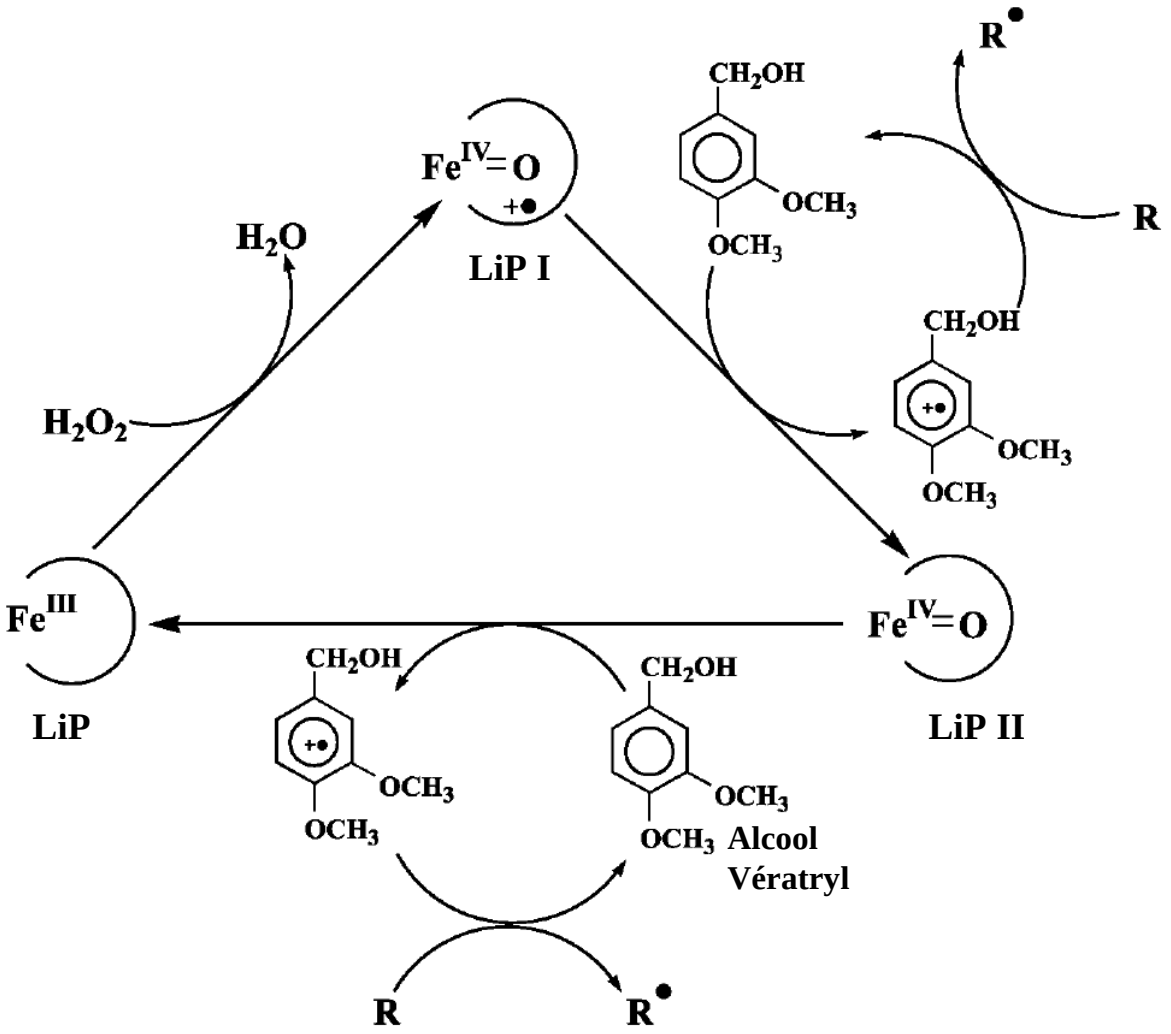


Figure 14 : Cycle catalytique de lignine peroxydase (adapté de Cameron, 2000).

La première étape consiste en l'oxydation de l'enzyme LiP par H_2O_2 au niveau du fer et dont le résultat est appelé complexe I (LiP I). La deuxième implique une réduction en deux étapes du complexe I par le substrat (R) réducteur via un composé appelé complexe II (LiP II). Ce mécanisme a été décrit plus en détail (Wong 2009).

- Les Manganèse Peroxydases (MnP) (EC 1.11.1.13) fonctionnent de façon équivalente aux LiP grâce à de l' H_2O_2 oxydant le Mn^{2+} en Mn^{3+} très réactif qui oxyde ensuite toute une variété de composés phénoliques et non phénoliques (équation suivante, Figure 15) (Tuor 1992; Reddy 2003; Wong 2009).

$$MnP + H_2O_2 \rightarrow MnP\ I + H_2O$$
$$MnP\ I + Mn^{2+} \rightarrow MnP\ II + Mn^{3+}$$
$$MnP\ II + Mn^{2+} \rightarrow MnP + Mn^{3+} + H_2O$$

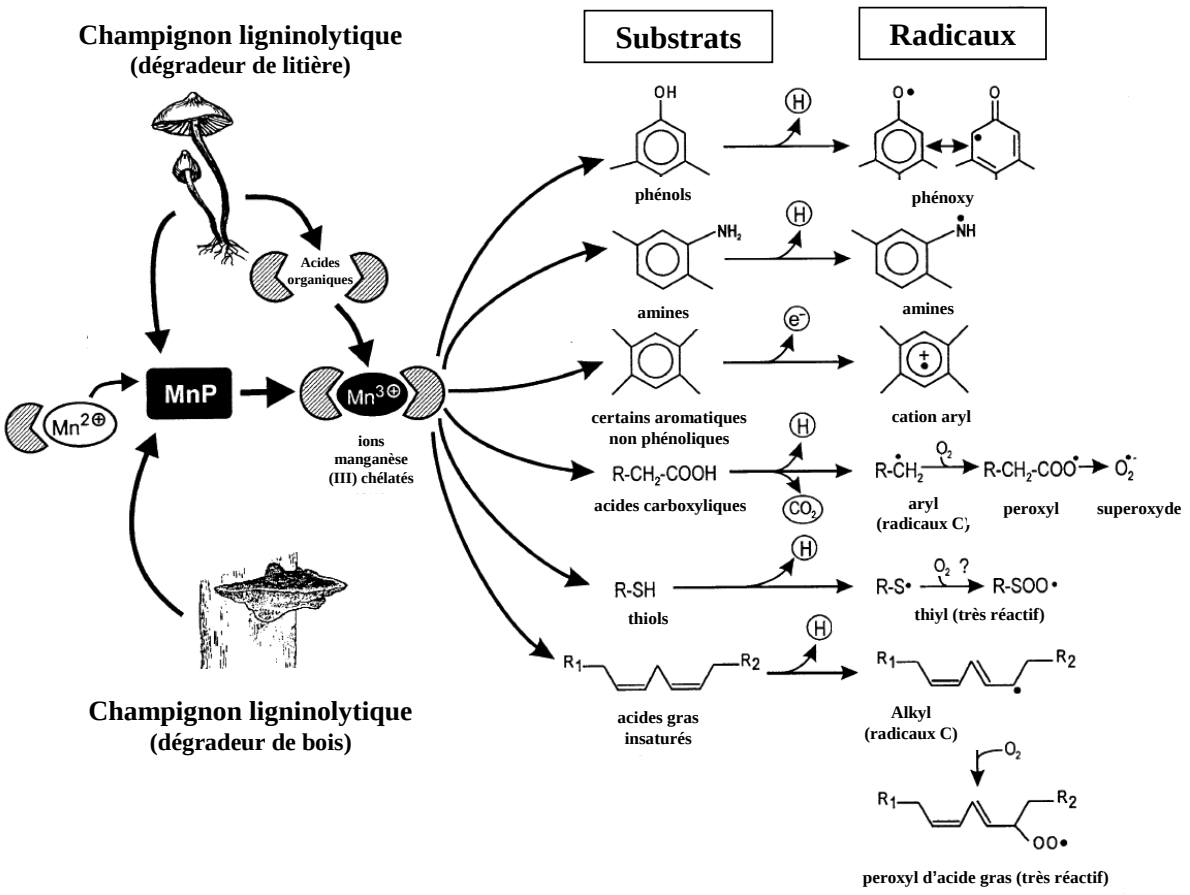


Figure 15: Action des MnP sur les substrats phénoliques via la formation d'un complexe Mn^{3+} - acides organiques : formation de radicaux réactifs (Hofrichter 2002)

Les MnP sont structuralement assez similaires aux LiP avec la présence d'un hème à un atome de fer (Figure 16, (Sundaramoorthy 1994) : PDB #1MNP).

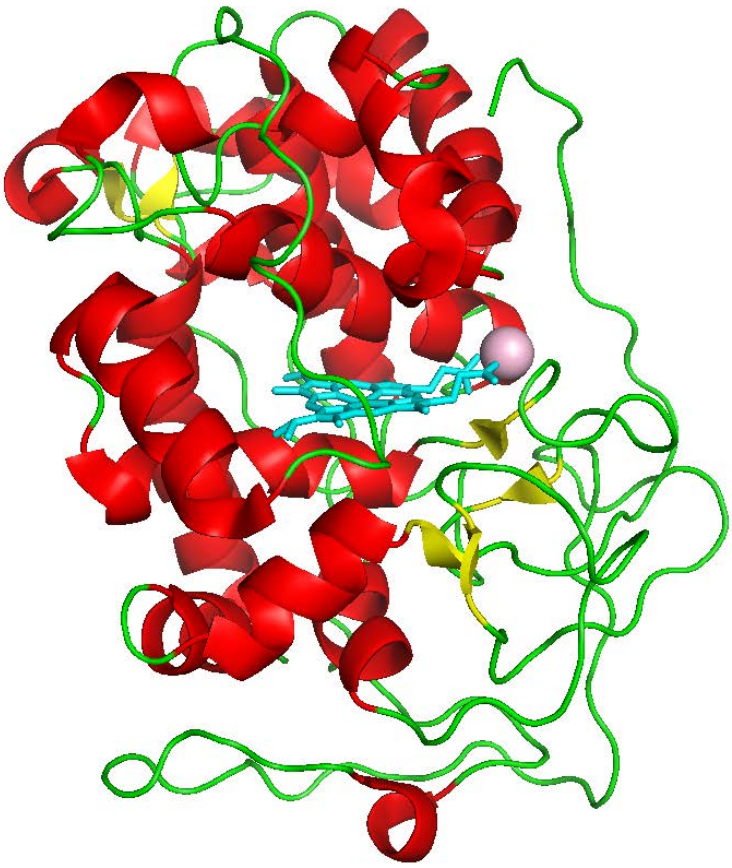


Figure 16 : Structure tridimensionnelle d'une MnP de *P. chrysosporium* présentant l'hème à atome de fer (bleu) et un ion manganèse (rose) (Sundaramoorthy, 2010, PDB # 3M5O)

La résolution structurale de cette enzyme a également montré la présence d'une glycosylation (Sundaramoorthy 2005). Certains acides organiques produits par *P. chrysosporium* tels que l'oxalate ou le malonate sont capables de stabiliser le système en chélatant le Mn^{3+}. Le complexe ainsi formé possède de hauts potentiels rédox, ce qui facilite la dissociation de Mn^{3+} de l'enzyme qui peut ainsi diffuser et oxyder le substrat insoluble, la lignine, générant des radicaux libres qui se désintègrent spontanément (Figure 17), (Wariishi 1989; Wariishi 1989; Hofrichter 2002). De même, la catalyse se déroulerait en utilisant le complexe oxalate-Mn^{2+} plutôt que le Mn^{2+} libre en tant que substrat (Kuan 1993).

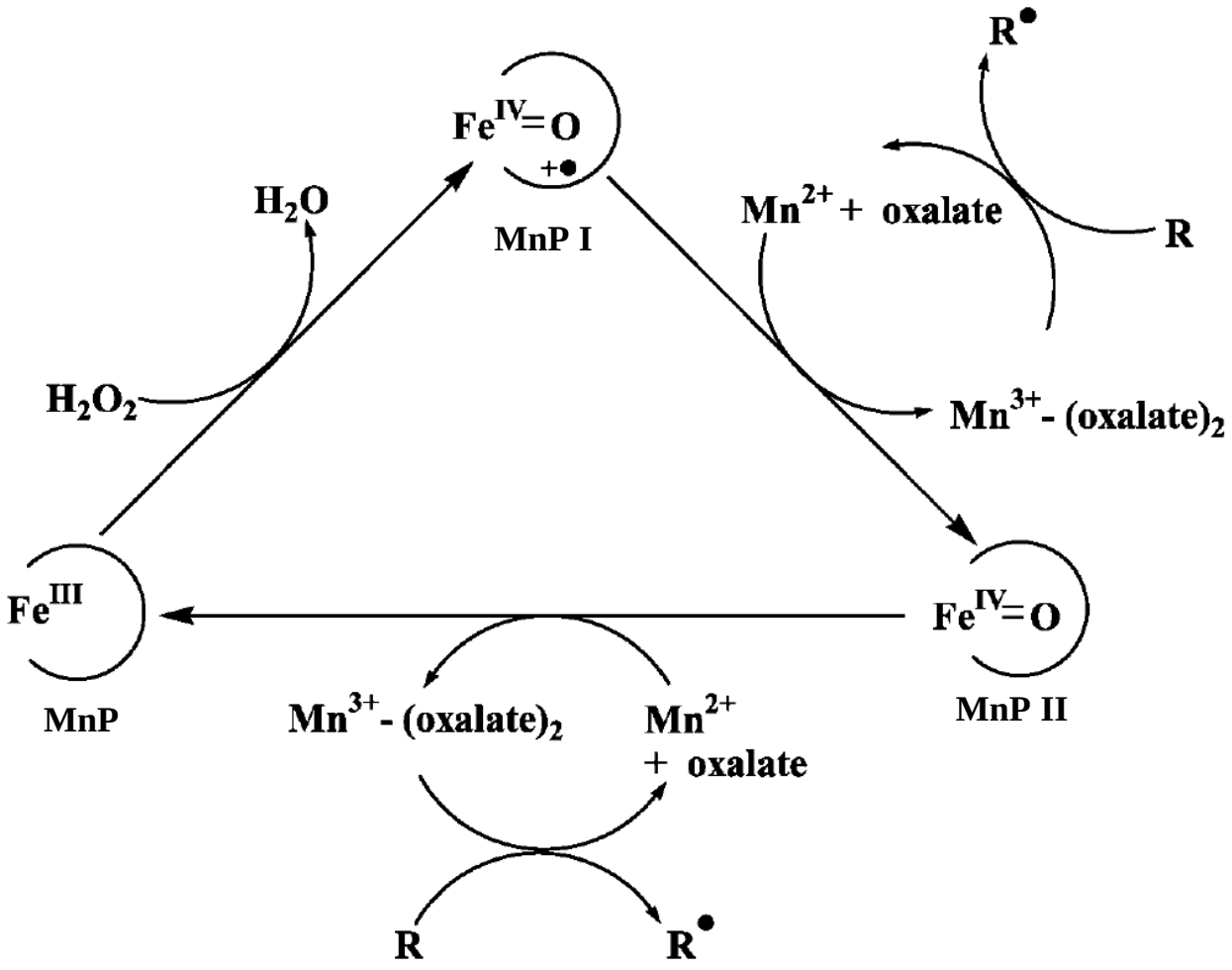


Figure 17 : Cycle catalytique des manganèse peroxydases (adapté de Cameron, 2000).

- Les laccases (EC 1.10.3.2) sont des enzymes à cuivre qui catalysent la réaction suivante :

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

Mise à part leur absence chez *P. chrysosporium*, ces enzymes semblent présentes dans tous les champignons de pourriture blanche étudiés (Kersten 2007; Wong 2009) et auraient un rôle dans la formation des pigments, la dégradation de la lignine et la détoxication de composés phénoliques et non phénoliques (Leatham 1981; Youn 1995; Wong 2009). Leur activité a également été démontrée chez des espèces bactériennes (Hullo 2001; Suzuki 2003) et chez les plantes dans lesquelles elles participeraient avec l'aide de peroxydases à la biosynthèse de la lignine (Bao 1993). Le site actif est très conservé et contient trois types de site de fixation (Type 1, 2 et 3) pouvant lier un total de quatre atomes de cuivre. La catalyse consiste en l'oxydation (1 électron) de quatre molécules de substrat et de deux réductions concomitantes à deux électrons d'une molécule de dioxygène en eau suivant la réaction :

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

Les étapes de la réaction sont schématisées dans la Figure 18.

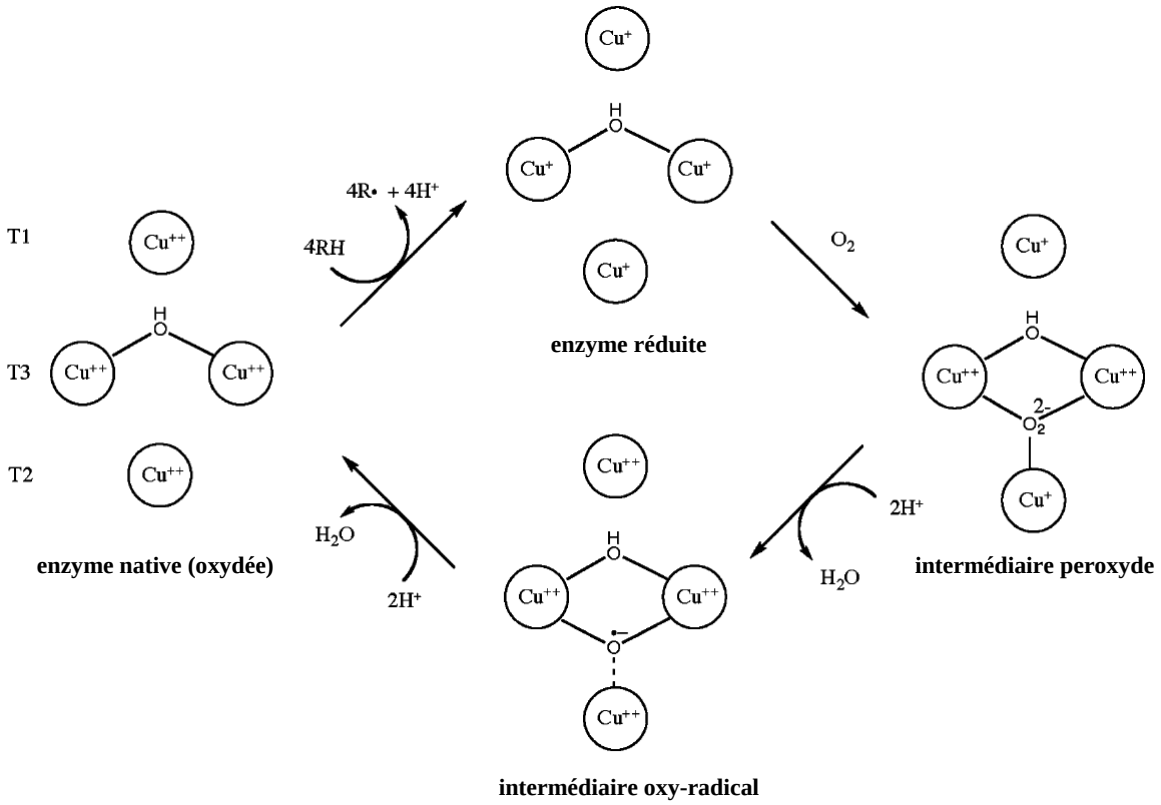


Figure 18 : Cycle catalytique des laccases (adapté de Wong, 2009).

- Parmi les oxydases à radical de cuivre (CRO), les glyoxal oxydases (GLX) sont capables d'oxyder l'hydroxyacétaldéhyde qui est un des produits de réaction catalysée par les LiP. Les oxydations successives de ce composé génèrent de l'oxalate et de multiples équivalents de H_2O_2 qui sont utilisés par les LiP et les MnP (Kersten 1987; Kirk 1987; Kersten 1990; Hammel 1994). Les GLX peuvent également oxyder des composés simples subsitués α-hydroxycarbonyl- ou α –dicarbonyl- ainsi que des molécules issues de la dégradation de la lignine (Kersten 2007).

D'autres oxydases ont également été mises en évidence telles que les oxydases multicuivre, les glucose, pyranose ou alcool oxydases qui sont impliquées dans la dégradation de la lignocellulose (Kersten 2007; Manavalan 2011). Les produits catalytiques de certaines d'entre elles sont présentés Figure 19.

Glyoxal oxydase → Glyoxal + O_2= Glyoxalate + H_2O_2

Aryl-alcool oxydase → Alcool primaire aromatique + O_2= aromatic aldéhyde + H_2O_2

Vanillyl-alcool oxydase → Vanillyl alcool + O_2= vanilline + H_2O_2

Pyranose oxydase → D-glucose + O_2= 2-déhydro-D-glucose + H_2O_2

Galatose oxydase → D-galactose + O_2= D-galacto-hexodialdose + H_2O_2

Glucose oxydase → β-D-glucose + O_2= D-glucono-1,5-lactone + H_2O_2

Méthanol oxydase → Méthanol + O_2= Formaldéhyde + H_2O_2

Figure 19 : Oxydases impliquées dans la dégradation de la lignine chez *P. chrysosporium* et leurs produits (adapté de Morel, 2009)

- Les déshydrogénases sont des enzymes oxydantes fonctionnant avec des coenzymes ou cofacteurs tels que le NAD^+, ou des groupements prosthétiques. Quelques exemples incluent les cellobiose déshydrogénases (CDH), les alcool déshydrogénases (contenant du Fe), les carboxylates déshydrogénases ou encore les aldéhyde déshydrogénases. La CDH est par exemple impliquée dans la production de H_2O_2 et de radicaux hydroxyles très réactifs qui participent à la dépolymérisation de la lignocellulose (Mason 2003; Kersten 2007).

- L'action des monooxygénases de polysaccharides (PMO) a été récemment mise en évidence. Il s'agit de petites protéines dépendantes du cuivre, fortement exprimées en présence de lignocellulose et capables de cliver les molécules de cellulose de façon oxydative, en synergie avec d'autres enzymes telles que les CDH (Harris 2010; Phillips 2011; Zifcakova 2012).

- Récemment, il a été montré que des membres des nouvelles familles de peroxygénases aromatiques (APO) et de peroxydases « dye-decolorizing » (DyP) seraient impliquées dans la dégradation de la lignine. Ils agiraient entre autres sur l'alcool vératryl, remplissant des fonctions similaires aux LiP (Hofrichter 2010; Liers 2010; Kinne 2011).

A.2.b. Les systèmes non enzymatiques

Les enzymes secrétées qui participent à la dégradation de la lignocellulose ne sont pas de très bonnes candidates pour pénétrer dans la structure du bois, du fait de leur grande taille. Par leur mécanisme réactionnel, elles génèrent des composés activés et très oxydants comme

le peroxyde d'hydrogène, l'alcool vératryl ou le manganèse qui servent ainsi de médiateurs. De même, les espèces réactives oxygénées (ERO), petites et non spécifiques, et en particulier le radical hydroxyle, permettent d'initier cette dégradation (Halliwell 1965; Koenigs 1974; Srebotnik 1988; Kremer 1992; Hammel 2002; Mason 2003). D'autres mécanismes impliquent aussi des glycopeptides (Tanaka 1999) ou encore le cycle redox des quinones (Gomez-Toribio 2009). Du fait de la présence de fer « actif » dans le système et de peroxyde d'hydrogène, la réaction de Fenton engendre la production supplémentaire de radicaux hydroxyles (Koenigs 1974; Kremer 1992; Wood 1994) selon l'équation suivante :

$$H_2O_2 + Fe^{2+} + H^+ \text{ -> } H_2O + Fe^{3+} + OH^{\cdot}$$

Les radicaux oxydants générés pourraient accélérer la dépolymérisation de la cellulose au niveau de sa structure cristalline, la rendant plus accessible et plus vulnérable à l'attaque par les enzymes hydrolytiques (Henriksson 2000; Mason 2003). De même, il a été mentionné le rôle de ces radicaux dans la dégradation de la lignine (Forney 1982; Tanaka 1999). Un mécanisme général de dégradation de polysaccharides grâce au radical hydroxyle a été proposé (Figure 20).

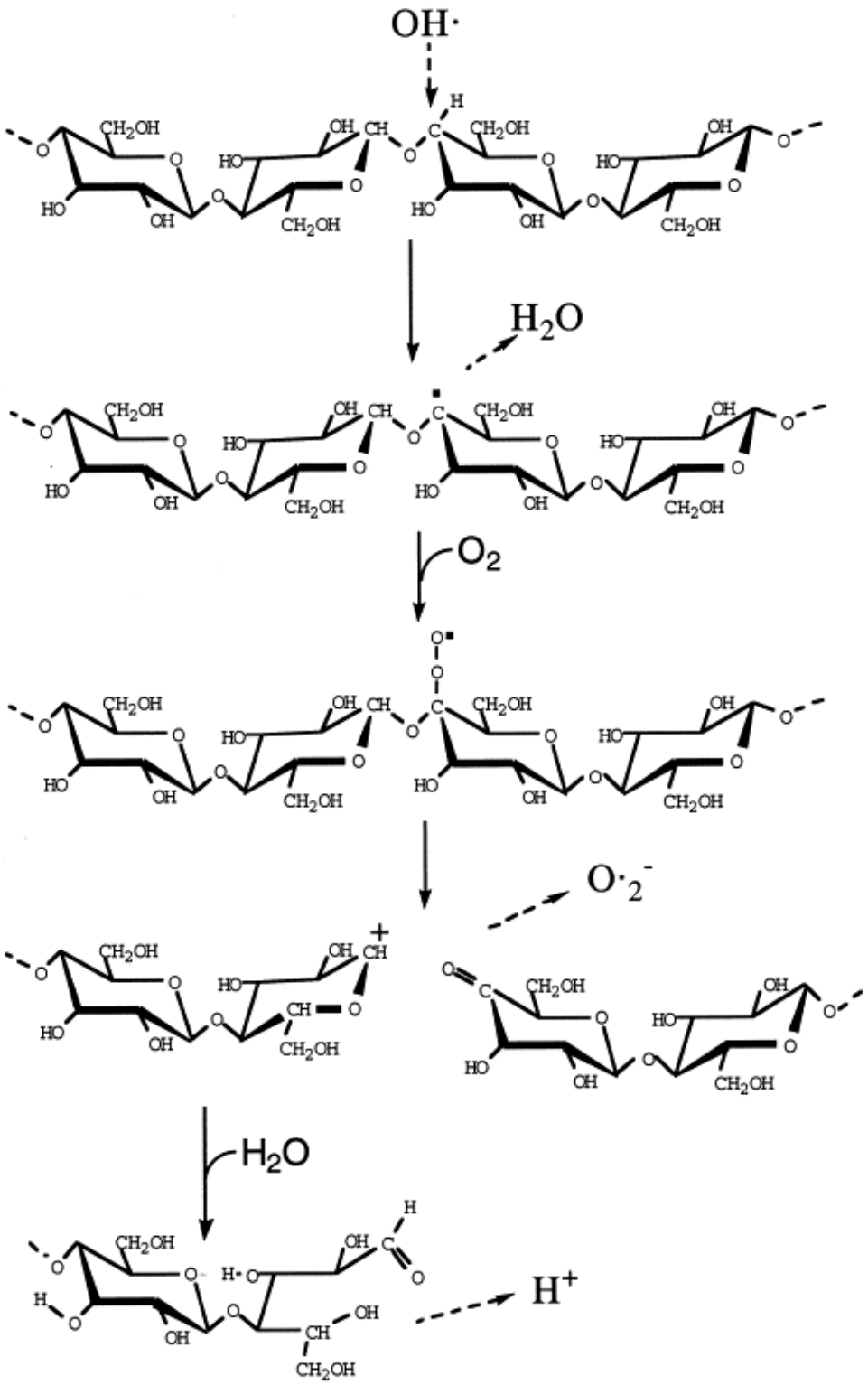


Figure 20 : Mécanisme de dégradation de la cellulose grâce au radical hydroxyle. Cette action peut également concerner les xylanes, les mannanes ou encore les pectines (Henriksson 2000).

De même, plusieurs types de réactions ont été proposés pour la transformation de la lignine (Figure 21) (Hammel 2002).

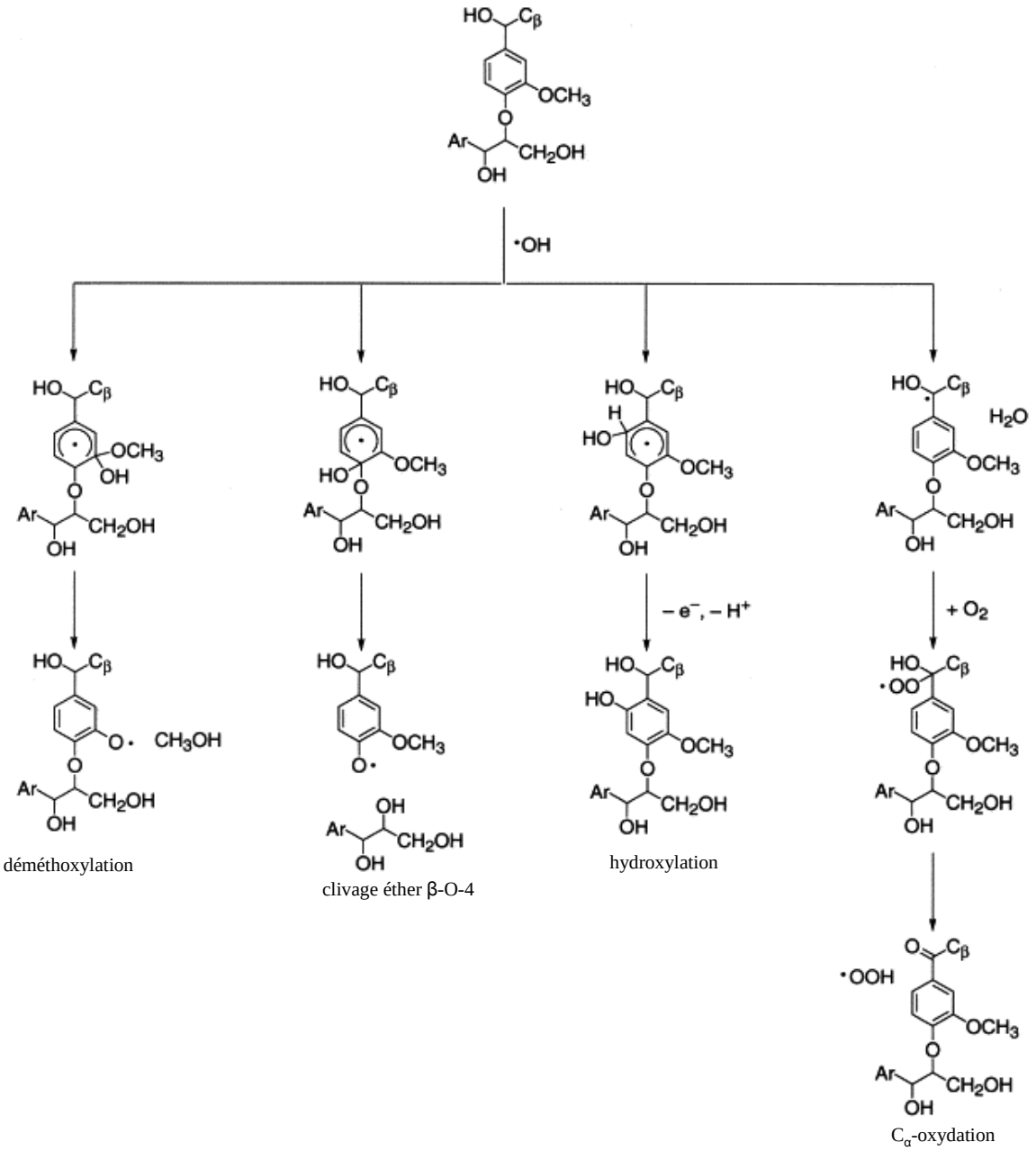


Figure 21 : Réactions typiques catalysées par le radical hydroxyle sur la structure arylglycerol-β-aryl éther de la lignine (Hammel 2002).

Les radicaux peroxyl et hydroperoxyl, un peu moins réactifs, peuvent être issus de l'oxydation des polymères par le radical hydroxyle mais aussi de l'action des MnP. Ils seraient également capables de transformer la lignocellulose, même s'ils sont un peu plus sélectifs dans leurs actions (Hammel 2002).

A.3. Potentiel biotechnologique des systèmes de dégradation extracellulaires

A.3.a. Bioconversion de la biomasse lignocellulosique

La bioconversion de la lignocellulose en matériaux valorisables peut impliquer l'utilisation des enzymes des champignons et autres microorganismes dégradeurs du bois. Elle est actuellement l'objet d'études dans l'industrie papetière où un des buts est l'élimination de la lignine tout en évitant la dégradation de la cellulose. Actuellement, les méthodes utilisées sont l'utilisation de produits chimiques et un broyage mécanique des fibres qui forment la pâte à papier. L'utilisation des capacités de dégradation des microorganismes permet d'éviter le blanchiment chimique (Singh 2010).

La production de bioéthanol de seconde génération (à partir de biomasse lignocellulosique) fait l'objet de nombreuses études et nécessite quatre étapes : le prétraitement, la dépolymérisation (saccharification) des polysaccharides en sucres plus simples (aussi appelé hydrolyse), la fermentation de ces sucres en des produits valorisables tels que le bioéthanol (Figure 22).

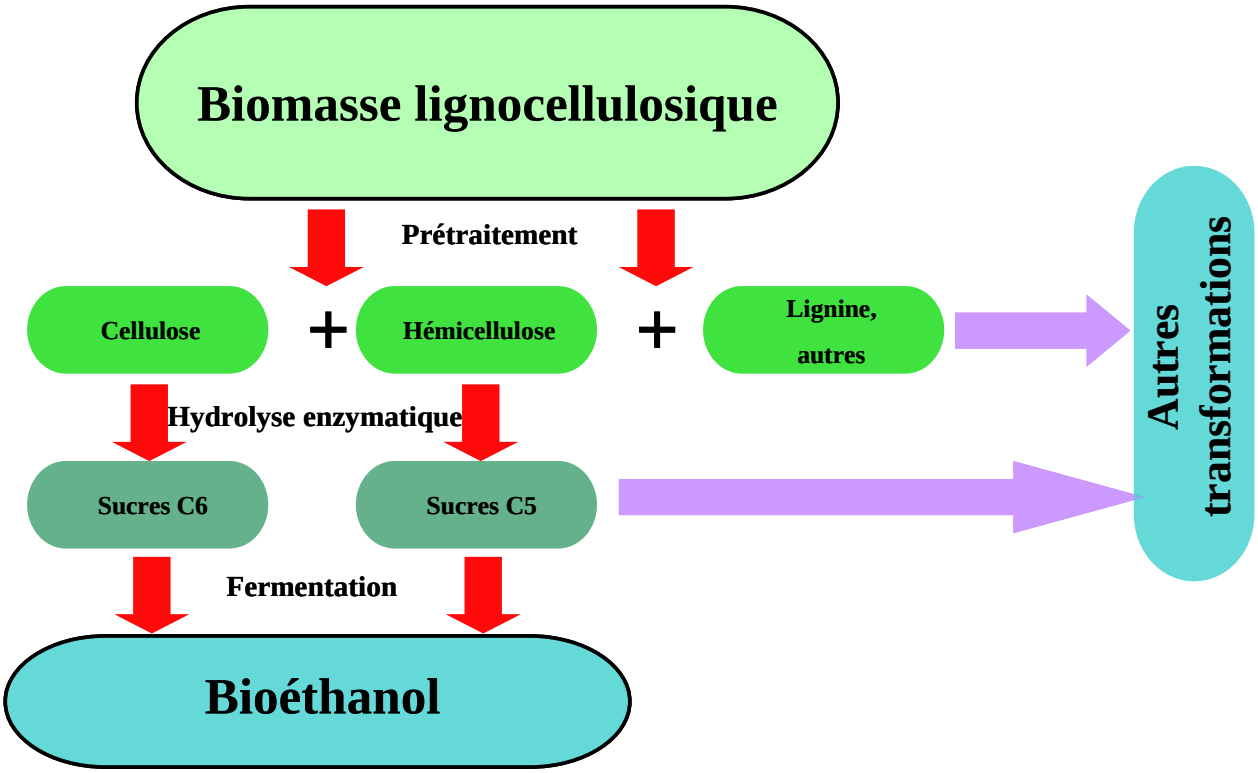


Figure 22 : Valorisation de la biomasse lignocellulosique, les étapes de la production de bioéthanol de deuxième génération

Le prétraitement permet de déstructurer la biomasse dans le but de rendre les polysaccharides plus accessibles aux enzymes. Il peut consister en l'enlèvement de la lignine voire de l'hémicellulose, de réduire la cristallinité de la cellulose et rendre la biomasse plus poreuse, tout en évitant la perte des sucres et la formation de composés indésirables pouvant inhiber les processus suivants. Le prétraitement physique peut inclure la fragmentation mécanique ou la pyrolyse. Le prétraitement physicochimique implique l'explosion à la vapeur, ou l'explosion au dioxyde de carbone tandis que le prétraitement chimique peut se réaliser par ozonolyse, hydrolyse acide, hydrolyse alcaline ou délignification oxydative (avec du peroxyde d'hydrogène) et enfin le traitement au champ électrique pulsé (Kumar 2009). Cependant, la plupart de ces prétraitements nécessite du matériel onéreux et beaucoup d'énergie selon le processus impliqué. Le prétraitement biologique utilisant différents champignons de pourriture est moins dangereux et plus respectueux de l'environnement. C'est pourquoi une recherche intensive sur les champignons dégradeurs du bois mais particulièrement les champignons de pourriture blanche est mise en œuvre pour déterminer les meilleures conditions de culture et les meilleures souches capables de dégrader la lignine en n'attaquant que peu voire pas du tout la cellulose sur un substrat donné. L'inconvénient de ce type de traitement est la lenteur du processus (Dashtban 2009; Kumar 2009).

L'hydrolyse implique des cellulases et hémicellulases qui dépolymérisent la cellulose et l'hémicellulose en sucres solubles monomériques. De nombreuses espèces fongiques parmi les genres Trichoderma, Penicillium ou encore Aspergillus sont capables de produire ces enzymes en grandes quantités. Les systèmes de prétraitements les plus utilisés utilisant la chaleur et les conditions acides, une attention particulière est menée sur les enzymes thermostables et tolérant un faible pH. De plus, ces enzymes seraient plus spécifiques, améliorant le rendement de l'hydrolyse (Turner 2007; Viikari 2007). L'amélioration par mutagenèse de ces enzymes pour un meilleur accès au substrat et une hydrolyse optimale fait l'objet de nombreuses études ainsi que la recherche des meilleures conditions de (co-)culture (Dashtban 2009).

La fermentation des hexoses et pentoses issus de l'hydrolyse des polysaccharides du bois en éthanol est généralement réalisée par *Saccharomyces cerevisiae*. Cette levure est connue pour être capable de transformer le glucose, majoritairement présent, en éthanol. Une souche de *S. cerevisiae* capable de fermenter des pentoses, tels que les xyloses ou arabinoses issus de l'hémicellulose, avec une efficacité similaire a été créée (Karhumaa 2006) permettant d'optimiser la fermentation des sucres disponibles. Cependant, des composés formés lors du prétraitement peuvent inhiber le processus de fermentation, ce qui présente une autre

contrainte à surmonter (Dashtban 2009). Enfin, la fermentation peut être réalisée de façon simultanée ou séparée de l'hydrolyse.

A.3.b. Dégradation de xénobiotiques

Du fait de leurs activités peu spécifiques, les enzymes extracellulaires des champignons dégradeurs de lignocellulose peuvent également être impliquées dans la dégradation de xénobiotiques. Cela concerne principalement les enzymes oxydatives.

De potentielles applications des laccases concernent la détoxication des eaux usées issues de l'industrie. Cette détoxication peut par exemple concerner les colorants présents dans les effluents de l'industrie textile, les effluents chimiques de l'industrie papetière ou les déchets issus de la production d'huile d'olive. Sont également concernés certains composés récalcitrants (chlorophénols, pesticides, etc.) ou encore des composés dangereux issus des procédés de transformation du charbon (composés contenant du soufre ou des phénols) (Harms 2011). Ainsi, il a été montré que les laccases fongiques sont capables de transformer des centaines de composés (dont des composés phénoliques chlorés) et la liste continue à s'allonger (Baldrian 2006). Quelques exemples de catalyses sont présentés Figure 23 (Majeau 2010).

Les peroxydases sont capables d'oxyder des polluants à plus grands potentiels rédox (Hofrichter 2010) et sont étudiées pour leurs capacités à dégrader des (chloro)phénols cancérigènes, perturbateurs endocriniens, HAP (Hydrocarbures aromatiques polycycliques), pesticides, colorants synthétiques et autres effluents industriels (industries agroalimentaires, textile, etc.) (Asgher 2008).

La plupart des études ont été réalisées chez *P. chrysosporium* et ont effectivement montré la modification de composés chlorés, (CCl_4, $CHCl_3$), de PCB (polychlorinated biphényls), de TNT (2,4,6-trinitrotoluène) ou encore de RDX (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine) par les LiP, les MnP et/ou les CDH, grâce à une action directe ou par les produits issus de leur catalyse comme des radicaux oxygénés (Bumpus 1994; Novotny 1997; Cameron 1999; Cameron 2000). La transformation de colorants issus de l'industrie textile tels que Direct Blue 15, Direct Green 6 et Drimarine Blue K2R par des manganèse peroxydases a également été rapportée chez *P. chrysosporium* (Pazarlioglu 2005; Urek 2007; Noreen 2011). Enfin, ces enzymes modifieraient également de nombreux composés organiques chlorés et un rôle non négligeable a été récemment attribué à des enzymes intracellulaires telles que les cytochromes P450 monooxygénases (CytP450) (Marco-Urrea 2012).

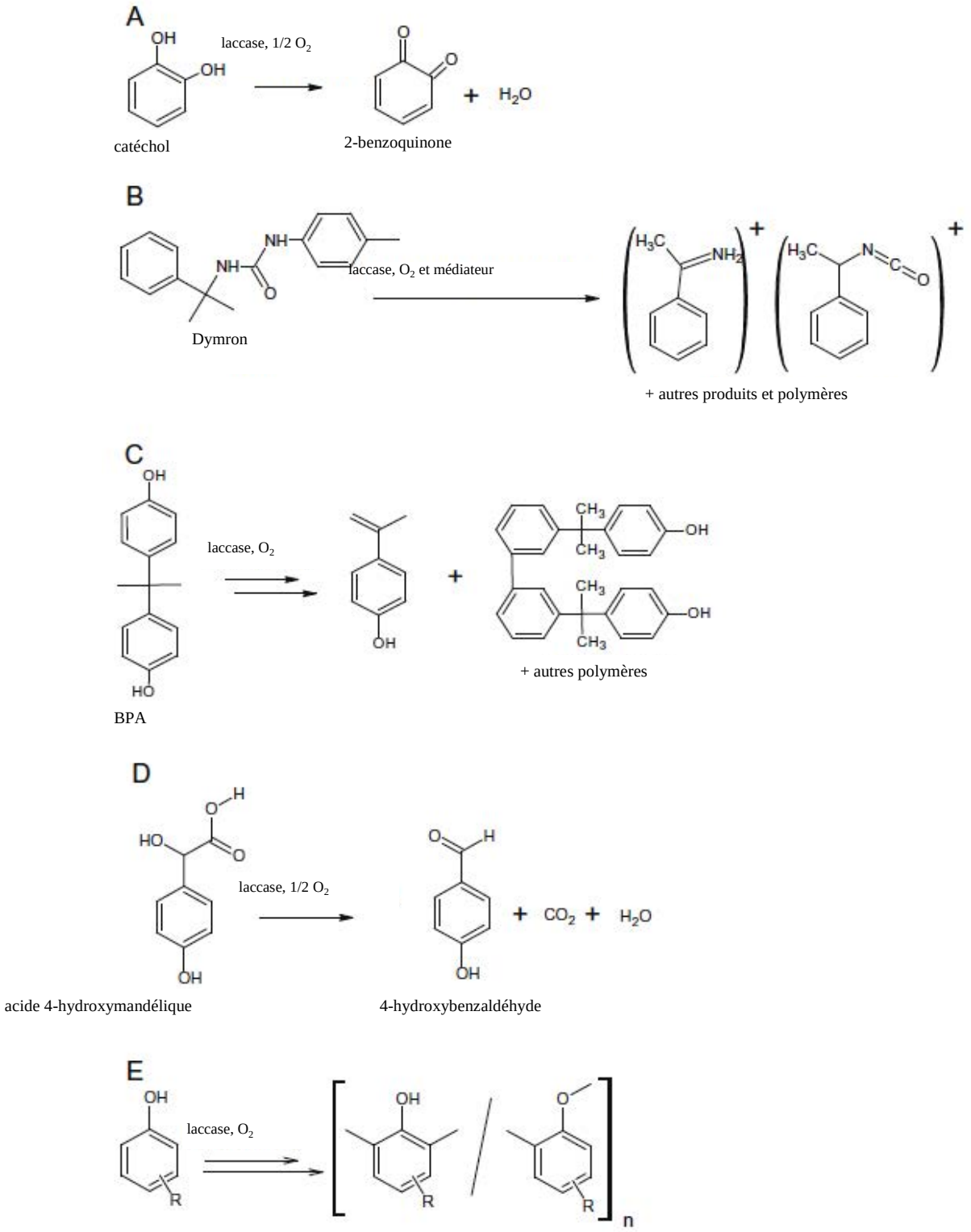


Figure 23 : Quelques exemples d'oxydations de xénobiotiques catalysées par des laccases, adapté de Majeau, 2010. A : oxydation du catechol, B : deux produits possibles issus de l'oxydation du Dymron, un insecticide (Maruyama 2006), C : produits dérivés principaux issus de l'oxydation du Bisphénol A (BPA) (Fukuda 2001; Uchida 2001), D : exemple de décarboxylation oxydative (Agematu 1993), E : polymérisation oxydative de dérivés phénols (Mita 2003).

A.4. Les systèmes extracellulaires de *Phanerochaete chrysosporium* et leur régulation

Les données génomiques ont révélé la présence de la plupart des enzymes hydrolytiques présentées ci dessus chez *P. chrysosporium*. Ainsi, 166 glycoside hydrolases ont pu être identifiées (Martinez 2004). Cependant, il faut rester prudent quant aux prédictions génomiques car des analyses fonctionnelles les contredisent parfois. Par exemple, la protéine PcXyl de *P. chrysosporium* prédite pour être une xylosidase a montré une fonction arabinofuranosidase (Huy 2013). Parmi les enzymes oxydatives, l'absence de laccase est remarquable. 10 LiP, 5 MnP (Pease 1989; Pribnow 1989; Orth 1994; Alic 1997) et un seul gène *cdh* (Raices 1995; Li 1996) existeraient chez *P. chrysosporium*. Six gènes codant les CRO ont été également été identifiés chez *P. chrysosporium* mais ne possèdent qu'une faible homologie de séquence avec les GLX. Le gène *Cro6* code une protéine assez proche (47% d'identité protéique) mais avec une région N-terminale en moins, tandis que le gène *Cro2* ne possède que 28% d'identité (Kersten 2007). Les oxydases représentent 11% du secrétome de *P. chrysosporium* contre 1% pour les LiP ou les MnP (Bouws 2008), soulignant leur rôle non négligeable dans la dégradation de la matière lignocellulosique grâce notamment à la production d'H_2O_2 utilisé par les péroxydases.

Des études transcriptomiques et du sécrétome ont également été réalisées sur divers substrats. Des analyses par Northern Blot indiquent une expression de *cbhI* en présence de cellulose mais pas en présence de glucose (Sims 1988). Le même résultat a été observé avec des glycosides hydrolases et des oxydoréductases comme la CDH qui n'est pas surexprimée en présence de glucose ou cellobiose mais l'est en présence de cellulose (Li 1996). De même, le cellotriose et le cellotetraose induisent l'expression de CDH tandis que le xylobiose et le xylotriose induisent l'expression de gènes codant des CBH (Hori 2012). Une étude récente du transcriptome a révélé une surexpression en présence de cellulose des gènes d'endoglucanases (GH5), de cellobiohydrolases (GH6 et GH7) de xylanases (GH10 et GH11) et de protéines GH61 en comparaison avec la présence de glucose seul (Wymelenberg 2009). L'ajout de xylane sur des cultures contenant de la cellulose induit également la production de xylanases GH10, d'une glucuronoyl esterase putative ainsi que des CDH et des protéines GH61 prédites pour accélérer la conversion enzymatique de polysaccharides (Hori 2011).

Des gènes codant des protéines incluant des hydrolases de polysaccharides, des enzymes dégradantes de lignine, des enzymes impliquées dans la production de peroxyde ou dans le stress oxydant sont fortement exprimés chez *P. chrysosporium* en présence de chêne rouge, de pin ou de peuplier (Wymelenberg 2010; Manavalan 2011; Wymelenberg 2011; Adav 2012).

L'expression des enzymes oxydantes telles que les LiP, les MnP ou les enzymes génératrices de peroxyde d'hydrogène est induite en réponse à un manque de nutriment (notamment en azote) ou en présence d'oxygène ou d'alcool vératryl. Cependant, les sytèmes de régulation sont complexes et encore mal connus (Holzbaur 1988; Stewart 1992; Stewart 1999).

Par exemple, des conditions de carence en azote induisent une augmentation de la quantité d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), un messager secondaire qui serait responsable de l'expression des gènes codant les LiP et MnP. En effet, une augmentation nette de la concentration intracellulaire en AMPc précède l'accumulation des transcrits tandis que des inhibiteurs de l'AMPc tendent à réduire leur apparition (Boominathan 1992). En accord avec ces résultats, l'ajout d'AMPc dans le milieu augmente l'activité MnP (Singh 2011). Il a été récemment suggéré que la signalisation AMPc induirait la transcription de la calmoduline qui augmenterait elle-même la transcription des gènes *lip* et *mnp* (Sakamoto 2012). D'autres systèmes pourraient également jouer un rôle dans l'expression de ces peroxydases, comme l'augmentation de la concentration en oxygène, sans affecter le niveau intracellulaire d'AMPc, et qui est responsable de la formation d'espèces réactives oxygénées (ERO) (Belinky 2003). De même, dans des cultures déficientes en manganèse, les enzymes antioxydantes qui en sont dépendantes telles que la superoxyde dismutase (MnSOD) ne peuvent pas neutraliser les ERO pour protéger la cellule contre le stress induit. Ces ERO, dont le radical hydroxyle, induiraient la production de LiP (Belinky 2006). Le manganèse serait également impliqué dans la régulation transcriptionnelle de MnP chez *P. chrysosporium* (Brown 1990; Brown 1991).

B. Les systèmes intracellulaires

Au cours de la dégradation de la lignocellulose, de nombreux produits sont absorbés. Parmi ceux-ci, nombreux sont ceux qui ne sont pas utilisés comme source nutritive. C'est le cas de certains composés aromatiques et phénoliques issus de la dégradation de la lignine (voir Figure 9), qui peuvent se révéler toxiques. Les champignons impliqués dans la fermentation des sucres lors de la production de bioéthanol sont particulièrement concernés puisque ces composés inhibent leur croissance (Buswell 1994; Pienkos 2009; Lee 2012). Ces molécules toxiques s'apparentent à d'autres composés aromatiques issues de l'industrie en particulier et nommés xénobiotiques.

La prise en charge des xénobiotiques par un organisme a fait l'objet de nombreuses études notamment en ce qui concerne la transformation de médicaments chez les mammifères,

la détoxication d'herbicides chez les plantes, de pesticides chez les insectes ou encore d'autres polluants chez les microorganismes. Ceci a permis de mettre en évidence une détoxication en plusieurs phases grâce à un système appelé « xénome » responsable de la détection, du transport et de l'élimination de ces xénobiotiques (Edwards 2005). Trois phases de détoxication ont été identifiées chez les champignons mais aussi chez de nombreux autres organismes (Figure 24).

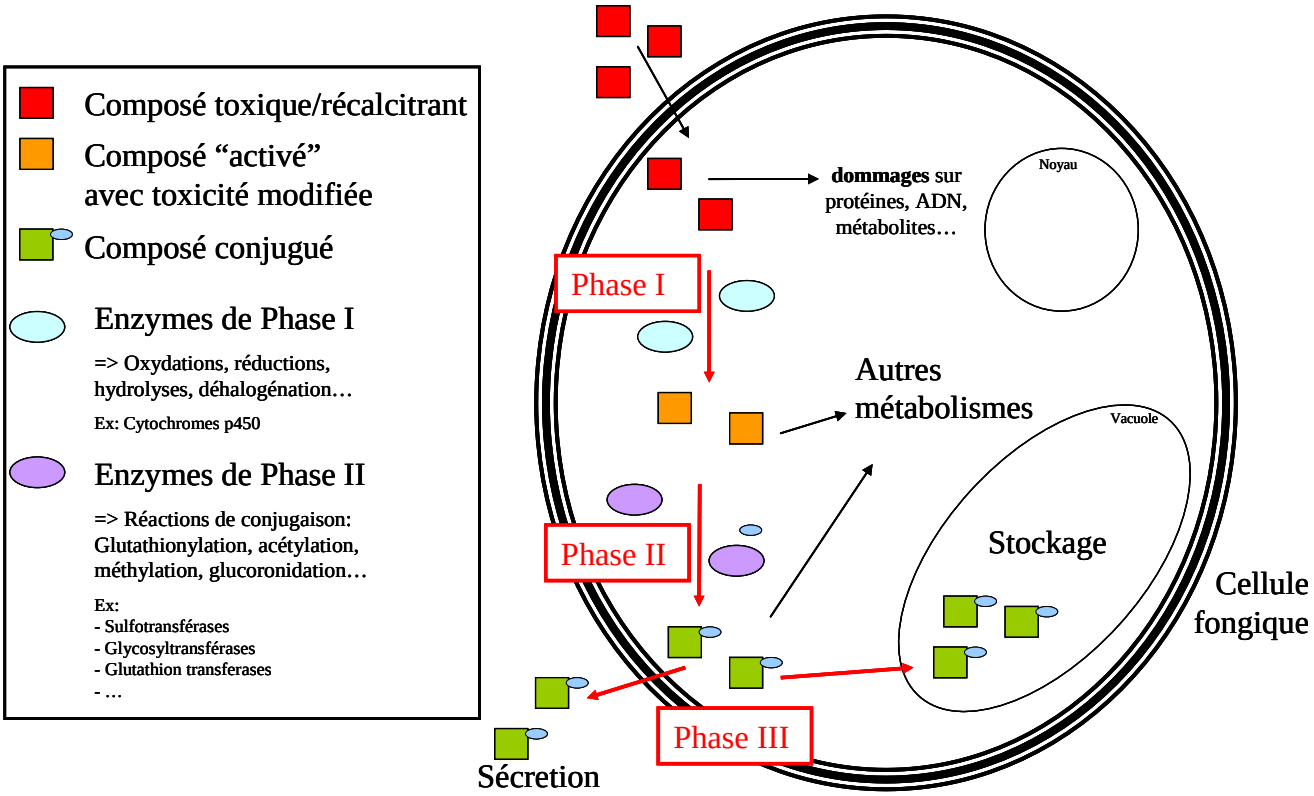


Figure 24 : Système de détoxication en trois phases d'un xénobiotique chez les champignons

B.1. Phase I de détoxication : activation du composé par les cytochromes P450 monooxygénases

L'activation intracellulaire du composé se réalise principalement par des réactions d'oxydoréduction. Parmi les enzymes impliquées dans ce système, la superfamille des cytochromes P450 monooxygénases (CytP450) est très représentée. Ces CytP450 sont capables de catalyser des réactions de nature très variée. Outre les réactions de détoxication de

xénobiotiques, elles peuvent intervenir à différents niveaux dans le métabolisme de l'organisme.

Les CytP450, dont la première structure cristalline a été obtenue en 1985, (Poulos 1985), sont des protéines contenant un hème qui est maintenu par le soufre d'une cystéine avec un environnement structural hautement conservé. Elles furent d'abord divisées en quatre classes selon le mécanisme de transfert d'électrons du NAD(P)H au site catalytique. Les protéines de la classe I nécessitent à la fois une réductase à FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) et une rédoxine fer-soufre. Celles de la classe II nécessitent seulement une P450-oxydoréductase (POR) contenant du FAD ou du FMN. Les enzymes de la classe III sont dites « autosuffisantes » car elles ne nécessitent pas de donneur d'électron et enfin, celles de la classe IV reçoivent directement les électrons du NAD(P)H. Les cytochromes des classes I et II de tous les organismes sont impliqués dans la détoxication des xénobiotiques (Werck-Reichhart 2000). Cette classification a été reconsidérée en tenant compte des avancées fonctionnelles sur les CytP450 et met en évidence l'existence de 10 classes (Hannemann 2007). Les champignons ne possèderaient que les classes II, VIII et IX de CytP450 (Hannemann 2007; Črešnar 2011).

Ainsi, un CytP450 utilise des électrons issus du NADH et du dioxygène dont un des atomes est ajouté sur le substrat, ce qui a qualifié ces enzymes de monooxygénases (Werck-Reichhart 2000; Bernhardt 2006). Cet oxygène peut par exemple être ajouté sous forme de radical hydroxyle. Les CytP450 catalysent généralement la réaction globale suivante :

$$RH + O_2 + NAD(P)H + H^+ \rightarrow ROH + H_2O + NAD(P)^+$$

Le transfert d'électron se fait souvent par une réductase. Cependant, certains cytochromes seraient capables d'accepter des électrons du cytochrome b_5 ou encore de la ferrédoxine mitochondriale. Cependant, ces mécanismes ne sont pas encore bien compris (Bernhardt 2006).

La première partie de la réaction a été très étudiée et se réalise généralement suivant les étapes illustrées dans la Figure 25 : la première correspond à la liaison au substrat (A) sur l'enzyme ferrique entraînant des changements structuraux résultant en la dissociation de la molécule d'eau préalablement coordonnée (2). Ces changements facilitent la réduction à un électron du complexe grâce au NAD(P)H et à la réductase (B), générant une enzyme à centre ferreux (3). La troisième étape amène à la formation d'un complexe superoxyde (4) par la liaison d'oxygène moléculaire sur le fer (C), suivie d'une deuxième réduction à un électron

(D) amenant à la formation d'une espèce peroxoferrique (5). Celle-ci se trouve ensuite protonnée (E) résultant en un complexe hydroperoxoferrique (6), puis le groupement distal OH est protonné (F) entraînant la libération d'une molécule d'eau et la formation du « composé I » très réactif (7) qui soustrait l'hydrogène du substrat (G) formant le « complexe II » et le substrat sous forme radicalaire (8) également très réactifs. Le substrat est donc ensuite spontanément hydroxylé (H) puis libéré (I) ramenant l'enzyme à son état initial (1) (Werck-Reichhart 2000; Isin 2007; Krest 2013).

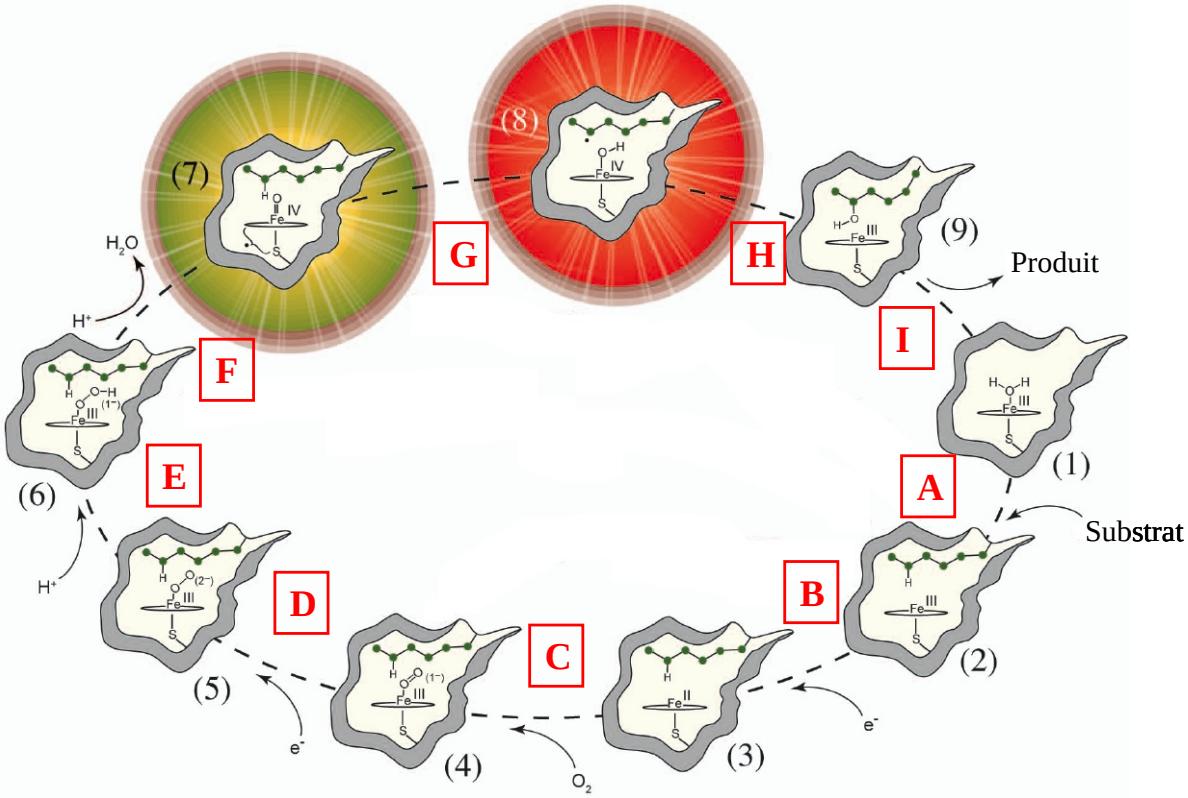


Figure 25 : Mécanisme catalytique des CytP450 : réaction d'hydroxylation (adapté de Krest, 2013)

Ainsi, plusieurs types de réactions peuvent être observés :

L'hydroxylation

Il s'agit de la réaction la plus fréquente de la phase I et consiste en l'ajout d'un groupement hydroxyle sur une molécule donnée, souvent aromatique (exemple : transformation du benzène en phénol). Le mécanisme détaillé Figure 25 peut se résumer comme indiqué Figure 26 :

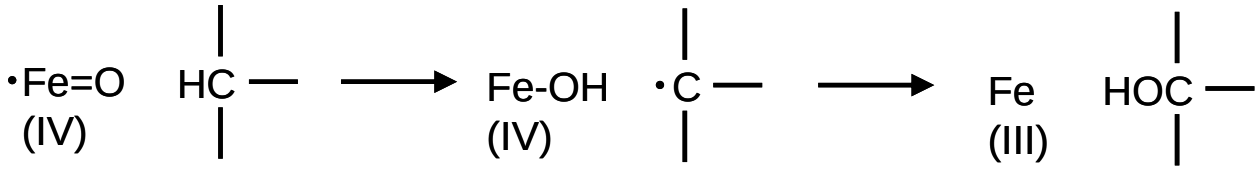


Figure 26 : Mécanisme général d'une réaction d'hydroxylation

L'époxydation

Cette réaction possède un mécanisme équivalent impliquant le NAD(P)H avec l'addition d'un oxygène sur la double liaison d'une molécule, créant un pont époxyde et pouvant être ensuite hydroxylé (Figure 27). Elle peut concerner des alkènes et des acides gras insaturés mais aussi des molécules aromatiques polycycliques (Isin 2007).

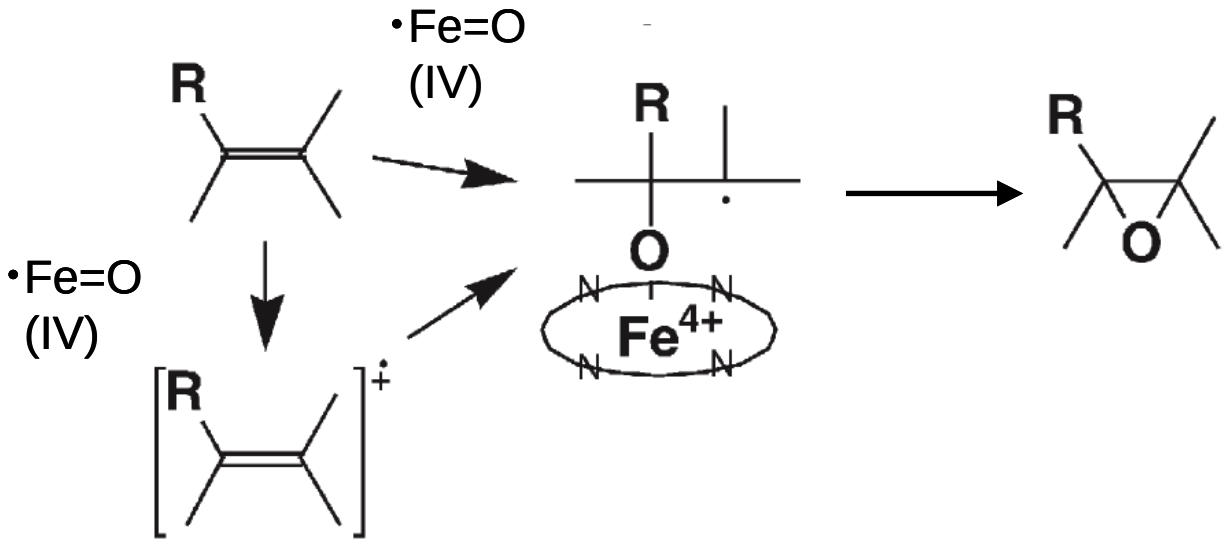


Figure 27 : Mécanisme général d'une réaction d'époxydation (Adapté de Isin, 2007)

L'oxydation

Egalement fréquente, cette réaction consiste, par le même mécanisme, en l'oxydation de deux carbones voisins conduisant à la rupture de la molécule au niveau de ces carbones conduisant ainsi à une forme aldéhyde ou cétone.

Le système enzymatique de phase I peut également procéder en la désalkylation, la sulfoxydation, la désamination, la réduction, la déshalogénation ou encore l'hydrolyse des molécules. Les CytP450 étant des protéines versatiles, ils peuvent catalyser de nombreuses autres réactions, parfois plus complexes (Bernhardt 2006; Isin 2007; Monti 2011).

De ce fait, de nombreuses recherches ont été menées pour identifier des substrats spécifiques voire améliorer la stabilité des CytP450 par génie protéique.

La phase I génère ainsi des molécules dont la toxicité est modifiée. Parfois, les molécules engendrées sont plus toxiques que la molécule initiale. Si ces molécules ne sont pas prises en charge rapidement par les enzymes de la phase II, elles peuvent causer des dommages aux protéines, aux ARN ou encore à l'ADN au sein de la cellule.

B.2. Phase II de détoxication : étape de conjugaison

La phase II prend en charge les composés toxiques activés de la phase précédente. Elle se traduit par la conjugaison d'un groupement spécifique sur ces molécules leur conférant des propriétés chimiques différentes. Les substrats conjugués sont plutôt hydrophiles et la nature du groupement conjugué détermine le type de réaction en jeu :

- La glucuronoconjugaison ou glucuronidation consiste en l'ajout par les UDP-glucuronyl transférases d'un groupement acide UDP-β-glucuronique, un dérivé du glucose (Bock 1979). L'addition d'autres oses comme le xylose peuvent également avoir lieu. Sur les composés hydroxylés, la réaction suit le mécanisme :

$$\text{R-OH + acide UDP glucuronique} \rightarrow \text{RO-glucuronide + UDP}$$

- La sulfoconjugaison ou sulfatation consiste en l'ajout par des sulfotransférases du groupement sulfuryl grâce au coenzyme phosphoadénosine phophosulfate (PAPS) (Klaassen 1997). La réaction peut se traduire ainsi :

$$\text{PAPS + R-OH} \rightarrow \text{PAP + R-OSO}_3^-$$

- La méthylation consiste en l'ajout par des méthyltransférases du radical méthyl grâce au coenzyme S-adénosylméthionine (SAM) (Borchardt 1980). L'existence d'O-méthyltransférases a été par exemple mise en évidence chez *P. chrysosporium* (Jeffers 1997). Lors d'O-méthylations, le groupement méthyl est additionné à l'oxygène d'un groupement hydroxyle, engendrant une fonction O-méthyl selon la réaction :

$$\text{R-OH + SAM} \rightarrow \text{R-OCH}_3 \text{ + S-adénosylhomocystéine.}$$

- L'acétylation, qui consiste en l'ajout par des N-acétyl transférases de groupement acétyl, substituant généralement un hydrogène d'une fonction amine, grâce au coenzyme (CoA) acétyl-CoA (Butcher 2002).

$$\text{R-NH}_2 \text{ + acétyl-CoA} \rightarrow \text{R-NH-COCH}_3 \text{ + CoA-SH}$$

- La glutathionylation ou conjugaison du glutathion (GSH), qui consiste en l'ajout du tripeptide glutathion (γ-L-Glutamyl-L-cystéinylglycine) par les glutathion transférases,

résultant en un composé glutathionylé. Plus de détails sont donnés dans la partie consacrée aux glutathion transférases.

Il existe d'autres réactions de conjugaison telles que la glycoconjugaison (ajout de glycine sur des xénobiotiques souvent aromatiques) ou encore la glutamoconjugaison (ajout de glutamine sur certains métabolites).

Ainsi, généralement, le composé trouve sa solubilité augmentée et sa toxicité réduite permettant son entrée en phase III, bien qu'il existe de rares cas où il se retrouve moins soluble ou plus toxique.

Il arrive aussi parfois que lors de son arrivée dans la cellule ou lors de sa génération, le xénobiotique possède déjà un groupe fonctionnel lui permettant d'entrer directement en phase II.

B.3. Phase III : Elimination / neutralisation du composé

Du fait de la modification de leurs propriétés physicochimiques, les composés conjugués peuvent ensuite être excrétés ou bien stockés dans des compartiments cellulaires où ils ne perturbent donc plus le bon fonctionnement de la cellule. En effet, l'augmentation de la concentration intracellulaire du produit conjugué peut parfois inhiber l'activité des enzymes de conjugaison par rétroaction. Ainsi, leur compartimentation ou leur excrétion s'avère donc nécessaire (Coleman 1997). Cependant, de part leur caractère hydrophile et leur état d'ionisation dépendant du pH de la cellule, leur diffusion à travers les membranes n'est en général pas possible. Leur passage implique donc des transporteurs membranaires particuliers de type Multi-Drug Resistance (MDR) qui prennent en charge les xénobiotiques conjugués. Il s'agit de glycoprotéines membranaires ayant un rôle de transporteurs de type antiport, dépendants d'énergie, généralement grâce à l'hydrolyse de l'ATP, et qui génèrent donc une diminution de la concentration intracellulaire de xénobiotique. Ainsi, parmi les transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette), des protéines associées Multi Drug Resistance (MRP) peuvent fonctionner comme transporteurs de conjugués glutathionylés mais aussi glucuronidés et sulfatés (Jedlitschky 1996).

B.4. La détoxication chez *Phanerochaete chrysosporium*

Les études de la détoxication chez *P. chrysosporium* ont principalement focalisé sur les systèmes extracellulaires et sur les CytP450, du fait de leur haut potentiel en bioremédiation et de leur forte représentativité au sein du génome.

Parmi les basidiomycètes, la taille des P450omes varie de 5 CytP450 chez la levure pathogène *Cryptoccocus* à plus de 300 *chez Moniliophthora perniciosa et Postia placenta.* Les champignons mycorhiziens et les dégradeurs du bois ont un P450ome étendu (Črešnar 2011). L'analyse du génome de *P. chrysosporium* a révélé l'existence de 154 gènes de CytP450 (dont des pseudogènes), représentant 1% de son génome (Hirosue 2011; Syed 2012). La dernière répartition proposée identifie 34 familles présentées dans le Tableau 1 (Syed 2012; Ichinose 2013).

Famille	Nombre de gènes	Famille	Nombre de gènes
CYP51	1	CYP5143	2
CYP53	1	CYP5144	35
CYP61	1	CYP5145	3
CYP63	7	CYP5146	6
CYP502	1	CYP5147	6
CYP505	7	CYP5148	2
CYP512	15	CYP5149	1
CYP5035	13	CYP5150	6
CYP5036	5	CYP5151	1
CYP5037	6	CYP5152	2
CYP5136	5	CYP5153	1
CYP5137	2	CYP5154	1
CYP5138	1	CYP5155	1
CYP5139	1	CYP5156	1
CYP5140	1	CYP5157	1
CYP5141	8	CYP5158	2
CYP5142	7	CYP5345	1

Tableau 1 : Nombre de gènes et familles de CytP450 de *P. chrysosporium* (Ichinose 2013).

Les cytochrome P450 monooxygénases d'un organisme donné peuvent être classés en sous familles (plus de 55% d'identité) désignées par des lettres. La notion de « clan » a également été introduite de façon à permettre une classification plus générale en prenant en compte les CytP450 d'autres d'organismes. Celle-ci est déterminée par les similarités protéiques (Nelson 1998). 10 clans ont ainsi été identifiés chez *P. chrysosporium*, représentés en couleur sur la Figure 28.

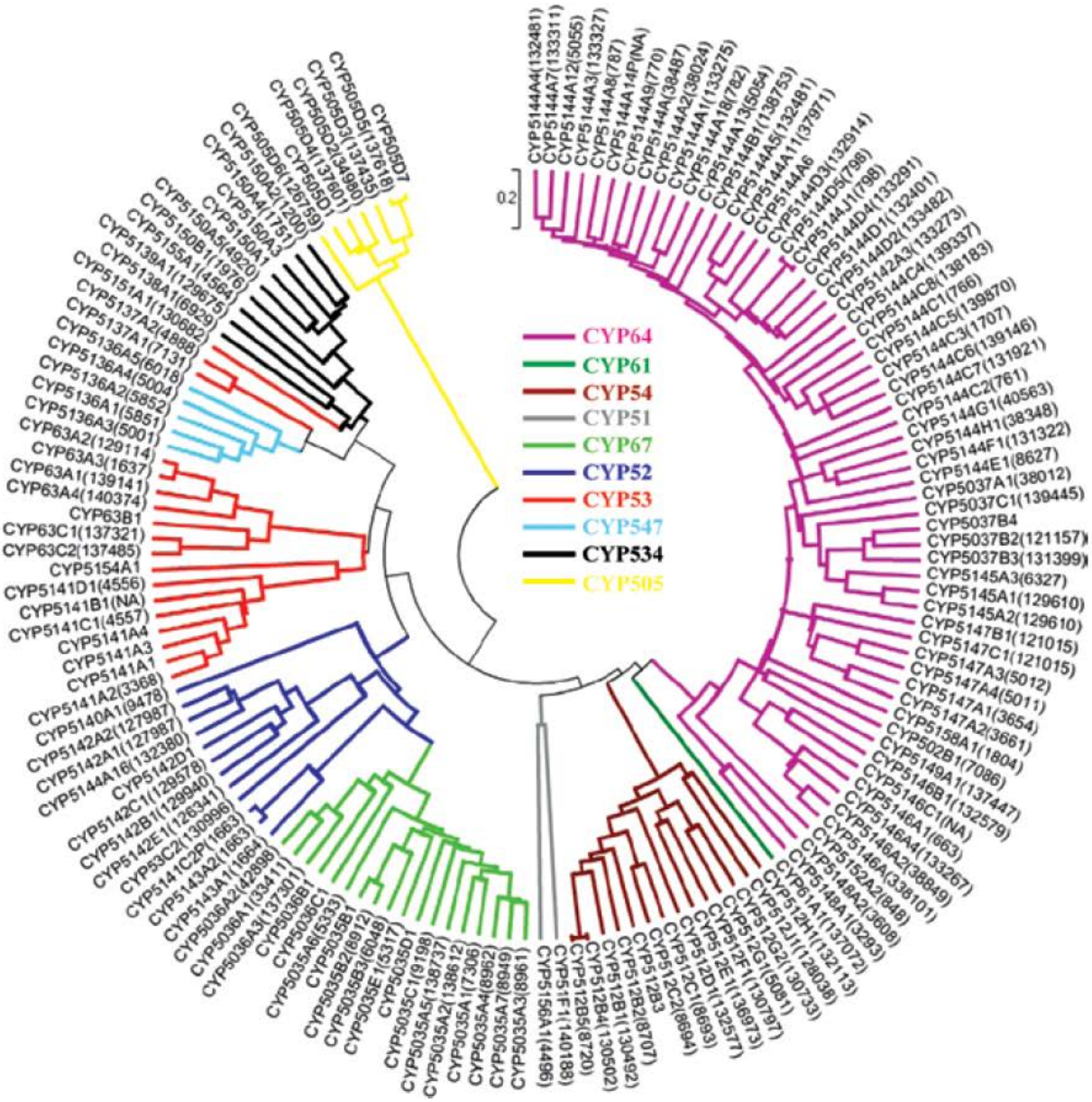


Figure 28 : Arbre phylogénétique du P450ome de *P. chrysosporium* (Syed 2012). Entre parenthèses les numéros d'identification des protéines disponibles dans la base de données du Joint Genome Institut (JGI). En couleur, les clans correspondants.

D'un point de vue de l'organisation génomique, la majorité des gènes appartenant à la même famille est présente sur le même scaffold (Doddapaneni 2005). De même, l'organisation des introns et exons est plutôt conservée comme chez les familles CYP63 et CYP505. L'extension du P450ome de *P. chrysosporium* résulte d'évènements de duplications, de translocations mais aussi de transfert horizontal de gènes (Doddapaneni 2005; Yadav 2006; Syed 2012).

Les représentants de la famille CYP505 possèdent des séquences particulières puisqu'elles correspondent à des protéines fusionnées oxydoréductases-P450 dites

« P450foxy ». Ces protéines contiennent des domaines fonctionnels FAD et NADPH (Doddapaneni 2005). Du fait de leur présence chez d'autres basidiomycètes et chez des ascomycètes, il a été suggéré pour les P450foxy l'existence d'un ancêtre commun qui précède la séparation ascomycètes/basidiomycètes (Berbee 1993).

Les gènes codant les CytP450 chez *P. chrysosporium* sont tous exprimés; 27 présentent un niveau d'expression élevé, que le milieu soit riche ou limité en nutriments (Doddapaneni 2005). Cependant, une étude sur les gènes de la famille CYP63 indique des profils d'expression différents selon la nature du substrat malgré leur grande conservation et leur place en tandem au sein du génome (Doddapaneni 2004; Doddapaneni 2005). De même, 18 gènes codant des CytP450 sont induits en réponse au nonylphénol (un polluant perturbateur endocrinien) et particulièrement 2 gènes de la famille CYP5136 qui sont surexprimés plus de 160 fois (Subramanian 2009).

A propos des partenaires de transfert d'électron, un seul gène code une P450 oxydoréductase (POR, EC 1.6.2.4) qui est NADPH-dépendante possèdant des domaines FAD et FMN. Ceci est plutôt surprenant vu le grand nombre de CytP450 présents au sein du génome. Un mécanisme alternatif de transfert d'électron aux CytP450 pourrait également être sollicité via le complexe cytochrome b5 réductase - cytochrome b5 (cyt b5r - cyt b5) (Subramanian 2010). En effet, le cyt b5r est capable de réduire le cyt b5 avec une spécificité stricte envers les NADH comme donneur d'électron (Syed 2011). Ce modèle a été testé sur la CYP5150A2 lors de l'hydroxylation de l'acide 4-propylbenzoïque (PBA), démontrant le rôle de la POR dans la réaction. L'ajout de cyt b5 augmente l'efficacité du système. De même, le complexe cyt b5r-cyt b5 seul est également capable de réaliser le rôle de la POR (Ichinose 2012).

L'analyse fonctionnelle des CytP450 de *P. chrysosporium* a été menée par expression hétérologue dans la levure de façon à identifier les capacités des CytP450 à transformer un composé donné. Parmi ceux-ci, des stéroïdes, des composés chimiques, ainsi que des composés issus de plante ont pu être métabolisés (Hirosue 2011), (Tableau 2).

Substrats	Réaction	PcCytP450 identifiés
Stéroïdes		
Testostérone	2*β*-Hydroxylation	CYP5136A1, CYP5136A3, CYP5141C1, CYP5144J1
	6*α*-Hydroxylation	CYP512E1
	6*β*-Hydroxylation	CYP512C1, CYP512E1, CYP512F1, CYP512G2
	7*β*-Hydroxylation	CYP5136A3
	11*β*-Hydroxylation	CYP512C1, CYP512G2, CYP5136A1, CYP5136A3, CYP5141C1, CYP5147A3, CYP5150A2
	12*β*-Hydroxylation	CYP512E1, CYP512G2, CYP5136A3, CYP5144J1
Progestérone	non caractérisée	CYP512C1, CYP512E1, CYP512F1, CYP512G2, CYP5136A1, CYP5136A3, CYP5141C1, CYP5144J1
Composés pétrochimiques		
Carbazole	3-Hydroxylation	CYP502B1, CYP5036A3, CYP5136A1, CYP5136A3, CYP5141C1, CYP5144A13, CYP5145A3, CYP5150A2
Dibenzofurane	2-Hydroxylation	CYP5136A1, CYP5136A3, CYP5145A3, CYP5150A2
Fluorene	9-Hydroxylation	CYP5136A1, CYP5136A3, CYP5150A2
Dibenzothiophène	S-Oxydation	CYP502B1, CYP512G2, CYP5136A1, CYP5136A3, CYP5139A1, CYP5144A13, CYP5145A3, CYP5147A1, CYP5147A3, CYP5150A2
	2-Hydroxylation	CYP5136A1, CYP5136A3, CYP5145A3, CYP5150A2
Biphényle	4-Hydroxylation	CYP5136A1, CYP5138A1, CYP5144A10, CYP5145A3, CYP5150A2
Naphtalène	1-Hydroxylation	CYP5036A3, CYP5136A1, CYP5136A3, CYP5138A1, CYP5139A1, CYP5141C1, CYP5150A2
	2-Hydroxylation	CYP5036A3, CYP5136A1, CYP5136A3, CYP5141C1, CYP5150A2
Pentachlorophénol	Hydroxylation	CYP microsomales
Chlorodibenzo-*p*-dioxine	Hydroxylation	CYP5136A3, CYP5138A1, CYP5145A3, CYP5146A2, CYP5147A3

Tableau 2 : Liste non exhaustive du potentiel catalytique des CytP450 de *P. chrysosporium* (Kasai 2010; Hirosue 2011; Ichinose 2012; Ning 2012; Ichinose 2013).

Substrats	Réaction	PcCytP450 identifiés
Composés issus de végétaux		
7-Ethoxycoumarine	*O*-Déethylation	CYP5037B2, CYP5037B3, CYP5037B4, CYP502B1, CYP5136A1, CYP5136A3, CYP5138A1, CYP5139A1, CYP5141C1, CYP5145A3, CYP5147A1, CYP5147A3, CYP5150A2
	3-Hydroxylation	CYP5136A1, CYP5139A1, CYP5141C1, CYP5147A3
Acide 4-Ethoxybenzoique	*O*-Déethylation	CYP5136A1, CYP5136A3, CYP5150A2
Acide déshydroabietique	non caractérisée	CYP512B1, CYP5035B2, CYP5136A1, CYP5141C1, CYP5150A2, CYP5150B1
Flavone	3'-Hydroxylation non caractérisée pour tous	CYP505D4, CYP5035A5, CYP5136A1, CYP5141C1, CYP5142A2, CYP5147A1, CYP5150A2, CYP5150B1
Composés pharmacochimiques		
Diclofenac	4'-Hydroxylation	CYP5136A1, CYP5150A2, CYP5150B1
Compactin	non caractérisée	CYP5136A3, CYP5144A9
Naproxen	non caractérisée	CYP5035A1, CYP5035A2, CYP5035B2, CYP5136A1, CYP5139A1, CYP5141C1, CYP5150A2

Tableau 2 (suite): Liste non exhaustive du potentiel catalytique des CytP450 de *P. chrysosporium*

Les CytP450 de *P. chrysosporium* sont également capables d'oxyder des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ainsi que des alkylphénols perturbateurs endocriniens (Subramanian 2009; Syed 2011). De plus, le rôle du CYP63A2 dans l'oxydation des HAP de grande masse moléculaire (benzoperylène, benzopyrène, fluoranthène, pyrène), des alkylphénols (à 3, 4, 5, 7, 8, et 9 carbones) et des alkanes (9 à 12 et 15 à 19 carbones) a récemment été démontré (Syed 2010; Syed 2013). D'autres études ont également mis en évidence l'action des CytP450 sur divers substrats par les mêmes types de réaction. Parmi celles-ci, plusieurs acides benzoïques, des dérivés coumariques, du cumène, ou encore certains alcools (Tableau 3) (Matsuzaki 2004).

Substrat	Métabolites
acide benzoïque	acide salicylique acide *p*-hydroxybenzoïque acide vanillique
camphor	4-hydroxycamphor 5- hydroxycamphor hydroxydamphor
1,8-cineol	2- hydroxycineol 3- hydroxycineol
Acide cinnamique	acide *p*-coumarique
acide *p*-coumarique	acide cafféique
coumarine	8- hydroxycoumarin 5- hydroxycoumarin 6- hydroxycoumarin 7- hydroxycoumarin
cumène	hydroxycumène
1,12-dodecanediol	acide 1,12-dodecanedioique
acide *p*-ethoxybenzoïque	*p*-hydroxybenzaldéhyde
7-ethoxycoumarin	7-hydroxycoumarin

Tableau 3 : Transformations de substrats de CytP450 par *P. chrysosporium* et leurs produits, en conditions de culture ligninolytiques (adapté de Matsuzaki, 2004).

Actuellement, les études fonctionnelles sur les CytP450 fongiques sont en plein essor du fait de leur potentiel biotechnologique très important, notamment pour la dégradation de polluants de nature diverse.

Alors que de nombreuses études ont porté sur les enzymes de la phase I de détoxication chez les champignons, peu ont caractérisé l'importance des systèmes enzymatiques de la phase II.

V. Les Glutathion Transférases (GST)

Les GST sont des enzymes (EC 2.5.1.18) de phase II du processus intracellulaire de détoxication. Elles interviennent principalement dans des réactions de conjugaison du glutathion (GSH) sur des molécules toxiques, généralement hydrophobes, par attaque nucléophile sur un centre électrophile (carbone, azote ou soufre). Leur action a principalement pour but de rendre ces molécules plus hydrosolubles, permettant leur excrétion via des acteurs de la phase III de détoxication ou leur séquestration dans des compartiments cellulaires comme les vacuoles (Coleman 1997; Sheehan 2001).

A. Historique et classification

Leur découverte date de 1961 lors de la mise en évidence de la conjugaison enzymatique de glutathion avec des composés aromatiques halogénés dans des extraits de foie de rat (Booth 1961). Elles ont d'abord été nommées selon le type de substrat catalysé, originellement GSH S-aryltransférases. Cependant, en 1974, Clark et ses collaborateurs ont découvert que le 1,2-chloro-4-dinitrobenzène (CDNB) était un substrat partagé par plusieurs de ces enzymes, ce qui a remis en cause la nomenclature utilisée pour les désigner. Une dénomination à trois lettres « GST » en référence à l'appellation « Glutathion-S-Transférase » a donc été adoptée (Habig 1974). Cependant, la commission enzyme de l'union internationale de biochimie et de biologie moléculaire (E.C.I.U.B.M.B.) recommande plutôt d'utiliser la dénomination « Glutathion Transférase » tout en gardant l'acronyme GST. A savoir que les termes « lyase » ou encore « isomérase » pourraient être plus appropriés pour certaines de ces enzymes du fait de l'éventail de fonctions que les GST peuvent accomplir (Fernandez-Canon 1998; Johansson 2001).

La superfamille des GST étant très répandue dans le monde du vivant, les isoformes ont été d'abord subdivisées en trois groupes selon leur localisation :

- Les GST microsomales, (mGST), maintenant appelées MAPEG pour « Membrane Associated Proteins in Eicosanoids and Glutathione metabolism » (Jakobsson 1999), sont présentes dans la plupart des organismes tels que les plantes, les animaux, les bactéries et les champignons (Jakobsson 2000; Bresell 2005). La première mGST caractérisée fut la MGST1 humaine capable de réaliser des réactions de conjugaison du glutathion sur des composés halogénés mais également de réduire des hydroperoxides (Morgenstern 1982; Morgenstern 1983; Andersson 1994; Mosialou 1995). De façon plus générale, ces enzymes sont impliquées

dans la synthèse des eicosanoïdes, leukotriènes et prostaglandines dépendamment du glutathion en réalisant des réactions telles que des conjugaisons ou des isomérisations (Frova 2006). Les mGST ont d'abord été réparties en 4 groupes appelés I, II, III et IV basés sur des alignements de séquences (Jakobsson 2000) puis, les MAPEG ont été distribuées en six familles: 1, 2, 3, leukotriène C_4 synthase (LTC_4), protéine activante 5-lipoxygénase (FLAP) et prostaglandine E synthase. En 2006, 131 MAPEG ont été identifiées grâce aux outils informatiques dont 52 séquences procaryotes, 103 eucaryotes (Bresell 2005; Frova 2006). Les protéines MAPEG ont des séquences plus courtes que la plupart des GST et possèdent a priori quatre régions transmembranaires (Schmidt-Krey 2000; Schmidt-Krey 2004; Bresell 2005). Les parties N et C terminales sont situées dans le lumen alors que les sites potentiels de fixation du GSH et du substrat se trouvent dans le cytosol (Lam 1997; Busenlehner 2004).

- Les GST kappa (GSTK), aussi appelées mitochondriales ont initialement été isolées dans la mitochondrie de cellules de foie de rat (Harris 1991) et peuvent également être présentes dans les peroxysomes mais pas dans le cytoplasme (Jowsey 2003; Morel 2004; Morel 2011). Il s'agit d'une famille de protéines ayant des orthologues chez les bactéries et les eucaryotes. Elles se distinguent des autres GST du fait de leur structure et de leur localisation bien qu'elles puissent réagir avec des substrats modèles de GST par des activités de type peroxydase et de conjugaison. Initialement classées avec d'autres GST (de la classe théta) de part leur séquence primaire et leur état d'oligomérisation, la structure tridimensionnelle de la protéine de rat ainsi que les caractérisations moléculaires et biochimiques des enzymes murines et humaines ont permis d'identifier cette nouvelle classe kappa (Pemble 1996; Jowsey 2003; Ladner 2004; Morel 2004; Robinson 2004; Li 2005). Il a également été montré que les GSTK présentes chez *Caenorhabditis elegans* sont impliquées dans le métabolisme énergétique et lipidique, conformément à leur localisation (Petit 2009). Les GST kappa pourraient également jouer un rôle clé dans la régulation de la biosynthèse et la multimérisation d'adiponectine avec une action dans le repliement et l'assemblage des protéines (Liu 2008). De plus, un lien entre leur expression, la sécrétion d'insuline et la mise en place des graisses a pu être établi (Gao 2009). La topologie de leur structure secondaire se rapprocherait plus des protéines bactériennes HCCA (2-hydroxychromene-2-carboxylate) isomérase et DsbA (une isomérase de pont disulfide) que des autres types de GST (Robinson 2004; Hayes 2005; Frova 2006).

- Les GST cytosoliques (cGST) forment la famille la plus abondante et la plus étudiée. Des isoformes sont présentes dans toutes les classes du vivant, le plus souvent comptant plus d'une dizaine de membres dans chaque espèce. Elles sont généralement solubles et

majoritairement présentes dans le cytoplasme mais peuvent également se trouver dans le noyau, les mitochondries et/ou les péroxysomes, souvent suite à une étape d'adressage. Leur classification repose d'abord sur le pourcentage d'identité de séquence peptidique. En effet, lorsque deux GST partagent plus de 40% d'identité, elles appartiennent à la même classe contrairement à celles ayant moins de 25% d'identité (Hayes 2005). Entre ces deux pourcentages, d'autres critères permettent d'affiner la classification, notamment la prise en compte de la structure physique des gènes (incluant le nombre d'introns et d'exons ainsi que leur taille), leurs propriétés immunoréactives (Pickett 1989) leurs propriétés biochimiques et structurales. Les différentes classes, ainsi que les taxons dans lesquels elles se trouvent, sont présentés dans le Tableau 4 (McGoldrick 2005; Frova 2006; Morel 2009; Meux 2011; Oakley 2011; Mathieu 2012).

Chaque taxon possède généralement au moins une classe commune à d'autres taxons, plus des classes spécifiques. Par exemple, les classes Zeta, Theta, Omega (GSTO) et Sigma peuvent être retrouvées dans plusieurs règnes, les classes Alfa, Mu et Pi sont présentes uniquement chez les mammifères. De la même façon, la classe Delta ne se trouve que chez les insectes tandis que les classes Tau, Lambda et DHAR sont exclusivement présentes chez les plantes et mousses (Frova 2006; Liu 2012). Les classes Beta, Chi et Eta se trouvent exclusivement chez les bactéries, tandis que les classes GTT, Ure2p, MAK16, EF1Bγ ou GSTFuA (Mathieu 2012) sont spécifiques des microorganismes.

L'étude toujours plus approfondie des GST et la découverte de nouvelles caractéristiques structurales et biochimiques remettent continuellement en cause leur classification. En effet, il arrive que selon leur activité, certaines enzymes d'une classe donnée se retrouvent renommées, faisant partie d'une famille fonctionnelle de GST. Par exemple, les tétrachlorohydroquinone déhalogénases (TCHQ) bactériennes en tenant compte des alignements multiples de séquences, feraient partie des classes theta et zeta (Anandarajah 2000; Allocati 2009) mais sont également considérées comme constituant une classe à part entière chez les plantes (Edwards 2005). De même, en ajoutant des informations structurales aux informations fonctionnelles, certaines enzymes d'une classe donnée peuvent être réparties dans de nouvelles classes dites structurales. C'est le cas par exemple d'une GST oméga de *P. chrysosporium* montrant une activité S-glutathionyl-*p*-hydroquinone réductase (GHR) avec une structure particulière, qui, faisant partie initialement des GSTO a été placée dans une nouvelle classe structurale appelée GST xi (Meux 2011). La classification est donc loin d'être figée et risque d'évoluer dans les années à venir.

Taxon	**Classes**
Mammifères	Zêta Thêta Oméga Sigma Alpha Mu Pi
Plantes	Zêta Thêta Phi EF1γ *GHR* TCHQD Tau Lambda DHAR
Insectes	Zêta Thêta Oméga Sigma Delta Epsilon
Bactéries	Zêta Thêta GHR TCHQD Ure2p-like Bêta Chi Eta Lig
Champignons	Oméga GHR EF1Bγ Phi *Ure2p* MAK16 GTT1 GTT2 *GSTFuA*
Mousses	Phi DHAR Thêta Zeta Lambda EF1Bγ Ure2p TCHQD Hémérythrin Iota
Poissons	Thêta (T) Pi (P) Alpha (A) Rho
Nématodes	Nu

Tableau 4: Classification des principales GST cytosoliques

Certaines protéines ne sont pas été considérées comme des GST à part entière mais montrent des caractéristiques topologiques et de spécificité de substrat similaires aux GST cytosoliques. C'est le cas des canaux intracellulaires ioniques de chlore (CLIC) (Harrop 2001; Cromer 2002; Littler 2010), les prostaglandines E synthases microsomales de types 2 (mPGES-2) (Yamada 2005) ainsi que la protéine sspA (Hansen 2005) qui n'a pas d'activité typique de GST et n'est pas capable de fixer du glutathion. De même, les MAK16 et EF1Bγ ont des rôles cellulaires distincts et leurs éventuelles propriétés GST n'ont pas encore été étudiées (McGoldrick 2005).

B. Structure

Malgré des séquences protéiques parfois très divergentes, les structures cristallines de GST résolues à ce jour montrent clairement une architecture tridimentionnelle conservée dans avec des repliements caractéristiques. Les GST ont un poids moléculaire compris entre 23 et 27 kDa correspondant à environ 200-250 acides aminés. L'étude de leur structure a permis de nombreuses avancées dans la compréhension du mécanisme catalytique de ces enzymes ainsi que des informations concernant les bases moléculaires de leur évolution, le tout en lien avec leur capacité de détoxication.

En 1991, la première structure résolue était une GST Pi du porc (pGSTP1-1) (Reinemer 1991). Elle comporte les caractéristiques structurales typiques des GST cytosoliques, c'est-à-dire un domaine N-terminal de type thioredoxine possédant une topologie βαβαββα et un domaine C-terminal composé d'hélices-α (Figure 29).

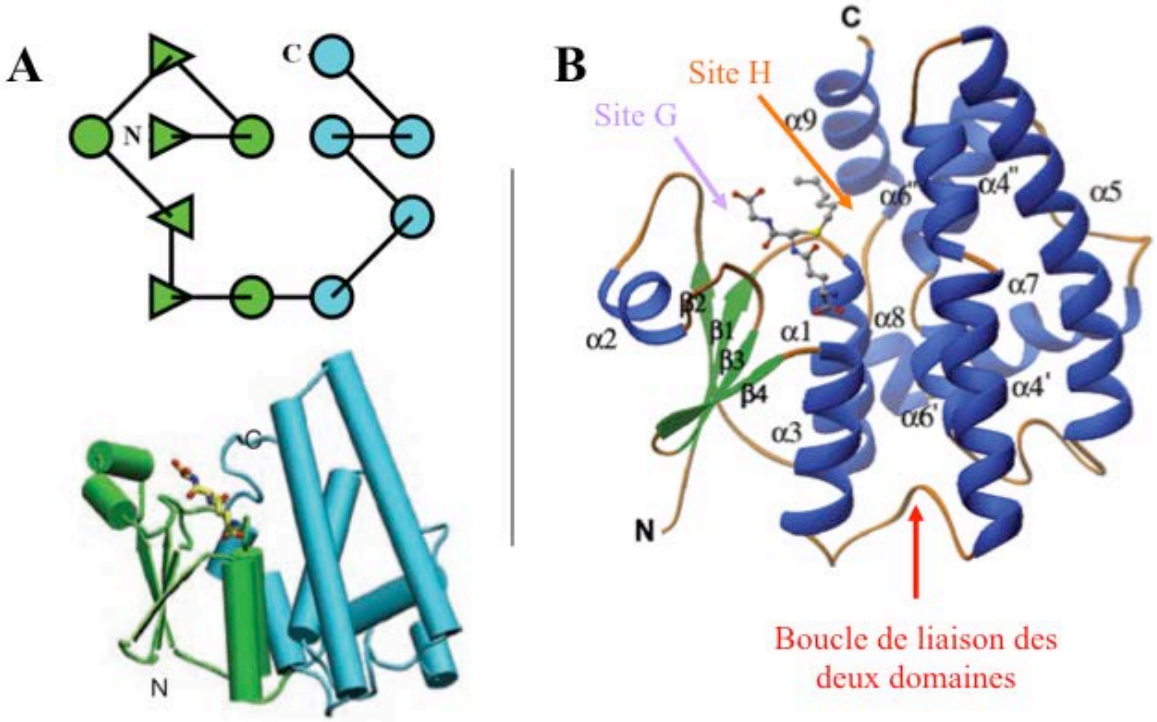


Figure 29A : Topologie et structure tridimensionnelle caractéristique d'un monomère de GST cytosolique. Le domaine thioredoxine $\beta\ \alpha\ \beta\ \alpha\ \beta\ \beta\ \alpha$ est représenté en vert tandis que le domaine hélicoïdal est représenté en bleu (Oakley 2011)

Figure 29B : Structure tridimensionnelle du monomère d'une GST cytosolique tau du blé TaGSTU4. Le domaine thioredoxine $\beta\ \alpha\ \beta\ \alpha\ \beta\ \beta\ \alpha$ est séparé du domaine hélicoïdal par la boucle indiquée (Thom 2002)

Pour la classe kappa, la structure tridimensionnelle est fortement similaire si ce n'est que le domaine α-hélical est inséré entre l'hélice α2 et le feuillet β3 (Ladner 2004; Li 2005) (Figure 30).

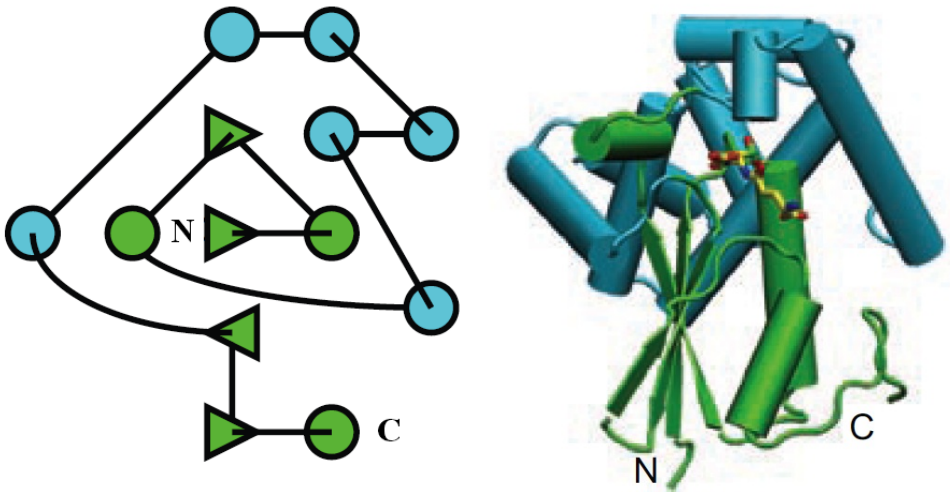


Figure 30 : Topologie et structure tridimensionnelle caractéristique d'un monomère de GST mitochondriale. Le domaine thioredoxine $\beta\ \alpha\ \beta\ \alpha\ \beta\ \beta\ \alpha$ est représenté en vert tandis que le domaine hélicoïdal, insérée au sein du motif thioredoxine, est représenté en bleu (adapté de Oakley 2011)

Dans ces deux protéines, le site de fixation du GSH pour les activités catalytiques se trouve sur le domaine à repliement de type thioredoxine et est appelé le « site G ». Ce domaine est également appelé « domaine I ». Il est le plus conservé puisqu'il implique les acides aminés à l'origine de la stabilisation du GSH via des liaisons hydrogènes, notamment le motif ββα qui est responsable de la reconnaissance de la partie γ-glutamyl du GSH (Armstrong 1997). De plus, l'acide aminé *cis*-proline se trouvant à l'extrémité N-terminale du feuillet β3 forme des liaisons hydrogène avec le groupement amine du résidu cystéinyl du GSH, et est une interaction fortement conservée parmi les GST cytosoliques et les GST mitochondriales (Oakley 2011). Excepté la variation de la nature des acides aminés dans l'établissement des liaisons hydrogènes, ces propriétés se retrouvent dans toutes les classes. La plus grande différence entre les « sites G » des différentes classes d'enzyme concerne les résidus impliqués dans l'interaction de la protéine avec le soufre du glutathion, notamment l'activation du groupe sulfhydrile par l'abaissement de son pKa, formant l'anion thiolate réactif pouvant ainsi attaquer des substrats électrophiles (Dirr 1994; Armstrong 1997). Les résidus varient en effet selon les classes de GST même si leur positionnement est conservé (Atkinson 2009). Il s'agit le plus communément de sérine ou tyrosine qui possèdent un groupement hydroxyle formant une liaison hydrogène avec l'atome de soufre du glutathion. C'est le cas des classes Alpha/Mu/Pi, Sigma, Theta, Zeta, Delta et Phi/Tau. Lorsqu'il s'agit d'une cystéine, ces GST forment un pont disulfure avec le soufre du GSH entraînant des réactions d'oxydoréduction plutôt que des réactions de conjugaison (Board 2000; Frova 2006). Cela concerne les GST Beta, Lambda/DHAR, et Oméga. Plusieurs études ont pu montrer que la mutagenèse dirigée de l'un de ces acides aminés entraîne une forte diminution de l'activité catalytique de l'enzyme (Kong 1992; Dirr 1994; Tan 1996; Caccuri 1997; Thom 2001).
Le domaine constitué d'hélice-α dans la partie C terminale des GST, également appelé le « domaine II » contient le site de liaison des cosubstrats hydrophobes appelé « site H ». Ce site est constitué d'une crevasse chez les GST cytosoliques entre les domaines N- et C-terminaux (Oakley 2011) et est proche du site G, formant à eux deux le site catalytique. Selon les différentes classes, la variation du nombre d'hélices, la topologie, l'accessibilité d'un point de vue stérique ainsi que la nature des acides aminés contribuent à la reconnaissance des substrats. Le site H présente donc une grande variabilité autant structurale que biochimique et est responsable de la spécificité de substrat entre les différentes enzymes (Wilce 1994; Armstrong 1997).

Les GST sont généralement actives sous forme de dimères, soit homodimère (sous unités identiques), soit hétérodimère (sous unités différentes mais généralement de la même

classe de GST puisque les résidus à leur interface doivent être compatibles (Figure 31) (Hayes 1995).

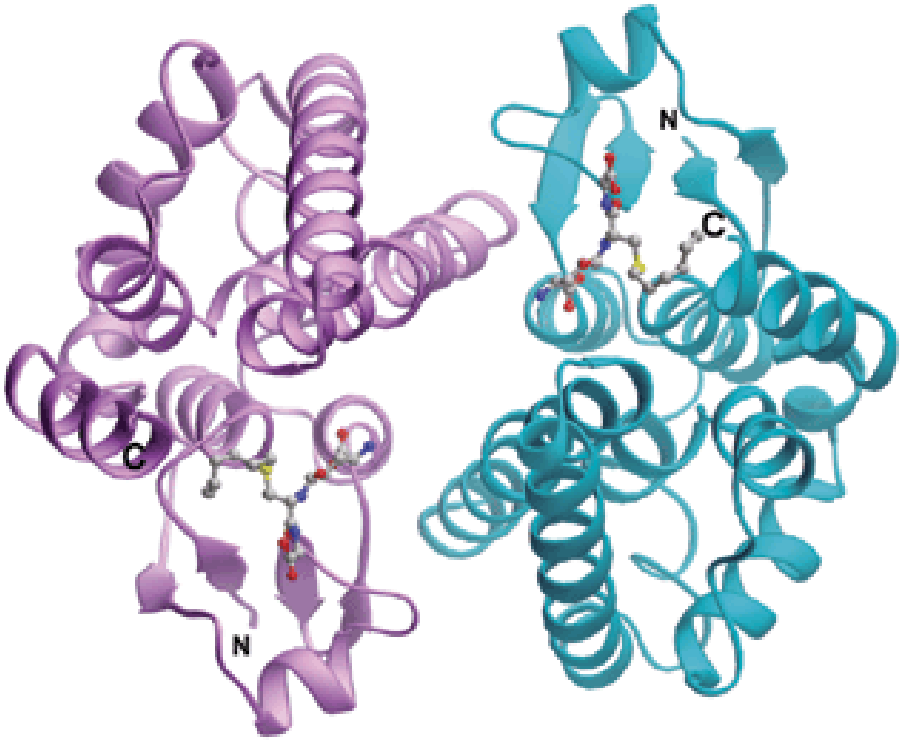


Figure 31 : Structure tridimensionnelle du dimère de la GST tau 4 du blé (TaGSTU4) (Thom 2002)

La structure quaternaire consiste en effet en une interaction entre le domaine I d'une sous unité et le domaine II de l'autre. Cette interaction peut être hydrophile (pour les classes theta, Sigma, Beta, Tau) ou hydrophobe (pour les classes Alpha, Mu, Pi, Omega, Phi) (Frova 2006). Cette dimérisation peut être de grande importance pour la stabilisation de la structure tertiaire de chaque sous-unité (cas de GSTP-1) (Erhardt 1995) mais aussi pour réaliser la coopérativité entre les sous-unités lors de la liaison du glutathion (Caccuri 1999). De même, il a été montré que les deux sites actifs de GSTP1-1 réagissent de façon synergétique (Hegazy 2004). Cependant, la classe Lambda présente de l'activité sous forme monomérique mais pas avec les substrats classiquement utilisés. Elle possède néanmoins une activité thiol-transférase et une structure protéique similaire, la classant tout de même parmi les GST (Dixon 2002). La réductase thiol-dépendante I (TDR1), une GST sous forme de trimère de dimères a également été récemment découverte chez deux protistes parasites (Fyfe 2012), ce qui élargit les possibilités de structures quaternaires que peuvent adopter les GST.

C. Fonctions

Les GST forment une famille d'enzymes ayant une structure à deux domaines décrits ci-dessus et ayant une activité impliquant du glutathion. Leur fonction varie donc autour d'un mécanisme de transfert de glutathion dont le premier rôle caractérisé est la conjugaison de glutathion sur des molécules toxiques de façon à favoriser leur élimination. Néanmoins, des études de caractérisation de plus en plus nombreuses des GST montrent la diversité des fonctions qu'elles peuvent avoir, parfois même au sein d'une même classe de GST. Elles peuvent posséder diverses activités enzymatiques mais aussi des fonctions non-enzymatiques.

C.1. Rôles dans le fonctionnement cellulaire

C.1.a. Transport et séquestration de molécules

La glutathionylation peut être responsable du transport de molécule au sein de la cellule. Elle catalyse la réaction de conjugaison du glutathion et implique un substrat électrophile (RX) qui subit une attaque nucléophile de la part d'un glutathion activé sous forme d'anion thiolate GS^- entraînant le départ du composé X. Le produit est donc glutathionylé. On peut parler d'activité glutathion transférase. Le mécanisme réactionnel général est le suivant :

GSH+ RX -> GS-R+XH (Armstrong 1997)

Le test classique permettant de mettre en évidence cette réaction par spectrophotométrie consiste à conjuguer du glutathion sur du 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) qui a la particularité d'absorber à une longueur d'onde de 340 nm une fois conjugué (Figure 32).

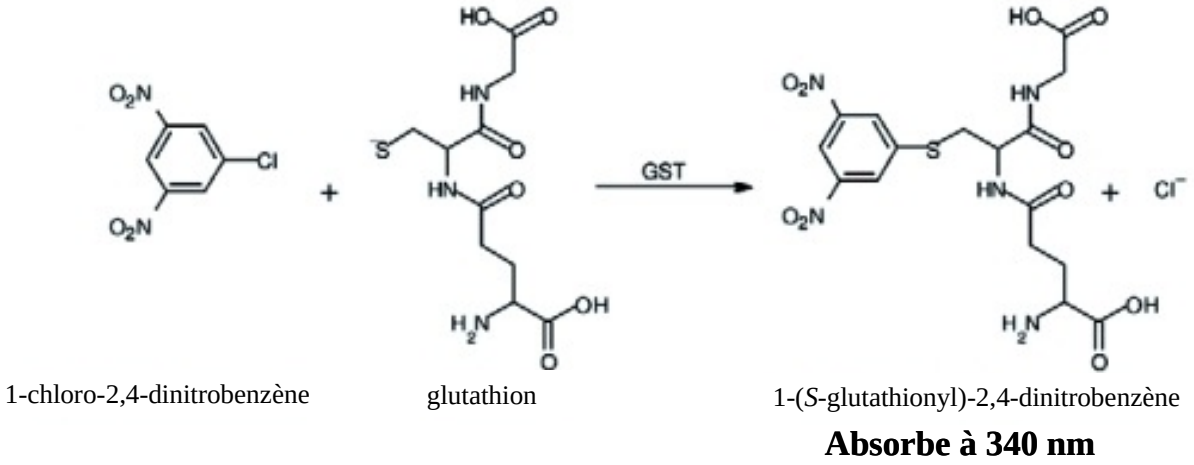


Figure 32 : Réaction de conjugaison de glutathion sur du chlorodinitrobenzène (CDNB)

Les substrats glutathionylés possèdent des propriétés physico-chimiques différentes qui leur permettent d'être pris en charge pour le transport des molécules de la phase III de détoxication.
En effet, il a été montré chez le maïs lors de la synthèse d'anthocyane que la glutathionylation du cyanidin 3-glucoside (C3G) par une GST permettait sa migration dans la vacuole via un transporteur dépendant du glutathion (Alfenito 1998).

Une propriété « ligandine » peut également être attribuée aux GST. Il s'agit d'une activité non-catalytique de fixation de composés sur les GSTs. Elle a notamment été démontrée chez une GST fongique avec la fixation de composés issus de la dégradation du bois tels que le coniferaldéhyde, la vanilline, l'épicatéchine ou encore le syringaldéhyde (Mathieu 2012). Cette activité pourrait également avoir un rôle de prévention contre le stress oxydant qui pourrait être engendré par de tels composés (Dixon 2002).
Des GST de la classe Mu peuvent également intervenir dans le transport d'hème des mitochondries sur son accepteur, un apocytochrome (Senjo 1985).

C.1.b. Régulation

Une GST de tomate a été montrée impliquée dans la régulation de l'apoptose cellulaire chez la levure. En effet, elle est capable d'inhiber Bax, un inducteur d'apoptose qui créé un bouleversement de l'homéostasie cellulaire, notamment les niveaux intracellulaires en glutathion, phospholipides, potentiels redox et membranaire mitochondrial (Kampranis 2000). De même, il a été découvert que l'Ure2p de *S. cerevisiae* est impliquée dans la régulation du catabolisme de l'azote par complexation avec deux facteurs de transcription de gène nécessaires à l'assimilation de sources « non préférées » d'azote (Coschigano 1991; Blinder 1996).

C.1.c. Implication dans le métabolisme

Quelques GST sont également impliquées dans la biosynthèse de molécules. Une activité isomérase a par exemple été observée chez une GST *d'Arabidopsis thaliana* lors de la synthèse du fumarylacetoacetate (Thom 2001) et chez une GST humaine impliquée dans la synthèse d'hormones stéroïdiennes (Johansson 2001).

Quelques GST seulement sont capables réaliser des réactions d'isomérisation de métabolites spécifiques. Un mécanisme a été proposé impliquant la formation transitoire d'un

composé en *cis* glutathionylé présentant un oxygène chargé négativement, stabilisé par un acide aminé positif de la GST. Ce composé transitoire subirait ensuite un réarrangement électronique conduisant à une conformation *trans* énergétiquement plus favorable et la libération du glutathion (Figure 33) (Marsh 2008).

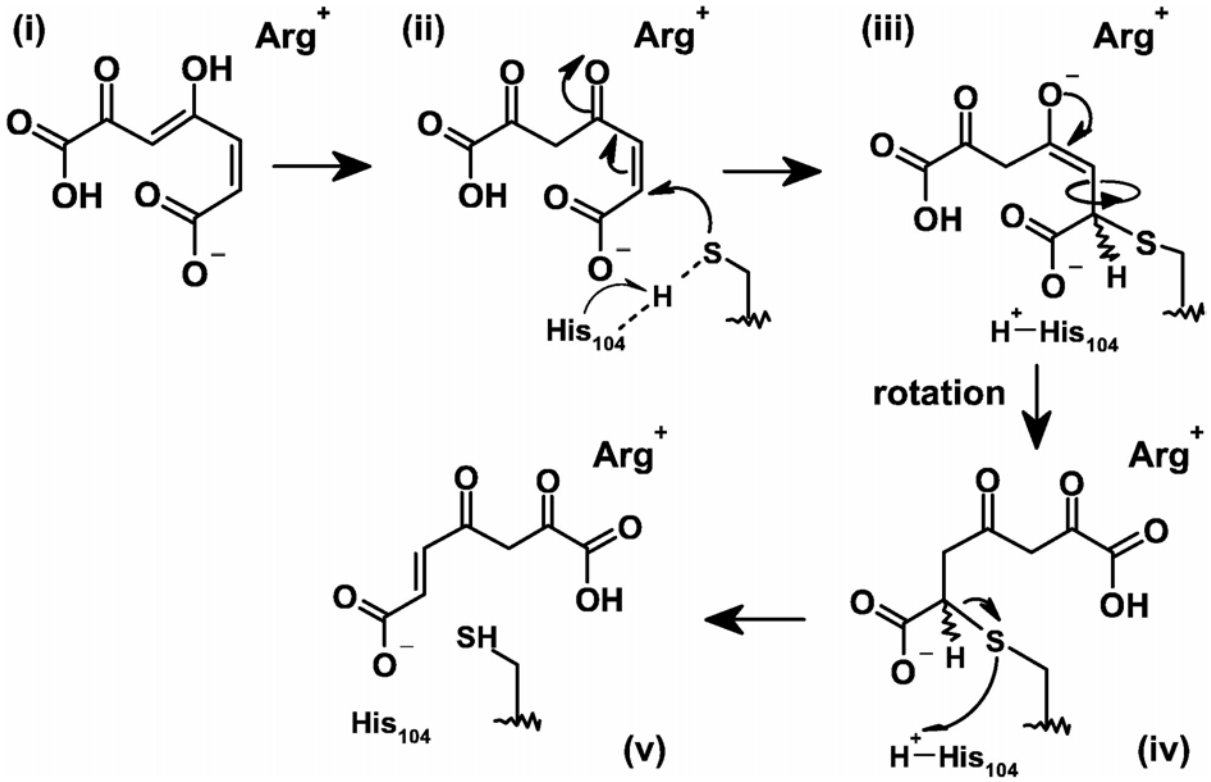


Figure 33 : Mécanisme possible d'isomérisation du maléylpyruvate (Marsh 2008)

De plus, il a été montré qu'une activité isomérase d'une GST Zeta de mammifère catalyse l'avant dernière étape du catabolisme de certains composés aromatiques tels que la phénylalanine et la tyrosine (Fernandez-Canon 1998).

Il est parfois nécessaire de déglutathionyler un substrat grâce à une activité de type réductase, dépendamment du glutathion. Elle est généralement réalisée par les GST à cystéines catalytiques qui attaquent le glutathion du substrat glutathionylé. Le mécanisme général de réaction est le suivant :

R-SG + GSH -> RH + GSSG

Ce type d'activité est également appelé « thiol transférase » ou « déglutathionylation ».

C.2. Détoxication, résistance contre les molécules toxiques

C.2.a. Détoxication de polluants anthropiques

La plupart des polluants anthropiques sont des composés halogénés et une activité de déhalogénation de composés tels que la tetrachlorohydroquinone ou encore le dichlorométhane a pu être observée chez des GST bactériennes (Orser 1993; Leisinger 1994; Vuilleumier 1996) et végétales. Le mécanisme réactionnel se ferait en deux étapes, une étape de glutathionylation (conjugaison de glutathion) par déhalogénation et une seconde étape de déglutathionylation, qui serait spontanée, par réduction ou hydrolyse selon les cas (Figure 34 et 35) (McCarthy 1996). Selon le nombre de groupement halogéné sur une molécule, une GST peut réaliser plusieurs déhalogénations (Xun 1992).

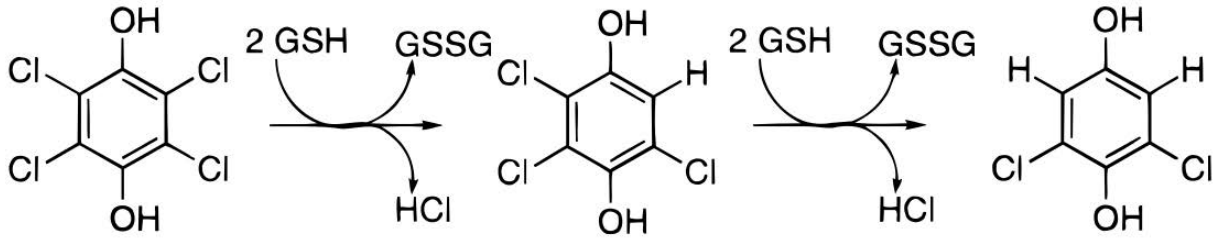


Figure 34 : Réaction de déhalogénation de la tétrachlorohydroquinone (McCarthy 1996)

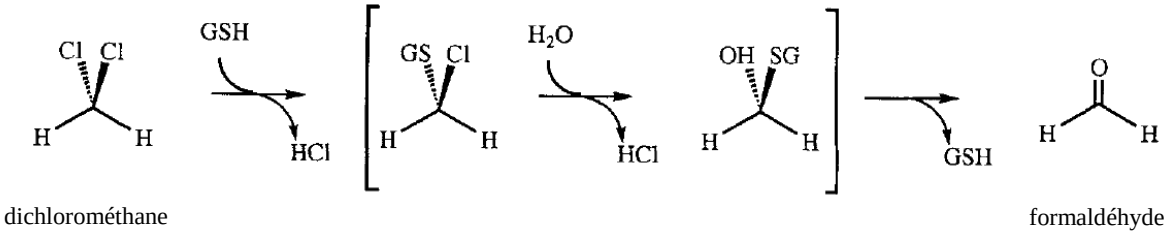


Figure 35 : Réaction de déhalogénation du dichloromethane (adapté de Vuilleumier, 1996).

Certaines formes d'arsenate peuvent également être réduites par les GST de par leur activité réductase (Zakharyan 2005).

Les GST sont capables de détoxifier des composés cancérigènes tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) grâce notamment à des réactions de conjugaison lors de la phase II de détoxication. Par exemple, chez des moules, un lien étroit met en relation l'activité totale de GST selon la concentration de HAP dans l'environnement avec une influence du nombre de cycles de la molécule (Gowland 2002). L'activité d'une GST de mammifère a également été étudiée directement sur quelques HAP, révélant même une spécificité énantiomérique (Sundberg 1997).

C.2.b. Résistance contre les pesticides

Les GST sont impliquées dans la détoxication de nombreuses molécules entrant dans la composition des pesticides tels que l'atrazine, les triazines, les chloroacetamides, les thiocarbamates ou encore les diphenylethers (Frear 1970; Shimabukuro 1971; Frear 1973; Lay 1976; Fuerst 1986; O'Connell 1988). Les réactions se font le plus souvent par déhalogénation lorsqu'un halogène est présent, suivi d'une glutathionylation.

C.2.c. Résistance contre les antibiotiques

La résistance contre des antibiotiques grâce à la GSTB1-1 de la bactérie *Proteus mirabilis* a été démontrée. En effet, la croissance bactérienne avec des antibiotiques est moins affectée lorsque cette GST est surexprimée. De même, une interaction directe entre cette GST et les antibiotiques a pu être mise en évidence par l'inhibition de son activité de conjugaison en leur présence (Perito 1996).

C.2.d. Dégradation de molécules naturelles

Le clivage de liaisons β-aryl éther a été démontré chez des GST bactériennes lors de la biodégradation de la lignine. C'est le cas de LigE, LigG et LigF de *Sphingomonas paucimobilis* (Masai 1993). Ces liaisons étant les plus abondantes dans la structure de la lignine, les GST auraient ici un rôle très important quant au recyclage des molécules organiques au sein de l'écosystème forestier. Les GST pourraient également avoir un rôle essentiel dans la pathogénicité de certains organismes en métabolisant les composés de défense de leurs hôtes.

C.3. Protection contre le stress oxydant

C.3.a. Induction des GST et signalisation cellulaire en réponse à un stress

Les GST peuvent être induites au cours d'un stress pour protéger la cellule. En effet, l'irradiation UV réalisée sur des cellules de persil induit l'expression de la GST1. La surexpression de cette enzyme en présence de glutathion induit elle-même l'activation du promoteur de la chalcone syntase qui est impliquée dans la synthèse de flavonoïdes protecteurs (Loyall 2000). De même, dans des conditions non stressantes, la GST Pi humaine monomérique est associée à la kinase Jun N-terminale (JNK), une kinase impliquée dans la réponse aux stress. Il a été montré que l'ajout d'H_2O_2 ou l'irradiation UV entraîne l'oligomérisation de la GST Pi et sa dissociation de la JNK qui devient opérationnelle (Adler 1999).

C.3.b. Détoxication des composés endogènes issus du stress

Lors d'un stress oxydant, de nombreuses espèces réactives oxygénées (ERO) sont produites, parmi lesquelles se trouvent des peroxydes. Certaines GST peuvent fonctionner comme des peroxydases, limitant ainsi les dommages que peuvent provoquer les ERO au sein de la cellule (Marrs 1996).

Le mécanisme réactionnel général est le suivant, le composé R pouvant être un atome d'hydrogène pour la réduction du peroxyde d'hydrogène :

$$2GSH + R\text{-}OOH \rightarrow GS\text{-}SG + R\text{-}OH + H_2O$$

Elles peuvent également agir sur certains hydroperoxides de lipides ou d'acides gras, créés lors d'un stress oxydant et génotoxiques (Hurst 1998; Yang 2002; Prabhu 2004). C'est le cas par exemple du 4-hydroxynonenal (HNE), impliqué dans la signalisation cellulaire et dont la concentration intracellulaire peut être régulée par les GST par une action de conjugaison avant d'être transporté dans un autre compartiment cellulaire ou en dehors de la cellule (Hiratsuka 2000; Awasthi 2004).

D. Evolution

Du fait de l'analyse de nombreuses séquences de GST mises en relation avec les données biochimiques et structurales disponibles, Carla Frova a proposé en 2006 un schéma évolutif pour les GST et qui est actuellement admis (Frova 2006). Tandis que certains points sont à éclaircir, le schéma proposé semble cohérent au vu des avancées scientifiques. Le raisonnement part du fait que toutes les GST connues ont dans leur structure un motif thioredoxine dont l'architecture tridimensionnelle est hautement conservée. De même, d'autres protéines possèdent ce domaine, telles que les glutarédoxines (Grx), les DsbA et les thioredoxines elles mêmes, toutes capables de catalyser des réactions de type thiol-transférase alors que les peroxydases dépendantes du glutathion et les peroxyredoxines sont plutôt des peroxydes réductases (Martin 1995; Copley 2004). Il semble donc que l'ancêtre commun soit fortement lié à la présence de ce motif.

Le schéma évolutif peut ainsi se subdiviser en deux phases principales (Frova 2006). Lors de la première phase, l'insertion d'un domaine a eu lieu et concerne une partie des protéines de la famille thioredoxine (dont les GST), donnant naissance à la structure tridimensionnelle des GST actuellement connues. Puis la deuxième phase correspondrait à la diversification fonctionnelle et structurale des GST qui donnent naissance aux différentes classes actuellement reconnues (Figure 36).

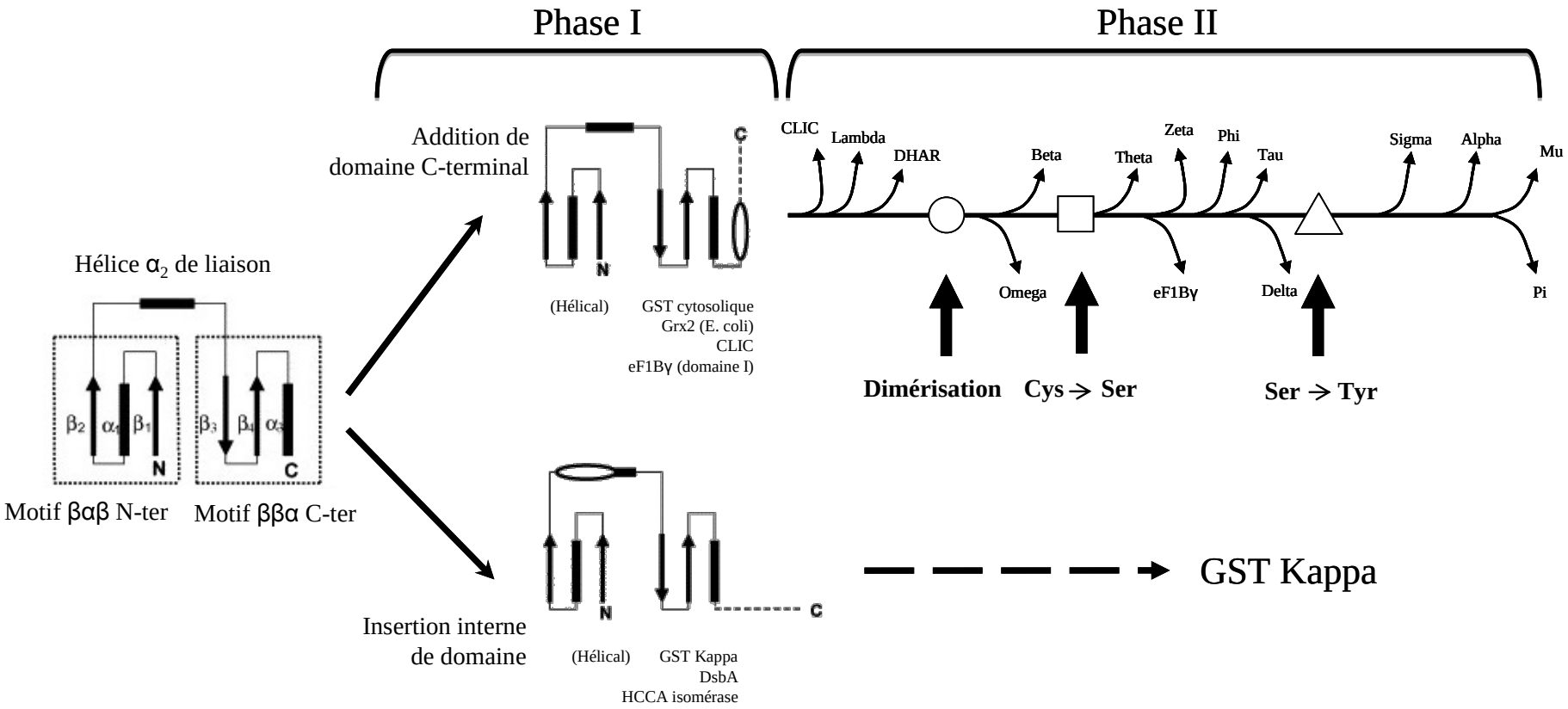


Figure 36 : Schéma adapté de la proposition d'évolution des GST par Frova

Ainsi, au cours de la première phase, le domaine thioredoxine de structure secondaire βαβαββα aurait acquis un domaine supplémentaire constitué principalement d'hélices α. Ce domaine, lorsqu'il est en position C-terminale, donne naissance à une structure de type Grx à partir de laquelle auraient évolué les GST cytosoliques ainsi que d'autres protéines, telles que les CLIC, ou encore les EF1Bγ. Lorsque ce domaine hélicoïdal est inséré au sein du repliement thioredoxine entre le feuillet β2 et α3, la structure obtenue est de type DsbA (une protéine isomérase de pont disulfide) et correspond à celle trouvée chez les protéines HCCA (hydroxychromene carboxylate isomérase), DsbA et chez les GST kappa (Figure 36). Dans ce cas, si ce domaine n'est pas complètement hélicoïdal, la structure peut s'apparenter à celle de glutathion peroxydases et peroxyrédoxines. Ce schéma fait écho à ce que Ladner et Robinson avaient émis comme hypothèse, c'est-à-dire que les GST cytosoliques et les GST kappa auraient évolué indépendamment par des voies parallèles (Figure 36) (Ladner 2004; Robinson 2004) contrairement à ce qu'avaient pensé Armstrong et Sheehan (Armstrong 1997; Sheehan 2001).

Lors de la deuxième phase, l'hypothèse proposant ce schéma d'évolution s'appuie sur la structure quaternaire des GST, sur les acides aminés catalytiques et sur la répartition d'une classe donnée dans le domaine du vivant. Aussi, le schéma n'est pas encore clair au sujet de la classe GST kappa puisque la structure quaternaire (dimère) et l'acide aminé catalytique (sérine) ne sont pas les mêmes que pour la protéine DsbA (monomère, cystéine). La protéine HCCA pourrait être un intermédiaire lors de leur évolution (Robinson 2004) mais la structure n'étant pas encore résolue, il est difficile de conclure à ce sujet. Concernant les GST cytosoliques, il y aurait d'abord une structure monomérique à partir de l'architecture de type Grx qui aurait donné les classes CLIC, Lambda et DHAR. Puis une première étape importante de dimérisation conduisant à la différenciation des GST Beta et Omega. Dans ces cas, une cystéine catalytique, impliquée dans la fixation du GSH, est responsable plutôt d'une activité thiol transférase que de glutathion transférase (sauf les CLIC qui ne forment que des canaux ioniques). Une seconde étape consiste en la mutation de la cystéine catalytique en sérine et concerne les classes Theta, Zeta et eEF1Bγ que l'on retrouve chez tous les eucaryotes, la classe Theta étant supposée être un ancêtre commun du fait de sa présence chez les procaryotes (Pemble 1996). Les classes Phi, Tau et Delta, uniquement retrouvées chez les plantes et insectes, seraient donc apparues plus tard. Puis, lors d'une troisième étape, la sérine catalytique est mutée en tyrosine que l'on retrouve dans les classes Alpha, Mu, Pi et Sigma de mammifères. La classe Sigma aurait divergé plus tôt puisqu'elle est également retrouvée chez

les invertébrés. Ces changements structuraux et d'acides aminés catalytiques ont donc contribué à la diversification d'activité et de spécificité des GST.

Le schéma évolutif a été récemment complété par une voie parallèle intégrant les GHR (glutathionyl hydroquinone réductase), qui présentent un mode de dimérisation atypique dû à la présence d'une boucle supplémentaire (présente aussi chez les GHR bactériennes) ce qui a amené à la définition d'une nouvelle classe structurale appelée Xi (Meux 2011; Green 2012) (Figure 37).

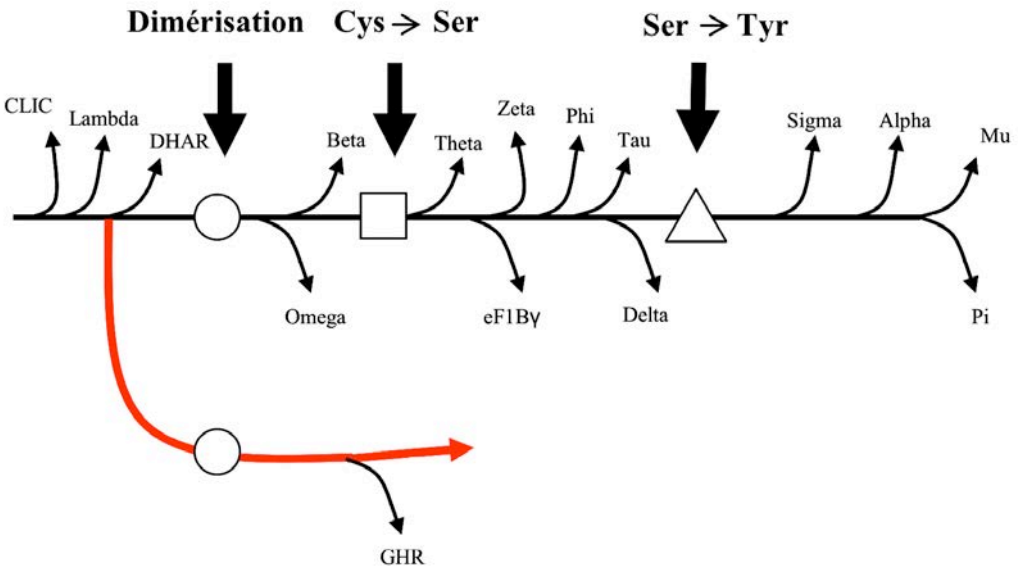


Figure 37 : Proposition d'évolution de la voie des GHR par Meux 2012 (thèse) intégrée dans le schéma d'évolution proposé par Frova

Les GST représentant une famille riche et diversifiée autant d'un point de vue structural, catalytique que fonctionnel, leur classification est sans cesse remise en cause en fonction du nombre croissant de données structurales et fonctionnelles.

E. Les GST fongiques

La première classification des GST fongiques a été proposée en considérant les isoformes de *S. cerevisiae*, identifiant 5 classes: Ure2p, Oméga, GTT, MAK16 et EF1Bγ. Une étude un peu plus étendue, considérant 21 espèces fongiques (principalement des ascomycètes) a confirmé cette répartition (McGoldrick 2005). Les auteurs ont cependant distingué 2 clusters, le cluster 1 incluant la GTT1 de *S. cerevisiae* et le cluster 2 incluant la GSTA de *Aspergillus nidulans* qui présente des similitudes avec les isoformes de la classe Ure2p (Morel 2009). A cela se sont récemment ajoutés les classes GTT2, GTE pour

« Glutathion Transférase Etherase-like », renommée GSTFuA (pour « Fungal specific class A ») (Mathieu 2012), GHR pour « S-Glutathionyl-p-Hydroquinone Reductase » (Morel 2009; Meux 2011) et une nouvelle classe appelée GST Phi (GSTF), dont les parties N-terminales présentent environ 75% de similarité avec des GSTF végétales (Morel 2013).

MAK16

Les MAK 16 sont décrites comme des protéines nucléaires jouant un rôle dans la progression du cycle cellulaire et dans la biogenèse de la sous-unité ribosomale 60S. La MAK16 du champignon *Encephalitozoon cuniculi* montre 30 % d'identité avec une GST humaine microsomale. En tant que GST, cette classe est assez peu caractérisée mais semble proche des GST MAPEG et Kappa, suggérant une divergence plus précoce par rapport aux autres GST cytosoliques (McGoldrick 2005).

EF1Bγ

Les GST « EF1Bγ » regroupent des protéines ayant des similarités avec les sous-unités de facteurs d'élongation eucaryotiques 1 (eEF1), impliqués dans la traduction des protéines dans les cellules eucaryotiques (McGoldrick 2005). Des alignements de séquences ont pu mettre en évidence des homologies avec des GST au niveau du domaine N-terminal de ces EF, tandis que le domaine C-terminal est plus variable voire absent selon les espèces fongiques (Koonin 1994; Jeppesen 2003). Cependant, leur rôle chez les champignons en tant que GST n'est pas clairement compris si ce n'est que l'inactivation d'un des deux gènes codant des homologues chez *S.cerevisiae* augmente la sensibilité du champignon envers le peroxyde d'hydrogène et l'arsenic, suggérant un rôle de cette enzyme dans la réponse aux stress oxydants (Todorova 2007).

GTT,

Cette classe correspond à la première GlutaThion Transferase (GTT) caractérisée chez *S. cerevisiae* (Choi 1998). Les deux GTT identifiées dans cet organisme (GTT1 et GTT2) montrent une activité classique GST envers le CDNB tandis que la GTT1 possède une activité peroxydase et que la GTT2 peut conjuguer du GSH sur le cadmium (Choi 1998; Adamis 2004; Herrero 2006). Après une analyse phylogénétique regroupant des séquences d'asco- de zygo- et de basidiomycètes, il est apparu deux clusters de GTT (GTT1 et GTT2) contenant chacun une isoforme de la levure (Morel 2009; Morel 2013). Cependant, *P. chrysosporium* ne possède pas d'isoforme GTT1 mais possède 2 isoformes GTT2 (Morel 2009, Morel 2013).

GSTF

Cette classe n'a été mise en lumière chez les champignons que très récemment et est corrélée aux GST Phi des plantes du fait de leur grande similarité au niveau de la partie N-terminale de leurs séquences. Le nombre d'isoformes varie beaucoup selon le génome considéré (Morel 2013). Peu de données sont disponibles sur les GSTF des basidiomycètes, si ce n'est que l'isoforme Phi de *P.chrysosporium* est surexprimée lors de l'ajout dans le milieu de culture de vanilline, un intermédiaire de la dégradation de la lignine (Shimizu 2005; Morel 2013).

GST à cystéine

Les GST à cystéines catalytiques seraient apparues tôt au cours de l'évolution des GST. Chez les champignons, leur rôle inclurait la protection des cellules contre les dommages du stress oxydatif ou des xénobiotiques comme cela a été suggéré chez la levure. Trois GST de *S.cerevisiae* seraient actives comme thiol transférases et déhydroascorbate réductases via un mécanisme dit « monothiol » ou encore ayant une activité envers quelques dérivés hydroquinone (Garcera 2006). Elles sont capables de déglutathionyler des molécules structuralement différentes. Les GST à cystéines sont également versatiles puisqu'un changement d'un ou de quelques acides aminés peut entraîner un changement d'activité, ce qui peut expliquer une grande diversité d'activité au sein d'une même classe (Garcera 2006; Meux 2011). Deux classes on été identifiées :

Oméga

Les GST oméga (GSTO), présentes chez de nombreux autres organismes tels que les mammifères ou les insectes, sont fortement représentées chez les champignons, notamment saprophytes. De plus, des études transcriptomiques chez le genre *Phanerochaete* soulignent leur importance lorsque le bois est utilisé comme source de carbone unique (Wymelenberg 2010; Wymelenberg 2011). Les niveaux de régulation de ces gènes varient selon l'essence de bois utilisée. Ainsi, certaines isoformes peuvent être induites sur de l'épicéa tandis que d'autres sont plutôt exprimées sur du sapin (MacDonald 2011). Le grand nombre d'isoformes observé serait donc le reflet de l'adaptation du champignon à un environnement lignolytique. En plus de leur activité thiol transférase, des GSTO de *P. chrysosporium* ont révélé une activité estérase (Meux 2011; Meux 2012)

GHR

Les GHR, présentes également chez les bactéries et les plantes, ont été récemment caractérisées chez les champignons. La GHR de *P. chrysosporium* se démarque des GSTO

par son mode de dimérisation particulier ainsi que par sa capacité à déglutathionyler des hydroquinones glutathionylées, grâce à la présence d'une cystéine catalytique (Xun 2010; Meux 2011).

GSTFuA

Il s'agit d'une classe fongique étendue chez les champignons ligninolytiques qui présente des homologies de séquence avec les protéines bactériennes Lig responsables du clivage des liaisons beta aryl ether chez le genre *Sphingobium*. C'est pourquoi ces enzymes furent dans un premier temps classées parmi les « Ethérases » (GTE) (Masai 1993; Morel 2009). Les seules études à ce jour concernent des GST étherases-like de *P. chrysosporium* et de *Coprinus cinereus* qui n'ont montré aucune activité étherase. Cependant, elles présentent des propriétés ligandine versatiles envers des composés dérivés de la dégradation de la lignine. Ces enzymes présente également des activités glutathion transférase sur des substrats dérivés de l'isothiocyanate et du butyrate (mais très peu envers le CDNB). Du fait de ces propriétés biochimiques et de leurs structures tridimensionnelles particulières, elles ont été renommées GSTFuA pour « fungal specific class A » (Mathieu 2012).

Ure2p

Ure2p, tire son nom d'un locus muté de *S. cerevisiae* impliqué dans l'assimilation de l'acide uréidosuccinique et dont la structure du produit du gène est proche de celle des GST (Lacroute 1968; Drillien 1972). La protéine de *S. cerevisiae* codée par ce gène, Ure2p, possède un rôle dans la régulation du catabolisme de l'azote (NCR pour Nitrogen catabolic repression) puisqu'elle est capable de former des complexes cytoplasmiques avec deux activateurs de transcription de gènes nécessaires lors de l'assimilation de sources d'azote « non préférées » (Coschigano 1991; Blinder 1996; Cooper 2002). De plus, Ure2p possède une forme prion appelée Ure3 (Wickner 1994) et a donc été l'objet de nombreuses études en tant que modèle puisque les formes prions sont des protéines infectieuses impliquées dans des maladies telles que les encéphalopathies spongiformes. Cette propriété est due à la présence d'une séquence N-terminale supplémentaire d'environ 90 acides aminés, riche en asparagine et qui n'est pas impliquée dans la NCR. Ure2p a été classée parmi les GST puisque le domaine C-terminal possède une séquence proche et un repliement typique des GST mais sans les acides aminés requis pour une activité GST transférase (Coschigano 1991; Masison 1995; Umland 2001). Cependant cette activité peut être restaurée par mutagenèse dirigée au niveau de ces acides aminés catalytiques (Zhang 2008). De plus, elle possède une activité de

type peroxydase dépendante du glutathion ainsi qu'une activité thiol disulfide oxydoréductase (Bai 2004; Zhang 2009). Lorsque le gène est inactivé, la levure présente une grande sensibilité envers quelques métaux lourds et oxydants, ce qui suggère un rôle dans la réponse au stress oxydant (Rai 2003; Todorova 2007; Todorova 2009; Todorova 2010). Des études chez d'autres champignons ont révélé que l'Ure2 de *Candida glabrata* aurait un rôle dans la NCR (Edskes 2011) et que deux homologues de *Schizosaccharomyces pombe* (GST 1 et GST 2) auraient une activité glutathion transférase (Kim 2001; Cho 2002). L'inactivation de ces gènes engendre une plus grande sensibilité de cette levure envers des oxydants (Veal 2002). L'homologue d'Ure2 chez *Aspergillus nidulans* (AnGSTA) n'aurait pas de rôle dans la NCR mais plutôt dans la résistance aux xénobiotiques et métaux lourds. Il ne présente pas d'activité de type glutathion transférase (Fraser 2002), contrairement aux homologues d'*Aspergillus fumigatus* qui présentent des activités GST et glutathion peroxydase (Burns 2005).

Des études d'expression de ces Ure2p fongiques montrent d'un point de vue général une régulation positive en présence d'oxydant (ménadione, H_2O_2, diamide), de xénobiotiques ou de métaux (chloride mercurique, chloride de cadmium, CDNB, voriconazole) (Kim 2001; Cho 2002; Fraser 2002; Burns 2005; Pocsi 2005; Da Silva Ferreira 2006), ce qui supporte l'hypothèse de leur rôle dans la gestion du stress oxydant et dans la détoxication.

Objectifs

L'arsenal de détoxication de *P. chrysosporium* comprend une grande diversité de cytochromes P450 monooxygénases ainsi qu'un nombre important de GST qui prendraient en charge les composés issus de la phase I. Du fait de leur implication dans les systèmes de dégradation et les systèmes antioxydants, les GST de ce champignon, encore peu connues, présenteraient un intérêt non négligeable dans les processus ligninolytiques et les processus impliqués dans la résistance envers les xénobiotiques et les composés toxiques. *P. chrysosporium* possèdent 27 gènes codant des GSTs, répartis en 7 classes (Tableau 5) (Morel 2009). La caractérisation biochimique et fonctionnelle de ces enzymes est l'un des objectifs de l'équipe de recherche dans laquelle s'est déroulée cette thèse de doctorat.

Glutathion transférase	numéro d'identification (JGI)
PcGHR1	EU791894
PcGHR2	126388
PcGSTO3	EU791893
PcGSTO4	7168
PcGSTO5	7169
PcGSTO6	3911
PcGSTO7	6880
PcGSTO8	6881
PcUre2p1	503
PcUre2p2	140156
PcUre2p3	140271
PcUre2p4	137250
PcUre2p5	128511
PcUre2p6	2269
PcUre2p7	2266
PcUre2p8	2268
PcUre2p9	140259
PcGSTFuA1	5118
PcGSTFuA2	5119
PcGSTFuA3	5122
PcGSTFuA4	5300
PcGSTFuA5	7058
PcGTT2.1	6766
PcGTT2.2	6683
PcGSTF	7971
PcMAK16	137531
PcEFBγ	39727

Tableau 5 : Les glutathion transférases dites « cytosoliques » de *P. chrysosporium*. (adapté de Morel, 2009)

Parmi les GST de *P. chrysosporium*, la classe Ure2p représente près d'un tiers du nombre total de ces enzymes. Les travaux présentés dans ce manuscrit portent principalement sur l'étude de cette classe Ure2p pour laquelle seules une isoforme de *S. cerevisiae* et une

isoforme d'*Aspergillus nidulans* avait été caractérisées au commencement de ce travail de thèse (Fraser 2002, Zhang 2009).

L'objectif de ce travail de thèse était de de mieux comprendre pourquoi cette classe est étendue chez *Phanerochaete chrysosporium*, d'identifier d'éventuelles redondances fonctionnelles ou spécificités catalytiques. L'étude s'est donc appuyée sur une caractérisation biochimique et structurale d'isoformes de cette classe.

Tout d'abord, une approche phylogénétique a été utilisée, permettant de mieux comprendre la répartition des Ure2p au sein des organismes fongiques en fonction de leur mode de vie. 5 isoformes de *P. chrysosporium* ont été produites, purifiées et caractérisées biochimiquement. En collaboration avec une équipe du CRM² (cristallographie, Résonance Magnétique et Modélisation) de l'Université de Lorraine, leur structure tridimensionnelle a été résolue et analysée. Ceci permet, avec l'analyse de protéines mutées pour des acides aminés clés, de mieux comprendre le mécanisme réactionnel impliqué. En complément de ces analyses, une étude plus physiologique a été réalisée afin d'avoir une idée de l'importance de la pression environnementale sur l'expression des gènes de *P. chrysosporium* face aux molécules toxiques issues de la dégradation du bois. Cette analyse nous a permis de mettre en évidence le rôle important d'une GST de la classe GTT dans la réponse à ce stress.

Les résultats de ces travaux sont présentés sous forme d'articles publiés, soumis ou en préparation et répartis en 3 chapitres.

Résultats

Chapitre 1 : Diversité des Ure2p fongiques

Les homologues des Ure2p ont été recherchés par Blast dans les bases de données génomiques en utilisant les séquences codant les Ure2p de *P. chrysosporium* comme matrices. Leur présence a pu être mise en évidence principalement chez les bactéries, les champignons, mais aussi chez un groupe d'amibes et de straménopiles. L'analyse phylogénétique de 189 séquences d'ascomycètes et de basidiomycètes révèle une subdivision en deux sous classes nommées Ure2pA et Ure2pB. Une analyse plus approfondie chez les basidiomycètes montre que globalement, les champignons saprophytes présentent le plus de séquences Ure2p et que les séquences Ure2pB sont présentes dans quasiment toutes les espèces testées contrairement aux Ure2pA. Chez *P. chrysosporium*, une seule isoforme de la sous-classe Ure2pB est présente (PcUre2p1) tandis que la classe Ure2pA est plus étendue (8 isoformes). Alors que les profils d'expression des gènes codant les PcUre2p dans différentes conditions sont globalement similaires, une induction de l'expression des PcUre2p4 et PcUre2p6 après l'ajout d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans le milieu a été mise en évidence. Les HAP sont prélevés par le champignon, avant d'être stockés dans des vésicules lipidiques intracellulaires. PcUre2p4 et PcUre2p6, dont les séquences sont très proches, pourraient donc jouer un rôle dans la détoxication de ces composés. De premières études biochimiques ont révélé que la PcUre2p1 (appelée par la suite PcUre2pB1) se démarque des PcUre2p4 et PcUre2p6 (renommées respectivement PcUre2pA4 et PcUre2pA6) par le fait qu'elle ne possède pas l'activité classique de glutathion transférase.

Ces résultats sont présentés sous forme d'un article publié dans l'*International Journal of Evolutionary Biology* (doi :10.4061/2011/938308) (**Article 1**).

Article 1 : Functional Diversification of Fungal Glutathione Transferase from the Ure2p Class

SAGE-Hindawi Access to Research
International Journal of Evolutionary Biology
Volume 2011, Article ID 938308, 9 pages
doi:10.4061/2011/938308

Research Article

Functional Diversification of Fungal Glutathione Transferases from the Ure2p Class

Anne Thuillier,[1] Andrew A. Ngadin,[1,2] Cécile Thion,[3] Patrick Billard,[3] Jean-Pierre Jacquot,[1] Eric Gelhaye,[1] and Mélanie Morel[1]

[1] *Unité Mixte de Recherches INRA UHP 1136 Interaction Arbres Microorganismes, IFR 110 Ecosystèmes Forestiers, Agroressources, Bioprocédés et Alimentation, Faculté des Sciences et Technologies, Nancy Université BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France*
[2] *Department of Biological Sciences, Faculty of Science and Technology, Universiti Malaysia Terengganu, 21030 Kuala Terengganu, Malaysia*
[3] *Laboratoire des Interactions Microorganismes-Minéraux-Matière Organique dans les Sols, UMR 7137 CNRS—UHP, Faculté des Sciences et Technologies, Nancy Université BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France*

Correspondence should be addressed to Mélanie Morel, mmorel@scbiol.uhp-nancy.fr

Received 30 June 2011; Revised 12 August 2011; Accepted 5 September 2011

Academic Editor: Olga C. Nunes

Copyright © 2011 Anne Thuillier et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The glutathione-S-transferase (GST) proteins represent an extended family involved in detoxification processes. They are divided into various classes with high diversity in various organisms. The Ure2p class is especially expanded in saprophytic fungi compared to other fungi. This class is subdivided into two subclasses named Ure2pA and Ure2pB, which have rapidly diversified among fungal phyla. We have focused our analysis on *Basidiomycetes* and used *Phanerochaete chrysosporium* as a model to correlate the sequence diversity with the functional diversity of these glutathione transferases. The results show that among the nine isoforms found in *P. chrysosporium*, two belonging to Ure2pA subclass are exclusively expressed at the transcriptional level in presence of polycyclic aromatic compounds. Moreover, we have highlighted differential catalytic activities and substrate specificities between Ure2pA and Ure2pB isoforms. This diversity of sequence and function suggests that fungal Ure2p sequences have evolved rapidly in response to environmental constraints.

1. Introduction

The glutathione-S-transferase (GST) proteins represent an extended family with high diversity depending on the organism [1–3]. These enzymes are usually able to conjugate glutathione (GSH) to hydrophobic molecules and thus are involved in biotransformation pathways. The addition of GSH onto molecules, previously oxidized by detoxification phase I enzymes, results in the formation of compounds which are usually less toxic and more soluble. These less-toxic peptide derivatives are ready to be excreted or stored. Additionally, these proteins can exhibit other activities such as thiol transferase or peroxidase activities [4–6], suggesting that they could directly participate in the cellular response to oxidative stress. In a recent paper, we have studied the diversity of fungal GSTs, considering zygo-, asco- and basidiomycetes [7]. The major result of this study is that it suggests a link between the number of GST encoding sequences in the analyzed genomes and the fungal way of life. Indeed, 46 and 27 GST-encoding genes have been found in the genomes of *Postia placenta* and *Phanerochaete chrysosporium*, respectively, compared to only 10 for the pathogen *Ustilago maydis* or 11 for the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *P. placenta* and *P. chrysosporium* are ligninolytic basidiomycetes, which use unspecific oxidative reactions to degrade lignin and, by extension, recalcitrant compounds. In *P. chrysosporium*, extracellular peroxidases are involved in coordination with numerous oxidases [8]. In contrast, *P. placenta* is thought to degrade lignin by secreting various small iron-binding molecules initiating Fenton reactions [9]. Beside these extracellular systems, oxidation of recalcitrant molecules could also occur from the action of various cell-wall linked oxidases such as cytochrome P450 monooxygenases [10]. In the genome of both these fungi,

a huge number of cytochrome P450 monooxygenase-related genes have been detected in comparison with other fungi [11, 12]. Such a diversity of cytochrome P450 monooxygenases can be related with the high occurrence of GST encoding genes in their genome and thus to their ability to metabolize recalcitrant compounds found in their natural ecosystem.

Another interesting point is the overrepresentation of a particular class of GSTs called Ure2p both in the genome of *P. placenta* and *P. chrysosporium*. For these species, the Ure2p class represents one-third of the total identified GSTs (9/27 for *P. chrysosporium* and 17/46 for *P. placenta*). *P. chrysosporium* Ure2p sequences cluster into two different subclasses. The first one, enclosing 8 of the 9 sequences, is related to the single Ure2p isoform of *S. cerevisiae*. In yeast this protein is known to act as a negative regulator of the nitrogen catabolite regulation (NCR) in response to primary nitrogen source by disabling Gln3p to activate transcription [13]. Moreover, the inability of a *URE2* deleted mutant strain (Δ*ure2*) to grow in presence of hydrogen peroxide (H_2O_2) has been demonstrated, and a relationship between diminishing levels of GSH and peroxide sensitivity was established. It was suggested that the susceptibility of the Δ*ure2* strain to the exogenous H_2O_2 can result from increased GSH degradation due to the deregulated localization of the gamma-glutamyl transpeptidase activating factors Gln3p/Gat1p [14]. The last *P. chrysosporium* sequence, named PcUre2p1, clusters in another group containing *GSTA* (AN4905) from *Aspergillus nidulans*. *GSTA* contributes to metal detoxification and contrary to the yeast isoform, it is not involved in the NCR [15].

In this study, we performed an exhaustive analysis of Ure2p sequences from fungal genomes, focusing on *P. chrysosporium* to correlate the diversity of sequences with the diversity of functions.

2. Materials and Methods

2.1. Strains and Culture Conditions. The strain of *P. chrysosporium* used is the homocaryon RP-78. Its genome has been fully sequenced and annotated [16]. The fungus was maintained on 4% malt, 3% agar plates. The sporulation conditions have been described previously [17]. The liquid culture medium consists of 5 mM sodium acetate pH 4.5, 1% glucose, 1 mM ammonium tartrate, 1% (v/v) base medium (20 g/L KH_2PO_4, 5 g/L $MgSO_4$, 1 g/L $CaCl_2$), 7% (v/v) trace medium (1.5 g/L Nitrilotriacetate, 3 g/L $MgSO_4$, 1 g/L NaCl, 0.1 g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 g/L $CoCl_2$, 0.1 g/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 g/L $CuSO_4$, 10 mg/L $AlK(SO_4) \cdot 12H_2O$, 10 mg/L H_3BO_3, 10 mg/L $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$) and 225 μM $MnCl_2$. The fungal inoculation was made by adding $2.5 \cdot 10^6$ spores (OD_{650} = 0.5) per flask containing 100 mL of liquid medium. For the cultures on wood, the fungus was first grown for 3 days on malt agar plates, and autoclaved wood chips were then placed on the fungal mat. The fungus was harvested from the wood chips 15 days later. The fungus was also grown in liquid medium containing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). For this condition, the fungal pellets were first grown without PAH for 5 days to yield biomass. The fungus was then transferred into new flasks containing PAH. To prepare these flasks, a stock solution of PAH was solubilised in hexane and added to the flasks to reach final quantities of 2.25 mg phenanthrene, 0.225 mg fluorene, 0.225 mg fluoranthene, and 0.225 mg anthracene per flask. 100 mL of liquid culture medium, the composition of which is described above but without glucose, was added in each flask after complete evaporation of hexane.

2.2. Sequence Analysis. For the global phylogenetic analysis, 189 sequences from both *Ascomycetes* and *Basidiomycetes* were found in NCBI genome database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/) using blastp with all *P. chrysosporium* Ure2p sequences as template. The deeper analysis focusing on *Basidiomycetes* was performed using data from the Fungal Genomics Program of the Joint Genome Institute (JGI) (http://genome.jgi-psf.org/Phchr1/Phchr1.home.html) using blastp with *P. chrysosporium* Ure2p sequences as template. 153 basidiomycete sequences were retrieved from this database. Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using *MEGA* version 5 [18]. Alignments were done with Muscle and the phylogenetic tree was constructed with the neighbour-joining method. Predictions of subcellular localization were done using WolfpSort (http://wolfpsort.org/) and Mitoprot (http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/mitoprot.html) softwares. Synteny was determined through the Fungal Genomics Program of the Joint Genome Institute (JGI). All references of the sequences used in this study are given in additional data.

2.3. Gene Expression. Gene expression was checked by semi-quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Total RNA isolation was performed using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). RNase-free DNase treatment (Qiagen) was applied according to the manufacturer's protocol to avoid genomic DNA contamination. Reverse transcription (RT) reactions were performed with 500 ng of total RNA using the Masterscript Kit (Prime) according to the manufacturer's protocol. RT products were amplified by PCR in the following conditions: DNA denaturation for 1 min at 95°C and 33 cycles at 95°C for 5 s, 52°C for 45 s, and 72°C for 1 min using Go Taq DNA polymerase (Promega). The suitability of the extracted RNA for RT-PCR amplification was checked by performing RT-PCR control experiments in the same amplification conditions with the ubiquitin encoding gene.

2.4. PAH Quantification. PAHs from total culture media were successively extracted three times with dichloromethane (DCM) (v/v) in separation funnels. DCM extracts were evaporated in a speedVac concentrator (Thermo Scientific RC1010), and dried samples were dissolved in acetonitrile for HPLC analyses using a Dionex UltiMate 3000 system with a 5 μm Agilent Eclipse PAH of 4.6 × 150 mm C18 reverse phase column maintained at 30°C. The compounds were detected and identified through Dionex UV photodiode array detector at 254 nm. The elution solution of 70% acetonitrile and 30% H_2O was used with a flow rate of 2 mL/min.

2.5. Microscopic Analysis. *P. chrysosporium* pellets grown in liquid cultures with or without PAH as indicated below were crushed, and observations were made with an epifluorescence microscope (Nikon E600) with an HQ-FITC-BP filter cube (Chroma) for excitation at 345 nm and emission at 485 nm (DAPI). Pictures were collected with a Nikon D60 Digital SLR camera.

2.6. Production and Purification of Recombinant Proteins. Amplifications of GST cDNAs were performed from RT products obtained as described above, using the high proof Herculase DNA polymerase (Stratagene). The PCR products were cloned into the NcoI and BamHI sites of the pET-3d vector (Novagen) resulting in a construction devoid of a His-Tag. The recombinant plasmid was then used to transform *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) cotransformed by the helper plasmid pSBET in order to provide the rare t-RNAs for AGG and AGA codons [19]. After induction with isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), proteins were purified using a combination of gel filtration and anion exchange chromatography as described in Rouhier et al. [20].

2.7. Enzymatic Activity Measurements. The activities of the recombinant proteins were assayed spectrophotometrically in 1 mL reaction medium using 8.5 μM PcUre2p4, 1.3 μM PcUre2p6, and 0.55 μM PcUre2p1. GST activity was assayed in 50 mM phosphate buffer pH 6.5, 2 mM chlorodinitrobenzene (CDNB) and 0.2 to 12.5 mM GSH. The pH dependency of PcUre2p4 and PcUre2p6 activities was assessed in 50 mM phosphate buffer pH 5.8 to pH 8.0 using 4 mM CDNB and 6 mM GSH. The other activities were assayed in 30 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA buffer, 1 mM β-hydroxyethyl disulphide (HED), dehydroascorbate (DHA) or peroxides as substrates, 0.2 to 12.5 mM GSH, 180 μM NADPH, and 0.5 IU of purified glutathione reductase [21–23]. Oxidation of NADPH and transformation of CDNB were both followed at 340 nm.

3. Results

3.1. Phylogenetic Analysis. Ure2p sequences have been identified within available genome database from NCBI using blastp and PcUre2p amino acid sequences as template.

Concerning bacterial genomes, PcUre2p homologues have been identified only in *Actinobacteria*, *Cyanobacteria,* and *Firmicutes* phyla. No similar sequence was found for *Archaea* while some were identified for *Spirochaetales* and *Proteobacteria* except the epsilon subdivision. Among eukaryotic organisms, only *Stramenopiles*, *Dictyosteliida,* and fungi possess similar sequences.

Ure2p amino acid sequences from *Ascomycete* and *Basidiomycete* genomes have thus been collected and analyzed through a phylogenetic approach (Figure 1). All sequence references are given in additional data. Two main subclasses, previously called Ure2p and cluster 2 [2, 7], are distinguishable and have been renamed Ure2pA and Ure2pB, respectively. Both subclasses are present in all fungal phyla. These sequences were grouped according to the fungal taxonomy, suggesting a recent diversification of Ure2p sequences among each phylum. While Ure2pB sequences from *Saccharomycotina* and *Pezizomycotina* are close to each other, *Saccharomycotina* sequences are rather related to *Basidiomycotina*. We then focused our analysis on *Basidiomycotina* by performing an exhaustive analysis of Ure2p sequences in all available basidiomycete genomes from the JGI Fungal Genomics Program. Ure2p sequences have been found in all the species tested. A phylogenetic analysis of the sequences allowed classifying them in the Ure2pA or Ure2pB subclasses (data not shown). The numbers of sequences from each cluster are reported in Figure 2. Two species (*Malassezia globosa* and *Schizophyllum commune*) possess only one sequence from the Ure2pA subclass, some other (*Agaricus bisporus, Coniophora puteana, Stereum hirsutum, Fomitiporia mediterranea, Heterobasidion annosum, Serpula lacrymans, Pleurotus ostreatus, Coprinopsis cinerea, Cryptococcus neoformans, Puccinia graminis*, *Laccaria bicolor,* and *Tremella mesenterica*) possess only sequences from Ure2pB, while the other fungi exhibit both isoforms. There is no relationship between this observation and the taxonomy of the fungi. Globally, the fungi exhibiting the highest number of sequences are wood decaying fungi (Figure 2, grey shadowing), however some species also involved in wood degradation show a relatively small number of Ure2p sequences (*Auricularia delicata, Schizophyllum commune, Heterobasidion annosum, Serpula lacrymans, Pleurotus ostreatus, and Tremella mesenterica*). Thus, the diversification of Ure2p sequences does not seem to be related with fungal evolution, nor with the wood degrading properties of the fungi, suggesting the occurrence of other environmental pressures.

3.2. Synteny. Globally the Ure2p synteny is not conserved among *Agaricomycotina*, except for Ure2pB sequences in few species which possess only these isoforms (*S. lacrymans*, *L. bicolor,* and *H. annosum*) (Figure 3). Ure2pB genes are surrounded with putative mitochondrial aminomethyltransferase, cytochrome c oxidase assembly protein, DNA methylase and RNA binding protein. However the putative link between Ure2pB and either mitochondrial metabolism or nucleic acid modification pathways has not been documented.

3.3. Expression of PcUre2p Genes in P. chrysosporium. The expression of all *P. chrysosporium* Ure2p coding genes was monitored in two conditions using semiquantitative RT-PCR (Figure 4). The first one corresponds to ligninolytic conditions (Figure 4(a)), and the second is a condition where the fungus is exposed to genotoxic PAHs [24]. In this condition, *P. chrysosporium* was able to dissipate between 15 to 30% of the initially added PAH in the culture medium after 10 days of incubation, the highest removal occurring with fluorene and fluoranthene. Taking advantage of the fluorescent properties of PAH, we were able to detect their intracellular accumulation in *P. chrysosporium* in our culture conditions after 10 days of treatment (Figure 4(b)). This accumulation occurred both in hyphae and spores, not in vacuoles but rather in lipid vesicles as shown before in *Fusarium solani* [25].

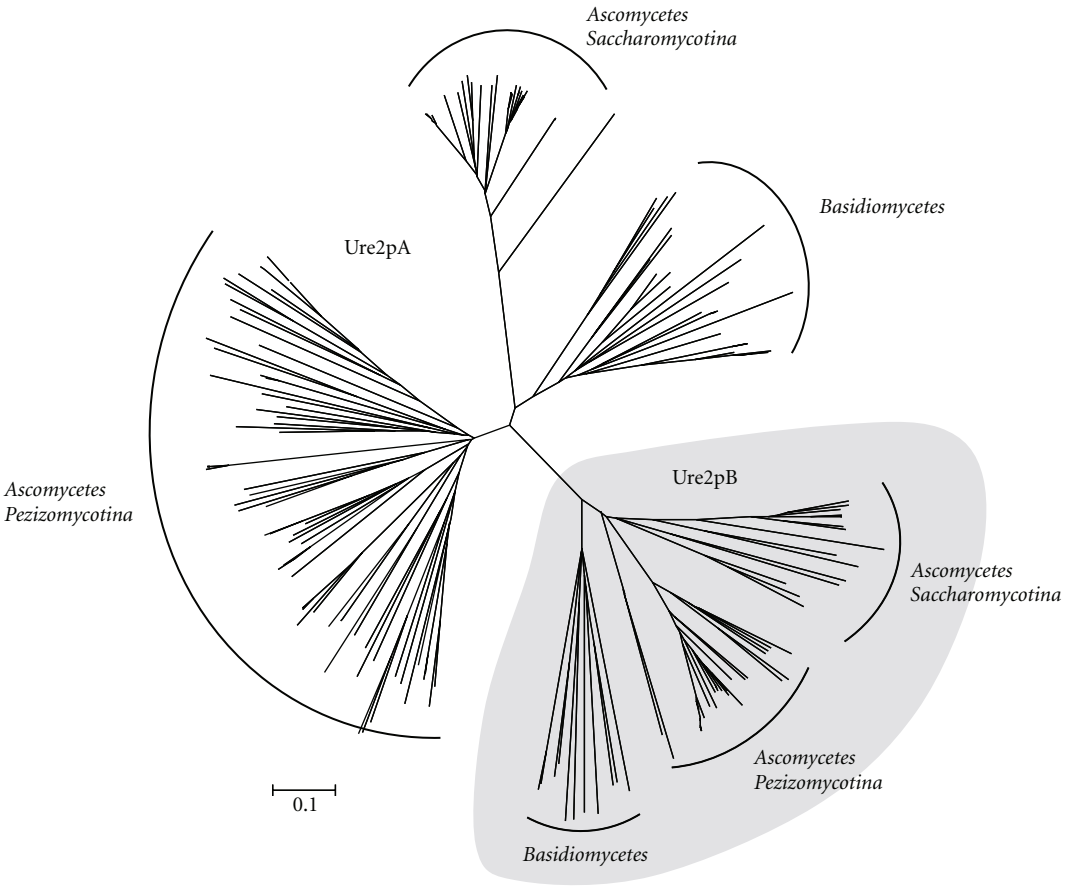


Figure 1: Neighbour joining reconstruction of the Ure2p protein sequences from *Ascomycetes* and *Basidiomycetes* NCBI genome database. Species names and sequence references are given in additional data. The bar represents a distance scale of 0.1 mutations per site.

No difference was highlighted concerning gene expression in ligninolytic (wood) compared to nonligninolytic (malt) conditions (Figure 4(a)): PcURE2p4 was not expressed, PcURE2p3, PcURE2p5, and PcURE2p6 were slightly expressed, while the others were constitutively expressed in both conditions.

PcURE2p1, PcURE2p7, and PcURE2p8 were constitutively expressed with and without PAH treatment, while the PcURE2p4 and PcURE2p6 genes were specifically induced after PAH treatment (Figure 4(b)). PcURE2p4, PcURE2p6, and PcURE2p8 genes are repeated in tandem but are not regulated in the same manner suggesting a different regulatory system between PcURE2p8 and the two others. PcURE2p2, PcURE2p3, PcURE2p5, and PcURE2p9 are not or very slightly expressed in both conditions.

3.4. Analysis of Ure2p Sequences. The amino acid sequences of PcUre2p4 and PcUre2p6 are very similar to one another showing 83.2% identity [7]. PcUre2p1 exhibits 26% and 29% of identity with PcUre2p4 and PcUre2p6, respectively. The proteins have the classical organization of GST, that is, a GSH-binding domain (Thioredoxin domain or G-site) and a α-helical domain (GST C-domain) (Figure 5). The Trx-domain of these proteins is highly conserved, exhibiting amino acids known to be involved in the interaction with GSH in the *S. cerevisiae* isoform (ScUre2p) [26, 27]. Asn124 and Arg164 (ScUre2p numbering) are shared by ScUre2p, PcUre2p1, PcUre2p4, and PcUre2p6. Glu180 and Ser181 residues are only conserved in ScUre2p, PcUre2p4, PcUre2p6 but not in PcUre2p1. Ala122 is replaced by Gly in PcUre2p4 and PcUre2p6. Moreover, the three *P. chrysosporium* isoforms exhibit a Tyr instead of Phe105. Another interesting point is the presence of a putative mitochondrial targeting peptide in PcUre2p1, suggesting a potential role for this protein in the organelle. The major difference between the yeast isoform and the other fungal sequences is the presence of the prion domain in ScUre2p [28]. This Gln/Asn rich sequence at the N-terminal end is required for aggregation properties of the protein. However, deletion of this N-terminal region has no effect on the stability or folding of the protein *in vitro* [29]. Among all the fungi analysed, only sequences from *Saccharomycotina* exhibit the N-terminal prion domain, suggesting that the other proteins have evolved separately in the other fungi, the most likely hypothesis being the acquisition of this property in *Saccharomycotina*.

3.5. Biochemical Properties of PcUre2p1, PcUre2p4, and PcUre2p6. The differences in the amino acid sequences are likely to influence the catalytic properties of the

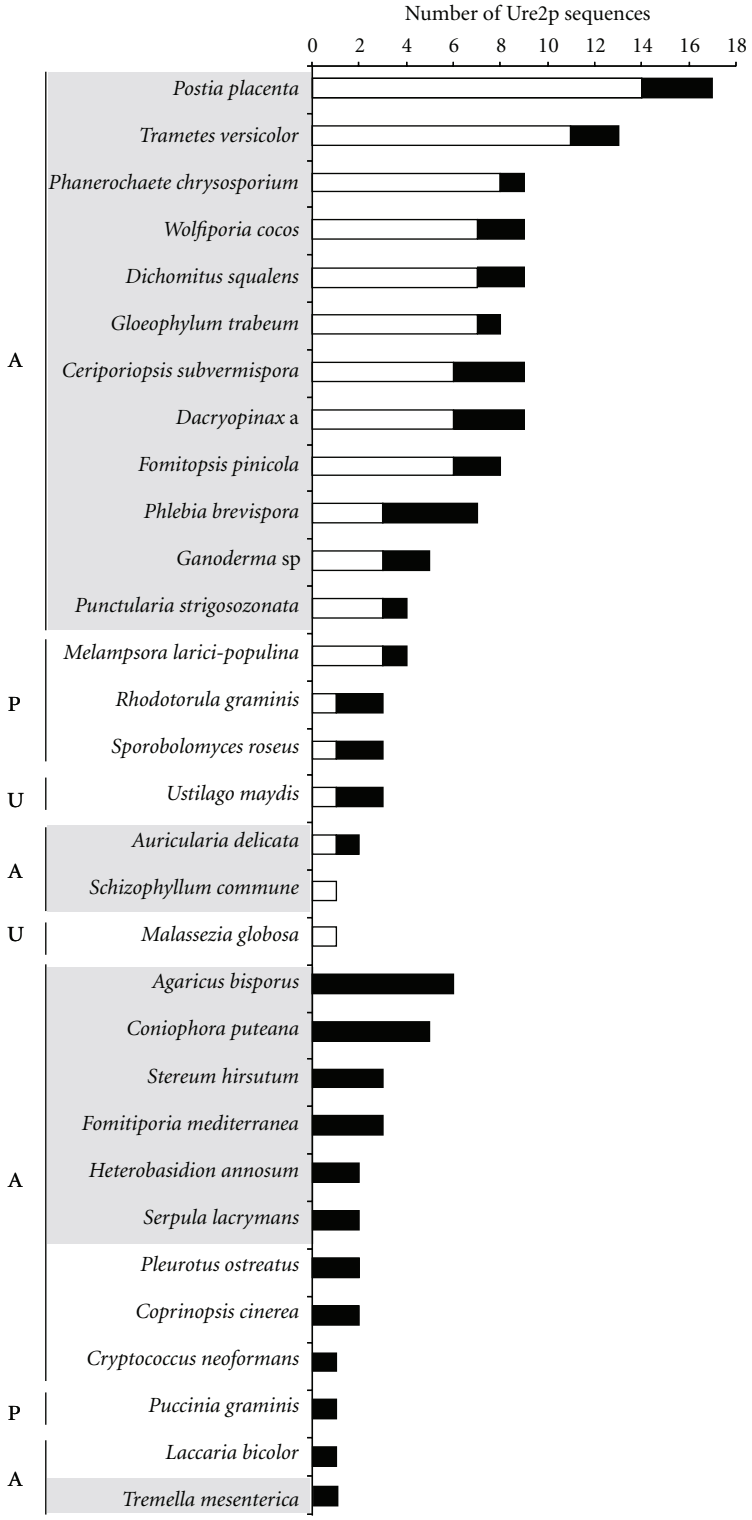


Figure 2: Number of Ure2p sequences found in all available genomes of *Agaricomycotina* (A), *Pucciniomycotina* (P), and *Ustilaginomycotina* (U) from the JGI Fungal genomics Program. A preliminary phylogenetic analysis allowed to differentiate Ure2pA (white bars) from Ure2pB sequences (black bars). Wood-decaying fungi are framed in grey.

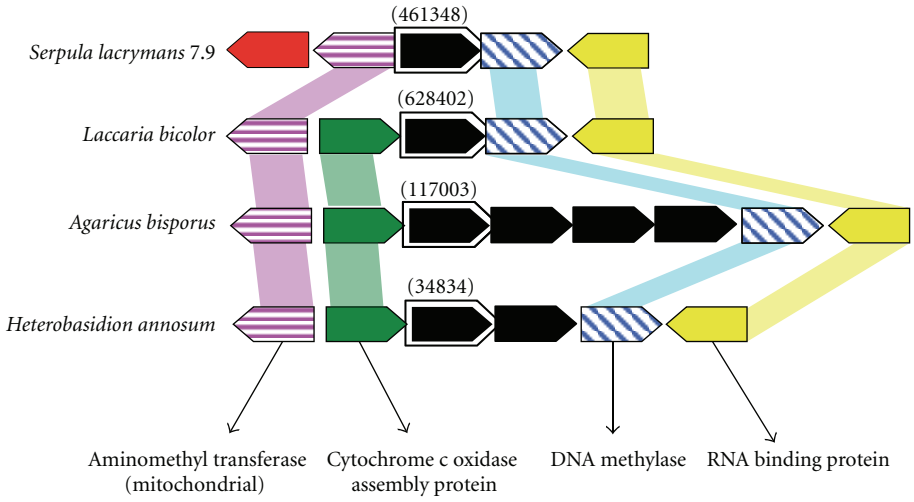


FIGURE 3: Conserved synteny of Ure2pB sequences among 4 *Agaricomycotina* species (*S. lacrymans, L. bicolor, A. bisporus,* and *H. annosum*). Ure2p genes are in black. Protein IDs of the sequences are reported onto the figure into brackets. The putative function of the genes surrounding Ure2p was obtained by sequence homology using blastp.

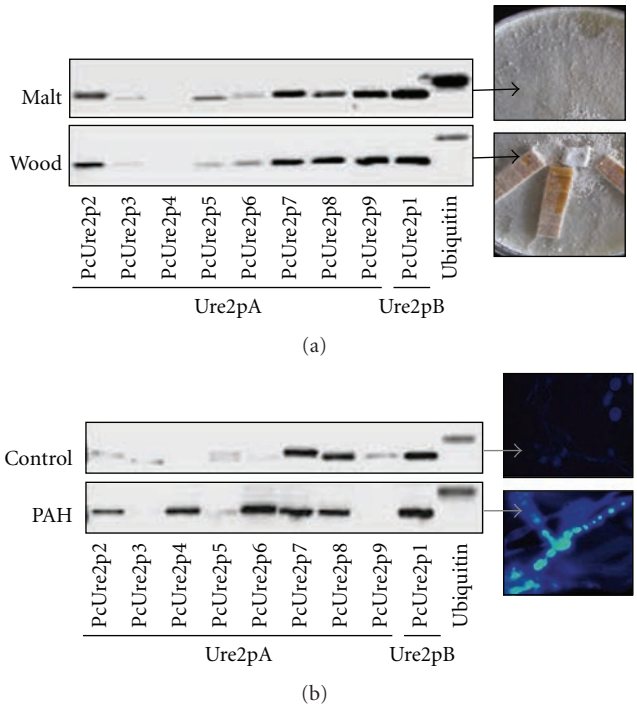


FIGURE 4: Gene expression of *P. chrysosporium* Ure2p measured by semiquantitative RT-PCR. (a) Ligninolytic condition (wood) versus nonligninolytic condition (Malt). (b) PAH treatment for 10 days; in this condition, PAH are internalized inside lipid vesicles (see photo) versus a control without PAH. The ubiquitin coding gene was amplified as a control. Two biological repetitions have been performed.

corresponding proteins. To test this hypothesis, the recombinant PcUre2p1, PcUre2p4, and PcUre2p6 proteins have been produced in *Escherichia coli* and purified. Their activities have been tested *in vitro* using various substrates (Table 1). PcUre2p4 and PcUre2p6 exhibited activity against CDNB, suggesting classical GST activity. For both enzymes, the highest specific activity was measured around pH 6.5 (Figure 6). The affinity of PcUre2p4 and PcUre2p6 are, respectively, 2.62 mM ± 0.26 and 3.12 mM ± 0.20 for GSH, and 2.46 mM ± 0.62 and 2.49 mM ± 0.71 for CDNB.

PcUre2p4 has been found to be inactive as thiol transferases and dehydroascorbate reductases. Contrary to ScUre2p, PcUre2p4 and PcUre2p6 had no GSH peroxidase activity whatever the peroxide used (hydrogen peroxide, t-butyl peroxide, or cumene peroxide). The purified recombinant PcUre2p1 was not active with both CDNB and peroxides but did reduce HED and DHA, thus exhibiting thioltransferase activity.

4. Discussion

While the single Ure2p isoform of *S. cerevisiae* has been well studied for its prion properties, its involvement in the NCR, and its role in the oxidative stress response [13, 14, 28, 29], this study is the first description of Ure2p in other fungi. This class is extended in basidiomycetes and especially in saprophytic fungi, suggesting a putative link between these GSTs and the degradative properties of the fungi. In many species, Ure2p genes are duplicated in tandem, revealing a monophyletic phylogenetic relationship between genes as described recently for insect GSTs [32]. Moreover, a tyrosine hydroxyl group thought to act as a hydrogen bond donor to the sulphur of GSH thus lowering its pK_a to stabilize a nucleophilic thiolate [33] is conserved in the first 15 amino acid residues of fungal sequences. The presence of this residue at the end of the first β-sheet defines a subgroup of GSTs called Y-GST type [34]. Based on the taxonomic distribution, it has been suggested that this type has evolved more recently compared to the so-called S/C-GST type found in other GST classes such as Omega [35].

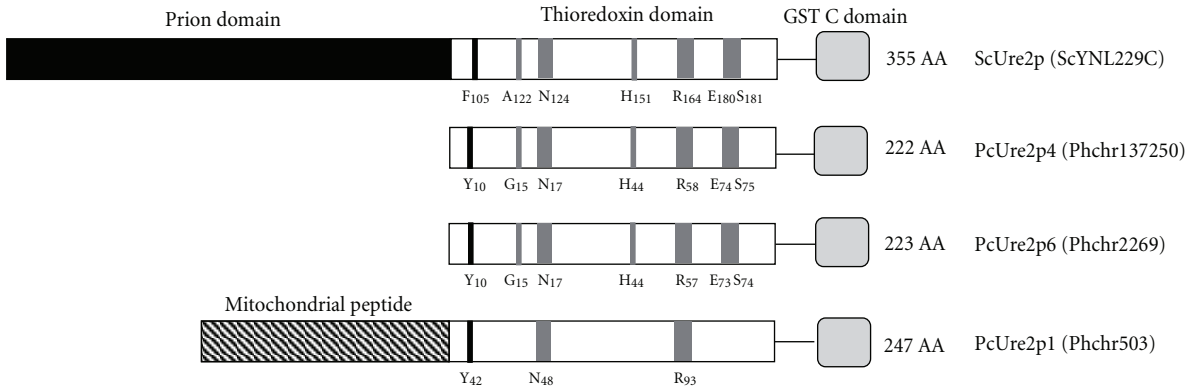


Figure 5: Comparative analysis of the Ure2p sequence from *Saccharomyces cerevisiae* and Ure2p1, Ure2p4 and Ure2p6 from *Phanerochaete chrysosporium*. Only the amino acids of the N-terminal domain known to be involved in the activity of the proteins have been reported. The protein IDs are given into brackets.

Table 1: Specific activities of recombinant *P. chrysosporium* and yeast proteins, using CDNB, HED, DHA, and peroxides (hydrogen peroxide, ter-butyl hydroperoxide, and cumene hydroperoxide). The specific activities are expressed in μmol/min/mg protein.

	CDNB	HED	DHA	Peroxides
ScUre2p	—	Active*	Active*	Active**
PcUre2p4	0.18 ± 0.01	—	—	—
PcUre2p6	1.21 ± 0.03	2.82 ± 0.08	0.76 ± 0.03	—
PcUre2p1	—	4.07 ± 0.88	2.90 ± 0.09	—

The specific activities concerning ScUre2p are not reported since the experimental procedures were different from the one used in this study.
*according to Zhang and Perrett [30], **according to Bai et al. [31].

P. chrysosporium exhibits nine Ure2p isoforms. We have tried here to decipher the significance of this diversification and the likely physiological roles of these enzymes. PcUre2p4 and PcUre2p6 from the Ure2pA subclass exhibit glutathionylation activity with CDNB, while PcUre2p1 from the Ure2pB subclass possesses only deglutathionylation (also called thioltransferase) activity. Incidentally, ScUre2p, which clusters into the Ure2pA subclass possesses deglutathionylation and peroxidase activity. However, none of the tested PcUre2p exhibits the peroxidase activity described in yeast, suggesting other functions in cell. To test this hypothesis, complementation tests using a *S. cerevisiae* ΔUre2p mutant have been performed (data not shown). The results showed that PcUre2p1, PcUre2p4, and PcUre2p6 are not able to restore the phenotype of the mutant concerning both the sensitivity to H_2O_2 [14] and its function in the NCR. However, a homologue of the yeast Gln3p is present in the genome of *P. chrysosporium* (Phchr 43861), suggesting that NCR could exist in this fungus. The main conclusion is that PcUre2p1, 4, and 6 do not have the same activity as ScUre2p in protecting cells against oxidative, heavy metal, or aromatic compounds stress, even if PcUre2p4 and PcUre2p6 belong to the same subclass as the yeast isoform. We can hypothesize that PcUre2p proteins are not directly involved in rescuing oxidative stress such as GSTs exhibiting peroxidase activities, but rather acts to detoxify specific substrates. The specific expression of PcUre2p4 and PcUre2p6 genes after PAH treatment is in accordance with the enzymatic data. PAHs are aromatic molecules that are degraded by at least three mechanisms in fungi: one uses the cytochrome P-450 system which is composed of a superfamily of monooxygenases, one uses the Fenton reaction [36], and the other uses the soluble extracellular enzymes of lignin catabolism, including lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP), and laccases which are nonspecific and oxidize a wide variety of organic compounds [37, 38]. However, in our conditions, no LiP or MnP activity was detected in the culture medium; we rather observed an intracellular storage of PAH in lipid vesicles as previously shown in *Fusarium solani* [25]. We can hypothesize a role of PcUre2p4 and 6 in intracellular PAH glutathionylation, transport, or oxidative stress rescue. PcUre2p1 gene was constitutively expressed in our conditions. In *A. nidulans*, the homologue *AnGSTA* contributes to metal and xenobiotic detoxification, as evidenced by the sensitivity to selenium, silver, nickel, sulphanilamide, and pyrrolnitrin of strains lacking a functional copy of *GSTA* [15]. The analysis of the soluble proteome of *P. chrysosporium* has revealed the presence of PcUre2p1 in a standard culture condition with a relative low abundance [39]. Moreover, the authors have shown a 3-fold upregulation of the protein after copper treatment. Another study revealed an induction of PcUre2p1 gene in response to nonylphenol [40]. Because of its putative mitochondrial localization, the protein may have a role in reducing toxic molecules in this organelle. A bacterial homolog of PcUre2p1 called YfcG with 43% amino acid

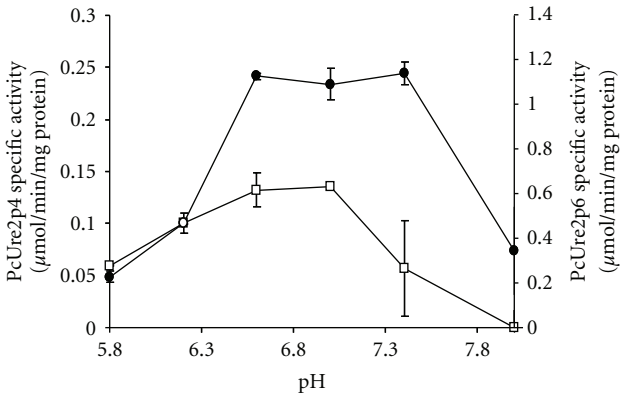


Figure 6: pH dependency of PcUre2p4 (□) and PcUre2p6 (•) activities using CDNB as substrate. Experimental details are given in Section 2 .

identity has been characterized in *Escherichia coli* [41]. Since this Ure2pB isoform is largely represented among fungi (Figure 2), the question of a putative bacterial origin is open.

In conclusion, we showed in this study that Ure2p GSTs in *P. chrysosporium* do not have the same role as ScUre2p. The repartition into 2 distinct subclasses in many fungi suggests that these proteins have evolved separately inside the Ure2p class, adapting their functional specificities to environmental constraints. It is indeed assumed that the genes that are under external pressure may evolve to carry out myriad functions with diverse substrate specificities through local duplications followed by diversification. The putative link between the saprophytic properties of the fungi and the function of the Ure2p proteins remains to be elucidated to consider the use of these GSTs with high substrate specificities as environmental biomarkers.

Additional Data

Sequences used in the phylogenetic analysis in Figures 1 and 2 are from NCBI and JGI databases.

Acknowledgments

The research was supported by an ANR Project (ANR-06-BLAN-0386). The authors would like to thank Aurélie Cébron for comments on the paper and Thierry Beguiristain for his help.

References

[1] A. Torres-Rivera and A. Landa, "Glutathione transferases from parasites: a biochemical view," *Acta Tropica*, vol. 105, no. 2, pp. 99–112, 2008.

[2] S. McGoldrick, S. M. O'Sullivan, and D. Sheehan, "Glutathione transferase-like proteins encoded in genomes of yeasts and fungi: insights into evolution of a multifunctional protein superfamily," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 242, no. 1, pp. 1–12, 2005.

[3] E. Öztetik, "A tale of plant glutathione S-transferases: since 1970," *Botanical Review*, vol. 74, no. 3, pp. 419–437, 2008.

[4] D. P. Dixon, T. Hawkins, P. J. Hussey, and R. Edwards, "Enzyme activities and subcellular localization of members of the arabidopsis glutathione transferase superfamily," *Journal of Experimental Botany*, vol. 60, no. 4, pp. 1207–1218, 2009.

[5] C. Burns, R. Geraghty, C. Neville, A. Murphy, K. Kavanagh, and S. Doyle, "Identification, cloning, and functional expression of three glutathione transferase genes from *Aspergillus fumigatus*," *Fungal Genetics and Biology*, vol. 42, no. 4, pp. 319–327, 2005.

[6] A. Garcerá, L. Barreto, L. Piedrafita, J. Tamarit, and E. Herrero, "*Saccharomyces cerevisiae* cells have three Omega class glutathione S-transferases acting as 1-Cys thiol transferases," *Biochemical Journal*, vol. 398, no. 2, pp. 187–196, 2006.

[7] M. Morel, A. A. Ngadin, M. Droux, J. P. Jacquot, and E. Gelhaye, "The fungal glutathione S-transferase system. Evidence of new classes in the wood-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 66, no. 23, pp. 3711–3725, 2009.

[8] M. Morel, A. A. Ngadin, J. P. Jacquot, and E. Gelhaye, "Chapter 6 reactive oxygen species in *Phanerochaete chrysosporium*: relationship between extracellular oxidative and intracellular antioxidant systems," *Advances in Botanical Research*, vol. 52, pp. 153–186, 2009.

[9] D. Contreras, J. Rodríguez, J. Freer, B. Schwederski, and W. Kaim, "Enhanced hydroxyl radical production by dihydroxybenzene-driven Fenton reactions: implications for wood biodegradation," *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, vol. 12, no. 7, pp. 1055–1061, 2007.

[10] I. Kelley, J. P. Freeman, and C. E. Cerniglia, "Identification of metabolites from degradation of naphthalene by a Mycobacterium sp," *Biodegradation*, vol. 1, no. 4, pp. 283–290, 1990.

[11] J. S. Yadav, H. Doddapaneni, and V. Subramanian, "P450ome of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: structure, evolution and regulation of expression of genomic P450 clusters," *Biochemical Society Transactions*, vol. 34, no. 6, pp. 1165–1169, 2006.

[12] D. Martinez, J. Challacombe, I. Morgenstern et al., "Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 6, pp. 1954–1959, 2009.

[13] D. Blinder, P. W. Coschigano, and B. Magasanik, "Interaction of the GATA factor Gln3p with the nitrogen regulator Ure2p in *Saccharomyces cerevisiae*," *Journal of Bacteriology*, vol. 178, no. 15, pp. 4734–4736, 1996.

[14] T. T. Todorova, V. Y. Petrova, S. Vuilleumier, and A. V. Kujumdzieva, "Response to different oxidants of *Saccharomyces cerevisiae* ure2Δ mutant," *Archives of Microbiology*, vol. 191, no. 11, pp. 837–845, 2009.

[15] J. A. Fraser, M. A. Davis, and M. J. Hynes, "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," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, no. 6, pp. 2802–2808, 2002.

[16] D. Martinez, L. F. Larrondo, N. Putnam et al., "Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78," *Nature Biotechnology*, vol. 22, no. 6, pp. 695–700, 2004.

[17] M. Tien and T. K. Kirk, "Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*," *Methods in Enzymology*, vol. 161, no. C, pp. 238–249, 1988.

[18] K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar, "MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 28, no. 10, pp. 2731–2739, 2011.

[19] P. M. Schenk, S. Baumann, R. Mattes, and H. H. Steinbiss, "Improved high-level expression system for eukaryotic genes in Escherichia coli using T7 RNA polymerase and rare (Arg)tRNAs," *BioTechniques*, vol. 19, no. 2, pp. 196–198, 1995.

[20] N. Rouhier, E. Gelhaye, P. E. Sautiere et al., "Isolation and characterization of a new peroxiredoxin from poplar sieve tubes that uses either glutaredoxin or thioredoxin as a proton donor," *Plant Physiology*, vol. 127, no. 3, pp. 1299–1309, 2001.

[21] A. Holmgren and F. Aslund, "Glutaredoxin," *Methods in Enzymology*, vol. 252, pp. 283–292, 1995.

[22] E. J. Collinson, G. L. Wheeler, E. O. Garrido, A. M. Avery, S. V. Avery, and C. M. Grant, "The yeast glutaredoxins are active as glutathione peroxidases," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 19, pp. 16712–16717, 2002.

[23] A. K. Whitbread, A. Masoumi, N. Tetlow, E. Schmuck, M. Coggan, and P. G. Board, "Characterization of the omega class of glutathione transferases," *Methods in Enzymology*, vol. 401, pp. 78–99, 2005.

[24] C. E. Cerniglia, "Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation," *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 19, no. 5-6, pp. 324–333, 1997.

[25] A. Verdin, A. Lounès-Hadj Sahraoui, R. Newsam, G. Robinson, and R. Durand, "Polycyclic aromatic hydrocarbons storage by Fusarium solani in intracellular lipid vesicles," *Environmental Pollution*, vol. 133, no. 2, pp. 283–291, 2005.

[26] L. Bousset, H. Belrhali, R. Melki, and S. Morera, "Crystal structures of the yeast prion Ure2p functional region in complex with glutathione and related compounds," *Biochemistry*, vol. 40, no. 45, pp. 13564–13573, 2001.

[27] Z. R. Zhang, M. Bai, X. Y. Wang, J. M. Zhou, and S. Perrett, ""Restoration" of glutathione transferase activity by single-site mutation of the yeast prion protein Ure2," *Journal of Molecular Biology*, vol. 384, no. 3, pp. 641–651, 2008.

[28] H. Y. Lian, Y. Jiang, H. Zhang, G. W. Jones, and S. Perrett, "The yeast prion protein Ure2: structure, function and folding," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1764, no. 3, pp. 535–545, 2006.

[29] C. Thual, L. Bousset, A. A. Komar et al., "Stability, folding, dimerization, and assembly properties of the yeast prion Ure2p," *Biochemistry*, vol. 40, no. 6, pp. 1764–1773, 2001.

[30] Z. R. Zhang and S. Perrett, "Novel glutaredoxin activity of the yeast prion protein ure2 reveals a native-like dimer within fibrils," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 21, pp. 14058–14067, 2009.

[31] M. Bai, J. M. Zhou, and S. Perrett, "The yeast prion protein Ure2 shows glutathione peroxidase activity in both native and fibrillar forms," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 48, pp. 50025–50030, 2004.

[32] B. P. Niranjan Reddy, G. B. Prasad, and K. Raghavendra, "In silico characterization and comparative genomic analysis of the Culex quinquefasciatus glutathione S-transferase (GST) supergene family," *The journal Parasitology Research*. In press.

[33] R. N. Armstrong, "Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases," *Chemical Research in Toxicology*, vol. 10, no. 1, pp. 2–18, 1997.

[34] H. J. Atkinson and P. C. Babbitt, "Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold," *Biochemistry*, vol. 48, no. 46, pp. 11108–11116, 2009.

[35] E. Meux, P. Prosper, A. A. Ngadin et al., "Glutathione transferases of *Phanerochaete chrysosporium*: S-glutathionyl-p-hydroquinone reductase belongs to a new structural class," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 11, pp. 9162–9173, 2011.

[36] E. Veignie, C. Rafin, D. Landy, S. Fourmentin, and G. Surpateanu, "Fenton degradation assisted by cyclodextrins of a high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon benzo[a]pyrene," *Journal of Hazardous Materials*, vol. 168, no. 2-3, pp. 1296–1301, 2009.

[37] G. R. Tortella, M. C. Diez, and N. Duran, "Fungal diversity and use in decomposition of environmental pollutants," *Critical Reviews in Microbiology*, vol. 31, no. 4, pp. 197–212, 2005.

[38] C. Wang, H. Sun, J. Li, Y. Li, and Q. Zhang, "Enzyme activities during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in soils," *Chemosphere*, vol. 77, no. 6, pp. 733–738, 2009.

[39] S. Özcean, V. Yildirim, L. Kaya et al., "*Phanerochaete chrysosporium* soluble proteome as a prelude for the analysis of heavy metal stress response," *Proteomics*, vol. 7, no. 8, pp. 1249–1260, 2007.

[40] V. Subramanian and J. S. Yadav, "Role of P450 monooxygenases in the degradation of the endocrine-disrupting chemical nonylphenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 75, no. 17, pp. 5570–5580, 2009.

[41] M. C. Wadington, J. E. Ladner, N. V. Stourman, J. M. Harp, and R. N. Armstrong, "Analysis of the structure and function of YfcG from *Escherichia coli* reveals an efficient and unique disulfide bond reductase," *Biochemistry*, vol. 48, no. 28, pp. 6559–6561, 2009.

Chapitre 2 : Diversité biochimique, structurale et fonctionnelle au sein de la classe des Ure2p

A : Caractérisation de Ure2pB1 de *Phanerochaete chrysosporium*

Les travaux de cette thèse de doctorat se sont d'abord focalisés sur l'étude du seul représentant Ure2pB de *P. chrysososporium* du fait de sa conservation au sein des basidiomycètes. Il s'agit également de la première étude biochimique et structurale d'une Ure2pB fongique alors que 2 homologues bactériens avaient déjà été caractérisés. Deux sites de liaison du glutathion ont été mis en évidence permettant la fixation d'un glutathion oxydé ou de deux glutathion réduits sur la protéine. Cette fixation est stabilisée par la présence d'une asparagine en position 18 qui, d'après des expériences de mutagenèse dirigée, est essentielle à l'activité catalytique, contrairement aux 2 cystéines présentes en position 66 et 223 dans la séquence dont la mutation n'affecte pas l'activité. Cette protéine, comme ses homologues bactériens, n'a pas d'activité typique glutathion transférase mais est capable de réaliser des réactions de déglutathionylation de petits substrats tels que l'acide déhydroascorbique et l'hydroxyéthyl-disulfide. Elle peut également déglutathionyler le phényl-acétophénone glutathionylé, un composé contenant deux cycles aromatiques. Les cystéines n'étant pas impliquées dans la catalyse, le glutathion réduit servirait de cofacteur pour la catalyse dans la mesure où l'équilibre glutathion réduit / glutathion oxydé affecte fortement la réaction. Cette GST se démarque des GST cytosoliques classiques par sa capacité à réduire des protéines comme l'insuline en présence de glutathion. De même l'utilisation d'une sonde fluorescente a permis de mettre en évidence une activité de déglutathionylation d'une autre GST de *P. chrysosporium* (PcGSTO3).

Ces résultats sont présentés sous la forme d'un article publié dans *FEBS Letters* (doi : 10.1016/j.febslet.2013.05.031) (**Article 2**).

Article 2 : Atypical features of a Ure2p glutathione transferase from Phanerochaete chrysosporium

FEBS Letters 587 (2013) 2125–2130

FEBS Letters

journal homepage: www.FEBSLetters.org

Atypical features of a Ure2p glutathione transferase from *Phanerochaete chrysosporium*

Anne Thuillier [a,b,1], Thomas Roret [c,d,1], Frédérique Favier [c,d], Eric Gelhaye [a,b], Jean-Pierre Jacquot [a,b], Claude Didierjean [c,d,*], Mélanie Morel-Rouhier [a,b,*]

[a] *Université de Lorraine, IAM, UMR 1136, IFR 110 EFABA,Vandoeuvre-lès-Nancy F-54506, France*
[b] *INRA, IAM, UMR 1136, Vandoeuvre-les-Nancy F-54506, France*
[c] *Université de Lorraine, CRM2, UMR 7036, Vandoeuvre-les-Nancy F-54506, France*
[d] *CNRS, CRM2, UMR 7036, Vandoeuvre-les-Nancy F-54506, France*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 28 February 2013
Revised 2 May 2013
Accepted 3 May 2013
Available online 24 May 2013

Edited by Stuart Ferguson

Keywords:
Glutathione transferase
Deglutathionylation
Structure
Phanerochaete chrysosporium

ABSTRACT

Glutathione transferases (GSTs) are known to transfer glutathione onto small hydrophobic molecules in detoxification reactions. The GST Ure2pB1 from *Phanerochaete chrysosporium* exhibits atypical features, i.e. the presence of two glutathione binding sites and a high affinity towards oxidized glutathione. Moreover, PcUre2pB1 is able to efficiently deglutathionylate GS-phenacylacetophenone. Catalysis is not mediated by the cysteines of the protein but rather by the one of glutathione and an asparagine residue plays a key role in glutathione stabilization. Interestingly PcUre2pB1 interacts in vitro with a GST of the omega class. These properties are discussed in the physiological context of wood degrading fungi.

Structured summary of protein interactions:
PcUre2pB1 and **PcUre2pB1** bind by X-ray crystallography (View interaction)
PcUre2pB1 enzymaticly reacts **PcGTO3** by enzymatic study (View interaction)

© 2013 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Glutathione transferases (GSTs) are phase II detoxification enzymes, catalyzing the addition of glutathione (GSH) onto electrophilic centers of various hydrophobic substrates modifying their solubility and improving their elimination or storage in phase III. These enzymes are usually involved in toxic compound catabolism, stress responses but also cell development, transport or metabolism. They belong to a large superfamily, which structurally consists of a more or less conserved thioredoxin-like N-terminal domain, involved in GSH binding (G-site) and a more variable helix-rich C-terminal domain, interacting with the hydrophobic substrates (H-site). GSTs, usually organized as homodimers, are present in almost all living organisms and their classification is mainly based on primary structure homologies.

In fungi, 4 main GST classes have been studied (Omega (GSTO), Fungal specific class A (GSTFuA), Glutathione Transferase (GTT) and Ure2p [1]. The Ure2p class has been recently analyzed [2]. It consists of 2 subclasses: Ure2pA, which is extended in saprophytic fungi and Ure2pB, which consists in one or few isoforms per organism [2]. While Ure2pA is fungal specific, Ure2pB sequences have been found to show homologies with bacterial sequences. Two of these homologues YfcG and YghU from *Escherichia coli* have been characterized at the protein level and appeared to be atypical glutathione transferases [3,4]. They are as efficient as glutaredoxin and thioredoxin in disulfide bond reduction in 2-hydroxyethyldisulfide. Crystallographic results revealed two glutathione binding sites within the proteins allowing the interaction with either one oxidized glutathione (GSSG) or alternatively two GSH molecules. The lack of functional cysteine residues in the active site of these enzymes suggests that the reductase activity is unique in that no sulfhydryl groups in the proteins are involved in the redox chemistry. It has been suggested that the non-covalently bound thiol-disulfide couple (2GSH/GSSG) could perform the reaction.

In this paper, we report the first structural and biochemical characterization of a fungal Ure2pB GST (PcUre2pB1 from

* Corresponding authors. Address: Université de Lorraine, Interactions Arbres/Micro-Organismes (IAM), UMR 1136, IFR 110 EFABA, Faculté des Sciences et Technologies, Bld des Aiguillettes, BP 70239, Vandoeuvre-les-Nancy F-54506, France. Fax: +33 3 68 42 28 (M. Morel-Rouhier), Université de Lorraine, Laboratoire de Cristallographie, Résonance Magnétique et Modélisations (CRM2), Equipe Biocristallographie, UMR 7036, Faculté des Sciences et Technologies, Bld des Aiguillettes, BP239, Vandoeuvre-les-Nancy F-54506, France. Fax: +33 3 68 43 00 (C. Didierjean).

E-mail addresses: Claude.Didierjean@univ-lorraine.fr (C. Didierjean), Melanie.Morel@univ-lorraine.fr (M. Morel-Rouhier).

[1] These authors have equally participated to the work.

0014-5793/$36.00 © 2013 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.031

Phanerochaete chrysosporium, a well-studied white-rot basidiomycete). We demonstrate that, additionally to exhibit the same atypical features than its bacterial homologues, PcUre2pB1 exhibits an unexpected activity in protein deglutathionylation. The putative physiological functions of these conserved proteins are discussed.

2. Materials and methods

2.1. Cloning, site-directed mutagenesis, production and purification of recombinant proteins

PcUre2pB1 (JGI ProtID 503) open reading frame was amplified from *P. chrysosporium* RP-78 cDNA and cloned into the pET-3d plasmid (Novagen). PcUre2pB1N18A, PcUre2pB1C66S, PcUre2pB1C223S and PcUre2pB1C66SC223S mutants were generated using complementary mutagenic primers. All primer sequences are given in Supplemental Table S1. Proteins were expressed, produced and purified as described in Appendix A of Supplementary methods.

2.2. Crystallization, X-ray diffraction data collection and structure resolution

PcUre2pB1 was crystallized using the microbatch under oil method at 4 °C. X-ray data at 1.45 Å were collected at 100 K on beamline FIP-BM30A at ESRF (Grenoble, France). The molecular-replacement solution model was refined using PHENIX [5]. Crystallization, data processing, phasing and model refinement were detailed in Appendix B (Supplementary methods) and Table S2.

2.3. Activity measurement

Hydroxyethyldisulfide (HED) was incubated with GSH to allow the spontaneous formation of glutathionylated β-mercaptoethanol (β-ME-SG). Then, β-ME-SG deglutathionylation tests and dehydroascorbate reductase activity using dehydroascorbate (DHA) as substrate were performed spectrophotometrically in conditions described previously [2]. Deglutathionylation of S-(phenacylacetophenone)-glutathione (PAP-SG) was measured by High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) as described previously [6] and influence of oxidized glutathione (GSSG) was assessed by addition of 0 to 6 mM GSSG at fixed PAP-SG and GSH concentrations.

2.4. Determination of free thiol groups of PcUre2pB1 and mutants

The number of free thiol groups was determined spectrophotometrically using 5,5′-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) as described previously [7,8]. Proteins were used as native, SDS-denaturated (1% SDS), DTT-reduced (excess of 100 fold DTT), and both DTT-reduced and SDS-denatured. DTT was then eliminated onto a Sephadex G-25 column and the proteins were concentrated with Amicon© Ultra Centrifugal filters.

2.5. Interactions of PcUre2pB1 with proteins

Insulin reduction was measured as described by Zaffagnini et al. [8] by following the reduction-generated turbidity at 650 nm of 0.75 mg/ml insulin in presence of 10 μM of PcUre2pB1 wild type and mutants. Addition of 330 μM DTT or 4 mM GSH started the reaction. Positive controls were performed using the thioredoxin PtTrxh1 and the glutaredoxin PtGrxC1 [9]. Protein deglutathionylation activity was visualized on SDS–PAGE gel using the recently characterized PcGSTO3, which can activate and bind the fluorescent dye CellTracker™ Green CMFDA (5-chloromethylfluorescein-diacetate) (Invitrogen) on its catalytic cysteine. Since this cysteine is glutathionylated in the native protein, the binding of the probe and thus fluorescence visualization occur only when PcGSTO3 is previously reduced [10]. The detailed procedure is given in Appendix C of Supplementary methods.

3. Results

3.1. Crystal structure of PcUre2pB1

The crystal structure of wild type PcUre2pB1 was solved by molecular replacement at a resolution of 1.45 Å, using the structure of YfcG from *E. coli* as the search model (PDB ID 3GX0). PcUre2pB1 adopts the canonical GST fold with a classical dimeric organization (Fig. 1 and Fig. S1). The electron density map revealed unambiguously one oxidized glutathione molecule (GSSG) per monomer (Fig. 1) probably loaded during protein production in *E. coli* as no additional glutathione was added during crystallization. One half of the GSSG molecule (GS-1) is bound to the G-site and forms 6 hydrogen bonds with the protein, 5 of which being usually observed in the GST/GSH complex structures (Fig. S2). The second half (GS-2) is anti parallel to GS-1 allowing the formation of three intra molecular hydrogen bonds. Concerning GS-2, only the terminal carboxylate groups of the glycinyl and glutamyl moieties interact with PcUre2pB1 with the side chains of N18 (in the loop β1-α1) and R150 (in α5 of the other subunit), respectively. The sulfur atom of GS-1 is roughly equidistant to the side chains of T16 and N18, and could therefore play a role in catalysis. T16 occupies the position of the catalytic residue in GSTs using a serine or a cysteine to assist the glutathione in thiol or GSH transferase activities [3]. An arginine in a position equivalent to N18 was recently discovered

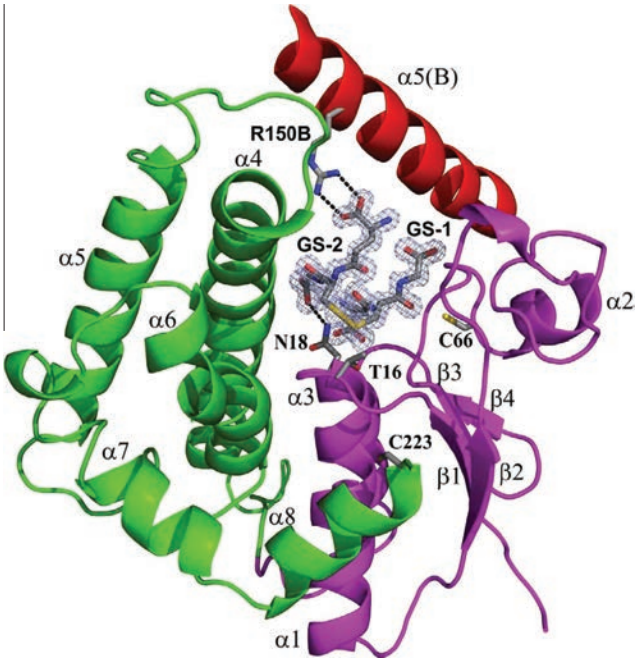


Fig. 1. Schematic drawing of PcUre2pB1 structure. The figure highlights the structural features discussed in the manuscript: positions of the PcUre2pB1 cysteinyl residues which could have a critical role in catalysis; T16 which occupies the position of the catalytic residue of serinyl- or cysteinyl-GSTs; GSSG binding site with the residues involved in the GS-2 moiety stabilization (N18 and R150 from the other subunit). These two residues are well conserved in the Ure2p-like class. N-terminal and C-terminal domains of monomer A are in magenta and green, respectively. Helix α5 of monomer B is colored in red. Side chains of T16, N18, C66, C223 and R150 (monomer B) and the GSSG molecule are shown as sticks with final 2Fo-Fc electron density (1.2σ contour level) covering GSSG. Intermolecular interactions are indicated as black dashed lines. Secondary structures are labeled.

as essential for catalysis in a GST from *Agrobacterium tumefaciens* [11].

A search with DALI [12] revealed that structural homologues of PcUre2pB1 are YfcG [4] and YghU [3] from *E. coli*, Ure2p from *Saccharomyces cerevisiae* [13], a Ure2p-like protein from *Pseudomonas protegens* Pf-5 (PpUre2pB1) and a Ure2p-like from *Pseudomonas aeruginosa* PACS2 (PaUre2pB1) (Figs. S3 and S4 and Table S3). PpUre2pB1 and PaUre2pB1 structures were recently solved in structural genomic programs. Clearly, the structural sequence alignment confirms that EcYfcG, EcYghU, PpUre2pB1, PaUre2pB1 and PcUre2pB1 belong to the Ure2pB subfamily, while ScUre2p is a member of the Ure2pA subfamily. Like PcUre2pB1, EcYfcG, EcYghU and PpUre2pB1 contain two glutathione molecules (oxidized or reduced) per monomer while only one is present in ScUre2p and PaUre2p. Recently, Stourman et al. [3] defined EcYfcG and EcYghU as members of a new GST class mainly because of their unique property to bind two molecules of GSH (oxidized or reduced) in their active site. PcUre2pB1 and PpUre2pB1 use residues similar to those of the *E. coli* enzymes to bind the two GSH moieties (Fig. S2). All the structures cited in this paragraph, including PcUre2pB1, share many structural features although they probably possess different roles in vivo. Among the structural features of this new GST class, the invariant R150 (PcUre2pB1 numbering), which is located in the second helix (α5) of the C-terminal domain, is a fingerprint of the Ure2p class. This arginine is an anchoring site for the GS-2 moiety in PcUre2pB1, EcYfcG, EcYghU and PpUre2pB1. By contrast this arginine does not seem essential in ScUre2p and PaUre2pB1.

3.2. Enzymatic activities

Incubation of HED with GSH in the absence of enzyme leads to the spontaneous formation of glutathionylated β-mercaptoethanol (β-ME-SG) [14]. Addition of PcUre2pB1 to β-ME-SG resulted in a mass loss of 306 Da corresponding to the removal of the glutathione adduct. The catalytic parameters of this activity such as those for dehydroascorbate reductase activity are reported in Table 1. These activities are independent of the two cysteinyl residues present in the protein since the mutants PcUre2pB1C66S, PcUre2pB1C223S and PcUre2pB1C66SC223S are still active in these enzymatic tests. These results are in agreement with the PcUre2pB1WT structure since both cysteinyl residues (C66 and C233) are distant by more than 10 Å from the expected active site and their thiol groups exhibit a quasi null solvent accessible surface. K_m values for β-ME-SG of PcUre2pB1WT and PcUre2pB1N18A are quite similar, suggesting that substrate recognition is not affected by the mutation, however k_{cat} is strongly reduced for the mutant, demonstrating the essential role in catalysis of the conserved asparagine at position 18.

Compared to yeast glutaredoxins (Grx1, Grx6 and Grx7), PcUre2pB1 exhibits lower K_m value (2.5, 5 and 37-fold respectively) and lower k_{cat} value (8, 17 and 22-fold) for β-ME-SG [14]). Another glutathionylated substrate (Phenacylacetophenone-SG, (PAP-SG)) was tested. This substrate has already been found to be deglutathionylated by PcGSTO3, an omega class GST from *P. chrysosporium*, which possesses a catalytic cysteine [6]. Glutathione alone does not deglutathionylate PAP-SG. As shown in Table 1, PcUre2pB1 and its cysteinyl mutants are able to remove glutathione from this substrate much more efficiently than from β-ME-SG.

3.3. Asparagine 18 has a key role in glutathione stabilization

Based on structural data, a GSSG molecule was found linked to PcUre2pB1 through non-covalent interactions (Fig. 1). The presence of GSSG among the protein prevents its activity since PAP-SG deglutathionylation by PcUre2pB1 is inhibited when increasing the GSSG/GSH ratio (Fig. 2). GSSG titration confirmed the presence of this compound in the untreated PcUre2pB1WT as well as in the untreated cysteinyl and asparaginyl mutants (Table S4). Thiol content has been determined to investigate the accessibility of cysteines in untreated, SDS treated, reduced dialyzed, and reduced dialyzed and SDS treated samples (Table S5). One of the two cysteines is not accessible to DTNB in untreated conditions. However, all cysteinyl thiols and even more are titrable in reduced conditions showing the presence of additional thiols, probably due to residual bound and reduced GSH. This suggests that the binding of glutathione is tight enough to be maintained within the proteins and thus to be titrated through the DTNB assay after reduction and dialysis. By contrast, the PcUre2pB1N18A mutant does not show any additional thiol after reduction (2.04 ± 0.01 thiols per molecule). Since only one thiol can be detected in PcUre2pB1WT, the two free thiols found in PcUre2pB1N18A suggest that this mutant can undergo conformational changes that expose the second buried cysteine and decrease the binding affinity of reduced glutathione, which is then lost during dialysis (Table S5). Indeed the crystal structure of PcUre2pB1WT revealed an interaction between the side-chain amide group of N18 and the C-terminal carboxylate group of the glycinyl GS-2 moiety. This interaction is obviously lost in the PcUre2pB1N18A mutant.

Table 1
Enzymatic activities of PcUre2pB1WT and mutants, using glutathionylated β-mercaptoethanol (β-ME-SG), dehydroascorbate (DHA) and glutathionylated-phenacylacetophenone (PAP-SG). ±S.D. (n ± 3).

	β-ME-SG	DHA	PAP-SG
K_m (μM)			
PcUre2pB1	79 ± 14	189 ± 25	1277 ± 191
PcUre2pB1C66S	83 ± 10	134 ± 15	953 ± 138
PcUre2pB1C223S	54 ± 4	489 ± 155	1664 ± 430
PcUre2pB1C66SC223S	63 ± 6	92 ± 37	923 ± 93
PcUre2pB1N18A	111 ± 18	132 ± 12	320 ± 65
k_{cat} (min^{-1})			
PcUre2pB1	103 ± 3	74 ± 2	345 011 ± 24 773
PcUre2pB1C66S	156 ± 4	87 ± 3	45 097 ± 2508
PcUre2pB1C223S	161 ± 3	100 ± 61	194 220 ± 21 956
PcUre2pB1C66SC223S	164 ± 4	327 ± 56	87 350 ± 3316
PcUre2pB1N18A	3.3 ± 0.1	1.9 ± 0.1	421 ± 22

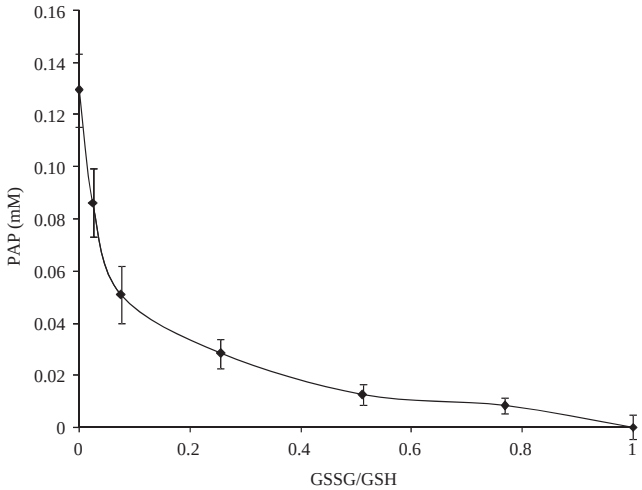


Fig. 2. Inhibition of PAP-SG deglutathionylation activity of PcUre2pB1 by GSSG. PAP was quantified by HPLC at 293 nm after 1 min incubation of 0.4 mM PAP-SG, 34 nM PcUre2pB1, 6 mM GSH and a range of 0–6 mM GSSG in TE pH8.

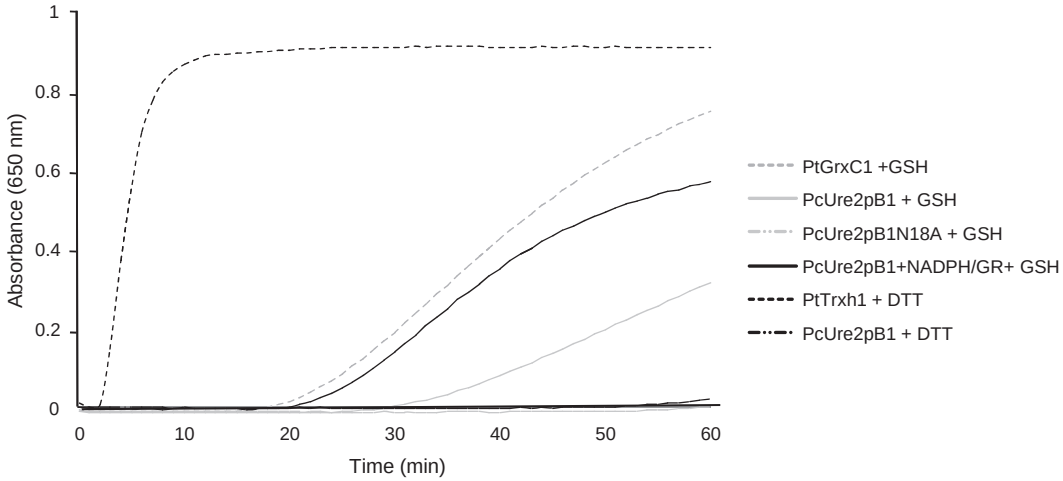


Fig. 3. Reduction of insulin by PcUre2pB1 and PcUre2pB1N18A. PtGrx1 and PtTrxh1 were used as positive control using GSH and DTT respectively. GSH and DTT alone are not able to reduce insulin (not reported on the figure).

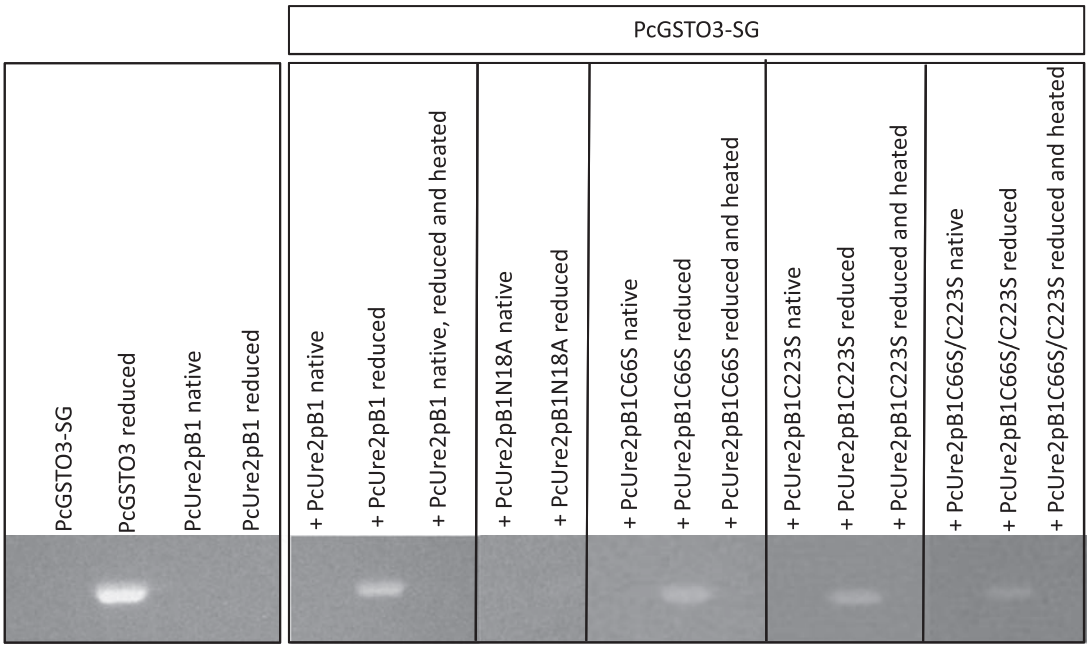


Fig. 4. Interaction between PcUre2pB1 and PcGSTO3 revealed by in gel fluorescence of CMFDA covalently bound onto PcGSTO3. Details are given in Supplementary methods.

3.4. Interactions of PcUre2pB1 with client proteins

3.4.1. Insulin reduction

Insulin precipitates when its disulfide bonds are reduced. This precipitation can be evaluated by turbidimetry following the absorbance at 650 nm. As previously shown [8,9], glutaredoxin (PtGrxC1) and thioredoxin (PtTrxh1) are active in this test in presence of GSH and DTT respectively. DTT and GSH alone are not able to promote insulin precipitation at least at low concentrations over 40 min at pH 8.0 (data not shown). We use this test to evaluate the ability of PcUre2pB1 to catalyze reduction of high molecular target. However it is not a classical disulfide activity since GSH is not used as a reductant but rather as a cofactor for PcUre2pB1, which is active in the presence of GSH but remained inactive in the presence of DTT (Fig. 3). This activity is strongly enhanced adding the NADPH/GR system; this latter probably preventing accumulation of GSSG, which could inhibit the reaction, as shown for PAP-SG deglutahionylation experiments. The cysteinyl mutants exhibit similar activity compared to the WT (data not shown), while PcUre2pB1N18A remained fully inactive for insulin reduction whatever the test conditions used. This suggests again a key role of bound glutathione for PcUre2pB1 activity.

3.4.2. Interactions with PcGSTO3

PcGSTO3 is a GST from the omega class of *P. chrysosporium*. It is natively glutathionylated (PcGSTO-SG) through covalent interaction with a catalytic cysteine [6]. Moreover, the deglutathionylated form of PcGSTO3 is able to activate and bind the fluorescent CMFDA dye onto the cysteine (Fig. 4) [10]. Using competition experiments it is thus feasible to discriminate whether the protein is glutathionylated or not. This property has been used to evaluate the capacity of PcUre2pB1 to deglutathionylate proteins. PcUre2pB1 and PcUre2pB1N18A under their native or reduced form are not able to bind the probe (Fig. 4). Incubating PcGSTO3-SG with

PcUre2pB1 previously reduced and dialyzed, revealed a fluorescent signal on SDS–PAGE gel. This suggests that PcGSTO3 has been reduced by PcUre2pB1 allowing the binding of the fluorescent probe onto the PcGSTO3 catalytic cysteine. The same experiment has been performed using heat inactivated reduced PcUre2pB1 to ensure that the detected activity is not due to residual DTT or GSH in the mixture. No signal was detected showing that the deglutathionylation activity of PcGSTO3 is indeed mediated by PcUre2pB1. This activity is independent of the PcUre2pB1 cysteines since the cysteinyl single and double mutated proteins (PcUre2pB1C66S, PcUre2pB1C223S and PcUre2pB1C66SC223S) exhibit the same profile than the wild type. By contrast, native PcUre2pB1 containing GSSG, and PcUre2pB1N18A (native or reduced) remained fully inactive in this test, revealing the key role of N18 and reduced glutathione in PcUre2pB1 catalysis.

4. Discussion

PcUre2pB1 was previously described as belonging to the fungal Ure2pB subclass [2]. Almost all considered basidiomycete genomes (98%) possess at least one Ure2pB sequence, suggesting a conserved important function of these proteins in fungal kingdom [1].

From our results, it appears clearly that PcUre2pB1 possesses the same biochemical and structural features than those displayed by the bacterial EcYfcG and EcYghU, in particular the presence of two glutathione binding sites, a high affinity towards GSSG and a disulfide reductase activity [3,4]. These features led Stourman et al. [3] to define a new GST class that they named Nu. Here, we suggest that PcUre2pB1 belongs to this newly described class, although this should not be confused with the GST class specific to lower invertebrate parasites, which was named similarly [15].

In this study, we have shown that, besides a deglutathionylation activity towards small molecules, PcUre2pB1 could be involved in glutathionylation/deglutathionylation of proteins, this latter activity being dependent on the GSSG/GSH ratio and thus on the cellular redox state. PcUre2B1 thus exhibits the same molecular mechanism than the one proposed for bacterial YfcG except that it accepts glutathionylated substrates such as proteins. To date only few GSTs have been described as being able to interact with proteins. Mammalian GSTs from Pi class have been shown to act in signalling pathways and protein S-glutathionylation in cancer [16]. In vivo GSTPi occurs in monomer–dimer equilibrium and monomer can bind to and regulate JNK and TRAF, which are proteins involved in regulation of apoptosis and cell proliferation. Exposure of the cell to a range of stresses can change the redox potential in the cell causing the dissociation of the complex and oligomerisation of GSTPi [17]. In *S. cerevisiae* Ure2p was assumed to interact with Gln3p which is a transcription activator in the nitrogen metabolism [18]. Complementation tests revealed that overexpressing PcUre2pB1 in a delta-Ure2p yeast mutant has no impact on nitrogen regulation (data not shown) suggesting that the *P. chrysosporium* isoform is not able to interact with yeast Gln3p. However this does not exclude a putative role of PcUre2pB1 in signalling or regulation in *P. chrysosporium*. In particular, *P. chrysosporium* is exposed to oxidative stress during wood degradation and a fine balance must exist between the regulation of the ligninolytic enzymes, which generate toxic lignin-derived compounds and the intracellular stress response machinery.

In microorganisms, the few available data show an involvement of these GSTs in stress response. The bacterial strain deleted for EcYfcG exhibits an increasing sensitivity toward hydrogen peroxide [19]. In *Aspergillus nidulans*, the GSTA mutant is sensitive to xenobiotics and heavy metals [20] and in *P. chrysosporium*, the expression of PcUre2pB1 is upregulated in presence of nonylphenol [21]. In bacteria, EcYfcG might interact with glutathionylspermidin and perhaps utilizes it as a substrate or a regulatory molecule [3,4]. However, the physiological targets (substrates and proteins) of these microbial specific proteins remain to be identified and will help to decipher their physiological roles.

Acknowledgments

We thank the staff and particularly David Cobessi at ESRF beamline FIP-BM30A for assistance with synchrotron data collection and François Dupire for mass analyses. This work was supported by the French National Research Agency (ANR-09-BLAN-0012) and the Laboratory of Excellence ARBRE (ANR-12-LABXARBRE-01).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.031.

References

[1] Morel, M., Meux, E., Mathieu, Y., Thuillier, A., Chibani, K., Harvengt, L., Jacquot, J.-P. and Gelhaye, E. (2013) Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi. Microb. Biotechnol. 6, 248–263.
[2] Thuillier, A., Ngadin, A., Thion, C., et al. (2011) Functional Diversification of Fungal Glutathione Transferases from the Ure2p Class. Int. J. Evol. Biol.. http://dx.doi.org/ 10.4061/2011/938308.
[3] 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.
[4] 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.
[5] Adams, P.D. et al. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 66, 213–221.
[6] Meux, E. 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.
[7] Ellman, G.L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 82, 70–77.
[8] Zaffagnini, M., Michelet, L., Massot, V., Trost, P. and Lemaire, S.D. (2008) Biochemical characterization of glutaredoxins from Chlamydomonas reinhardtii reveals the unique properties of a chloroplastic CGFS-type glutaredoxin. J. Biol. Chem. 283, 8868–8876.
[9] Couturier, J., Didierjean, C., Jacquot, J.-P. and Rouhier, N. (2010) Engineered mutated glutaredoxins mimicking peculiar plant class III glutaredoxins bind iron-sulfur centers and possess reductase activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 403, 435–441.
[10] Meux, E., Morel, M., Lamant, T., Gerardin, P., Jacquot, J.P., Dumarcay, S. and Gelhaye, E. (2012) New substrates and activity of *Phanerochaete chrysosporium* Omega glutathione transferases. Biochimie 95, 336–346.
[11] 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.
[12] Holm, L. and Rosenström, P. (2010) Dali server: conservation mapping in 3D. Nucleic Acids Res. 38, W545–W549.
[13] Bousset, L., Belrhali, H., Janin, J., Melki, R. and Morera, S. (2001) Structure of the globular region of the prion protein Ure2 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Structure (London, England: 1993) 9, 39–46.
[14] Luo, M. et al. (2010) Structural and biochemical characterization of yeast monothiol glutaredoxin Grx6. J. Mol. Biol. 398, 614–622.
[15] Schuller, D.J., Liu, Q., Kriksunov, I.A., Campbell, A.M., Barrett, J., Brophy, P.M. and Hao, Q. (2005) Crystal structure of a new class of glutathione transferase from the model human hookworm nematode *Heligmosomoides polygyrus*. Proteins: Struct., Funct., Bioinf. 61, 1024–1031.
[16] Tew, K.D., Manevich, Y., Grek, C., Xiong, Y., Uys, J. and Townsend, D.M. (2011) The role of glutathione S-transferase P in signaling pathways and S-glutathionylation in cancer. Free Radical Biol. Med. 51, 299–313.
[17] Board, P.G. and Menon, D. (2013) Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. Biochim. Biophys. Acta. 1830, 3267–3288.
[18] Kulkarni, A.A., Abul-Hamd, A.T., Rai, R., El Berry, H. and Cooper, T.G. (2001) Gln3p nuclear localization and interaction with Ure2p in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 276, 32136–32144.

[19] 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.

[20] 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.

[21] 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.

Supplementary figures

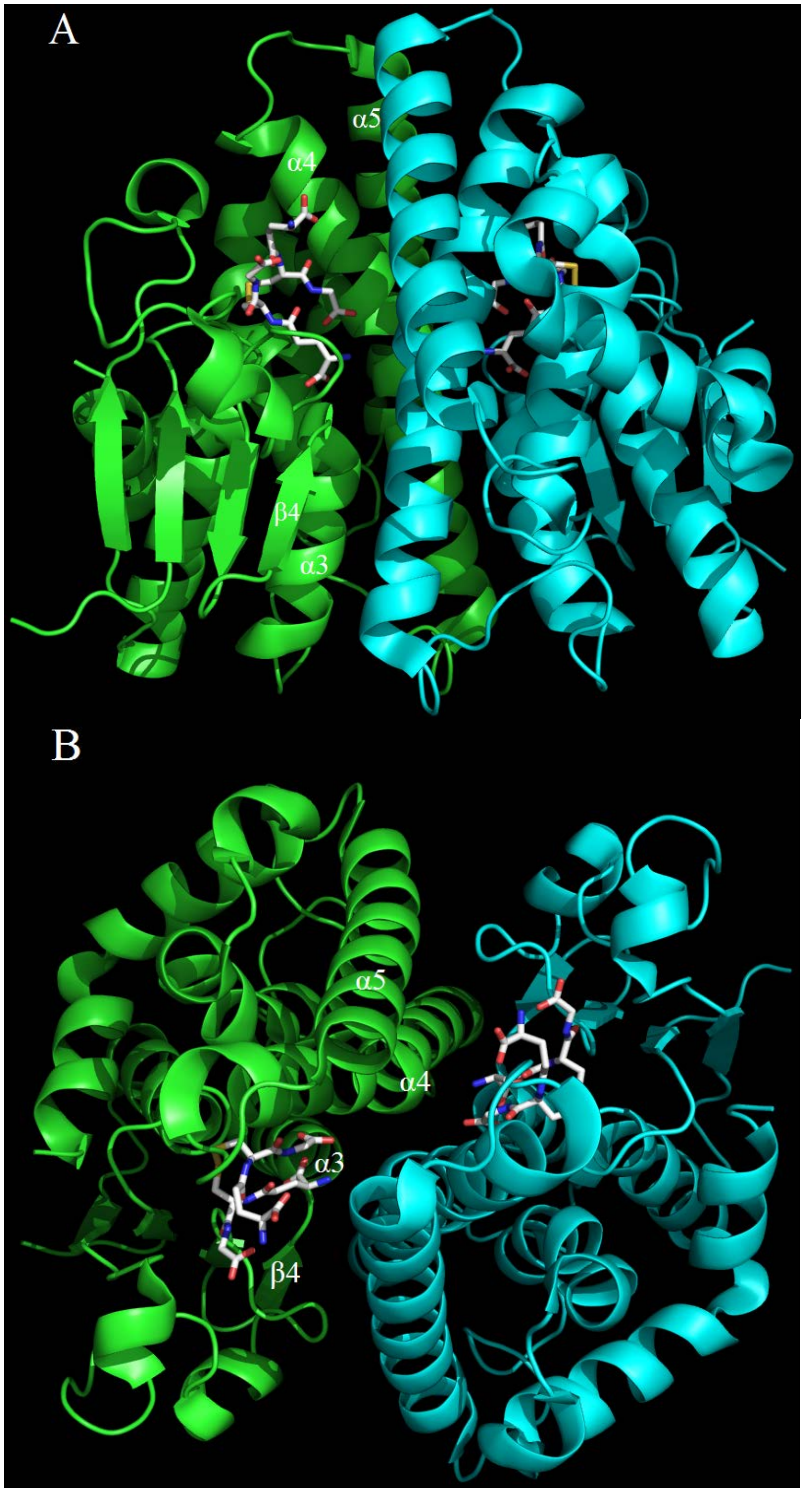
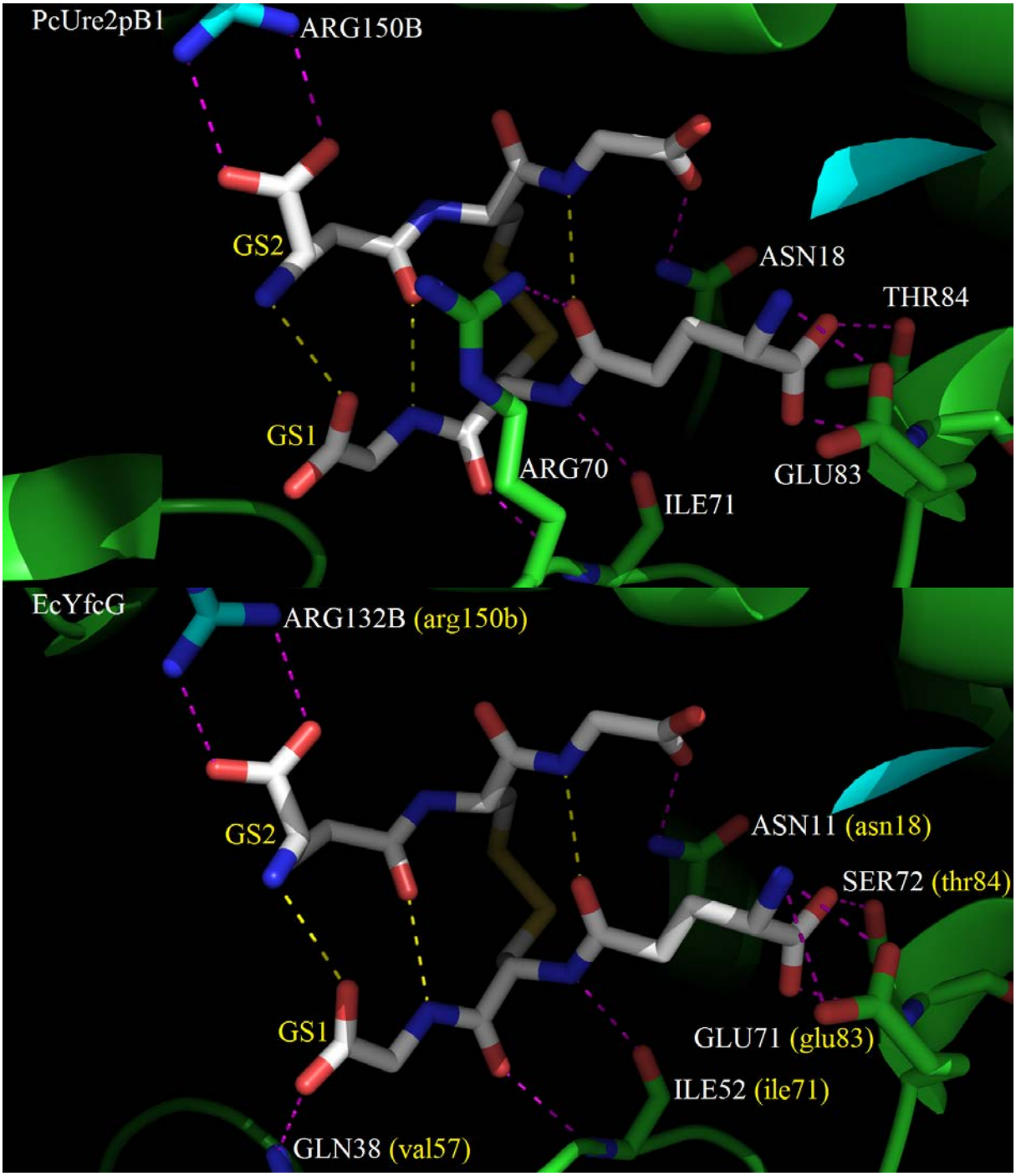
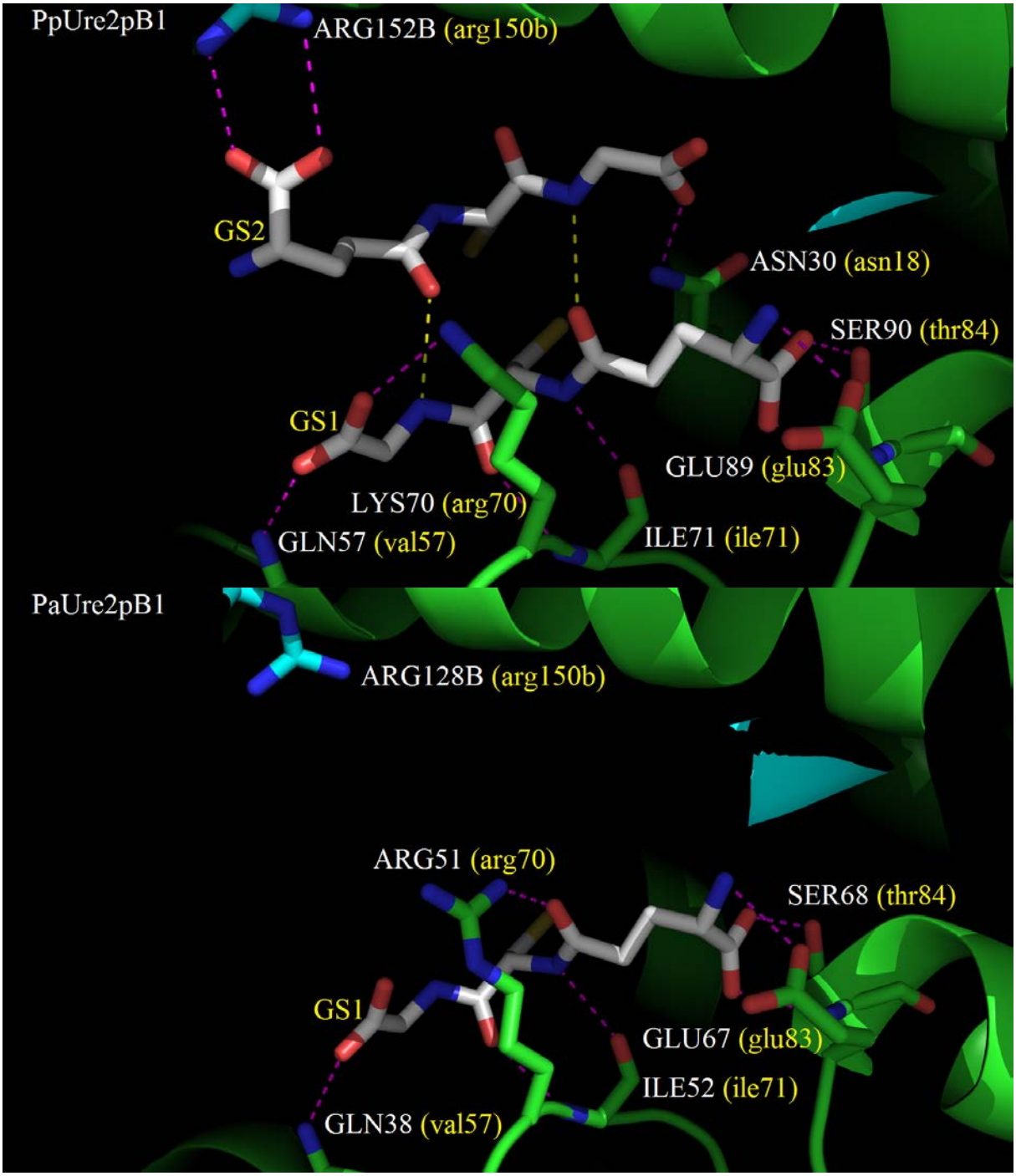


Figure S1: Views of the PcUre2pB1 dimer.
PcUre2pB1 from *P. chrysosporium* is represented in cartoon. Monomers A and B are coloured green and cyan, respectively. GSSG is represented in white sticks in each monomer.
A. View of the dimer with its two fold axis in the plane of the figure. As found in most GST dimers, parts of β4 and α3 of one monomer pack against α4 and α5 of the other monomer.
B. View of the dimer with its two fold axis perpendicular to the plane of the figure. The solvent-accessible surface area of the assembly is 16,990Å² and the buried interface area is 4,739Å².


PcUre2pB1
ARG150B
GS2
ASN18
THR84
GS1
ARG70
GLU83
ILE71
EcYfcG
ARG132B (arg150b)
GS2
ASN11 (asn18)
SER72 (thr84)
GS1
GLU71 (glu83)
ILE52 (ile71)
GLN38 (val57)


PpUre2pB1
ARG152B (arg150b)
GS2
ASN30 (asn18)
SER90 (thr84)
GS1
GLU89 (glu83)
LYS70 (arg70)
GLN57 (val57)
ILE71 (ile71)
PaUre2pB1
ARG128B (arg150b)
ARG51 (arg70)
SER68 (thr84)
GS1
GLU67 (glu83)
ILE52 (ile71)
GLN38 (val57)

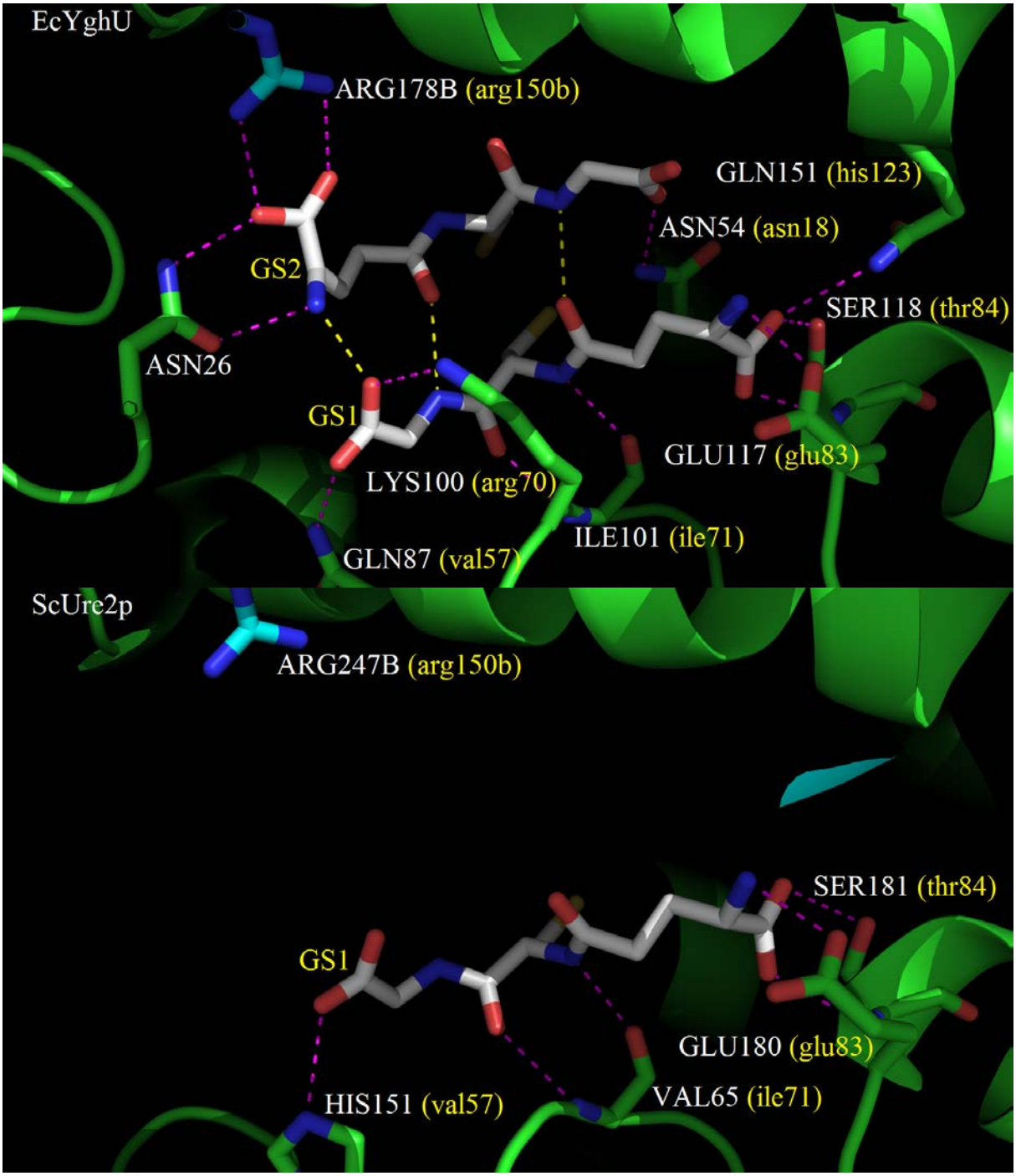


Figure S2: Active sites of Ure2p and Ure2p-like proteins.
Depending on the enzyme, the ligand bound in the active site is different: GSSG (PcUre2pB1 and EcYfcG), two GSH (PpUre2pB1 and EcYghU) or one GSH (PaUre2pB1 and ScUre2p). Polar protein ligand interactions are shown as purple dashed lines while GSH-GSH interactions or intramolecular GSSG interactions are shown as yellow dashed lines. In PpUre2pB1, EcYfcG, EcYghU, PaUre2pB1 and ScUre2p figures, the residues are labelled in white and their equivalent residues in PcUre2pB1 are indicated in brackets.
GS1 (GS moiety of GSSG molecule or GSH molecule) is located in the well-known GST G site and GS2 (GS moiety of GSSG molecule or GSH molecule) is located near the enzyme G site. In all structures, GS1 and GS2 exhibit extended conformations and when both are present they are hydrogen bonded in an antiparallel manner.

Conserved residues and positions (PcUre2pB1 numbering):

I71 (α2-β3 loop): This residue precedes the invariant cis-proline of GSTs, and is hydrogen bonded to the backbone of the cysteinyl moiety of GS1.

E83 and T84 (β3-β4 loop): These two residues are well conserved in GSTs. The lateral chain of Glu83 is salt-linked to the NH_3^+ group of GS1 γGlu. The NH and OH groups of T84 are hydrogen bonded to the COO^- group of GS1 γGlu.

N18 (β1-α1) loop): This asparaginyl residue is well conserved in Ure2p family. Its carboxamide group is hydrogen bonded to the carboxylate group of GS2 GLY.

R150 (α5 of the other subunit): This residue is invariant in Ure2p family. Its guanidinium group forms a salt bridge with the carboxylate group of GS2γGlu.

Alternative residues and positions(PcUre2pB1 numbering):

R70 (α2-β3 loop): This position is usually occupied by an arginine or a lysine in Ure2p family. In PcUre2pB1 and PaUre2pB1, the guanidinium group is hydrogen bonded to the GS1γGluα-carbonyl-oxygen. It is interesting to note that this carbonyl group is usually not hydrogen bonded to the protein in GSTs. In PpUre2pB1 and EcYghU, the lysine side chain forms a salt bridge with the carboxylate group of GS1 γGlu. The lysine of EcYfcG and the arginine of ScUre2p do not interact with GS1.

N26: (EcYghU numbering, N terminal extension of EcYghu): This residue is only present in EcYghU, because EcYghU is the only one to possess a long N-terminal extension. The carboxamide group is hydrogen bonded to the terminal groups of GS2γGlu.

V57: (β2-α2 loop): This position is occupied by a glutamine in EcYfcG, EcYghU, PaUre2pB1 and PpUre2pB1 and by a histidine in ScUre2p. The glutamine or histidine side chain is hydrogen bonded to the carboxyl group of GS1 Gly.

H123: (α4): This position is occupied by a glutamine in EcYghU, a valine in EcYfcG, a methionine in PpUre2pB1 and PaUre2pB1 and a threonine in ScUre2p. Only the side chain of the glutamine in EcYghU is hydrogen bonded to the carboxylate group of GS1γGlu.

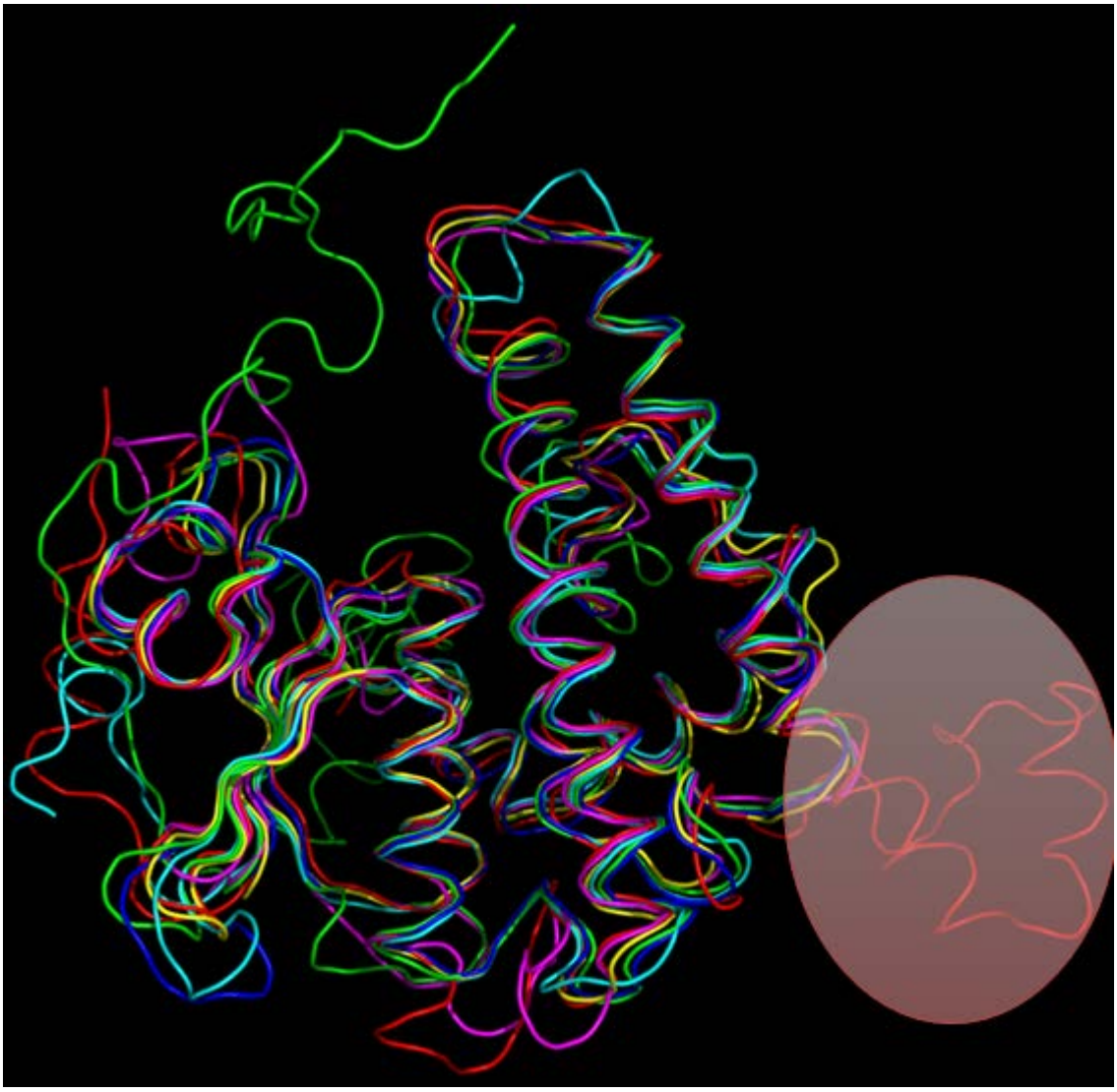


Figure S3: Superimposition of the monomers of Ure2p and Ure2p-like proteins.
ScUre2p, EcYghU, EcYfcG, PaUre2p1, PpUre2p1 monomers are represented in ribbon style and coloured red, green, blue, yellow and cyan, respectively. They were all superimposed on PcUre2pB1 monomer coloured in purple. In the bottom right corner there is an insertion of around 32 residues in the structure of ScUre2p called cap domain. This cap domain is supposed to be implicated in the assembly of amyloid fibrils.

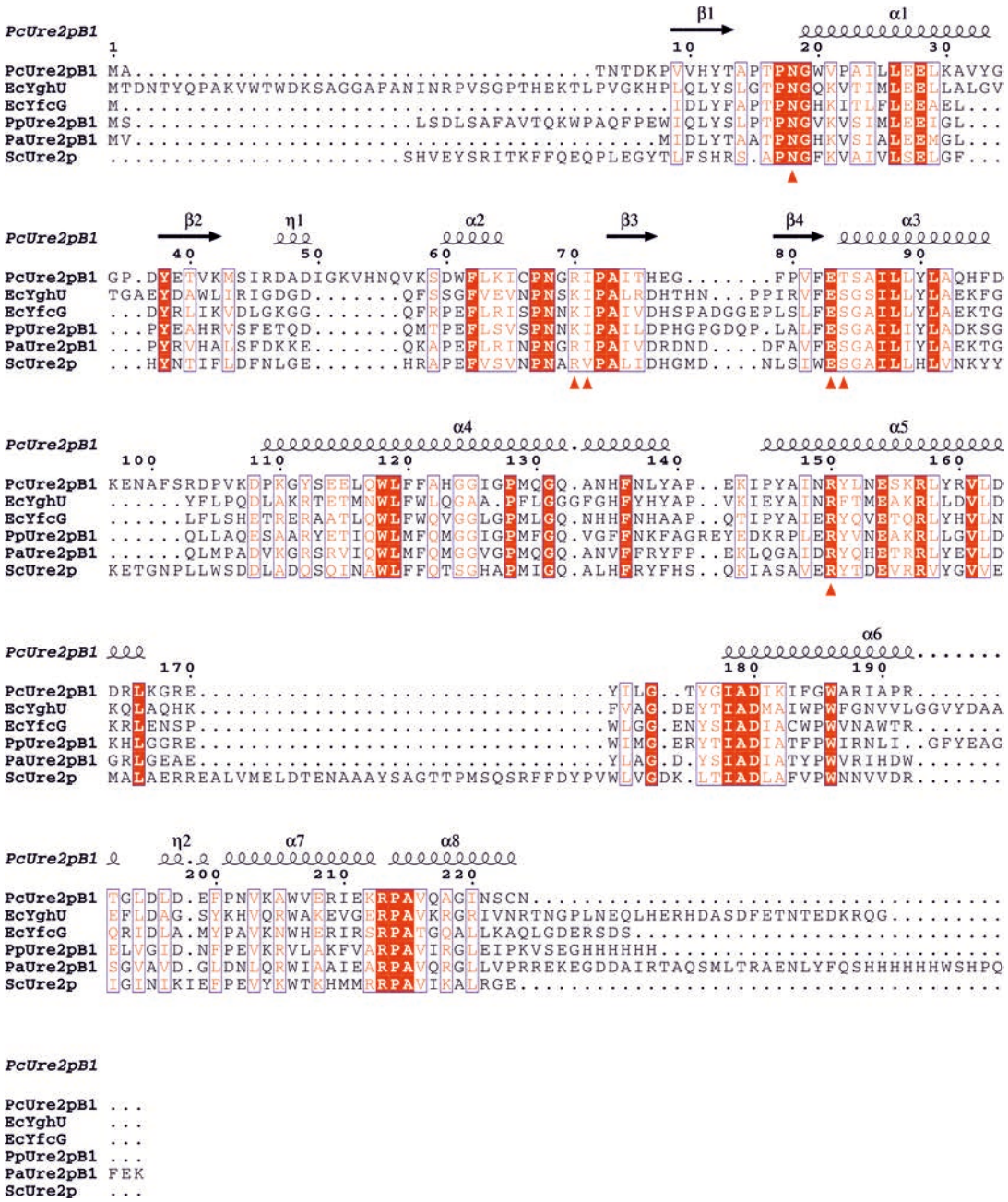


Figure S4: Sequence alignment based on the structural superimposition of Ure2p and Ure2p-like proteins.
PcUre2pB1: a Ure2p-like from *P. chrysosporium* (PDB ID 4F0B ; UniProKBI7A570)
EcYghU: a Ure2p-like from *E. coli* (PDB ID 3C8E ; UniProKBQ46845)
EcYfcG: a Ure2p-like from *E. coli* (PDB ID 3GX0 ; UniProKBP77526)
PpUre2pB1: a Ure2p-like from *P. protegens Pf-5*(PDB ID 4IKH ; UniProKBQ4KED9)
PaUre2pB1: a Ure2p-like from *P. aeruginosa* PACS2 (PDB ID 4ECJ ; UniProKB Q02KA8)
ScUre2p: Ure2p from *S. cerevisiae* (PDB ID 1JZR ; UniProKBP23202).
The sequence alignment was generated with the programs STRAP [1] and ESPript [2]. PcUre2pB1 secondary structure elements are shown above the sequence alignment.

[1] Gille, C. (2006). Structural interpretation of mutations and SNPs using STRAP-NT. Protein Science 15, 208-210.

[2] Gouet, P., Robert, X. and Courcelle, E. (2003). ESPript/ENDscript: extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins. Nucleic Acids Research 31, 3320-3323.

Supplementary methods

Appendix A: Production and purification of the recombinant proteins.

The recombinant plasmid was co-transformed in E. coli BL21 (DE3) strain containing the pSBET plasmid. Cultures were amplified at 37°C in 2L LB medium supplemented with ampicillin and kanamycin. PcUre2ps expression was induced by 100 µM isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), added at exponential phase for 4h. The bacterial culture was centrifuged for15 min at 4400 g and the pellet was resuspended in 20 mL TE NaCl (30mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, 200 mM NaCl) buffer. Cell lysis was performed by sonication (3 times for 1 min with 2 min intervals). The lysate was centrifuged for 30 min at 27,000 g to separate soluble and insoluble fraction. The soluble fraction was subjected to a two step ammonium sulfate precipitation (40 and 80%). The proteins that precipitated with 80% ammonium sulfate were centrifuged (20 min, 15000 g), redissolved and purified by size exclusion chromatography (ACA44 (5X75cm) column). Fractions containing the protein were pooled and dialysed by ultrafiltration under nitrogen pressure (YM10 membrane, Amicon) to remove NaCl, and loaded onto a DEAE-cellulose column (Sigma) in TE buffer for an anion-exchange chromatography. PcUre2p1 was eluted in the void volume and was concentrated by ultrafiltration. Purity was checked using a 15% SDS-PAGE. Protein concentration was determined using a molar extinction coefficient of ε_{280nm}=44,015 $M^{-1}.cm^{-1}$ and ε_{280nm}=43,890 $M^{-1}.cm^{-1}$ when cysteins are reduced or mutated.

Appendix B: Crystallization, X-ray diffraction data collection and structure resolution

Crystallization of PcUre2pB1 was achieved using the microbatch under oil (paraffin) method at 277 K. Drops were prepared by mixing 1.5 µL of a 13.92 $mg.mL^{-1}$ protein solution with 2 µL of a solution composed of 20 % (v/v) 2-propanol, 20 % (w/v) PEG-4000, 0.1 M sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6. Prismatic crystals appeared after two days. For data collection, a crystal was looped out of the drop and soaked briefly in the crystallization solution supplemented with 20 % (v/v) glycerol. X-ray diffraction experiments were performed at 100 K with crystals flash-cooled in a liquid-nitrogen stream. X-ray diffraction data set at 1.45Å resolution was collected on beamline FIP-BM30A at the European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, France). The data were indexed and processed using XDS [1] and scaled and merged with SCALA [2] from the CCP4 program package [3].

The structure was solved by molecular replacement with MOLREP [4] using the crystal structure of EcYfcG from *Escherichia coli* as the template (PDB code 3GXO). The model was refined using PHENIX [5] and manually corrected using COOT [6]. The validation of PcUre2pB1 crystal structure was performed with MOLPROBITY [7]. Final model statistics are shown in Table S2.

Appendix C: In gel activities.

PcUre2pB1 native (with bound GSSG) and PcGSTO3-SG (with bound GSH) were used as obtained after the purification steps or DTT-reduced and dialyzed as described in part 2.4 to obtain the reduced PcUre2pB1 (with bound GSH) and reduced PcGSTO3 (without glutathione). Reduced PcUre2pB1 preheated 1 hour at 100°C were tested as well. The proteins were incubated equimolarly (8 µM) in TE buffer pH 8 at room temperature for 20 minutes, then 2 µM of CMFDA were added. After 20 minutes, the proteins were separated by SDS-PAGE and the fluorescence was visualized using a UV imaging system (Geldoc®). For glutathionylation tests, the experiment was performed as described above except that 8 µM of reduced PcGSTO3 was incubated with an excess of native PcUre2pB1 (80 µM) before labelling.

[1] Kabsch, W. (2010). XDS. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 66, 125-132.
[2] Evans, P. (2006). Scaling and assessment of data quality. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 62, 72-82.
[3] Winn, M.D. et al. (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 67, 235-242.
[4] Vagin, A. and Teplyakov, A. (2010). Molecular replacement with MOLREP. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 66, 22-25.
[5] Adams, P.D. et al. (2010). PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 66, 213-221.
[6] 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.
[7] Chen, V.B. et al. (2010). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 66, 12-21.

Supplementary tables

Table S1: Primers used in this study.

Primer name	Sequence
PcUre2pB1for	5' CCCCATGGCTACCAACACCGAC 3'
PcUre2pB1rev	5'CCCCGGATCCTCAGTTGCAGCTGTTCAT3'
PcUre2pB1N18Afor	5'CACCGCACCTACGCCC**GC**TGGATGGGTGCCCGCTA3'
PcUre2pB1N18Arev	5'TAGCGGGCACCCATCCA**GC**GGGCGTAGGTGCGGTG3'
PcUre2pB1C66Sfor	5'TGGTTCCTCAAGATTT**C**CCCTAACGGCCGCATT3'
PcUre2pB1C66Srev	5'AATGCGGCCGTTAGGG**G**AAATCTTGAGGAACCA3'
PcUre2pB1C223Srev	5'CCCCGGATCCTCAGTTG**G**AGCTGTTGATGCC3'

Restrictions sites NcoI and BamHI are underlined
Nucleotide modifications are in bold.

Table S2. Data collection and refinement statistics.
a: Values in parentheses are for the highest resolution shell
b: R-merge $=\Sigma_{hkl}\Sigma_j |\langle I_{hkl}\rangle - I_{hkl,j}| / \Sigma_{hkl}\langle I_{hkl}\rangle$, where $I_{hkl,j}$ is the intensity of the jth measurement of a reflection hkl and $\langle I_{hkl}\rangle$ is the average intensity of that reflection on its total number of measurements.
c: GDS : oxidized glutathione, GOL : glycerol.
d :R_{all} is determined for all reflections (working set + test set), R_{work} corresponds to a subset of 95 % of reflections (working set), R_{free} is for the complementary 5 % (test set).

PcUre2pB1 crystal parameters	
Space group	$P2_12_12_1$
a, *b*, *c* (Å)	50.91, 53.95, 165.23
Protein monomer in a.u.	2
Matthews coefficient	2.23
Data collection statistics	
Beam line	BM30A, ESRF
Resolution (Å)	48.65-1.45 (1.53-1.45) [a]
Observations	568,560 (65,111)
Completeness (%)	94.7 (81.3)
R-merge[b] (%)	2.6 (26.2)
I/σ(I)	24.9 (7.3)
Redundancy	7.4 (6.9)
Refinement statistics	
Residues / Water molecules / Ligands	2x220 (A,B) / 544 HOH / 2 GDS, 2GOL[c]
R-all / R-work / R-free [d] (%)	14.2 / 14.1 / 16.5
RMSD bond length (Å) / angles (°)	0.015 / 1.456
Mean B factor ($Å^2$)	10.1(Protein) / 26.0 (HOH) / 10.1 (Ligand)
Ramachandran plot regions (%)	97.3(most favored) / 2.3 (additionally allowed) / 0.4 (disallowed)
PDB ID	4F0B

Table S3: DALI structural alignment data of Ure2p and Ure2p-like proteins.
The structural alignment was performed with DALI [1] using PcUre2pB1 monomer as search model. The amino acid sequence of PcUre2pB1 consists of 224 residues. In this table there is PDB identifier of the matched structure, Z-score and RMSD of the match structures, the number of aligned positions (Nali) and the number of residues in matched structures (Nres) and sequence identity of aligned positions (%ID).

	PDB	Z-score	RMSD	Nali	Nres	%ID
PaUre2pB1	4ECJ	29.6	1.3	200	204	47
EcYfcG	3GX0	28.0	1.2	195	204	43
PpUre2pB1	4IKH	27.3	1.6	201	227	39
ScUre2p	1JZR	26.3	1.7	202	234	32
EcYghU	3C8E	25.3	1.5	205	284	38

Table S4. GSSG titration in wild type and mutated PcUre2pB1.
GSSG content within the protein was monitored spectrophotometrically using the coupled system NADPH/Glutathione reductase (GR). The protein (30 µM) was added to 0.24 mg/mL NADPH in TE buffer (Tris-HCl pH 8.0, 30 mM, EDTA 1 mM). Addition of 0.5 IU GR started the reaction and NADPH consumption was followed at 340 nm until equilibrium. The concentration of GSSG was calculated using the NADPH molar extinction coefficient (6220 $M^{-1}.cm^{-1}$). Data are represented as mean ± S.D. (*n*±3). However, this titration depends on the accessibility of GSSG to GR, making it not quantitative method.

	native	reduced-dialysed
PcUre2pB1	0.47 ± 0.02	0.02 ± 0.00
PcUre2pB1C66SC223S	0.62 ± 0.06	0.18 ± 0.06
PcUre2pB1N18A	0.62 ± 0.03	0.07 ± 0.02

Table S5. Number of free thiols in wild type and mutated PcUre2pB1 under various conditions.
The native column is indicative of the protein thiol content measured after purification. Proteins were denatured using SDS treatment or reduced by DTT. The thiol content per protein was quantified by 5,5-dithiobis(nitrobenzoic acid). Data are represented as mean ± S.D. (*n*±3). ND: no thiol detected

	native	native denatured	reduced dialysed	reduced dialysed denatured
PcUre2pB1	0.97 ± 0.08	1.49 ± 0.03	2.38 ± 0.04	2.63 ± 0.24
PcUre2pB1C66S	1.07 ± 0.14	0.98 ± 0.00	1.29 ± 0.03	1.46 ± 0.02
PcUre2pB1C223S	ND	0.87 ± 0.18	1.50 ± 0.08	1.71 ± 0.01
PcUre2pB1C66SC223S	ND	0.02 ± 0.03	0.17 ± 0.07	0.50 ± 0.01
PcUre2pB1N18A	1.90 ± 0.01	1.88 ± 0.01	1.93 ± 0.01	2.04 ± 0.01

[1] Holm, L. and Rosenström, P. (2010). Dali server: conservation mapping in 3D. Nucleic Acids Research 38, W545-W549.

B : Caractérisation des isoformes Ure2pA de *Phanerochaete chrysosporium*.

Quatre représentants de la sous-classe Ure2pA de *Phanerochaete chrysosporium* ont été étudiés d'un point de vue structural et biochimique. Ces enzymes présentent toutes deux sites de fixation du glutathion, une activité glutathion transférase ainsi qu'une forte affinité pour le glutathion oxydé. La fixation du glutathion oxydé au sein de PcUre2pA8 est différente de celle observée chez les autres isoformes. Comme attendu du fait de leur forte identité de séquence, les structures de PcUre2pA4 et PcUre2pA6 sont quasiment identiques. Cependant, des mesures de dichroïsme circulaire montrent que leur structuration secondaire diffère au cours de la fixation du glutathion. Ceci peut être à l'origine de leurs importantes différences d'activités. En effet, alors que PcUre2pA4 ne présente qu'une activité faible envers le CDNB, PcUre2pA6 est capable de glutathionyler un grand nombre de substrats et possède d'autres types d'activités telles que thiol-transférase et peroxydase. Cette propriété est particulièrement remarquable dans la mesure où jamais ces trois types d'activité n'ont été observés simultanément chez une GST native. Contrairement à PcUre2pA8, les PcUre2pA4, PcUre2pA5 et PcUre2pA6 sont capables de réduire l'insuline en présence de glutathion. Cette activité est tout de même plus réduite chez PcUre2pA5 et PcUre2pA4 que chez PcUre2pA6.

Ces résultats, présentés sous forme d'un article en préparation (**Article 3**), sont à analyser d'un point de vue évolutif. En effet, la très forte identité de séquence et la position en tandem sur le génome des PcUre2pA4 et PcUre2pA6 suggère que ces 2 gènes résultent d'une duplication assez récente suivie de processus de néofonctionalisation pour PcUre2pA6 ou de perte de fonction pour PcUre2pA4. Enfin, la position particulière du GSSG adoptée au sein de PcUre2pA8 serait dû à la présence d'une sérine supplémentaire et serait responsable de l'importance de l'activité glutathion transférase observée.

Cet exemple peut-être un excellent modèle pour comprendre comment une famille d'enzymes évolue en réponse à des pressions environnementales, notamment face à un éventail de composés potentiellement toxiques.

Article 3 : Structural and functional variability within the Ure2pA subclass of Phanerochaete chrysosporium : insight into evolutionary mechanisms

Article 3 : Structural and functional variability within the Ure2pA subclass of Phanerochaete chrysosporium : insight into evolutionary mechanisms

Thuillier Anne[1§], Thomas Roret[2§], Eric Gelhaye[1], Jean-Pierre Jacquot[1], Claude Didierjean[2], Mélanie Morel-Rouhier[1*].

[§] The authors have equally participated to the work.

[1]UMR1136 INRA-Université de Lorraine "Interactions Arbres/Micro-organismes", IFR 110 EFABA, Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France
[2]CRM2 UMR 7036 CNRS-Université de Lorraine, Institut Jean Barriol, Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France.

[*]Address correspondence to : Mélanie Morel-Rouhier, UMR1136 INRA-Université de Lorraine "Interactions Arbres/Micro-organismes", IFR 110 EFABA, Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France; Tel ++ 33 3 83 68 42 28; E-mail : Melanie.Morel@univ-lorraine.fr
Claude Didierjean, CRM[2], UMR 7036 CNRS- Université de Lorraine, Institut Jean Barriol, Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France; Tel ++ 33 3 83 68 48 79; E-mail : Claude.Didierjean@univ-lorraine.fr

Abstract

Glutathione tranferases (GST) are enzymes mostly involved in detoxification mechanisms. Among fungal GSTs, the Ure2p class is subdivided in two subclasses: Ure2pB, which was recently structurally and biochemically characterized in fungi and bacteria, and the fungal specific Ure2pA subclass, which is expanded in some fungi, mostly saprophytic. In this study, four Ure2pA isoforms from *Phanerochaete chrysosporium* have been studied at a structural and biochemical level. Despite high similarity in primary sequence and 3D structure, Ure2pA isoforms do not share the same pattern of activity, suggesting putative specificities in cellular function. They all bind oxidized glutathione but with variable affinities. This could explain the variability of their catalytic profile.

Introduction

Understanding adaptation of organisms to their environment remains a major objective of biologists. Due to the relative small size of their genome, fungi are excellent model to unravel the mechanisms triggering this adaptation. Whole fungal genome sequencing has revealed the presence of multigenic families, which could be related to the fungal way of life. For instance, several families of virulence-related genes are expanded in the fungal plant pathogens (Raffaele 2012). In the same way, saprobes possess an expanded set of genes encoding plant cell-wall degrading enzymes in comparison to biotrophic pathogens and symbiotes (Eastwood 2011; Floudas 2012). Among the expanded gene family found in saprobes, major attention has indeed been devoted to the extracellular systems involved in plant cell wall degradation focusing on the huge diversity of polysaccharides-hydrolyzing enzymes (Cazymes) and on the oxidative enzymatic systems involved in lignin oxidation and breakdown (Floudas 2012). Besides these extracellular systems, wood-degrading fungi also exhibit a large number of genes involved in cellular detoxication, in particular cytochrome P450 monooxygenases (CytP450) and glutathione transferases (GSTs) (Morel 2013). These latter are found in all organisms and have been extensively studied due to their involvement in enzymatic detoxication of xenobiotics as well as in cell signaling and other cellular processes.

In fungi, cytosolic GSTs belong to 6 classes: GSTO, GHR, GTT, Phi, GSTFuA and Ure2p (Meux 2011; Thuillier 2011; Mathieu 2012; Morel 2013), GSTFuA and Ure2p being the most expanded classes in wood-degrading fungi (Morel 2009; Morel 2013). Based on phylogenetic studies, it has been shown that this latter clusters in two subclasses called

Ure2pA and Ure2pB (Thuillier 2011). The Ure2p expansion in various wood decayers results from the high number of Ure2pA sequences (Ure2pA/Ure2pB ratio of 20 for *Phanerochaete carnosa*, 8 for *Bjerkandera adusta*, 7 for *Phanerochaete chrysosporium* for example).

To date, Ure2pA studies are limited to different yeast isoforms: one from *Saccharomyces cerevisiae* due to its particular prion features and its role in nitrogen catabolism regulation. It exhibits also peroxidase and thiol disulfide oxidoreductase activities and has a role in resistance against metals and oxidative stress (Coschigano 1991; Blinder 1996; Cooper 2002; Rai 2003; Bai 2004; Zhang 2009; Edskes 2011). The others from *Schizosaccharomyces pombe*, have a role in oxidative stress responses displaying glutathione transferase and glutathione peroxidase activities (Kim 2001; Cho 2002; Veal 2002).

In this study, we have characterized four Ure2pA proteins from *P. chrysosporium*, called PcUre2pA4, PcUre2pA5, PcUre2pA6 and PcUre2pA8. PcUre2pA8, PcUre2pA6 and PcUre2pA4 genes are located on the same scaffold (number 3 at positions 875225 to 880067, JGI database number) and separated only by 964 and 1254 base pairs respectively, while PcUre2pA5 is located on scaffold number 4. PcUre2pA4 and PcUre2pA6, present in a tandem configuration within the genome, result probably from a recent duplication event. They share 83.2% amino acid sequence identity, whereas they share only 45.8 % and 47.7 % identity with PcUre2pA8 respectively. PcUre2pA5 shares 45.8, 42.1 and only 25.1% identity with PcUre2pA4, PcUre2pA6 and PcUre2pA8 respectively. We present here the first biochemical and structural characterization of members of the Ure2pA subclass, which are highly duplicated in wood-decaying basidiomycetes.

Materials and methods

- Cloning, Production and Purification of Recombinant Proteins -

The sequence encoding the PcUre2pA4, PcUre2pA5, PcUre2pA6 and PcUre2pA8 (respectively JGI ProtID 137250, 128511, 2269, 2268) were amplified from cDNAs of *Phanerochaete chrysosporium* RP-78 strain using the Herculase® II Fusion Enzyme (Agilent) and cloned into the NcoI and BamHI restriction sites of pET-3d plasmid (Novagen). All primer sequences used for amplification are given in supplemental Table S1.

Proteins were produced and purified as described previously (Rouhier 2001). Briefly, the recombinant plasmid was co-transformed in *E. coli* BL21 (DE3) strain containing the pSBET plasmid (Schenk 1995). Cultures were amplified at 37°C in 2 L LB medium supplemented with ampicillin and kanamycin. PcUre2ps expression was induced by 100 µM isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), added at exponential phase for 4 h.

Pellets of the 15 min at 4400 g centrifugation were resuspended in 20 mL TE NaCl (30 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl) and cell lysis was performed by sonication (3 X 1 min with 2 min intervals). A centrifugation step for 30 min at 27,000 g was done to separate soluble and insoluble fraction. The soluble fraction was subjected to a two steps ammonium sulfate precipitation. A 15% SDS-PAGE allowed the localisation of most of the precipitated proteins of interest between 40 and 80% of saturation. After solubilisation with TE NaCl buffer, the fraction was purified by size exclusion chromatography (ACA44 (5 X 75 cm) column). Fractions containing the protein were pooled and dialysed by ultrafiltration under nitrogen pressure (YM10 membrane, Amicon) to remove NaCl and loaded onto a DEAE-cellulose column (Sigma) in TE buffer (30 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) for an anion-exchange chromatography. PcUre2pA4, PcUre2pA5 and PcUre2pA6 were directly eluted without using any NaCl gradient, in contrary to PcUre2pA8. All were then concentrated by ultrafiltration after checking purity of the proteins on 15% SDS-PAGE gels. Protein concentrations were determined using molecular weight and molar extinction coefficients given in Table S2.

- Crystallization and X-Ray Crystallography –

PcUre2pA4, PcUre2pA5, PcUre2pA6 and PcUre2pA8 were crystallized using the microbatch under oil method at 4°C (Table S3). PcUre2pAs diffraction data were collected on beamline FIP-BM30A at ESRF (France). Their data sets were indexed and processed using XDS (Kabsch 2010) and scaled and merged with Scala (Evans 2005) from the CCP4 program

package (Winn 2011). Both structures were solved by molecular replacement with Molrep (Vagin 2009) using PcUre2pB1 as first model (pdb entry 4F0B). Structures were refined using automatic calculations from PHENIX (Adams 2010) with manual inspection and corrections using Coot (Emsley 2010). The validation of both crystal structures was performed with MolProbity (Chen 2009) (Table S4).

- Enzymatic Activity Measurement -

The activities of PcUre2ps were assayed spectrophotometrically as described previously (Thuillier 2011). Thiol transferase activities were determined using the coupled system NADPH/Glutathione reductase (GR) following the oxidation of 180 µM NADPH at 340 nm in TE pH 8 with 0.5 IU of GR from baker yeast, 2 or 6 mM GSH and varying concentrations from 0 to 3 mM of dehydroascorbate (DHA) or β-hydroxyethyl disulphide (HED) at 25°C. The reaction was initiated with Ure2ps, after 2 minutes preincubation. Activities were determined using a molar extinction coefficient of 6220 $M^{-1}.cm^{-1}$. Peroxidase activity with 0 to 2 mM cumene hydroperoxide was determined using the same coupled system in TE with 6 mM GSH. GSH transferase activity was assessed as described previously (Mathieu 2012). Briefly, glutathionylation activities with phenethyl isothiocyanate (phenethyl ITC) prepared in 2% (v/v) acetonitrile, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) prepared in ethanol and 4-nitrophenyl butyrate (PNP-butyrate) prepared in DMSO were monitored respectively at 274 nm, 340 nm, and 412 nm following the absorbance of appearing glutathionylated substrates. Specific conditions for each enzyme are determined by preliminary tests and presented in Table S5. The apparent k_{cat} and K_m values were calculated using the Prism© 4 software from GraphPad.

Deglutathionylation tests using S-(phenacylacetophenone)-glutathione (PAP-SG) were performed in phosphate buffer 50mM pH 8.0 containing 3 mM GSH and 460 µM PAP-SG. The reaction was initiated by addition of 1 µM enzyme. PcUre2pB1 was used as positive control. After one hour, the reaction was stopped by adding 350 µL ethanol reaching a final volume of 1 mL, then vortexed and centrifuged at 14,500 rpm during 15 minutes. Phenacylacetophenone (PAP) appearing was analyzed and quantified at 290 nm by high pressure liquid chromatography (HPLC) using a Gemini 5-µm C18 column (150 mm long X 4.6 mm inner diameter) at 25°C as described previously (Meux 2011).

- Thiol and glutathione content of PcUre2ps -

Proteins used were native, SDS-denaturated (1% SDS) and 100 x DTT-reduced for 2 hours at room temperature. They were then desalted on Sephadex G-25 and dialysed with Amicon© Ultra Centrifugal filters. The number of free thiol groups was determined spectrophotometrically using 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) as described previously (Ellman 1959; Zaffagnini 2008). Briefly, 100 µM DTNB were added to 20 µM of protein in TE. Increase of absorbance at 412 nm caused by the release of thionitrobenzoate (TNB^-) was followed during 30 minutes and number of titrated thiol was calculated using a molar extinction coefficient of 13600 $M^{-1}.cm^{-1}$.

GSSG content was monitored spectrophotometrically at 340 nm using the coupled system NADPH/GR. 30 µM of native, dialysed or reduced-dialysed (as described previously) protein were added to 180 µM NADPH in TE. Addition of 0.5 IU GR starts the reaction. The approximate concentration of GSSG was calculated after 30 min reaction using the NADPH molar extinction coefficient (6220 M-1.cm-1), considering that one mole of NADPH consumed corresponds to one mole of GSSG reduced.

- Protein Reduction Assays -

Insulin disulfide reduction was measured spectrophotometrically as described previously (Zaffagnini 2008)**.** The protein precipitates when reduced and this can be followed by measuring turbidity at 650 nm. The reaction mixture contained 100 mM potassium phosphate buffer pH 7.0, 1 mM EDTA, 0.13 mM bovine insulin and 10 µM of each Ure2p. Reaction was started by addition of 4 mM GSH. Positive and negative controls were respectively PtGrxC1 (Couturier 2010) and GSH. GSTO3-SG deglutathionylation test was performed as described previously (Thuillier 2013).

- Circular Dichroïsm -

Circular Dichroism spectra of 5 µM enzymes were obtained in phosphate buffer (20 mM pH 7) at 25°C in a quartz cuvette (1-mm path length) from 180 to 250 nm with a bandwidth of 1 nm using a Chirascan Plus spectropolarimeter (Applied Photophysics, Ltd, UK). DTT-reduced/dialysed enzymes with or without 52.6 µM oxidized or reduced glutathione were tested with native enzyme as control. The mean residue ellipticity $[\theta]_{MR}$ was calculated using Pro-Data Viewer (Applied Photophysics, Ltd, UK) software and expressed in $deg.cm^{-2}.dmol^{-1}$.per residue.

- Glutathione binding Properties -

Thanks to the presence of tryptophans, fluorescence emission of PcUre2ps were studied with a range from 0 to 2.5 mM reduced or oxidized glutathione using a spectrofluorometer (Cary Eclipse; VARIAN) in 100 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA. Emission spectra (from 300 to 450 nm) were recorded with a 290 nm excitation wavelength. The calculation of the dissociation constant K_D toward glutathione was done using the Prism© 4 (GraphPad) software.

Results

-PcUre2pA activities-

Enzymatic activities have been measured for PcUre2pA4, PcUre2pA5, PcUre2pA6 and PcUre2pA8 using various substrates (Table 1). Thiol transferase activity has been tested using hydroxyethyl disulfide and dehydrascorbate, glutathione transferase (or glutathionylation) using chlorodinitrobenzene (CDNB), Phenethyl isothiocyanate (ITC) and PNP-butyrate, and peroxidase activity using hydrogen peroxide (H_2O_2), ter-butyl hydroperoxide (tBOOH) and cumene hydroperoxide (CuOOH). Glutathionyl-phenylacetophenone (PAP-SG) was also used to test deglutathionylation activities. Interestingly, despite their high similarity at the primary structure level, each Ure2pA possesses its own activity pattern. PcUre2pA5 and PcUre2pA8 exhibit glutathionylation activity with phenethyl-ITC. PcUre2pA8 is also very active with CDNB. By contrast PcUre2pA4 is only weakly active with CDNB. PcUre2pA6 is active with almost all tested substrates (except H_2O_2 and tBOOH), suggesting that it is able to act as thiol transferase, glutathione transferase and peroxidase. To date it seems that PcUre2pA6 is the only GST to combine these activities in its native form. PcUre2pA5, 6 and 8 have only a residual PAP-SG deglutathionylation activity below the detectable level after around one hour reaction.

	enzymes	HED	DHA	PAP-SG	CDNB	Phenethyl-ITC	PNP-butyrate	Cu-OOH
K_m (µM)	PcUre2pA4	ND	ND	ND	2461 ± 0.622*	ND	ND	ND
	PcUre2pA5	ND	ND	+	1371 ± 164	41.79 ± 9.15	298.6 ± 52.9	ND
	PcUre2pA6	157.1 ± 21.0	87.0 ± 12.0	+	2493 ± 708*	101.7 ± 24.5	617.8 ± 71.19	1308 ± 302
	PcUre2pA8	ND	ND	+	8819 ± 1632	43.4 ± 4.7	670 ± 195	ND
k_{cat} (min^{-1})	PcUre2pA4	ND	ND	ND	7.138 ±	ND	ND	ND
	PcUre2pA5	ND	ND	+	52.52 ± 2.09	200.2 ± 12.8	3.436 ± 0.148	ND
	PcUre2pA6	72.33 ± 2.10*	19.09 ± 0.65*	+	37.64 ± 4.04*	70.79 ± 4.98	4.795 ± 0.157	4.263 ± 0.493
	PcUre2pA8	ND	ND	ND	4468 ± 162.1	624.3 ± 14.5	110.6 ± 8.457	ND

Table 1 : Kinetic parameters of PcUre2pA4, PcUre2pA5, PcUre2pA6 and PcUre2pA8 in enzymatic assays.
Apparent K_m and k_{cat} values were determined using a concentration range of 0 to 5 mM substrate at fixed GSH concentration (see experimental conditions in Table S5) and were calculated by nonlinear regression using the Michaelis-Menten equation. Data are represented as mean ± S.D. (n ± 3). ND: Not Detected, +: residual activity. *Thuillier 2011

In a previous work, we have shown that PcUre2pB1, the member of the other Ure2p subclass was able to reduce disulfide bonds of insulin (Thuillier 2013). This activity was tested for the Ure2pA isoforms in presence of GSH. PcUre2pA8 is not able to reduce insulin, while PcUre2pA6 is active in this test. PcUre2pA4 and PcUre2pA5 display a very low activity (Figure 1).

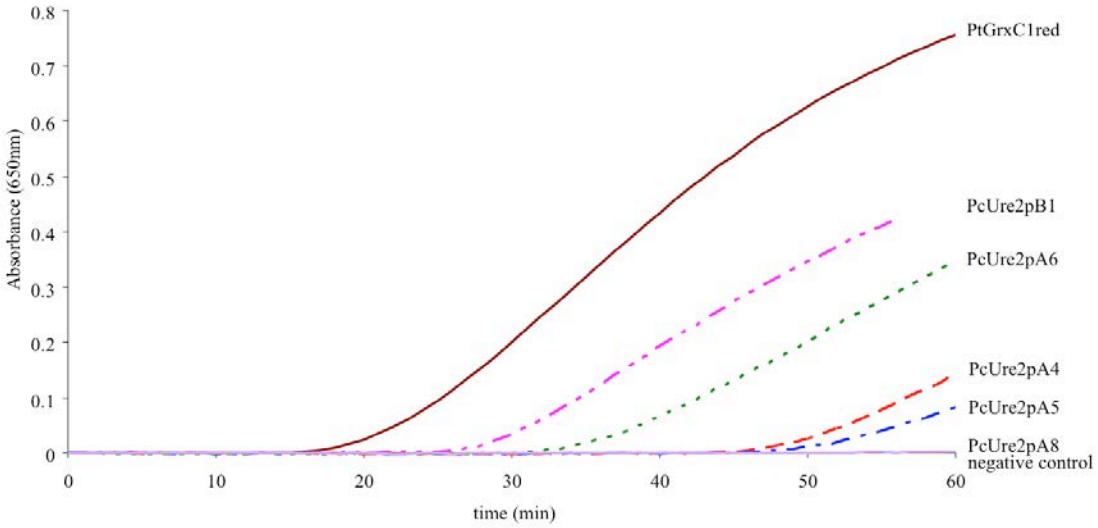


Figure 1: Insulin reduction of PcUre2p in presence of GSH. A glutaredoxin from poplar (PtGrxC1) and PcUre2pB1 were used as positive controls. GSH alone was used as a negative control.

-Glutathione binding-

To check the presence of glutathione within the proteins, thiol contents were determined. Since none of the protein has cysteinyl residue in their primary sequences, thiol detection would be only due to the presence of reduced glutathione within the proteins. However, no thiol could be detected in the native nor the denatured proteins, suggesting the absence of reduced GSH. The presence of GSSG was also tested for native PcUre2pA4, PcUre2pA5, PcUre2pA6, and PcUre2pA8 using the NADPH/GR coupled system. This test is not quantitative since it is dependant of the accessibility of GSSG to the GR, however the activity observed proves the presence of GSSG within the enzymes (Table 2).

As no previous incubation with GSSG was done, GSSG should come from *Escherichia coli* during protein production and was co-purified with the proteins.

Protein	Number of GSSG molecule per monomer
PcUre2pA4	0.48 ± 0.06
PcUre2pA5	0.54 ± 0.11
PcUre2pA6	0.32 ± 0.17
PcUre2pA8	1.01 ± 0.19

Table 2: Titration of oxidized glutathione within native Ure2pAs.

-Is glutathione binding responsible for Ure2pA catalytic diversity?-

PcUre2pA possess tryptophans in their sequences and especially one close to the glutathione binding site (W20 considering PcUre2p4 numbering) allowing following glutathione binding through fluorescence signal modification upon excitation at 290 nm. The proteins were first reduced and dialyzed to be free of any glutathione. Thiol titration and GSSG detection assays confirmed the absence of both forms within the enzymes. Then GSH or GSSG was added and dissociation constants were calculated (Table 3). In each case, a stronger affinity toward GSSG was observed compared to GSH.

The better affinity for GSSG is for PcUre2p4 and PcUre2p5, while PcUre2p8 is different from the others by exhibiting the lowest affinity for glutathione (Table 3).

Kd (µM)	GSH	GSSG	R^2 (GSH/GSSG)
PcUre2pA4	1.86±0.11	0.53±0.03	0.967/0.9645
PcUre2pA5	1.45±0.10	0.54±0.03	0.95/0.9672
PcUre2pA6	1.60±0.098	0.94±-0.05	0.975/0.965
PcUre2pA8	20.67±0.96	3.09±0.11	0.9703/0.9862

Table 3: Dissociation constants of PcUre2pA4, PcUre2pA5, PcUre2pA6 and PcUre2pA8 toward oxidized or reduced glutathione.

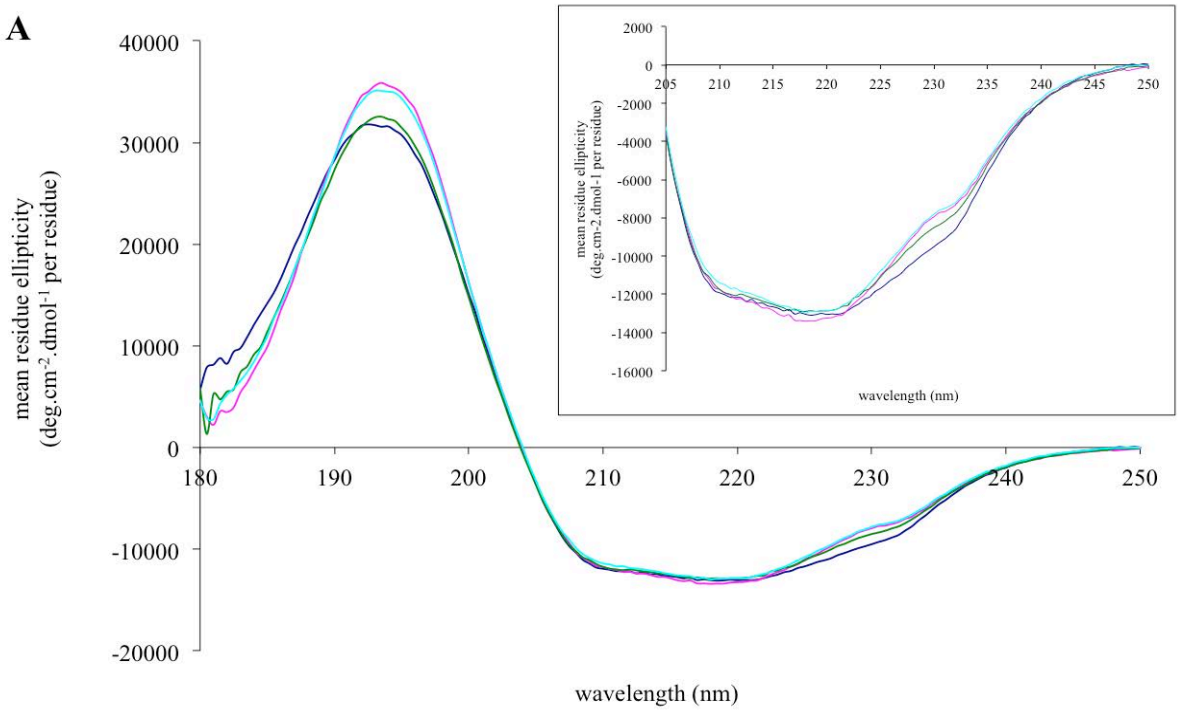
-Secondary structures-

Changes in secondary structure content were analysed using circular dichroism comparing enzymes either native, reduced or reduced with added GSSG or GSH. Whatever the tested conditions, no evident conformational change was recorded for PcUre2pB1, PcUre2pA5 and PcUre2pA8 (data not shown). In contrast, a shift around 230 nm of the CD spectrum was observed after DTT-reduction for PcUre2pA4 (Figure 2A). The addition of GSSG onto the reduced PcUre2pA4 restores the spectrum of the native protein, suggesting that the binding of GSSG induces modifications in secondary structures. Addition of GSH modifies also the spectrum, showing that PcUrepA4 is able to bind both GSSG and GSH (in accordance with the results above) and that this binding is accompanied with changes in enzyme folding.

PcUre2pA6 spectra shows a strong modification at around 222 nm when GSSG is added to the reduced protein, indicating a structuration of alpha-helices with GSSG binding (Figure 2B). Interestingly, this profile is different from the one of PcUre2p4, despite high sequence similarity, suggesting that the folding of the proteins in presence of glutathione could be responsible for the catalytic variations.

-Tertiary structures-

The crystal structure of PcUre2pA4 was solved by molecular replacement, using the structure of PcUre2pB1 as search model (PDB ID 4F0B). The PcUre2pA4 model was used to solve the X-ray structures of PcUre2pA5, PcUre2pA6 and PcUre2pA8. All studied PcUre2pAs adopt the canonical GST tertiary and quaternary structures. Each monomer consists of a N-terminal thioredoxin like domain ($\beta_1\alpha_1\beta_2\alpha_2\beta_3\beta_4\alpha_3$) followed by an all helical C-terminal domain ($\alpha_4\alpha_5\alpha_6\alpha_7\alpha_8$) (Figure 3).



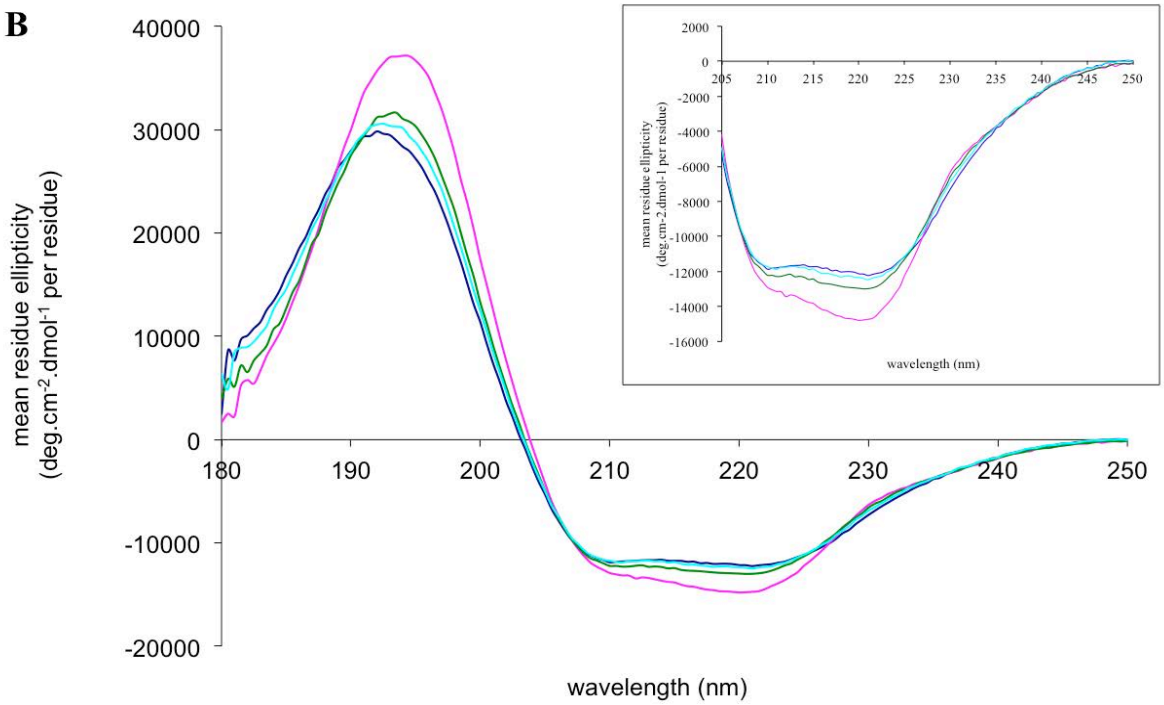


Figure 2: Redox and glutathione dependent conformational changes of PcUre2pA4 and PcUre2pA6.

Circular dichroïsm was used to evaluate variation of α-helix content in PcUre2pA4 (A) and PcUre2pA6 (B). Spectra were recorded in 20 mM Phosphate buffer pH 7.0 with 5 µM native (light blue) or reduced (dark blue) proteins. Influence of glutathione was assessed on reduced proteins by adding 52.6 µM oxidized (pink) or reduced (green) glutathione.

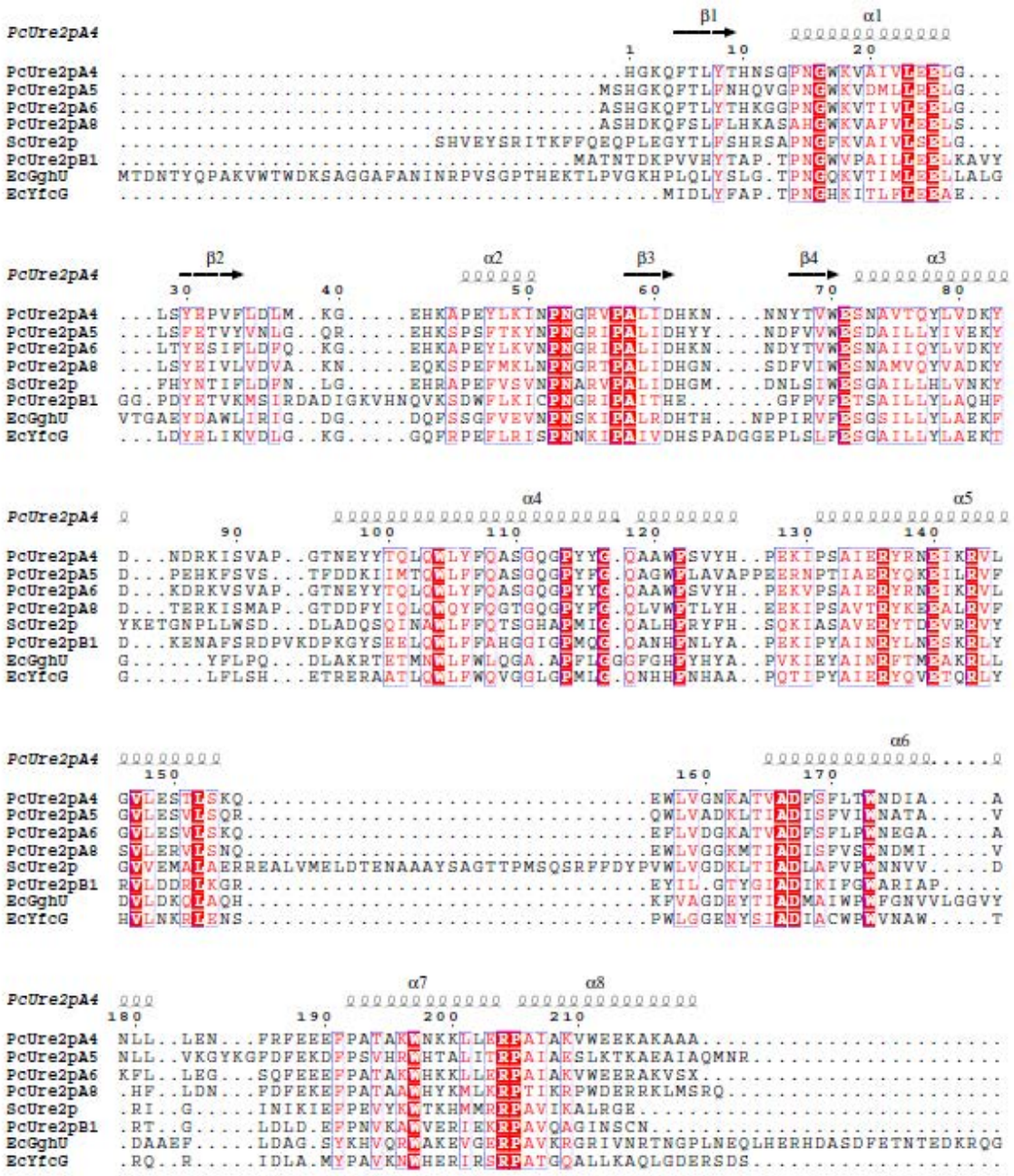


Figure 3: Sequence alignment based on the structural superimposition of Ure2p and Ure2p-like proteins. PcUre2pA4 secondary structure elements are shown above the sequence alignment.
PcUre2pA4-5-6-8: Ure2pAs from *P. chrysosporium*
PcUre2pB1: Ure2pB from *P. chrysosporium* (PDB ID 4F0B ; UniProKBI7A570)
EcYghU: Ure2p-like from *E. coli* (PDB ID 3C8E ; UniProKBQ46845)
EcYfcG: Ure2p-like from *E. coli* (PDB ID 3GX0 ; UniProKBP77526)
ScUre2p: Ure2p from *S. cerevisiae* (PDB ID 1JZR ; UniProKBP23202).
The sequence alignment was generated with the programs STRAP (Gille 2001) and ESPript (Gouet 1999).

The structures of native PcUre2pA4, PcUre2pA5, and PcUre2pA8 were obtained in complex with GSSG. PcUre2pA6 structure was obtained without any ligand. However in this structure, the region between β_2 and β_3 including helix α_2, the C-terminal parts of helices α_4 and α_6 and the N-terminal part of helix α_5 are disordered. For PcUre2pA6, GSSG seems to be essential to the stability of the G- and H-sites (Figure 4). The region between β_2 and β_3 often gives a basic residue to stabilize the C-terminal carboxylate group of the glutathione and helices α_4 and α_6 hydrophobic residues of the H-site.

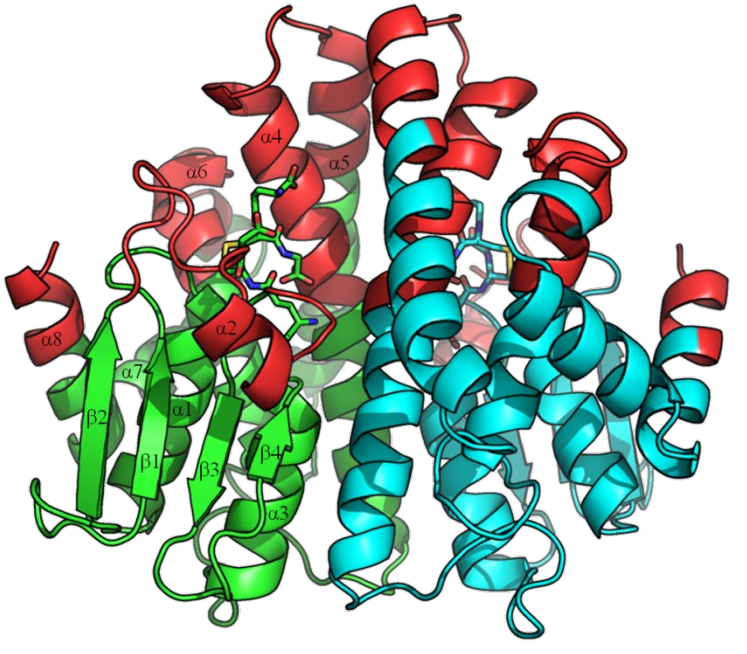


Figure 4: Schematic drawing of PcUre2pA6 structure. The figure highlights the dimeric form (monomer A in green and monomer B in cyan) of PcUre2pA6 with a thioredoxin-like domain in N-terminal ($\beta_1\alpha_1\beta_2\alpha_2\beta_3\beta_4\alpha_3$) followed by an all helical C-terminal domain ($\alpha_4\alpha_5\alpha_6\alpha_7\alpha_8$). One GSSG molecule is shown in the active site. Missing areas in electron density of PcUre2pA6-apo are pointed in red and correspond to areas 37-56 (involving α_2), 113-140 (part of α_4 and α_5), 176-189 (part of de α_6 and α_7) and 214-220 (part of α_9).

In the structures containing oxidized glutathione, the electron density maps revealed unambiguously one GSSG molecule per monomer. In all these PcUre2pAs, one half of the GSSG molecule (GS-1) is bound in the G-site as observed in the GST/GSH complex structures. In PcUre2pA4-5-6, the second half (GS-2) is anti parallel to GS-1 and packs along the helix α_4 near the dimer interface (Figure 5). This GSSG conformation was already shown in PcUre2pB1 and allows the formation of three intra molecular hydrogen bonds. The terminal carboxylate groups of the glycinyl and glutamyl moieties of GS-2 interact with the

side chains of N18 (in the loop β_1-α_1) and R139 (in α_5 of the other subunit), respectively in PcUre2pA4. These interactions are also conserved in PcUre2pA5 and PcUre2pA6. R139 is an invariant residue in Ure2pAs and Ure2pBs. In PcUre2pA8, GS-2 adopts an atypical conformation with its glutamyl moiety at the surface of the protein (Figure 5). Only one intramolecular H-bond is observed and only the C-terminal moiety interacts with the protein. The glycinyl carboxylate forms H-bond with the lateral chain of Q121 from helix α_4 and with the side chains of Y118 and the invariant R139 from the other monomer. Furthermore in PcUre2pA8, the rotamer of the GS-1 cysteine (χ_1 = -180°, trans) is different to that observed in the other Ure2pAs and Ure2pBs (χ_1 =-60°, minus). In PcUre2pA8, the cysteine of GS-1 cannot adopt the minus rotamer due to the lateral chain of S16, which is replaced by a glycine in PcUre2pA4-5-6. In PcUre2pB1, EcYghU and EcYfcG a threonine is found at this equivalent position. In this case, the side chain of threonine does not hamper the minus rotamer of the GS-1 cysteine because the loop β_1-α_1 is shorter.

PcUre2pA8 was also characterized in presence of glutathionylated dinitrobenzene (GSDNB). The structures of PcUre2pA8 with GSSG or GSDNB are similar (mean RMSD 0.46Å). In the structure of PcUre2pA8 in complex with GSDNB, the cysteine keeps the original trans rotamer as observed with GSSG (Figure 5). As PcUre2pA8 has an atypical GSSG or GSDNB binding (Figure 5), its H-site is probably specific to this protein. Residues involved in the H-site come mainly from helices α_4 and α_6. This pocket is closed by a second GSDNB molecule in which only the DNB moiety is well defined in the final electron density map.

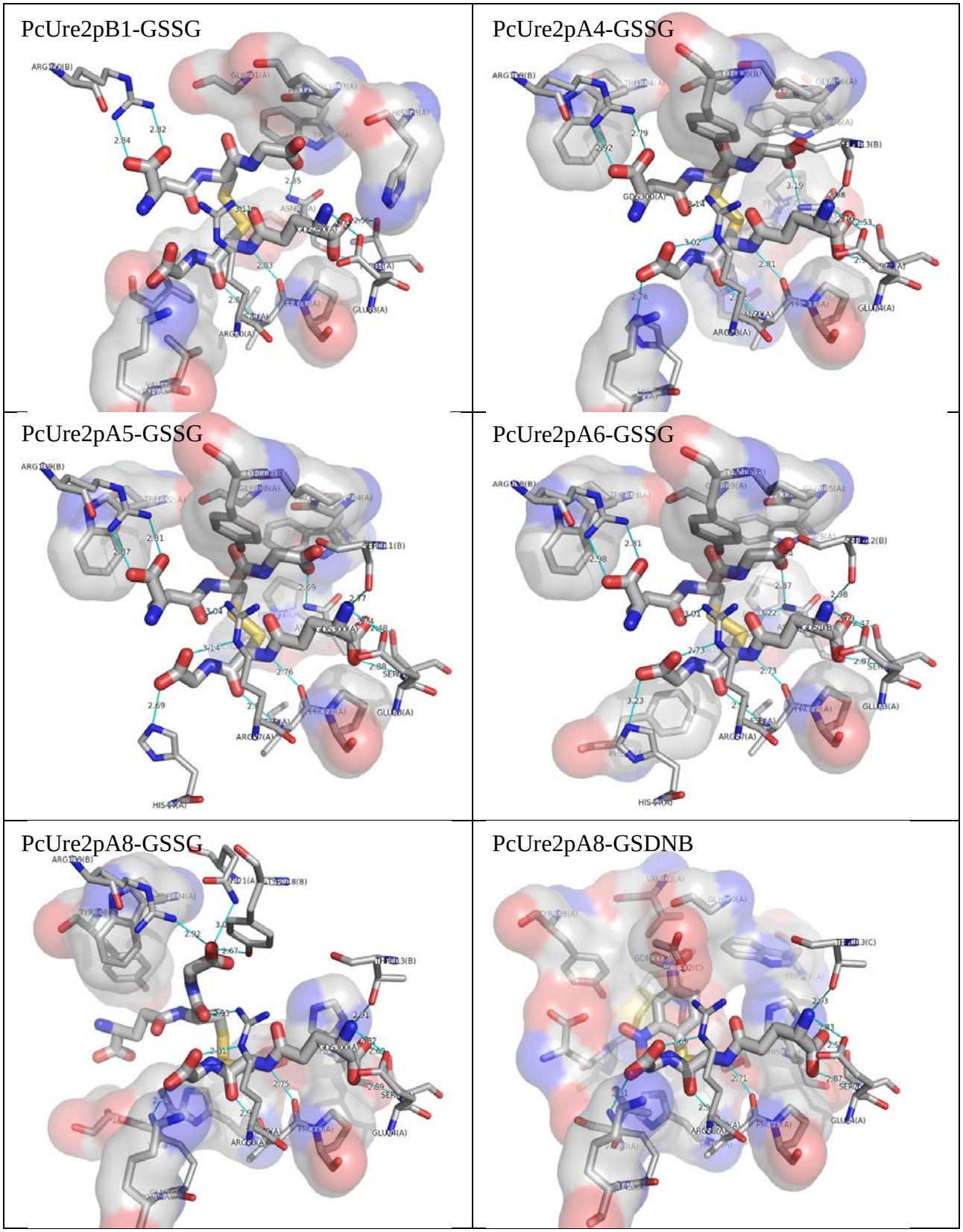


Figure 5: Representation of G-sites and H-sites of PcUre2ps in complex with GSSG or GSDNB (in wide sticks). From top left corner to bottom right corner: PcUre2pB1-GSSG, PcUre2pA4-GSSG, PcUre2pA5-GSSG, PcUre2pA6-GSSG, PcUre2pA8-GSSG and PcUre2pA8-GSDNB. H-bonds are represented as blue dashed lines. Residues involved in contacts with the ligand are shown in thin sticks. The surface of residues involved in Van der Waals interactions are shown with a transparency of 50%.

Discussion

Ure2p class is a biochemically diversified GST class as it contains multifunctional isoforms. It is subdivided in two subclasses named Ure2pA and Ure2pB (Thuillier 2011). Ure2pB can be observed in bacteria, fungi, mosses and algae and from an evolutionary point of view, may be the ancestor subclass, initially a bacterial isoform as suggested previously (Liu 2012). Two Ure2pB-like isoforms named YfcG and YghU have been characterized in *Escherichia coli* (Wadington 2009; Stourman 2011). These bacterial enzymes exhibit strong thiol-disulfide oxidoreductase activity but low GST and peroxidase activities (Kanai 2006). This is also the case for *P. chrysosporium* PcUre2pB1 (Thuillier 2013). By contrast, in the moss *Physcomitrella patens*, the unique Ure2p protein, clustering with Ure2pB, displays GST and peroxidase activities but no thiol-disulfide bond oxidoreductase (Liu 2012). In *Aspergillus fumigatus* the Ure2pB isoform possesses weak GST and peroxidase activities, however, thiol-disulfide oxidoreductase activity was not tested in the study (Burns 2005).

Ure2pA isoforms are fungal specific, extended in some species and absent in others (Thuillier 2011). A structural similarity search with DALI (Holm 2010) revealed that the homologues of PcUre2pAs are the soluble C-terminal domain of Ure2p from *S. cerevisiae* (ScUre2p), Ure2pB1 from *P. chrysosporium*, YfcG and YghU from *E. coli*, a Ure2p-like protein from *Pseudomonas protegens* Pf-5 (PpUre2pB1) and a Ure2p-like protein from *Pseudomonas aeruginosa* PACS2 (PaUre2pB1). The identified homologues belong to the Ure2pB subclass mainly due to the absence of 3D solved structures of Ure2pA, except for the atypical yeast isoform.

The major difference between Ure2pA and Ure2pB subclasses is located in the loop β_1-α_1 which is one residue shorter in Ure2pBs (Figure 3). As shown in Ser-GSTs or Cys-GSTs, this loop is essential since it contains the catalytic residue. Although PcUre2pAs and ScUre2p belong to the same subgroup, PcUre2pAs do not exhibit a long loop between the helices α_5 and α_6. In ScUre2p this loop has been assumed to be involved in the assembly of ScUre2p into amyloid fibrils (Bousset 2001). At a functional point of view, ScUre2p exhibits peroxidase activity (Bai 2004) and thiol-disulfide oxidoreductase activity (Zhang 2009). The residues equivalent to the catalytic Ser or Tyr appeared to be an alanine and an asparagine. GST activity can be recovered by directed mutagenesis of either Ala 122 to Cys or Asn 124 to Ala or Val (Zhang 2008). PcUre2pAs from *P. chrysosporium* exhibit a variable pattern of activities. Globally they all exhibit the GST activity and PcUre2pA6 exhibits also thiol-disulfide oxidoreductase and peroxidase activities. This latter enzyme is interesting in that it is

active with all the substrates we have tested. The Ala122 (yeast numbering) is replaced by a glycine in PcUre2p6 and PcUre2p4, a serine in PcUre2p8 and a threonine in Ure2pB isoforms. The Asn124 is conserved in all Ure2pA except PcUre2p8. PcUre2pA8 is the most efficient for GST activity, probably because of the atypical position of GSSG among the protein due to the presence of a serine instead of a glycin in the other Ure2pAs. In many classes of GSTs, a serine (or tyrosine) is responsible for the glutathione activation for nucleophilic attack on such substrates as CDNB (Armstrong 1997; Sheehan 2001). It has indeed been shown that mutagenesis of active cystein to serine change the activity from degluathionylation to glutathionylation (Garcera 2006; Meux 2011), highlighting the importance of this residue for glutathione transferase activity. This may explain the better glutathionylation activity observed in PcUre2pA8.

Surprisingly, while PcUre2pA4 shares 83.4% amino acid sequence identity with PcUre2pA6, it shows only a weak GST activity. The structure of PcUre2pA4 and PcUre2pA6 are also very similar, indicating that the differences in their activities depend only on few amino acid modifications, which may be responsible for differential positioning of the substrate. While the amino acids involved in GSSG fixation are highly conserved and the position of GSSG in the 3D structure seems to be similar between PcUre2p4 and PcUre2p6, the variable folding of the enzymes highlighted by circular dichroism may alter the substrate positioning.

PcUre2ps are also able to interact with proteins. In particular, PcUre2pB1 is active at deglutathionylating another GST (PcGSTO3) *in vitro*. This is not the case for the studied PcUre2pAs. Nevertheless, PcUre2pA4, 5 and 6 are able to reduce disufide bonds of insulin, suggesting that they are able to accept molecules of high molecular weight as well. The putative protein targets of PcUre2ps are currently under investigation.

This study underlines the importance of small amino acid changes in gaining or optimizing functions for proteins resulting from duplicated genes. Promiscuous activities share the same catalytic mechanism but exhibit differences in substrate positioning (Khersonsky 2006). Due to these properties, GSTs are excellent models to study the functional evolution of proteins and good template to optimize an activity of interest (Atkinson 2009; Mannervik 2010; Brown 2012; Zhang 2012). As an example, the substrate-binding H-site of human glutathione transferase (GST) M2-2 was subjected to iterative saturation mutagenesis in order to obtain an efficient enzyme with the novel epoxide substrate indene 1,2-oxide (Norrgård 2011). In a similar manner, GST A2-2 was redesigned for enhanced catalytic efficiency with azathioprine. The activation of azathioprine has therapeutic

potential for possible use of GSTs in targeted enzyme-prodrug treatment of diseases. X-ray crystallography of the optimized mutant demonstrated significant changes in the topography of the active site facilitating productive binding of azathioprine as a substrate (Zhang 2012). In fungi the extension of the Ure2pA subclass and the diversification of its members could reflect the local adaptation to their environment, and in particular to the myriad of the toxic compounds released during wood degradation that the fungi has to detoxify.

Acknowledgments

This work was supported by the French National Research Agency through the Laboratory of Excellence ARBRE (ANR-12-LABXARBRE-01)

References

Adams, P. D., P. V. Afonine, G. Bunkoczi, V. B. Chen, I. W. Davis, N. Echols, J. J. Headd, L.-W. Hung, G. J. Kapral and R. W. Grosse-Kunstleve (2010). "PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution." Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 66(2): 213-221.

Armstrong, R. N. (1997). "Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases." Chemical research in Toxicology 10(1): 2-18.

Atkinson, H. J. and P. C. Babbitt (2009). "Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold." Biochemistry 48(46): 11108-11116.

Bai, M., J.-M. Zhou and S. Perrett (2004). "The yeast prion protein Ure2 shows glutathione peroxidase activity in both native and fibrillar forms." Journal of Biological Chemistry 279(48): 50025-50030.

Blinder, D., P. W. Coschigano and B. Magasanik (1996). "Interaction of the GATA factor Gln3p with the nitrogen regulator Ure2p in Saccharomyces cerevisiae." Journal of bacteriology 178(15): 4734-4736.

Bousset, L., H. Belrhali, J. Janin, R. Melki and S. Morera (2001). "Structure of the globular region of the prion protein Ure2 from the yeast Saccharomyces cerevisiae." Structure (London, England : 1993) 9(1): 39-46.

Brown, S. D. and P. C. Babbitt (2012). "Inference of functional properties from large-scale analysis of enzyme superfamilies." Journal of Biological Chemistry 287(1): 35-42.

Burns, C., R. Geraghty, C. Neville, A. Murphy, K. Kavanagh and S. Doyle (2005). "Identification, cloning, and functional expression of three glutathione transferase genes from Aspergillus fumigatus." Fungal Genetics and Biology 42(4): 319-327.

Chen, V. B., W. B. Arendall, J. J. Headd, D. A. Keedy, R. M. Immormino, G. J. Kapral, L. W. Murray, J. S. Richardson and D. C. Richardson (2009). "MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography." Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 66(1): 12-21.

Cho, Y.-W., E.-H. Park, J. A. Fuchs and C.-J. Lim (2002). "A second stress-inducible glutathione S-transferase gene from Schizosaccharomyces pombe." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression 1574(3): 399-402.

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 microbiology reviews 26(3): 223-238.

Coschigano, P. W. and B. Magasanik (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." Molecular and cellular biology 11(2): 822-832.

Couturier, J., C. Didierjean, J.-P. Jacquot and N. Rouhier (2010). "Engineered mutated glutaredoxins mimicking peculiar plant class III glutaredoxins bind iron-sulfur centers and possess reductase activity." Biochemical and biophysical research communications 403(3): 435-441.

Eastwood, D. C., D. Floudas, M. Binder, A. Majcherczyk, P. Schneider, A. Aerts, F. O. Asiegbu, S. E. Baker, K. Barry and M. Bendiksby (2011). "The plant cell wall-decomposing machinery underlies the functional diversity of forest fungi." Science 333(6043): 762-765.

Edskes, H. K., A. Engel, L. M. McCann, A. Brachmann, H.-F. Tsai and R. B. Wickner (2011). "Prion-forming ability of Ure2 of yeasts is not evolutionarily conserved." Genetics 188(1): 81-90.

Ellman, G. L. (1959). "Tissue sulfhydryl groups." Archives of biochemistry and biophysics 82(1): 70-77.

Emsley, P., B. Lohkamp, W. Scott and K. Cowtan (2010). "Features and development of Coot." Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 66(4): 486-501.

Evans, P. (2005). "Scaling and assessment of data quality." Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 62(1): 72-82.

Floudas, D., M. Binder, R. Riley, K. Barry, R. A. Blanchette, B. Henrissat, A. T. Martinez, R. Otillar, J. W. Spatafora and J. S. Yadav (2012). "The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes." Science 336(6089): 1715-1719.

Garcera, A., L. Barreto, L. Piedrafita, J. Tamarit and E. Herrero (2006). "Saccharomyces cerevisiae cells have three Omega class glutathione S-transferases acting as 1-Cys thiol transferases." Biochem. J 398: 187-196.

Gille, C. and C. Frömmel (2001). "STRAP: editor for STRuctural Alignments of Proteins." Bioinformatics 17(4): 377-378.

Gouet, P., E. Courcelle and D. I. Stuart (1999). "ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript." Bioinformatics 15(4): 305-308.

Holm, L. and P. Rosenström (2010). "Dali server: conservation mapping in 3D." Nucleic Acids Research 38(suppl 2): W545-W549.

Kabsch, W. (2010). "Xds." Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 66(2): 125-132.

Kanai, T., K. Takahashi and H. Inoue (2006). "Three distinct-type glutathione S-transferases from Escherichia coli important for defense against oxidative stress." Journal of Biochemistry 140(5): 703-711.

Khersonsky, O., C. Roodveldt and D. S. Tawfik (2006). "Enzyme promiscuity: evolutionary and mechanistic aspects." Current opinion in chemical biology 10(5): 498-508.

Kim, H.-G., K.-N. Park, Y.-W. Cho, E.-H. Park, J. A. Fuchs and C.-J. Lim (2001). "Characterization and regulation of glutathione S-transferase gene from Schizosaccharomyces pombe." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression 1520(2): 179-185.

Liu, Y.-J., X.-M. Han, L.-L. Ren, H.-L. Yang and Q.-Y. Zeng (2012). "Functional Divergence of the Glutathione S-Transferase Supergene Family in Physcomitrella patens Reveals Complex Patterns of Large Gene Family Evolution in Land Plants." Plant Physiology 161(2): 773-786.

Mannervik, B. and A. Runarsdottir (2010). "The quest for molecular quasi-species in ligand-activity space and its application to directed enzyme evolution." FEBS letters 584(12): 2565-2571.

Mathieu, Y., P. Prosper, M. Buee, S. Dumarcay, F. Favier, E. Gelhaye, P. Gerardin, L. Harvengt, J. P. Jacquot, T. Lamant, E. Meux, S. Mathiot, C. Didierjean and M. Morel

(2012). "Characterization of a Phanerochaete chrysosporium glutathione transferase reveals a novel structural and functional class with ligandin properties." J Biol Chem.

Meux, E., P. Prosper, A. Ngadin, C. Didierjean, M. Morel, S. Dumarçay, T. Lamant, J.-P. Jacquot, F. Favier and E. Gelhaye (2011). "Glutathione Transferases of Phanerochaete chrysosporium S-glutathionyl-p-Hydroquinone Reductase belongs to a new structural class." Journal of Biological Chemistry 286(11): 9162-9173.

Morel, M., E. Meux, Y. Mathieu, A. Thuillier, K. Chibani, L. Harvengt, J.-P. Jacquot and E. Gelhaye (2013). "Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi." Microbial Biotechnology: n/a-n/a.

Morel, M., A. A. Ngadin, M. Droux, J. P. Jacquot and E. Gelhaye (2009). "The fungal glutathione S-transferase system. Evidence of new classes in the wood-degrading basidiomycete Phanerochaete chrysosporium." Cellular and Molecular Life Sciences 66(23): 3711-3725.

Norrgård, M. A. and B. Mannervik (2011). "Engineering GST M2-2 for high activity with indene 1, 2-oxide and indication of an H-site residue sustaining catalytic promiscuity." Journal of Molecular Biology 412(1): 111-120.

Raffaele, S. and S. Kamoun (2012). "Genome evolution in filamentous plant pathogens: why bigger can be better." Nature Reviews Microbiology 10(6): 417-430.

Rai, R., J. J. Tate and T. G. Cooper (2003). "Ure2, a prion precursor with homology to glutathione S-transferase, protects Saccharomyces cerevisiae cells from heavy metal ion and oxidant toxicity." Journal of Biological Chemistry 278(15): 12826-12833.

Rouhier, N., E. Gelhaye, P.-E. Sautiere, A. Brun, P. Laurent, D. Tagu, J. Gerard, E. de FaÃ¿, Y. Meyer and J.-P. Jacquot (2001). "Isolation and characterization of a new peroxiredoxin from poplar sieve tubes that uses either glutaredoxin or thioredoxin as a proton donor." Plant Physiology 127(3): 1299-1309.

Schenk, P., S. Baumann, R. Mattes and H.-H. Steinbiss (1995). "Improved high-level expression system for eukaryotic genes in Escherichia coli using T7 RNA polymerase and rare ArgtRNAs." Biotechniques 19(2): 196-200.

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

Stourman, N. V., M. C. Branch, M. R. Schaab, J. M. Harp, J. E. Ladner and R. N. Armstrong (2011). "Structure and function of YghU, a Nu-class glutathione transferase related to YfcG from escherichia coli." Biochemistry 50(7): 1274-1281.

Thuillier, A., A. A. Ngadin, C. Thion, P. Billard, J.-P. Jacquot, E. Gelhaye and M. Morel (2011). "Functional diversification of fungal glutathione transferases from the ure2p class." International journal of evolutionary biology 2011.

Thuillier, A., T. Roret, F. Favier, E. Gelhaye, J.-P. Jacquot, C. Didierjean and M. Morel-Rouhier (2013). Atypical features of a Ure2p glutathione transferase from Phanerochaete chrysosporium. 587: 2125-2130.

Vagin, A. and A. Teplyakov (2009). "Molecular replacement with MOLREP." Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 66(1): 22-25.

Veal, E. A., W. M. Toone, N. Jones and B. A. Morgan (2002). "Distinct roles for glutathione S-transferases in the oxidative stress response in Schizosaccharomyces pombe." Journal of Biological Chemistry 277(38): 35523-35531.

Wadington, M. C., J. E. Ladner, N. V. Stourman, J. M. Harp and R. N. Armstrong (2009). "Analysis of the structure and function of YfcG from Escherichia coli reveals an efficient and unique disulfide bond reductase." Biochemistry 48(28): 6559-6561.

Winn, M. D., C. C. Ballard, K. D. Cowtan, E. J. Dodson, P. Emsley, P. R. Evans, R. M. Keegan, E. B. Krissinel, A. G. Leslie and A. McCoy (2011). "Overview of the CCP4 suite and current developments." Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 67(4): 235-242.

Zaffagnini, M., L. Michelet, V. Massot, P. Trost and S. p. D. Lemaire (2008). "Biochemical characterization of glutaredoxins from Chlamydomonas reinhardtii reveals the unique properties of a chloroplastic CGFS-type glutaredoxin." Journal of Biological Chemistry 283(14): 8868-8876.

Zhang, W., D. F. A. R. Dourado, P. A. Fernandes, M. J. Ramos and B. Mannervik (2012). "Multidimensional epistasis and fitness landscapes in enzyme evolution." Biochem. J 445: 39-46.

Zhang, W., O. Modén, K. Tars and B. Mannervik (2012). "Structure-based redesign of GST A2-2 for enhanced catalytic efficiency with azathioprine." Chemistry & Biology 19(3): 414-421.

Zhang, Z. R., M. Bai, X. Y. Wang, J. M. Zhou and S. Perrett (2008). ""Restoration" of Glutathione Transferase Activity By Single-site Mutation of The Yeast Prion Protein Ure2." Journal of Molecular Biology 384(3): 641-651.

Zhang, Z. R. and S. Perrett (2009). "Novel glutaredoxin activity of the yeast prion protein ure2 reveals a native-like dimer within fibrils." Journal of Biological Chemistry 284(21): 14058-14067.

Supplemental data

TABLE S1:
Primers designed for Ure2pA amplification from *P. chrysosporium* cDNAs.
Restriction sites are underlined

primers	primers sequences (5'-3')
PcUre2pA4	
forward (NcoI)	CCCCATGGCTTCTCACGGTAAACAA
reverse (BamHI)	CCCGGATCCTCAGTGCGCAGCAGCCTT
PcUre2pA5	
forward (NcoI)	CCCCATGGCTTCGCACGGAAAGCAG
reverse (BamHI)	CCCGGATCCTCACCGGTTCATCTGGGC
PcUre2pA6	
forward (NcoI)	CCCCATGGCTTCTCACGGCAAGCAA
reverse (BamHI)	CCGGATCCTCAATGCGCGGAAACCTT
PcUre2pA8	
forward (NcoI)	CCCCATGGCTTCGCACGACAAGCAA
reverse (BamHI)	CCCGGATCCCTACTGCCGAGACATGAG

TABLE S2:
Molar extinction coefficients and molecular weight of PcUre2p proteins.

Protein	ε_{280nm} ($M^{-1}.cm^{-1}$)	Molecular Weight (Da)
PcUre2pA4	63,370	25,616.9
PcUre2pA5	51,910	26,476.2
PcUre2pA6	57,870	25,605.0
PcUre2pA8	57,410	26,171.8

TABLE S3: Summary of PcUre2pAs crystallization conditions. For these PcUre2pAs, the presence of a ligand is indicated as the concentration of protein used and the ratio between the protein and the precipitant. The crystallization condition is indicated for each PcUre2pAs with the precipitant used, the buffer if any and additives. Glycerol was used for flash-cooling except for PcUre2pA8 without ligand.

	Ligand	**Concentration (mg/ml)**	**Volume (µl)**	***Precipitant***	**Buffer (0.1M)**	**Additives (0.2M)**	**Cryogenic condition**
PcUre2pA4	GSSG	12.87	1/1	30 % PEG4000	Sodium Acetate pH4.6	Ammonium Acetate	CC +20% glycerol
PcUre2pA5	GSSG	12.70	1.5/2	3.5M Ammonium Sulfate	-	-	CC +20% glycerol
PcUre2pA6	-	12.61	1.5/1	25 % PEG4000	Sodium Acetate pH4.6	Ammonium Sulfate	CC +20% glycerol
PcUre2pA6	GSSG	12.61	1/1	20 % PEG10000	HEPES pH7.5	-	CC +20% glycerol
PcUre2pA8	-	23.53	1/1	30 % PEG4000	TRIS pH8.5	Sodium Acetate trihydrate	-
PcUre2pA8	GSSG	23.53	1/1	30 % PEG4000	TRIS pH8.5	Sodium Acetate trihydrate	CC +15% glycerol
PcUre2pA8	GSDNB	23.53	1/1	30 % PEG4000	TRIS pH8.5	Sodium Acetate trihydrate	CC +15% glycerol

TABLE S4 : Statistics of x-ray diffraction data collection and model refinement.

Data collection	**PcUre2pA4+ GSSG**	**PcUre2pA5+ GSSG**	**PcUre2 pA6**	**PcUre2pA6+ GSSG**	**PcUre2 pA8**	**PcUre2pA8+ GSSG**	**PcUre2pA8+G SDNB**
Beam line	FIP-BM30A	FIP-BM30A	FIP-BM30A	FIP-BM30A	FIP-BM30A	FIP-BM30A	FIP-BM30A
Space group	P212121	P3121	P21	C2221	P41212	P212121	P212121
Unit cell (Å)	92.44 94.06 104.63	73.10 73.10 97.11	62.36 84.89 92.78	70.85 77.38 89.21	88.91 88.91 240.43	53.64 91.87 180.01	53.63 91.86 179.99
Resolution (Å)	47.0 (1.8)	48.6 (1.9)	49.4 (2.4)	45.1 (2.0)	44.5 (2.4)	46.3 (1.5)	46.3 (1.8)
Unique reflections	84,906 (12,133)	23,916 (3,429)	37,186 (5,354)	14,950 (2,384)	38,501 (5,386)	136,502 (15,653)	85,430 (11,918)
Average redundancy	7.3 (7.1)	2.9 (2.0)	10.1 (10.1)	7.0 (6.9)	13.2 (12.8)	7.0 (3.5)	18.9 (4.7)
Completeness (%)	99.9 (99.1)	99.3 (99.2)	99.9 (99.1)	87.8 (97.7)	99.6 (97.6)	95.9 (77.1)	99.4 (96.5)
Rmerge	0.122 (0.761)	0.060 (0.205)	0.080 (0.674)	0.168 (0.609)	0.086 (0.355)	0.044 (0.232)	0.065 (0.325)
I/σ	14.5 (3.3)	11.5 (3.7)	20.9 (3.3)	16.9 (8.2)	23.3 (7.6)	25.8 (4.9)	6.5 (5.1)
Refinement							
Resolution (Å)	47.0 (1.8)	48.6 (1.9)	49.4 (2.4)	45.1 (2.0)	44.5 (2.4)	46.3 (1.5)	46.3 (1.8)
Rfree/R	19.04/16.34	16.90/14.07	22.86/19.34	21.00/19.15		16.89/14.97	18.09/16.62
Total number of atoms	8,444	2,223	5,357	2,077		9,487	8,749
Water	1,123	239	97	233		1,538	1,033
Average B factor	14.95	18.20	-	8.00		11.26	14.76
Molecules	4 GDS ; 4 Na	1 GDS ; 5 SO4 ; 3 GOL	5 SO4 ; 1 GOL	1 GDS		4 GDS ; 5 CL ; 3 ACT	8 GDN ; 4 CL ; 9 ACT ; 2 GOL
R.m.s deviations							
Bonds	0.004	0.013	0.010	0.008		0.007	0.013
Angles	0.893	1.295	1.246	1.033		1.109	0.771
MolProbity analysis							
Clashscore, all atoms	2.6	0	4.94	5.42		1.90	5.57
MolProbity score	1.29	0.76	2.32	1.45		1.06	1.38

TABLE S5 :
Enzyme, GSH concentrations and experimental conditions used for kinetic parameters determination toward different substrates

		PcUre2pA4		PcUre2pA5		PcUre2pA6		PcUre2pA8	
	Buffer	enzyme concentration	GSH concentration	enzyme concentration	GSH concentration	enzyme concentration	GSH concentration	enzyme concentration	GSH concentration
HED	TE pH8	-	-	-	-	788 nM	6 mM	-	-
DHA	TE pH8	-	-	-	-	1.6 µM	2 mM	-	-
CDNB	Phosphate pH 6.5	8.48 µM	6 mM	915 nM	6 mM	1.88 µM	6 mM	9 nM	6 mM
Phenethyl-ITC	Phosphate pH 6.5	-	-	80 nM	4 mM	788 nM	6 mM	28.8 nM	3 mM
pNP-butyrate	TE pH8	-	-	3.66 µM	4 mM	3 µM	4 mM	90 nM	6mM
Cu-OOH	Phosphate pH 6.5	-	-	-	-	13 µM	6 mM	-	-

Chapitre 3 : Les enzymes de détoxication dans le contexte de la dégradation du bois : caractérisation de la PcGTT2.1

Certaines GST ayant montré une activité de fixation des molécules issues de la dégradation du bois, leur implication dans la réponse au stress et la détoxication des molécules libérées par le bois a été analysée. Les composés les plus toxiques du bois sont ceux présents dans la fraction "extractible". Ces molécules sont généralement des composés phénoliques et des aldéhydes libérés lors de la première phase de décomposition du bois. Dans le but d'avoir une vision globale de la réponse de *P. chrysosporium* à ces molécules, une étude transcriptomique a été abordée. Le champignon a été mis en présence d'extraits acétoniques de chêne, de pin ou d'épicéa puis la régulation des gènes a été étudiée. L'analyse statistique des résultats a mis en évidence un effet significatif des extraits de chêne sur l'expression des gènes comparativement aux autres types d'extraits. Les gènes les plus régulés en présence de ces composés sont ceux relatifs à la nutrition, à la modification nucléique, aux signaux de transduction et aux réponses aux stress. Certains systèmes extracellulaires incluant les manganèse peroxydases et les lignine peroxydases sont également induits mais dans une moindre mesure. Parmi les systèmes de détoxication, une dizaine de gènes du système antioxydant sont surexprimés ainsi que 12 et 3 gènes codant respectivement des cytochrome P450 monooxygénases et des GST : une GST microsomale (MAPEG), et des GST cytosoliques des classes GTT (GTT2.1) et GSTFuA (GSTFuA3). La GSTFuA3 étant déjà caractérisée (données non publiées), une attention particulière a été portée sur la GTT2.1. Cette enzyme ne présente aucune activité glutathion transférase avec les substrats testés, en revanche elle est active pour la réduction des peroxydes. La levure déficiente en GTT est à nouveau résistante aux peroxydes lorsque la PcGTT2.1 y est surexprimée. Une analyse génomique a montré que les GTT2.1 sont retrouvées seulement chez les champignons dégradeurs de bois, suggérant un rôle potentiel de cette enzyme dans la réduction des peroxydes générés lors des processus oxydatifs de dégradation du bois. Cette répartition génomique est en relation avec l'évolution des systèmes enzymatiques de dégradation du bois. En effet un continuum évolutif a été récemment proposé (Floudas 2012). Une partie de ces systèmes enzymatiques présents chez les champignons de pourriture blanche aurait été perdue chez les champignons de pourritures brunes et les champignons mycorhiziens. Cette adaptation génomique reflèterait donc le mode de vie de ces champignons et en particulier leur adaptation à un substrat donné. Le gène codant la GTT2.1 a été maintenu chez toutes les

pourritures blanches analysées et tend à disparaitre chez les champignons de pourriture brune jusqu'à disparaitre totalement chez les champignons symbiotiques. Le substrat et les besoins du champignon pourraient être responsables de cette disparition. Ceci suggère une évolution parallèle des systèmes extracellulaires de dégradation et des systèmes intracellulaires de détoxication.

Ces résultats sont présentés dans l'***Article 4*** soumis dans le journal Molecular Microbiology

Article 4 : Emerging function of a glutathione transferase in response to wood extractives toxicity

Article 4 : Emerging function for a glutathione transferase in response to wood extractives toxicity

Running title: Response of *P. chrysosporium* to wood toxicity

Anne Thuillier[a,b], Kamel Chibani[a,b], Aurélie Deroy[a,b], Gemma Belli[d], Enrique Herrero[d], Stéphane Dumarçay[c], Philippe Gérardin[c], Annegret Kohler[a,b], Jean-Pierre Jacquot[a,b], Eric Gelhaye[a,b], Mélanie Morel-Rouhier[a,b§].

a : Université de Lorraine, IAM, UMR 1136, IFR 110 EFABA,Vandoeuvre-lès-Nancy, F-54506, France

b : INRA, IAM, UMR 1136, Vandoeuvre-les-Nancy, F-54506, France

c : Laboratoire d'études et de Recherches sur le Matériau Bois, UMR 1093 INRA-Université de Lorraine, Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

d: Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Universitat de Lleida, IRBLleida, Lleida, Spain

[§] Corresponding author:

M. Morel-Rouhier: Université de Lorraine, Interactions Arbres/ Micro-Organismes (IAM), UMR 1136, IFR 110 EFABA, Faculté des Sciences et Technologies, Bld des Aiguillettes, BP 70239, Vandoeuvre-les-Nancy, F-54506, France. Fax: +33 3 68 42 28, E-mail: Melanie.Morel@univ-lorraine.fr.

Keywords: transcriptomics, *Phanerochaete chrysosporium*, glutathione transferase, extractives, GTT2

Abstract

The first steps of wood degradation by fungi lead to the release of toxic compounds known as extractives. To better understand how lignolytic fungi cope with these products, a transcriptomic analysis of *Phanerochaete chrysosporium* genes was performed in presence of oak acetonic extractives. The most up-regulated genes relate to nutrition, nucleic acid modification, gene regulation, signalling and stress responses. Focusing on the induced antioxidant and detoxification systems, a glutathione transferase of the GTT2 class has been selected for functional characterization. This enzyme does not possess any classical glutathione transferase activity but rather a peroxidase activity. The occurrence of the GTT2 gene within the genome is closely linked to the wood decay capabilities of the fungi. This example suggests that the intracellular detoxification system could have evolved concomitantly with the extracellular ligninolytic machinery in relation to the capacity to degrade wood.

Introduction

Microorganisms that use lignocellulose as a carbon source are currently the focus of many research projects dealing with lignocellulosic biomass valorization, biofuel production, wood protection, and environmental control of carbon cycling. On the other hand, wood degrading fungi are the principal biological hazard for wood products. Wood preservative fungicides are very diverse and the industrial protection of wood against fungi has to respond to environmental, legislative and economic pressures to utilize more environmentally friendly formulations (Laks, 2008, Wallace & Dickinson, 2006). Some studies have reported an antifungal activity of natural highly reactive compounds (known as extractives), which are primarily released during wood degradation process (Feraydoni & Hosseinihashemi, 2012, Ramirez *et al.*, 2012, Wu *et al.*, 2012).

Genomic, transcriptomic and proteomic data have considerably enriched our knowledge concerning the regulation and the evolution of wood degradation systems (Eastwood *et al.*, 2011, Fernandez-Fueyo *et al.*, 2012, Floudas *et al.*, 2012, Kang *et al.*, 2009, MacDonald *et al.*, 2012, Suzuki *et al.*, 2013). This extracellular system is mainly composed of oxidases, lignin peroxidases (LiPs), manganese peroxidases (MnP) and carbohydrate active enzymes (CAZYmes). It is believed that basidiomycetes initiate wood decay by producing

extracellular reactive oxygen species that depolymerize lignocellulose (Hunt *et al.*, 2013, Wei *et al.*, 2010), suggesting that during wood degradation, fungal cells are under oxidative stress. Accordingly, LiP induction is associated with reactive oxygen species (ROS), oxidative damage to macromolecules and induction of antioxidant enzymes such as catalase, superoxide dismutase, glutathione reductase and glutathione peroxidase (Belinky *et al.*, 2003). In *Postia placenta*, the quantity of reactive oxygen species produced by a laccase with wood has been estimated to be large enough that it likely contributes to incipient decay (Wei *et al*., 2010). The lignolytic activity of these fungi is thus closely related to their capacity to resist oxidants and other toxic molecules (wood extractives or fungicides). For this purpose lignolytic fungi have developed an efficient detoxification system composed of multigenic families of enzymes, which are expanded within their genomes and which exhibit versatile activities, allowing them to accept a broad range of compounds as substrates (Hirosue *et al.*, 2011). This system is mainly composed of oxidases as cytochrome P450 monooxygenases (CytP450), conjugating enzymes and transporters. CytP450 coding genes are highly represented in saprophytic fungal genomes (Doddapaneni *et al.*, 2005, Morel *et al.*, 2013, Suzuki *et al*., 2013). Glutathione transferases (GSTs) genes belonging to the second step of detoxification are less duplicated, however their gene copy number is increased in wood degrader fungi in comparison with the others (Morel *et al*., 2013). Moreover, a close correlation exists between the number of genes coding for CytP450 and GSTs (Morel *et al*., 2013). Theses enzymes have been studied in a context of pollutant degradation but rarely in a wood degradation context. In this study, we show that oak extractives create an oxidative stress in *P. chrysosporium* highlighted by induction of genes of the antioxidant and detoxification systems. In particular, the analysis has revealed the involvement of a new GST specific to wood degraders, which behaves as a glutathione peroxidase and seems to have evolved concomitantly with the extracellular degradative system.

Results and discussion

-Transcriptomic analysis-

The most up-regulated genes (more than 10 fold) by incubation with oak extractives are reported in Table 1 and they relate to nutrition, nucleic acid modification and gene regulation, signalling and stress responses. A limited number of genes coding for proteins involved in degradation of recalcitrant compounds, respiration, and folate and methionine

metabolism were also found among the most up-regulated genes. The induction of genes involved in amino acid (saccharopine dehydrogenase, taurine dioxygenase, agmatinase, fumarylacetoacetate hydrolase) and peptide (peptidase) catabolism, as well as those involved in mitochondrial respiration suggests modification of the bioenergetical state of the fungus. The catabolism of amino acids could be a way to recycle both intracellular carbon and nitrogen. In accordance, the gene coding for glutamine synthetase is also induced. In addition, the induction of genes coding for degradative enzymes (chloroperoxidase or aromatic compound dioxygenase) suggests that the fungus is able to scavenge carbon from the phenolic extracts. Accordingly, genes coding for some class II peroxidases (lignin and manganese peroxidases) are also induced by oak extractives from 3.58 to 6.33 fold (Table 2).

SEQ_ID	fold oak/ctrl	Cybert-ppde,p	Cybert-BH	Annotation
Degradation and nutrition				
40125	37.16	0.9996	4.95E-04	Peptidase
9276	30.15	0.9984	1.96E-03	Saccharopine dehydrogenase
130933	29.62	0.9981	2.49E-03	Saccharopine dehydrogenase
34295	28.87	0.9779	3.30E-02	Chloroperoxidase
122114	24.75	0.9688	4.54E-02	Sugar transporter
10661	21.67	0.9997	3.19E-04	Taurine dioxygenase
4568	18.41	0.9905	1.41E-02	Agmatinase
2677	18.20	0.9991	1.06E-03	Cellulosome anchoring protein cohesin subunit
134181	16.28	0.9975	3.32E-03	Aryl-alcohol dehydrogenase
41330	15.64	0.9912	1.30E-02	Aromatic compound dioxygenase
5517	13.77	0.9942	8.39E-03	Barwin-related endoglucanase
5864	13.73	0.9898	1.52E-02	Glutamine synthetase
137220	12.51	0.9886	1.71E-02	Sugar transporter
9336	12.51	0.9946	7.73E-03	Sugar transporter
132735	11.69	0.9702	4.38E-02	Fumarylacetoacetate hydrolase
37522	11.40	0.9978	2.87E-03	Glycoside hydrolase
137453	11.36	0.9999	8.73E-05	Glycosyl transferase
121193	11.10	0.9882	1.76E-02	Cellulose-binding region, glycoside hydrolase
135277	10.79	0.9671	4.75E-02	Amino acid/polyamine transporter
4296	10.62	0.9840	2.41E-02	Sugar transporter
137216	10.42	0.9826	2.61E-02	Cellulose-binding region, exo-cellobiohydrolase
Folate/methionine pathway				
5290	11.86	0.9990	1.27E-03	Folylpolyglutamate synthetase
123437	10.39	0.9991	1.10E-03	Tetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase
125238	10.15	0.9996	4.44E-04	Methylthioadenosine phosphorylase

Table 1: (first part) Most up-regulated genes (fold>10) in the oak extractives treatment compared to the control condition. Seq ID and annotations are those retrieved from the JGI.

SEQ_ID	fold oak/ctrl	Cybert-ppde,p	Cybert-BH	Annotation
Respiration				
127904	17.30	0.9999	7.96E-05	Coenzyme Q biosynthesis Coq4
44349	16.81	0.9953	6.77E-03	NADH:ubiquinone oxidoreductase, NDUFS6/13 kDa subunit
34038	13.99	0.9801	2.98E-02	Cytochrome c oxidase, subunit Va
6157	11.85	0.9986	1.71E-03	NDE2, FAD-dependent pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase
DNA/RNA modification, gene regulation				
5211	23.13	0.9999	1.18E-04	Nucleolar GTPase/ATPase p130
5606	21.47	0.9875	1.86E-02	Splicing coactivator SRm160/300, subunit SRm300
8396	20.24	0.9977	3.01E-03	Splicing coactivator SRm160/300, subunit SRm300
6418	18.79	0.9938	9.06E-03	Zn-finger protein
130038	17.05	1.0000	2.38E-07	DNase I-like protein
7242	13.78	0.9885	1.72E-02	Fork head transcription factor
3298	13.12	0.9922	1.16E-02	Clp1
129920	12.44	0.9908	1.37E-02	Transcription factor TAFII-31
8180	10.95	0.9907	1.38E-02	Nuclear pore complex protein
5016	10.80	0.9753	3.70E-02	Fungal transcriptional regulatory protein
25553	10.64	0.9999	1.30E-04	Nucleoporin interacting component
44155	10.42	0.9940	8.73E-03	Translation initiation inhibitor, YjgF-like protein
139682	10.39	0.9976	3.24E-03	ATP-dependent helicase
39851	10.31	0.9886	1.71E-02	Pumilio/Puf RNA-binding
6343	10.24	0.9985	1.84E-03	RINT-1 family protein
2869	10.20	0.9992	9.43E-04	Zn-finger protein
32494	10.15	0.9989	1.40E-03	RNA-binding region RNP-1
Signalling and stress				
2416	106.57	0.9993	8.71E-04	SSP
7396	27.23	0.9989	1.37E-03	SSP
41334	22.16	0.9992	9.71E-04	Flavonol reductase/cinnamoyl-CoA reductase
5667	20.42	0.9979	2.75E-03	Protein kinase
3280	18.81	0.9945	7.97E-03	Thaumatin
5747	17.85	0.9939	8.85E-03	Tyrosine specific protein phosphatase
7176	16.91	0.9999	5.89E-05	SSP
133796	15.18	0.9919	1.19E-02	Serine/threonine phosphatase 2C
38902	14.09	0.9955	6.51E-03	HCP-like protein
1088	13.41	0.9902	1.46E-02	RTA1 like protein
3130	12.28	0.9907	1.38E-02	SSP
122315	11.99	0.9989	1.42E-03	Peptide methionine sulfoxide reductase
43951	11.63	0.9985	1.95E-03	Membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism (MAPEG)
43149	11.28	0.9959	5.95E-03	N-acetyltransferase (Mrp1)
136604	10.32	0.9913	1.29E-02	Disulfide isomerase

Table 1: (second part) Most up-regulated genes (fold>10) in the oak extractives treatment compared to the control condition. Seq ID and annotations are those retrieved from the JGI.

SEQ_ID	fold oak/ctrl	Cybert-ppde.p	Cybert-BH	Annotation
10307	7.16	1.0000	3.49E-05	BQR1
878	6.33	0.9727	4.08E-02	Class II peroxidases MnP
6811	4.26	0.9755	3.67E-02	Class II peroxidases LiP
140708	3.97	0.9661	4.87E-02	Class II peroxidases MnP
6250	3.58	0.9834	2.49E-02	Class II peroxidases
124009	3.41	0.9829	2.57E-02	Glyoxal oxidase
131217	2.66	0.9854	2.19E-02	Oxalate oxidase
137275	2.53	0.9661	4.87E-02	Pyranose oxidase
123914	2.25	0.9909	1.36E-02	CytC peroxidase
129887	0.47	0.9814	2.80E-02	BQR3
6199	0.20	0.9988	1.53E-03	Aryl-alcohol oxidase
1932	0.16	0.9978	2.93E-03	Ion-binding glycoprotein
37905	0.12	0.9892	1.61E-02	Glyoxal oxidase
8882	0.10	0.9953	6.74E-03	Glyoxal oxidase
136169	0.06	0.9937	9.09E-03	Oxalate oxidase

Table 2: Regulation of genes coding for the lignin degradation system.

Interestingly, five small secreted protein coding genes have been found highly up-regulated (SSPs and thaumatin). These small proteins do not exhibit any homology with sequences available in the databases. They are predicted to be secreted and contain many cysteines. SSP are of great interest in pathology and symbiosis research since they could act as signalling molecules in fungi, able to regulate gene expression of the plant host (Hacquard *et al.*, 2012, Plett *et al.*, 2011). Although thaumatin genes are expanded and well studied in plants they have been only recently discovered in fungi (Petre *et al.*, 2011). In saprophytic fungi the role of these proteins is still unknown but a signalling function is plausible.

Other stress-related genes could be noticed such as the ones coding for a peptide methionine sulfoxide reductase or an acetyltransferase. The oxidation of methionine into methionine sulfoxide (MetSO) is a reversible process, the reduction being catalysed by methionine sulfoxide reductase. These oxidation/reduction steps could restore biological activity of proteins by repairing oxidative damage (Levine *et al.*, 1996). The acetyltransferase MPR1 is also involved in stress response. Indeed, it has been shown to regulate oxygen reactive species caused by a toxic proline catabolism intermediate (Nomura & Takagi, 2004).
In addition to the genes reported in Table 1, 69 genes exhibiting no homology in the databases are up regulated more than 10 fold.

-Focus on detoxification systems-

Genes coding for proteins involved in the antioxidant response such as methionine sulfoxide reductase mentioned above and benzoquinone reductase (BQR) are induced (Table 3). Quinones are potent redox active compounds generating a redox cycling with their

corresponding semiquinone radicals, thus producing superoxide anion radicals. BQR are not able to directly reduce ROS, but they prevent this first one-electron reduction step generating ROS (Akileswaran *et al.*, 1999, Brock & Gold, 1996, Brock *et al.*, 1995).

SEQ_ID	fold oak/ctrl	Cybert-ppde,p	Cybert-BH	Annotation	
Antioxidant system					
122315	11,99	0,9989	1,42E-03	Methionine sulfoxide reductase MsrA	
136604	10,32	0,9913	1,29E-02	Disulfide isomerase	
135167	8,54	0,9974	3,58E-03	Glutathione reductase GR3	
10307	7,16	1,0000	3,49E-05	Benzoquinone reductase BQR1	
7851	5,32	0,9817	2,75E-02	YAP1	
125657	4,08	0,9976	3,18E-03	Peroxiredoxin PrxII.2	
128306	3,97	0,9902	1,46E-02	Catalase Cat1	
876	2,29	0,9936	9,31E-03	Glutathione reductase GR1	
123914	2,25	0,9909	1,36E-02	CytC peroxidase	
Cytochrome P450 monooxygenases					
7086	8,21	0,9962	5,37E-03	CYP502B1	5b
131322	7,24	0,9699	4,41E-02	CYP5144F1	240a
131921	6,86	0,9742	3,87E-02	CYP5144C7	142a
9146	5,81	0,9942	8,35E-03		
138612	5,80	0,9994	7,43E-04	CYP5035A2	97a
137485	5,49	0,9994	7,11E-04	CYP63C2	101a
38849	4,21	0,9958	6,09E-03	CYP5146A2	59c
137321	3,99	0,9768	3,47E-02	CYP63C1	101b
37971	2,64	0,9689	4,53E-02	CYP5144A11	83c
139146	2,46	0,9954	6,63E-03	CYP5144C6	20e
9478	2,32	0,9987	1,66E-03	CYP5140A1	96a
132579	2,14	0,9901	1,48E-02	CYP5146B1	59b
Glycosyl transferases					
137453	11,36	0,9999	8,73E-05	GT, family 2	
3697	8,84	0,9814	2,79E-02	GT, family 8	
7550	8,07	0,9899	1,51E-02	GT, family 8	
2561	6,14	0,9769	3,46E-02	GT, family 8	
40855	5,08	0,9817	2,75E-02	GT, family 3	
Glutathione transferases					
43951	11,63	0,9985	1,95E-03	MAPEG	
6766	8,51	0,9989	1,30E-03	GTT2	
5122	5,07	0,9992	9,88E-04	GST FuA3	

Table 3: Up-regulation of genes coding for the antioxidant and detoxification systems.

The induction of two glutathione reductase genes suggests an intracellular accumulation of oxidized glutathione, evidence for an oxidative stress. In accordance, YAP1, which is the central regulator of oxidative gene expression is 5 fold induced. Moreover, the formation of peroxides inside the cell is supported by the up-regulation of various genes coding for intracellular peroxidases (Peroxiredoxin PrxII.2, catalase, CytC peroxidase). Focusing then on the intracellular degradative pathways of toxic compounds, we highlighted the induction of 12 genes coding for CytP450 known as phase I detoxification enzymes, and 5

and 3 genes coding for the phase II conjugating glycosyl transferases and glutathione transferases respectively (Table 3).

The CytP450ome has been quite extensively investigated in *P. chrysosporium*, especially thanks to a functional library in yeast (Hirosue *et al*., 2011). These enzymes are highly versatile and inducible. The isoforms found induced in our experiment have not been functionally characterized yet except 5b and 97a, which modify carbazole, dibenzothiophene and ethoxycoumarin for the first one, and naproxen for the second (Hirosue *et al*., 2011). Transcriptomic experiments showed that 20e and 59b gene expression is induced after anthracen and anthrone treatments (Chigu *et al.*, 2010).

The second detoxification phase consists of conjugating reactions performed by many transferases and in particular glycosyl transferases (GTs) and glutathione transferases (GSTs). GSTs are at the interface between compound elimination and oxidative stress rescue. In this study, we identified 3 GSTs genes, which are up-regulated by oak extractives (MAPEG, GSTFuA3 and GTT2.1). The first codes for a membrane associated protein involved in eicosanoid and glutathione metabolism (MAPEG). This superfamily includes structurally related membrane proteins with diverse functions of widespread origin. The eukaryotic MAPEG members can be subdivided into six families: MGST 1, 2 and 3, leukotriene C-4 synthase (LTC4), 5-lipoxygenase activating protein (FLAP), and prostaglandin E synthase. Protein overexpression and enzyme activity analysis demonstrated that all proteins catalyzed the conjugation of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene with reduced glutathione. Glutathione transferase activity can thus be regarded as a common denominator for a majority of MAPEG members throughout the kingdoms of life whereas glutathione peroxidase activity occurs in representatives from the MGST1, 2 and 3 and PGES subfamilies (Bresell *et al.*, 2005). Based on sequence homology, it appears that the *Phanerochaete* isoform belongs to MGST3, but it has not been functionally characterized yet. GSTFuA3 belongs to a newly identified GST class (Mathieu *et al.*, 2012, Morel *et al.*, 2009). PcGSTFuA1 from this class has been shown to exhibit a ligandin property towards wood extractive compounds such as coniferaldehyde, syringaldehyde, vanillin, chloronitrobenzoic acid, hydroxyacetophenone and catechins, suggesting a putative role in sequestration and transport of the toxic molecules inside the cell (Mathieu *et al*., 2012).

GTT2.1 has been defined by sequence homology with the *Saccharomyces cerevisiae* isoform (Morel *et al*., 2009). In yeast, GTT2 exhibits GST activity with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and seems to be crucial in the response to peroxides (Choi *et al.*, 1998, Herrero *et al.*, 2006, Mariani *et al.*, 2008). Its crystal structure showed that *S. cerevisiae*

GTT2 is an atypical cytosolic GST, with the absence of the classic catalytic essential residues-tyrosine, serine or cysteine. Instead, a water molecule acts as the deprotonator of the glutathione sulphur atom (Ma *et al.*, 2009). This GST subclass is fungal specific and no other fungal homologue has been characterized to date.

-PcGTT2.1 is a novel glutathione-dependent peroxidase-

PcGTT2.1 and ScGTT2 share only 17.6% identity defined by global sequence alignment using Lalign (http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html). However, the over-expression of PcGTT2.1 in a yeast strain deficient in both GTT1 and GTT2 genes, rescued the growth of *S. cerevisiae* in presence of hydrogen peroxide (H_2O_2) and terbutyl hydroperoxide (tBOOH) (Figure 1). The activity pattern of the recombinant PcGTT2.1 has been determined using various substrates. Peroxidase activity has been detected with tBOOH (k_{cat}= 5.57 ± 0.05 s^{-1}) and cumene hydroperoxide (CuOOH) (k_{cat}= 5.73 ± 0.05 s^{-1}) but not with H_2O_2. No classical GST activity has been detected with chlorodinitrobenzene (CDNB) and isothiocyanate (ITC), or thiol transferase and reductase activities using hydroxyethyl disulfide (HED) and dehydroascorbate (DHA) respectively.

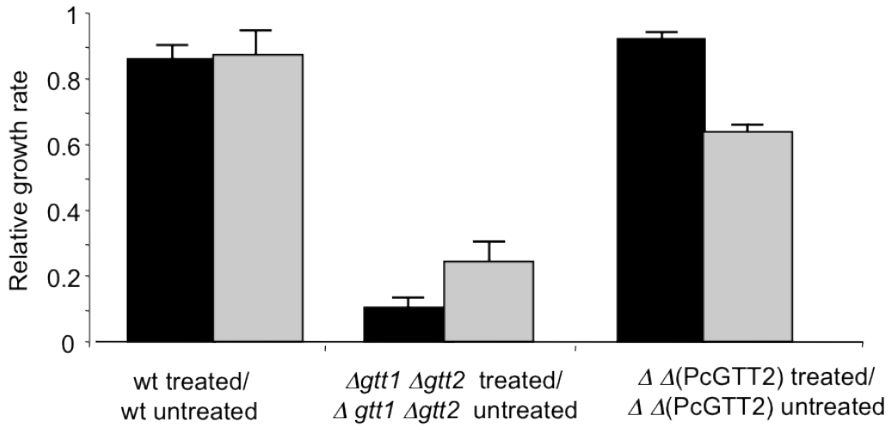


Figure 1: Sensitivity of PcGTT2 complemented yeast strains to tertbutyl-hydroperoxide (black bars) and hydrogen peroxide (grey bars). Growth of *S. cerevisiae* wild type (W303-1A) and *Δgtt1Δgtt2* mutant (MML1022) cells was automatically recorded as described in Experimental procedures. Exponential growth rates of treated cultures with the indicated agent concentrations as well as control untreated cultures were calculated, and the treated vs. untreated ratios are represented. Bars correspond to the means of three independent experiments (± s.d.).

-GTT2.1 gene as a marker of evolution-

PcGTT2.1 homologues have been searched within basidiomycete genomes from the MycoCosm database of the Joint Genome Institute (JGI). A phylogenetic analysis allowed us to identify 2 groups that we named GTT2.1 and GTT2.2 (Figure S1). While GTT2.2 homologues have been identified in almost all other considered fungi except *Agaricus bisporus*, *Hydnomerulius pinastris* and *Serpula lacrymans*, GTT2.1 homologues are only present in wood degraders (Figure 2).

No sequence has been found in soil saprotrophs such as *Coprinus cinereus* and *Agaricus bisporus* nor in mycorrhizal fungi as *Hebeloma cylindrosporum* and *Laccaria bicolor*. The occurrence of GTT2.1 sequences suggests that the gene has been lost in non wood-degrader fungi. This pattern is similar to the one described for the fungal decomposing machinery (Eastwood *et al*., 2011). Indeed, the reductions and losses in specific protein families involved in wood decay allowed the emergence of both brown rot saprotrophy and ectomycorrhizal symbiosis, white rot saprotrophy being the ancestor. In particular, Boletales have lost aggressive ligninolysis property, showing contractions of oxidoreductases coding genes (Floudas *et al*., 2012). Due to the detoxification activity of PcGTT2.1, our observation raises the question of a putative link between the maintenance of GTT2.1 in wood degrader genomes and the selective pressure exerted by the toxic molecules released during wood degradation.

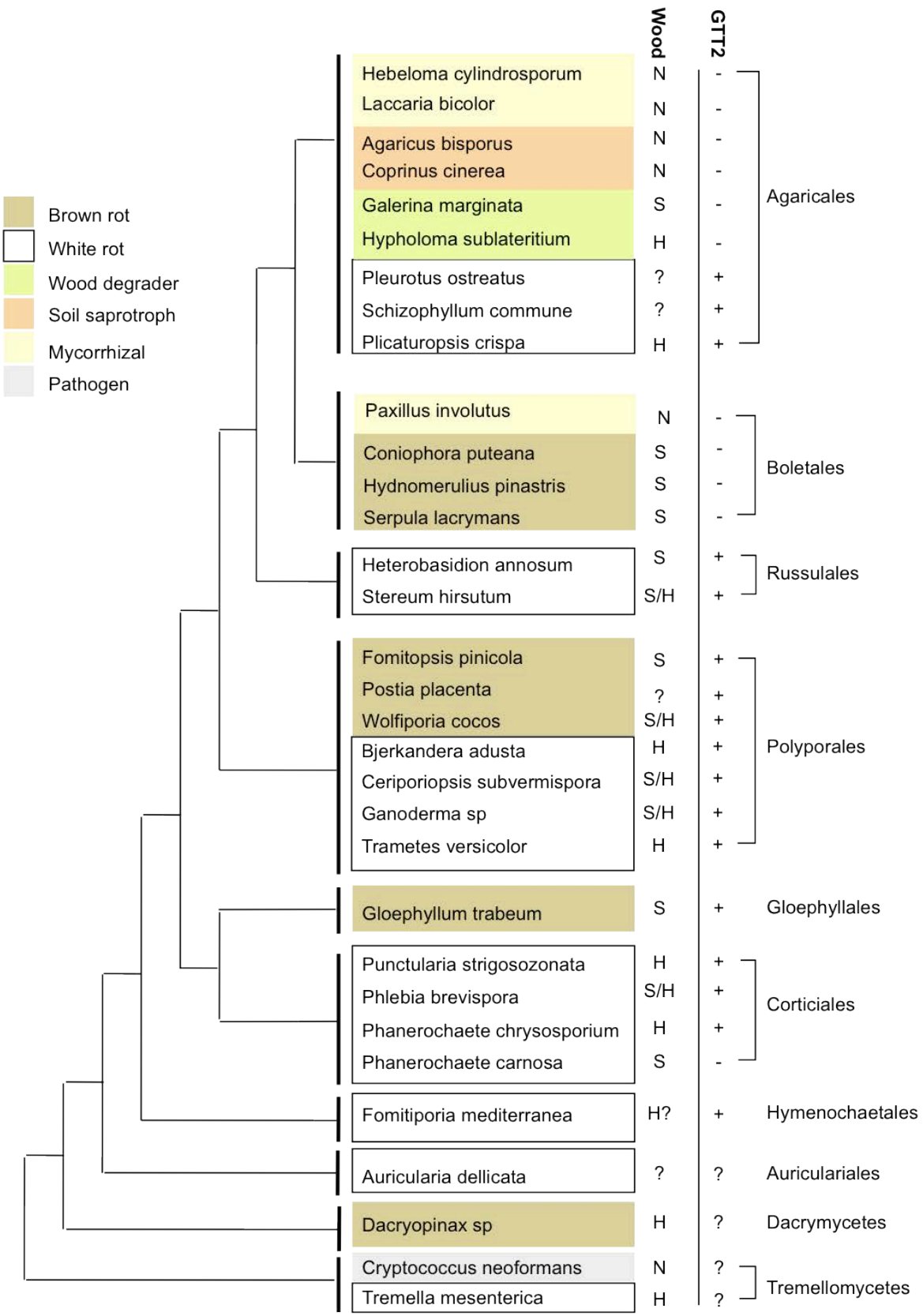


Figure 2: Presence of GTT2.1 gene in various basidiomycetes in relation to their taxonomical distribution and nutritional modes. Wood preference is reported. S: softwood, H: hardwood and N: non degrader. This schematic tree has been constructed based on the chronogram made by (Floudas *et al*., 2012) and the phylogenetic tree shown in supplemental figure S1.

An interesting point is that *Phanerochaete carnosa,* which is a white rot fungus, does not exhibit any GTT2.1 homologue. While taxonomically close, *P. carnosa* and *P. chrysosporium* differ in that *P. carnosa* has been isolated almost exclusively from softwood, while *P. chrysosporium* was mainly isolated from hardwood. Globally *P. carnosa* and *P. chrysosporium* reduce similarly the total phenolic content of various sapwood samples. *P. carnosa* transforms a higher fraction of phenolics in most of the heartwood samples, including those from softwood species, while *P. chrysosporium* transformed a broader range of heartwood phenolics in maple, a hardwood species (Suzuki *et al*., 2013). The overexpression of PcGTT2.1 in presence of phenolics from oak heartwood suggests that PcGTT2.1 could have a role in this process.

Looking at wood specificities of the various ligninolytic fungi, it is noticeable that all fungi growing onto hardwood exhibit a GTT2.1 isoform except *Hypholoma sublateritium*. Softwood and hardwood fibers differ in the structure and composition of their hemicellulosic polymers and lignin (Sjöström, 1981). Indeed, softwood hemicelluloses are mainly constituted of galactoglucomannans and arabinoglucuronoxylans, while hardwood hemicelluloses contain mainly glucuronoxylans and glucomannans. Similarly, softwood lignins are mainly constituted of guaiacyl unit, while hardwood lignins contain guaiacyl and syringyl units. The chemical composition of extractives depends directly on the wood species and an important variability exists among the ones mentioned above, leading to important variations in their content, chemical composition and biological properties (Fengel & Wegener, 1984).

A recent study showed that transgenic poplar lines enriched in syringyl lignin are more resistant to fungal degradation suggesting a toxic effect of these subunits (Skyba *et al.*, 2013).

Since PcGTT2.1 is involved in cell detoxification, the adaptation of fungi to their habitat occurs not only through their extracellular machinery but also through their ability to survive in toxic environments. A comparative genomic analysis did not reveal any differences in gene content for the classical antioxidant systems in *P. chrysosporium*, *C. cinereus* and *L. bicolor* genomes (Morel *et al.*, 2008). However, large variations have been observed in the detoxification system including CytP450 and GSTs (Morel *et al*., 2013).

Conclusion

This study highlights the evolution of a GST isoform in response to environmental pressure. Glutathione transferases are proteins known to rapidly evolve and have been extensively studied in human since they are associated with many diseases. In particular GSTPs regulate signaling pathways that promote cellular defense in human, detoxify therapeutic drugs and quench the formation of toxic hydroperoxides formed during treatments. In particular GSTPi1 is upregulated in multidrug resistant tumors in humans (Ricci *et al.*, 2005). Another GST has been recently proposed to have similar role in plants. GSTF1 from *Alopecurus myosuroides*, a black grass is involved in multiple-herbicide resistance (Cummins *et al.*, 2013). Both proteins have the particularity to exhibit glutathione peroxidase activity and could exert their metabolic effects either by binding and stabilizing key pathway intermediates or by posttranslationally modulating the activities of specific regulatory proteins and enzymes. PcGTT2.1 seems to have lost its glutathione transferase activity to gain glutathione peroxidase activity and thus has been maintained within the genome of wood-degrader fungi in relation to specific detoxification needs. It is a good example of neofunctionalisation of a protein driven by selective pressure.

Experimental procedures

-Oak extractives preparation-

Oak heartwood samples were ground to a fine powder, passed through a 115-mesh sieve and dried at 60°C until minimal weight was obtained. Extraction was then performed overnight with HPLC grade acetone using a Soxhlet apparatus. The solvent was removed from the crude extracts by evaporation to dryness under vacuum. The powder was resuspended in dimethyl sulfoxide (DMSO).

-Culture conditions-

Phanerochaete chrysosporium homocaryon RP78 was maintained in Malt Agar medium. Fungal plugs were used to inoculate liquid minimal medium (5 mM sodium acetate pH 4.5, 1 % glucose, 1 mM ammonium tartrate, 1 % (v/v) base medium (20 g L^{-1} KH_2PO_4, 5 g L^{-1} $MgSO_4$, 1 g L^{-1} $CaCl_2$), 7% (v/v) trace medium (1.5 g L^{-1} Nitrilotriacetate, 3 g L^{-1} $MgSO_4$, 1 g L^{-1} NaCl, 0.1 g L^{-1} $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 g L^{-1} $CoCl_2$, 0.1 g L^{-1} $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 g L^{-1}

$CuSO_4$, 10 mg L^{-1} $AlK(SO_4)\cdot 12H_2O$, 10 mg L^{-1} H_3BO_3, 10 mg L^{-1} $NaMoO_4\cdot 2H_2O$) and 225 µM $MnCl_2$ (Tien & Kirk, 1988)). Static cultures were performed at 37°C for 3 days. The medium was then replaced by fresh medium (30 ml) containing extractives obtained from 200 mg of oak wood. The treatment was done at 37°C for 24 hours. Mycelium was then rinsed with distilled water and freezed in liquid nitrogen for further RNA extraction.

-Arrays-

The *P. chrysosporium* custom exon expression array (12 · 135K) was manufactured by Roche NimbleGen Systems Limited (Madison, WI, USA) (http://www.nimblegen.com/products/exp/ index.html). From a data set of 9998 unique *P. chrysosporium* gene predictions, each array featured 6 unique probes per gene, all in duplicate. Total RNA was extracted and purified from triplicate cultures using the RNeasy Plant mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer. The RNA was treated twice with DNase I (during purification as recommended in manufacturer protocol and directly onto purified RNA) and cleaned with a Qiagen RNA Cleanup Kit. An additional purification step was performed to remove residual phenolic compounds due to oak treatment by precipitating RNA with LiCl 2M. RNA was converted to double-strand cDNA using the Smarter™ PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech) according to the manufacturer protocol and purified using the Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen). Single dye labelling of samples, hybridization procedures, data acquisition, background correction and normalization were performed at the NimbleGen facilities (NimbleGen Systems, Reykjavik, Iceland) following their standard protocol. Microarray probe intensities were quantile normalized across all chips. Average expression levels were calculated for each gene from the independent probes on the array and were used for further analysis. Natural log-transformed data were calculated and were subjected to the CyberT statistical framework (http://cybert.ics.uci.edu/) (Baldi & Long, 2001) using the Standard t-test unpaired two conditions data module. Benjamini & Hochberg multiple-hypothesis testing corrections with False Discovery Rate (FDR) were used.
Transcripts with a significant P value (< 0.05) were considered to be differentially expressed. The complete expression dataset is available as a series (accession number XXXXXX) at the Gene Expression Omnibus at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/).

-Cloning of PcGTT2.1, heterologous expression and purification of the recombinant protein-

The open reading frame sequence encoding *P. chrysosporium* PcGTT2.1 (JGI ProtID 6766) was amplified from a *P. chrysosporium* cDNA library using PcGTT2.1 forward and reverse primers (5' CCCCCATGGCTCACCTCCCCAACTTTCTC 3') and (5' CCCCGGATCCTTAGTGGAGGGTCTCGGC 3') and cloned into the NcoI and BamHI restriction sites (underlined in the primers) of pET-3d (Novagen). The amplified sequences encoded a protein in which an alanine has been added during cloning to improve protein production. For protein production, the *Escherichia coli* BL21(DE3) strain, containing the pSBET plasmid, was co-transformed with PcGTT2.1-pET-3d plasmid (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 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*. 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 the resolubilized fraction 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 60390 M^{-1} cm^{-1}.

-Activity Measurements-

The activity measurements of PcGTT2.1 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 (ITC) prepared in 2 % (v/v) acetonitrile, and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) prepared in DMSO, as substrates. For

these substrates the reactions were monitored respectively at 274 nm and 340 nm following the increase in absorbance arising from the formation of the S-glutathionylated adduct. The reactions with CDNB was performed in 100 mM phosphate buffer pH 7.5 in presence of glutathione (2 mM) while the reaction with 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). The reactions were started by addition of the purified enzyme and monitored with a Cary 50 UV-Visible spectrophotometer (VARIAN). To determine catalytic properties of the enzyme, assays were performed in steady state using a range of substrate concentrations (from 10 µM to 10 mM) and the catalytic parameters were calculated using the GraphPad® software.

-Yeast complementation-

S. cerevisiae strains W303-1A (*MAT***a** *ura3-1ade2-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15 can1-1*) and MML1022 (as W303-1A plus *Δgtt1::natMX4 Δgtt2::kanMX4*) were employed. MML1022 strain was constructed by standard genetic methods as described previously (Barreto *et al.*, 2006). For sensitivity experiments, growth of *Saccharomyces cerevisiae* cells in liquid SD medium (Sherman, 2002) under parallel separate treatments at 30ºC was automatically recorded (optical density at 600 nm) at one-hour intervals during 24 hours, using individual 0.5 ml cultures in shaken microtiter plates sealed with oxygen-permeable plastic sheets, in a PowerWave XS (Biotek) apparatus at controlled temperature. Identical cell numbers ($2x10^5$) were inoculated initially in each parallel culture. Cells were treated with 0.2 mM tertbutyl-hydroperoxide (tBOOH) or 0.4 mM hydrogen peroxide (H_2O_2).

Acknowledgments

This work was supported by the French National Research Agency through the Laboratory of Excellence ARBRE (ANR-12- LABXARBRE-01) and the project number ANR-09-BLAN-0012.

References

Akileswaran, L., B. J. Brock, J. L. Cereghino & M. H. Gold, (1999) 1,4-benzoquinone reductase from Phanerochaete chrysosporium: cDNA cloning and regulation of expression. *Appl Environ Microbiol* **65**: 415-421.

Baldi, P. & A. D. Long, (2001) A Bayesian framework for the analysis of microarray expression data: regularized t -test and statistical inferences of gene changes. *Bioinformatics* **17**: 509-519.

Barreto, L., A. Garcera, K. Jansson, P. Sunnerhagen & E. Herrero, (2006) A peroxisomal glutathione transferase of Saccharomyces cerevisiae is functionally related to sulfur amino acid metabolism. *Eukaryot Cell* **5**: 1748-1759.

Belinky, P. A., N. Flikshtein, S. Lechenko, S. Gepstein & C. G. Dosoretz, (2003) Reactive oxygen species and induction of lignin peroxidase in Phanerochaete chrysosporium. *Appl Environ Microbiol* **69**: 6500-6506.

Bresell, A., R. Weinander, G. Lundqvist, H. Raza, M. Shimoji, T. H. Sun, L. Balk, R. Wiklund, J. Eriksson, C. Jansson, B. Persson, P. J. Jakobsson & R. Morgenstern, (2005) Bioinformatic and enzymatic characterization of the MAPEG superfamily. *Febs J* **272**: 1688-1703.

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

Brock, B. J., S. Rieble & M. H. Gold, (1995) Purification and characterization of a 1,4-benzoquinone reductase from the basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. *Appl Environ Microbiol* **61**: 3076-3081.

Chigu, N. L., S. Hirosue, C. Nakamura, H. Teramoto, H. Ichinose & H. Wariishi, (2010) Cytochrome P450 monooxygenases involved in anthracene metabolism by the white-rot basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**: 1907-1916.

Choi, J. H., W. Lou & A. Vancura, (1998) A novel membrane-bound glutathione S-transferase functions in the stationary phase of the yeast Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem* **273**: 29915-29922.

Couturier, J., C. S. Koh, M. Zaffagnini, A. M. Winger, J. M. Gualberto, C. Corbier, P. Decottignies, J. P. Jacquot, S. D. Lemaire, C. Didierjean & N. Rouhier, (2009)

Structure-function relationship of the chloroplastic glutaredoxin S12 with an atypical WCSYS active site. *J Biol Chem* **284**: 9299-9310.

Cummins, I., D. J. Wortley, F. Sabbadin, Z. He, C. R. Coxon, H. E. Straker, J. D. Sellars, K. Knight, L. Edwards, D. Hughes, S. S. Kaundun, S. J. Hutchings, P. G. Steel & R. Edwards, (2013) Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 5812-5817.

Doddapaneni, H., R. Chakraborty & J. S. Yadav, (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.

Eastwood, D. C., D. Floudas, M. Binder, A. Majcherczyk, P. Schneider, A. Aerts, F. O. Asiegbu, S. E. Baker, K. Barry, M. Bendiksby, M. Blumentritt, P. M. Coutinho, D. Cullen, R. P. de Vries, A. Gathman, B. Goodell, B. Henrissat, K. Ihrmark, H. Kauserud, A. Kohler, K. LaButti, A. Lapidus, J. L. Lavin, Y. H. Lee, E. Lindquist, W. Lilly, S. Lucas, E. Morin, C. Murat, J. A. Oguiza, J. Park, A. G. Pisabarro, R. Riley, A. Rosling, A. Salamov, O. Schmidt, J. Schmutz, I. Skrede, J. Stenlid, A. Wiebenga, X. F. Xie, U. Kues, D. S. Hibbett, D. Hoffmeister, N. Hogberg, F. Martin, I. V. Grigoriev & S. C. Watkinson, (2011) The Plant Cell Wall-Decomposing Machinery Underlies the Functional Diversity of Forest Fungi. *Science* **333**: 762-765.

Fengel, D. & G. Wegener, (1984) Chemical composition and analysis of wood. In: Wood Chemistry, Ultrastructures, Reactions. W. d. Gruyter (ed). pp. 183-267.

Feraydoni, V. & S. K. Hosseinihashemi, (2012) Effect of walnut heartwood extractives, acid copper chromate, and boric acid on white-rot devay resistance of treated beech sapwood. *Bioresources* **7**: 2393-2402.

Fernandez-Fueyo, E., F. J. Ruiz-Duenas, P. Ferreira, D. Floudas, D. S. Hibbett, P. Canessa, L. F. Larrondo, T. Y. James, D. Seelenfreund, S. Lobos, R. Polanco, M. Tello, Y. Honda, T. Watanabe, R. J. San, C. P. Kubicek, M. Schmoll, J. Gaskell, K. E. Hammel, F. J. St John, A. Vanden Wymelenberg, G. Sabat, S. S. BonDurant, K. Syed, J. S. Yadav, H. Doddapaneni, V. Subramanian, J. L. Lavin, J. A. Oguiza, G. Perez, A. G. Pisabarro, L. Ramirez, F. Santoyo, E. Master, P. M. Coutinho, B. Henrissat, V. Lombard, J. K. Magnuson, U. Kues, C. Hori, K. Igarashi, M. Samejima, B. W. Held, K. W. Barry, K. M. LaButti, A. Lapidus, E. A. Lindquist, S. M. Lucas, R. Riley, A. A. Salamov, D. Hoffmeister, D. Schwenk, Y. Hadar, O. Yarden, R. P. de Vries, A. Wiebenga, J. Stenlid, D. Eastwood, I. V. Grigoriev, R. M. Berka, R. A. Blanchette, P. Kersten, A. T.

Martinez, R. Vicuna & D. Cullen, (2012) Comparative genomics of Ceriporiopsis subvermispora and Phanerochaete chrysosporium provide insight into selective ligninolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 5458-5463.

Floudas, D., M. Binder, R. Riley, K. Barry, R. A. Blanchette, B. Henrissat, A. T. Martinez, R. Otillar, J. W. Spatafora, J. S. Yadav, A. Aerts, I. Benoit, A. Boyd, A. Carlson, A. Copeland, P. M. Coutinho, R. P. de Vries, P. Ferreira, K. Findley, B. Foster, J. Gaskell, D. Glotzer, P. Gorecki, J. Heitman, C. Hesse, C. Hori, K. Igarashi, J. A. Jurgens, N. Kallen, P. Kersten, A. Kohler, U. Kues, T. K. A. Kumar, A. Kuo, K. LaButti, L. F. Larrondo, E. Lindquist, A. Ling, V. Lombard, S. Lucas, T. Lundell, R. Martin, D. J. McLaughlin, I. Morgenstern, E. Morin, C. Murat, L. G. Nagy, M. Nolan, R. A. Ohm, A. Patyshakuliyeva, A. Rokas, F. J. Ruiz-Duenas, G. Sabat, A. Salamov, M. Samejima, J. Schmutz, J. C. Slot, F. S. John, J. Stenlid, H. Sun, S. Sun, K. Syed, A. Tsang, A. Wiebenga, D. Young, A. Pisabarro, D. C. Eastwood, F. Martin, D. Cullen, I. V. Grigoriev & D. S. Hibbett, (2012) The Paleozoic Origin of Enzymatic Lignin Decomposition Reconstructed from 31 Fungal Genomes. *Science* **336**: 1715-1719.

Hacquard, S., D. L. Joly, Y. C. Lin, E. Tisserant, N. Feau, C. Delaruelle, V. Legue, A. Kohler, P. Tanguay, B. Petre, P. Frey, Y. Van de Peer, P. Rouze, F. Martin, R. C. Hamelin & S. Duplessis, (2012) A Comprehensive Analysis of Genes Encoding Small Secreted Proteins Identifies Candidate Effectors in Melampsora larici-populina (Poplar Leaf Rust). *Mol Plant Microbe Int* **25**: 279-293.

Herrero, E., J. Ros, J. Tamarit & G. Belli, (2006) Glutaredoxins in fungi. *Photosynth Res* **89**: 127-140.

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

Hunt, C. G., C. J. Houtman, D. C. Jones, P. Kitin, P. Korripally & K. E. Hammel, (2013) Spatial mapping of extracellular oxidant production by a white rot basidiomycete on wood reveals details of ligninolytic mechanism. *Environ Microbiol* **15**: 956-966.

Kang, Y. M., M. L. Prewitt & S. V. Diehl, (2009) Proteomics for biodeterioration of wood (Pinus taeda L.): Challenging analysis by 2-D PAGE and MALDI-TOF/TOF/MS. *Int. Biodeterior Biodegradation* **63**: 1036-1044.

Laks, P. E., (2008) Wood Preservative Fungicides and the American Wood Preservers' Association Use Category System. In: Development of Commercial Wood Preservatives: Efficacy, Environmental, and Health Issues. T. P. Schultz, H. Militz, M. H. Freeman, B. Goodell & D. D. Nicholas (eds). Washington: Amer Chemical Soc, pp. 228-240.

Levine, R. L., L. Mosoni, B. S. Berlett & E. R. Stadtman, (1996) Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 15036-15040.

Ma, X. X., Y. L. Jiang, Y. X. He, R. Bao, Y. X. Chen & C. Z. Zhou, (2009) Structures of yeast glutathione-S-transferase Gtt2 reveal a new catalytic type of GST family. *Embo Rep* **10**: 1320-1326.

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

Mariani, D., C. J. Mathias, C. G. da Silva, R. D. Herdeiro, R. Pereira, A. D. Panek, E. C. A. Eleutherio & M. D. Pereira, (2008) Involvement of glutathione transferases, Gtt1 and Gtt2, with oxidative stress response generated by H2O2 during growth of Saccharomyces cerevisiae. *Redox Rep* **13**: 246-254.

Mathieu, Y., P. Prosper, M. Buee, S. Dumarcay, F. Favier, E. Gelhaye, P. Gerardin, L. Harvengt, J. P. Jacquot, T. Lamant, E. Meux, S. Mathiot, C. Didierjean & M. Morel, (2012) Characterization of a Phanerochaete chrysosporium Glutathione Transferase Reveals a Novel Structural and Functional Class with Ligandin Properties. *J Biol Chem* **287**: 39001-39011.

Morel, M., A. Kohler, F. Martin, E. Gelhaye & N. Rouhier, (2008) Comparison of the thiol-dependent antioxidant systems in the ectomycorrhizal Laccaria bicolor and the saprotrophic Phanerochaete chrysosporium. *New Phytol* **180**: 391-407.

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

Morel, M., A. A. Ngadin, M. Droux, J. P. Jacquot & E. Gelhaye, (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.

Nomura, M. & H. Takagi, (2004) Role of the yeast acetyltransferase Mpr1 in oxidative stress: Regulation of oxygen reactive species caused by a toxic proline catabolism intermediate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 12616-12621.

Petre, B., I. Major, N. Rouhier & S. Duplessis, (2011) Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar. *Bmc Plant Biol* **11**:33.

Plett, J. M., M. Kemppainen, S. D. Kale, A. Kohler, V. Legue, A. Brun, B. M. Tyler, A. G. Pardo & F. Martin, (2011) A Secreted Effector Protein of Laccaria bicolor Is Required for Symbiosis Development. *Curr Biol* **21**: 1197-1203.

Ramirez, M. G. L., H. G. O. Ruiz, F. N. Arzate, M. A. C. Gallegos & S. G. Enriquez, (2012) Evalution of fungi toxic activity of tannins and a tannin-copper complex from the mesocarp of Cocos nucifera Linn. *Wood Fiber Sci* **44**: 357-364.

Ricci, G., F. De Maria, G. Antonini, P. Turella, A. Bullo, L. Stella, G. Filomeni, G. Federici & A. M. Caccuri, (2005) 7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole derivatives, a new class of suicide inhibitors for glutathione S-transferases - Mechanism of action of potential anticancer drugs. *J Biol Chem* **280**: 26397-26405.

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

Sherman, F., (2002) Getting started with yeast. *Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology, Pt B* **350**: 3-41.

Sjöström, E., (1981) Wood chemistry. Fundamentals and Applications. In: Wood Polysaccharides. A. Press. (ed). pp. 49-82.

Skyba, O., C. J. Douglas & S. D. Mansfield, (2013) Syringyl-Rich Lignin Renders Poplars More Resistant to Degradation by Wood Decay Fungi. *Appl Environ Microbiol* **79**: 2560-2571.

Suzuki, H., J. MacDonald, K. Syed, A. Salamov, C. Hori, A. Aerts, B. Henrissat, A. Wiebenga, P. A. vankuyk, K. Barry, E. Lindquist, K. LaButti, A. Lapidus, S. Lucas, P. Coutinho, Y. C. Gong, M. Samejima, R. Mahadevan, M. Abou-Zaid, R. P. de Vries, K. Igarashi, J. S. Yadav, I. V. Grigoriev & E. R. Master, (2013) 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.

Tamura, K., D. Peterson, P. Nicholas, G. Stecher, M. Nei & S. Kumar, (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Masimum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* **28**: 2731-2739.

Tien, M. & T. K. Kirk, (1988) Lignin peroxidase of Phanerochaete chrysosporium. *Methods Enzymol* **161**: 238-249.

Wallace, D. F. & D. J. Dickinson, (2006) The bacterial transformation of organic biocides: a common mechanism. *The International Research Group on Wood Protection (Tromso)*.

Wei, D. S., C. J. Houtman, A. N. Kapich, C. G. Hunt, D. Cullen & K. E. Hammel, (2010) Laccase and Its Role in Production of Extracellular Reactive Oxygen Species during Wood Decay by the Brown Rot Basidiomycete Postia placenta. *Appl Environ Microbiol* **76**: 2091-2097.

Wu, C. C., C. L. Wu, S. L. Huang & H. T. Chang, (2012) Antifungal activity of Liriodenine from Michelia formosana heartwood against wood-rotting fungi. *Wood Sci Technol* **46**: 737-747.

Supplemental Figure

Figure S1: Neighbor-joining tree of GTT2 related sequences. Sequences were obtained from JGI databases using BlastP and GTT2.1 and GTT2.2 sequences from *Phanerochaete chrysosporium* as template. Amino acid sequence alignments have been performed with Muscle in MEGA version 5 (Tamura *et al.*, 2011). Evolutionary analyses were conducted in MEGA5. Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Pc: *Phanerochaete chrysosporium*, Phaca: *Phanerochaete carnosa*, Phlgi: *Phlebiopsis gigantea*, Phlbr: *Phlebia brevispora*, Bjead: *Bjerkandera adusta*, Cersu: *Ceriporiopsis subvermispora*, Fompi: *Fomitopsis pinicola*, Wolco: *Wolfiporia cocos*, Pospl: *Postia placenta*, Trave: *Trametes versicolor*, Gansp: *Ganoderma* sp, Dicsq: *Dichomitus squalens*, Hebcy: *Hebeloma cylindrosporum*, Galma: *Galerina marginata*, Hypsu: *Hypholoma sublateritium*, Lacbi: *Laccaria bicolor*, Copci: *Coprinus cinereus*, Punst: *Punctularia strigosozonata*, Pleos: *Pleurotus ostreatus*, Glotr: *Gloephyllum trabeum*, Fomme*: Fomitiporia mediterranea*, Gymlu: *Gymnopus luxurians*, Stehi: *Stereum hirsutum*, Hetan: *Heterobasidion annosum*, Plicr: *Plicaturopsis crispa*, Schco: *Schyzophyllum commune*, Conpu: *Coniophora puteana*, Aurde: *Auricularia delicata*, Dacsp: *Dacryopinax sp*, Treme: *Tremella mesenterica*, Cryne: *Cryptococcus neoformans.*

Discussion générale

I. Influence du mode de vie des champignons sur l'évolution des GST au sein du système de détoxication.

A. Le génome des champignons répond à un milieu de contraintes

Dans tout écosystème, les organismes font face à des changements dans leur environnement et doivent ajuster leur physiologie de façon à pouvoir vivre de façon optimale dans un milieu donné. Cela se traduit par des modifications de leur patrimoine génétique au fil des générations, et qui peuvent être maintenues par les processus de sélection naturelle (Williams 2008). Ces modifications sont par conséquent liées au mode de vie adopté par l'organisme en question et peuvent aussi dépendre des interactions possibles avec d'autres organismes (Van der Putten 2001). Les champignons sont un modèle de choix pour étudier de telles adaptations. En effet, il s'agit d'Eucaryotes ayant la capacité de coloniser une grande diversité de substrats et d'écosystèmes selon leur type trophique et les conditions environnementales (Peay 2010). De plus, leur génome est relativement petit par rapport aux autres eucaryotes: 37,7 millions de paires de bases en moyenne pour 1581 génomes fongiques analysés (Kullman 2005), ce qui facilite leur étude au niveau génomique.

Les nouvelles techniques de séquençage à haut débit ouvrent de grandes perspectives quant à la compréhension de la diversité et de l'évolution des génomes. Ainsi, le Joint Genome Institute (JGI) a lancé le « fungal genomic program » (FGP) visant à séquencer les génomes fongiques à grande échelle de façon à explorer la diversité fongique, pour mieux comprendre son rôle dans l'environnement mais aussi pour aider au développement de nouvelles applications biotechnologiques que pourraient apporter les champignons. Ce programme permet également de réaliser des études comparatives sur l'évolution des gènes, la structure des génomes et de comprendre le métabolisme des champignons en relation avec les modes de vie saprophytes, symbiotiques et pathogènes (Eastwood 2011; Martin 2011; Plett 2011; Floudas 2012; Suzuki 2012; Manning 2013).

Cependant, seuls les champignons cultivables en laboratoire et dont le génome a été séquencé peuvent faire l'objet de telles études. En comparant le génome des organismes séquencés, l'étude des gènes nécessaires à un mode de vie particulier peut permettre d'attribuer un champignon à un groupe fonctionnel écologique caractéristique. Par exemple, l'étude de la nature et du nombre de gènes codant les enzymes de dégradation du bois permet d'affecter un type de pourriture à un champignon donné (Floudas 2012). De façon plus générale, des éléments génomiques qui seraient conservés parmi les taxa permettent d'émettre

des hypothèses quant à leur importance au sein de l'organisme. Leur rôle peut être mis en lien avec l'étude de systèmes de régulation ainsi que les processus physiologiques. A contrario, lorsque ces éléments génomiques divergent parmi les taxa, cela signifierait le relâchement possible des contraintes sélectives (Whitehead 2012).

Ainsi, en 2009, l'étude de la diversité des GST fongiques a été réalisée par génomique comparative en utilisant des banques de données telles que le FGP du JGI en considérant différents phyla et différents mode de vie. Les 29 génomes étudiés ont révélé 7 à 46 séquences de GST qui reflèteraient le type trophique du champignon plutôt que la taille de son génome ou sa taxonomie (Tableau 6). En effet, les champignons saprophytes sont parmi les espèces possédant le plus de GST. De plus, la distribution parmi les différentes classes est hétérogène et parmi les saprophytes, les Ure2p, les GST à cystéine (ici sous le terme Omega) et les GSTFuA (initialement nommées GTE) sont les plus étendues (Morel 2009).

		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

Tableau 6 : Analyse comparative des gènes codant les GST chez une sélection de champignons asco-, zygo- et basidiomycètes (Morel 2009).

Par une approche similaire, une étude phylogénétique a été réalisée lors de ce travail de doctorat. Cette analyse s'est focalisée sur la classe des Ure2p des génomes d'asco- et de basidiomycètes (***Article 1***) a permis la mise en évidence de deux sous-classes dénommées Ure2pA et Ure2pB. Chaque sous-classe est présente dans les deux phyla où elles sont regroupées selon la taxonomie fongique, ce qui suppose une diversification récente de ces gènes. Les Ure2pA sont spécifiques aux champignons alors que les Ure2pB ont été récemment identifiées chez d'autres organismes tels que les bactéries ou les mousses (Kanai 2006; Liu 2012). Chez les basidiomycètes, la sous-classe Ure2pA est particulièrement étendue tandis que les représentants Ure2pB sont moins nombreux mais plus ubiquistes, ce qui suggère un rôle différent mais nécessaire pour ces organismes. Cette distribution n'est a priori pas reliée au style de vie suggérant plutôt l'influence d'une pression environnementale.

Outre leur représentation au niveau génomique, la régulation de ces GST au niveau cellulaire est à prendre en considération. En effet, il est difficile d'assigner une fonction à une enzyme simplement sur la base de sa séquence, ne connaissant pas son niveau d'expression. La régulation d'un gène est effectivement un facteur évolutif important. Ainsi, un gène non exprimé n'est généralement pas maintenu (Krylov 2003; Romero 2012). La plupart du temps, les GST sont faiblement exprimées mais peuvent être fortement induites par un signal particulier. Les analyses de transcriptomique réalisées chez *P. chrysosporium* par l'équipe de Van den Wymelenberg montrent une grande expression de PcUre2pA8 et de PcUre2pB1, unique représentant de la sous-classe Ure2pB, et ce, dans toutes les conditions testées (milieu riche, limité en carbone ou limité en azote, ou milieu contenant du glucose, de la cellulose ou du bois de peuplier ou de pin). Les PcUre2pA7 et PcUre2pA2 sont peu exprimées (Wymelenberg 2009; Wymelenberg 2010; Wymelenberg 2011). Les conditions ne sont peut-être pas optimales, puisque qu'elles ont été exprimées lors des tests d'expression réalisés au cours de cette thèse (***Article 1***, Thuillier 2011). Cependant, l'analyse des séquences des PcUre2p durant cette thèse a montré l'existence de codons stop issus probablement de mutations récentes au sein de l'ADNc de la PcUre2pA2, ce qui empêcherait la production de la protéine (données non présentées).

L'importance de la pression environnementale a également été montrée au cours de ces travaux dans la mesure où PcUre2pA4 et PcUre2pA6 sont particulièrement exprimées en présence des xénobiotiques HAP (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques), ce qui reflèterait la nécessité de ces enzymes dans les processus de détoxication ou de résistance envers ces composés (***Article 1***, Thuillier 2011). Ainsi, un changement environnemental qui engendrerait l'expression réitérée d'une enzyme conduirait à sa conservation dans le génome

voire à des mutations liées à une sélection adaptative. C'est probablement le cas de la conservation des isoformes de la sous-classe Ure2pB au sein des basidiomycètes.

Une étude plus large a également été menée au cours de ce doctorat de façon à étudier la réponse de *P. chrysosporium* à différents extraits de bois, notamment de chêne. Ainsi, un set plus global de gènes a répondu à ce changement, impliquant principalement des gènes de nutrition, de régulation, de modification d'acide nucléique, de signalisation cellulaire mais aussi dans la réponse aux stress (***Article 4***). Une expression non négligeable d'enzymes du système antioxydant, de cytochrome P450 monooxygénases et de glutathion transférases souligne la toxicité du milieu engendré par ces extraits de chêne et plus généralement celle d'un environnement ligninolytique. C'est pourquoi il est nécessaire de considérer la réponse du xénome d'un point de vue plus global.

B. Les capacités d'adaptation des champignons au substrat lignocellulosique nécessitent une plasticité du xénome

Une étude présentée ci après a donc été menée sur la totalité des génomes de basidiomycètes disponibles sur la base de données du JGI. En effet, selon leur mode de vie, les champignons doivent faire face à un environnement plus ou moins hostile contre lequel ils doivent se défendre grâce à leur système de détoxication. Les champignons symbiotiques et parasites doivent par exemple faire face aux mécanismes de défense de l'hôte (Wojtaszek 1997; Danielsson 2011). Concernant les saprophytes, l'environnement ligninolytique engendré par l'action des enzymes de dégradation du bois produit des composés intermédiaires souvent toxiques pour le champignon. Les séquences des cytochrome P450 monooxygénases pour la phase I de détoxication et des glutathion transférases pour la phase II de détoxication ont donc été analysées. Leur variabilité et le nombre de copies de gènes semblent être liés au mode de vie de ces champignons, reflètant leur adaptation aux contraintes rencontrées.

Ces résultats font l'objet d'une revue publiée chez Microbial biotechnology.

Article 5 : Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi

microbial biotechnology

Open Access

Minireview

Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi

Mélanie Morel,[1,2]* Edgar Meux,[1,2] Yann Mathieu,[1,2] Anne Thuillier,[1,2] Kamel Chibani,[1,2] Luc Harvengt,[3] Jean-Pierre Jacquot[1,2] and Eric Gelhaye[1,2]

[1]*Université de Lorraine, IAM, UMR 1136, IFR 110 EFABA, Vandoeuvre-lès-Nancy, F-54506, France.*

[2]*INRA, IAM, UMR 1136, Vandoeuvre-lès-Nancy, F-54506, France.*

[3]*Laboratoire de biotechnologie, Pôle Biotechnologie et Sylviculture Avancée, FCBA, Campus Foret-Bois de Pierroton, 33610 Cestas, France.*

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. This is of particular importance for white biotechnology, this xenome being a putative target for improving degradation properties of these fungi in biomass valorization purposes.

Received 17 September, 2012; revised 5 November, 2012; accepted 8 November, 2012. *For correspondence. E-mail mmorel@scbiol.uhp-nancy.fr; Tel. (+33) 3 83 68 4228; Fax (+33) 3 68 42 92.
doi:10.1111/1751-7915.12015

Funding Information This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR) research grant (ANR-09-BLAN-0012).

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 (CNV) 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 programmes 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 projects have been devoted to wood-decaying fungi (Martinez *et al*., 2004; 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

© 2012 The Authors. Published by Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

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, and 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.

This article presents the fungal xenomic network with a comparative genomic analysis of two xenomic multigenic families found in wood decaying fungi. We have focused on the cytochrome P450 (CytP450) family, which is involved in the first step of compound modification mainly through oxidation reactions (phase I) and the glutathione transferase (GST) family, which belongs to the phase II conjugating enzymes and for which functional data are becoming available (Meux *et al*., 2011; Thuillier *et al*., 2011; Mathieu *et al*., 2012). In the literature, studying GST is usually justified because of the considerable interest of these enzymes in medicine, agriculture and analytical biotechnology. For example, in medicine, GSTs could be molecular targets for the design of new anticancer drugs. In agriculture, GSTs are exploited in the development of transgenic plants with increased resistance to biotic and abiotic stresses, or they could be used as biosensors for monitoring environmental pollutants, such as herbicides and insecticides (Chronopoulou and Labrou, 2009). In this review, we focus the analysis on fungal GSTs, which have been far less studied than their plant and mammals counterparts, postulating that these enzymes and more globally the xenome could be new targets of investigations in white biotechnology.

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 catalysing 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 (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 to storage (Fig. 1). In this article, 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.

© 2012 The Authors. Published by Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd.

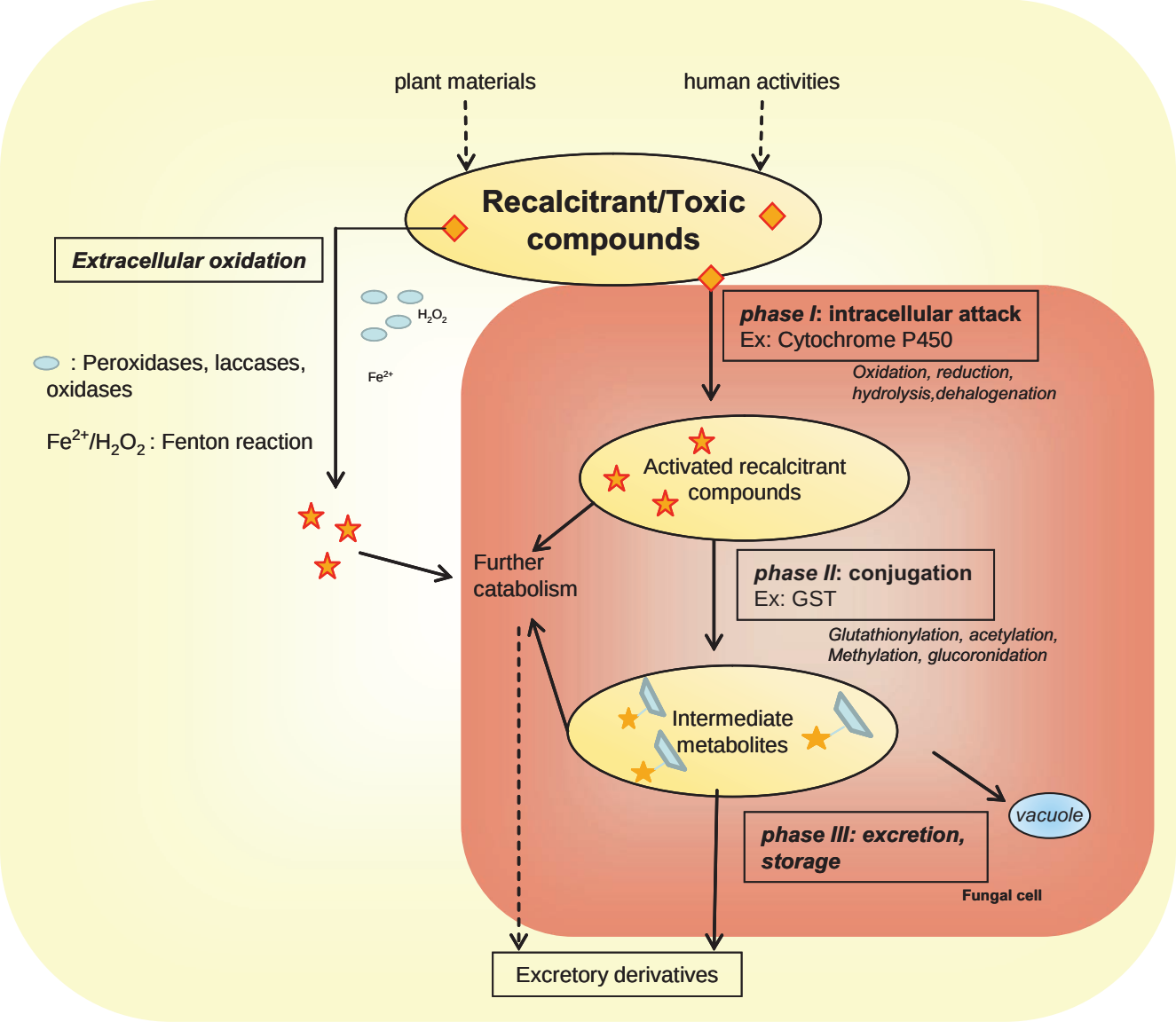


Fig. 1. The fungal detoxification system defined as 'xenome'.

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; 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 enzy-

© 2012 The Authors. Published by Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd.

matic 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 CytP450. These enzymes, found in all life forms, are able to catalyse various reactions as hydroxylation, dealkylation, sulfoxidation etc. and could be involved in primary, secondary and detoxification metabolisms. These haemthiolate 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 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 four (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 catalyse the formation of sugar (glucoside, xyloside or glucuronide), sulfate, 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). Neverthe-

© 2012 The Authors. Published by Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd.

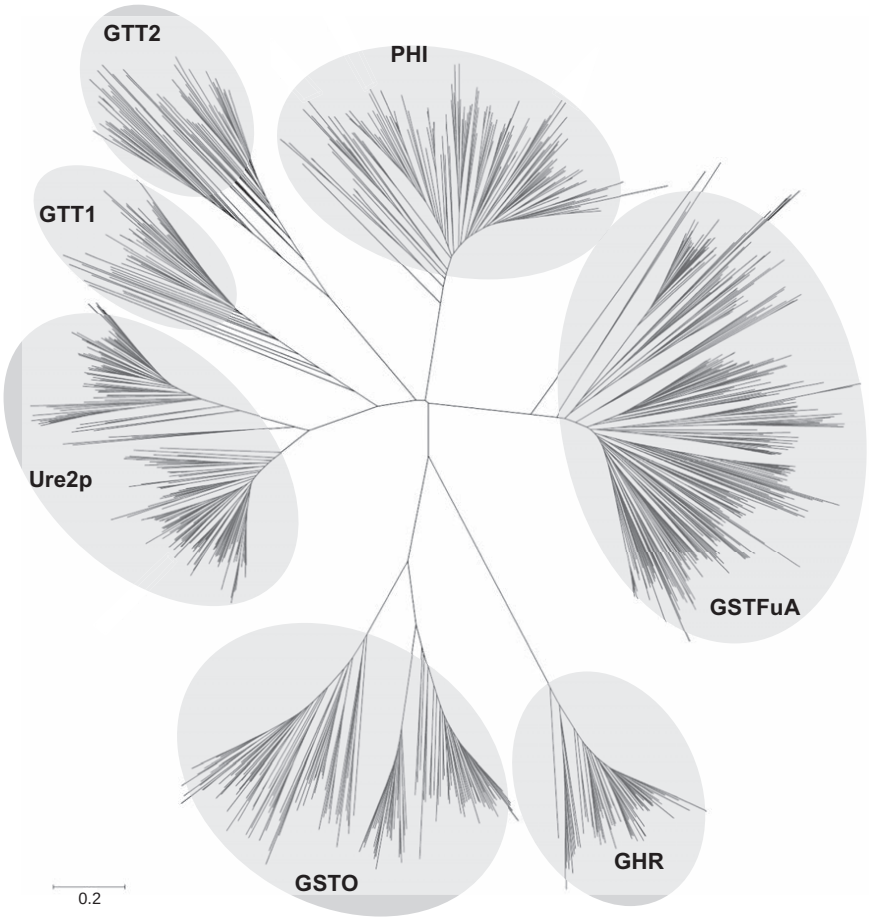


Fig. 2. Phylogenetic tree of glutathione transferases from *Basidiomycetes*. Various subclasses could be distinguished: Ure2p, GSTFuA, Omega (GSTO), Glutathionyl Hydroquinone Reductase (GHR), Phi, GTT1 and GTT2. The sequences were retrieved from genomes available on the Joint Genome Institute (http://www.jgi.doe.gov/). Sequence alignments were done by CLUSTALW and the tree was constructed with the neighbour-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.

less, 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, GSTs form a large ubiquitous multigenic family. The number of isoforms found in fungi range from six 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 one to five paralogues 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 recently renamed GSTFuA (Mathieu *et al*., 2012), GSTO and GHR (McGoldrick *et al*., 2005, Morel *et al*., 2009) (Fig. 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*., 2012). This emphasizes the challenge of GST classification.

© 2012 The Authors. Published by Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd.

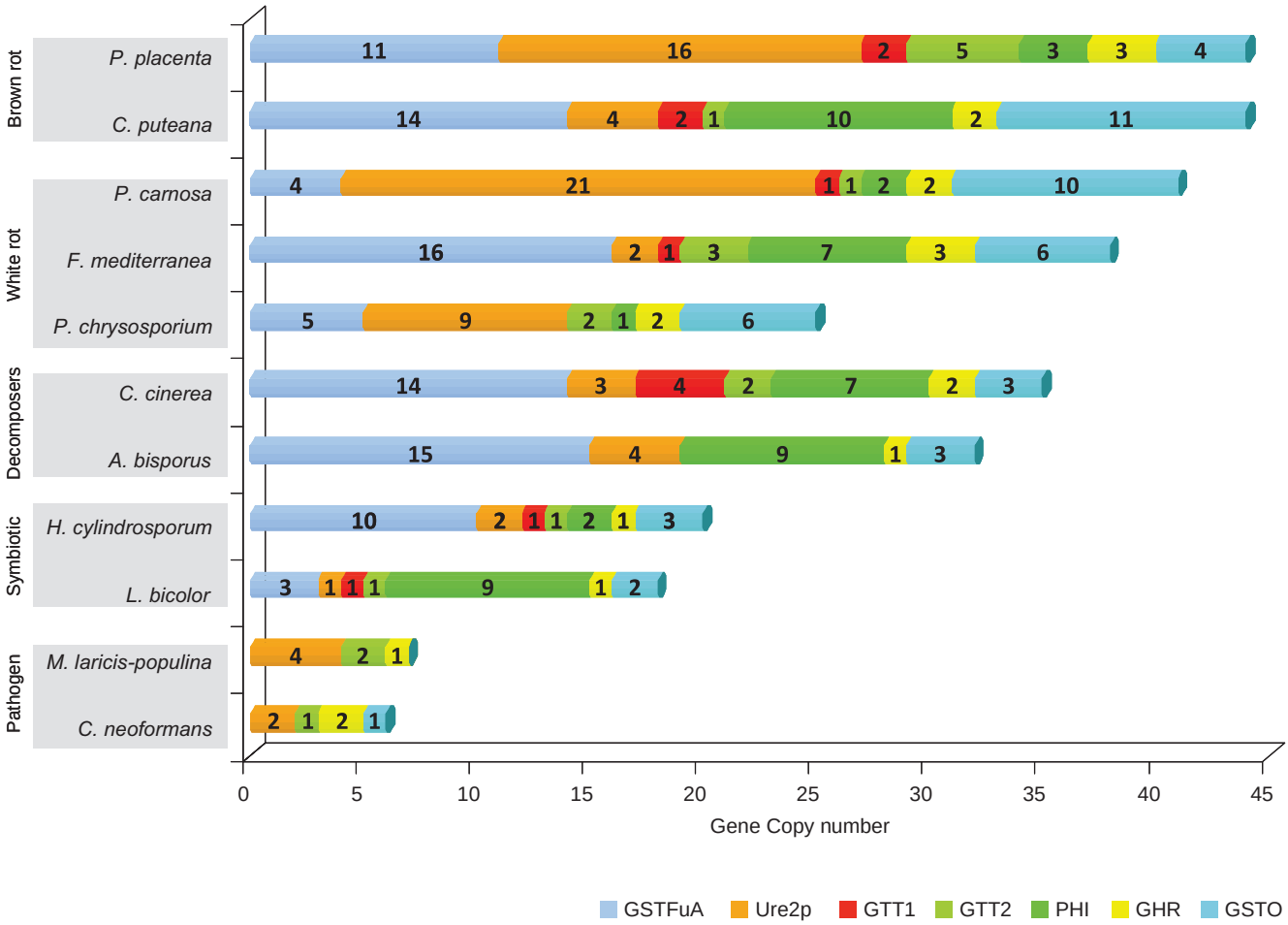


Fig. 3. Organization of the GSTome in selected fungi. GST isoform numbers for each subclass are reported. The repartition has been done based on the sequences retrieved from the JGI coupled to phylogenetic analyses.

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 (http://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 Fig. 3. We have investigated the diversity of GSTs in saprophytic, symbiotic and pathogenic fungi (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 catalyses the formation of glutathione-Cd conjugates (Adamis *et al*., 2004), while ScGTT1 catalyses 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

© 2012 The Authors. Published by Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd.

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 (Fig. 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 S1).

A separate cluster has been identified in the present phylogenetic analysis (Fig. 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 S1). A proteomic study revealed upregulation 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, 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 S1). 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 one in most of the organisms to four 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 upregulation 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 upregulated by fir in *P. carnosa* (MacDonald *et al*., 2011).

GSTFuA 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 β-aryl ether linkages, which is the most abundant bond found in lignin. SpLigE and SpLigF are enantioselective GSTs involved in cleavage of β-aryl ether compounds, like guaiacylglycerol β-O-4-methylumbelliferone (GOU) to produce β-hydroxypropiovanillone and 4-methylumbelliferone *in vitro* (Otsuka *et al*., 2003). SpLigG is a glutathione lyase catalysing glutathione removal from the glutathione conjugate produced by SpLigF (Masai *et al*., 2003).

The number of isoforms is highly variable within and among 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 and 19 isoforms) in wood interacting fungi (saprotrophic, litter-decomposing and necrotrophic fungi) whereas it is absent in the analysed biotrophic pathogens (supplemental Table

© 2012 The Authors. Published by Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd.

S1). 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 (Fig. 2).

Cysteine-containing GSTs

Cysteine-containing GSTs are relatively ancient members of the cytosolic GST superfamily widespread in several kingdoms and phyla [Omega (O) in mammals, fungi and insect; *S*-glutathionyl hydroquinone reductase (GHR) in fungi and prokaryotes; Lambda (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 with the classical GSTs. They do not catalyse conventional conjugation reactions and instead use GSH as a cofactor rather than co-substrate. Cysteine-containing GSTs have been described to catalyse 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 two 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 *Melampsora larici populina, Puccinia graminis* or *Malassezia globosa* suggesting an evolution of the GST driven by the adaptation of the fungus to its habitat (supplemental Table S1). GHR sequences cluster separately and have been recently described as a new subclass of enzymes catalysing the removal of glutathione from hydroquinone conjugates (Xun *et al*., 2010; Belchik and Xun, 2011; Meux *et al*., 2011). One to four 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 S1).

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 GSTO class (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 sulfur 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 towards 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 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.

Considering fungi from various phyla, a significant expansion of the total number of GST has been highlighted in *Agaricomycotina* (Fig. 4A and supplemental Table S2). This CNV is independent of the global number of gene models. This result can be correlated with a previous study performed on the CytP450 family (Cresnar and Petric, 2011). These authors showed that predominantly yeast-form fungi such as *Saccharomycotina* have a small P450ome, while mycorrhizal relationships and complex nutrient degradation mainly performed by *Agaricomycotina* seem to enhance the P450ome size. Based on this observation 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 can be observed suggesting a close link between phase I and phase II detoxification processes (Fig. 4B). However, this correlation with CytP450 does not exist when considering the GST classes individually. This suggests that compensatory effects between GST gene copy numbers could exist to relay the first detoxification step. Both protein families are largely expanded in wood-interacting fungi. 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

© 2012 The Authors. Published by Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd.

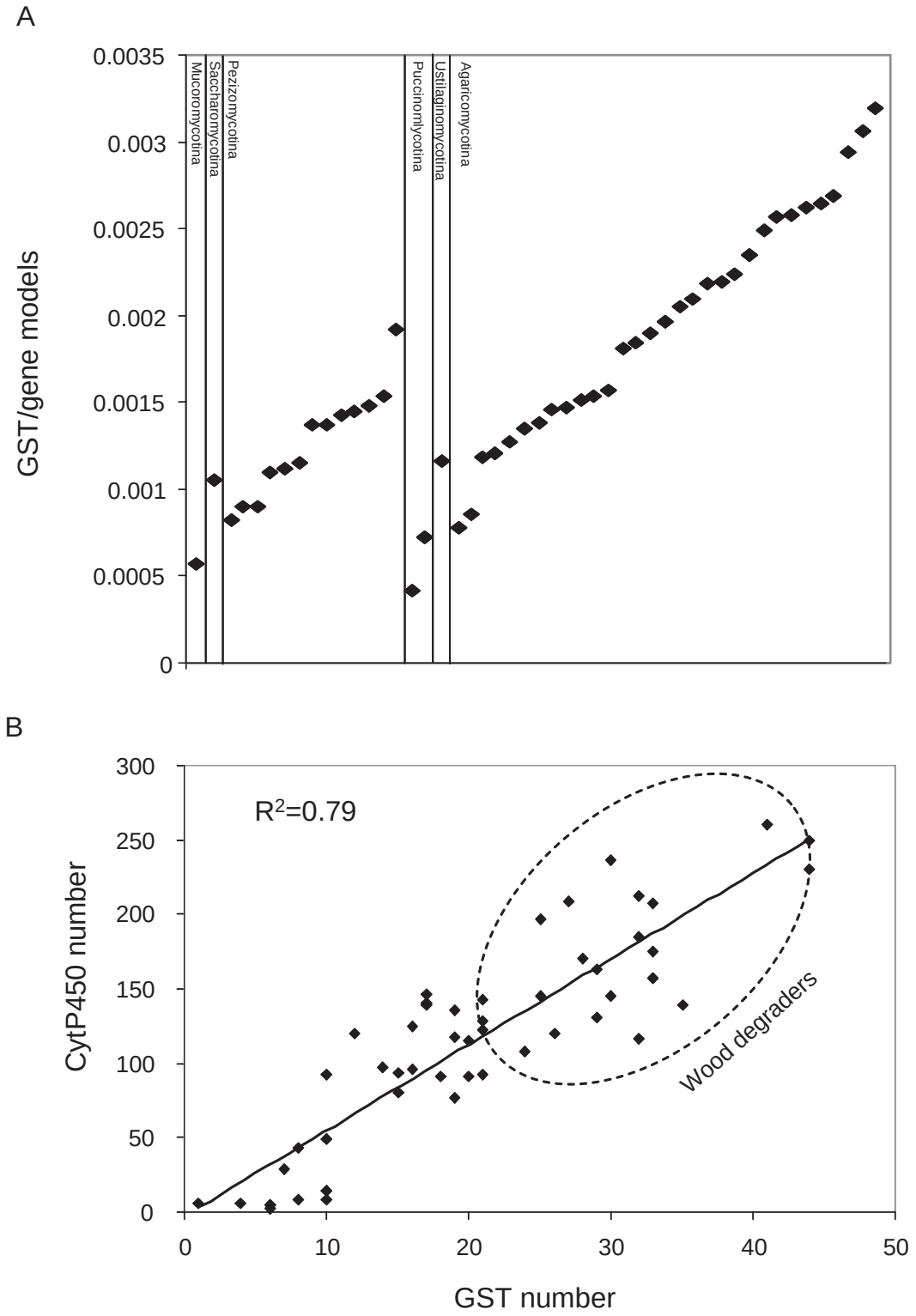


Fig. 4. GSTome expansion in *Agaricomycotina*. A. Relative GSTome size of fungal species belonging to various phyla. The ratio between number of GST and number of gene models is reported. B. Relationship between GST and CytP450 copy numbers in the JGI available fungal genomes. Wood degraders exhibit the highest numbers of GST and CytP450 isoforms. Species names and data are given in supplemental Table S2.

© 2012 The Authors. Published by Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd.

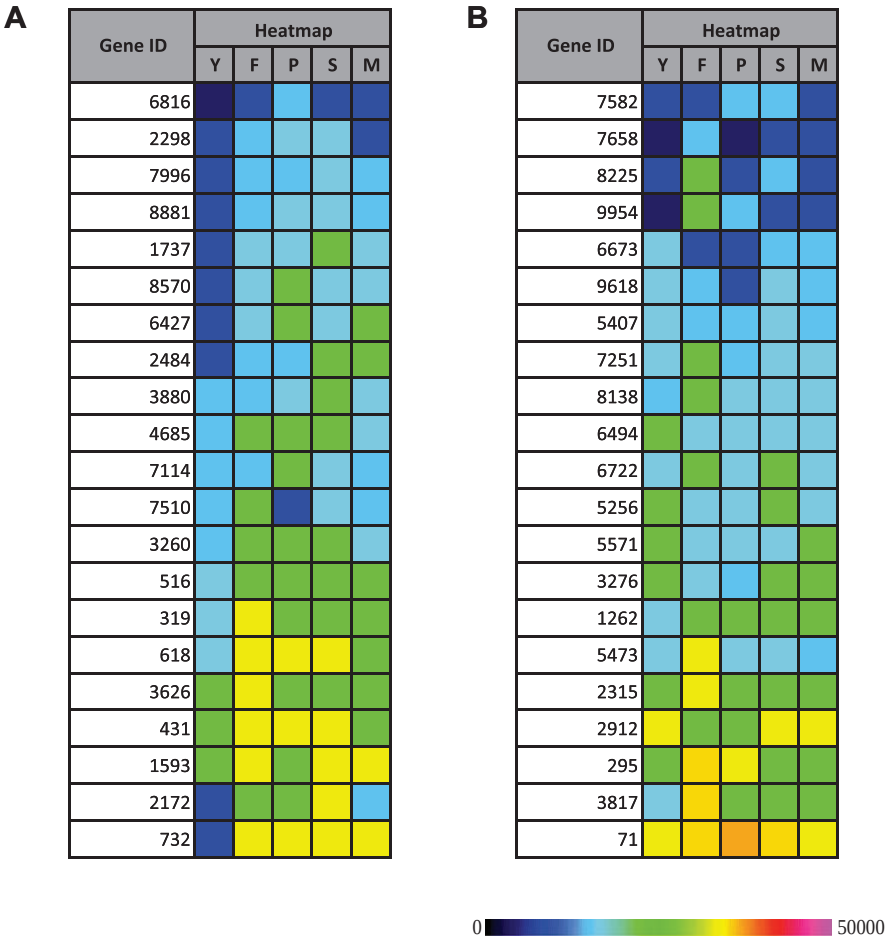


Fig. 5. Heat maps for selected *P. carnosa* transcripts coding for CytP450 (A) and GSTs (B), during growth on YMPG (Y) or medium containing wood from fir (F), pine (P), spruce (S) or maple (M), as determined by mRNA-Seq. The colour scale represents the reads per kilobase of gene model per million mapped reads. The figure has been adapted from MacDonald and colleagues (2011).

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 a 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 (Fig. 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 (Fig. 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

© 2012 The Authors. Published by Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd.

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; 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 stabilizing 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 catalyse 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-functionalization

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 GSTFuA isoforms. 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. 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 co-workers 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 GSTFuA and Ure2p isoforms of *P. chrysosporium* suggesting a potential functional convergence between these classes. A similar convergence has been also observed for versatile CytP450, which are able to catalyse similar reactions without significant sequence similarity (Hirosue *et al*., 2011).

Xenomic genes and fungal adaptation

Globally, the xenome, described in this article 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 catabolize 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

© 2012 The Authors. Published by Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd.

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 with *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.

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 article, 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. Moreover, combining data concerning both GSTome and CytP450ome could have promising implications in biotechnological purposes such as wood preservation, fungicide resistance or biomass valorization. The yield of enzymatic hydrolysis being increased by pre-treatment with ligninolytic fungi (Giles *et al*., 2011), the selection of strains with better degrading capabilities and resistance mechanisms to toxic molecules will provide potentially economic, social and health benefits.

Conflict of interest

None declared.

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

© 2012 The Authors. Published by Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd.

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.

Chronopoulou, E.G., and Labrou, N.E. (2009) Glutathione transferases: emerging multidisciplinary tools in red and green biotechnology. *Recent Pat Biotechnol* **3:** 211–223.

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 Biol* **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 USA* **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 USA* **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. *J Ecol* **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.

Giles, R.L., Galloway, E.R., Gloria, D., Elliott, G.D., and Parrow, M.W. (2011) Two-stage fungal biopulping for improved enzymatic hydrolysis of wood. *Bioresour Technol* **102:** 8011–8016.

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. *J Biotechnol* **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 Microbiol* **9:** 177–192.

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

© 2012 The Authors. Published by Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd.

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. *Ecol Monogr* **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.

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.

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

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.

Mariani, D., Mathias, C.J., da Silva, C.G., Herdeiro Rda, S., Pereira, R., Panek, A.D., *et al*. (2008) Involvement of glutathione transferases, Gtt1 and Gtt2, with oxidative stress response generated by H_2O_2 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 USA* **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., *et al*. (2012) Characterization of a *Phanerochaete chrysosporium* glutathione transferase reveals a novel structural and functional class with ligandin properties. *J Biol Chem* **PMID:** 23007392.

Meux, E., Prosper, P., Ngadin, A., Didierjean, C., Morel, M., Dumarcay, S., *et al*. (2011) Glutathione transferases of *Phanerochaete chrysosporium*: S-glutathionyl-phydroquinone reductase belongs to a new structural class. *J Biol Chem* **286:** 9162–9173.

Meux, E., Prosper, P., Masai, E., Mulliert, G., Dumarçay, S., Morel, M., Didierjean, C., Gelhaye, E., and Favier, F. (2012) Sphingobium sp. SYK-6 LigG involved in lignin degradation is structurally and biochemically related to the glutathione transferase omega class. *FEBS Lett* **586:** 3944–3950.

Mizutani, M., and Ohta, D. (2010) Diversification of P450 genes during land plant evolution. *Annu Rev Plant Biol* **61:** 291–315.

© 2012 The Authors. Published by Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd.

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** (Part 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. *Funct Ecol* **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 Biol Rev* **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* **82:** 169–181.

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.

© 2012 The Authors. Published by Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd.

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.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. GST isoform number in basidiomycetes 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.

Table S2. Total number of GST and CytP450 in various species from *Agaricomycotina*, *Ustilagomycotina*, *Pucciniomycotina*, *Pezizomycotina*, *Saccharomycotina* and *Mucoromycotina*.

© 2012 The Authors. Published by Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd.

Supplemental Table 1: GST isoform number in basidiomycetes 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	GSTFuA	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

Supplemental Table 2: Total number of GST and CytP450 in various species from Agaricomycotina, Ustilagomycotina, Pucciniomycotina, Pezizomycotina, Saccharomycotina and Mucoromycotina.

Fungus	gene models	totalGST	total cytP450	GST/gene models
Rhizopus oryzae	17459	10	49	0.000572770490864311
saccharomyces cerevisiae	5695	6	3	0.00105355575065847
Neurospora crassa	9733	8	43	0.000821945957053324
chaetomium globosum	11124	10	92	0.000898957209636821
Magnaporthe griseae	11054	10	14	0.000904649900488511
sclerotinia sclerotiorum	14522	16	96	0.00110177661479135
aspergillus nidulans	10701	12	120	0.00112139052425007
botrytis cinerea	16448	19	136	0.00115515564202335
mycosphaerella graminicola	10952	15	81	0.00136961285609934
stagonospora nodorum	12380	17	146	0.00137318255250404
fusarium graminearum	13332	19	118	0.00142514251425143
mycosphaerella fijensis	10327	15	94	0.00145250314709015
fusarium vertilliodoides	14179	21	129	0.00148106354467875
aspergillus clavatus	9121	14	97	0.00153491941673062
aspergillus fumigatus	9887	19	77	0.00192171538383736
Melampsora laricis-populina	16694	7	29	0.000419312327782437
Sporobolomyces roseus	5536	4	6	0.000722543352601156
Ustilago maydis	6902	8	8	0.00115908432338453
Laccaria bicolor	23132	18	91	0.00077814283243991
Cryptococus neoformans	6967	6	5	0.000861202813262523
Hebeloma cylindrosporum	16841	20	91	0.00118757793480197
Tremella mesenterica Fries	8313	10	8	0.00120293516179478
Auricularia delicata	23577	30	237	0.00127242651736862
Galerina marginata	21461	29	163	0.00135128838357952
Pleurotus ostreatus	12330	17	141	0.00137875101378751
Jaapia argillacea	16419	24	108	0.00146172117668555
Punctularia strigosozonata	11538	17	139	0.00147339226902409
Schizophyllum commune	13210	20	115	0.00151400454201363
Plicaturopsis crispa	13626	21	92	0.00154117129018054
Heterobasidion annosum	13405	21	143	0.00156657963446475
Botryobasidium botryosum	16526	30	145	0.0018153213118722
Hypholoma sublateritium	17911	33	157	0.00184244319133493
Fomitopsis pinicola	14724	28	171	0.00190165715838087
Wolfiporia cocos	12746	25	197	0.00196139965479366
Dacryopinax sp	10242	21	122	0.00205038078500293
Ganoderma sp	12910	27	209	0.00209140201394268
Hydnomerulius pinastri	13270	29	131	0.00218538055764883
Gloeophyllum trabeum	11846	26	120	0.00219483369913895
Trametes versicolor	14296	32	185	0.00223838836038053
Stereum hirsutum	14072	33	208	0.00234508243320068
Phanerochate chrysosporium	10048	25	145	0.00248805732484076
Postia Placenta	17173	44	250	0.00256216153263844
Serpula lacrymans	12789	33	157	0.00258034248182031
Coprinopsis cinerea	13342	35	139	0.00262329485834208
Ceriporiopsis subvermispora	12125	32	212	0.00263917525773196
Dichomitus squalens	12290	33	175	0.00268510984540277
Phanerochate carnosa	13937	41	260	0.00294180957164383
Agaricus bisporus	10438	32	117	0.00306572140256754
Coniophora puteana	13761	44	230	0.00319744204636291

II. Convergence fonctionnelle et évolution, l'exemple des Ure2p

A. Complémentarité génomique des classes Ure2p/GSTFuA et des cytochrome P450 monooxygénases.

Considérant l'ensemble des classes de GST, la corrélation numérique avec les cytochrome P450 monooxygénases est claire (***Article 5***, Morel 2013). Cependant, elle n'est pas évidente lorsque les classes sont analysées individuellement. Toutefois, le nombre de séquences Ure2p et GSTFuA combinées conserve cette corrélation avec le nombre de gènes de cytochrome P450 monooxygénases (Figure 38). Ces séquences ont probablement co-évolué en réponse aux besoins des champignons face à un environnement toxique, nécessitant la diversification des processus de détoxication (Hirosue 2011). Une autre étude a également montré une telle corrélation sur six familles de gènes impliqués soit dans la reconnaissance, soit l'assimilation de la nourriture chez la drosophile. Il a été suggéré que cette relation est due au fait que ces gènes interagissent dans un même mécanisme nutritif (Wu 2011).

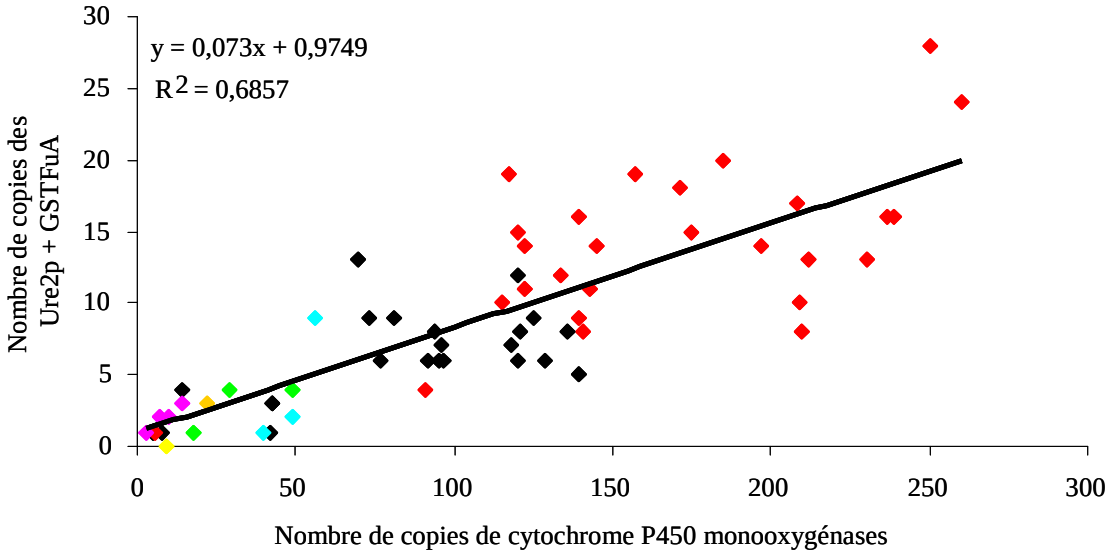


Figure 38 : Corrélation entre le nombre de copies des classes Ure2p et GSTFuA et des CytP450 dans les génomes de Agaricomycotina (◆), Pezizomycotina (◆), Mucoromycotina (◆), Saccharomycotina (◆), Chytridiomycotina (◆), Puccinomycotina (◆) and Ustilagomycotina (◆)

Alors que les gènes fongiques subissent régulièrement des duplications en réponse aux contraintes environnementales rencontrées, seules celles présentant un avantage sélectif sont conservées et/ou peuvent acquérir de nouvelles fonctions (Wagner 1998; Kondrashov 2002; Wapinski 2007). L'extension des classes Ure2p et GSTFuA serait donc le reflet d'une adaptation récente due à une pression environnementale plus ou moins forte. Ainsi, les

différences observées entre *Phanerochaete carnosa* et *P. chrysosporium* (Figure 39), pourtant taxonomiquement très proches, seraient dues au type de bois qu'ils colonisent, respectivement conifères et feuillus. En effet, ces deux bois diffèrent dans leur composition chimique et donc dans la nature des composés issus de leur dégradation, ce qui aurait une influence sur le génome de ces champignons (MacDonald 2012). De plus, parmi les Agaricomycètes, un effet compensatoire est observable entre les GST Ure2p et GSTFuA, du moins, en ce qui concerne le nombre de séquences. La sous-classe Ure2pA, qui est plus étendue, n'est présente que dans les génomes de *Corticiaceae*, *Polyporales* et *Gloephyllales*, tandis que les autres ordres possèdent un plus grand nombre de GSTFuA (Figure 39). Il y a donc eu probablement l'extension d'une classe au détriment de l'autre, du fait de la non conservation de séquences non fonctionnelles.

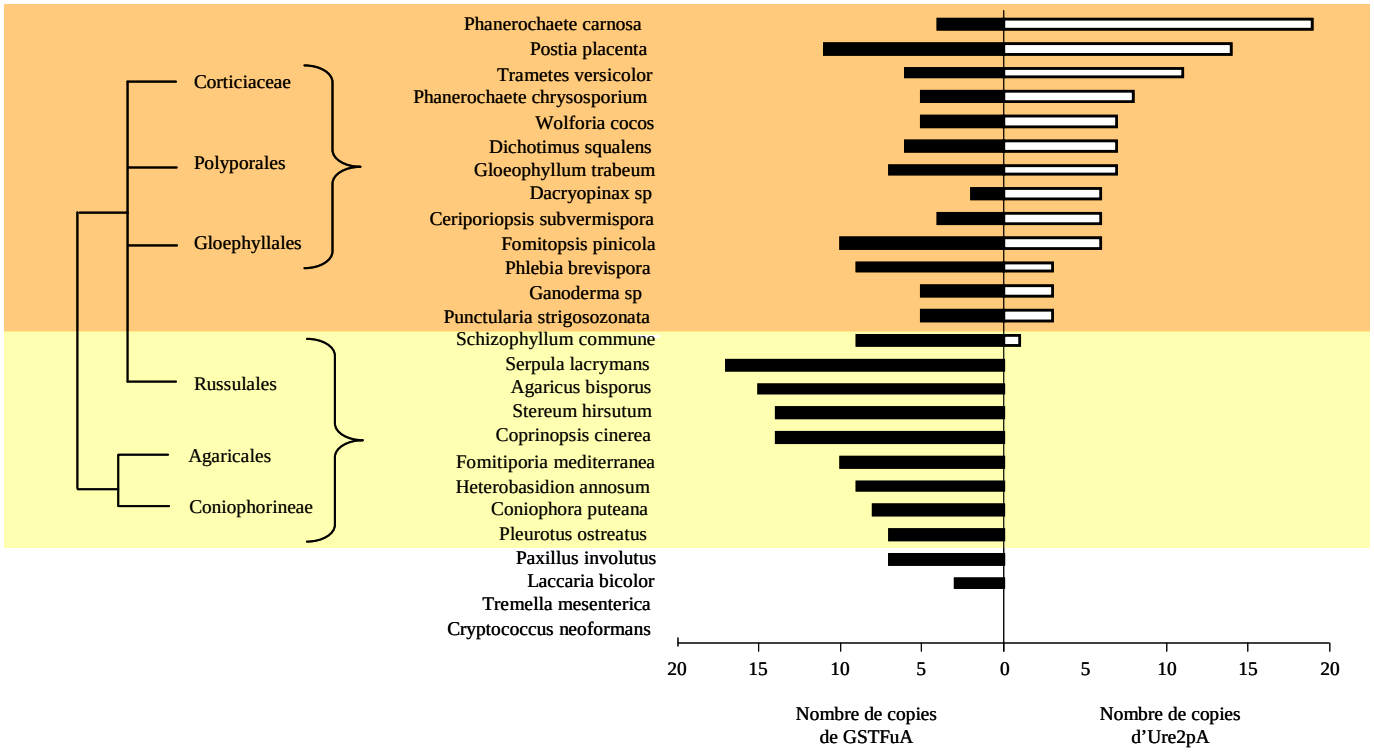


Figure 39 : Répartition des nombres de copies des GSTFuA (barres noires) et des Ure2pA (barres blanches) dans différentes espèces d'Agaricomycotina en relation avec leur taxonomie.

B. Convergence fonctionnelle des GSTFuA et des Ure2p : promiscuité et multispécificité

Afin de mieux comprendre ce possible effet compensatoire, une étude fonctionnelle de la classe Ure2p de *P. chrysosporium* a été réalisée lors de ce travail de thèse.

Après avoir identifié les isoformes pouvant présenter un intérêt (***Article 1***), les capacités catalytiques des PcUre2p ont été étudiées pour chaque sous-classe, en relation avec leur structure, résolue en parallèle (***Articles 2 et 3***). Il a été ainsi montré que certaines isoformes sont capables de transformer un éventail de substrats. En effet, alors que seule la PcUre2pA4 ne transforme qu'un des substrats testés, les PcUre2pA5, PcUre2pA6, PcUre2pA8 sont capables d'en transformer trois (CDNB, phénéthyl isothiocyanate et PNP-butyrate). De même, la PcUre2pB1 est capable de déglutathionyler le HED et le DHA, substrats relativement petits, mais aussi le PAP-SG, et même des protéines telles qu'une GSTO. Ces résultats appuient la notion de « multispécificité » (de substrat) attribuée à de nombreuses enzymes, notamment impliquées dans la détoxication. En particulier, la plupart des CytP450 sont capables d'accepter une large gamme de substrats donnés (Syed 2013).

Des propriétés ligandine sur des composés dérivés de hêtre ont été observées chez les PcUre2p au cours de ces travaux (***Article 3***), tout comme chez les PcGSTFuA (Mathieu 2012). Ces enzymes possèdent en effet la capacité de lier une variété de substrats et sont donc multispécifiques pour cette fonction. Cette propriété peut être impliquée dans la phase III de détoxication pour le transport ou la séquestration des xénobiotiques et est d'ailleurs couramment observée chez les GST (Marrs 1996; Lu 2004; Tuna 2010; Brock 2013) ce qui suggère donc que les GST sont non seulement des enzymes de phase II mais aussi de phase III.

Ainsi, en plus de cette fonction ligandine, les résultats obtenus ont également mis en évidence la capacité de la PcUre2pA6 à réaliser plusieurs types de réactions catalytiques, telles que la déglutathionylation et la glutathionylation de petits substrats, ainsi qu'une réaction de type peroxydase. De même, la plupart des PcUre2pAs étudiées possèdent en plus de l'activité de déglutathionylation, une activité résiduelle de réduction de l'insuline, réaction réalisée également par la PcUre2pB1 dans une plus grande mesure. Ces aptitudes mettent en lumière la promiscuité enzymatique présente de façon évidente au sein de la classe des Ure2p. La promiscuité signifie qu'une enzyme possède la capacité de réaliser d'autre(s) type(s) de réactions dits « secondaires » par rapport à sa fonction « principale » ou native. La fonction principale est définie par une valeur plus élevée du rapport k_{cat}/K_M des activités observées

(Babtie 2010; Khersonsky 2010). Elle est ainsi bien marquée pour la PcUre2pA6 qui présente des activités de glutathionylation, déglutathionylation et peroxydase. L'avantage pour l'organisme de posséder des enzymes multifonctionnelles et multispécifiques peut être de limiter les dépenses énergétiques pour l'expression de plusieurs enzymes dans le but réaliser différentes réactions possibles, face par exemple à un éventail de xénobiotiques issus de la dégradation du bois. Ce phénomène peut poser problème lors d'études fonctionnelles impliquant un organisme mutant dont un gène a été supprimé, puisque la fonction déficiente peut être compensée/complémentée par une fonction « secondaire » d'une telle enzyme (Yang 2004). D'un point de vue plus large la promiscuité enzymatique peut être appliquée dans toutes les voies métaboliques. Il n'est donc pas surprenant que les enzymes de détoxication possèdent généralement une grande promiscuité qui serait liée à un mécanisme de sélection conformationnelle (Redinbo 2004; Hou 2007; Honaker 2013). Il est à noter que le mécanisme catalytique peut également varier pour un même type de réaction. Ainsi, pour la déglutathionylation par les Ure2p, les résultats biochimiques et structuraux montrent qu'aucun résidu cystéinyl n'est impliqué dans la catalyse alors que cet acide aminé est habituellement essentiel pour ce genre de réaction, notamment chez les GST à cystéines (***Article 2 et 3)*** (Whitbread 2005; Meux 2011).

Ces données, comparées à celles obtenues pour les GSTFuA (Mathieu 2012), révèlent en plus des informations génomiques présentées précédemment, une convergence fonctionnelle entre les deux classes, malgré une grande différence structurale. Les profils catalytiques et ligandines des enzymes testées sont en effet assez similaires (Figure 40). Cette similarité est par exemple assez surprenante entre la PcUre2pA5 et la PcGSTFuA1. La proximité fonctionnelle observée chez ces enzymes ainsi que la multispécificité est à mettre en relation avec la régulation de ces enzymes *in vivo*. Ainsi, dans les conditions où l'une n'est pas exprimée, la cellule peut faire appel à l'autre enzyme de façon à répondre à un besoin. La convergence fonctionnelle de ces enzymes expliquerait l'effet compensatoire évoqué après observation de la distribution des GST fongiques entre ces deux classes. Elle a également été démontrée au sein d'autres familles d'enzymes telles que les cytochrome P450 monooxygénases (Hirosue 2011) mais aussi la superfamille des peptidases Zn dépendantes (Makarova 1999). La convergence fonctionnelle est une notion qui concerne les enzymes structuralement différentes et ne présentant pas spécialement d'homologies mais qui sont capables de catalyser une même réaction biochimique (Galperin 2012).

Enfin, ces observations soulignent l'importance de la caractérisation biochimique en plus des analyses génomiques pour l'assignation d'une fonction à une enzyme. Ainsi, il est

très difficile de réaliser des annotations fonctionnelles des GST sur la seule base de leur séquence, considérant la myriade de fonctions qu'elles peuvent posséder (différents types d'activités, diverses actions dans le métabolisme cellulaire, etc.).

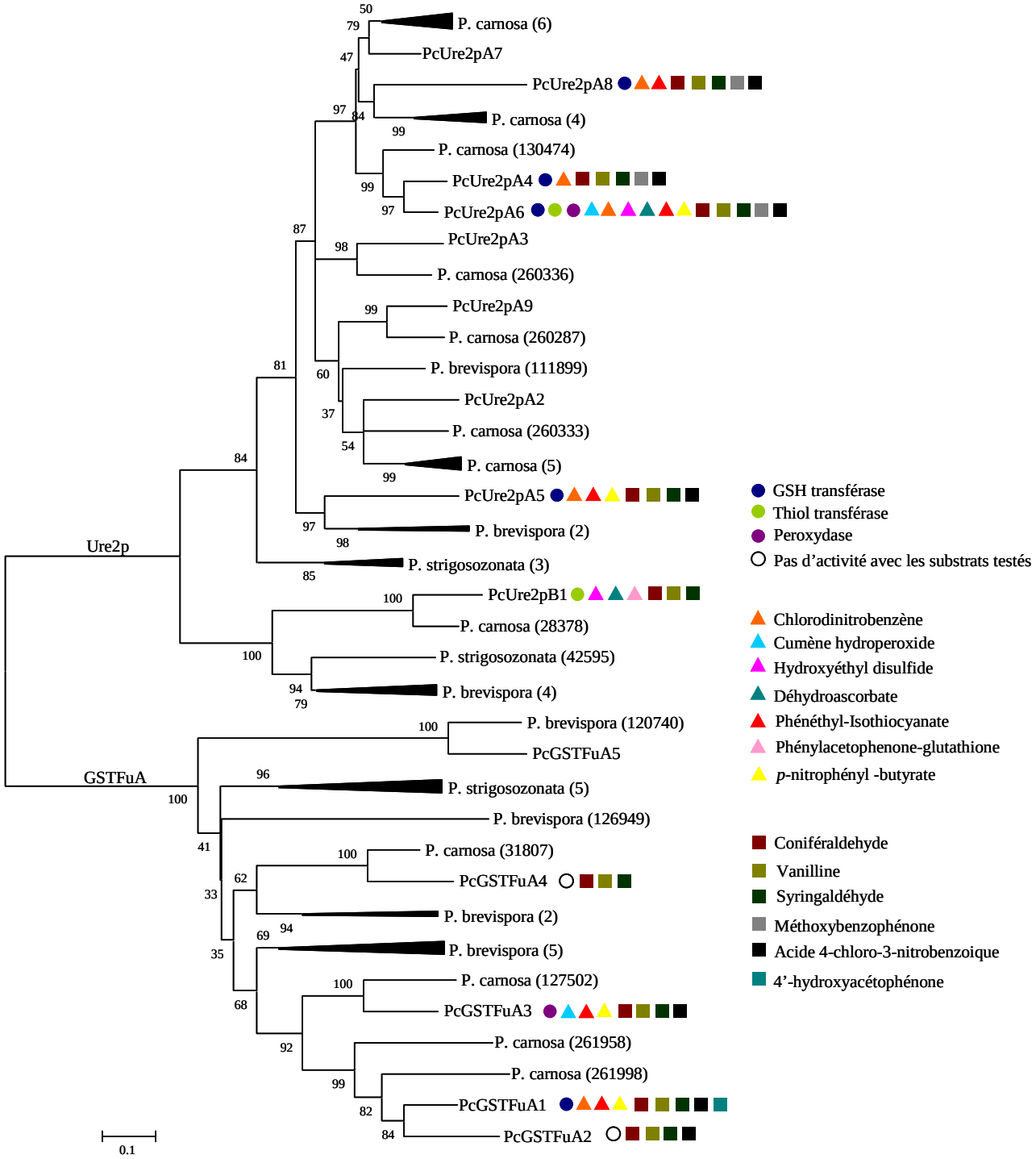


Figure 40 : Mise en évidence de la convergence fonctionnelle des PcUre2p et des GSTFuA en relation avec leurs données phylogénétiques chez quelques *Corticiaceae*. La propriété ligandine a été testée à l'aide de composés dérivés de hêtre (carrés). Leur type d'activité (rond) a été déterminé à l'aide de divers substrats (triangles). Entre parenthèses : nombre de séquences ou numéro d'identification du JGI.

C. L'extension d'une famille d'enzyme et la diversification fonctionnelle sont moteurs de l'évolution enzymatique

Cette capacité à réaliser diverses fonctions et de transformer différents substrats présente un intérêt dans l'étude de l'évolution des fonctions protéiques. Selon l'hypothèse de Jensen (Jensen 1976), un ancêtre commun partagerait un certain nombre d'activités à un niveau assez bas. Puis des évènements de duplication conduiraient à l'émergence d'enzymes qui se spécialisent dans une fonction donnée selon la pression de sélection subie, avec disparition ou apparition de nouvelles fonctions mais pouvant garder une activité ancestrale à un niveau assez bas (activité « secondaire » correspondant à la promiscuité de l'enzyme). La Figure 41 illustre ce schéma de pensée.

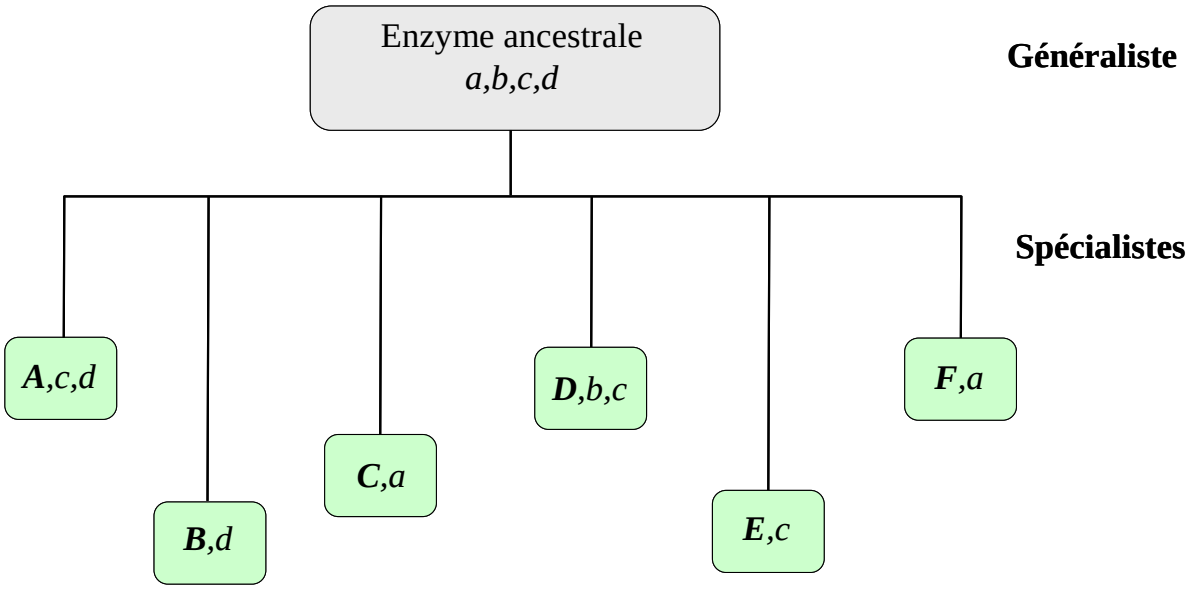


Figure 41 : Rôle de la promiscuité dans l'évolution fonctionnelle des enzymes d'une famille donnée, d'après l'hypothèse de Jensen. En minuscules : les activités « secondaires » observables ; en majuscules : les activités « principales » (adapté de Khersonsky, 2010).

Ainsi, cette promiscuité présente un avantage certain pour l'organisme puisque les activités « secondaires » peuvent être sélectionnées suite à un changement environnemental grâce à une ou quelques mutations, sans forcément supprimer la fonction principale. La duplication des gènes devient donc un facteur évolutif important puisqu'elle permet de palier à l'éventuelle perte de fonction engendrée. Ce phénomène est donc nécessaire pour permettre l'adaptation d'un organisme à un environnement donné (Wagner 1998; Kondrashov 2002; Wapinski 2007).

L'étude des PcUre2p illustre bien ces phénomènes, notamment au sein des PcUre2pA (***Article 3***). En effet, du fait de leurs séquences assez similaires (Morel 2009), elles sont très probablement issues de duplications relativement récentes et les huit gènes prédits ont été distribués de cette manière sur trois scaffolds, parfois en tandem. De plus, les isoformes étudiées partagent au moins un type d'activité commun, l'activité « glutathion transférase » (glutathionylation). Chaque copie a ensuite évolué indépendamment. Ainsi, alors que la PcUre2pA5 conserve une activité modérée, la PcUre2pA8 semble être très spécialisée dans la glutathionylation au vu de sa grande efficacité. La PcUre2pA4, quant à elle, serait en train de perdre sa fonction tandis que la PcUre2pA6, pourtant très proche du point de vue de sa structure primaire et tertiaire, présenterait des activités secondaires non négligeables (peroxydase et déglutathionylation). L'hypothèse peut également être inversée en considérant que la PcUre2pA6 est une enzyme généraliste puis que ses duplicatas se sont spécialisés (Figure 41). Selon les besoins de l'organisme, il arrive aussi que certains duplicatas soient inactivés. C'est le cas de la PcUre2pA2 qui possède deux codons stop dans sa séquence. De ce fait, considérant le cas PcUre2pA4-PcUre2pA6, il suffit effectivement de peu de mutations pour ajouter ou modifier une fonction. Un exemple montre qu'en mutant seulement la cystéine catalytique en sérine de la PcGSTO3, celle-ci acquière l'activité de glutathionylation au détriment de l'activité de déglutathionylation (Meux 2011). La même observation a été observée pour l'Ure2 de *S. cerevisiae* qui a initialement une activité peroxydase et dont des mutations ponctuelles sont capable de lui conférer une activité de glutathionylation (Zhang 2008). Un changement de spécificité d'une lyase a également été rapporté après la mutation d'une histidine en phénylalanine (Watts 2006).

Ainsi, de nombreuses études d'évolution ont ainsi été réalisées par mutation d'un ou plusieurs acides aminés afin de développer une fonction « secondaire », généralement au détriment de la fonction principale. Parmi quelques exemples significatifs, l'enzyme de lactonisation du muconate a vu son activité secondaire augmentée de 1,2 million de fois tandis que son activité principale s'est vue diminuée de 15 fois par simple mutation d'un glutamate en glycine (Schmidt 2003). De même, la mutation d'une sérine en glycine permet d'augmenter chez une β-lactamase deux types d'activité « secondaire » de 86 et 19 fois, tandis que la mutation supplémentaire glutamate en lysine multiplie ces deux activités de 806 et 284 fois avec une activité principale légèrement affectée (Wang 2002).

L'amélioration des enzymes par évolution dirigée est en effet sujette à une recherche intensive de manière à mettre au point des biocatalyseurs permettant de réaliser des réactions bien précises, notamment pour la production de produits chimiques et pharmaceutiques. En

effet, l'application dans des processus industriels nécessite une optimisation de leurs propriétés de thermostabilité, d'activité, de sélectivité et de tolérance envers les solvants et les conditions industrielles (Wang 2012). Trois étapes sont essentielles. La première consiste à choisir une protéine initiale qui possède une fonction proche de celle recherchée bien que des études récentes montrent que des fonctions complètement différentes peuvent être obtenues (Smith 2011). C'est ainsi qu'une bromoperoxydase a été convertie en lipase (Chen 2009). La deuxième étape consiste à créer une banque de mutants basée sur la protéine initiale. La troisième étape est d'identifier les clones possédant les propriétés voulues. Il est avisé de choisir des enzymes ayant des capacités évolutives importantes comme par exemple une enzyme issue d'une grande famille présentant des fonctions variées ou possédant un large éventail de substrats. L'utilisation d'enzymes « généralistes » est donc adaptée et une spécialisation d'une activité cible initialement plus faible peut donc être réalisée (Tracewell 2009). Par exemple, les cytochrome P450 monooxygénases sont des enzymes de choix pour la production de nouveaux biocatalyseurs puisqu'ils possèdent une capacité évolutive importante mais peuvent également catalyser un grand nombre de réactions avec une certaine sélectivité. Leur énantiosélectivité a même déjà été améliorée (Trefzer 2007; Tang 2011; Urlacher 2012; Wang 2012).

Les enzymes de détoxication sont capables de réaliser une grande variété de réactions sur un large panel de substrats. Appartenant à des (sous-)classes étendues, souvent résultats de duplication, elles sont un modèle de choix pour des études évolutives en réponse à l'environnement. La compréhension des mécanismes évolutifs des Ure2p en relation avec leurs propriétés biochimiques peut permettre de mieux appréhender de futures études d'évolution dirigée.

Conclusions et perspectives

Les avancées technologiques disponibles pour la biologie fondamentale prennent tout leur intérêt lorsqu'elles considèrent l'organisme dans son intégralité au sein de son écosystème. Elles permettent de mieux comprendre son fonctionnement et de mieux appréhender l'influence environnementale qu'il peut subir. Ainsi, le développement de la génomique comparative permet d'identifier les acteurs cellulaires responsables de son adaptation mais aussi de mettre en évidence une grande variabilité génétique selon le mode de vie de l'organisme, notamment au sein de certaines familles d'enzymes telles que les enzymes de détoxication. Un tel lien a en effet été mis en évidence lors de l'étude du xénome chez les basidiomycètes (***Article 5***). Cependant, la relation entre cette variabilité et les réponses physiologiques n'est pas encore bien établie. Ces travaux ont montré la nécessité des études biochimiques pour véritablement assigner une fonction à une enzyme dans la mesure où elles peuvent présenter une grande promiscuité en lien avec la variété de rôles biologiques qu'elle peut avoir.

Ainsi, l'existence de deux sous classes au sein des Ure2p (appartenant à la famille des glutathion transférases) a été mise en évidence dans le règne fongique (***Article 1***). La classe Ure2pA est généralement plus étendue et contient parfois des gènes très proches structuralement et issus de duplications récentes, moteur évolutif pour l'adaptation de l'organisme à son milieu. La classe Ure2pB, moins étendue mais dont la structure est plus conservée est également présente chez d'autres organismes, ce qui lui suggère un rôle important dans le métabolisme.

Du fait de sa grande conservation au sein des autres organismes, il serait intéressant d'étudier les orthologues Ure2pB dans des organismes proches comme *Phanerochaete carnosa* (qui ne possède également qu'une Ure2pB) et dans des organismes ayant d'autres modes de vie de façon à mieux comprendre l'influence de l'environnement sur cette protéine. La caractérisation structurale et biochimique de l'Ure2pB de *P. chrysosporium* a permis de révéler une protéine possédant un mécanisme catalytique particulier n'impliquant pas de cystéine et qui a l'originalité d'intéragir avec des protéines (***Article 2***). La recherche de cibles naturelles telles que des composés protéiques déglutathionylés par la PcUre2pB1 a été débutée grâce à un outil fluorescent qui se fixe sur les thiols libres. L'identification des substrats marqués permettrait à terme de replacer cette enzyme au sein d'une voie métabolique donnée. Une étude plus physiologique est également envisagée. Ainsi, des premiers tests de transformation de *P. chrysosporium* et de *S. cerevisiae* ont été amorcés de manière à localiser cette protéine *in vivo* par fusion GFP. De plus, la création de mutants

déficients ou surexprimant cette protéine est également envisagée afin d'identifier son rôle biologique dans des conditions données.

Une diversité fonctionnelle a également été mise en évidence au sein des Ure2pA de *P. chrysosporium* malgré une structure similaire, mettant en lumière la forte capacité évolutive de ces enzymes par modification minimale de la séquence protéique (***Article 3***). De plus, les gènes codant ces enzymes peuvent être exprimés dans des conditions spécifiques (comme la présence de polluants tels que les HAP) selon les besoins du champignon à transformer un substrat (***Article 1***). Il serait intéressant de caractériser les autres isoformes de *P. chrysosporium*, voire d'autres organismes et d'identifier leurs rôles physiologiques par le même type d'études mentionnées ci-dessus. La production d'enzymes recombinantes mutées permettrait d'identifier les acides aminés clés, responsables des variations catalytiques observées. Cela apporterait une meilleure connaissance des mécanismes évolutifs subis par ces enzymes.

Enfin, une approche plus globale a été initiée par l'étude de la réponse de *P. chrysosporium* à des extraits de hêtre. Celle-ci a montré des variations d'expression des enzymes impliquées dans la réponse aux stress, en particulier la PcGTT2.1 qui se trouve être une peroxydase (***Article 4***). La présence de cette GST serait le résultat d'une adaptation à des conditions environnementales particulières du fait de son maintien dans quelques espèces seulement de champignons de pourriture blanche et probablement en lien avec la nature de leur habitat naturel. L'étude de la variabilité du xénome au sein d'une même espèce de champignon isolée à partir de différents substrats naturels pourrait de ce fait révéler des informations quant à l'évolution des enzymes sous contrainte environnementale.

A terme et de façon plus appliquée, ces travaux pourraient permettre de mieux appréhender les difficultés liées à la toxicité des processus industriels lors par exemple du traitement de la biomasse lignocellulosique ou bien des eaux usées et sols contaminés. De même, la compréhension des mécanismes évolutifs est nécessaire pour développer de nouvelles stratégies d'ingénierie protéique, notamment grâce à des travaux d'évolution dirigée. Enfin, d'un point de vue plus global, ces études permettraient une meilleure connaissance des processus biogéochimiques au sein de l'écosystème forestier.

Références

Adamis, P. D., D. S. Gomes, M. L. C. Pinto, A. D. Panek and E. C. Eleutherio (2004). "The role of glutathione transferases in cadmium stress." Toxicology letters **154**(1): 81-88.

Adav, S. S., A. Ravindran and S. K. Sze (2012). "Quantitative proteomic analysis of lignocellulolytic enzymes by Phanerochaete chrysosporium on different lignocellulosic biomass." Journal of Proteomics **75**(5): 1493-1504.

Adler, V., Z. Yin, S. Y. Fuchs, M. Benezra, L. Rosario, K. D. Tew, M. R. Pincus, M. Sardana, C. J. Henderson, C. R. Wolf, R. J. Dacis, Z. Ronai (1999). "Regulation of JNK signaling by GSTp." The EMBO Journal **18**: 1321-1334.

Agematu, H., N. Shibamoto, H. Nishida, R. Okamoto, T. Shin and S. Murao (1993). "Oxidative decarboxylations of 4-hydroxymandelic acid and 2-(4-hydroxyphenyl) glycine by laccase from Coriolus versicolor and bilirubin oxidases from Trachyderma tsunodae and Myrothecium verrucaria." Biosci. Biotech. Biochem **57**(11): 1877-1881.

Ahmadjian, V. (1993). The lichen symbiosis, Wiley.

Alfenito, M. R., E. Souer, C. D. Goodman, R. Buell, J. Mol, R. Koes and V. Walbot (1998). "Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases." Plant Cell **10**(7): 1135-1149.

Alic, M., L. Akileswaran and M. H. Gold (1997). "Characterization of the gene encoding manganese peroxidase isozyme 3 from Phanerochaete chrysosporium." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology **1338**(1): 1-7.

Allocati, N., L. Federici, M. Masulli and C. Di Ilio (2009). "Glutathione transferases in bacteria." FEBS J **276**(1): 58-75.

Anandarajah, K., P. M. Kiefer, Jr., B. S. Donohoe and S. D. Copley (2000). "Recruitment of a double bond isomerase to serve as a reductive dehalogenase during biodegradation of pentachlorophenol." Biochemistry **39**(18): 5303-5311.

Andersson, C., E. Mosialou, R. Weinander, R. Morgenstern, M. W. Anders and D. Wolfgang (1994). Enzymology of Microsomal Glutathione S-Transferase. Advances in Pharmacology, Academic Press. **Volume 27:** 19-35.

Armstrong, R. N. (1997). "Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases." Chemical Research in Toxicology **10**(1): 2-18.

Asgher, M., H. N. Bhatti, M. Ashraf and R. L. Legge (2008). "Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system." Biodegradation **19**(6): 771-783.

Atkinson, H. J. and P. C. Babbitt (2009). "Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold." Biochemistry **48**(46): 11108-11116.

Awasthi, Y. C., Y. Yang, N. K. Tiwari, B. Patrick, A. Sharma, J. Li and S. Awasthi (2004). "Regulation of 4-hydroxynonenal-mediated signaling by glutathione S-transferases." Free Radic Biol Med **37**(5): 607-619.

Azcon-Aguilar, C. and J. Barea (1997). "Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens - an overview of the mechanisms involved." Mycorrhiza **6**(6): 457-464.

Babtie, A., N. Tokuriki and F. Hollfelder (2010). "What makes an enzyme promiscuous?" Current Opinion in Chemical Biology **14**(2): 200-207.

Bai, M., J.-M. Zhou and S. Perrett (2004). "The yeast prion protein Ure2 shows glutathione peroxidase activity in both native and fibrillar forms." Journal of Biological Chemistry **279**(48): 50025-50030.

Baldrian, P. (2006). "Fungal laccases - occurrence and properties." FEMS microbiology reviews **30**(2): 215-242.

Bao, W., D. M. O'Malley, R. Whetten and R. R. Sederoff (1993). "A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem." Science **260**(5108): 672-674.

Belinky, P. A., N. Flikshtein and C. G. Dosoretz (2006). "Induction of lignin peroxidase via reactive oxygen species in manganese-deficient cultures of Phanerochaete chrysosporium." Enzyme and Microbial Technology **39**(2): 222-228.

Belinky, P. A., N. Flikshtein, S. Lechenko, S. Gepstein and C. G. Dosoretz (2003). "Reactive Oxygen Species and Induction of Lignin Peroxidase in Phanerochaete chrysosporium." Applied and environmental microbiology **69**(11): 6500-6506.

Berbee, M. L. and J. W. Taylor (1993). "Dating the evolutionary radiations of the true fungi." Canadian Journal of Botany **71**(8): 1114-1127.

Berbee, M. L. and J. W. Taylor (2010). "Dating the molecular clock in fungi - how close are we?" Fungal Biology Reviews **24**(1-2): 1-16.

Berger, L., R. Speare, P. Daszak, D. E. Green, A. A. Cunningham, C. L. Goggin, R. Slocombe, M. A. Ragan, A. D. Hyatt, K. R. McDonald, H. B. Hines, K. R. Lips, G. Marantelli and H. Parkes (1998). "Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America." Proceedings of the National Academy of Sciences **95**(15): 9031-9036.

Bernhardt, R. (2006). "Cytochromes P450 as versatile biocatalysts." Journal of biotechnology **124**(1): 128-145.

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

Biely, P., J. Puls and H. Schneider (1985). "Acetyl xylan esterases in fungal cellulolytic systems." FEBS Letters **186**(1): 80-84.

Biely, P. and M. Tenkanen (1998). "Enzymology of hemicellulose degradation." Trichoderma and Gliocladium **2**: 25-47.

Biely, P., M. Vrsanska, M. Tenkanen and D. Kluepfel (1997). "Endo-beta-1, 4-xylanase families: differences in catalytic properties." Journal of Biotechnology **57**(1): 151-166.

Blackwell, M. (2011). "The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species?" American Journal of Botany **98**(3): 426-438.

Blackwell, M., R. Vilgalys, T. James and J. Taylor (2012). "Fungi. Eumycota: mushrooms, sac fungi, yeast, molds, rusts, smuts, etc." Tree of Life Web Project: 04-25.

Blanchette, R. A. (1995). "Degradation of the lignocellulose complex in wood." Canadian Journal of Botany **73**(S1): 999-1010.

Blanchette, R. A. (2000). "A review of microbial deterioration found in archaeological wood from different environments." International Biodeterioration & Biodegradation **46**(3): 189-204.

Blanchette, R. A., T. A. Burnes, G. F. Leatham and M. J. Effland (1988). "Selection of white-rot fungi for biopulping." Biomass **15**(2): 93-101.

Blinder, D., P. W. Coschigano and B. Magasanik (1996). "Interaction of the GATA factor Gln3p with the nitrogen regulator Ure2p in Saccharomyces cerevisiae." J Bacteriol **178**(15): 4734-4736.

Board, P. G., M. Coggan, G. Chelvanayagam, S. Easteal, L. S. Jermiin, G. K. Schulte, D. E. Danley, L. R. Hoth, M. C. Griffor, A. V. Kamath, M. H. Rosner, B. A. Chrunyk, D. E. Perregaux, C. A. Gabel, K. F. Geoghegan and J. Pandit (2000). "Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases." J Biol Chem **275**(32): 24798-24806.

Bock, K. W., D. Josting, W. Lilienblum and H. Pfeil (1979). "Purification of Rat-Liver Microsomal UDP-glucuronyltransferase." European Journal of Biochemistry **98**(1): 19-26.

Boerjan, W., J. Ralph and M. Baucher (2003). "Lignin biosynthesis." Annual review of plant biology **54**(1): 519-546.

Boominathan, K. and C. A. Reddy (1992). "cAMP-mediated differential regulation of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase production in the white-rot basidiomycete Phanerochaete chrysosporium." Proceedings of the National Academy of Sciences **89**(12): 5586-5590.

Booth, J., E. Boyland and P. Sims (1961). "An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione." Biochem J **79**(3): 516-524.

Boraston, A. B., D. N. Bolam, H. J. Gilbert and G. J. Davies (2004). "Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition." Biochemical Journal **382**(Pt 3): 769.

Borchardt, R. T. (1980). "N-and O-methylation." Enzymatic Basis of Detoxification **2**: 43-62.

Bouws, H., A. Wattenberg and H. Zorn (2008). "Fungal secretomes-nature's toolbox for white biotechnology." Applied Microbiology and Biotechnology **80**(3): 381-388.

Bresell, A., R. Weinander, G. Lundqvist, H. Raza, M. Shimoji, T. H. Sun, L. Balk, R. Wiklund, J. Eriksson, C. Jansson, B. Persson, P. J. Jakobsson and R. Morgenstern (2005). "Bioinformatic and enzymatic characterization of the MAPEG superfamily." FEBS J **272**(7): 1688-1703.

Brock, J., P. G. Board and A. J. Oakley (2013). "Structural Insights into Omega-Class Glutathione Transferases: A Snapshot of Enzyme Reduction and Identification of a Non-Catalytic Ligandin Site." PloS one **8**(4): e60324.

Brown, J., J. Glenn and M. Gold (1990). "Manganese regulates expression of manganese peroxidase by Phanerochaete chrysosporium." Journal of bacteriology **172**(6): 3125-3130.

Brown, J. A., M. Alic and M. H. Gold (1991). "Manganese peroxidase gene transcription in Phanerochaete chrysosporium: activation by manganese." Journal of bacteriology **173**(13): 4101-4106.

Brundrett, M. C. (2009). "Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis." Plant and Soil **320**(1-2): 37-77.

Bumpus, J. A. and M. Tatarko (1994). "Biodegradation of 2, 4, 6-trinitrotoluene byPhanerochaete chrysosporium: Identification of initial degradation products and the discovery of a TNT metabolite that inhibits lignin peroxidases." Current microbiology **28**(3): 185-190.

Burdsall, H. and W. Eslyn (1974). "A new Phanerochaete with a chrysosporium imperfect state." Mycotaxon l: l23-l33.

Burns, C., R. Geraghty, C. Neville, A. Murphy, K. Kavanagh and S. Doyle (2005). "Identification, cloning, and functional expression of three glutathione transferase genes from Aspergillus fumigatus." Fungal Genetics and Biology **42**(4): 319-327.

Busenlehner, L. S., S. G. Codreanu, P. J. Holm, P. Bhakat, H. Hebert, R. Morgenstern and R. N. Armstrong (2004). "Stress sensor triggers conformational response of the integral

membrane protein microsomal glutathione transferase 1." Biochemistry **43**(35): 11145-11152.

Buswell, J. A. and K.-E. Eriksson (1994). "Effect of lignin-related phenols and their methylated derivatives on the growth of eight white-rot fungi." World Journal of Microbiology and Biotechnology **10**(2): 169-174.

Butcher, N., S. Boukouvala, E. Sim and R. Minchin (2002). "Pharmacogenetics of the arylamine N-acetyltransferases." The pharmacogenomics journal **2**(1): 30-42.

Caccuri, A. M., G. Antonini, P. Ascenzi, M. Nicotra, M. Nuccetelli, A. P. Mazzetti, G. Federici, M. Lo Bello and G. Ricci (1999). "Temperature adaptation of glutathione S-transferase P1-1. A case for homotropic regulation of substrate binding." Journal of Biological Chemistry **274**(27): 19276-19280.

Caccuri, A. M., G. Antonini, M. Nicotra, A. Battistoni, M. Lo Bello, P. G. Board, M. W. Parker and G. Ricci (1997). "Catalytic mechanism and role of hydroxyl residues in the active site of theta class glutathione S-transferases. Investigation of Ser-9 and Tyr-113 in a glutathione S-transferase from the Australian sheep blowfly, Lucilia cuprina." J Biol Chem **272**(47): 29681-29686.

Cameron, M., S. Timofeevski and S. Aust (2000). "Enzymology of Phanerochaete chrysosporium with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics." Applied microbiology and biotechnology **54**(6): 751-758.

Cameron, M. D. and S. D. Aust (1999). "Degradation of Chemicals by Reactive Radicals Produced by Cellobiose Dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium*." Archives of biochemistry and biophysics **367**(1): 115-121.

Cantarel, B. L., P. M. Coutinho, C. Rancurel, T. Bernard, V. Lombard and B. Henrissat (2009). "The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics." Nucleic acids research **37**(suppl 1): D233-D238.

Carlile, M. J., S. C. Watkinson and G. Gooday (1994). The fungi, Springer.

Chen, B., Z. Cai, W. Wu, Y. Huang, J. Pleiss and Z. Lin (2009). "Morphing activity between structurally similar enzymes: from heme-free bromoperoxidase to lipase." Biochemistry **48**(48): 11496-11504.

Cho, Y.-W., E.-H. Park, J. A. Fuchs and C.-J. Lim (2002). "A second stress-inducible glutathione S-transferase gene from Schizosaccharomyces pombe." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression **1574**(3): 399-402.

Choi, J. H., W. Lou and A. Vancura (1998). "A novel membrane-bound glutathione S-transferase functions in the stationary phase of the yeast Saccharomyces cerevisiae." Journal of Biological Chemistry **273**(45): 29915-29922.

Coleman, J., M. Blake-Kalff and E. Davies (1997). "Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation." Trends in Plant Science **2**(4): 144-151.

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 microbiology reviews **26**(3): 223-238.

Copley, S. D., W. R. Novak and P. C. Babbitt (2004). "Divergence of function in the thioredoxin fold suprafamily: evidence for evolution of peroxiredoxins from a thioredoxin-like ancestor." Biochemistry **43**(44): 13981-13995.

Coschigano, P. W. and B. Magasanik (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." Molecular and Cellular Biology **11**(2): 822-832.

Couturier, J., C. S. Koh, M. Zaffagnini, A. M. Winger, J. M. Gualberto, C. Corbier, P. Decottignies, J. P. Jacquot, S. D. Lemaire, C. Didierjean and N. Rouhier (2009). "Structure-function relationship of the chloroplastic glutaredoxin S12 with an atypical WCSYS active site." J Biol Chem **284**(14): 9299-9310.

Črešnar, B. and Š. Petrič (2011). "Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics **1814**(1): 29-35.

Cromer, B. A., C. J. Morton, P. G. Board and M. W. Parker (2002). "From glutathione transferase to pore in a CLIC." Eur Biophys J **31**(5): 356-364.

Da Silva Ferreira, M., I. Malavazi, M. Savoldi, A. Brakhage, M. Goldman, H. Kim, W. Nierman and G. Goldman (2006). "Transcriptome analysis of Aspergillus fumigatus exposed to voriconazole." Current Genetics **50**(1): 32-44.

Daniel, G. and T. Nilsson (1998). "Developments in the study of soft rot and bacterial decay." Forest products biotechnology: 37-62.

Danielsson, M., K. Lundén, M. Elfstrand, J. Hu, T. Zhao, J. Arnerup, K. Ihrmark, G. Swedjemark, A.-K. Borg-Karlson and J. Stenlid (2011). "Chemical and transcriptional responses of Norway spruce genotypes with different susceptibility to Heterobasidion spp. infection." BMC plant biology **11**(1): 154.

Dashtban, M., H. Schraft and W. Qin (2009). "Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives." International Journal of Biological Sciences **5**(6): 578.

Dirr, H., P. Reinemer and R. Huber (1994). "X-ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferases. Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function." Eur J Biochem **220**(3): 645-661.

Dixon, D. P., B. G. Davis and R. Edwards (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**(34): 30859-30869.

Dixon, D. P. and R. Edwards (2010). "Roles for stress-inducible lambda glutathione transferases in flavonoid metabolism in plants as identified by ligand fishing." J Biol Chem **285**(47): 36322-36329.

Doddapaneni, H., R. Chakraborty and J. Yadav (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**(1): 92.

Doddapaneni, H., V. Subramanian and J. S. Yadav (2005). "Physiological Regulation, Xenobiotic Induction, and Heterologous Expression of P450 Monooxygenase Gene pc-3 (CYP63A3), a New Member of the CYP63 Gene Cluster in the White-rot FungusPhanerochaete chrysosporium." Current microbiology **50**(6): 292-298.

Doddapaneni, H. and J. Yadav (2005). "Microarray-based global differential expression profiling of P450 monooxygenases and regulatory proteins for signal transduction pathways in the white rot fungus Phanerochaete chrysosporium." Molecular Genetics and Genomics **274**(5): 454-466.

Doddapaneni, H. and J. S. Yadav (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." Applied microbiology and biotechnology **65**(5): 559-565.

Dodds, P. N. and J. P. Rathjen (2010). "Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions." Nature Reviews Genetics **11**(8): 539-548.

Drillien, R. and F. o. Lacroute (1972). "Ureidosuccinic acid uptake in yeast and some aspects of its regulation." Journal of bacteriology **109**(1): 203-208.

Duranova, M., S. Spanikova, H. A. Wösten, P. Biely and R. P. De Vries (2009). "Two glucuronoyl esterases of Phanerochaete chrysosporium." Archives of microbiology **191**(2): 133-140.

Eastwood, D. C., D. Floudas, M. Binder, A. Majcherczyk, P. Schneider, A. Aerts, F. O. Asiegbu, S. E. Baker, K. Barry and M. Bendiksby (2011). "The plant cell wall-decomposing machinery underlies the functional diversity of forest fungi." Science **333**(6043): 762-765.

Edskes, H. K., A. Engel, L. M. McCann, A. Brachmann, H.-F. Tsai and R. B. Wickner (2011). "Prion-forming ability of Ure2 of yeasts is not evolutionarily conserved." Genetics **188**(1): 81-90.

Edwards, R., D. Del Buono, M. Fordham, M. Skipsey, M. Brazier, D. P. Dixon and I. Cummins (2005). "Differential induction of glutathione transferases and glucosyltransferases in wheat, maize and Arabidopsis thaliana by herbicide safeners." Z Naturforsch C **60**(3-4): 307-316.

Edwards, R. and D. P. Dixon (2005). "Plant glutathione transferases." Methods Enzymol **401**: 169-186.

Edwards, S. L., R. Raag, H. Wariishi, M. H. Gold and T. L. Poulos (1993). "Crystal structure of lignin peroxidase." Proceedings of the National Academy of Sciences **90**(2): 750-754.

Erhardt, J. and H. Dirr (1995). "Native dimer stabilizes the subunit tertiary structure of porcine class pi glutathione S-transferase." Eur J Biochem **230**(2): 614-620.

Eriksson, K.-E. L., R. A. Blanchette and P. Ander (1990). Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components, Springer-Verlag.

Ferguson, B., T. Dreisbach, C. Parks, G. Filip and C. Schmitt (2003). "Coarse-scale population structure of pathogenic Armillaria species in a mixed-conifer forest in the Blue Mountains of northeast Oregon." Canadian Journal of Forest Research **33**(4): 612-623.

Fernandez-Canon, J. M. and M. A. Penalva (1998). "Characterization of a fungal maleylacetoacetate isomerase gene and identification of its human homologue." J Biol Chem **273**(1): 329-337.

Floudas, D., M. Binder, R. Riley, K. Barry, R. A. Blanchette, B. Henrissat, A. T. Martinez, R. Otillar, J. W. Spatafora and J. S. Yadav (2012). "The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes." Science **336**(6089): 1715-1719.

Forney, L. J., C. A. Reddy, M. Tien and S. D. Aust (1982). "The involvement of hydroxyl radical derived from hydrogen peroxide in lignin degradation by the white rot fungus Phanerochaete chrysosporium." Journal of Biological Chemistry **257**(19): 11455-11462.

Fraser, J. A., M. A. Davis and M. J. Hynes (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." Applied and Environmental Microbiology **68**(6): 2802-2808.

Frear, D. and H. Swanson (1973). "Metabolism of substituted diphenylether herbicides in plants. I. Enzymatic cleavage of fluorodifen in peas (*Pisum sativum* L.)." Pesticide Biochemistry and Physiology **3**(4): 473-482.

Frear, D. S. and H. R. Swanson (1970). "Biosynthesis of S-(4-ethylamino-6-isopropylamino-2-s-triazino) glutathione: Partial purification and properties of a glutathione S-transferase from corn." Phytochemistry **9**(10): 2123-2132.

Frova, C. (2006). "Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives." Biomolecular Engineering **23**(4): 149-169.

Fuerst, E. P. and J. W. Gronwald (1986). "Induction of rapid metabolism of metolachlor in sorghum (Sorghum bicolor) shoots by CGA-92194 and other antidotes." Weed Science: 354-361.

Fukuda, T., H. Uchida, Y. Takashima, T. Uwajima, T. Kawabata and M. Suzuki (2001). "Degradation of Bisphenol A by Purified Laccase from Trametes villosa." Biochemical and biophysical research communications **284**(3): 704-706.

Fyfe, P. K., G. D. Westrop, A. M. Silva, G. H. Coombs and W. N. Hunter (2012). "Leishmania TDR1 structure, a unique trimeric glutathione transferase capable of deglutathionylation and antimonial prodrug activation." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(29): 11693-11698.

Galperin, M. Y. and E. V. Koonin (2012). "Divergence and convergence in enzyme evolution." Journal of Biological Chemistry **287**(1): 21-28.

Gao, F., Q. Fang, R. Zhang, J. Lu, H. Lu, C. Wang, X. Ma, J. Xu, W. Jia and K. Xiang (2009). "Polymorphism of DsbA-L Gene Associates with Insulin Secretion and Body Fat Distribution in Chinese Population." Endocrine Journal **56**(3): 487-494.

Garcera, A., L. Barreto, L. Piedrafita, J. Tamarit and E. Herrero (2006). "Saccharomyces cerevisiae cells have three Omega class glutathione S-transferases acting as 1-Cys thiol transferases." Biochemical Journal **398**(2): 187-196.

Glass, N. L., C. Rasmussen, M. G. Roca and N. D. Read (2004). "Hyphal homing, fusion and mycelial interconnectedness." Trends Microbiol **12**(3): 135-141.

Gold, M. H. and M. Alic (1993). "Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete Phanerochaete chrysosporium." Microbiological Reviews **57**(3): 605-622.

Gomez-Toribio, V., A. B. Garcia-Martin, M. J. Martinez, Ã. n. T. Martinez and F. Guillén (2009). "Induction of extracellular hydroxyl radical production by white-rot fungi through quinone redox cycling." Applied and Environmental Microbiology **75**(12): 3944-3953.

Gowland, B. T., A. D. McIntosh, I. M. Davies and C. F. Moffat (2002). "Glutathione S-transferase activity in mussels, Mytilus edulis, exposed to discharges from an aluminum smelter." Bull Environ Contam Toxicol **69**(1): 147-154.

Green, A. R., R. P. Hayes, L. Xun and C. Kang (2012). "Structural understanding of the glutathione-dependent reduction mechanism of glutathionyl-hydroquinone reductases." J Biol Chem **287**(43): 35838-35848.

Grigoriev, I. V., D. Cullen, S. B. Goodwin, D. Hibbett, T. W. Jeffries, C. P. Kubicek, C. Kuske, J. K. Magnuson, F. Martin and J. W. Spatafora (2011). "Fueling the future with fungal genomics." Mycology **2**(3): 192-209.

Guillén, D., S. Sanchez and R. Rodriguez-Sanoja (2010). "Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles." Applied Microbiology and Biotechnology **85**(5): 1241-1249.

Habig, W. H., M. J. Pabst, G. Fleischner, Z. Gatmaitan, I. M. Arias and W. B. Jakoby (1974). "The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver." Proc Natl Acad Sci U S A **71**(10): 3879-3882.

Hallac, B. B. and A. J. Ragauskas (2011). "Analyzing cellulose degree of polymerization and its relevancy to cellulosic ethanol." Biofuels, Bioproducts and Biorefining **5**(2): 215-225.

Halliwell, G. (1965). "Catalytic decomposition of cellulose under biological conditions." Biochemical Journal **95**(1): 35.

Hammel, K. E., K. A. Jensen, Jr., M. D. Mozuch, L. L. Landucci, M. Tien and E. A. Pease (1993). "Ligninolysis by a purified lignin peroxidase." J Biol Chem **268**(17): 12274-12281.

Hammel, K. E., A. N. Kapich, K. A. Jensen and Z. C. Ryan (2002). "Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi." Enzyme and Microbial Technology **30**(4): 445-453.

Hammel, K. E. and M. A. Moen (1991). "Depolymerization of a synthetic lignin *in vitro* by lignin peroxidase." Enzyme and Microbial Technology **13**(1): 15-18.

Hammel, K. E., M. D. Mozuch, K. A. Jensen and P. J. Kersten (1994). "H2O2 Recycling during Oxidation of the Arylglycerol .beta.-Aryl Ether Lignin Structure by Lignin Peroxidase and Glyoxal Oxidase." Biochemistry **33**(45): 13349-13354.

Hannemann, F., A. Bichet, K. M. Ewen and R. Bernhardt (2007). "Cytochrome P450 systems - biological variations of electron transport chains." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects **1770**(3): 330-344.

Hansen, A. M., Y. Gu, M. Li, M. Andrykovitch, D. S. Waugh, D. J. Jin and X. Ji (2005). "Structural basis for the function of stringent starvation protein a as a transcription factor." J Biol Chem **280**(17): 17380-17391.

Harms, H., D. Schlosser and L. Y. Wick (2011). "Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals." Nature Reviews Microbiology **9**(3): 177-192.

Harris, J. M., D. J. Meyer, B. Coles and B. Ketterer (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., D. Welner, K. McFarland, E. Re, J.-C. Navarro Poulsen, K. Brown, R. Salbo, H. Ding, E. Vlasenko and S. Merino (2010). "Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family." Biochemistry **49**(15): 3305-3316.

Harrop, S. J., M. Z. DeMaere, W. D. Fairlie, T. Reztsova, S. M. Valenzuela, M. Mazzanti, R. Tonini, M. R. Qiu, L. Jankova, K. Warton, A. R. Bauskin, W. M. Wu, S. Pankhurst, T. J. Campbell, S. N. Breit and P. M. Curmi (2001). "Crystal structure of a soluble form of the intracellular chloride ion channel CLIC1 (NCC27) at 1.4-A resolution." J Biol Chem **276**(48): 44993-45000.

Harvey, P. J. and J. M. Palmer (1990). "Oxidation of phenolic compounds by ligninase." Journal of Biotechnology **13**(2-3): 169-179.

Hatakka, A. and K. E. Hammel (2010). Fungal biodegradation of lignocelluloses. Industrial Applications, Springer**:** 319-340.

Hayes, J. D., J. U. Flanagan and I. R. Jowsey (2005). Glutathione transferases. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. **45:** 51-88.

Hayes, J. D. and D. J. Pulford (1995). "The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance." Crit Rev Biochem Mol Biol **30**(6): 445-600.

Hegazy, U. M., B. Mannervik and G. Stenberg (2004). "Functional role of the lock and key motif at the subunit interface of glutathione transferase p1-1." J Biol Chem **279**(10): 9586-9596.

Henriksson, G., G. Johansson and G. r. Pettersson (2000). "A critical review of cellobiose dehydrogenases." Journal of Biotechnology **78**(2): 93-113.

Herrero, E., J. Ros, J. Tamarit and G. BellÃ- (2006). "Glutaredoxins in fungi." Photosynthesis research **89**(2-3): 127-140.

Hervé, C., A. Rogowski, A. W. Blake, S. E. Marcus, H. J. Gilbert and J. P. Knox (2010). "Carbohydrate-binding modules promote the enzymatic deconstruction of intact plant cell walls by targeting and proximity effects." Proceedings of the National Academy of Sciences **107**(34): 15293-15298.

Hiratsuka, A., K. Hirose, H. Saito and T. Watabe (2000). "4-Hydroxy-2(E)-nonenal enantiomers: (S)-selective inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and detoxification by rat glutathione S-transferase A4-4." Biochem J **349 Pt 3**: 729-735.

Hirosue, S., M. Tazaki, N. Hiratsuka, S. Yanai, H. Kabumoto, R. Shinkyo, A. Arisawa, T. Sakaki, H. Tsunekawa and O. Johdo (2011). "Insight into functional diversity of cytochrome P450 in the white-rot basidiomycete Phanerochaete chrysosporium Involvement of versatile monooxygenase." Biochemical and biophysical research communications **407**(1): 118-123.

Hofrichter, M. (2002). "Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP)." Enzyme and Microbial Technology **30**(4): 454-466.

Hofrichter, M., R. Ullrich, M. J. Pecyna, C. Liers and T. Lundell (2010). "New and classic families of secreted fungal heme peroxidases." Applied microbiology and biotechnology **87**(3): 871-897.

Holzbaur, E. L. and M. Tien (1988). "Structure and regulation of a lignin peroxidase gene from *Phanerochaete chrysosporium*." Biochemical and biophysical research communications **155**(2): 626-633.

Honaker, M. T. (2013). Conformational Heterogeneity and Catalytic Promiscuity in Glutathione Transferases.

Hori, C., K. Igarashi, A. Katayama and M. Samejima (2011). "Effects of xylan and starch on secretome of the basidiomycete Phanerochaete chrysosporium grown on cellulose." FEMS Microbiology Letters **321**(1): 14-23.

Hori, C., H. Suzuki, K. Igarashi and M. Samejima (2012). "Transcriptional Response of the Cellobiose Dehydrogenase Gene to Cello- and Xylooligosaccharides in the Basidiomycete Phanerochaete chrysosporium." Applied and environmental microbiology **78**(10): 3770-3773.

Hou, L., M. T. Honaker, L. M. Shireman, L. M. Balogh, A. G. Roberts, K.-c. Ng, A. Nath and W. M. Atkins (2007). "Functional promiscuity correlates with conformational heterogeneity in A-class glutathione S-transferases." Journal of Biological Chemistry **282**(32): 23264-23274.

Hullo, M.-F. o., I. Moszer, A. Danchin and I. Martin-Verstraete (2001). "CotA of Bacillus subtilis is a copper-dependent laccase." Journal of bacteriology **183**(18): 5426-5430.

Hurst, R., Y. Bao, P. Jemth, B. Mannervik and G. Williamson (1998). "Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of human glutathione transferases." Biochem J **332 (Pt 1)**: 97-100.

Huy, N. D., P. Thayumanavan, T.-H. Kwon and S.-M. Park (2013). "Characterization of a recombinant bifunctional xylosidase/arabinofuranosidase from Phanerochaete chrysosporium." Journal of Bioscience and Bioengineering(0).

Ichinose, H. (2012). "Molecular and functional diversity of fungal cytochrome P450s." Biological and Pharmaceutical Bulletin **35**(6): 833-837.

Ichinose, H. (2013). "Cytochrome P450 of wood-rotting basidiomycetes and biotechnological applications." Biotechnology and Applied Biochemistry.

Ichinose, H. and H. Wariishi (2012). "Heterologous expression and mechanistic investigation of a fungal cytochrome P450 (CYP5150A2): Involvement of alternative redox partners." Archives of Biochemistry and Biophysics **518**(1): 8-15.

Isin, E. M. and F. P. Guengerich (2007). "Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects **1770**(3): 314-329.

Jakobsson, P. J., R. Morgenstern, J. Mancini, A. Ford-Hutchinson and B. Persson (1999). "Common structural features of MAPEG -- a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism." Protein Sci **8**(3): 689-692.

Jakobsson, P. J., R. Morgenstern, J. Mancini, A. Ford-Hutchinson and B. Persson (2000). "Membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism (MAPEG). A widespread protein superfamily." Am J Respir Crit Care Med **161**(2 Pt 2): S20-24.

Jedlitschky, G., I. Leier, U. Buchholz, K. Barnouin, G. Kurz and D. Keppler (1996). "Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump." Cancer Research **56**(5): 988-994.

Jeffers, M. R., W. C. McRoberts and D. B. Harper (1997). "Identification of a phenolic 3-O-methyltransferase in the lignin-degrading fungus Phanerochaete chrysosporium." Microbiology **143**(6): 1975-1981.

Jeffries, T. W. (1994). Biodegradation of lignin and hemicelluloses. Biochemistry of microbial degradation, Springer**:** 233-277.

Jennings, D. H. and G. Lysek (1996). Fungal biology: understanding the fungal lifestyle, Bios Scientific Publishers Ltd.

Jensen, R. A. (1976). "Enzyme recruitment in evolution of new function." Annual Reviews in Microbiology **30**(1): 409-425.

Jeppesen, M. G., P. Ortiz, W. Shepard, T. G. Kinzy, J. Nyborg and G. R. Andersen (2003). "The Crystal Structure of the Glutathione S-Transferase-like Domain of Elongation Factor 1BÎ³ from Saccharomyces cerevisiae." Journal of Biological Chemistry **278**(47): 47190-47198.

Johansson, A.-S. and B. Mannervik (2001). "Human Glutathione Transferase A3-3, a Highly Efficient Catalyst of Double-bond Isomerization in the Biosynthetic Pathway of Steroid Hormones." Journal of Biological Chemistry **276**(35): 33061-33065.

Jowsey, I. R., R. E. Thomson, T. C. Orton, C. R. Elcombe and J. D. Hayes (2003). "Biochemical and genetic characterization of a murine class Kappa glutathione S-transferase." Biochem J **373**(Pt 2): 559-569.

Kampranis, S. C., R. Damianova, M. Atallah, G. Toby, G. Kondi, P. N. Tsichlis and A. M. Makris (2000). "A novel plant glutathione S-transferase/peroxidase suppresses Bax lethality in yeast." J Biol Chem **275**(38): 29207-29216.

Kanai, T., K. Takahashi and H. Inoue (2006). "Three distinct-type glutathione S-transferases from Escherichia coli important for defense against oxidative stress." Journal of Biochemistry **140**(5): 703-711.

Karhumaa, K., B. Wiedemann, B. Hahn-Hägerdal, E. Boles and M.-F. Gorwa-Grauslund (2006). "Co-utilization of L-arabinose and D-xylose by laboratory and industrial Saccharomyces cerevisiae strains." Microbial Cell Factories **5**(1): 18.

Kasai, N., S. Ikushiro, S. Hirosue, A. Arisawa, H. Ichinose, Y. Uchida, H. Wariishi, M. Ohta and T. Sakaki (2010). "Atypical kinetics of cytochromes P450 catalysing 3'-hydroxylation of flavone from the white-rot fungus Phanerochaete chrysosporium." Journal of biochemistry **147**(1): 117-125.

Keeling, P., B. Leander and A. Simpson (2009). Eukaryotes. Eukaryota, organisms with nucleated cells. Version 28 October 2009.

Kelley, R. and C. A. Reddy (1986). "Identification of glucose oxidase activity as the primary source of hydrogen peroxide production in ligninolytic cultures of Phanerochaete chrysosporium." Archives of microbiology **144**(3): 248-253.

Kersten, P. and D. Cullen (2007). "Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete Phanerochaete chrysosporium." Fungal Genetics and Biology **44**(2): 77-87.

Kersten, P. J. (1990). "Glyoxal oxidase of Phanerochaete chrysosporium: its characterization and activation by lignin peroxidase." Proceedings of the National Academy of Sciences **87**(8): 2936-2940.

Kersten, P. J. and T. K. Kirk (1987). "Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H2O2 production by Phanerochaete chrysosporium." Journal of bacteriology **169**(5): 2195-2201.

Khersonsky, O. and D. S. Tawfik (2010). "Enzyme promiscuity: a mechanistic and evolutionary perspective." Annual Review of Biochemistry **79**: 471-505.

Kim, H.-G., K.-N. Park, Y.-W. Cho, E.-H. Park, J. A. Fuchs and C.-J. Lim (2001). "Characterization and regulation of glutathione S-transferase gene from Schizosaccharomyces pombe." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression **1520**(2): 179-185.

Kinne, M., M. Poraj-Kobielska, R. Ullrich, P. Nousiainen, J. Sipilä, K. Scheibner, K. E. Hammel and M. Hofrichter (2011). "Oxidative cleavage of non-phenolic beta-O-4 lignin model dimers by an extracellular aromatic peroxygenase." Holzforschung **65**(5): 673-679.

Kirk, T. K., H.-m. Chang and L. Lorenz (1975). "Topochemistry of the fungal degradation of lignin in birch wood as related to the distribution of guaiacyl and syringyl lignins." Wood Science and Technology **9**(2): 81-86.

Kirk, T. K. and D. Cullen (1998). "Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi." Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. Wiley, New York: 273-307.

Kirk, T. K. and R. L. Farrell (1987). "Enzymatic" combustion": the microbial degradation of lignin." Annual Reviews in Microbiology **41**(1): 465-501.

Klaassen, C. D. and J. W. Boles (1997). "Sulfation and sulfotransferases 5: the importance of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) in the regulation of sulfation." The FASEB Journal **11**(6): 404-418.

Klemm, D., B. Heublein, H. P. Fink and A. Bohn (2005). "Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material." Angewandte Chemie International Edition **44**(22): 3358-3393.

Koenigs, J. W. (1974). "Hydrogen peroxide and iron: a proposed system for decomposition of wood by brown-rot basidiomycetes." Wood and Fiber Science **6**(1): 66-80.

Kondrashov, F. A., I. B. Rogozin, Y. I. Wolf and E. V. Koonin (2002). "Selection in the evolution of gene duplications." Genome Biology **3**(2): 8.1-8.9.

Kong, K. H., K. Takasu, H. Inoue and K. Takahashi (1992). "Tyrosine-7 in human class Pi glutathione S-transferase is important for lowering the pKa of the thiol group of glutathione in the enzyme-glutathione complex." Biochem Biophys Res Commun **184**(1): 194-197.

Koonin, E. V., R. L. Tatusov, S. F. Altschul, S. H. Bryant, A. R. Mushegian, P. Bork and A. Valencia (1994). "Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma contains a glutathione transferase domain-Study of a diverse, ancient protein super family using motif search and structural modeling." Protein Science **3**(11): 2045-2055.

Kremer, S. M. and P. M. Wood (1992). "Production of Fenton's reagent by cellobiose oxidase from cellulolytic cultures of Phanerochaete chrysosporium." European journal of biochemistry **208**(3): 807-814.

Krest, C. M., E. L. Onderko, T. H. Yosca, J. C. Calixto, R. F. Karp, J. Livada, J. Rittle and M. T. Green (2013). "Reactive intermediates in cytochrome P450 catalysis." Journal of Biological Chemistry.

Krylov, D. M., Y. I. Wolf, I. B. Rogozin and E. V. Koonin (2003). "Gene loss, protein sequence divergence, gene dispensability, expression level, and interactivity are correlated in eukaryotic evolution." Genome Research **13**(10): 2229-2235.

Kuan, I.-C., K. A. Johnson and M. Tien (1993). "Kinetic analysis of manganese peroxidase. The reaction with manganese complexes." Journal of Biological Chemistry **268**(27): 20064-20070.

Kullman, B., H. Tamm and K. Kullman (2005). "Fungal genome size database." Institute of Agricultural and Environmental Sciences, Estonian Agricultural University, Tartu, Estonia. Available on the internet: http://www. zbi. ee/fungal-genomesize. Reference **2**: 2005.

Kumar, P., D. M. Barrett, M. J. Delwiche and P. Stroeve (2009). "Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production." Industrial & Engineering Chemistry Research **48**(8): 3713-3729.

Lacroute, F. (1968). "Regulation of pyrimidine biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae." Journal of bacteriology **95**(3): 824-832.

Ladner, J. E., J. F. Parsons, C. L. Rife, G. L. Gilliland and R. N. Armstrong (2004). "Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanism of the mitochondrial class kappa enzyme rGSTK1-1." Biochemistry **43**(2): 352-361.

Lam, B. K., J. F. Penrose, K. Xu, M. H. Baldasaro and K. F. Austen (1997). "Site-directed mutagenesis of human leukotriene C4 synthase." J Biol Chem **272**(21): 13923-13928.

Lay, M.-M. and J. E. Casida (1976). "Dichloroacetamide antidotes enhance thiocarbamate sulfoxide detoxification by elevating corn root glutathione content and glutathione S-transferase activity." Pesticide Biochemistry and Physiology **6**(5): 442-456.

Leatham, G. F. and M. A. Stahmann (1981). "Studies on the laccase of Lentinus edodes: specificity, localization and association with the development of fruiting bodies." Journal of General Microbiology **125**(1): 147-157.

Lee, S., A. K. Monnappa and R. J. Mitchell (2012). "Biological activities of lignin hydrolysate-related compounds." BMB Rep **45**(5): 265-274.

Leisinger, T., R. Bader, R. Hermann, M. Schmid-Appert and S. Vuilleumier (1994). "Microbes, enzymes and genes involved in dichloromethane utilization." Biodegradation **5**(3-4): 237-248.

Li, B., S. R. Nagalla and V. Renganathan (1996). "Cloning of a cDNA encoding cellobiose dehydrogenase, a hemoflavoenzyme from Phanerochaete chrysosporium." Applied and Environmental Microbiology **62**(4): 1329-1335.

Li, J., Z. Xia and J. Ding (2005). "Thioredoxin-like domain of human kappa class glutathione transferase reveals sequence homology and structure similarity to the theta class enzyme." Protein Sci **14**(9): 2361-2369.

Liers, C., C. Bobeth, M. Pecyna, R. Ullrich and M. Hofrichter (2010). "DyP-like peroxidases of the jelly fungus Auricularia auricula-judae oxidize nonphenolic lignin model compounds and high-redox potential dyes." Applied Microbiology and Biotechnology **85**(6): 1869-1879.

Littler, D. R., S. J. Harrop, S. C. Goodchild, J. M. Phang, A. V. Mynott, L. Jiang, S. M. Valenzuela, M. Mazzanti, L. J. Brown, S. N. Breit and P. M. Curmi (2010). "The enigma of the CLIC proteins: Ion channels, redox proteins, enzymes, scaffolding proteins?" FEBS Lett **584**(10): 2093-2101.

Liu, M., L. Zhou, A. Xu, K. S. Lam, M. D. Wetzel, R. Xiang, J. Zhang, X. Xin, L. Q. Dong and F. Liu (2008). "A disulfide-bond A oxidoreductase-like protein (DsbA-L) regulates adiponectin multimerization." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(47): 18302-18307.

Liu, Y.-J., X.-M. Han, L.-L. Ren, H.-L. Yang and Q.-Y. Zeng (2012). "Functional Divergence of the Glutathione S-Transferase Supergene Family in Physcomitrella patens Reveals Complex Patterns of Large Gene Family Evolution in Land Plants." Plant Physiology **161**(2): 773-786.

Loyall, L., K. Uchida, S. Braun, M. Furuya and H. Frohnmeyer (2000). "Glutathione and a UV light-induced glutathione S-transferase are involved in signaling to chalcone synthase in cell cultures." Plant Cell **12**(10): 1939-1950.

Lu, W. D. and W. M. Atkins (2004). "A novel antioxidant role for ligandin behavior of glutathione S-transferases: attenuation of the photodynamic effects of hypericin." Biochemistry **43**(40): 12761-12769.

Lynd, L. R., P. J. Weimer, W. H. Van Zyl and I. S. Pretorius (2002). "Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology." Microbiology and molecular biology reviews **66**(3): 506-577.

MacDonald, J., M. Doering, T. Canam, Y. Gong, D. S. Guttman, M. M. Campbell and E. R. Master (2011). "Transcriptomic responses of the softwood-degrading white-rot fungus Phanerochaete carnosa during growth on coniferous and deciduous wood." Applied and Environmental Microbiology **77**(10): 3211-3218.

MacDonald, J., H. Suzuki and E. R. Master (2012). "Expression and regulation of genes encoding lignocellulose-degrading activity in the genus Phanerochaete." Applied microbiology and biotechnology **94**(2): 339-351.

Majeau, J.-A., S. K. Brar and R. D. Tyagi (2010). "Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants." Bioresource Technology **101**(7): 2331-2350.

Makarova, K. S. and N. V. Grishin (1999). "The Zn-peptidase superfamily: functional convergence after evolutionary divergence." Journal of molecular biology **292**(1): 11-17.

Manavalan, A., S. S. Adav and S. K. Sze (2011). "iTRAQ-based quantitative secretome analysis of Phanerochaete chrysosporium." J Proteomics **75**(2): 642-654.

Manning, V. A., I. Pandelova, B. Dhillon, L. J. Wilhelm, S. B. Goodwin, A. M. Berlin, M. Figueroa, M. Freitag, J. K. Hane and B. Henrissat (2013). "Comparative genomics of a plant-pathogenic fungus, Pyrenophora tritici-repentis, reveals transduplication and the impact of repeat elements on pathogenicity and population divergence." G3: Genes| Genomes| Genetics **3**(1): 41-63.

Marco-Urrea, E. and C. Reddy (2012). Degradation of chloro-organic pollutants by white rot fungi. Microbial degradation of xenobiotics, Springer**:** 31-66.

Marrs, K. A. (1996). "The Functions and Regulation of Glutathione S-Transferases in Plants." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **47**: 127-158.

Marschner, H. and B. Dell (1994). "Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis." Plant and Soil **159**(1): 89-102.

Marsh, M., D. K. Shoemark, A. Jacob, C. Robinson, B. Cahill, N. Y. Zhou, P. A. Williams and A. T. Hadfield (2008). "Structure of bacterial glutathione-S-transferase maleyl pyruvate isomerase and implications for mechanism of isomerisation." J Mol Biol **384**(1): 165-177.

Martin, F., D. Cullen, D. Hibbett, A. Pisabarro, J. Spatafora, S. Baker and I. Grigoriev (2011). "Sequencing the fungal tree of life." New Phytologist **190**(4): 818-821.

Martin, J. L. (1995). "Thioredoxin--a fold for all reasons." Structure **3**(3): 245-250.

Martinez, A. T., M. Speranza, F. J. Ruiz-Duenas, P. Ferreira, S. Camarero, F. Guillen, M. J. Martinez, A. Gutierrez and J. C. del Rio (2005). "Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin." Int Microbiol **8**(3): 195-204.

Martinez, D., L. F. Larrondo, N. Putnam, M. D. S. Gelpke, K. Huang, J. Chapman, K. G. Helfenbein, P. Ramaiya, J. C. Detter and F. Larimer (2004). "Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus Phanerochaete chrysosporium strain RP78." Nature biotechnology **22**(6): 695-700.

Maruyama, T., C. Komatsu, J. Michizoe, H. Ichinose and M. Goto (2006). "Laccase-Mediated Oxidative Degradation of the Herbicide Dymron." Biotechnology progress **22**(2): 426-430.

Masai, E., Y. Katayama, S. Kubota, S. Kawai, M. Yamasaki and N. Morohoshi (1993). "A bacterial enzyme degrading the model lignin compound beta-etherase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily." FEBS Lett **323**(1-2): 135-140.

Masison, D. C. and R. B. Wickner (1995). "Prion-inducing domain of yeast Ure2p and protease resistance of Ure2p in prion-containing cells." Science **270**(5233): 93-95.

Mason, M., P. Nicholls and M. Wilson (2003). "Rotting by radicals-the role of cellobiose oxidoreductase?" Biochemical Society Transactions **31**(6): 1335-1336.

Mathew, G. M., R. K. Sukumaran, R. R. Singhania and A. Pandey (2008). "Progress in research on fungal cellulases for lignocellulose degradation." Journal of Scientific and Industrial Research **67**(11): 898.

Mathieu, Y., P. Prosper, M. Buee, S. Dumarcay, F. Favier, E. Gelhaye, P. Gerardin, L. Harvengt, J. P. Jacquot, T. Lamant, E. Meux, S. Mathiot, C. Didierjean and M. Morel (2012). "Characterization of a Phanerochaete chrysosporium glutathione transferase reveals a novel structural and functional class with ligandin properties." J Biol Chem **287**(46): 39001-39011.

Matsuzaki, F. and H. Wariishi (2004). "Functional diversity of cytochrome P450s of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*." Biochemical and biophysical research communications **324**(1): 387-393.

McCarthy, D. L., S. Navarrete, W. S. Willett, P. C. Babbitt and S. D. Copley (1996). "Exploration of the Relationship between Tetrachlorohydroquinone Dehalogenase and the Glutathione S-Transferase Superfamily " Biochemistry **35**(46): 14634-14642.

McGoldrick, S., S. M. O'Sullivan and D. Sheehan (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): 1-12.

Meux, E., M. Morel, T. Lamant, P. Gerardin, J. P. Jacquot, S. Dumarcay and E. Gelhaye (2012). "New substrates and activity of Phanerochaete chrysosporium Omega glutathione transferases." Biochimie **95**(2): 336-346.

Meux, E., P. Prosper, A. Ngadin, C. Didierjean, M. Morel, S. Dumarçay, T. Lamant, J.-P. Jacquot, F. Favier and E. Gelhaye (2011). "Glutathione Transferases of Phanerochaete chrysosporium S-glutathionyl-p-hydroquinone reductase belongs to a new structural class " Journal of Biological Chemistry **286**(11): 9162-9173.

Mita, N., S.-i. Tawaki, H. Uyama and S. Kobayashi (2003). "Laccase-Catalyzed Oxidative Polymerization of Phenols." Macromolecular Bioscience **3**(5): 253-257.

Monti, D., G. Ottolina, G. Carrea and S. Riva (2011). "Redox reactions catalyzed by isolated enzymes." Chemical Reviews-Columbus **111**(7): 4111.

Morel, F. and C. Aninat (2011). "The glutathione transferase kappa family." Drug Metab Rev **43**(2): 281-291.

Morel, F., C. Rauch, E. Petit, A. Piton, N. Theret, B. Coles and A. Guillouzo (2004). "Gene and protein characterization of the human glutathione S-transferase kappa and evidence for a peroxisomal localization." J Biol Chem **279**(16): 16246-16253.

Morel, M., E. Meux, Y. Mathieu, A. Thuillier, K. Chibani, L. Harvengt, J.-P. Jacquot and E. Gelhaye (2013). "Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi." Microbial Biotechnology: n/a-n/a.

Morel, M., A. A. Ngadin, M. Droux, J. P. Jacquot and E. Gelhaye (2009). "The fungal glutathione S-transferase system. Evidence of new classes in the wood-degrading basidiomycete Phanerochaete chrysosporium." Cellular and Molecular Life Sciences **66**(23): 3711-3725.

Morel, M. l., A. A. Ngadin, J.-P. Jacquot and E. Gelhaye (2009). "Reactive Oxygen Species in Phanerochaete chrysosporium Relationship Between Extracellular Oxidative and Intracellular Antioxidant Systems." Advances in Botanical Research **52**: 153-186.

Morgenstern, R. and J. W. DePierre (1983). "Microsomal Glutathione Transferase - Purification in Unactivated Form and further Characterization of the Activation Process, Substrate Specificity and Amino Acid Composition." European Journal of Biochemistry **134**(3): 591-597.

Morgenstern, R., C. Guthenberg and J. W. Depierre (1982). "Microsomal Glutathione S-Transferase - Purification, Initial Characterization and Demonstration that It Is not Identical to the Cytosolic Glutathione S-Transferases A, B and C." European Journal of Biochemistry **128**(1): 243-248.

Mosialou, E., F. Piemonte, C. Andersson, R. M. E. Vos, P. J. van Bladeren and R. Morgenstern (1995). "Microsomal glutathione transferase: Lipid-derived substrates and lipid dependence." Archives of Biochemistry and Biophysics **320**(2): 210-216.

Muheim, A., R. Waldner, D. Sanglard, J. Reiser, H. E. Schoemaker and M. S. Leisola (1991). "Purification and properties of an aryl-alcohol dehydrogenase from the whiteâ€⃝rot fungus Phanerochaete chrysosporium." European journal of biochemistry **195**(2): 369-375.

Nelson, D. R. (1998). "Metazoan cytochrome P450 evolution." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology **121**(1): 15-22.

Nilsson, T. and G. Daniel (1989). "Chemistry and microscopy of wood decay by some higher ascomycetes." Holzforschung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood **43**(1): 11-18.

Ning, D. and H. Wang (2012). "Involvement of Cytochrome P450 in Pentachlorophenol Transformation in a White Rot Fungus Phanerochaete chrysosporium." PloS one **7**(9): e45887.

Noreen, R., M. Asgher, H. N. Bhatti, S. Batool and M. J. Asad (2011). "Phanerochaete chrysosporium IBL-03 secretes high titers of manganese peroxidase during decolorization of Drimarine Blue K2RL textile dye." Environmental technology **32**(11): 1239-1246.

Novotny, Ä., B. Vyas, P. Erbanova, A. Kubatova and V. Å aÅ¡ek (1997). "Removal of PCBs by various white rot fungi in liquid cultures." Folia microbiologica **42**(2): 136-140.

O'Brien, H. E., J. L. Parrent, J. A. Jackson, J.-M. Moncalvo and R. Vilgalys (2005). "Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples." Applied and Environmental Microbiology **71**(9): 5544-5550.

O'Connell, K. M., E. J. Breaux and R. T. Fraley (1988). "Different rates of metabolism of two chloroacetanilide herbicides in Pioneer 3320 corn." Plant physiology **86**(2): 359-363.

O'Sullivan, A. C. (1997). "Cellulose: the structure slowly unravels." Cellulose **4**(3): 173-207.

Oakley, A. (2011). "Glutathione transferases: a structural perspective." Drug Metab Rev **43**(2): 138-151.

Orser, C. S., J. Dutton, C. Lange, P. Jablonski, L. Xun and M. Hargis (1993). "Characterization of a Flavobacterium glutathione S-transferase gene involved reductive dechlorination." J Bacteriol **175**(9): 2640-2644.

Orth, A. B., M. Rzhetskaya, D. Cullen and M. Tien (1994). "Characterization of a cDNA encoding a manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: genomic organization of lignin and manganese peroxidase-encoding genes." Gene **148**(1): 161-165.

Pazarlioglu, N. K., R. O. Urek and F. Ergun (2005). "Biodecolourization of Direct Blue 15 by immobilized *Phanerochaete chrysosporium*." Process Biochemistry **40**(5): 1923-1929.

Pease, E. A., A. Andrawis and M. Tien (1989). "Manganese-dependent peroxidase from Phanerochaete chrysosporium. Primary structure deduced from cDNA sequence." Journal of Biological Chemistry **264**(23): 13531-13535.

Peay, K. G., M. I. Bidartondo and A. Elizabeth Arnold (2010). "Not every fungus is everywhere: scaling to the biogeography of fungal-plant interactions across roots, shoots and ecosystems." New Phytologist **185**(4): 878-882.

Pemble, S. E., A. F. Wardle and J. B. Taylor (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., J. Graca and J. C. Rodrigues (2009). "3 Wood chemistry in relation to quality." Wood quality and its biological basis: 53.

Perito, B., N. Allocati, E. Casalone, M. Masulli, B. Dragani, M. Polsinelli, A. Aceto and C. Di Ilio (1996). "Molecular cloning and overexpression of a glutathione transferase gene from Proteus mirabilis." Biochem J **318 (Pt 1)**: 157-162.

Petit, E., X. Michelet, C. Rauch, J. Bertrand-Michel, F. Terce, R. Legouis and F. Morel (2009). "Glutathione transferases kappa 1 and kappa 2 localize in peroxisomes and mitochondria, respectively, and are involved in lipid metabolism and respiration in Caenorhabditis elegans." FEBS J **276**(18): 5030-5040.

Phillips, C. M., W. T. Beeson IV, J. H. Cate and M. A. Marletta (2011). "Cellobiose dehydrogenase and a copper-dependent polysaccharide monooxygenase potentiate cellulose degradation by Neurospora crassa." ACS chemical biology **6**(12): 1399-1406.

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

Pienkos, P. and M. Zhang (2009). "Role of pretreatment and conditioning processes on toxicity of lignocellulosic biomass hydrolysates." Cellulose **16**(4): 743-762.

Plett, J. M. and F. Martin (2011). "Blurred boundaries: lifestyle lessons from ectomycorrhizal fungal genomes." Trends in Genetics **27**(1): 14-22.

Pocsi, I., M. Miskei, Z. Karanyi, T. Emri, P. Ayoubi, T. Pusztahelyi, G. Balla and R. Prade (2005). "Comparison of gene expression signatures of diamide, H2O2 and menadione exposed Aspergillus nidulans cultures - linking genome-wide transcriptional changes to cellular physiology." BMC Genomics **6**(1): 182.

Poulos, T. L., S. L. Edwards, H. Wariishi and M. H. Gold (1993). "Crystallographic refinement of lignin peroxidase at 2 A." Journal of Biological Chemistry **268**(6): 4429-4440.

Poulos, T. L., B. Finzel, I. Gunsalus, G. C. Wagner and J. Kraut (1985). "The 2.6-A crystal structure of Pseudomonas putida cytochrome P-450." Journal of Biological Chemistry **260**(30): 16122-16130.

Prabhu, K. S., P. V. Reddy, E. C. Jones, A. D. Liken and C. C. Reddy (2004). "Characterization of a class alpha glutathione-S-transferase with glutathione peroxidase activity in human liver microsomes." Arch Biochem Biophys **424**(1): 72-80.

Pribnow, D., M. B. Mayfield, V. J. Nipper, J. A. Brown and M. H. Gold (1989). "Characterization of a cDNA encoding a manganese peroxidase, from the lignin-degrading basidiomycete Phanerochaete chrysosporium." Journal of Biological Chemistry **264**(9): 5036-5040.

Rai, R., J. J. Tate and T. G. Cooper (2003). "Ure2, a prion precursor with homology to glutathione S-transferase, protects Saccharomyces cerevisiae cells from heavy metal ion and oxidant toxicity." Journal of Biological Chemistry **278**(15): 12826-12833.

Raices, M., E. Paifer, J. Cremata, R. Montesino, J. StÃ¥hlberg, C. Divne, I. n. J. SzabÃ³, G. Henriksson, G. Johansson and G. r. Pettersson (1995). "Cloning and characterization of a cDNA encoding a cellobiose dehydrogenase from the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*." FEBS letters **369**(2): 233-238.

Ralph, J. (2010). "Hydroxycinnamates in lignification." Phytochemistry Reviews **9**(1): 65-83.

Reddy, G. V. B., M. Sridhar and M. H. Gold (2003). "Cleavage of nonphenolic beta-1 diarylpropane lignin model dimers by manganese peroxidase from Phanerochaete chrysosporium." European journal of biochemistry **270**(2): 284-292.

Redinbo, M. R. (2004). "Promiscuity: what protects us, perplexes us." Drug discovery today **9**(10): 431.

Reinemer, P., H. W. Dirr, R. Ladenstein, J. Schaffer, O. Gallay and R. Huber (1991). "The three-dimensional structure of class pi glutathione S-transferase in complex with glutathione sulfonate at 2.3 A resolution." EMBO J **10**(8): 1997-2005.

Robinson, A., G. A. Huttley, H. S. Booth and P. G. Board (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**(Pt 3): 541-552.

Romero, I. G., I. Ruvinsky and Y. Gilad (2012). "Comparative studies of gene expression and the evolution of gene regulation." Nature Reviews Genetics **13**(7): 505-516.

Sakamoto, T., Y. Yao, Y. Hida, Y. Honda, T. Watanabe, W. Hashigaya, K. Suzuki and T. Irie (2012). "A calmodulin inhibitor, W-7 influences the effect of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate signaling on ligninolytic enzyme gene expression in Phanerochaete chrysosporium." AMB Express **2**(1): 1-9.

Sanchez, C. (2009). "Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi." Biotechnology advances **27**(2): 185-194.

Schenk, P. M., S. Baumann, R. Mattes and H. H. Steinbiss (1995). "Improved high-level expression system for eukaryotic genes in Escherichia coli using T7 RNA polymerase and rare ArgtRNAs." Biotechniques **19**(2): 196-198, 200.

Schmidt, D. M., E. C. Mundorff, M. Dojka, E. Bermudez, J. E. Ness, S. Govindarajan, P. C. Babbitt, J. Minshull and J. A. Gerlt (2003). "Evolutionary potential of (beta/alpha) 8-barrels: functional promiscuity produced by single substitutions in the enolase superfamily." Biochemistry **42**(28): 8387-8393.

Schmidt-Krey, I., Y. Kanaoka, D. J. Mills, D. Irikura, W. Haase, B. K. Lam, K. F. Austen and W. Kuhlbrandt (2004). "Human leukotriene C(4) synthase at 4.5 A resolution in projection." Structure **12**(11): 2009-2014.

Schmidt-Krey, I., K. Mitsuoka, T. Hirai, K. Murata, Y. Cheng, Y. Fujiyoshi, R. Morgenstern and H. Hebert (2000). "The three-dimensional map of microsomal glutathione transferase 1 at 6 A resolution." EMBO J **19**(23): 6311-6316.

Senjo, M., T. Ishibashi and Y. Imai (1985). "Purification and characterization of cytosolic liver protein facilitating heme transport into apocytochrome b5 from mitochondria. Evidence for identifying the heme transfer protein as belonging to a group of glutathione S-transferases." J Biol Chem **260**(16): 9191-9196.

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

Shimabukuro, R. H., D. S. Frear, H. R. Swanson and W. C. Walsh (1971). "Glutathione conjugation. An enzymatic basis for atrazine resistance in corn." Plant Physiol **47**(1): 10-14.

Shimizu, M., N. Yuda, T. Nakamura, H. Tanaka and H. Wariishi (2005). "Metabolic regulation at the tricarboxylic acid and glyoxylate cycles of the lignin-degrading basidiomycete Phanerochaete chrysosporium against exogenous addition of vanillin." Proteomics **5**(15): 3919-3931.

Sigoillot, J.-C., J.-G. Berrin, M. Bey, L. Lesage-Meessen, A. Levasseur, A. Lomascolo, E. Record and E. Uzan-Boukhris (2012). "Fungal strategies for lignin degradation." Lignins: biosynthesis, biodegradation and bioengineering **61**.

Sims, P., C. James and P. Broda (1988). "The identification, molecular cloning and characterisation of a gene from *Phanerochaete chrysosporium* that shows strong homology to the exo-cellobiohydrolase I gene from *Trichoderma reesei*." Gene **74**(2): 411-422.

Singer, R. (1954). "VI. Fungi." The Botanical Review **20**(6): 451-462.

Singh, D., J. Zeng and S. Chen (2011). "Increasing manganese peroxidase productivity of Phanerochaete chrysosporium by optimizing carbon sources and supplementing small molecules." Letters in applied microbiology **53**(1): 120-123.

Singh, P., O. Sulaiman, R. Hashim, P. Rupani and L. C. Peng (2010). "Biopulping of lignocellulosic material using different fungal species: a review." Reviews in Environmental Science and Bio/Technology **9**(2): 141-151.

Smith, B. A. and M. H. Hecht (2011). "Novel proteins: from fold to function." Current Opinion in Chemical Biology **15**(3): 421-426.

Srebotnik, E., K. Messner and R. Foisner (1988). "Penetrability of white rot-degraded pine wood by the lignin peroxidase of Phanerochaete chrysosporium." Applied and Environmental Microbiology **54**(11): 2608-2614.

Stenström, E., E. Damm and T. Unestam (1997). "Le Rôle des mycorhizes dans la protection des arbres forestiers contre les agents pathogènes du sol." ENGREF, Ecole nationale du génie rural, des eaux et des forêts, Nancy, France.

Stewart, P. and D. Cullen (1999). "Organization and differential regulation of a cluster of lignin peroxidase genes of Phanerochaete chrysosporium." Journal of bacteriology **181**(11): 3427-3432.

Stewart, P., P. Kersten, A. V. Wymelenberg, J. Gaskell and D. Cullen (1992). "Lignin peroxidase gene family of Phanerochaete chrysosporium: complex regulation by carbon and nitrogen limitation and identification of a second dimorphic chromosome." Journal of bacteriology **174**(15): 5036-5042.

Subramanian, V., H. Doddapaneni, K. Syed and J. S. Yadav (2010). "P450 redox enzymes in the white rot fungus Phanerochaete chrysosporium: gene transcription, heterologous expression, and activity analysis on the purified proteins." Current microbiology **61**(4): 306-314.

Subramanian, V. and J. S. Yadav (2009). "Role of P450 monooxygenases in the degradation of the endocrine-disrupting chemical nonylphenol by the white rot fungus Phanerochaete chrysosporium." Applied and environmental microbiology **75**(17): 5570-5580.

Sundaramoorthy, M., M. H. Gold and T. L. Poulos (2010). "Ultrahigh (0.93 Angström) resolution structure of manganese peroxidase from Phanerochaete chrysosporium: Implications for the catalytic mechanism." Journal of Inorganic Biochemistry **104**(6): 683-690.

Sundaramoorthy, M., K. Kishi, M. H. Gold and T. L. Poulos (1994). "The crystal structure of manganese peroxidase from Phanerochaete chrysosporium at 2.06-A resolution." Journal of Biological Chemistry **269**(52): 32759-32767.

Sundaramoorthy, M., H. L. Youngs, M. H. Gold and T. L. Poulos (2005). "High-Resolution Crystal Structure of Manganese Peroxidase: Substrate and Inhibitor Complexes." Biochemistry **44**(17): 6463-6470.

Sundberg, K., M. Widersten, A. Seidel, B. Mannervik and B. Jernstrom (1997). "Glutathione conjugation of bay- and fjord-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by glutathione transferases M1-1 and P1-1." Chem Res Toxicol **10**(11): 1221-1227.

Sutcliffe, R. and J. N. Saddler (1986). "The role of lignin in the adsorption of cellulases during enzymatic treatment of lignocellulosic material."

Suzuki, H., J. MacDonald, K. Syed, A. Salamov, C. Hori, A. Aerts, B. Henrissat, A. Wiebenga, K. Barry and E. Lindquist (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**(1): 444.

Suzuki, T., K. Endo, M. Ito, H. Tsujibo, K. Miyamoto and Y. Inamori (2003). "A thermostable laccase from Streptomyces lavendulae REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence, and expression." Bioscience, biotechnology, and biochemistry **67**(10): 2167-2175.

Syed, K., H. Doddapaneni, V. Subramanian, Y. W. Lam and J. S. Yadav (2010). "Genome-to-function characterization of novel fungal P450 monooxygenases oxidizing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)." Biochemical and biophysical research communications **399**(4): 492-497.

Syed, K., C. Kattamuri, T. B. Thompson and J. S. Yadav (2011). "Cytochrome b5 reductase-cytochrome b5 as an active P450 redox enzyme system in Phanerochaete chrysosporium: Atypical properties and in vivo evidence of electron transfer capability to CYP63A2." Archives of Biochemistry and Biophysics **509**(1): 26-32.

Syed, K., A. Porollo, Y. W. Lam, P. E. Grimmett and J. S. Yadav (2013). "CYP63A2, a Catalytically Versatile Fungal P450 Monooxygenase Capable of Oxidizing Higher-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Alkylphenols, and Alkanes." Applied and environmental microbiology **79**(8): 2692-2702.

Syed, K. and J. S. Yadav (2012). "P450 monooxygenases (P450ome) of the model white rot fungus Phanerochaete chrysosporium." Critical reviews in microbiology **38**(4): 339-363.

Tan, K. L., G. Chelvanayagam, M. W. Parker and P. G. Board (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., S. Itakura and A. Enoki (1999). "Hydroxyl radical generation by an extracellular low-molecular-weight substance and phenol oxidase activity during wood degradation by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*." Journal of Biotechnology **75**(1): 57-70.

Tang, W. L., Z. Li and H. Zhao (2011). "Inverting the enantioselectivity of P450pyr monooxygenase by directed evolution." Chem. Commun. **46**(30): 5461-5463.

Thom, R., I. Cummins, D. P. Dixon, R. Edwards, D. J. Cole and A. J. Lapthorn (2002). "Structure of a tau class glutathione S-transferase from wheat active in herbicide detoxification." Biochemistry **41**(22): 7008-7020.

Thom, R., D. P. Dixon, R. Edwards, D. J. Cole and A. J. Lapthorn (2001). "The structure of a zeta class glutathione S-transferase from Arabidopsis thaliana: characterisation of a

GST with novel active-site architecture and a putative role in tyrosine catabolism." J Mol Biol **308**(5): 949-962.

Thomson, J. A. (1993). "Molecular biology of xylan degradation." FEMS Microbiology Letters **104**(1â€ 2): 65-82.

Thuillier, A., A. A. Ngadin, C. Thion, P. Billard, J.-P. Jacquot, E. Gelhaye and M. Morel (2011). "Functional diversification of fungal glutathione transferases from the ure2p class." International journal of evolutionary biology **2011**.

Tien, M. and T. K. Kirk (1983). "Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete Phanerochaete chrysosporium Burds." Science(Washington) **221**(4611): 661-662.

Todorova, T., S. Vuilleumier and A. Kujumdzieva (2007). "Role of glutathione s-transferases and glutathione in arsenic and peroxide resistance in Saccharomyces cerevisiae: a reverse genetic analysis approach." Biotechnology and Biotechnological equipment **21**(3): 348.

Todorova, T. T., A. V. Kujumdzieva and S. Vuilleumier (2010). "Non-enzymatic roles for the URE2 glutathione S-transferase in the response of Saccharomyces cerevisiae to arsenic." Archives of Microbiology **192**(11): 909-918.

Todorova, T. T., V. Y. Petrova, S. Vuilleumier and A. V. Kujumdzieva (2009). "Response to different oxidants of Saccharomyces cerevisiae ure2Δ mutant." Archives of Microbiology **191**(11): 837-845.

Tracewell, C. A. and F. H. Arnold (2009). "Directed enzyme evolution: climbing fitness peaks one amino acid at a time." Current Opinion in Chemical Biology **13**(1): 3-9.

Trefzer, A., V. Jungmann, I. Molnar, A. Botejue, D. Buckel, G. Frey, D. S. Hill, M. Jörg, J. M. Ligon and D. Mason (2007). "Biocatalytic conversion of avermectin to 4"-oxo-avermectin: Improvement of cytochrome P450 monooxygenase specificity by directed evolution." Applied and environmental microbiology **73**(13): 4317-4325.

Tuna, G., G. K. Erkmen, O. Dalmizrak, A. Dogan, I. H. Ogus and N. Ozer (2010). "Inhibition characteristics of hypericin on rat small intestine glutathione-S-transferases." Chemico-biological interactions **188**(1): 59-65.

Tuor, U., H. Wariishi, H. E. Schoemaker and M. H. Gold (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.

Turner, P., G. Mamo and E. N. Karlsson (2007). "Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining." Microb Cell Fact **6**(9): 1-23.

Uchida, H., T. Fukuda, H. Miyamoto, T. Kawabata, M. Suzuki and T. Uwajima (2001). "Polymerization of Bisphenol A by Purified Laccase from Trametes villosa." Biochemical and biophysical research communications **287**(2): 355-358.

Umland, T. C., K. L. Taylor, S. Rhee, R. B. Wickner and D. R. Davies (2001). "The crystal structure of the nitrogen regulation fragment of the yeast prion protein Ure2p." Proceedings of the National Academy of Sciences **98**(4): 1459-1464.

Urek, R. O. and N. K. Pazarlioglu (2007). "Enhanced production of manganese peroxidase by Phanerochaete chrysosporium." Brazilian Archives of Biology and Technology **50**(6): 913-920.

Urlacher, V. B. and M. Girhard (2012). "Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application." Trends in biotechnology **30**(1): 26-36.

Van der Putten, W. H., L. E. Vet, J. A. Harvey and F. L. WÃ¤ckers (2001). "Linking above- and belowground multitrophic interactions of plants, herbivores, pathogens, and their antagonists." Trends in Ecology & Evolution **16**(10): 547-554.

Veal, E. A., W. M. Toone, N. Jones and B. A. Morgan (2002). "Distinct roles for glutathione S-transferases in the oxidative stress response in Schizosaccharomyces pombe." Journal of Biological Chemistry **277**(38): 35523-35531.

Vega, K. and M. Kalkum (2012). "Chitin, Chitinase Responses, and Invasive Fungal Infections." International Journal of Microbiology **2012**.

Viikari, L., M. Alapuranen, T. Puranen, J. VehmaanperÃ¤ and M. Siika-Aho (2007). Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. Biofuels, Springer**:** 121-145.

Vuilleumier, S. and T. Leisinger (1996). "Protein engineering studies of dichloromethane dehalogenase/glutathione S-transferase from Methylophilus sp. strain DM11. Ser12 but not Tyr6 is required for enzyme activity." Eur J Biochem **239**(2): 410-417.

Wagner, A. (1998). "The fate of duplicated genes: loss or new function?" BioEssays **20**(10): 785-788.

Wang, M., T. Si and H. Zhao (2012). "Biocatalyst development by directed evolution." Bioresource technology **115**: 117-125.

Wang, X., G. Minasov and B. K. Shoichet (2002). "Evolution of an antibiotic resistance enzyme constrained by stability and activity trade-offs." Journal of molecular biology **320**(1): 85-95.

Wapinski, I., A. Pfeffer, N. Friedman and A. Regev (2007). "Natural history and evolutionary principles of gene duplication in fungi." Nature **449**(7158): 54-61.

Wariishi, H., H. B. Dunford, I. MacDonald and M. H. Gold (1989). "Manganese peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. Transient state kinetics and reaction mechanism." Journal of Biological Chemistry **264**(6): 3335-3340.

Wariishi, H., K. Valli and M. H. Gold (1989). "Oxidative cleavage of a phenolic diarylpropane lignin model dimer by manganese peroxidase from Phanerochaete chrysosporium." Biochemistry **28**(14): 6017-6023.

Watts, K. T., B. N. Mijts, P. C. Lee, A. J. Manning and C. Schmidt-Dannert (2006). "Discovery of a substrate selectivity switch in tyrosine ammonia-lyase, a member of the aromatic amino acid lyase family." Chemistry & biology **13**(12): 1317-1326.

Werck-Reichhart, D. l. and R. Feyereisen (2000). "Cytochromes P450: a success story." Genome Biol **1**(6): 3003.3001-3003.3009.

Whetten, R. W., J. J. MacKay and R. R. Sederoff (1998). "Recent advances in understanding lignin biosynthesis." Annual review of plant biology **49**(1): 585-609.

Whitbread, A. K., A. Masoumi, N. Tetlow, E. Schmuck, M. Coggan and P. G. Board (2005). "Characterization of the omega class of glutathione transferases." Methods in enzymology **401**: 78.

Whitehead, A. (2012). "Comparative genomics in ecological physiology: toward a more nuanced understanding of acclimation and adaptation." The Journal of experimental biology **215**(6): 884-891.

Whittaker, R. H. (1969). "New concepts of kingdoms of organisms." Science **163**(3863): 150-160.

Wickner, R. B. (1994). "[URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in Saccharomyces cerevisiae." Science **264**(5158): 566-569.

Wilce, M. C. and M. W. Parker (1994). "Structure and function of glutathione S-transferases." Biochim Biophys Acta **1205**(1): 1-18.

Williams, G. C. (2008). Adaptation and natural selection: a critique of some current evolutionary thought, Princeton University Press.

Wojtaszek, P. a. (1997). "Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection." Biochemical Journal **322**(Pt 3): 681.

Wong, D. W. (2009). "Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes." Applied biochemistry and biotechnology **157**(2): 174-209.

Wood, P. M. (1994). "Pathways for production of Fenton's reagent by wood-rotting fungi." FEMS Microbiology Reviews **13**(2-3): 313-320.

Wu, D.-D., D. M. Irwin and Y.-P. Zhang (2011). "Correlated evolution among six gene families in Drosophila revealed by parallel change of gene numbers." Genome biology and evolution **3**: 396.

Wymelenberg, A. V., J. Gaskell, M. Mozuch, S. S. BonDurant, G. Sabat, J. Ralph, O. Skyba, S. D. Mansfield, R. A. Blanchette and I. V. Grigoriev (2011). "Significant alteration of gene expression in wood decay fungi Postia placenta and Phanerochaete chrysosporium by plant species." Applied and environmental microbiology **77**(13): 4499-4507.

Wymelenberg, A. V., J. Gaskell, M. Mozuch, P. Kersten, G. Sabat, D. Martinez and D. Cullen (2009). "Transcriptome and secretome analyses of Phanerochaete chrysosporium reveal complex patterns of gene expression." Applied and Environmental Microbiology **75**(12): 4058-4068.

Wymelenberg, A. V., J. Gaskell, M. Mozuch, G. Sabat, J. Ralph, O. Skyba, S. D. Mansfield, R. A. Blanchette, D. Martinez and I. Grigoriev (2010). "Comparative transcriptome and secretome analysis of wood decay fungi Postia placenta and Phanerochaete chrysosporium." Applied and environmental microbiology **76**(11): 3599-3610.

Xun, L., S. M. Belchik, R. Xun, Y. Huang, H. Zhou, E. Sanchez, C. Kang and P. Board (2010). "S-Glutathionyl-(chloro) hydroquinone reductases: a novel class of glutathione transferases." The Biochemical journal **428**(3): 419.

Xun, L., E. Topp and C. S. Orser (1992). "Glutathione is the reducing agent for the reductive dehalogenation of tetrachloro-p-hydroquinone by extracts from a Flavobacterium sp." Biochem Biophys Res Commun **182**(1): 361-366.

Yadav, J., H. Doddapaneni and V. Subramanian (2006). "P450ome of the white rot fungus Phanerochaete chrysosporium: structure, evolution and regulation of expression of genomic P450 clusters." Biochemical Society Transactions **34**(Pt 6): 1165.

Yamada, T., J. Komoto, K. Watanabe, Y. Ohmiya and F. Takusagawa (2005). "Crystal structure and possible catalytic mechanism of microsomal prostaglandin E synthase type 2 (mPGES-2)." J Mol Biol **348**(5): 1163-1176.

Yang, K. and W. W. Metcalf (2004). "A new activity for an old enzyme: Escherichia coli bacterial alkaline phosphatase is a phosphite-dependent hydrogenase." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(21): 7919-7924.

Yang, Y., R. Sharma, J. Z. Cheng, M. K. Saini, N. H. Ansari, U. P. Andley, S. Awasthi and Y. C. Awasthi (2002). "Protection of HLE B-3 cells against hydrogen peroxide- and

naphthalene-induced lipid peroxidation and apoptosis by transfection with hGSTA1 and hGSTA2." Invest Ophthalmol Vis Sci **43**(2): 434-445.

Yelle, D. J., J. Ralph, F. Lu and K. E. Hammel (2008). "Evidence for cleavage of lignin by a brown rot basidiomycete." Environmental Microbiology **10**(7): 1844-1849.

Youn, H.-D., Y. C. Hah and S.-O. Kang (1995). "Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi." FEMS Microbiology Letters **132**(3): 183-188.

Zakharyan, R. A., G. Tsaprailis, U. K. Chowdhury, A. Hernandez and H. V. Aposhian (2005). "Interactions of sodium selenite, glutathione, arsenic species, and omega class human glutathione transferase." Chem Res Toxicol **18**(8): 1287-1295.

Zhang, Z. R., M. Bai, X. Y. Wang, J. M. Zhou and S. Perrett (2008). ""Restoration" of Glutathione Transferase Activity By Single-site Mutation of The Yeast Prion Protein Ure2." Journal of Molecular Biology **384**(3): 641-651.

Zhang, Z. R. and S. Perrett (2009). "Novel glutaredoxin activity of the yeast prion protein ure2 reveals a native-like dimer within fibrils." Journal of Biological Chemistry **284**(21): 14058-14067.

Zifcakova, L. and P. Baldrian (2012). "Fungal polysaccharide monooxygenases: new players in the decomposition of cellulose." Fungal ecology.

Communications scientifiques

Communications scientifiques

Publications

Thuillier A. , Ngadin A., Thion C., Billard P., Jacquot JP. Gelhaye E., Morel M. (2011)
Functional Diversification of Fungal Glutathione Transferases from the Ure2p Class. ***International Journal of Evolutionary Biology***, vol. 2011, Article ID 938308, 9 pages,. doi:10.4061/2011/938308

Morel M., Meux E., Mathieu Y., Thuillier A., Chibani K., Harvengt L., Jacquot JP., Gelhaye E. (2013)
Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi. ***Microbial Biotechnology***, vol. 6, Issue 3, 243-263, doi: 10.1111/1751-7915.12015

Thuillier A., Roret T., Favier F., Gelhaye E., Jacquot JP., Didierjean C., Morel-Rouhier M. (2013)
Atypical features of a Ure2p glutathione transferase from *Phanerochaete chrysosporium* ***FEBS Letters***, vol. 587, Issue 14, 2125-2130, doi: 10.1016/j.febslet.2013.05.031

Thuillier A., Chibani K., Deroy A, Belli G., Herrero E., Dumarçay S., Gérardin P., Kohler A., Jacquot JP., Gelhaye E., Morel-Rouhier M.
Emerging function of a glutathione transferase in response to wood extractives toxicity. ***Soumis chez Molecular Microbiology***.

Thuillier A., Roret T., Gelhaye E., Jacquot JP., Didierjean C., Morel-Rouhier M.
Structural and functional variability within the Ure2pA subclass of *Phanerochaete chrysosporium* : insight into evolutionary mechanisms. ***En préparation***.

Posters

Thuillier A., Mitochondrial control of oxidative stress in a ligninolytic fungus in relation with its saprophytic capabilities. **Séminaire des doctorants 2011 du département EFPA** (Ecologie des Forêts, Prairies et milieux Aquatiques) de l'INRA, **Séminaire 2011 de l'école doctorale RP2E**.

Thuillier A., Mathieu Y., Meux E., Dumarçais S., Gérardin P., Gelhaye E., Buée M., Harvengt L., Jacquot JP., Morel M.
Fungal glutathione transferases : targets for evolutionary innovations. **11th European Conference on Fungal Genetics.** Marburg, Germany. Printemps 2012.

Thuillier A. Ngadin AA., Thion C., Billard P., Jacquot JP., Gelhaye E., Morel M., Functional diversification of fungal glutathione transferase from the Ure2p class. **Journées Jean Chevaugeon, 9èmes Rencontres de Phytopathologie-Mycologie de la Société française de Phytopathologie**. Aussois, France, janvier 2012.

Présentations orales

Thuillier A., Meux E., Mathieu Y., Fungal Glutathione transferases : New insights from *Phaneroachete chrysosporium*. **Journée GDR (Groupement De Recherche) 2477 « Thiorédoxines et Glutarédoxines »**, l'Institut de Biotechnologie des Plantes, Orsay, 2011.

Thuillier A. Caractérisation d'une glutathion transférase, une enzyme de détoxication d'un champignon ligninolytique. **Séminaire 2013 de l'école doctorale RP2E**, Vandoeuvre-les-Nancy.

Résumé : *Phanerochaete chrysosporium* est un champignon forestier faisant partie des organismes saprophytes capables de recycler la matière organique morte. Grâce à l'excrétion de nombreuses enzymes de dégradation, en particulier des lignine peroxydases, il est capable de décomposer la matière végétale dont la lignine, un polymère complexe de composés phénoliques très résistant. L'élimination de la lignine permet la libération des autres composants du bois tels que la cellulose et l'hémicellulose qui peuvent être utilisés dans l'industrie papetière ou pour la production de bioéthanol de deuxième génération. La structure des intermédiaires et produits de dégradation de la lignine est souvent proche de celle de nombreux polluants, d'où l'intérêt biotechnologique de *P. chrysosporium* dans les processus de bioremédiation. Cependant, les systèmes de dégradation engendrent des composés plus ou moins toxiques pour le champignon et contre lesquels il doit faire face. C'est pourquoi il possède un système de détoxication impliquant des enzymes telles que les cytochrome P450 monooxygénases ou encore les glutathion transférases (GST). Les Ure2p forment une classe de GST étendue chez *Phanerochaete* et d'autres basidiomycètes saprophytes. Leur étude par des approches phylogénétiques, biochimiques, structurales et transcriptomiques a permis de mieux comprendre les mécanismes d'évolution que peut subir une classe d'enzymes potentiellement soumises à une forte pression de sélection.

Mots clés : champignons saprophytes, dégradation du bois, glutathion transférases, xénobiotiques, détoxication, évolution

Abstract : *Phanerochaete chrysosporium* is a forest fungus being part of saprophytic organisms able to recycle dead organic matter. Thanks to the excretion of numerous wood decaying enzymes, and especially lignin peroxidases, this fungus is able to break down plant material including lignin, a complex polymer of phenolic compounds. Lignin removal allows the release of other wood components such as cellulose and hemicellulose, which can be further used in paper industry or to produce second generation bioethanol. The structure of intermediates and products from lignin decomposition is close to that of numerous pollutants making *P. chrysosporium* biotechnologically interesting for bioremediation purposes. Moreover, the fungus has to deal with more or less toxic compounds created by degradation mechanisms. It thus presents a detoxification pathway involving enzymes including cytochrome P450 monooxygenases and glutathione transferases (GST). Ure2p enzymes belong to an extended GST class in *Phanerochaete* genus as well as in other saprophytic basidiomycetes. Their study based on phylogenetic, biochemical, structural and transcriptomic approaches provides a better understanding of evolution mechanisms of a class of enzymes potentially subject to strong selection selection pressure.

Keywords: saprophytic fungi, wood degradation, glutathione transferases, xenobiotics, detoxification, evolution