



HAL
open science

Caractérisation fonctionnelle de petites protéines sécrétées chez les champignons lignolytiques

Nicolas Valette

► **To cite this version:**

Nicolas Valette. Caractérisation fonctionnelle de petites protéines sécrétées chez les champignons lignolytiques. Biologie végétale. Université de Lorraine, 2017. Français. NNT : 2017LORR0324 . tel-01834557v1

HAL Id: tel-01834557

<https://theses.hal.science/tel-01834557v1>

Submitted on 10 Jul 2018 (v1), last revised 10 Jul 2018 (v2)

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UFR Sciences et Technologies
E.D Ressources, Procédés, Produits et Environnement
Biologie Végétal et Forestière



UMR 1136 INRA/Université de Lorraine
Interactions Arbres-Micro-organismes

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

En biologie végétale et forestière

Par **Valette Nicolas**

Caractérisation fonctionnelle de petites protéines sécrétées chez les champignons lignolytiques

Soutenance publique prévue le 6 décembre 2017

Membres du jury :

Rapporteurs :

Pr. Bernard Kurek
Pr. Jean-Guy Berrin

Directeur de recherche, INRA, Reims, France
Directeur de recherche, INRA, Marseille, France

Examineurs :

Pr. Philippe Silar
Dr. Claire Fourrey-Veneault
Pr. Melanie Morel-Rouhier
Pr. Eric Gelhaye

Professeur, Université Paris Diderot, Paris, France
Maître de conférence, Université de Lorraine, Nancy, France
Professeur, Université de Lorraine, Nancy, France
Professeur, Université de Lorraine, Nancy, France

UMR 1136 INRA/Université de Lorraine Interaction Arbres Micro-Organismes
Centre INRA de Champenoux – 54280 Champenoux
Faculté des sciences et technologies – 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy

Remerciements :

Avant toute chose je tiens à remercier les membres du jury Bernard Kurek et Jean-Guy Berrin pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse, ainsi que Claire Fourrey et Philippe Silar d'en être les examinateurs. En espérant que mes travaux de thèse soient à la hauteur de vos attentes.

Je tiens également à remercier la région Lorraine et le Labex ARBRE sans qui cette thèse n'aurait pu avoir lieu.

Tout d'abord je tiens à remercier ma directrice de thèse Mélanie Morel-Rouhier qui m'a accompagné durant ces trois années et sans qui rien n'aurait été possible. Tu as su répondre à mes nombreuses questions et me donner de précieux conseils. Tu m'as aussi fait découvrir des congrès internationaux et nationaux dans lesquels j'ai pu exposer mes travaux, discuter avec d'autres scientifiques et découvrir de nouvelles perspectives de recherche. Je garderai toujours en mémoire les paysages de la Californie, les cimes enneigées d'Aussois, Marbourg et son architecture, Paris et son hôtel et les caves de champagne à Reims. Pour finir, ces trois années de thèse furent pour ma part extraordinaires car j'ai bénéficié d'un environnement de travail exceptionnel, c'est donc tout naturellement que je t'en suis reconnaissant et que je te remercie pour tout.

Je me rappelle de mon arrivée au laboratoire dans le premier bureau accompagné de tous les autres stagiaires de M2 dont je faisais partie. Puis la joie mêlée à de l'excitation lorsque j'ai appris que je continuerais en thèse. Un jour une place s'est libérée dans le bureau des doctorants c'est alors que j'ai découvert des mecs géniaux :

PA un très grand consommateur de Red Bull et de café dont le prix des actions s'est mis à flamber au moment de la rédaction de sa thèse.

Henri le bonhomme du Haut-Doubs avec qui j'ai fait quelques bras de fer et concours de pompes que j'ai bien évidemment tous gagnés, mais aussi des parties d'hearstones où je dois dire j'ai essuyé quelques défaites. Henri c'était aussi des tee-shirts moulants un peu particuliers imprimés avec des pastèques afin de mettre en valeur ses pectoraux. De la franche rigolade ponctuée de conversations plus sérieuses merci pour tous ses moments.

Jonathan ou johny c'est avant-tout une passion débordante pour la moto qui à l'heure actuelle fait toujours partie intégrante de la décoration du bureau bien que tu ne sois plus là. Je me rappelle lorsque 19h30 était passé débutaient alors des concours de basket que j'ai tous gagnés et des parties de football dans le couloir que j'ai très souvent perdues. J'aurais aimé aller courir plus souvent avec toi le matin sur le plateau de Brabois mais je n'ai pu tenir le rythme que j'ai su tenir lors du motoGP au Mans. Un week-end génial où j'ai découvert l'univers des courses moto et ses nuits aux sons des moteurs rugissants et l'odeur du bitume fondu tout cela entrecoupé de quelques heures de sommeil. Je retiendrai aussi ta tendance à être pointilleux sur l'emplacement de l'agrapheuse et du sopalin ou sur l'ouverture des rideaux. J'ai passé trois excellentes années en ta compagnie avec de nombreux fous rires bonne chance à toi en Suède.

Flavien dit flavinus le vosgien, le producteur et amateur de bière qui par ailleurs est excellente. Quand je pense à nos munsters mangés le midi je me dis que l'on aurait dû acheter des actions chez Dodin. A l'instant où j'écris nous ne sommes toujours pas allés voir un match de hockey sur glace, j'espère que tu me feras découvrir ce sport très prochainement.

Thomas ou toto je me souviens de ton arrivée au labo, tu étais timide toujours à dire oui. Depuis de l'eau a coulé sous les ponts, tu restes quand même prudent mais ta véritable nature éclate après 19h !!! Je ne pourrai oublier les nombreux congrès passés ensemble au cours desquels j'ai su que tu étais un expert du planté de baton enfin sur 1 bon mètre pas plus. J'ai aussi découvert ton attrait pour la langue allemande et se fameux « achtung », et comment ne pas oublier le merveilleux accueil dont nous avons été témoin. Mais les moments avec toto c'est aussi quelques anecdotes comme l'oubli de nos posters dans le TGV, l'achat de casquette taille enfant ou encore une attaque en règle dans notre chambre d'hôtel à Paris. J'ai aussi eu le plaisir de partager la petite balle jaune avec toi pour des duels acharnés fait de coups droits longs de ligne et de revers courts croisés avec pour finalité un point gagnant et une victoire 6-1/6-2 pour moi il me semble. Mais durant tous ces moments j'ai appris à te connaître avec de très bons fous rires et puis je pourrai dire que je me suis assis en face du champion régional de ma thèse en 180s et que je fais face à ton fameux tee-shirt blanc à rayures vertes. Je terminerai sur un vivement Jeudi !!! Et en espérant que l'on puisse connaître la fin et en reparler ensemble.

Ma seconde pensée va pour **Antonio** qui est rentré depuis peu en Espagne mais dont la joie de vivre débordante se traduisait par un grand sourire. J'ai eu le bonheur de travailler avec toi pendant 1 an et d'entendre très souvent « we don't talk anymore, we don't talk anymore like we used to ». En espérant te revoir un jour.

Je voudrais aussi remercier tous les membres du laboratoire pour la joie et le professionnalisme dont ils font preuve tous les jours : **Jean-Michel, Fanny, Raphael, Rodnay, Jérémy, Tiphaine, Eric, Arnaud, Jean-Pierre, Mélanie, Elodie, Elena, Nicolas et Vuong**. Sans vous rien aurait été pareil vous m'avez offert des conditions de travail exceptionnelles et je vous en remercie.

J'ai aussi une pensée pour les membres de l'équipe du LIED et plus particulièrement pour **Valérie** et **Philippe**. Je tenais à vous remercier pour votre accueil chaleureux, pour m'avoir guidé et encadré pendant mes séjours à Paris.

Liste des figures :

Figure 1 : Evolution et expansion du domaine fongique au cours du temps (adapté de James and Berbee, 2012; Toruellea et al., 2015; Berbee et al., 2017).....	6
Figure 2 : Schéma de la voie des phénylpropanes chez les plantes (adapté de Emiliani et al.,2009; Weng et al., 2008).	8
Figure 3 : Schéma de l'organisation des parois d'une cellule végétale lignifiée (Bacic et al., 1988).	10
Figure 4 : Schéma représentant une chaîne de cellulose composée de sous unités de glucose liées par des liaisons β -1,4. (http://www.madsci.org/posts/archives/2005-06/1120022354.Ch.r.html).....	12
Figure 5 : Schéma représentant l'organisation d'une fibre de cellulose (Börjesson et al., 2015).	12
Figure 6 : Schéma partiel de la composition d'un polymère d'hémicellulose.	15
Figure 7 : Structure des trois unités de base de la lignine (Ralph et al., 2004).	15
Figure 8 : Schéma récapitulatif de toutes les étapes de la synthèse de la lignine (Mottiar et al., 2016).	16
Figure 11 : Colonisation de la litière au cours du temps par les champignons dégradateurs (adapté de Frankland et al., 1998).....	22
Figure 12 : Image de microscopie représentant les différents modes d'attaque des pourritures molles (Blanchette et al., 2000).....	24
Figure 13 : Photographie de la colonisation d'un excrément par des champignons coprophiles.	24
Figure 14 : Photographie de Thomas Reich (WSL) représentant l'action caractéristique des pourritures brunes sur le bois.....	26
Figure 15 : Schéma des mécanismes oxydatifs de dégradation de la biomasse lignocellulosique chez les pourritures brunes (adapté de Goodell, 2003; Arantes et al., 2012).	28
Figure 16 : Image représentant l'action caractéristique des pourritures blanches sur le bois.....	31
Figure 17 : Cycle catalytique des lignine peroxydases (adapté de Hammel and Cullen, 2008).	34
Figure 18 : Cycle catalytique des Manganèse peroxydases (adapté de Hofrichter et al., 2002).	36
Figure 19 : Cycle catalytique des versatile peroxydases (adapté de Ruiz-duenas et al., 2007).	38
Figure 20 : Schéma de la chaîne d'acides aminés impliquée dans le mécanisme de LRET des lignine peroxydases (Schoemaker et al., 1994).	38
Figure 21 : Cycle catalytique des phénol oxydases (adapté de Sitarz et al., 2016).	42
Figure 22 : Réaction catalysée par les glyoxal oxydases (Daou et al., 2017).	44
Figure 23 : Schéma des réactions catalysées par les aryl-alcool oxydases (Hernández-ortega et al., 2012)	46
Figure 24 : Réaction catalysée par les pyranose oxydases (Wongnate and chaiyen, 2013)	46
Figure 25 : Schéma récapitulatif des différentes activités enzymatiques nécessaires à la dégradation de la cellulose (adapté de Narra et al., 2014; Henriksson et al., 2000; Philips et al., 2011 ; Langston et al., 2011).	52

Figure 26 : Schéma récapitulatif des différentes activités enzymatiques nécessaires à la dégradation de l'hémicellulose (adapté de Sánchez et al., 2009; Malherbe and Cloete, 2002).....	54
Figure 27 : Mécanismes de régulation transcriptionnelle des cellulases et des hémicellulases chez <i>Trichoderma reesei</i> (Shida et al., 2016).....	58
Figure 28 : Schéma des réactions de la voie des quinones aboutissant à la réaction de Fenton (Gomez-toribio et al., 2009).....	62
Figure 29 : Schéma de la dégradation de la cellulose par les LPMO (adapté de Vaaje-Kolstad et al., 2017).....	64
Figure 30 : Croissance aérienne des hyphes fongiques (adapté de Wessels, 2000).....	66
Figure 31 : Recrutement de cutinase par les HSBA permettant la dégradation de la surface hydrophobe (adapté de Ohtaki et al., 2006).	68
Figure 32 : Schéma de la réaction de glycation entre un sucre et une protéine aboutissant sur la réaction de Fenton (Tanaka et al., 2007).	70
Figure 33 : Cycle de vie de <i>Podospora anserina</i> (http://podospora.igmors.u-psud.fr/more.php).	86
Figure 34 : Observation microscopique des appressoria et schématisation du mécanisme de pénétration (adapté de Brun et al., 2009).	90
Figure 35 : Carte des plasmides utilisés au cours de ma thèse.	100
Figure 37 : Schéma des secondes PCR du protocole de construction de la cassette de délétion.....	131
Figure 38 : Schéma représentant la construction du mécanisme de transfert de l'ADN sur la membrane.....	138
Figure 39 : Western Blot montrant l'expression de SSP1 et SSP1trunc après surexpression chez <i>S. cerevisiae</i>	194
Figure 40 : Phénotypage des mutants de levures surexprimant SSP1 et SSP1trunc.....	194
Figure 41 : Profils d'amplification des trois fragments d'ADN nécessaire à la réalisation d'une cassette de délétion permettant le remplacement d'un gène chez <i>P. anserina</i>	196
Figure 42 : Profils d'amplification des demi-cassettes utilisées pour la transformation génétique de <i>P. anserina</i>	196
Figure 43 : Transformants isolés sur milieu de sélection (Généticine).....	198
Figure 44 : Etape de vérification de l'insertion des cassettes de délétion chez <i>P. anserina</i>	198
Figure 45 : Photo des étapes de génotypage des 24 microspores.	198
Figure 46 : Résultats des Southern Blot réalisés sur les souches délétées pour Pa_6-2010 et Pa_5-3780.	201
Figure 47 : Formation de périthèces et libération de spores des mutants de <i>P. anserina</i> sur diverses sources de carbone.	202
Figure 48 : Tests de croissance des souches sauvage et mutées en présence de diverses sources carbonées (milieu M2 supplémenté avec différents sucres à une concentration finale de 4 g/l).....	205
Figure 49 : Test d'identification du phénomène de croissance : crippled growth.	206
Figure 50 : Test de résistance des souches mutantes à des extractibles de bois.....	209
Figure 51 : Test de résistance des souches mutantes contre des molécules toxiques pures.....	210
Figure 52 : Pourcentages moyens de dégradation du bois par la souche sauvage et par la souche double mutante.....	213
Figure 53 : Photo des sécrétions de la souche sauvage et du double mutant sur bois après 3 mois de culture à 27°C.....	213

Figure 54 : Observation au microscope confocal des appressorium-like chez le sauvage et le double mutant.....	214
Figure 55 : Test de croissance des souches sauvage et mutantes sur milieu oxydant..	216
Figure 56 : Test de croissance des souches sauvage et mutantes sur milieu permettant la fragilisation des parois cellulaires.	219
Figure 57 : Image prise au microscope optique (X40) après la digestion du mycélium de <i>P. chrysosporium</i> par du glucanex.....	220
Figure 58 : Observation microscopique (X40) d'une macrospore et d'une microspore produite par <i>P. chrysosporium</i>	220
Figure 59 : Pourcentage de spores germées au cours du temps en fonction du milieu de culture.....	220
Figure 61 : Validation de la fluorescence de la GFP introduite chez <i>P. chrysosporium</i> RP78.....	224
Figure 62 : Visualisation de la fluorescence de la GFP pour les constructions GFP seule (A) et Ure1m-GFP (B) introduites chez <i>P. chrysosporium</i> BKM par lipotransfection.	226
Figure 64 : Alignement des séquences protéiques de <i>P. anserina</i> avec la SSP1 de <i>P. chrysosporium</i>	272
Figure 65 : Schéma de l'organisation génomique des séquences codantes de l'époxyde hydrolase, de la SSP1 et de la dioxygénase.....	284
Figure 66 : Arbre phylogénétique de séquences homologues aux SSP de <i>P. anserina</i> ..	284
Figure 67 : Image de la superposition des modèles de PcSSP1 et LPMO à partir de Pymol.....	290

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Composition du milieu Tien and Kirk.....	102
Tableau 2 : Composition d'un gel SDS-page en fonction du pourcentage d'acrylamide	114
Tableau 3 : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour obtenir les mutants chez <i>P. anserina</i>	128
Tableau 4 : Composition du milieu de croissance M2.	132
Tableau 5 : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour vérifier l'insertion de la cassette de délétion dans l'ADN génomique	134
Tableau 6 : Bilan des enzymes de restriction utilisées pour le southern blot et taille des fragments associés à la digestion de l'ADN génomique du mutant et du sauvage.....	136
Tableau 7 : Mix de réaction PCR pour réaliser une sonde digoxygénine	138
Tableau 8 : Liste des phénotypes obtenus pour chaque microscopores des mutants $\Delta 3780$ et $\Delta 2010$	200
Tableau 9 : Tableau représentant des espèces fongiques possédant une organisation génomique de SSP1 similaire à celle de <i>P. chrysosporium</i>	280

Liste des articles scientifiques :

- ARTICLE 1** : Valette et al. 2017, Fungal biology reviews.
ARTICLE 2 : Valette et al. 2016, Microbial biotechnology.
ARTICLE 3 : Valette et al. En préparation
ARTICLE 4 : Fernandez-Gonzalez et al. En préparation

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
Chapitre 1 : L'histoire évolutive des organismes dégradeurs de biomasse est étroitement liée à l'expansion de la lignée verte :	3
1. La conquête du milieu terrestre : fruit de l'évolution du mode de nutrition :	3
1.1 Les premiers champignons, des organismes aquatiques :	3
1.2 La paroi chitineuse, un élément essentiel de la conquête du milieu terrestre :	5
2. L'expansion de la lignée verte et la colonisation du milieu terrestre.	7
2.1 Une histoire de mycorhize :	7
2.2 Le métabolisme des phénylpropanes :	7
Chapitre 2 : La composition des bois d'angiospermes et de gymnospermes: différences et similarités	11
1. La paroi cellulaire des tissus lignifiés :	11
1.1 La cellulose :	13
1.2 L'hémicellulose :	13
1.3 La lignine :	13
1.3.1 Voie de synthèse :	13
1.3.2 Les différences entre les feuillus et les conifères :	17
2. Les extractibles :	21
Chapitre 3 : Les champignons dégradeurs de biomasse	21
1. Les décomposeurs de litière :	23
2. Les pourritures molles :	23
3. Les coprophiles :	25
4. Les pourritures brunes :	27
5. Les pourritures blanches :	29
Chapitre 4 : Mécanismes de dégradation des pourritures blanches :	33
1. <i>Phanerochaete chrysosporium</i> une pourriture blanche modèle :	33
2. Système enzymatique de dégradation de la lignine :	33
2.1 Système enzymatique principal :	35
2.1.1 Les lignine peroxydases :	35
2.1.2 Les Manganèse peroxydases :	37
2.1.3 Les versatile peroxydases :	39
2.1.4 Les phénols oxydases ou laccases :	41
2.2 Système enzymatique satellite :	43
2.2.1 Les glyoxal oxydases :	45
2.2.2 Les aryl-alcool oxydases :	47
2.2.3 Les pyranoses oxydases :	47
3. Système de dégradation des polysaccharides du bois :	49

3.1 Dépolymérisation de la cellulose :	49
3.2 Dépolymérisation des hémicelluloses :	53
4. Limitations de l'efficacité des enzymes de dégradation de la biomasse lignocellulosique et stratégies d'adaptation développées par les champignons :	55
4.1 Un système finement régulé au niveau transcriptionnel :	55
4.1.1 Régulation des gènes codant des enzymes lignolytiques :	55
4.1.2 Régulation des gènes codant les enzymes permettant la lyse des polysaccharides :	57
4.2 Problème de pénétration des enzymes dans le bois :	59
4.2.1 La réaction de Fenton :	61
4.2.2 Les petites protéines sécrétées :	63
4.2.2.1 Les Lytic Polysaccharide Mono Oxygenases :	65
4.2.2.2 Les hydrophobines :	67
4.2.2.3 Les Hydrophobic Binding Surface protein A (HSBA) :	67
4.2.2.4 Les glycoprotéines :	69
4.3 Les extractibles du bois, un impact négatif sur les processus de dégradation de la lignocellulose :	71
Chapitre 5 : <i>Podospora anserina</i> un saprophyte coprophile modèle d'étude de la dégradation de la biomasse végétale :	85
1. Cycle de vie :	85
2. <i>P. anserina</i> un véritable saprophyte :	87
3. Système enzymatique et capacité de dégradation de la biomasse végétale :	89
3.1 Dégradation de la cellulose et de l'hémicellulose :	89
3.2 Dégradation de la lignine :	91
4. Implication potentielle d'un mécanisme physique dans la dégradation de la biomasse végétale, les appressorium-like :	91
Objectifs de la thèse :	93
MATÉRIELS ET MÉTHODES	97
Chapitre 1. Matériels biologiques :	99
1. Souches de champignons de référence :	99
2. Souches de champignons utilisés dans des expériences de manipulation génétique :	99
3. Souches de bactéries pour la production de protéines recombinantes :	99
4. Souche de bactéries pour la production de plasmide d'intérêt :	101
5. Carte des plasmides utilisés:	101
Chapitre 2 : Polymerase Chain Reaction et clonage du gène d'intérêt dans un vecteur d'expression :	103
1. Création d'une banque d'ADNc chez <i>P. chrysosporium</i> :	103

1.1	Extraction des ARN totaux :.....	103
1.2	Reverse transcription :.....	103
2.	Ligation d'un fragment d'ADN dans un vecteur d'expression :.....	105
2.2	Insertion dans un vecteur d'expression :.....	105
Chapitre 3 :	Méthodes de transformation d' <i>Escherichia coli</i> :.....	107
1.	Transformation de bactéries électro-compétentes BL21 pSBET :.....	107
2.	Transformation de bactéries thermo-compétentes Rosetta 2 et DH5 α :.....	107
Chapitre 4 :	Production et purification de protéines recombinantes :.....	109
1.	Production de protéines recombinantes par induction à l'Isopropyl β -D-1 thiogalactopyranoside (IPTG) :.....	109
2.	Purification des protéines sans étiquette :.....	109
2.2	Chromatographie d'exclusion de taille :.....	111
2.3	Chromatographie échangeuse d'ions : Diethylaminoethyl cellulose :.....	111
3.	Purification des protéines présentant une étiquette poly-histidines :.....	113
3.1	Chromatographie d'affinité IMAC :.....	113
3.2	Fast Protein Liquid Chromatography :.....	113
4.	Séparation de macromolécules sur gel :.....	115
4.1	Electrophorèse protéique sur gel polyacrylamide :.....	115
Chapitre 5 :	Caractérisation biochimique des protéines recombinantes :.....	117
1.	Détermination de la taille et de l'état d'oligomérisation des protéines :.....	117
1.1	Par chromatographie d'exclusion de taille analytique couplée à une analyse sur gel SDS-PAGE :.....	117
1.2	Par spectroscopie : diffusion dynamique de la lumière (DLS) :.....	117
2.	Visualisation des propriétés structurales des protéines :.....	119
2.1	Microscopie à force atomique :.....	119
2.2	Dichroïsme circulaire :.....	119
3.	Activités enzymatiques des protéines recombinantes :.....	121
3.1	Par dosage fluorométrique :.....	121
4.	Modification des tampons protéiques :.....	121
4.1	Par dialyse des protéines :.....	121
4.2	Diminution de la quantité de sel par concentration et dilution:.....	123
Chapitre 6 :	Transformation génétique et caractérisation des mutants chez <i>S. cerevisiae</i> :	123
1.	Western-blotting :.....	125
1.1	Préparation des cellules :.....	125
1.2	Extraction protéique :.....	125
1.3	Western blot :.....	127

2. Localisation cellulaire par imagerie au microscope confocal :.....	127
Chapitre 7 : Réalisation de mutants knock out chez <i>Podospora anserina</i> :.....	129
1. Réalisation de cassettes de délétion par PCR et transformation génétique :	129
1.1 Obtention des cassettes de délétion :.....	129
1.2 Transformation génétique :.....	133
2. Vérification des mutants par PCR :.....	135
2.1 Extraction d'ADNg :.....	135
2.2 PCR :.....	135
2.3 Elimination de mutations génomique et détermination du génotype :.....	137
3. Southern Blotting :.....	137
3.1 Digestion des ADN génomiques :.....	137
3.3 Transfert sur membrane :	139
3.4 Pré-hybridation et hybridation :.....	139
3.5 Marquage et détection.....	141
4. Caractérisation des mutants Knock-out :	141
4.1 Test de croissance en présence de rouge congo et diamide :.....	141
cela, les cultures sont incubées 10 jours à 27 °C.....	141
4.2 Test de fructification sur différentes sources de carbone :.....	143
4.3 Test de croissance sur différentes sources de carbone :.....	143
4.4 Test du phénomène de crippled growth :	143
4.5 Test de croissance en présence d'extractibles de bois et de molécules toxiques :	143
4.6 Test de dégradation du bois :.....	145
4.7 Test de formation des appressorium like :	145
RESULTATS	147

Analyse génomique et protéomique de petites protéines sécrétées (SSP) chez des espèces d'Aspergillus :..... 149

Caractérisation biochimique de SSP1 de P. chrysosporium :..... 161

Approches physiologiques et utilisation d'organismes modèles pour la caractérisation fonctionnelle de SSP1 :..... 195

1. Expression de SSP1 et SSP1trunc chez *S. cerevisiae* :..... 195

Production et caractérisation de mutants délétés pour 2 orthologues de SSP1 chez P. anserina. 197

1. Obtention des mutants knock-out :..... 197

2- Caractérisation des mutants 203

 2.1 Cycle de vie et croissance sur diverses sources carbonées :..... 203

 2.2 Crippled growth :

2.3 Croissance en présence de diverses molécules toxiques :.....	207
2.4 Processus de dégradation du bois :	211
2.5 Croissance sur milieu oxydant ou en présence de molécules déstabilisatrices de la paroi cellulaire :	215
<i>Mise au point de techniques de transformation génétique chez Phanerochaete chrysosporium</i> :	217
1. Tests de différents cocktails enzymatiques pour l'obtention de protoplastes :.....	217
1.1 Digestion enzymatique du mycélium :	221
1.2 Digestion enzymatique de spores :	221
2. Transformation par méthode chimique : utilisation de PolyEthyleneGlycol/CaCl ₂	223
3. Transformation par électroporation :.....	225
4. Adaptation d'une méthode de transformation utilisée chez les plantes : la biolistique :.....	225
5. La lipotransfection une nouvelle méthode de transformation génétique pour les champignons :	227
<i>Etude de l'expression précoce des gènes de P. chrysosporium en contact avec des extractibles de chêne</i>	229
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	267
Apport et limitation de l'utilisation d'organismes modèles :	269
<i>L'expression des fusions SSP1-GFP et SSP1 tronquée-GFP n'a pas pu être confirmée chez la levure S. cerevisiae</i> :	269
<i>L'expression de la protéine SSP1trunc provoque une diminution de croissance chez S. cerevisiae sur milieu oxydant</i> :	271
<i>Utilisation d'un organisme saprophyte coprophile : P. anserina</i>	273
<i>Utilisation d'un système bactérien pour la production de protéine recombinantes : Escherichia coli</i>	275
Limite actuelle du modèle d'étude <i>Phanerochaete chrysosporium</i> :	277
<i>Développement de nouvelles méthodes de transformation génétique de P. chrysosporium</i> :	277
1. La biolistique :	279
2. La lipotransfection :	279
L'apport de la génomique comparative	281
<i>Une organisation génomique particulière : un cluster de gènes codant des enzymes de détoxification impliquant SSP1 chez P. chrysosporium</i>	281
1. Des gènes codant des enzymes de la phase I de détoxification:	283
2. La SSP1 pourrait être impliquée dans des voies de détoxification:.....	283
<i>Les petites protéines sécrétées par P. anserina pourraient être des GAS protéines</i> :	285
L'apport de la biologie structurale :	289

Perspectives à long terme :.....	291
1. Utilisation du système enzymatique des pourritures blanches dans les biotechnologies :	291
1.1 Des enzymes extracellulaires au service de la bioremédiation des sols et des eaux usées :.....	291
1.2 Prétraitement du matériel lignocellulosique, des perspectives biologiques :	293
Conclusion	297
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	299

INTRODUCTION

Notre planète est apparue il y a 4,6 milliards d'années suite à l'explosion d'une étoile rouge géante. Il s'en est suivi une période d'accrétion (4,6 à 3,7 milliards d'années) qui a débouché sur la formation des océans indispensables à la vie dont les premières traces remonteraient à 3,5 milliards d'années. Des formations géologiques de cette époque ont été retrouvées à l'ouest de l'Australie : les stromatolites. Elles sont formées par des colonies d'êtres vivants photosynthétiques appelés les cyanobactéries (Schopf et al., 2002). Ces dernières sont des organismes autotrophes : elles ont la capacité de synthétiser de la matière organique à partir de dioxyde de carbone, d'eau et de lumière ce qui les rend particulièrement adaptées à une atmosphère dépourvue en dioxygène (O₂). Durant 1,1 milliards d'années, ces organismes ont converti le dioxyde de carbone en dioxygène permettant l'accumulation de ce dernier dans l'atmosphère ainsi que la formation de la couche d'ozone. Ces deux événements ont été nécessaires à l'apparition de cellules eucaryotes il y a environ 1,5 milliards d'années. La diversification des cellules eucaryotes a conduit à la formation des trois grands groupes connus que sont les animaux, les plantes et les champignons. L'étape clé de la richesse actuelle est la colonisation du milieu terrestre qui fut possible uniquement grâce à une étroite collaboration entre ces organismes. Les premières diversifications sont apparues bien avant cet événement. En effet il y a environ 1 milliard d'années, des modifications évolutives indépendantes ont provoqué les divisions basales du domaine eucaryotique. Un être unicellulaire aurait donné naissance aux animaux (holozoaires) et aux champignons, mais aussi aux végétaux à la suite d'endosymbiose de cyanobactéries, responsables de la formation de plastides primaires (Berbee et al., 2017; Douzery et al., 2004).

Chapitre 1 : L'histoire évolutive des organismes dégradeurs de biomasse est étroitement liée à l'expansion de la lignée verte :

1. La conquête du milieu terrestre : fruit de l'évolution du mode de nutrition :

1.1 Les premiers champignons, des organismes aquatiques :

Les premiers organismes apparentés au règne fongique ne possédaient pas de paroi chitineuse et étaient majoritairement aquatiques. En l'absence de paroi, les nutriments

transportés par les courants marins étaient absorbés par phagocytose. Ces êtres vivants dits phagotrophes appartiennent majoritairement à deux groupes : les amibes et les forams (Berbee et al., 2017). Parmi ces protistes, certains ont acquis la capacité de former une paroi chitineuse donnant naissance à la première divergence évolutive : les holomycètes (Torruella et al., 2015). Chez certains autres organismes comme les cryptomycètes et les aphélides, la paroi est absente de la phase trophique ce qui pourrait résulter d'une adaptation trophique, en particulier à la vie parasitaire et à la phagotrophie (James and Berbee, 2012). A l'inverse, la présence d'une paroi permanente a conduit les holomycètes à créer de nouvelles structures et un nouveau mode de nutrition nécessaires à la vie terrestre (Berbee et al., 2017).

1.2 La paroi chitineuse, un élément essentiel de la conquête du milieu terrestre :

Il y a environ 750 millions d'années, l'apparition de paroi composée de β -1,3 glucanes, de chitine, de mannanes et de glycoprotéines a conféré aux champignons un avantage évolutif certain. En effet, elle permet de lutter contre les forces de tensions et d'assurer le maintien de l'intégrité structurale des cellules (James and Berbee, 2012). C'est ainsi que de nouvelles organisations cellulaires ont pu voir le jour. Les chytridiomycètes ont développé des radiations anucléées appelées rhizoïdes, tandis que les blastocladiomycètes présentent de véritables hyphes à croissance indéterminée. Ces deux types de structures permettent la colonisation du milieu nutritif et sont essentielles dans les processus de nutrition. Cependant, la présence de cette paroi n'est pas favorable à la phagotrophie. C'est pourquoi, les holomycètes ont développé un nouveau mode de nutrition reposant sur la dissolution des nutriments à l'extérieur de la cellule grâce à la sécrétion d'enzymes à partir de rhizoïdes ou d'hyphes. Les molécules ainsi libérées, de par leur petite taille, peuvent diffuser de manière passive ou active à travers la paroi et la membrane plasmique. Ce mode de nutrition est appelé osmotrophie (Berbee et al., 2017). Parmi les enzymes excrétées, les Carbohydrate-Active enzymes (CAZy) sont abondantes et responsables de l'assimilation des sucres. En particulier, l'accumulation de pectine au sein des parois végétales a engendré la spécialisation du système de sécrétion enzymatique des champignons pour s'adapter à ce substrat. En effet, l'expansion des CAZy est corrélée avec la présence du polymère polysaccharidique chez les végétaux. De plus, les CAZy seraient apparues avant l'émergence des

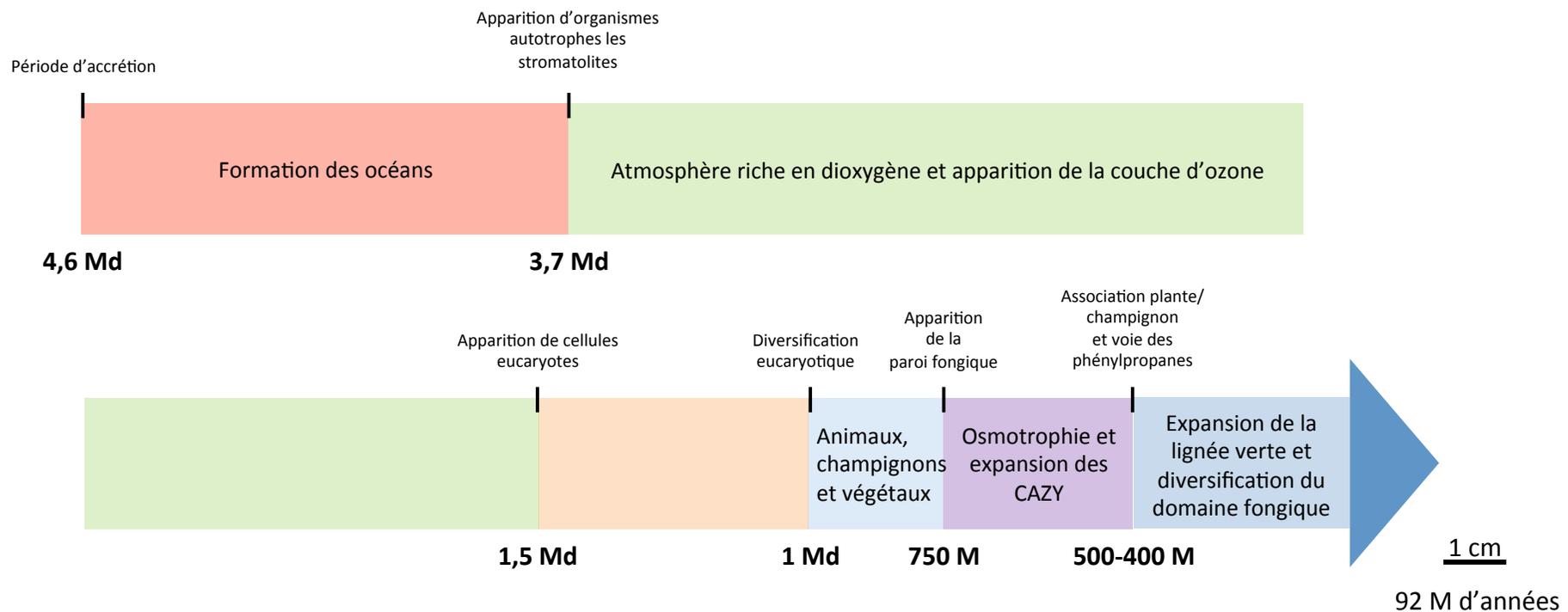


Figure 1 : Evolution et expansion du domaine fongique au cours du temps (adapté de James and Berbee, 2012; Toruellea et al., 2015; Berbee et al., 2017).

Echelle des temps géologiques représentant les étapes majeures de l'évolution, de l'expansion et de la conquête du milieu terrestre par le domaine fongique. Les premiers organismes assimilés aux champignons sont apparus il y a environ 1 milliard d'années puis se sont rapidement adaptés à leur milieu. En effet, il leur aura fallu 250 millions d'années pour modifier leur mode de nutrition et adopter l'osmotrophie qui fait suite à l'apparition de la paroi. En parallèle, l'apparition de la voie des phénylpropanes chez les plantes va permettre une expansion de la lignée verte associée à une diversification du monde fongique qui a commencée il y a 500 millions d'années avec les premières associations plantes/champignons.

chytridiomycètes, peu après l'apparition de la pectine chez les streptophytes il y a 750 millions d'années. C'est pourquoi, l'ancêtre commun des champignons actuels aurait évolué à partir d'un mode de nutrition basé sur la dégradation de la biomasse végétale grâce à ces systèmes enzymatiques. L'apparition de la paroi fongique a donc amorcé le début de la diversité fongique. Cette caractéristique a notamment permis la diversification des chytridiomycètes qui peuvent être associés à des algues aquatiques, à des plantes terrestres et à des spores fongiques et des blastocladiomycètes, qui sont des pathogènes de plantes ou d'algues, des parasites de moustiques ou de moucheron et même des saprotrophes. De plus, sachant que les champignons actuels ont évolué à partir d'un système de nutrition basé sur la dégradation des polymères constituant des plantes, on peut donc imputer leur grande variété à l'expansion du domaine végétal qui a eu lieu pendant 450 à 500 millions d'années (Figure 1).

2. L'expansion de la lignée verte et la colonisation du milieu terrestre.

2.1 Une histoire de mycorhize :

Les végétaux qui ont colonisé les continents dérivent d'un ancêtre commun multicellulaire appartenant à la lignée des charophytes (Martin et al., 2017). Cet événement a eu lieu grâce à la mise en place d'une symbiose avec des champignons appartenant aux *Glomeromycota* il y a environ 400 millions d'années (Bonfante and Genre, 2008; Martin et al., 2017; Wang et al., 2010). Cette datation fut réalisée à partir de fossiles de plantes provenant de roches sédimentaires de Rhynie Chert en Ecosse. Cette symbiose appelée mycorhize arbusculaire est une association entre deux entités eucaryotiques : un champignon biotrophe obligatoire et une plante (Bonfante and Genre, 2008). Elle a pour but d'augmenter l'apport en nutriments de la plante via les hyphes fongiques qui en retour reçoivent les nutriments carbonés nécessaires au cycle de vie du champignon. Les *Glomeromycota* ont évolué au côté des plantes pendant 400 millions d'années, leur permettant la colonisation de la plupart des écosystèmes terrestres (Bonfante and Genre, 2008). Cependant, ce n'est pas le seul mécanisme évolutif ayant abouti à la colonisation du milieu terrestre.

2.2 Le métabolisme des phénylpropanes :

Les plantes terrestres ont dû rapidement s'adapter à de nombreuses contraintes absentes de la vie marine telles que l'absence de protection contre les UV-B, les

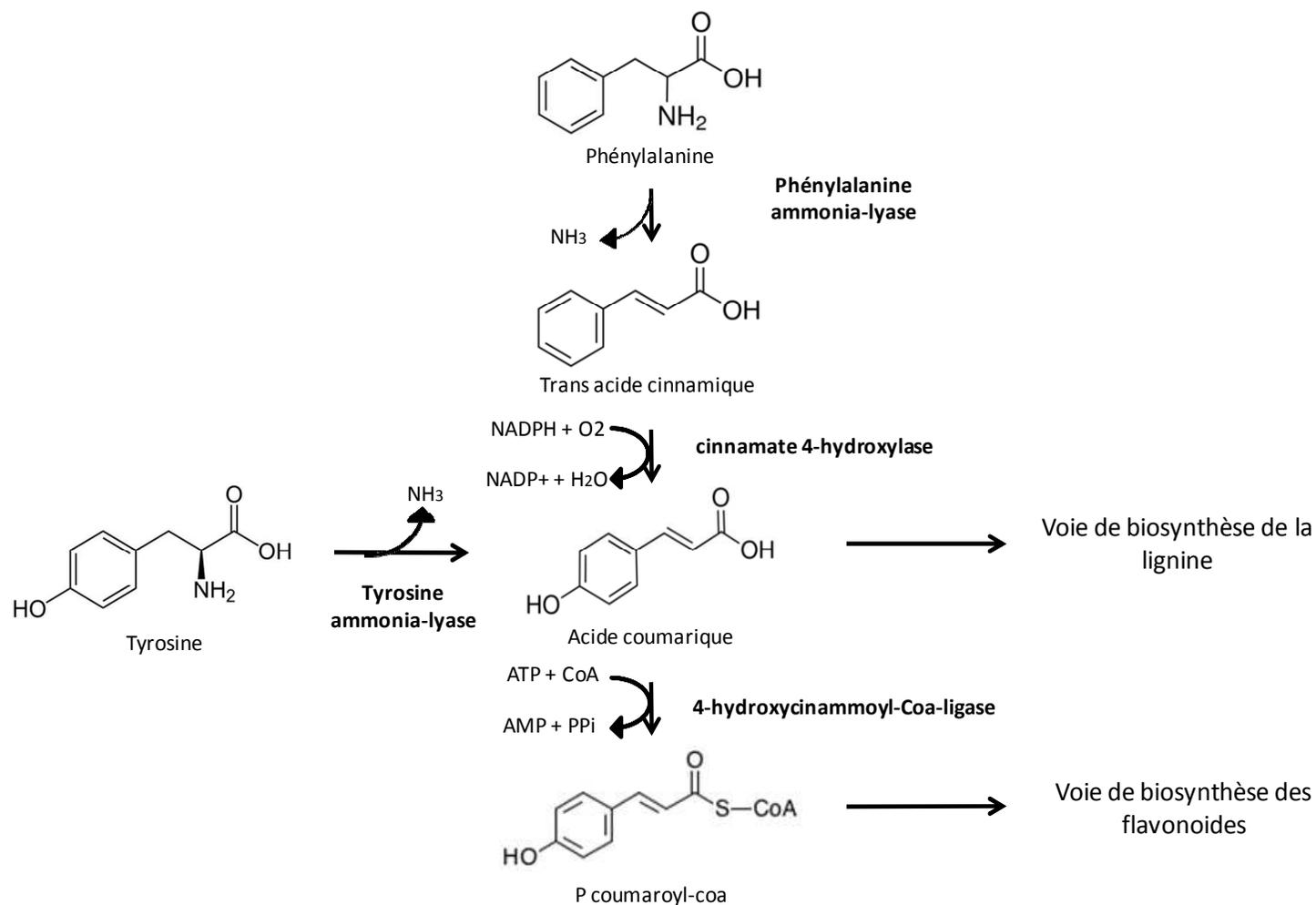


Figure 2: Schéma de la voie des phénylpropanes chez les plantes (adapté de Emiliani et al., 2009; Weng et al., 2008).

Il existe deux entrées possibles dans la voie de biosynthèse des phénylpropanes : tout d'abord la catalyse de la déamination des résidus phénylalanine par la phénylalanine ammonia-lyase suivi de l'hydroxylation de l'acide cinnamique ou la déamination de la tyrosine par la tyrosine ammonia-lyase. Ces deux possibilités aboutissent à la formation d'acide coumarique qui est la molécule précurseur de la voie de biosynthèse de la lignine. Ce dernier peut aussi être pris en charge par la 4-hydroxycinnamoyl-CoA-ligase pour former le précurseur de la voie de biosynthèse des flavonoïdes : le P coumaroyl-CoA.

problèmes de dessiccation, ou encore la nécessité d'avoir des structures de maintien (Weng and Chapple, 2010). Un événement majeur a permis de répondre à toutes ces contraintes : l'apparition de la voie des phénylpropanes. La première fonction reliée à ce métabolisme est la protection des spores contre les radiations des UV-B grâce au dépôt de sporopollenin. Chez les charophytes, sa présence sur la paroi extérieure fait suite à la polymérisation d'acides gras hydroxylés avec des composés phénoliques (Morant et al., 2007). L'étape clé de la complexification de la voie des phénylpropanes est l'acquisition de phénylalanine ammonia-lyase (PAL). Cette dernière se serait faite par transfert horizontal d'une bactérie ou lors de mycorhize avec un champignon. Cette enzyme permet la production de précurseurs de lignine et de flavonoïdes, puisqu'elle catalyse la déamination de résidus phénylalanine (Emiliani et al., 2009). L'acide cinnamique produit est ensuite hydroxylé par la cinnamate 4-hydroxylase afin d'obtenir de l'acide p-coumarique précurseur de lignine. Ce dernier peut être transformé par la 4-hydroxycinnamoyl-Coa-ligase permettant l'entrée dans le métabolisme des flavonoïdes (Weng et al., 2008) (Figure 2).

L'apparition de ce type de molécules a permis l'acquisition de résistance contre les organismes pathogènes, la formation d'un réseau vasculaire transporteur d'eau luttant contre la dessiccation et l'apparition de structure de maintien permettant un important accroissement (Emiliani et al., 2009; Renault et al., 2017; Weng and Chapple, 2010). De plus, la production de flavonoïdes a un rôle essentiel pour la reproduction et la protection contre les UV (pigments), contre l'attaque de microorganismes (phytoalexin, quercétine) et dans la communication entre les plantes et les microorganismes (Emiliani et al., 2009; de Vries et al., 2017). L'évolution de cette voie au sein des streptophytes durant 450 à 500 millions d'années a abouti à la formation de trois embranchements : les bryophytes, les pteridophytes et les spermaphytes (Becker and Marin, 2009). Les deux premiers groupes sont composés respectivement d'environ 15 000 et 12 000 espèces (Dudani et al., 2014; Gradstein et al., 2001). Les spermaphytes se subdivisent en deux grands groupes : les gymnospermes constitués de 1000 espèces colonisant de vastes étendues (Bond, 1989), et les angiospermes dominant actuellement le monde végétal avec environ 300 000 espèces différentes ce qui est plus que tous les autres groupes réunis (Crane et al., 1995).

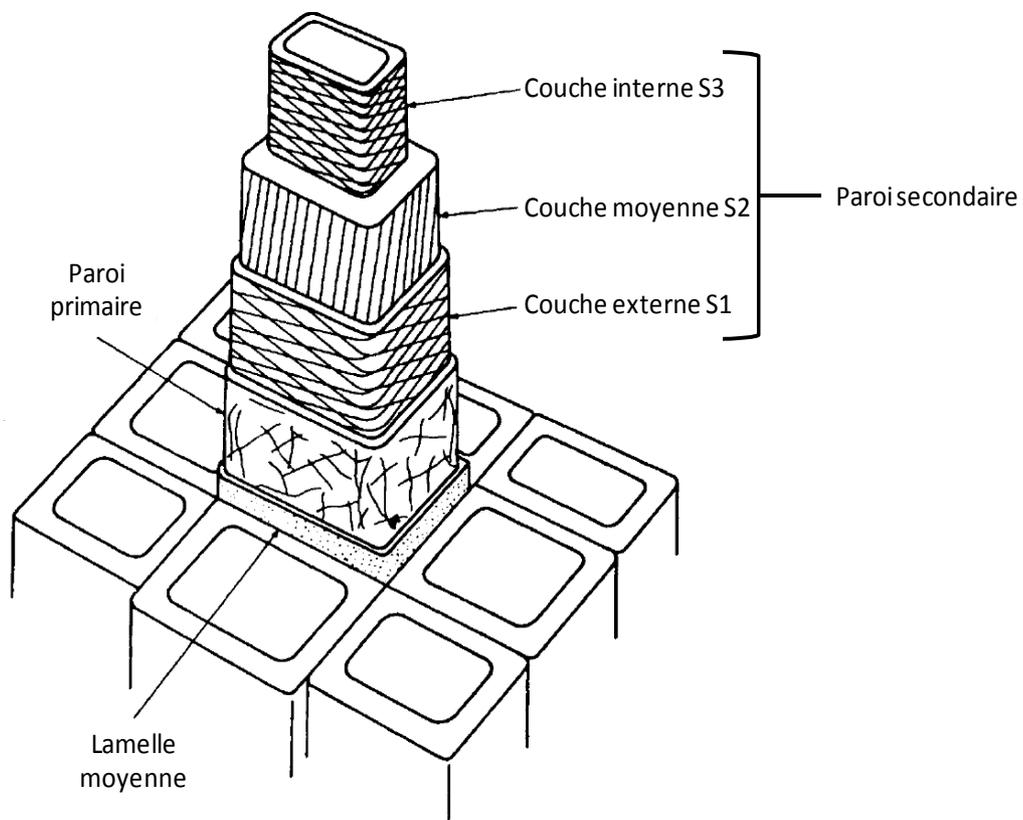


Figure 3 : Schéma de l'organisation des parois d'une cellule végétale lignifiée (Bacic et al., 1988).

Les cellules végétales lignifiées sont constituées de trois grands compartiments : une lamelle moyenne externe, une paroi primaire et une paroi secondaire interne. Cette dernière est elle-même constituée de trois couches : la couche externe S1, moyenne S2 et interne S3.

Chapitre 2 : La composition des bois d'angiospermes et de gymnospermes : différences et similarités

Le développement de la voie des phénylpropanes a ainsi permis la lignification de certains tissus. Chez les spermaphytes actuels, le xylème et le phloème sont des tissus spécialisés dans la conduction des nutriments, de l'eau, des produits de la photosynthèse et des molécules signal. Ils sont constitués entre autres de cellules conductrices mortes dont ne subsistent que les parois épaisses et lignifiées (Li et al., 2001). A contrario, les cellules spécialisées du parenchyme et du collenchyme ne possèdent pas de paroi secondaire et par conséquent pas de lignine (Bacic et al., 1988; Popper, 2008).

1. La paroi cellulaire des tissus lignifiés :

La paroi des cellules lignifiées est constituée de trois principaux polymères : la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Ils s'interconnectent afin de former les organisations tissulaires que sont la lamelle moyenne, la paroi primaire et la paroi secondaire (Figure 3). La paroi primaire est constituée d'un réseau de micro-fibrilles de cellulose maintenu dans une matrice de polysaccharides non cellulosiques et des glycoprotéines (Popper, 2008). L'ensemble est principalement composé de D-glucose, de D-galactose, de D-mannose, de D-xylose, de L-arabinose, de L-fucose, de L-rhamnose et d'acide D-galacturonique. Dans le cadre de la formation du bois, tout ceci s'interconnecte à la pectine et à la lignine. La composition globale du bois varie très peu entre les feuillus et les conifères. Cependant, la quantité de glycoprotéine serait moins importante chez les gymnospermes (Bacic et al., 1988).

La paroi secondaire est plus complexe car elle-même subdivisée en trois parties : la couche externe S1, la couche moyenne S2 et la couche interne S3. Malgré cela, elle est composée d'un socle commun de molécules : le xylan, la cellulose, la lignine, le glucomannane et le galactoglucomannane. Les gymnospermes produisent les deux derniers polysaccharides en grande quantité (12 à 15%) contrairement aux angiospermes (3 à 5 %). La situation s'inverse lorsque l'on regarde la production de 4-O-méthylglucorxylan (Bacic et al., 1988). Cependant, la grande variabilité de la paroi secondaire provient de l'hétérogénéité de la lignine qui est un polymère avec une organisation très complexe.

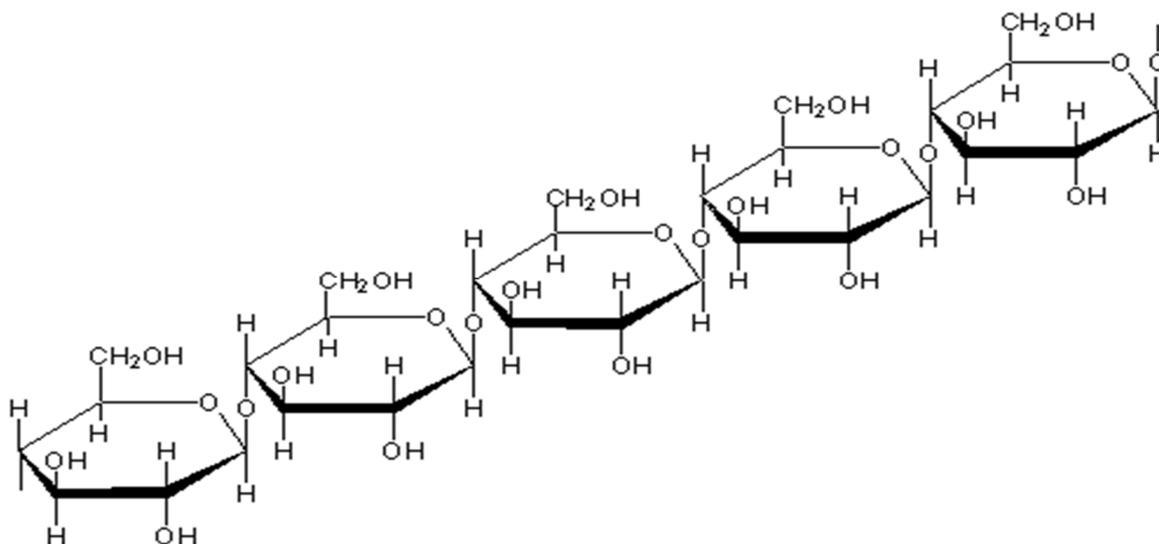


Figure 4 : Schéma représentant une chaîne de cellulose composée de sous unités de glucose liées par des liaisons β -1,4. (<http://www.madsci.org/posts/archives/2005-06/1120022354.Ch.r.html>)

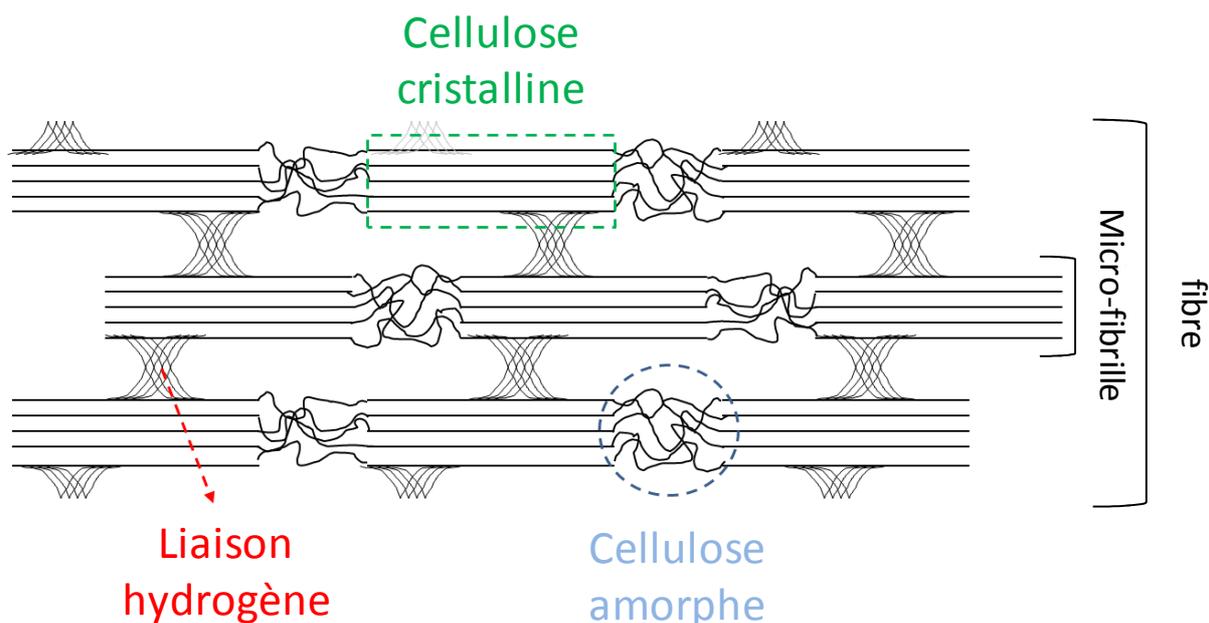


Figure 5 : Schéma représentant l'organisation d'une fibre de cellulose (Börjesson et al., 2015).

Il existe différents états de la cellulose : la cellulose amorphe correspond à un enchevêtrement désorganisé (en bleu). A l'inverse lorsque le polymère est ordonné on dit qu'il se trouve sous la forme cristalline (en vert). Ces deux états peuvent être observés au sein de micro-fibrilles. L'interconnection de ces dernières par des liaisons hydrogènes (en rouge) permet la formation de fibres de cellulose.

1.1 La cellulose :

La cellulose produite par les végétaux se compose uniquement de monomères de glucose assemblés entre eux par des liaisons β -1,4 (Figure 4). Les fibres acquièrent leurs propriétés lorsqu'elles sont constituées de 8 monomères. En effet, à ce stade, les chaînes de glucose deviennent insolubles et s'assemblent. La taille finale d'une chaîne de cellulose dépend de sa localisation. La cellulose de la paroi primaire est formée de 8 000 unités de glucose tandis que celle de la paroi secondaire contient 15 000 sous unités (Brown, 2004). La cellulose native peut se trouver sous deux formes cristallines : la cellulose I et la cellulose II. Ces dernières divergent uniquement au niveau de l'orientation des chaînes de glucanes qui sont disposées de façon parallèle pour la cellulose I et antiparallèle pour la cellulose II (Kuga and Malcolm Brown, 1988). Bien que la cellulose de type II soit thermodynamiquement plus stable que celle de type I, on la retrouve uniquement chez quelques algues et bactéries (Canale-Parola, 1970). Les cellules du bois présentent donc une cellulose de type I (Figure 5).

1.2 L'hémicellulose :

Historiquement, hémicellulose est le terme utilisé pour désigner les polysaccharides non cellulosiques qui sont extraits de la paroi à l'aide d'agents alcalins. La masse sèche de cette dernière est composée par environ 30 % de ces sucres (Pauly et al., 2013). Les hémicelluloses sont des polymères constitués d'un mélange de monosaccharides comprenant : du glucose, du mannose, du galactose, des xyloses, de l'arabinose, du rhamnose et de résidus acides comme l'acide galacturonique et l'acide 4-O-méthylglucuronique (Pettersen, 1984) (Figure 6).

1.3 La lignine :

La lignine est un hétéropolymère composé de sous unités phénylpropanes : l'alcool p-coumarylique (H), l'alcool coniférylique (G) et l'alcool sinapylique (S) (Figure 7).

1.3.1 Voie de synthèse :

L'initialisation de la synthèse de la lignine nécessite l'intervention de plusieurs voies métaboliques se trouvant dans divers compartiments cellulaires (Mottiar et al., 2016).

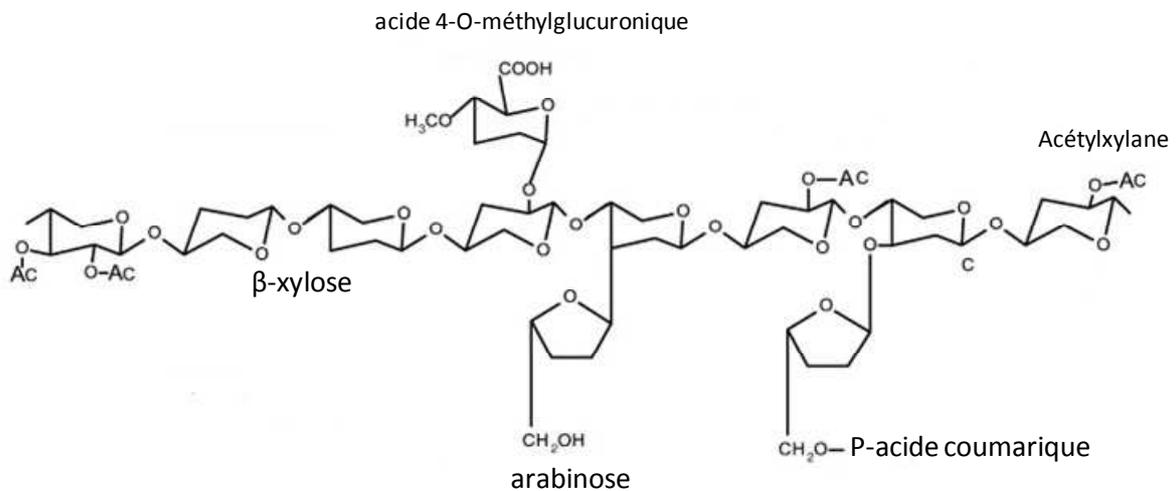


Figure 6 : Schéma partiel de la composition d'un polymère d'hémicellulose.

Contrairement à la cellulose, les hémicelluloses sont des polymères dont la structure se compose d'hétéropolysaccharides pouvant présenter des ramifications. Ce schéma représente de façon partielle la composition de ce polymère permettant d'avoir un aperçu des différents sucres présents tels que des xyloses, de l'arabinose, de l'acide coumarique, de l'acide 4-o-méthylglucuronique et des acétylations.

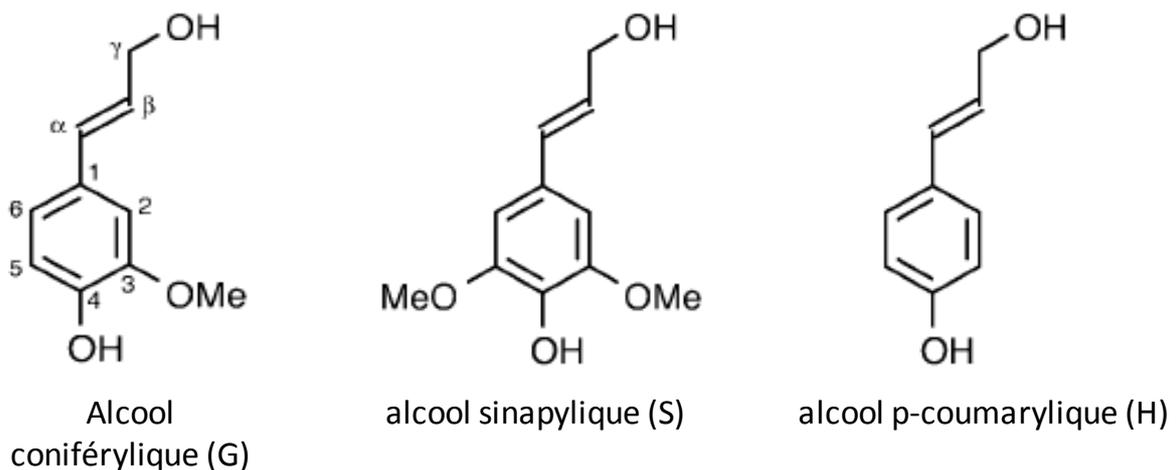


Figure 7 : Structure des trois unités de base de la lignine (Ralph et al., 2004).

Les sous unités constituant la lignine sont toutes composées d'un cycle aromatique phénolique dont le groupement hydroxyle est associé en para avec un alcool. La structure de l'alcool coniférylique et de l'alcool sinapylique dérive de celle de l'alcool p-coumarylique puisqu'elles présentent des O-méthylations sur les positions 3 et 5.

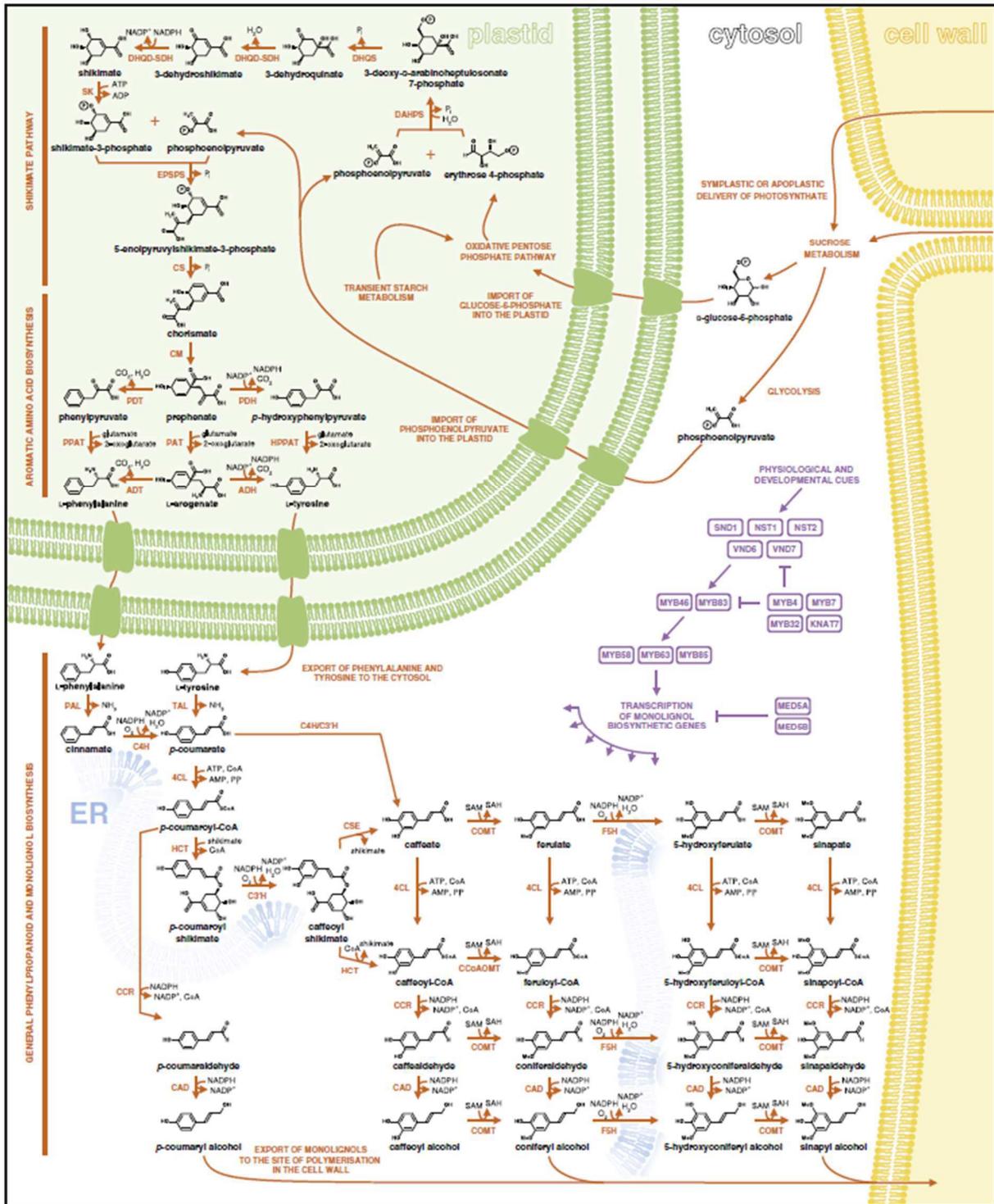


Figure 8 : Schéma récapitulatif de toutes les étapes de la synthèse de la lignine (Mottiar et al., 2016).

La synthèse de la lignine commence dans le plaste avec la voie du shikimate permettant la formation de précurseurs entrant dans la voie de biosynthèse de la phénylalanine et de la tyrosine. Ces deux résidus sont ensuite transférés dans le cytosol en tant qu'initiateur de la voie des phénylpropanes conduisant à la synthèse des précurseurs de lignine. Ces derniers seront ensuite polymérisés au sein de la paroi cellulaire afin d'obtenir la lignine

Les étapes préliminaires ou voie du shikimate se déroulent dans le chloroplaste et permettent la production de chorismate : une molécule précurseur de phénylalanine et de tyrosine. Ces deux acides aminés, une fois synthétisés, sont transportés dans le cytosol et intégrés dans la voie de biosynthèse des phénylpropanes. Cette dernière est composée d'un cluster de 8 enzymes nécessaires à la synthèse de tous les précurseurs de la lignine : la CAD ((hydroxy) cinnamyl alcohol dehydrogenase), la CCoAMT (caffeoyl-coA O-methyltransferase), la CCR ((hydroxy) cinnamoyl-coA reductase), la C3'H (p-coumaroyl shikimate 3'-hydroxylase), la C4H (cinnamate 4-hydroxylase), la 4CL (4-hydroxycinnamoyl-coA ligase), la COMT (caffeic acid O-methyltransferase), la F5H (ferulic acid/coniferaldehyde/coniferyl alcohol 5-hydroxylase), la HCT (hydroxycinnamoyl-coA synthase) et la PAL (phenylalanine ammonia-lyase) (Weng and Chapple, 2010) (Figure 8).

1.3.2 Les différences entre les feuillus et les conifères :

Les spermaphytes possèdent tous la voie de biosynthèse des résidus guaiacyls (G) dont l'enzyme clé la caffeoyl-coA O-methyltransferase est hautement conservée. Elle catalyse la méthylation du cycle en 3' et permet la synthèse d'un intermédiaire conduisant à la formation de coniferaldehyde précurseur des sous unités G (Li et al., 2000). Chez les angiospermes, une divergence évolutive récente auraient permis l'acquisition d'une nouvelle O-methyltransferase jouant un rôle essentiel dans la production de résidus syringyl (S) : la 5-hydroxyconiferaldehyde O-méthyltransférase (aldOMT). La voie de biosynthèse spécifique aux angiospermes débute à partir du coniferaldehyde modifié grâce à l'action combinée de deux enzymes que sont : la 5-hydroxyconiferaldehyde (CAld5H) et la aldOMT. Leur activité permet la production de synapaldéhyde qui est converti en alcool synapylique (produit final et précurseur de lignine) par la synapyl alcohol dehydrogenase (SAD) (Li et al., 2001). Ceci explique la présence des sous unités G et H chez les conifères et des trois sous unités G, H et S chez les feuillus. L'impact des sous unités synapyl se mesure au niveau structural mais aussi au niveau des propriétés physiques. En effet, ce monolignol est plus fortement méthylé que les autres ce qui provoque une forte diminution de liaisons 5-5 et de dibenzodioxine. L'absence de ces structures confère une forme plus linéaire à la lignine de feuillus (Zakzeski et al., 2010). (Figure 9 et 10). De plus, la présence de groupements méthylés la rend plus résistante à divers stress environnementaux.

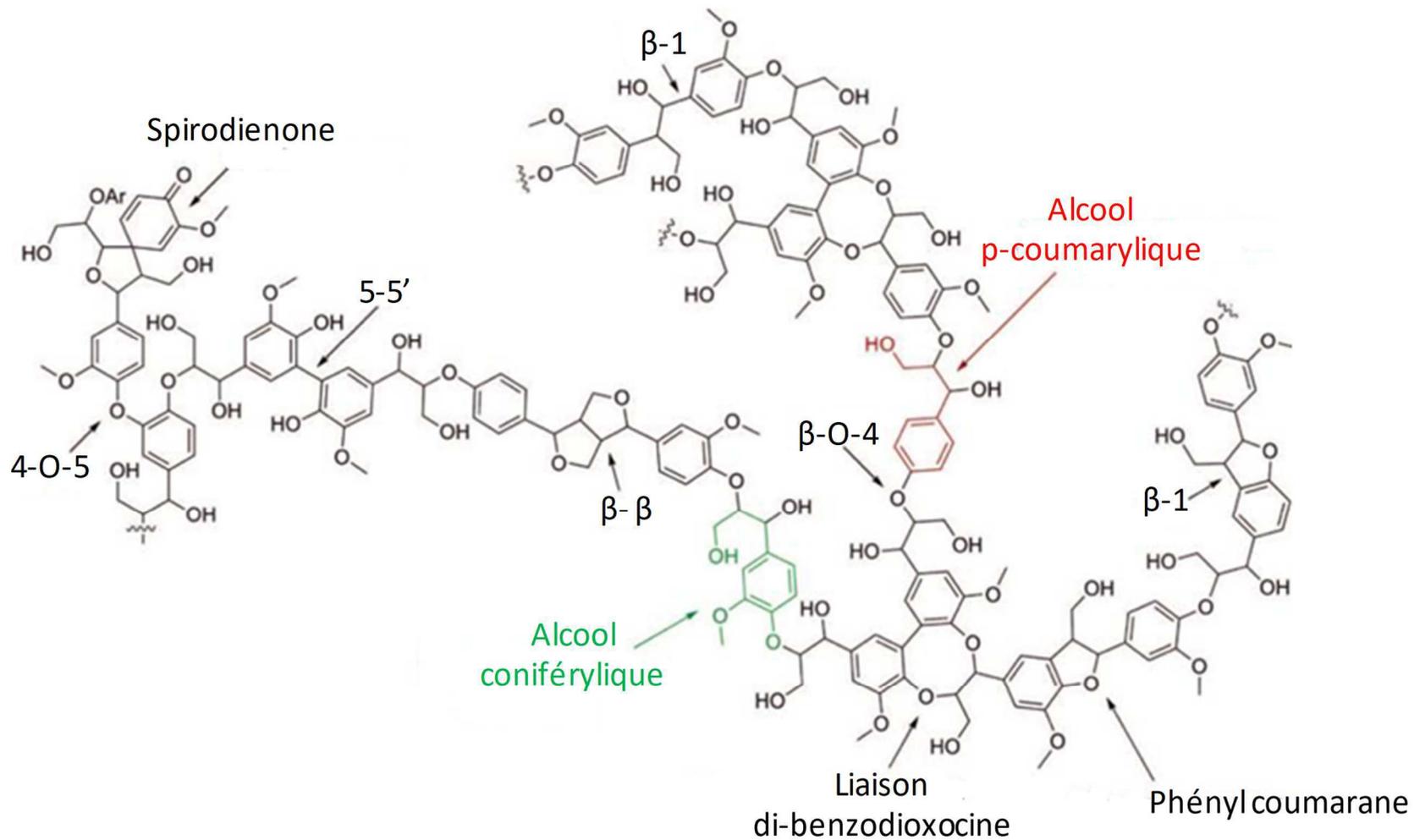


Figure 9 : Schéma de la structure partielle de lignine de conifères (Zakzeski et al., 2010).

Le polymère ligneux des conifères est constitué de sous unités coniféryliques et coumaryliques respectivement peu et pas méthylées. Ceci permet la formation de liaisons de type di-benzodioxocine et 5-5 provoquant une importante ramification de la structure chez les conifères.

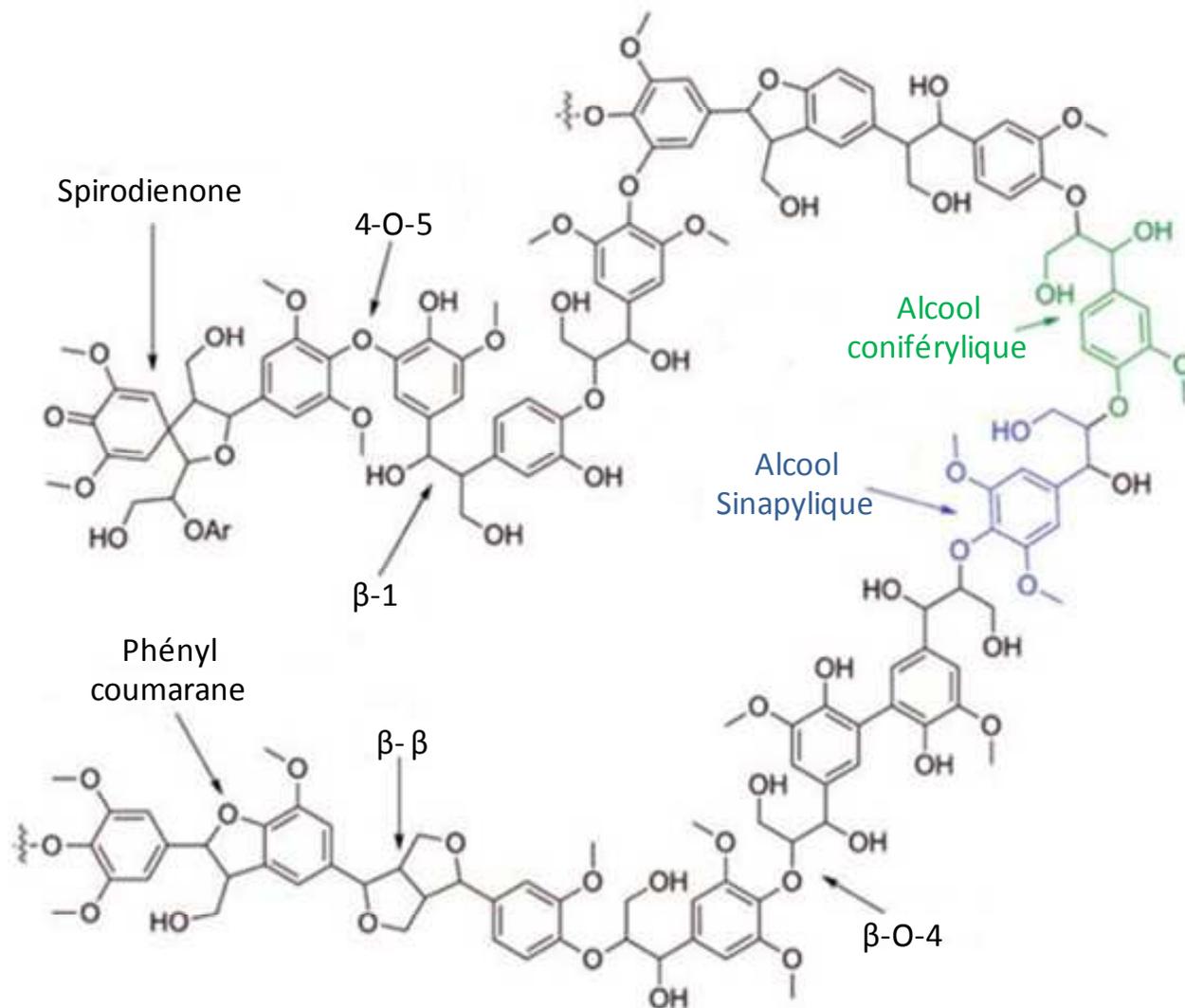


Figure 10 : Schéma de la structure partielle de lignine de feuillus (Zakzeski et al., 2010).

Chez les feuillus, la présence de sous unités sinapyliques fortement méthylées au sein du polymère ligneux provoque une très forte diminution des liaisons de type 5-5 et di-benzodioxine. C'est pourquoi, la structure globale du polymère adopte une conformation linéaire non ramifiée

2. Les extractibles :

Les extractibles sont des molécules de faible poids moléculaire qui confèrent de nombreuses caractéristiques au bois comme sa couleur, son odeur, sa durabilité ou encore sa résistance à la lumière. Les extractibles primaires (sucres, graisses et protéines) sont présents dans l'aubier et jouent le rôle de molécules intermédiaires du métabolisme secondaire. Les extractibles secondaires se situent dans le duramen et exhibent une grande variété de molécules comprenant des alcaloïdes, des quinones, des graisses, des huiles, des saponines, des terpènes, des tropolones, des cires et un grand nombre de composés aromatiques et phénoliques (stilbènes, flavonoïdes, tannins...) (Windeisen and Wegener, 2009). Les extractibles sont présents dans tous les tissus du bois, cependant leur composition chimique dépend de leur localisation au sein de la plante, créant ainsi une variabilité moléculaire tissulaire. En particulier, les nœuds du bois, qui sont des zones de blessure, sont riches en extractibles à la fois en terme de quantité et de variabilité assurant ainsi une protection accrue contre les agressions extérieures au niveau de ces zones fragilisées. Chez les gymnospermes, les lignanes sont majoritaires tandis que chez les angiospermes se sont principalement des sucres accompagnés de flavonoïdes et de tannins (Kebbi-Benkeder et al., 2015). Les extractibles représentent environ 4 à 10 % de la masse sèche du bois des essences sous les climats tempérés, et peuvent atteindre jusqu'à 20 % chez des espèces tropicales (Telmo and Lousada, 2011).

Chapitre 3 : Les champignons dégradeurs de biomasse

Les vastes zones forestières formées par les spermaphytes représentent un important réservoir naturel de carbone. A la mort de la plante, les tissus lignifiés vont se décomposer très lentement entraînant une séquestration du carbone pendant de nombreuses années. La diversité des champignons dégradeurs de biomasse végétale est un reflet de l'histoire évolutive des plantes terrestres. En effet, les différentes stratégies de décomposition de cette biomasse sont apparues au cours du temps et font écho à la diversification des structures cellulaires et des mécanismes de défense des plantes. C'est pourquoi, des organismes fongiques se sont spécialisés dans le recyclage de ce dernier : les champignons saprophytes. Sous l'action de ces derniers, 85 milliards de tonnes de

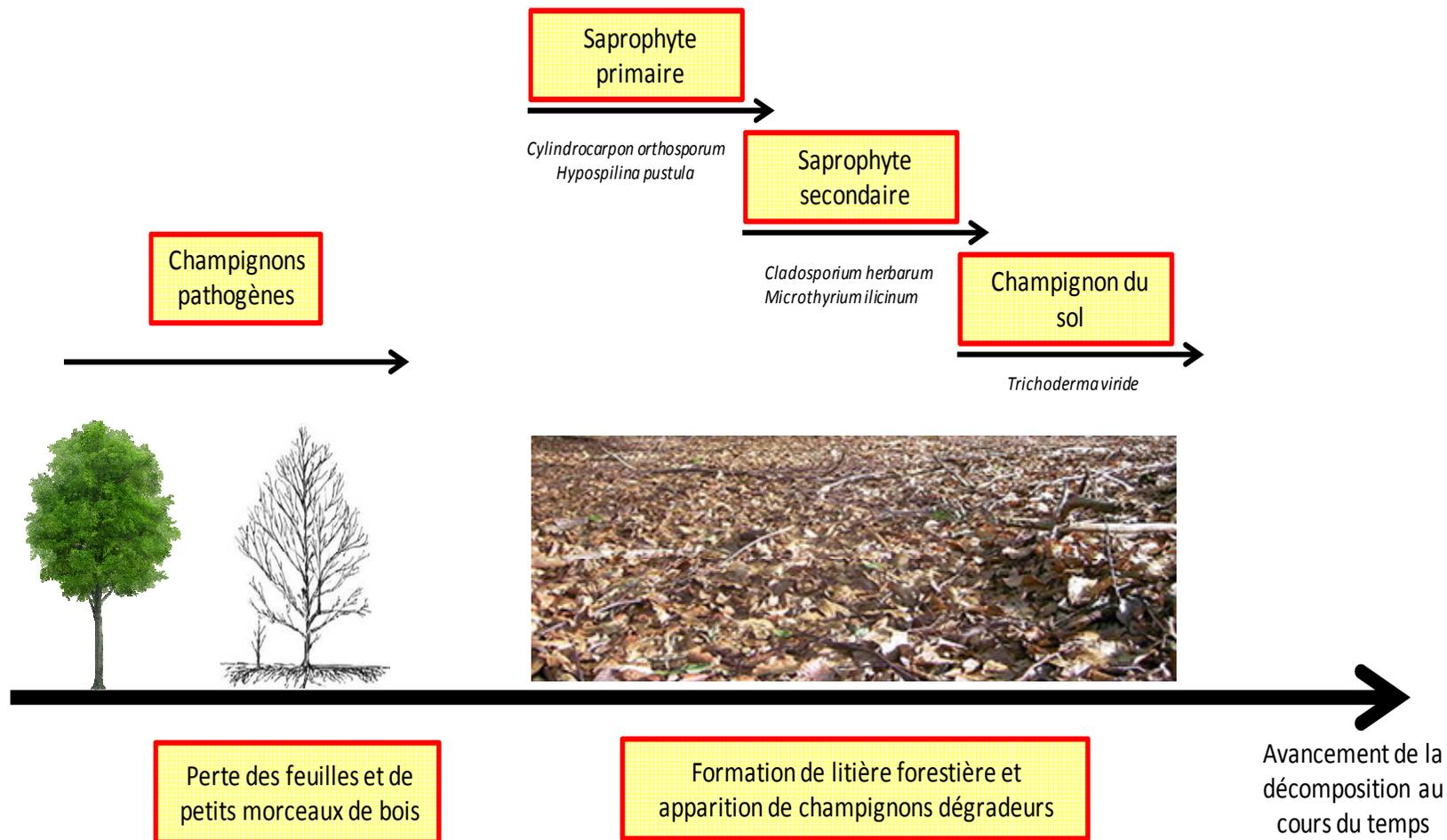


Figure 11 : Colonisation de la litière au cours du temps par les champignons dégradateurs (adapté de Frankland et al., 1998).

La colonisation de la litière au cours du temps est régie par une succession d'étapes faisant intervenir différents types d'organismes. La première vague correspond à l'attaque d'une plante par un champignon pathogène affaiblissant cette dernière et provoquant une perte de feuilles ainsi qu'une accumulation de petits morceaux de bois sur le sol. Il s'en suit alors une colonisation par des saprophytes primaires, secondaires et des champignons du sol provoquant une complète décomposition de la litière au cours du temps.

CO₂ seraient émises par an, faisant d'eux des acteurs majeurs du cycle du carbone (Espagne et al., 2008). On les retrouve chez les ascomycètes considérés comme le plus grand phylum du règne fongique avec 64 000 espèces connues et chez les basidiomycètes un phylum de 30 000 espèces (Ashton, 2009; Kantvilas, 2003). Ils se subdivisent en cinq mode de vie différents : les décomposeurs de litière, les pourritures molles, les pourritures brunes, les pourritures blanches et les coprophiles.

1. Les décomposeurs de litière :

La décomposition biologique de la litière joue un rôle important dans le cycle du carbone au sein des écosystèmes. Les champignons qui représentent plus de 90 % de la respiration des organismes du sol en sont les principaux acteurs (Osono, 2007). De nombreuses études ont permis d'isoler des espèces appartenant essentiellement aux ascomycètes et aux basidiomycètes, phyla regroupant des espèces capables de dégrader la lignocellulose composant majeur de la litière (Baldrian et al., 2011; Purahong et al., 2016). La colonisation de la litière par les champignons se fait par vagues successives d'espèces définies par le type de substrat rencontré : les saprotrophes primaires (*Cylindrocarpon orthosporum*, *Hypospilina pustula* par exemple) les saprotrophes secondaires (*Cladosporium herbarum*, *Microthyrium ilicinum* par exemple) et les champignons du sol (*Trichoderma viride*) (Frankland, 1998) (Figure 11). En effet, au cours du temps, l'occurrence des ascomycètes au sein de la litière de *Quercus petraea* diminue progressivement pour laisser place aux basidiomycètes (Voříšková and Baldrian, 2013). De plus, les paramètres environnementaux (ratio C/N, macronutriments, micronutriments, contenu en eau ou pH) ont un impact important sur la communauté fongique (Purahong et al., 2016). De par leur activité de dégradation du matériel lignocellulosique, les champignons saprophytes de litière contrôlent le ratio C/N au cours du temps. En effet, la minéralisation du carbone provoque une diminution de ce ratio qui se stabilise par la suite (Šnajdr et al., 2011).

2. Les pourritures molles :

Les pourritures molles, appartenant aux ascomycètes, sont des espèces très répandues car elles tolèrent de nombreuses conditions environnementales. En effet, elles ne sont ni affectées par d'extrêmes sécheresses ni par des taux d'humidité élevés.

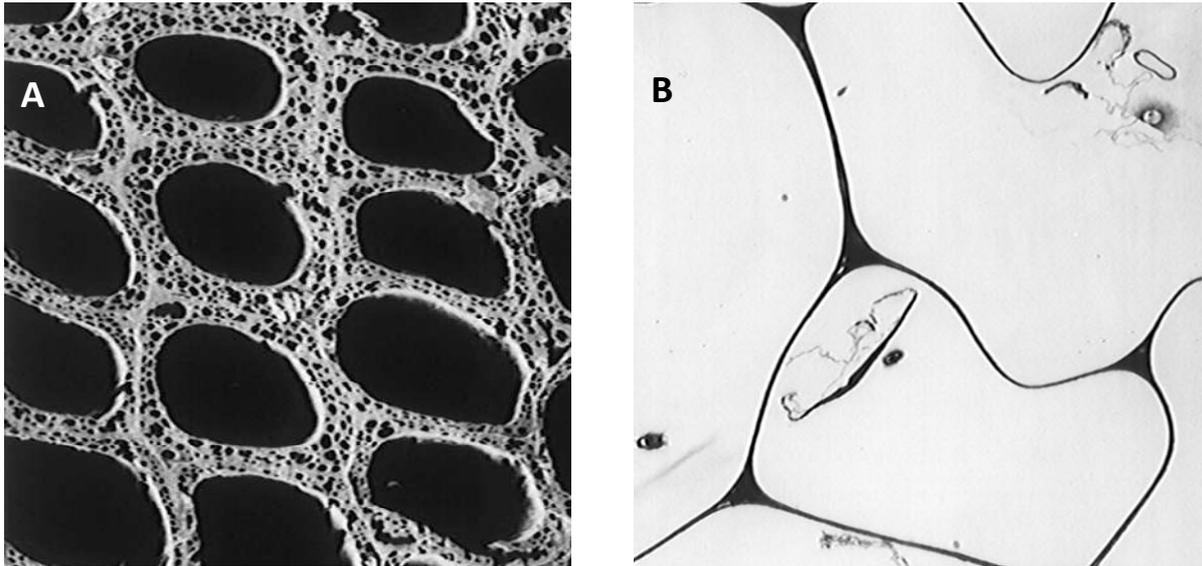


Figure 12 : Image de microscopie représentant les différents modes d'attaque des pourritures molles (Blanchette et al., 2000).

Développement fongique d'une pourriture molle de type I le long des microfibrilles de cellulose provoquant l'apparition de cavités au sein de la paroi cellulaire sans modification de la lamelle moyenne (A). Développement fongique d'une pourriture molle de type II au sein de la paroi cellulaire provoquant l'érosion complète de cette dernière sans modifier la lamelle moyenne (B).



Figure 13 : Photographie de la colonisation d'un excrément par des champignons coprophiles.

De plus, ces organismes s'adaptent à de larges gammes de température et de pH (Blanchette et al., 2004; Filley et al., 2001; Hamed, 2013). Les pourritures molles pourraient donc se développer dans des conditions difficiles, là où la croissance des pourritures blanches ou brunes est inhibée. Les champignons de pourriture molle sont capables de dégrader la cellulose et l'hémicellulose, tandis que la lignine est juste modifiée et non minéralisée (Hamed, 2013; Popescu et al., 2011). Ils provoquent une pourriture caractéristique formant des cavités dans les parois cellulaires du bois. Le champignon se développe le long des microfibrilles de cellulose présentes au sein de la paroi sans attaquer la lamelle moyenne : ce sont les pourritures molles de type I. D'autres organismes traversent la paroi cellulaire de la lumière vers la lamelle moyenne tout en provoquant son érosion : ce sont les pourritures molles de type II (Blanchette, 2000; Hamed, 2013; Popescu et al., 2011; Skyba et al., 2008) (Figure 12). Le mode d'attaque des pourritures molles n'est pas caractéristique d'une essence de bois particulière. En effet, *Aspergillus niger* provoque des dégradations de type I et II chez le pin (gymnosperme) et chez l'érable (angiosperme), tandis que *Penicillium chrysogenum* provoque une pourriture de type II chez ces deux espèces de bois (Hamed, 2013). De par leur capacité préférentielle de dégradation de la cellulose et de l'hémicellulose, ces organismes jouent un rôle important dans la diminution du ratio C/N au cours du temps.

3. Les coprophiles :

Les champignons coprophiles sont des organismes adaptés aux excréments d'herbivores qui sont des écosystèmes présentant de la matière organique végétale non digérée. Cette dernière est une importante source de nutriments pour ces espèces saprophytes. L'incroyable diversité de ces organismes est soulignée par le fait qu'ils peuvent appartenir aux basidiomycètes, aux ascomycètes ou aux zygomycètes (Richardson, 2001). Malgré qu'ils soient cosmopolites, on les retrouve principalement en Europe, en Amérique du nord et dans les pays néo-tropicaux (Calaça and Xavier-Santos, 2016) (Figure 13). Bien que la structure des excréments soit dépendante de l'espèce d'herbivore, la colonisation des excréments par les champignons se fait suivant un schéma bien précis : tout d'abord l'apparition d'ascomycètes ayant un cycle de vie court nécessitant peu de cellulose, puis des ascomycètes avec un cycle de vie plus long utilisant la cellulose restante et enfin des basidiomycètes permettant la digestion de la lignine et de la cellulose associée (Wicklow et al., 1980).



Figure 14 : Photographie de Thomas Reich (WSL) représentant l'action caractéristique des pourritures brunes sur le bois.

4. Les pourritures brunes :

Les pourritures brunes sont certainement les agents de dégradation de la biomasse végétale les plus répandus au sein des forêts de gymnospermes. Ils provoquent une très rapide dépolymérisation de la matière cellulosique ainsi qu'une modification chimique des résidus ligneux (déméthylation, déalkylation ou déméthoxyacétylation). Les processus employés permettent donc une métabolisation rapide des polysaccharides tout en laissant la structure ligneuse quasiment intacte puisque très peu modifiée. Ceci provoque l'apparition de petits cubes friables de couleur brune caractéristique de ce type de pourriture (Figure 14). Lors d'une attaque du bois par ces organismes, une première étape de colonisation est réalisée par expansion mycélienne en direction des stocks de polysaccharides du parenchyme via la lumière cellulaire. Une fois ces ressources nutritives atteintes, le champignon dispose de suffisamment d'énergie pour pénétrer dans la lumière des cellules trachéides et ainsi proliférer (Daniel, 1994). Le maintien des hyphes fongiques à la couche interne de la paroi cellulaire (S3) se fait grâce à la sécrétion de polysaccharides (Goodell, 2003). Suite à cela et ce jusqu'à la fin de la dégradation, le champignon reste attaché à la partie S3 tout en dégradant la couche moyenne (S2) pauvre en lignine (Sachs et al., 1963).

La métabolisation par les pourritures brunes des polysaccharides présents dans le bois fait appel à un système enzymatique extracellulaire. En effet, ils sont capables de sécréter des endoglucanases et des β -glucosidases catalysant respectivement le clivage des liaisons β -1,4 des polymères de glucose et de la cellobiose en β -D glucose. De plus, chez certains organismes, furent isolées des enzymes telles que des cellobiose déshydrogénases ou des cellobiose hydrolases. Il existe aussi des enzymes actives sur des galactomannanes, des glucomannanes et des xyloses (et ses dérivés) (Goodell, 2003). Cependant, ce système enzymatique ne peut agir seul puisque les enzymes connues ont une taille moléculaire trop importante pour diffuser au sein de la paroi cellulaire. C'est pourquoi, les pourritures brunes sécrètent des petites molécules dont l'action synergique va permettre à terme une dépolymérisation oxydative de la biomasse lignocellulosique et donc l'ouverture des pores cellulaires. Tout d'abord, le champignon sécrète une grande quantité d'acide oxalique entraînant une forte acidification du milieu jusqu'à des valeurs pouvant atteindre 1,6. Dans ces conditions, l'acide oxalique est capable de se lier au Fe^{3+} (solubilisation de $[\text{Fe}^{3+} \text{ oxyhydroxide}]$) pour former un complexe diffusant au sein de la paroi végétale.

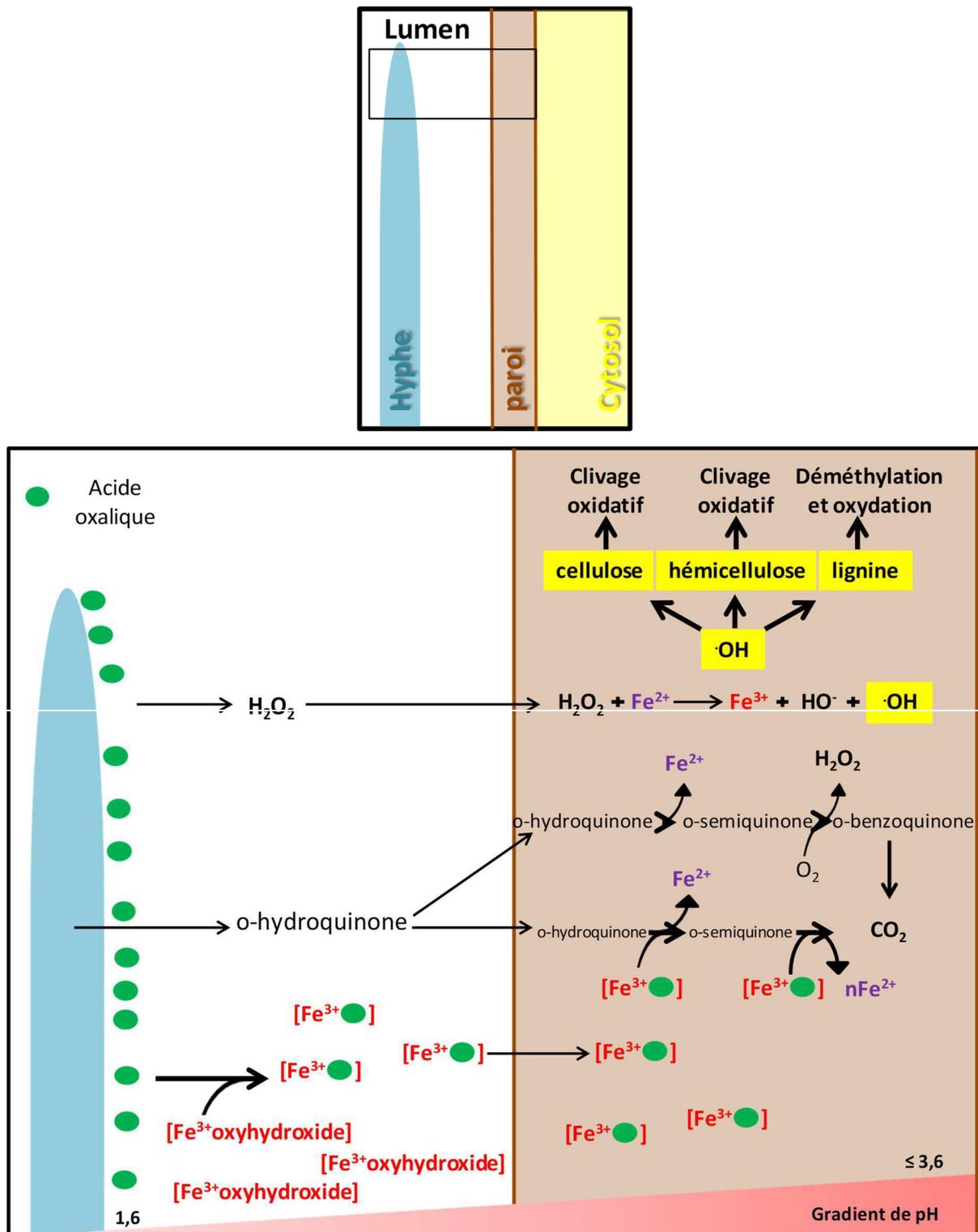


Figure 15 : Schéma des mécanismes oxydatifs de dégradation de la biomasse lignocellulosique chez les pourritures brunes (adapté de Goodell, 2003; Arantes et al., 2012).

Les hyphes fongiques sécrètent de l'acide oxalique afin de diminuer le pH favorisant ainsi la formation de complexe [oxalate- Fe^{3+}]. Ce complexe diffuse ensuite au sein de la paroi cellulaire des tissus lignifiés où il va être réduit par l'action d'une o-hydroquinone provoquant la libération de Fe^{2+} . En parallèle, les hyphes sécrètent aussi du peroxyde d'hydrogène qui va interagir avec le Fe^{2+} pour donner des radicaux hydroxyles qui vont cliver la cellulose et l'hémicellulose et modifier chimiquement la lignine

Au sein de ce compartiment, le pH augmente pour atteindre une valeur minimale de 3,6. Ceci est dû à l'effet tampon de la biomasse lignocellulosique et à la diminution de la concentration en acide. Dans ces conditions, les quinones sécrétées par le champignon et qui ont diffusé au sein de la paroi peuvent ainsi réduire le Fe^{3+} du complexe [oxalate- Fe^{3+}] en Fe^{2+} . De plus, la semi-quinone formée a la possibilité de produire du peroxyde d'hydrogène via ses radicaux et une molécule de dioxygène. Il y a alors au sein de la paroi les deux réactifs de la réaction de Fenton permettant la production d'anion hydroxyle. De plus, le champignon alimente directement cette réaction par la sécrétion d' H_2O_2 . Par conséquent, l'augmentation de la concentration d'anion hydroxyle va engendrer un fort clivage oxydatif de la cellulose, de l'hémicellulose et une déméthylation/oxydation de la lignine (Arantes et al., 2012) (Figure 15).

5. Les pourritures blanches :

Les pourritures blanches sont des champignons saprotrophes capables de dégrader tous les composants du bois incluant les polysaccharides et la lignine. Toutes les espèces apparentées appartiennent à l'embranchement des Agaricomycotina. Cependant, ce groupe n'est pas uniquement composé de pourritures blanches. En effet, au cours de l'histoire évolutive, des événements de pertes de gènes ont entraîné la disparition des mécanismes nécessaires à la dégradation de la lignine provoquant l'émergence de nouveaux modes de vie comme les symbioses mycorhiziennes (Floudas et al., 2012). Les pourritures blanches ont été intensément étudiées ces dernières décennies car ce sont les seuls organismes fongiques à posséder la capacité de dégrader la lignine via la sécrétion d'enzymes extracellulaires (Figure 16).

La colonisation du milieu et l'activité de dégradation de ces organismes sont liées au ratio C/N du substrat. En effet, lorsque l'environnement présente une forte disponibilité en carbone associée à une faible proportion d'azote, l'activité lignolytique des pourritures blanches est élevée. A l'inverse, la diminution du ratio C/N via l'augmentation de la disponibilité d'azote provoque une chute de l'activité des phénols oxydases spécifiques des pourritures blanches. Par conséquent, la disponibilité des ressources azotées pourrait impacter la diversité et la présence de ce type de champignons au sein d'un écosystème donné (Carreiro et al., 2000).



Figure 16 : Image représentant l'action caractéristique des pourritures blanches sur le bois.

Le bois se décompose formant des fibres blanches suite à la dégradation de la lignine, de la cellulose et de l'hémicellulose, provoquant une perte de résistance mécanique.

Chapitre 4 : Mécanismes de dégradation des pourritures blanches :

1. *Phanerochaete chrysosporium* une pourriture blanche modèle :

Le genre *Phanerochaete* est composé de plus de 90 espèces morphologiquement hétérogènes. La variabilité phénotypique se traduit notamment au niveau de l'hyménium pouvant être plus ou moins lisse ou tuberculeuse, la morphologie des hyphes, des basides, des basidiospores (De Koker et al., 2003; Wu, 1998). L'espèce *Phanerochaete chrysosporium* exhibe un cycle de vie particulièrement peu courant au sein du groupe des pourritures blanches, puisqu'elle est présente principalement à l'état anamorphe (formation de conidie) dans des conditions de laboratoire. Cependant, il est possible d'observer l'apparition de l'état téléomorphe *in vitro* mais conduisant seulement à la production de structure stérile appelée cystidium (Burdall, 1998). Comme toutes les pourritures blanches, *P. chrysosporium* fait partie des basidiomycètes, il possède un optimal de température de 40°C lui permettant de croître dans des écosystèmes en décomposition au sein des forêts tempérées de l'Amérique du nord, de l'Europe et de l'Iran (Singh and Chen, 2008). Cette espèce fut longuement étudiée pour ses capacités à sécréter des métabolites secondaires pouvant être utilisés dans le domaine pharmaceutique, mais aussi pour ses enzymes présentant un intérêt biotechnologique dans les secteurs de la bio-remédiation des sols et de la transformation du bois. De plus, son génome a été le premier génome de basidiomycète à être séquencé en 2004 (Martinez et al., 2004). La dernière version de l'analyse de ce génome (v3.0) indique une taille du génome de 35,15 Mbp et une prédiction de 13602 gènes.

2. Système enzymatique de dégradation de la lignine :

Le système enzymatique nécessaire à la dégradation de la lignine se subdivise en deux parties, l'une contenant les enzymes directement impliquées dans le processus et l'autre faisant intervenir des enzymes nécessaires à la production d'intermédiaires essentiels au fonctionnement du premier groupe d'enzymes.

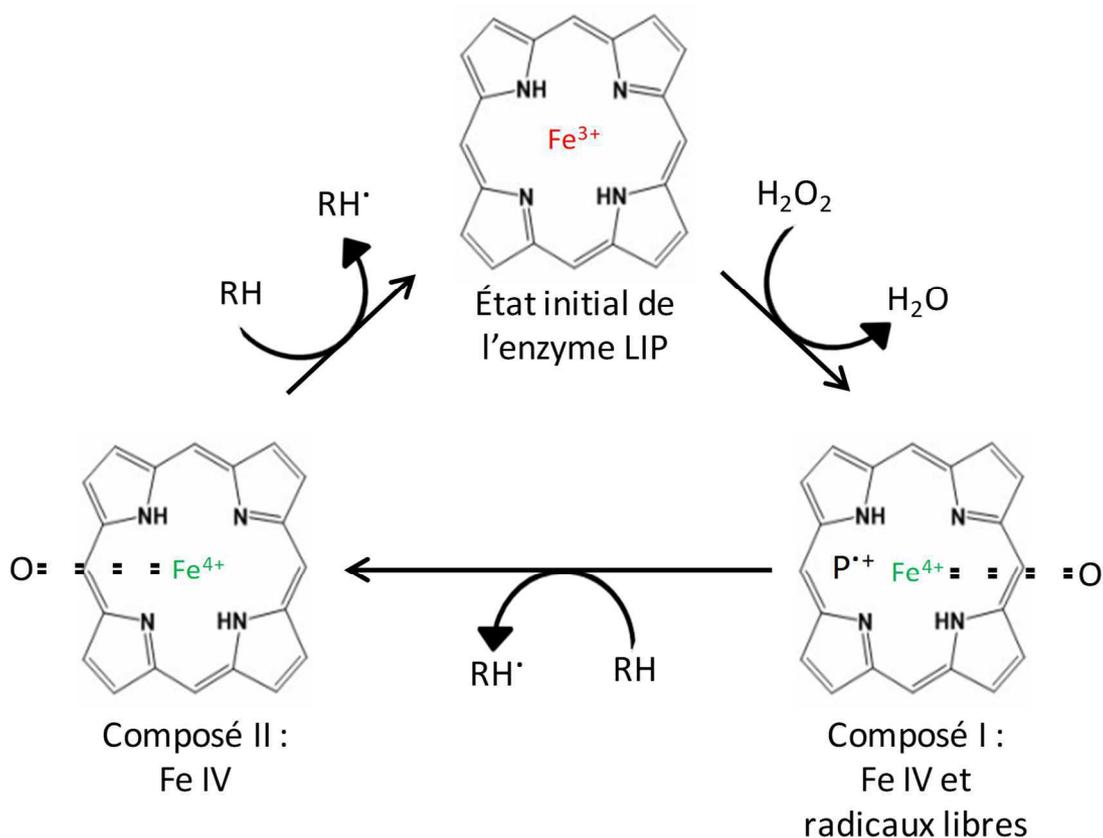


Figure 17 : Cycle catalytique des lignine peroxydases (adapté de Hammel and Cullen, 2008).

L'état initial de l'enzyme correspond à la liaison d'une molécule de fer III par les quatre noyaux pyrroles. L'activation de l'enzyme se fait par une oxydation provoquée par du peroxyde d'hydrogène conduisant à la formation du composé I. Il se présente sous la forme de fer IV et de radicaux libres sur les noyaux pyrroles. L'action de l'enzyme va permettre tout d'abord le transfert des radicaux libres pour former le composé II uniquement constitué de fer IV. Un second transfert permet le retour de l'enzyme à son état initial.

2.1 Système enzymatique principal :

Le système enzymatique principal de dégradation du polymère ligneux regroupe quatre principaux types d'enzymes qui permettent une dégradation complète de la lignine: les lignine peroxydases (LiP), les manganèse peroxydases (MnP), les versatile peroxydases (VP) et les phénols oxydases ou laccases (Dashtban et al., 2010).

2.1.1 Les lignine peroxydases :

Au cours de l'année 1983, Kirk et collaborateurs ont décrit chez *P. chrysosporium* une enzyme ayant la capacité de dégrader la lignine à l'aide de peroxyde d'hydrogène. Quelques années plus tard, ces enzymes ont été décrites chez de nombreux autres organismes (Kirk and Farrell, 1987). Les lignine peroxydases sont des hémoprotéines à fer III qui est penta coordonné par quatre noyaux tetrapyrroles et un résidu histidine. Un cycle catalytique se subdivise en trois parties (Hammel and Cullen, 2008). Tout d'abord l'enzyme est activée par oxydation via une molécule de peroxyde d'hydrogène. Ce mécanisme conduit à la formation d'un composé intermédiaire qui est constitué de fer IV et de radicaux libres sur les noyaux pyrroles. Il s'en suit 2 oxydations successives d'un substrat via le transfert des radicaux libres des noyaux pyrroles. L'enzyme retrouve ensuite son état initial qui par la suite pourra à nouveau réaliser un cycle catalytique (Hammel and Cullen, 2008) (Figure 17). L'action des lignine peroxydases se fait sur une large gamme de molécules comprenant divers modèles de lignines, des benzyle alcools, des méthyl-benzyles, des phénols ou des composés aromatiques non phénoliques de lignines (Kersten and Cullen, 2007). Ceci signifie que l'enzyme ne reconnaît pas de site de fixation spécifique (Kersten et al., 1990). Les pourritures blanches sont capables de réguler le système de dégradation de la lignine et en particulier les lignine peroxydases via la production de métabolites secondaires. Parmi ces molécules, l'alcool veratryl produit à partir de phénylalanine et s'accumulant dans le milieu extracellulaire pourrait avoir ce rôle (Haemmerli et al., 1987). En effet, ce composé permet l'induction du système lignolytique, l'augmentation de la quantité de peroxyde d'hydrogène nécessaire aux peroxydases grâce à l'activation de la glucose oxydase pour laquelle il servirait de médiateur et l'oxydation du polymère de lignine à distance via le transfert de radicaux libres (Harvey et al., 1986; Leisola et al., 1984). Lorsque le taux de peroxyde d'hydrogène est trop important, il peut interagir avec cette molécule et avoir un rôle tampon pour limiter la suroxydation des enzymes (Haemmerli et al., 1986).

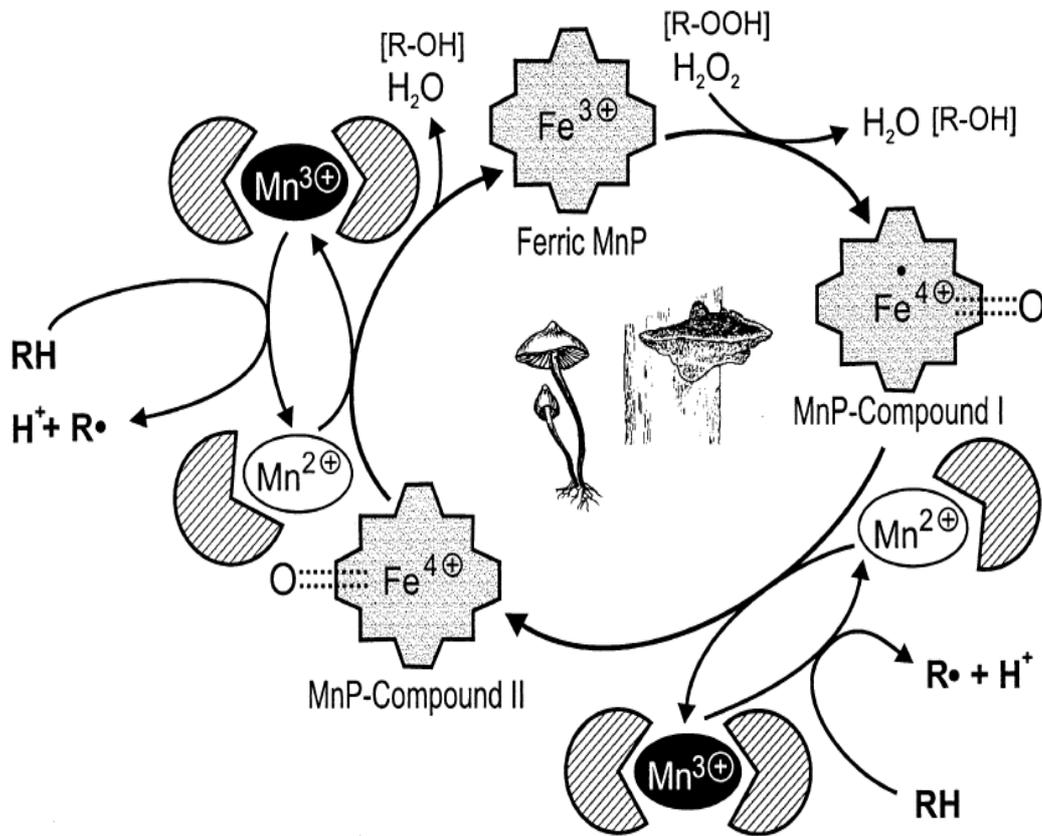


Figure 18 : Cycle catalytique des Manganèse peroxydases (adapté de Hofrichter et al., 2002).

L'état initial de l'enzyme correspond à la liaison d'une molécule de fer III par les quatre noyaux pyrroles. L'activation de l'enzyme se fait par une oxydation provoquée par du peroxyde d'hydrogène conduisant à la formation du composé I. Il se présente sous la forme de fer IV et de radicaux libres sur les noyaux pyrroles. L'action de l'enzyme va permettre tout d'abord le transfert des radicaux libres sur un atome de manganèse II pour former du manganèse III. Ce dernier va oxyder une molécule substrat pour revenir à l'état manganèse II. L'enzyme quant à elle forme le composé II uniquement constitué de fer IV. Un second transfert faisant intervenir de façon similaire le manganèse est réalisé ce qui permet le retour de l'enzyme à son état initial.

Les lignine peroxydases sont donc capables de dégrader tous les composants ligneux ce qui les rend essentielles dans les processus de dégradation. Ceci est confirmé aussi par le fait que leur pouvoir oxydant est plus important que celui des horseradish peroxydases et des laccases (Kersten et al., 1990).

2.1.2 Les Manganèse peroxydases :

Les manganèse peroxydases (MnP) ont été découvertes chez *P. chrysosporium* par deux groupes de chercheurs au milieu des années 1980. Les deux équipes ont purifié une MnP parmi les protéines d'un milieu de culture de *P. chrysosporium*, et ont décrit l'enzyme comme étant une peroxydase hémique dépendante du manganèse (Glenn and Gold, 1985; Kuwahara et al., 1984). Très rapidement après cette découverte, il a été montré que ce type d'enzyme possédait une large gamme de substrats comme des phénols, des composés aromatiques aminés ou encore des thiols (GSH et DTT) (Paszczynski et al., 1985). De plus, la réaction enzymatique qui est catalysée par les MnP est une oxydation pouvant faire intervenir différents cofacteurs selon le substrat oxydé. En effet, la catalyse des thiols requiert la présence de dioxygène, tandis que celle des composés aromatiques aminés et des phénols nécessite du peroxyde d'hydrogène (Paszczynski et al., 1985). Les peroxydases à hème ont toutes un cycle catalytique similaire, les MnP ne dérogent pas à cette règle. Cependant, cette dernière utilise des ions Mn^{2+} pour oxyder leur substrat contrairement aux autres peroxydases (Hofrichter, 2002). Les étapes de catalyse se répartissent sur trois phases, tout d'abord l'activation de l'enzyme par oxydation du groupe prosthétique (protoporphyrine IX à Fe^{3+}) via une molécule de peroxyde d'hydrogène. Ceci permet la formation d'un composé intermédiaire I contenant un ion Fe^{4+} lié à un atome d'oxygène par une double liaison (Hofrichter, 2002; Wariishi et al., 1988). Il s'en suit la première étape d'oxydation du substrat ligneux qui nécessite un transfert d'électron via une molécule médiatrice. En effet, cette dernière réduit le composé I en captant un électron permettant l'oxydation de la lignine. Il a été montré que pour cette étape, de nombreuses molécules médiatrices pouvaient être utilisées comme des phénols, le ferrocyanide et l'ion Mn^{2+} (Wariishi et al., 1988). Il en résulte donc la perte d'un électron par le complexe enzymatique conduisant à la synthèse du composé II. Il s'en suit une seconde étape d'oxydation de la lignine similaire à la précédente. Cependant, elle requiert obligatoirement la présence d'ion Mn^{2+} comme molécule médiatrice, sans cela le cycle catalytique ne peut se terminer empêchant le retour de l'enzyme à son état initial (Wariishi et al., 1988) (Figure 18).

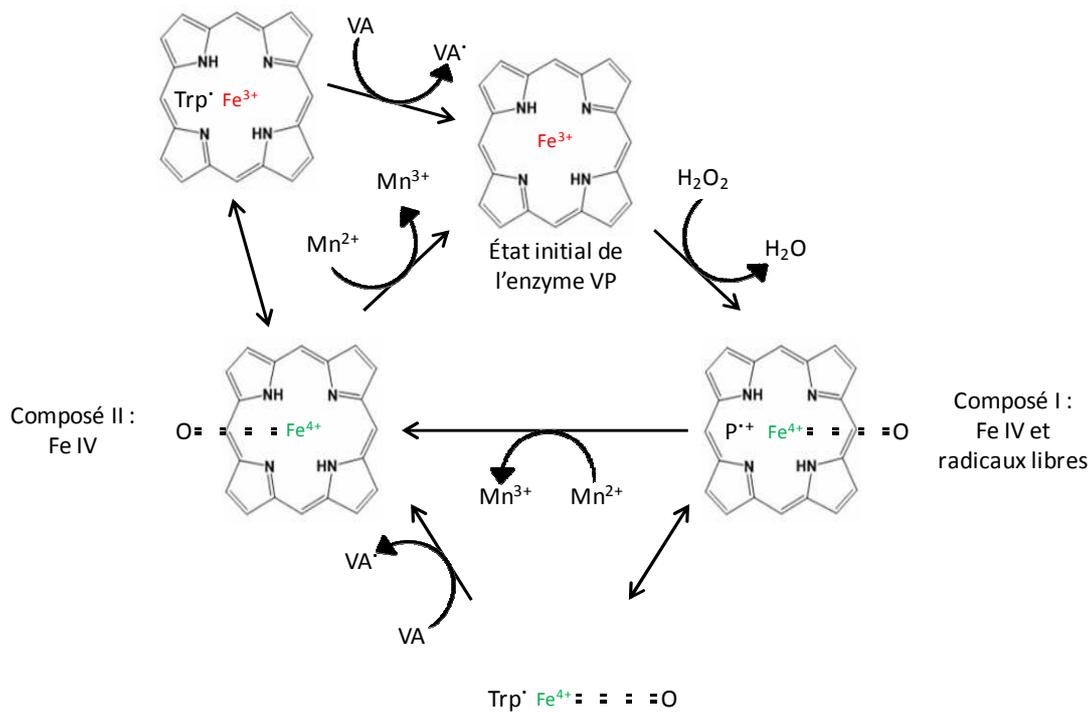


Figure 19 : Cycle catalytique des versatile peroxydases (adapté de Ruiz-duenas et al., 2007).

Ces enzymes particulières peuvent adopter deux types de cycles catalytiques dont le premier est strictement identique à celui des manganèse peroxydases. Le second consiste à transférer le radical du noyau pyrrole (composé I) sur un résidu tryptophane dont l'exposition permet l'oxydation d'alcool veratryl et la formation du composé II. Il s'en suit un deuxième transfert du Fer IV vers le noyau pyrrole puis le résidu tryptophane qui oxyde une nouvelle molécule d'alcool veratryl permettant le retour à l'état initial.

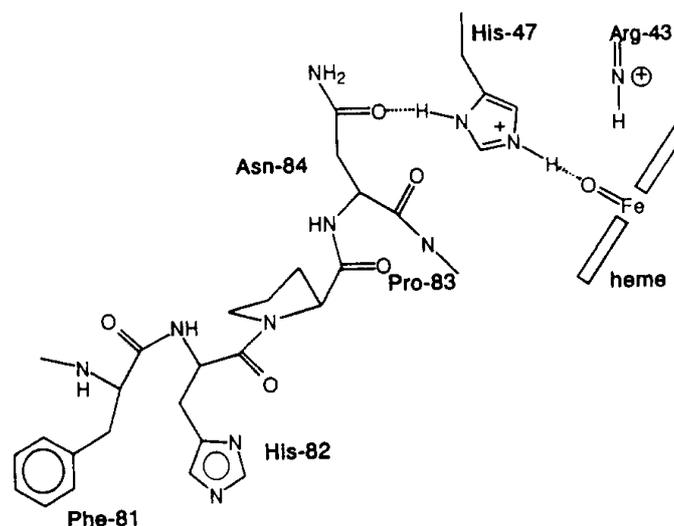


Figure 20 : Schéma de la chaîne d'acides aminés impliquée dans le mécanisme de LRET des lignine peroxydases (Schoemaker et al., 1994).

Ce mécanisme permet le transfert de radicaux libres depuis l'atome de fer vers les noyaux pyrroles puis un résidu dont l'exposition permet l'oxydation de molécules telle que l'alcool veratryl.

De plus, des études cinétiques ont montré que la MnP possédait un seul site de liaison pouvant accueillir l'ion Mn^{2+} (Wariishi et al., 1992). Les étapes d'oxydation du manganèse nécessitent la présence d'un chélateur de type acide organique. Ce dernier permet la chélation des ions Mn^{2+} et la stabilisation des ions Mn^{3+} en solution. Cette fonction peut être assurée par différentes molécules comme le lactate, l'oxalate et le malonate (Wariishi et al., 1992). Cependant, l'activité enzymatique ainsi que la réduction du composé II dépend fortement du chélateur. En effet, pour une concentration de 2 mM d'oxalate, l'activité et la réduction sont optimales. A contrario, pour de fortes concentrations (50 mM) de lactate et de malonate, aucun des deux optimums n'est atteint (Kishi et al., 1994). De plus, la réduction du composé II est dépendante du pH puisqu'il réalise l'oxydation des composés phénoliques de façon optimale à pH 4,5. Le composé I est quant à lui indépendant du pH, de la concentration et du type de chélateur (Kishi et al., 1994). Le chélateur utilisé semble être l'oxalate puisque celui est le seul que *P. chrysosporium* sécrète à la concentration requise pour stimuler les MnP.

2.1.3 Les versatile peroxydases :

Les versatile peroxydases (VP) sont des enzymes hémiques ayant la capacité particulière d'oxyder tous les substrats des autres peroxydases. C'est pourquoi, les premières descriptions de VP font référence à des MnP (Ruiz-Dueñas et al., 2008). En effet, la comparaison des sites de fixation du manganèse montre qu'ils sont presque identiques et constitués de trois acides aminés (deux acides glutamiques et un acide aspartique) et des propionates hémiques (Ruiz-Dueñas et al., 2007; Sundaramoorthy et al., 2005). La coordination de tous ces groupements est donc responsable de la fixation du métal. Par conséquent, les VP font intervenir des mécanismes d'oxydations identiques à ceux des MnP (Figure 19). Tout ceci permet d'expliquer que les deux familles d'enzymes ont la capacité d'oxyder la même gamme de substrats. Cependant, les VP sont impliquées dans la dégradation de molécules nécessitant l'intervention d'autres processus d'oxydation. Elles pourraient utiliser un mécanisme appelé Long Range Transfert (LRET) basé sur le transfert d'électrons d'acide aminé en acide aminé, afin d'oxyder les substrats à haut potentiel redox. Les modèles tridimensionnels des structures de VP partagent une forte similarité avec ceux des lignine peroxydases. En effet, la chaîne d'acides aminés impliquée dans le transfert d'électrons chez les LiP semble varier d'un seul résidu chez les VP (Camarero et al., 1999; Schoemaker et al., 1994) (Figure 20).

Lors de la première description de ce mécanisme, il a été montré que l'alcool veratryl joue le rôle de médiateur et les réactions sont uniquement possible en cas de faible oxygénation (Schoemaker et al., 1994). Ces similarités entre les deux enzymes expliquent le fait que les VP soient capable d'oxyder les mêmes substrats que les LiP. Il existe un autre système d'oxydation qui est lui similaire à celui reporté pour de nombreuses peroxydases. Des études enzymatiques montrent une double cinétique chez cette enzyme ce qui suggère la présence de deux sites d'oxydation indépendants (Ruiz-Dueñas et al., 2001; Ruiz-Duenas et al., 2009). Le site pour les bas potentiels redox se situe dans la chaîne principale de l'hème et est similaire à celui de peroxydases dites classiques (Ruiz-Dueñas et al., 2008; Tsukamoto et al., 1999). Les propriétés des versatiles peroxydases sont donc issues d'une combinaison de plusieurs sites d'oxydation conduisant à la formation d'une enzyme à l'architecture hybride. Ceci lui confère une grande versatilité vis-à-vis de ses substrats et lui permet d'accueillir des molécules aromatiques à haut potentiel redox, des phénols à bas potentiel redox ou encore les substrats des MnP. Elles constituent donc une famille enzymatique particulière regroupant toutes les capacités des autres peroxydases fongiques.

2.1.4 Les phénols oxydases ou laccases :

Les phénols oxydases font partie des enzymes étudiées depuis la fin du XIX^{ème} siècle. *P. chrysosporium* ne possède pas de gènes codant pour ces enzymes au sein de son génome, en revanche elles sont largement représentées chez d'autres espèces de champignons de pourriture blanche. Elles ont été décrites pour la première fois dans des exsudats d'un arbre (*Rhus vernicifera*) puis très rapidement chez les champignons (Yoshida, 1883; Bertrand et al 1896). Plus tardivement, en 1993 Givaudan et al ont réalisé la première étude chez des procaryotes et plus particulièrement sur une bactérie : *Azospirillum lipoferum* (Givaudan et al., 1993; Sharma et al., 2007). Les laccases sont donc des enzymes très répandues car présentes au sein d'organismes bactériens, de végétaux et de champignons (Munk et al., 2015). Les phénol oxydases ou laccases sont des oxydases à cuivre multiple (MCO) catalysant l'oxydation de composés phénoliques (Baldrian, 2006). De par l'absence de substrat spécifique, elles peuvent agir sur un large panel de molécules comme des phénols, des polyphénols, des benzènes thiols, des polyamines, des hydroxyindols ou encore des aryldiamines (Sitarz et al., 2016). A la différence des peroxydases, les laccases utilisent le dioxygène comme accepteur d'électron final et produisent des molécules d'eau (Thurston, 1994).

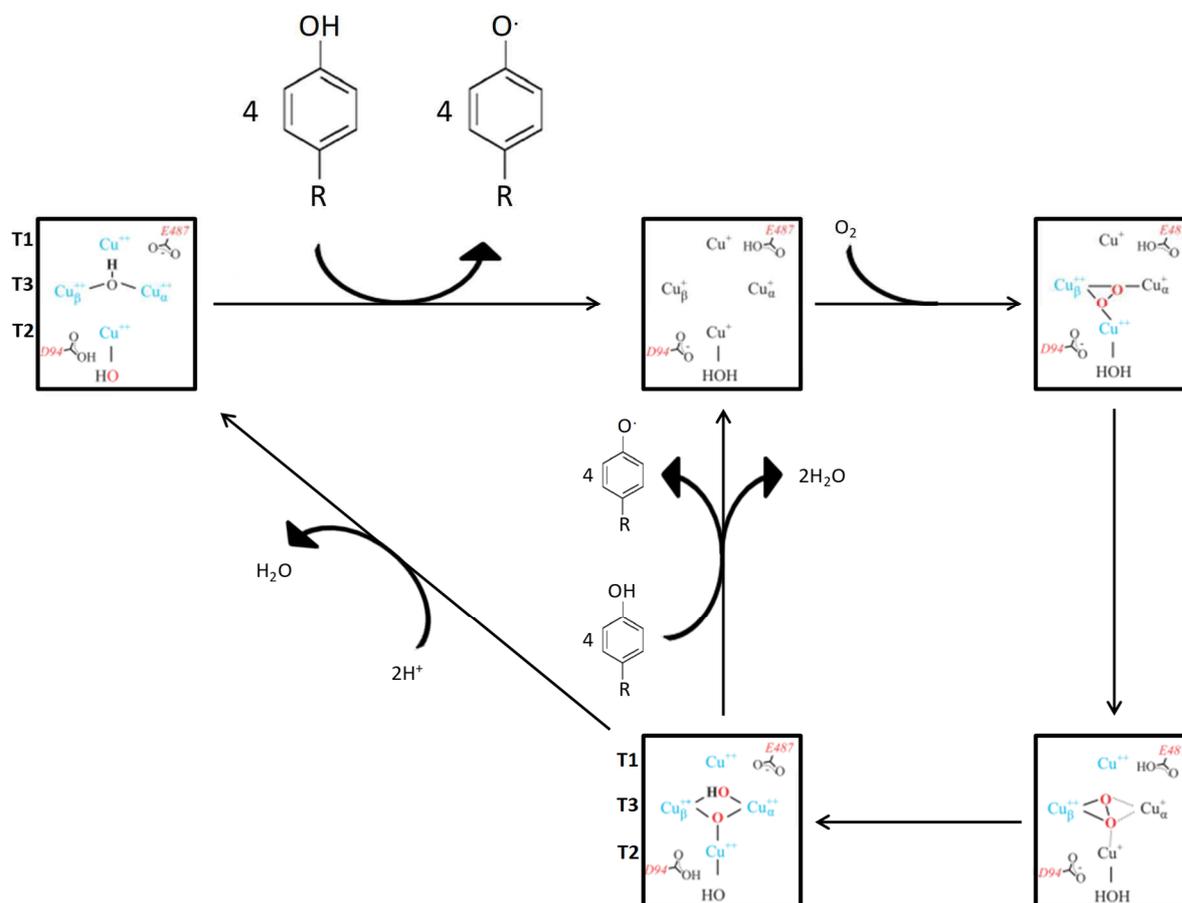


Figure 21 : Cycle catalytique des phénol oxydases (adapté de Sitarz et al., 2016).

La forme réduite de l'enzyme peut accepter une molécule de dioxygène qui se lie préférentiellement à l'ion Cu β du site T3. Elle est ensuite rapidement réduite formant ainsi un intermédiaire peroxyde. Une première réduction est réalisée via le transfert d'un H du résidu E487 sur l'intermédiaire peroxyde. En parallèle, la protonation du résidu D94 permet la diminution du potentiel redox de l'atome de cuivre du centre T2 et favorise le transfert d'un électron sur le peroxyde, ce qui provoque la formation de la liaison entre le CuT2 et l'oxygène. L'enzyme est alors complètement oxydée. L'excès de substrat réduit engendre le retour à la forme totalement réduite de l'enzyme.

Cette réaction est possible grâce à la présence de trois sites comprenant du cuivre : le site T1 appelé centre cuivre bleu, le site T2 appelé cuivre normal et le site T3 comprenant deux atomes de cuivre. Le substrat est oxydé dans le site T1 puis une navette se met en place pour transporter les électrons jusqu'au site T2 et T3 binucléé où le dioxygène est réduit en eau (Munk et al., 2015) (Figure 21).

L'intervention des laccases lors de la dégradation de la biomasse végétale par les pourritures blanches provoque de nombreuses modifications au sein de la lignine. Ces modifications vont engendrer une dépolymérisation de cette dernière. En effet, ces enzymes sont capables de dégrader les dilignols à liaison β -1 via la formation de phénoxy radical. Ces derniers, lors du mécanisme de dégradation de la liaison entre le C_α et le C_β , sont responsables de l'apparition d'éthanone, de synringaldéhyde, de benzaldéhyde et de glycol (Kawai et al., 1988a). De plus, ils interviennent dans deux autres voies de décomposition : le clivage alky-aryl produisant du phényl propanal et de l'hydroquinone, et l'oxydation du C_α conduisant à la synthèse de diphényl propanone (Kawai et al., 1988a). Une autre étude réalisée sur le 4,6-di(tert-butyl)guaiacol, un composé phénolique modèle, a montré une potentielle nouvelle action des laccases. En effet, celles-ci peuvent ouvrir les cycles aromatiques via la formation de phénoxy radical qui interagiraient par la suite avec du dioxygène (Kawai et al., 1988b). De plus, la dégradation de la partie non phénolique de la lignine (80 à 90 % du polymère) nécessite la présence de médiateurs comme le 1-hydroxybenzotriazole (1-HBT) and 2,2-azobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid). Les voies de dégradation sont alors similaires à celle des LiP mais les produits peuvent être différents (Kawai et al., 2002).

Les laccases sont donc des enzymes essentielles dans la dégradation de la lignine de par leur capacité à catalyser l'oxydation des parties phénoliques et des parties non phénoliques. De nombreux champignons lignolytiques ne présentent aucune activité liée aux LiP. Ces dernières jouent un rôle important dans la dégradation de la partie non phénolique. C'est pourquoi, le couple laccase/1-HBT pourrait être utilisé comme système alternatif par ces organismes pour dépolymériser la lignine (Kawai et al., 2002).

2.2 Système enzymatique satellite :

Les enzymes de dégradation directe de la lignine nécessitent la présence de peroxyde d'hydrogène, pour cela les pourritures blanches sécrètent un système enzymatique

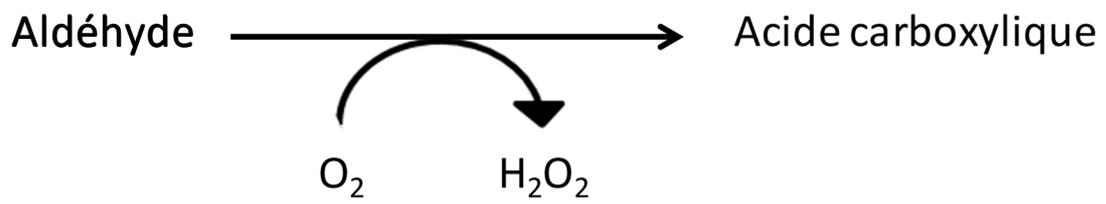


Figure 22 : Réaction catalysée par les glyoxal oxydases (Daou et al., 2017).

permettant la production d'H₂O₂ : des pyranoses oxydases, des aryl-alcool oxydases et des glyoxal oxydases (Dashtban et al., 2010; Hernández-Ortega et al., 2012).

2.2.1 Les glyoxal oxydases :

L'importance des glyoxal oxydases (GLOX) dans les mécanismes de dégradation de la lignine et en particulier la production de peroxyde d'hydrogène a été décrite pour la première fois en 1987 (Kersten and Kirk, 1987). Au fil du temps, elles ont été décrites comme des métalloprotéines contenant un atome de cuivre et appartenant à la classe des AA5 dans la base de données des CAZymes (<http://www.cazy.org/>). De plus, ce sont des aldéhydes oxydases largement réparties au sein des différents phylums végétaux, animaux et fongiques. En effet, elles catalysent une réaction fondamentale pour les organismes vivants, puisqu'elles sont capables de produire du peroxyde d'hydrogène via l'utilisation de dioxygène comme donneur d'électron. Ceci permet la transformation d'un groupement aldéhyde en acide carboxylique (Daou and Faulds, 2017) (Figure 22). L'implication de la glyoxal oxydase dans les mécanismes de dégradation de la biomasse paraît évidente. En effet, après deux semaines de cultures, *P. chrysosporium* montre un niveau élevé de transcrits similaires entre les peroxydases et la GLOX. Ce dernier chute après 8 semaines pour toutes ces enzymes, témoignant d'une co-régulation (Janse et al., 1998). Récemment, il a été montré que les MnP étaient localisées au niveau de l'apex des hyphes fongiques tout comme les glyoxal oxydases. Cette colocalisation de la GLOX a pour but d'apporter le peroxyde d'hydrogène ainsi que de nombreux acides organiques stabilisant les ions Mn³⁺ générés par les MnP (Daou and Faulds, 2017). La GLOX est donc essentielle au fonctionnement des MnP et par conséquent à la dégradation de la biomasse végétale. Cependant, la production et la sécrétion de ces enzymes semblent être décalées de quelques jours (Takano et al., 2010). En effet, les MnP sont sécrétées deux jours avant les GLOX certainement afin d'éviter l'effet synergique de leurs actions et par conséquent des effets délétères au sein des cellules fongiques. La régulation de la GLOX se fait par l'intermédiaire d'un mécanisme d'oxydo-réduction qui provoque son activation lorsque l'enzyme est oxydée ou lorsque le cuivre est réduit (Daou et al., 2016). Ce processus peut être régulé par la présence de peroxydases puisque le couple lignine peroxydase/alcool veratryl est capable d'activer la GLOX (Kersten et al., 1990). Cependant, la présence d'un substrat à haut potentiel redox est indispensable. Le champignon pourrait utiliser ce mécanisme afin de co-réguler la génération de peroxyde d'hydrogène et l'action enzymatique des LiP (Kurek and Kersten, 1995).

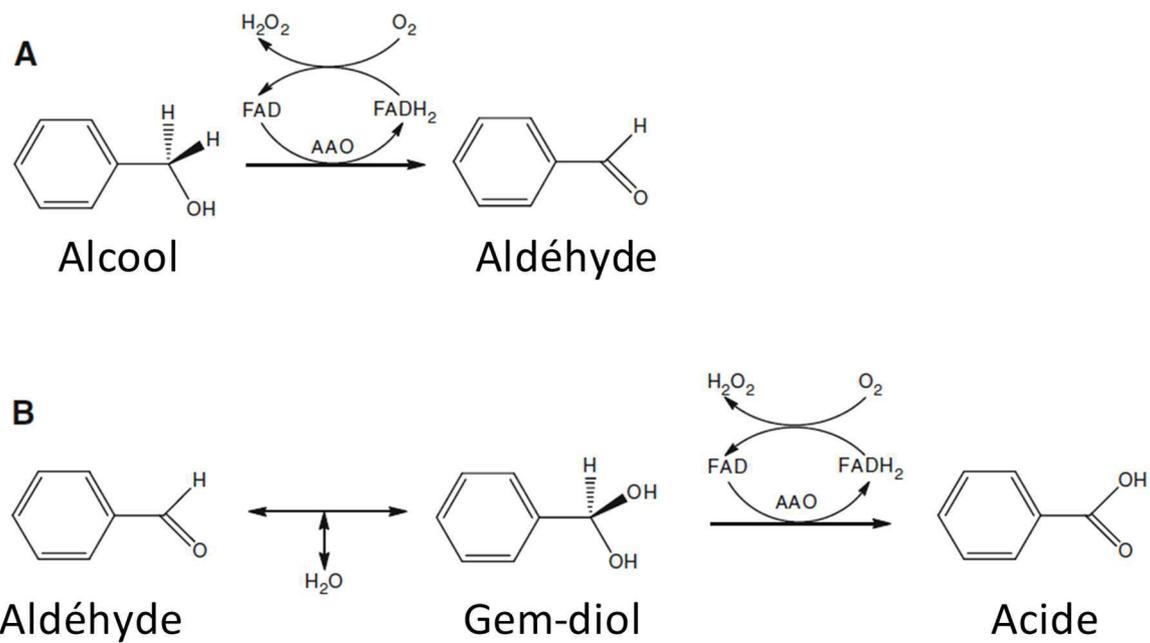


Figure 23 : Schéma des réactions catalysées par les aryl-alcool oxydases (Hernández-ortega et al., 2012)

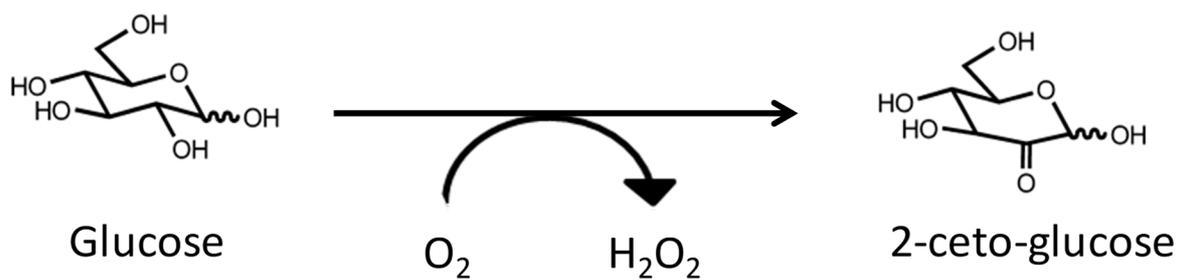


Figure 24 : Réaction catalysée par les pyranose oxydases (Wongnate and chaiyen, 2013)

2.2.2 Les aryl-alcool oxydases :

Ces enzymes ont été découvertes et décrites pour la première fois chez un champignon de pourriture blanche : *Trametes versicolor* (Farmer et al., 1960). Depuis de nombreuses études ont été réalisées afin de comprendre leur rôle au sein de la machinerie enzymatique. Les aryl-alcool oxydases ou AAO sont des flavoprotéines extracellulaires catalysant la réaction de déshydrogénation oxydative des alcools polyinsaturés. Ce processus enzymatique nécessite la présence de molécules d'oxygène qui sont utilisées comme accepteur final d'électron (Ferreira et al., 2015). La finalité conduit à la production de peroxyde d'hydrogène et d'un composé contenant un acide carboxylique (Guillén et al., 1994). A l'heure actuelle, le rôle de ces enzymes serait de maintenir le pool de peroxyde d'hydrogène au sein du système de dégradation de la biomasse végétale des pourritures blanches (Hernández-Ortega et al., 2012). Ce modèle est soutenu par la présence d'un équilibre entre les étapes d'oxydation extracellulaires et les réactions de réduction intracellulaires sur le benzyle alcool, aldéhyde ou acide maintenant la production d'H₂O₂ (Guillén et al., 1994). Le mécanisme décrit ci-dessus fait intervenir trois enzymes : une aryl-alcool oxydase catalysant l'oxydation de l'alcool en aldéhyde puis l'aldéhyde en acide, une aryl-alcool déshydrogénase et une aryl-aldéhyde déshydrogénase permettant la réduction de l'acide en l'alcool (Ferreira et al., 2010; Guillén et al., 1992; Guillén et al., 1994) (Figure 23).

2.2.3 Les pyranoses oxydases :

Les pyranoses oxydases ou P2O (pyranoses : oxygène 2-oxidoreductase) sont des flavoprotéines catalysant l'oxydation du carbone 2 de plusieurs aldopyranoses via l'utilisation de dioxygène. Cette réaction conduit à la formation de deux produits : un 2-keto-aldose et du peroxyde d'hydrogène (Daniel et al., 1994; Danneel et al., 1993) (Figure 24). Cette enzyme est donc versatile vis-à-vis de son substrat car elle est capable de catalyser ce type de réaction pour le D-galactose, le L-sorbose, le D-xylose, le D-mannose, le D-fructose, le D-glucono-1.5-lactone, le maltose, le cellobiose et le sucrose (Ai et al., 2014; Izumi et al., 1990). Cependant, les P2O ont un substrat préférentiel : le D-glucose (Daniel et al., 1994; Danneel et al., 1993; Izumi et al., 1990; Wongnate and Chaiyen, 2013). Lors de l'attaque du bois par les champignons de pourriture blanche, les pyranose oxydases se situent préférentiellement dans l'espace périplasmique des hyphes, eux-mêmes se trouvant dans la lumière des fibres où l'on peut observer différents stades de dégradation (Daniel et al., 1994).

Cette localisation suggère un rôle majeur de l'enzyme dans les processus de dégradation de la biomasse via la production d' H_2O_2 , le co-substrat nécessaire aux enzymes de dégradation de la lignine. De plus, il semblerait que les P20 favorisent la dépolymérisation de la lignine via des interactions avec les phénoxy radicaux et les quinoides formés par des laccases (Ai et al., 2014). Ces deux intermédiaires remplaceraient la molécule de dioxygène en tant qu'accepteur d'électron. Par conséquent, les réactions enzymatiques réalisées par les pyranose oxydases sont essentielles au processus de dégradation de la lignine. Chez les pourritures blanches, le système enzymatique principal est donc soutenu par de nombreuses réactions qui, par leur fonctionnement, apportent des molécules essentielles au déroulement de la dégradation de la biomasse végétale. De plus, l'ensemble est en perpétuelle interaction permettant une régulation fine du système enzymatique satellite. Par ailleurs, il existe un bon nombre d'enzymes intracellulaires (glucose oxydase et fatty-acyl-coA oxydase) qui ont la capacité de produire du peroxyde d'hydrogène. Cependant l'export de la molécule dans le compartiment extracellulaire n'a toujours pas été décrit (Hernández-Ortega et al., 2012).

3. Système de dégradation des polysaccharides du bois :

Les champignons de pourriture blanche sont capables de dégrader les polysaccharides des plantes. Pour cela, ils font appel à un autre système enzymatique extracellulaire permettant la métabolisation des sucres. Ce dernier se compose d'enzymes diverses et variées agissant de façon synergique.

3.1 Dépolymérisation de la cellulose :

Les organismes fongiques métabolisant la cellulose sécrètent classiquement des grands types d'enzymes agissant directement sur le polymère : les endo-cellulases et les exo-cellulases (cellobiohydrolases). Les produits de ces enzymes sont ensuite dégradés par les β -glucosidases et les cellobioses deshydrogénases (Baldrian and Valášková, 2008). Ces enzymes ont toutes été classées au sein du grand groupe des glycosides hydrolases à partir de leur similarité de séquences d'acides aminés (Goedegebuur et al., 2002). Ce dernier est lui-même constitué de nombreuses familles qui possèdent toutes un point commun : la capacité de dégradation hydrolytique des glucanes (McCarter and Withers, 1994).

Il existe deux méthodes d'hydrolyse de la cellulose, tout d'abord par utilisation d'un processus dit d'inversion et un mécanisme de retenue. Le premier fait intervenir un groupement carboxylique déprotoné qui en captant un proton de la molécule d'eau entraîne une cascade de réactions. En effet, par la suite, la molécule d'eau attaque la liaison osidique puis sa rupture intervient grâce à la présence d'un acide carboxylique donnant son proton et libérant ainsi un monomère de glucose. Ce mécanisme fait donc intervenir deux groupements, l'un se comportant comme une base et l'autre comme un acide. Le second mécanisme d'action, fait toujours intervenir une base et un acide. Le groupement acide attaque directement la liaison osidique et se fixe sur le polymère provoquant la libération du monomère de glucose. Ce dernier est stabilisé par le don de proton du groupement basique. L'intervention de la molécule d'eau a pour but de libérer le groupement acide fixé sur le polymère de cellulose (McCarter and Withers, 1994). La déstructuration de la cellulose fait intervenir différentes enzymes qui vont agir à divers endroits particuliers du polymère. Les endo-cellulases sont des enzymes agissant de façon aléatoire sur les chaînes de celluloses. Elles agissent sur les liaisons β -1,4 internes du polymère de cellulose en générant de nouveaux oligosaccharides et de nouvelles terminaisons qui sont utilisées comme substrat par d'autres enzymes de dégradation. La diversité de ce groupe se reflète par la présence de 5 familles contenant des endo-cellulases : les GH5, les GH44, les GH7, les GH8 et les GH9 (Narra et al., 2014). Il semblerait que leur importance dans les processus de dégradation de la cellulose ne soit plus à démontrer, car elles font partie des enzymes les plus actives. Récemment, une nouvelle famille a été décrite comme étant une endo-cellulase malgré l'absence de domaine de liaison à la cellulose (CBM) (Narra et al., 2014). Les exo-cellulases sont des enzymes permettant la libération d'une molécule de glucose à l'extrémité d'une chaîne de cellulose. La catalyse hydrolytique de cette terminaison non réductrice se réalise sur la liaison β -1,4. Ce système de dégradation réunit donc des enzymes attaquant préférentiellement l'extrémité des chaînes de cellulose (les exo-cellulases) et des enzymes ciblant aléatoirement le cœur des fibres (les endo-cellulases). Ces deux modes d'actions sont dictés par l'organisation structurale des enzymes. Le site actif d'une exo-cellulase est enfoui au sein d'une poche profonde permettant d'accueillir un long polymère de cellulose. Le site actif des endo-cellulases est localisé dans une structure en forme de fourche ouverte permettant la liaison aléatoire à la cellulose et l'action au sein du polymère.

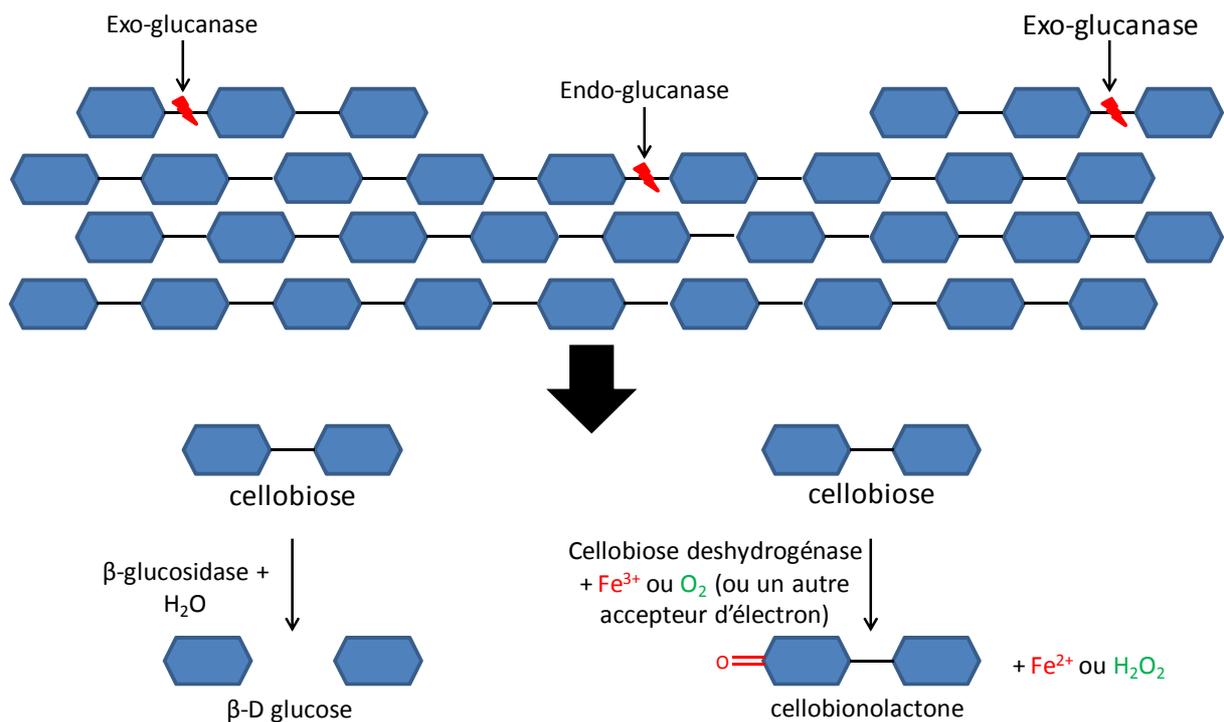


Figure 25 : Schéma récapitulatif des différentes activités enzymatiques nécessaires à la dégradation de la cellulose (adapté de Narra et al., 2014; Henriksson et al., 2000; Philips et al., 2011; Langston et al., 2011).

Les exo-cellulases clivent les extrémités non réductrices des chaînes de cellulose tandis que les endo-cellulases clivent de façon aléatoire les liaisons β-1,4 internes du polymère. Ces deux actions provoquent la libération de cellobiose pris en charge par le β-glucosidase pour produire du glucose ou par la cellobiose déshydrogénase afin de produire un cellobionolactone et les molécules nécessaires à la réaction de Fenton.

Cette classification est donc un outil extrêmement puissant en théorie, mais en pratique la distinction entre les deux types d'enzymes peut être difficile à mesurer. En effet, de nombreuses enzymes apparaissent comme des intermédiaires (Henrissat and Davies, 1997). C'est le cas pour les enzymes processives qui peuvent réaliser différentes attaques sans jamais quitter le substrat. Il existe aussi des enzymes de clivage de la cellulose utilisant un mécanisme d'oxydo-réduction comme les Cellobiose deshydrogénases (CDH). Les protéines connues contiennent un domaine hémique N-terminal et un domaine flavine C-terminal. Ce dernier se retrouve au sein d'une superfamille, les glucose-méthanol-choline oxydoréductases qui sont répandues dans tout le domaine du vivant. A l'inverse la partie hémique est uniquement conservée chez les champignons (Phillips et al., 2011). Ces flavoprotéines sécrétées sont capables de réaliser des coupures à la surface de la cellulose, les nouveaux sites créés sont de potentielles cibles à hydrolyser (Langston et al., 2011). De plus, elles oxydent le cellobiose grâce à leur flavine entraînant un transfert d'électron jusqu'à l'hème permettant la réduction de nombreux substrats : des quinones, des ions métalliques, des colorants organiques et des radicaux phénoliques (Henriksson et al., 2000; Phillips et al., 2011). Le rôle biologique de ces enzymes pourrait être d'une part la métabolisation des polysaccharides et d'autre part la déstructuration de la lignine. En effet, elles catalysent la dégradation du cellobiose via deux voies qui produisent des intermédiaires comme le peroxyde d'hydrogène ou l'ion Fe^{2+} (Henriksson et al., 2000). La réaction spontanée de ces deux produits entraîne la synthèse de radicaux hydroxyls via la réaction de Fenton. De plus, la molécule d' H_2O_2 peut être utilisée directement par les peroxydases, suggérant un lien direct entre dégradation de la cellulose et dégradation de la lignine (Figure 25).

3.2 Dépolymérisation des hémicelluloses :

Ce polymère présente une hétérogénéité de structure qui lui confère une plus grande résistance à la dégradation que la cellulose. C'est pourquoi, la dépolymérisation de l'hémicellulose fait intervenir un nombre plus important d'enzymes. Malgré cela, les modes d'action des enzymes sécrétées restent similaires à ceux utilisés pour la décomposition de la cellulose. Le xylan étant le polysaccharide le plus présent au sein de l'hémicellulose, de nombreuses études ont porté sur la caractérisation des xylanases (Malherbe and Cloete, 2002; Sánchez, 2009).

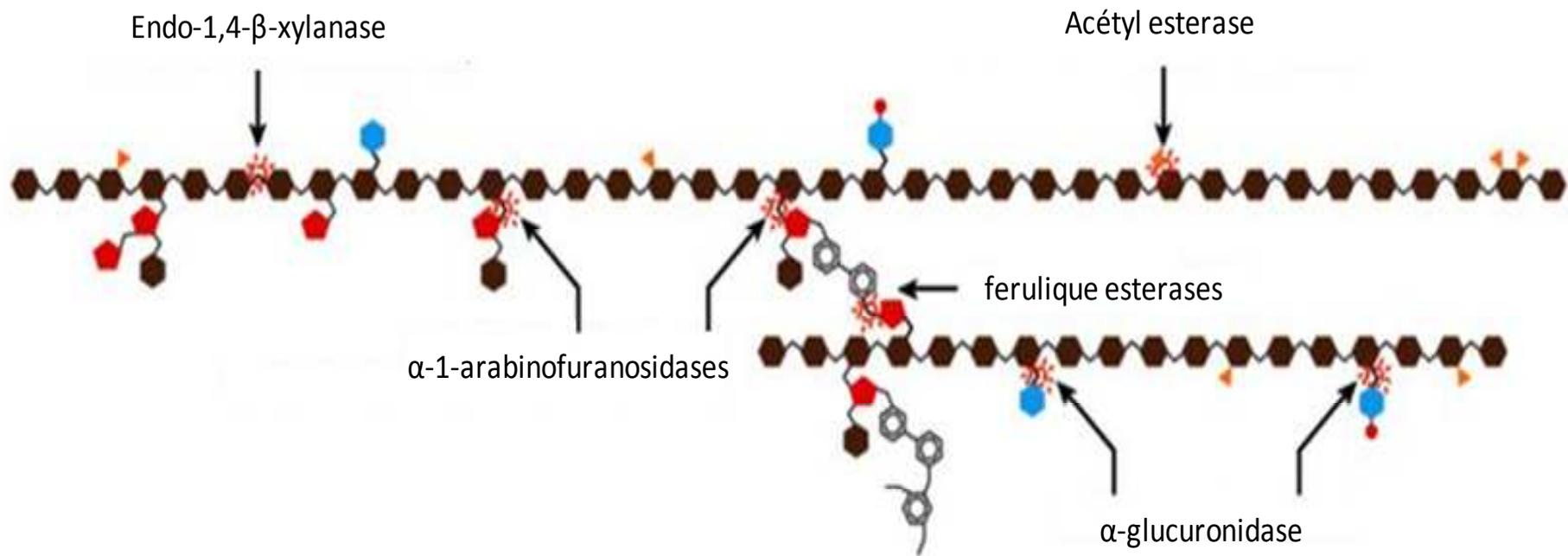


Figure 26 : Schéma récapitulatif des différentes activités enzymatiques nécessaires à la dégradation de l'hémicellulose (adapté de Sánchez et al., 2009; Malherbe and Cloete, 2002).

Le mécanisme de dégradation de l'hémicellulose nécessite de nombreuses activités enzymatiques afin de dépolymériser celle-ci. Les ramifications sont supprimées suite à l'action d' α -glucuronidase, α -1-arabinofuranosidases, d'acétyl estérases ou encore de ferulique estérases. Les chaînes de xylose sont clivées par l'action d'endo-1,4- β -xylanase produisant des oligosaccharides eux-mêmes dégradés par la β -xylosidase pour donner des xyloses.

La dégradation de ce polymère produit des monosaccharides et de l'acide acétique. Elle fait intervenir une large gamme d'enzymes hydrolytiques dont la coopération est essentielle pour le bon déroulement du processus. La classification de ces dernières reflète leur mode d'action par exemple : l'endo-1,4- β -xylanase qui génère des oligosaccharides provenant du xylan, ou encore la xylan 1,4- β -xylosidase produit des xyloses à partir de ces oligosaccharides. De plus, la dégradation requiert de nombreuses enzymes accessoires regroupant des xylan esterases, des ferulique et p-coumaric esterases, des α -1-arabinofuranosidases et des α -O-4 méthyl glucuronidases. Ce pool d'enzymes est nécessaire à la décomposition du xylan et du mannane. Dans le cas de l'O-acetyl-4-O-methylglucuronxylan, une hémicellulose très répandue, quatre enzymes sont requises pour sa dépolymérisation : l'endo-1-4- β - xylanase (endo-xylanase), l'acétyl estérase, l' α -glucuronidase et la β -xylosidase (Sánchez, 2009) (Figure 26).

4. Limitations de l'efficacité des enzymes de dégradation de la biomasse lignocellulosique et stratégies d'adaptation développées par les champignons :

4.1 Un système finement régulé au niveau transcriptionnel :

4.1.1 Régulation des gènes codant des enzymes lignolytiques :

Les champignons de pourriture blanche sécrètent des enzymes lignolytiques régulées par la présence de carbone et d'azote dans l'environnement. La diminution d'un de ces deux éléments engendre une augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc qui joue un rôle central dans la régulation de la transcription des gènes lignolytiques (Boominathan and Reddy, 1992; Li et al., 1994). En effet, les régions promotrices des gènes de laccases, de LiP et de MnP possèdent toutes des séquences régulatrices dépendantes de l'AMPc. Il existe aussi des séquences reconnues par la protéine activatrice AP-2 qui est elle-même régulée par l'AMPc (Dhawale, 1993). Par conséquent, lorsque les ressources nutritives deviennent limitantes, l'expression des gènes codant pour les enzymes lignolytiques est augmentée. Chez *P. chrysosporium*, l'activité lignolytique est abolie par de fortes concentrations en azote, tandis que d'autres champignons comme *Lentinus edodes*, *Bjerkandera sp.*, *Pleurotus ostreatus* ne semblent pas être affectés (Janusz et al., 2013; Kaal et al., 1993, 1995; Leatham and Kent Kirk, 1983).

Cependant, d'autres éléments doivent être pris en compte comme le pH, la température et la présence de micro-éléments (métaux, ions et espèces réactives de l'oxygène). Chez *P. ostreatus*, les séquences promotrices des gènes de peroxydases contiennent différents éléments de réponses liées à la température (HSE), aux métaux (MRE), aux xénobiotiques (XRE) et à l'AMPc (CRE) pouvant être impliqués dans la régulation de l'expression des gènes (Fernández-Fueyo et al., 2014). L'expression des gènes codant les enzymes de dégradation est également dépendante du pH et de la température (Dashtban et al., 2010). En effet, une grande majorité des gènes codant des peroxydases voit leur expression fortement réprimée à des pH de 3 et de 8 ainsi que pour une température de 10 °C (Fernández-Fueyo et al., 2014). Les éléments de réponses aux métaux permettent de réguler l'expression des gènes codant pour des peroxydases. En effet, les gènes codant les peroxydases *mnp1* et *mnp2* présentent des MRE putatifs dans leurs séquences promotrices, lorsque du Mn^{2+} est ajouté dans le milieu de culture le nombre de transcrits augmente chez *P. chrysosporium* (Johansson et al., 2002). A l'inverse, l'expression du gène codant la peroxydase *mnp3* n'est pas régulée positivement car elle ne possède pas de MRE. De plus, il existe des gènes de MnP qui n'ont pas de MRE chez *Trametes versicolor* mais dont l'expression est augmentée en présence de Mn^{2+} suggérant l'existence d'autres mécanismes de régulation (Johansson et al., 2002). Les processus de régulation doivent prendre en compte de nombreuses variations environnementales, c'est pourquoi ils sont multiples et encore mal compris à ce jour.

4.1.2 Régulation des gènes codant les enzymes permettant la lyse des polysaccharides :

Les principaux facteurs permettant l'induction de la production des cellulases et des hémicellulases sont l'abondance et la disponibilité des ressources carbonées (cellulose ou hémicellulose). Cependant, il est important de noter que ces enzymes ne sont pas produites en présence de sucres simples tels que le glucose ou facilement assimilable (fructose). Cette régulation par les conditions environnementales s'effectue au niveau transcriptionnel (Shida et al., 2016). Les études réalisées sur l'expression de ces gènes ont menées à la découverte de plusieurs facteurs de transcription activateurs tels que : Xyr1, Ace2, Ace3 et Hap2/3/5. L'inactivation de Xyr1 engendre une forte répression de l'expression de nombreux gènes codant pour des cellulases et des hémicellulases.

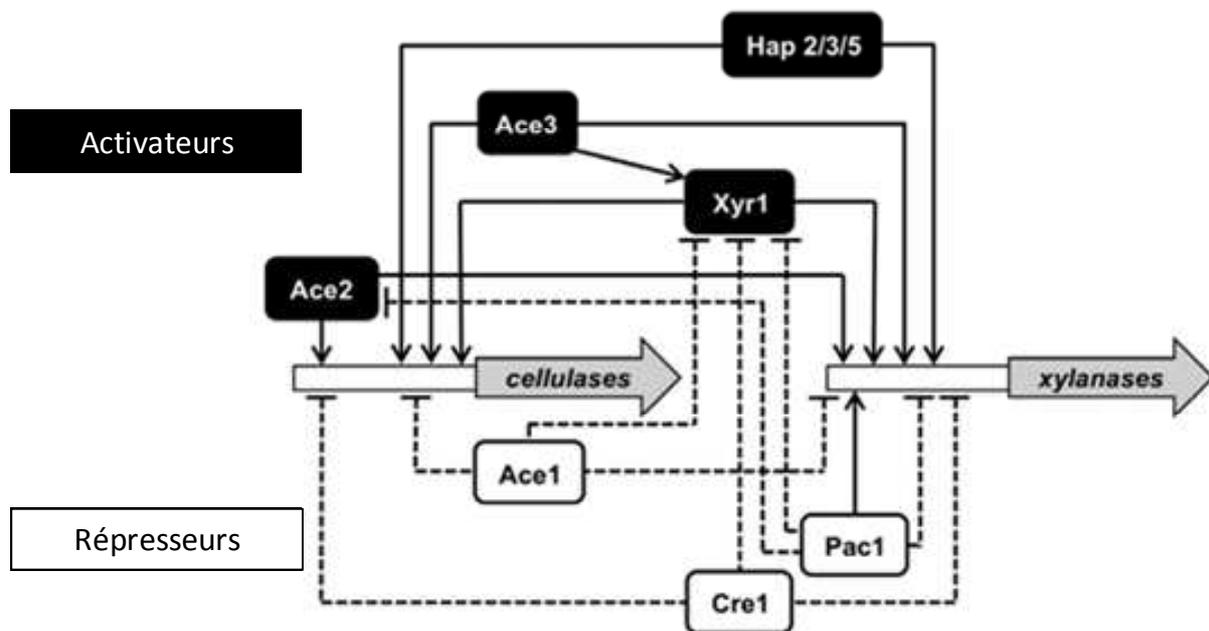


Figure 27 : Mécanismes de régulation transcriptionnelle des cellulases et des hémicellulases chez *Trichoderma reesei* (Shida et al., 2016).

Les principaux activateurs de l'expression des gènes codant des cellulases ou des xylanases sont Xyr1 et Ace2. Ace3 affecte l'expression de Xyr1. De façon plus générale, le complexe Hap 2/3/5 permet de modifier la conformation de l'ADN afin de recruter Xyr1 et Ace2. A contrario il existe des régulateurs négatifs sur lesquels les conditions environnementales jouent un rôle important. En effet, les protéines Cre en présence de sucres métabolisables vont se fixer sur les séquences promotrices des gènes de cellulases ou de xylanases empêchant leurs activations. Pac1 semble quant à lui avoir un effet direct sur Xyr1 et Ace2 en réprimant leur expression. Enfin, il existe des régulateurs globaux qui peuvent réguler négativement ces gènes, c'est le cas d'Ace1.

Cette régulation se fait indépendamment de la source de carbone et de la molécule inductrice chez *Hypocrea jecorina* (xylose, xylobiose ou α -sophorose) (Stricker et al., 2006). C'est pourquoi, ce facteur de transcription est considéré comme le plus important. A l'inverse, la répression de l'expression engendrée par l'inactivation d'Ace2 peut être contournée par la présence de molécules inductrices. Ace3 affecte l'expression de Xyr1. De plus, la présence du complexe Hap2/3/5 serait essentielle dans la modification du nucléosome permettant le recrutement de Xyr1 et d'Ace2, et par conséquent dans la régulation des gènes de dégradation de la cellulose et de l'hémicellulose (Wurleitner et al., 2003). Il existe aussi de nombreux facteurs de transcription represseurs comme Ace1, Cre1 et Pac1. Les conditions environnementales jouent également un rôle important dans le fonctionnement de ces represseurs. En effet, Cre1 et Pac1 sont respectivement sensibles à la source de carbone et au pH. En présence de sucres facilement métabolisables (glucose), la phosphorylation des protéines Cre par une caséine kinase II leur permet de se fixer au sein des régions promotrices des gènes cibles afin de les inactiver (Cziferszky et al., 2002). Chez les champignons filamenteux, il existe différentes voies de réponses aux variations de pH permettant la régulation de la sécrétion d'enzymes et les gènes codant les cellulases et les hémicellulases n'y échappent pas. Lors de la suppression de Pac1, la production de cellulase augmente drastiquement ainsi que le niveau d'expression de Xyr1 et Ace2 (Shida et al., 2016). De plus, Ace1 bien qu'il semble être un régulateur plus global est capable de réprimer les gènes codant pour ces enzymes de dégradation (Figure 27).

4.2 Problème de pénétration des enzymes dans le bois :

Il existe un obstacle majeur à l'efficacité du système enzymatique de dégradation de la lignine : la taille des enzymes. En effet, les pores de la paroi cellulaire des cellules du bois, dont la taille est définie par l'architecture de la structure globale, est d'un diamètre bien inférieur à celui des enzymes (Srebotnik et al., 1988). Par conséquent, pendant les étapes précoces de la dégradation, les enzymes se retrouvent à la surface des cellules lignifiées et dans l'incapacité de les pénétrer (Evans et al., 1994; Hammel et al., 1993). Les champignons ont donc dû mettre en place des mécanismes afin de permettre la diffusion et l'action des enzymes de dégradation au sein de la structure du bois.

En 1994 Evans et collaborateurs ont émis l'hypothèse que des petites molécules émises par le champignon seraient capables d'initier la dépolymérisation du substrat lignocellulosique et ainsi permettre la diffusion des enzymes. Ces petites molécules sont la résultante de diverses voies métaboliques et se présentent sous la forme de quinones de produits de la réaction de Fenton, d'oxalate, de malate et de fumarate ou de petites protéines sécrétées (Dashtban et al., 2010; Evans et al., 1994; Leonowicz et al., 1999).

4.2.1 La réaction de Fenton :

L'initiation de la dégradation de la lignine et par conséquent l'élargissement des pores de la paroi cellulaire peut être induite par la réaction de Fenton chez les champignons de pourritures blanches. En effet, cette réaction conduit à la formation de radicaux hydroxyls qui peuvent réagir avec la lignine et entraîner sa déstructuration via plusieurs mécanismes comme un clivage au niveau du C α ou un clivage de la liaison β -O-4 (Hammel et al., 2002). Ce phénomène peut se produire uniquement si le champignon produit des médiateurs de faible poids moléculaire qui pourront pénétrer dans la structure cellulaire. Chez *Perenniporia medulla-panis*, cette fonction est assurée par des composés phénoliques et de l'acide oxalique (Arantes et al., 2011). La combinaison va permettre la réduction du Fe $^{3+}$ en Fe $^{2+}$ qui en présence de peroxyde d'hydrogène va initier la réaction de Fenton. L'oxalate produit par le champignon permet la diminution du pH causant une augmentation de la disponibilité de Fe $^{3+}$ et le transport de ce dernier par chélation. Cependant, une trop grande quantité entraîne la formation de complexe Fe-oxalate trop stable et non réductible. C'est pourquoi le champignon est capable de réguler la quantité d'acide produit (Arantes et al., 2009). Après formation du complexe, les composés phénoliques (catéchol, pyrogallol et l'alcool veratryl) vont permettre sa réduction et donc la libération de Fe $^{2+}$ au sein de la paroi cellulaire. De nombreux organismes utilisent le cycle redox de la voie des quinones pour réaliser la réaction de Fenton et donc la production du radical hydroxyl. Chez *Pleurotus eryngii*, la première réaction de la voie des quinones (Q) se fait de façon intracellulaire grâce à une deshydrogenase à NADPH. De plus, *P. chrysosporium* combine ce système avec un système redox membranaire (Stahl et al., 1995). De ces divers processus, il en résulte la formation de quinones réduites (QH $_2$) qui à leur tour vont entrer dans un cycle d'oxydation présentant plusieurs possibilités. En effet, la QH $_2$ peut être prise en charge par des laccases ou des peroxydases aboutissant à la synthèse de Quinone oxydée (Q $^-$).

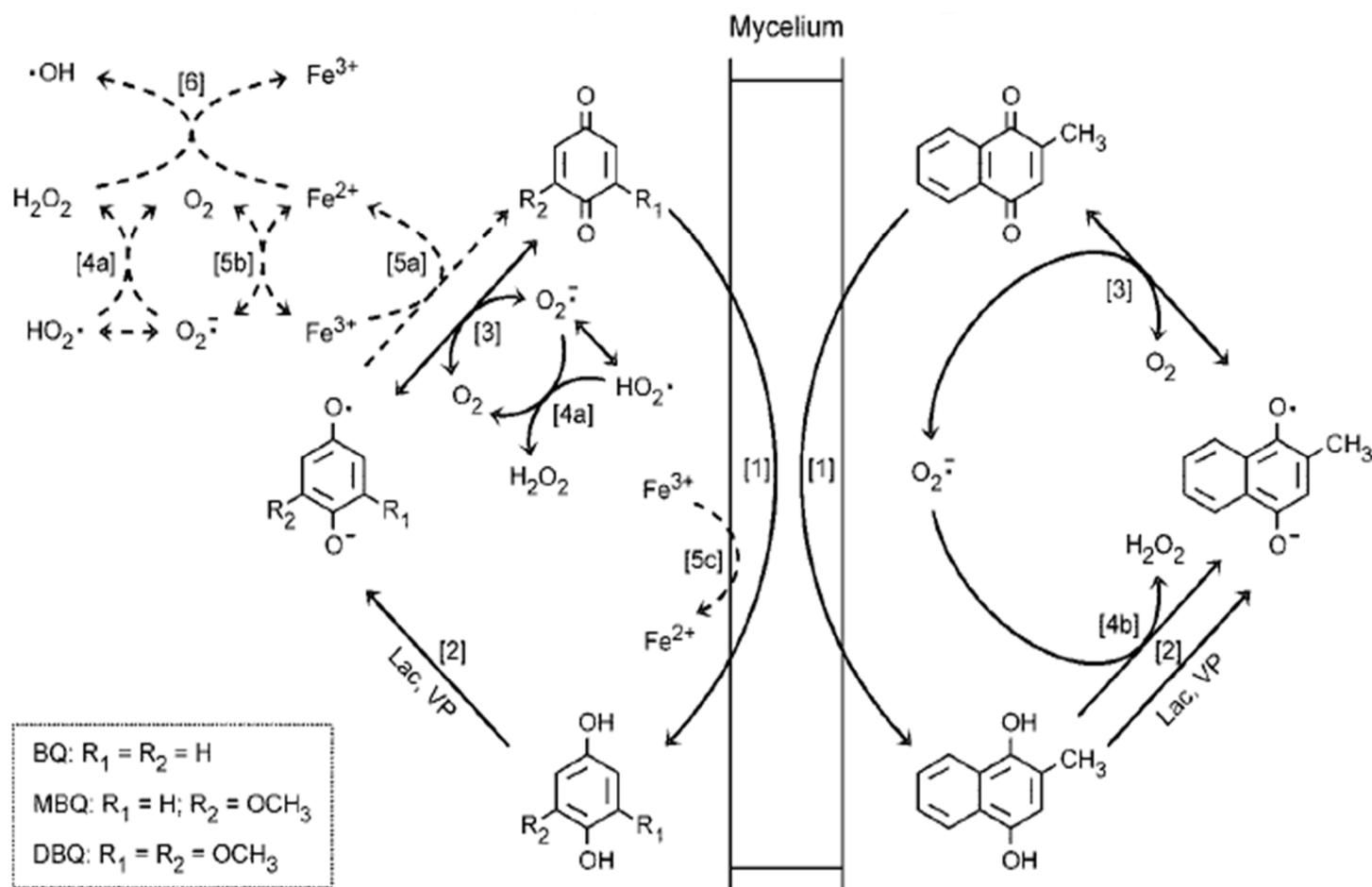


Figure 28 : Schéma des réactions de la voie des quinones aboutissant à la réaction de Fenton (Gomez-toribio et al., 2009).

La première réaction de cette voie se fait de façon intracellulaire ce qui aboutit sur une quinone réduite (1). Cette dernière va être ensuite oxydée par une laccase ou une versatile peroxydase (2) puis réagir avec du Fer III pour donner du Fer II et retourner à son état initial (5a). En parallèle, du peroxyde d'hydrogène est formé à partir d'anion superoxyde (4a). Il en ressort la production de Fer II et d'H₂O₂ qui peuvent interagir au sein de la réaction de Fenton.

Ces dernières peuvent être obtenues grâce à une étape d'auto-oxydation de la quinone via l'utilisation de l'anion superoxyde. La Q⁻ provoque la réduction du Fe³⁺ et donc la formation du Fe²⁺ qui entre dans la réaction de Fenton au contact du peroxyde d'hydrogène aboutissant à la synthèse de radicaux hydroxyles (Gomez-Toribio et al., 2009) (Figure 28). Les différentes stratégies mise en place par les champignons de pourriture blanche afin de permettre la diffusion des enzymes de dégradation, sont basées sur la production de radicaux hydroxyles. Cette espèce réactive de l'oxygène est capable de diffuser dans la paroi cellulaire des plantes, et ainsi provoquer la modification chimique aléatoire de tous les polymères. En effet, son action ne se limite pas à la lignine puisqu'ils agissent dans la dépolymérisation de la cellulose et de l'hémicellulose (Shah and Nerud, 2002). Toutes ces modifications vont initier la perméabilité du polymère ligneux, et ainsi permettre la diffusion des enzymes fongiques. A partir de ce stade, la pourriture blanche se propage au sein de la structure végétale jusqu'à sa digestion complète.

4.2.2 Les petites protéines sécrétées :

Les petites protéines sécrétées ou SSP (Small Secreted Proteins) sont définies grâce à diverses caractéristiques comme la présence d'un peptide signal de sécrétion et une séquence de moins de 300 acides aminés (Pellegrin et al., 2015). De plus, elles peuvent être restreintes aux séquences contenant une grande quantité de résidus cystéines (Martin et al., 2008). Le rôle de la plupart de ces protéines est à ce jour encore inconnue, ce qui peut représenter un important réservoir de nouvelles fonctions dans les mécanismes globaux de la dégradation de la biomasse végétale. En effet, à l'heure actuelle très peu d'études ont conduit à la caractérisation de ces protéines chez des organismes saprotrophes. Cependant, de récents travaux ont permis d'identifier quelques-unes de leurs fonctions. Par exemple, chez les champignons pathogènes elles sont essentielles à la pathogénicité, tandis que chez les champignons ectomycorhiziens elles prennent part à la régulation de l'expression des gènes de la plante afin de favoriser la formation de la symbiose (Frías et al., 2011; Plett et al., 2014). De plus chez les champignons dégradeurs de biomasse, elles peuvent intervenir directement dans la décomposition du matériel lignocellulosique comme c'est le cas pour les LPMO (Lytic Polysaccharides MonoOxygenase) et les glycoprotéines, ou indirectement en recrutant des enzymes de dégradation en milieu hydrophobe comme peuvent le faire les HSBA (Hydrophobic Binding Surface protein A).

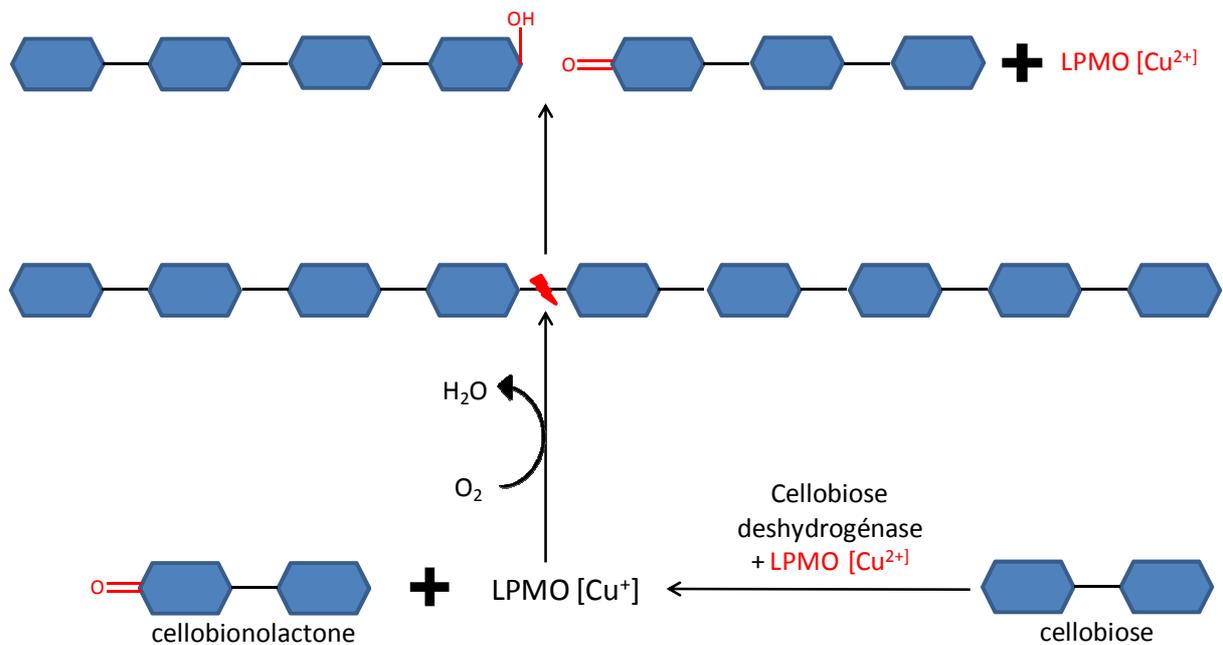


Figure 29 : Schéma de la dégradation de la cellulose par les LPMO (adapté de Vaaje-Kolstad et al., 2017).

Ces petites protéines doivent impérativement être réduites pour être activées. Cette étape pourrait être la résultante de l'action des cellobiose déshydrogénases. Une fois réduite la molécule d'oxygène va oxyder le Cu⁺ en Cu²⁺ permettant l'activation du dioxygène et une attraction d'un hydrogène de la liaison β-1,4.

4.2.2.1 Les Lytic Polysaccharide Mono Oxygenases :

Les LPMO ont été découvertes très récemment comme étant des enzymes capables d'oxyder des polysaccharides récalcitrants (Hemsworth et al., 2014). Elles sont classées dans quatre grandes classes au sein de la banque de données des CAZYmes les AA9, les AA10, les AA11 et les AA13 (Vaaje-Kolstad et al., 2017). Les LPMO sont toutes des enzymes cuivre-dépendantes catalysant l'oxydation des polysaccharides comme la chitine et la cellulose. A l'heure actuelle, la description de leur mécanisme d'action reste relativement imprécise, cependant il existe plusieurs scénarii possibles (Beeson et al., 2012; Kjaergaard et al., 2014). La première étape est une oxydation du Cu^+ en Cu^{2+} afin d'activer la molécule de dioxygène et former ainsi un anion superoxyde. Par la suite l'état redox de l'enzyme va être modifié tout au long de la voie métabolique conduisant, alternativement à la présence de Cu^+ et de Cu^{2+} . Ces mécanismes d'oxydoréduction entraînent l'absorption d'un hydrogène (des carbones 1 ou 4) de la liaison osidique suivi d'une hydroxylation sur le radical formé permettant le clivage de la liaison (Vaaje-Kolstad et al., 2017) (Figure 29).

La catalyse de cette réaction nécessite la présence de deux électrons délivrés par un donneur d'électron qui peut être de nature enzymatique ou non enzymatique. Il a été démontré qu'au moins trois systèmes sont efficaces dans la réduction des LPMO durant la dégradation du matériel lignocellulosique. La cellobiose déshydrogénase (CDH) qui est un flavocytochrome extracellulaire est capable de réduire les LPMO directement, tandis que les glucose-méthanol-choline oxydoréductases utilisent des phénols dérivant de plantes et de champignons comme médiateurs. Le troisième système fait directement intervenir ces derniers qui réduisent les LPMO même en absence d'enzyme régénératrice. C'est pourquoi, leur quantité est très rapidement réduite au cours du temps (Kracher et al., 2016). La co-occurrence des gènes codant pour des LPMO avec ceux des enzymes régénératrices au sein de nombreux génomes de champignon aux styles de vie différents, a permis de mettre en évidence une étroite collaboration entre la glucose déshydrogénase (GDH) et les LPMO. En effet la GDH en présence de médiateurs peut régénérer 1670 fois plus les LPMO que des réducteurs comme l'acide ascorbique ou l'acide gallique (Kracher et al., 2016). Les interactions des deux protéines assurent la spécificité et l'efficacité de la chaîne de transfert extracellulaire d'électrons, tandis que les composés phénoliques semblent être utilisés comme médiateurs aspécifiques en absence de la GDH.

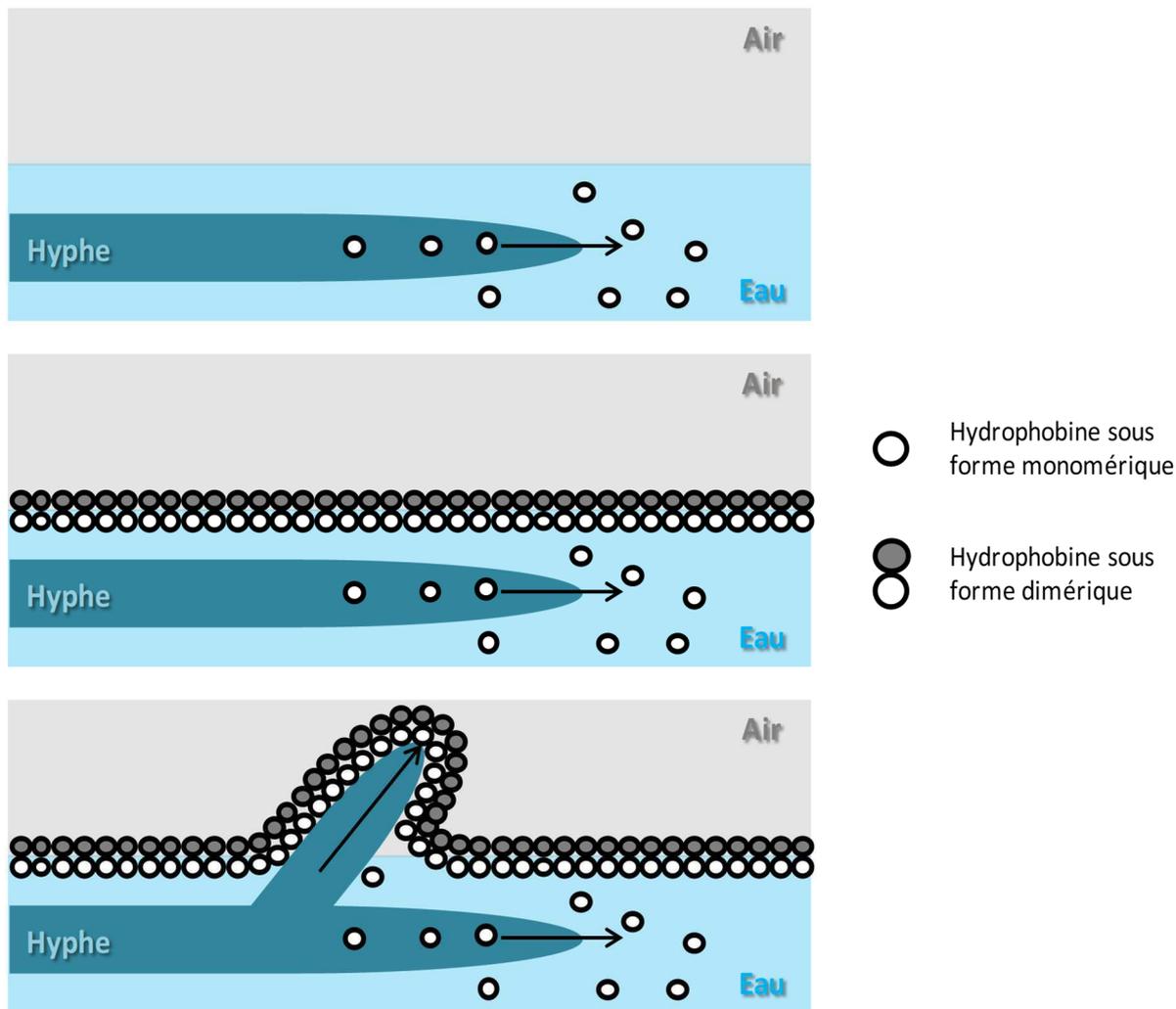


Figure 30 : Croissance aérienne des hyphes fongiques (adapté de Wessels, 2000).
 Les hyphes sécrètent des monomères d'hydrophobine dans le milieu (a). Ces monomères s'organisent en dimère à l'interface avec l'air et l'eau (b). La diminution de tension de surface permet une croissance aérienne des hyphes (c).

4.2.2.2 Les hydrophobines :

Les hydrophobines sont de petites protéines sécrétées (7 à 9 KDa) uniquement chez les champignons filamenteux, principalement des ascomycètes et des basidiomycètes. Cette famille de protéines se divise en deux groupes basés sur les propriétés physiques et chimiques des protéines : les hydrophobines de type I ayant une conformation relativement désordonnée qui en s'assemblant forme une monocouche très rigide et résistante, et les hydrophobines de type II de structure globulaire formant une monocouche moins résistante à divers stress (Delcour et al., 2015; Kwan et al., 2006). Ces deux classes de protéines sont produites par les ascomycètes, tandis que la classe I est uniquement présent chez les basidiomycètes. Bien que les hydrophobines soient séparées en deux types, elles partagent des caractéristiques communes se traduisant par la présence de 8 résidus cystéines conservés et le fait que tous les monomères sont amphipatiques permettant lors de leur assemblage de modifier les propriétés d'une surface donnée : un matériau hydrophobe deviendra hydrophile et inversement (Linder, 2009; Wösten and de Vocht, 2000). Lorsque le champignon se trouve dans un milieu aqueux, il sécrète des hydrophobines qui vont s'assembler en monocouche à l'interface air/eau. Ceci va permettre la croissance aérienne des hyphes grâce à la diminution de la tension de surface (Wessels, 2000) (Figure 30).

Il a été montré que les organismes pathogènes utilisaient ce type de mécanisme afin d'ancrer l'appressorium et ainsi parasiter la plante (Bretherton and Munholland, 1999; Tucker and Talbot, 2001). De plus, les hydrophobines impactent la composition de la paroi cellulaire du champignon. En effet, la délétion du gène codant pour l'hydrophobine SC3 chez *Schizophyllum commune* conduit à l'augmentation de mucilage (sucre soluble dans l'eau) et en particulier de β -1,3 glucan avec de simples résidus glucose reliés par des liaisons β -1,6 (Bretherton and Munholland, 1999). Récemment, des études ont montré que certaines de ces protéines, les HSBA, étaient capables de recruter des enzymes de dégradation de la biomasse.

4.2.2.3 Les Hydrophobic Binding Surface protein A (HSBA) :

Les protéines HSBA font partie du groupe des hydrophobines et sont donc des petites protéines ubiquitaires chez les champignons filamenteux. Chez *Aspergillus oryzae*, une cutinase (CutL1) interagit avec une HSBA (RoIA) permettant une stimulation de la dégradation du polybutylène succinate Co-adipate (PBSA) (Ohtaki et al., 2006).

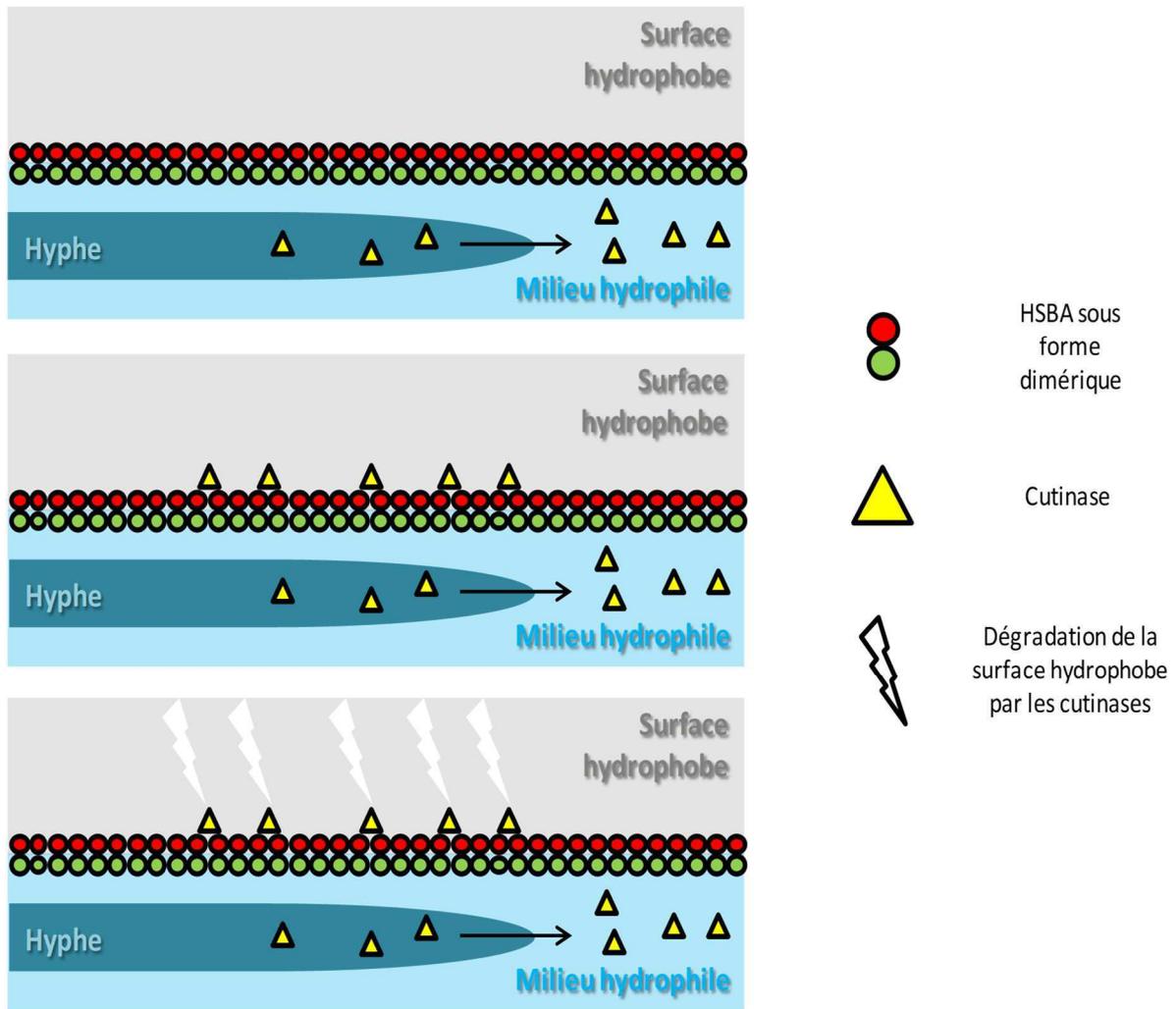


Figure 31 : Recrutement de cutinase par les HSBA permettant la dégradation de la surface hydrophobe (adapté de Ohtaki et al., 2006).

Les hyphes fongiques sécrètent dans le milieu des cutinase (a). Ces dernières sont ensuite recrutées au niveau de la monocouche de HSBA formé entre le milieu hydrophile et la surface hydrophobe (b). Suite à cela les cutinases catalysent la dégradation de la surface hydrophobe (c).

Le recrutement de la cutinase par RolA se réalise une fois que cette dernière est fixée sur le polymère. La stabilisation des interactions se fait grâce à l'intervention de trois acides aminés de la séquence de la cutinase (Asp142, Asp171 et Glu31) et deux de la séquence de RolA (His32 et Lys34). De plus, la force ionique du milieu est très importante car une trop forte concentration en NaCl perturbe l'interaction entre les deux protéines. Ce qui confirme le fait que les liaisons entre les deux protéines sont de nature ionique (Takahashi et al., 2015). Une étude récente suggère que d'autres acides aminés sont impliqués dans la formation du complexe CutL1-RolA : le résidu D30 de RolA et les résidus D34, D73 et D117 de CutL1 (Terauchi et al., 2017). *Aspergillus Oryzae* est donc capable de sécréter une protéine permettant le recrutement d'enzymes de dégradation, afin de stimuler celle-ci sur un milieu hydrophobe (Figure 31). Chez *Schizophyllum commune*, l'hydrophobine SC3 est incapable de s'auto-assembler en fibre amyloïde à l'interface d'eau et d'un solide hydrophobe. En effet, elle se stoppe sous une forme α -hélice intermédiaire (Scholtmeijer et al., 2009). La présence de trois polysaccharides : le Schizophyllan un $\beta(1-3),\beta(1-6)$ glucane, le Scleroglucan un second $\beta(1-3),\beta(1-6)$ glucane et le paramylon un $\beta(1-6)$ glucane promeut la formation de fibres amyloïdes par la protéine SC3. Cette induction se fait à l'interface entre deux matériaux hydrophile/hydrophobe, mais elle n'est pas spécifique aux glucanes car l'héparan sulfate a montré des propriétés d'induction similaires (Scholtmeijer et al., 2009). Les résultats récents mettent en avant le fait que les hydrophobines ne présenteraient pas une seule et unique fonction comme elles ont été décrites précédemment. En effet, leur principale caractéristique consistait à avoir une structure active permettant de diminuer les tensions de surface entre deux matériaux. Cependant, il semblerait qu'elles soient capables de lier de nombreuses macromolécules de types variés.

4.2.2.4 Les glycoprotéines :

Les glycoprotéines de faible poids moléculaire ont été décrites chez des organismes de pourriture brune et blanche (Tanaka et al., 2007). De par leur petite taille de 1,5 à 12 KDa, elles sont capables de pénétrer facilement les pores de la paroi des cellules végétales (Goodell, 2003). Chez les pourritures blanches, elles font partie des premières molécules à agir sur la lignine permettant sa déstabilisation. Leur action est donc essentielle au bon déroulement du processus global de dégradation, puisque sans celle-ci le diamètre des pores ne s'agrandirait pas.

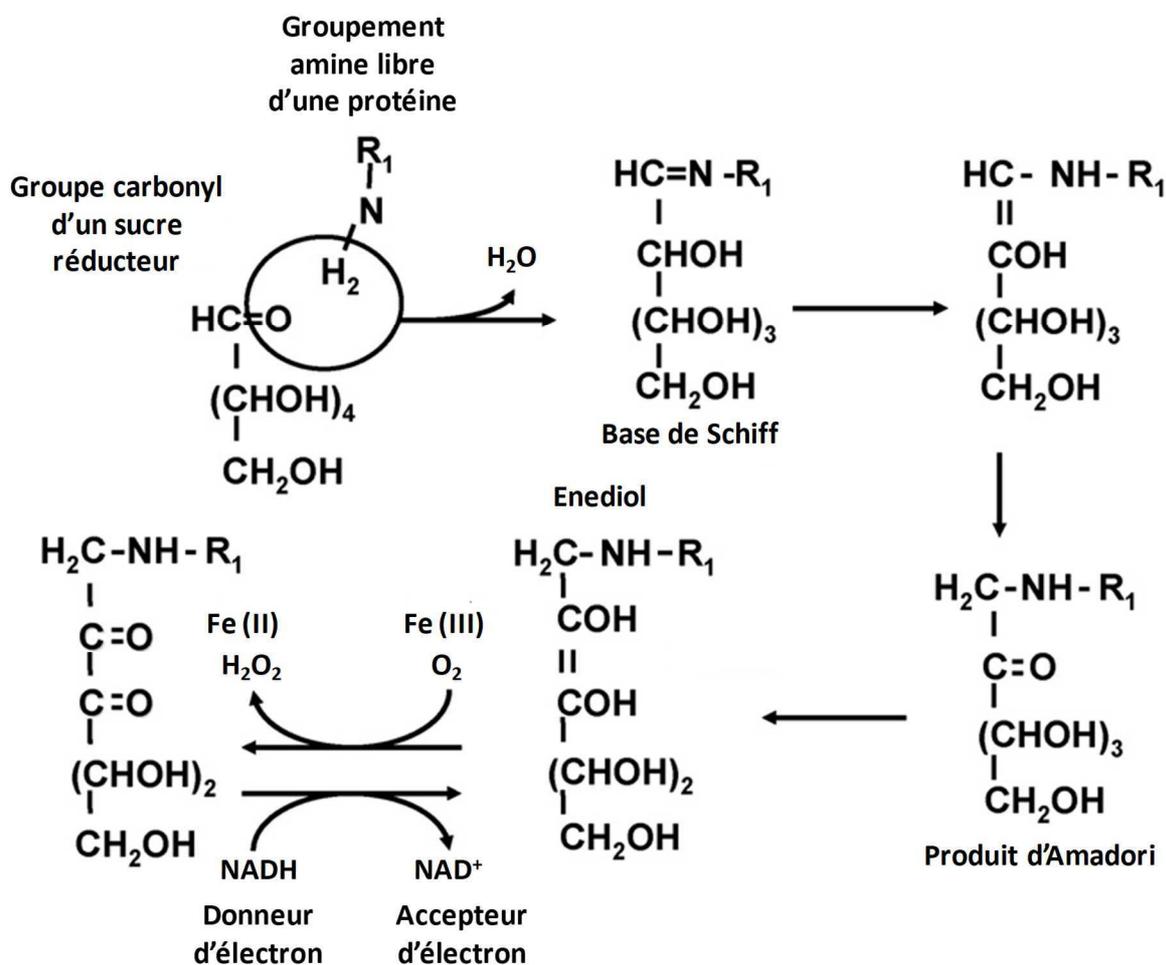


Figure 32 : Schéma de la réaction de glycation entre un sucre et une protéine aboutissant sur la réaction de Fenton (Tanaka et al., 2007).

La libération d'une molécule d'eau permet l'association d'un sucre réducteur avec une protéine via le groupe carbonyle du sucre et l'amine libre de la protéine conduisant à la formation d'une base de schiff. Ils s'opèrent ensuite des déplacements électroniques formant le 2,3-enediol. Cette molécule va interagir avec le Fer III et du dioxygène pour créer les réactifs de la réaction de Fenton.

Par conséquent, les enzymes comme les peroxydases ne pourraient pas atteindre leur substrat et réaliser leur cycle catalytique. *P. chrysosporium* produit des glycoprotéines durant son attaque, l'une d'entre elle a été décrite comme étant capable de produire des radicaux hydroxyles. Pour se faire, la glycoprotéine réalise une réaction non enzymatique de glycation (entre le sucre et la protéine) conduisant à la formation de 2,3-enediol. Ce dernier permet la réduction des ions Fe^{3+} en ion Fe^{2+} et la réduction du dioxygène en peroxyde d'hydrogène. Ces deux produits vont réagir ensemble au sein de la réaction de Fenton (Tanaka et al., 2007) (Figure 32). De plus, le 2,3-enediol oxydé peut être régénéré par la présence de réducteur tel que le NADH (Kido et al., 2015). Ceci engendrerait le maintien de ce composé et donc une production continue de radicaux hydroxyles. Ceci permettrait donc une attaque oxydative de la lignine et des polysaccharides des cellules végétales engendrant un élargissement du diamètre des pores de la paroi. Par conséquent, l'action enzymatique se retrouve facilitée grâce à ces petites protéines.

4.3 Les extractibles du bois, un impact négatif sur les processus de dégradation de la lignocellulose :

Les pourritures blanches doivent faire face à de nombreuses sources de stress provenant des espèces réactives de l'oxygène produites au cours des processus de dégradation, ou encore de la libération de molécules par le bois appelées extractibles. Ces molécules sont responsables de la résistance du bois et sont majoritairement présents dans le duramen (Windeisen and Wegener, 2009). Elles peuvent se fixer sur les enzymes de dégradation et ainsi inhiber leur activité. Elles sont également d'excellents pièges à métaux et aux espèces réactives de l'oxygène limitant à la fois l'activité des peroxydases extracellulaires de manière plus indirecte mais également en diminuant la disponibilité du Fer et de l' H_2O_2 nécessaire à la réaction de Fenton. L'apport de carbone n'est donc plus assuré pour le champignon et sa croissance en est affectée d'autant plus que ces molécules agissent également en perturbant l'intégrité de la membrane et l'homéostasie ionique. Tous ces processus ainsi que les stratégies développées par les champignons pour détoxiquer ces molécules sont décrits dans l'article ci-dessous :



British Mycological
Society promoting fungal science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fbr



Review

Antifungal activities of wood extractives



Nicolas VALETTE^{a,b}, Thomas PERROT^{a,b}, Rodnay SORMANI^{a,b},
Eric GELHAYE^{a,b}, Mélanie MOREL-ROUHIER^{a,b,*}

^aUniversité de Lorraine, Interactions Arbres–Microorganismes, UMR1136, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

^bINRA, Interactions Arbres–Microorganismes, UMR1136, F-54280 Champenoux, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 November 2016

Received in revised form

13 January 2017

Accepted 20 January 2017

Keywords:

Detoxification

Extractives

Lignolytic fungi

Wood

ABSTRACT

Extractives are non-structural wood molecules that represent a minor fraction in wood. However, they are source of diverse molecules putatively bioactive. Inhibition of fungal growth is one of the most interesting properties of wood extractives in a context of wood preservation, crop protection or medical treatments. The antifungal effect of molecules isolated from wood extractives has been mainly attributed to various mechanisms such as metal and free radical scavenging activity, direct interaction with enzymes, disruption of membrane integrity and perturbation of ionic homeostasis. Lignolytic fungi, which are microorganisms adapted to wood substrates, have developed various strategies to protect themselves against this toxicity. A better knowledge of these strategies could help both developing new systems for extractive removal in biomass valorization processes and using these molecules as antifungal agents.

© 2017 British Mycological Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Wood is an abundant renewable material composed of three valuable polymers, lignin, cellulose and hemicellulose. Most applications focus on the valorization of cellulose and hemicellulose as a resource for energy and fuel production (FitzPatrick *et al.*, 2010). Lignin, an alkyl-aromatic polymer comprising 15–30 % of biomass, is typically underused in selective conversion processes because of its intrinsic heterogeneity, which presents technical challenges for producing lignin-derived chemicals or biofuels (Beckham *et al.*, 2016). In nature, microorganisms have adapted to use this complex substrate as a carbon source. In particular, white-rot fungi are the only organisms capable of completely mineralizing

all components of wood, by secreting a complex enzymatic system to breakdown both cellulose and lignin. This enzymatic system is composed of Carbohydrate-Active Enzymes (CAZymes) that modify and breakdown oligo- and poly-saccharides, and peroxidases, laccases, and additional oxidative enzymes generating aromatic radicals that cleave diverse lignin ether linkages through non-enzymatic reactions (Martínez *et al.*, 2005). From an ecological point of view, these fungi are thus key actors in carbon cycling in the biosphere. Meta-analyses revealed that wood traits such as wood nitrogen and phosphorus concentrations, C:N ratio, lignin content, wood density and maximum tree height and diameter, are important drivers of variation in wood decomposition rates by microorganisms, mainly by governing fungal community

* Corresponding author. Université de Lorraine, Interactions Arbres–Microorganismes, UMR1136, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

E-mail address: Melanie.Morel@univ-lorraine.fr (M. Morel-Rouhier).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2017.01.002>

1749-4613/© 2017 British Mycological Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

and nutritional strategies (Pietsch et al., 2014; Schilling et al., 2015; van Geffen et al., 2010; Weedon et al., 2009; Yamashita et al., 2015). Moreover, wood decomposability could also be driven by the chemical composition of lignin and hemicelluloses, and the variability of extractives. The latter are non-cell wall small molecules that can be removed from wood by solvents. These compounds can be classified in 2 main groups: (1) aliphatic and alicyclic compounds (terpenes and terpenoids (including resin acids and steroids), esters of fatty acids, fatty acids and alcohols, alkanes) and (2) phenolic compounds (simple phenols, stilbenes, lignans, isoflavones, condensed tannins, flavonoids and hydrolyzable tannins) (Stenius, 2000). The composition of extractives in wood varies widely from species to species, and it depends on which part of the tree was used for the isolation, the geographical origin, and the season of sampling (Doussot et al., 2002; Kebbi-Benkeder et al., 2015; Prida and Puech, 2006). Moreover, the total amount of extractives in a given species depends on growth conditions like carbon dioxide concentrations or temperature (Kilpeläinen et al., 2005). Chemical extractives contents (organic, aqueous, tannic and phenolic) are generally higher in the heartwood, the more colored part of wood that is also more resistant to fungal attack (Schultz and Nicholas, 2000). Heartwood has been analyzed both by time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS) imaging and gas chromatography-mass spectrometry in *Cryptomeria japonica*. The results showed that the predominant constituent of heartwood extractives was ferruginol, a diterpene phenol, that was almost evenly distributed in heartwood tissue (in the tracheid cell walls, in the cell walls of the axial parenchyma cells and ray parenchyma cells, and also inside these parenchyma cells) (Imai et al., 2005). High amount of extractives, even more than in heartwood, have been detected in knotwood. This could be due to branch departure that constitutes potential weakness subjected to biotic and abiotic injuries, and to the natural ability of trees to self-prune, since species with high flavonoid content are generally bad pruning species (Kebbi-Benkeder et al., 2015). Extractives are synthesized by the tree during its life to protect itself against biotic and abiotic attack. While remaining within the dead wood, these molecules may be important controllers of decomposition rates. Indeed a close correlation has been established between wood durability and extractive content and diversity (Kirker et al., 2016; Pometti et al., 2010). In accordance, some fungal species as *Coniophora puteana*, *Heterobasidion annosum*, *Phellinus sulphurascens*, and *Phellinus weirii* were able to grow on and decay leached western red cedar (WRC) wood more readily than non-leached WRC. This observation has been correlated to the amount of extractive compounds, since leached wood contained ~80 % less extractives than non-leached WRC (Chedgy et al., 2009).

In this review, we describe the antifungal activities of wood extractives and the systems developed by wood decay fungi to bypass the inhibitory activity of these molecules.

2. Antifungal activity of wood extractives

The antifungal effect of some molecules found in wood extractives has been demonstrated at length in the literature.

Some examples are shown in Table 1. Their bioactivity has been attributed to various mechanisms such as metal and free radical scavenging activity, direct interaction with enzymes, disruption of membrane integrity and perturbation of ionic homeostasis (Fig. 1).

Inhibition of the degradative capabilities of rot fungi

Metal and free radical scavenging

The metal chelation property of wood extractives could drastically impact wood degradation activities of fungi, which use haem-containing class II peroxidases and copper-dependent laccases in the case of white-rot fungi, and Fenton-mediated radical production in the case of brown-rot fungi (Pollegioni et al., 2015). Troponoids are a family of compounds that possess antifungal activity both on white and brown-rot fungi, through the binding of ferric or ferrous iron to form $[\text{Fe}(\text{trop})_3]$ or $[\text{Fe}(\text{trop})_2]$ precipitates respectively, and the inhibition of Fe(III) reduction avoiding initiation of the Fenton reaction (Diouf et al., 2002; Yen et al., 2008). B-thujaplicin, one of the most known troponoids reduces the activity of laccase, but also other metal-containing enzymes as tyrosinase and lipoxigenase (Poma et al., 1999; Suzuki et al., 2000).

Besides metal scavenging, wood extractives can scavenge reactive oxygen species that are required for the enzymatic or oxidative process of wood decay. Indeed, lignocellulolytic enzymes are too large to penetrate into undecayed wood cell walls; therefore, they generate radical intermediates responsible for local lignin attack. Lignans and flavonoids have a high antioxidative potency and/or radical scavenging capacity (Willför et al., 2003). For example, the flavonoids 3,4',7,8-tetrahydroxyflavanone and teracacidin have antifungal activities, *in vitro* radical scavenging activity and are able to inhibit laccase activity on syringaldazine. The kinetics studies of laccase activity with teracacidin as an inhibitor suggest that teracacidin might not act directly on the active site of laccase, but instead inhibit the radical reaction after laccase forms a complex with syringaldazine (Mihara et al., 2005). Another study showed that phenol-rich extracts of different red maple (*Acer rubrum* L.) tissues possess high radical scavenging capacities against superoxide anion hydroxyl radical, peroxyl radical, hypochlorite ion, hydrogen peroxide and nitric oxide. In particular, stem bark extracts, which yielded the higher content of total phenol among the studied tissues, were the most efficient in radical scavenging (Royer et al., 2011).

Direct binding onto wood degradative enzymes

As described above, laccase activity can be reduced by the low availability of metal and reactive oxygen species due to extractive chelation. Moreover, docking analyses showed the ability of medicarpin, a phytoalexin identified in *Dalbergia congestiflora* heartwood, to inhibit *Trametes versicolor* laccase (PDB ID: 1GYC) by directly binding (1) to the T1 site of the protein, reducing bonding with lignin components, (2) at the O₂ channel site preventing O₂ reduction and (3) at the H₂O channel site blocking the release of water molecules (Martínez-Sotres et al., 2015, 2012). Few examples concern the inhibition of lignolytic peroxidases, which seem not to be affected. Indeed, phenolic load showed an inhibitory effect on laccase, while it was not

Table 1 – Examples of molecules from wood extractives that have been shown to inhibit fungal growth.

Molecule	Class	Tree species	Fungal species
14-deoxycoleon U salvinolone taxodione ^a	Diterpene	<i>Taxodium distichum</i>	<i>Trametes versicolor</i> ; <i>Fomitopsis palustris</i>
Ferruginol taxodone ^a	Diterpene	<i>T. distichum</i>	<i>F. palustris</i>
Alpha terpineol ^b	Monoterpene	<i>Cunninghamia konishii</i>	<i>T. versicolor</i>
Borneol ^b	Terpene	<i>C. konishii</i>	<i>T. versicolor</i> ; <i>Pestalotiopsis funereal</i>
Cedrol ^b	Sesquiterpene alcohol	<i>C. konishii</i>	<i>T. versicolor</i> ; <i>Gloeophyllum trabeum</i> ; <i>Lenzites betulina</i> ; <i>Laetiporus sulphureus</i> ; <i>Fusarium oxysporum</i> ; <i>Fusarium solani</i> ; <i>Rhizoctonia solani</i> ; <i>P. funereal</i> ; <i>Ganoderma australe</i>
Endo fenchol ^b	Terpene	<i>C. konishii</i>	<i>T. versicolor</i> ; <i>L. betulina</i>
Isorhapontigenin piceatannol ^c	Stilbene	<i>Picea abies</i>	<i>Antrodia sinuosa</i> ; <i>Antrodia xantha</i> ; <i>Coniophora puteana</i> ; <i>Fomitopsis pinicola</i> ; <i>Gloeophyllum sepiarium</i> ; <i>Phlebiopsis gigantea</i> ; <i>Serpula lacrymans</i> ; <i>Serpula himantoides</i>
Resveratrol ^c	Stilbene	<i>P. abies</i>	<i>Heterobasidion paviporum</i> ; <i>P. gigantea</i> ; <i>S. lacrymans</i>
Combretastatin ^d	Stilbene	<i>Combretum caffrum</i>	<i>R. solani</i> ; <i>Pyricularia oryzae</i>
Tetrahydroxyflavanone teracacidin ^e	Flavonoid	<i>Acacia auriculiformis</i>	<i>Phellinus badius</i>
Medicarpin ^f	Flavonoid	<i>Dalbergia congestiflora</i>	<i>T. versicolor</i>
Thujaplicin ^g	Troponoid	<i>Calocedrus macrolepis</i>	<i>L. betulina</i> ; <i>Pycnoporus coccineus</i> ; <i>T. versicolor</i> ; <i>Schizophyllum commune</i> ; <i>L. sulphureus</i> ; <i>Phaeolus schweinitzii</i> ; <i>G. trabeum</i> ; <i>F. pinicola</i> ; <i>G. australe</i> ; <i>P. funereal</i> ; <i>F. solani</i> ; <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ; <i>Trichoderma viride</i> ; <i>Penicillium citrinum</i> ; <i>Aspergillus niger</i>
Tropolone ^h	Troponoid	Cupressaceous trees	<i>Postia placenta</i>
Cinnamaldehyde ^{i,j}	Phenylpropanoid	<i>Cinnamomum</i> sp.	<i>Aspergillus flavus</i> ; <i>L. sulphureus</i> ; <i>T. versicolor</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; <i>A. niger</i> ; <i>Candida albicans</i> ; <i>C. gloeosporioides</i> ; <i>R. solani</i> ; <i>F. solani</i> ; <i>G. australe</i> ; <i>L. betulina</i> ; <i>Phytophthora capsici</i>
Dihydrodehydrodiconiferyl alcohol 9'-O-β-D-glucoside ^k	Neolignan glucoside	<i>Styrax japonica</i>	<i>C. albicans</i> ; <i>C. parapsilosis</i> ; <i>Trichosporon beigelii</i> ; <i>Malassezia furfur</i>
Liriodenine ^l	Isoquinoline alkaloid	<i>Michelia formosana</i>	<i>L. betulina</i> ; <i>T. versicolor</i> ; <i>L. sulphureus</i> ; <i>G. trabeum</i> ; <i>F. pinicola</i>

The tree species from which the molecules derived, and the fungal species tested are reported. ^aKusumoto et al. (2010); ^bCheng et al. (2011); ^cHedenstrom et al. (2016); ^dMa et al. (2016); ^eMihara et al. (2005); ^fMartinez-Sotres et al. (2012); ^gYen et al. (2008); ^hDiouf et al. (2002); ⁱSchreaz et al. (2016); ^jHu et al. (2013); ^kChoi et al. (2012); ^lWu et al. (2012).

observed in the case of peroxidases, which are still active (Ntougias et al., 2015). Most studies have focused on the inhibitory effect of these molecules on enzymatic cellulolysis, because of its biotechnological and economic interest in biomass conversion to useful chemicals as biofuel for example. This inhibitory effect on CAZYmes is also important to explain the antifungal properties of wood extractives, since it prevents fungi to access sugar sources. Cellulase deactivation and precipitation were detected with vanillin addition and investigation of compounds with similar structure of vanillin on cellulose activity demonstrated that aldehyde and phenolic hydroxyl groups of vanillin are responsible for the inhibitory effect (Li et al., 2014). Several other phenolic compounds inhibit cellulose conversion with various efficiencies depending on the presence of hydroxyl, carbonyl and methoxy groups in the molecules or on their oxidation state (Oliva-Taravilla et al., 2015; Qin et al., 2016). Moreover, oligomeric phenolics could exert more inhibition on enzymatic cellulolysis than simple phenolics by reversibly complexing cellulases or precipitating them from solution, and by adsorbing onto cellulose limiting access of CAZYmes to

their substrate (Kim et al., 2011; Oliva-Taravilla et al., 2016; Tejirian and Xu, 2011). Accordingly it has been shown that polymeric lignins (such as tannic acid) resulted in severe inhibition of cellobiohydrolase 1 (CBH1) β-glucosidase 1 (BGL1) and endoglucanase 2 (EG2) (Mhlongo et al., 2015). The strength of the inhibition depends on the type of enzyme and the microorganism from which the enzyme was derived. For example the β-glucosidase from *Aspergillus niger* is more resistant to phenol compared to the ones from *Trichoderma reesei* (Ximenes et al., 2011).

Disruption of fungal cell wall and plasma membrane

Cinnamaldehyde, which occurs naturally in the bark and leaves of cinnamon trees possesses antifungal activity against many fungi including white rot (*Trametes versicolor* and *Lenzites betulina*) and brown-rot fungi (*Laetiporus sulphureus*) (Shreaz et al., 2016). This molecule, at lethal concentration, alters cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* by inhibition of cell wall synthesizing enzymes: chitin synthase and β-(1,3)-glucan synthase (Bang et al., 2000). Microscopic examination of cinnamaldehyde

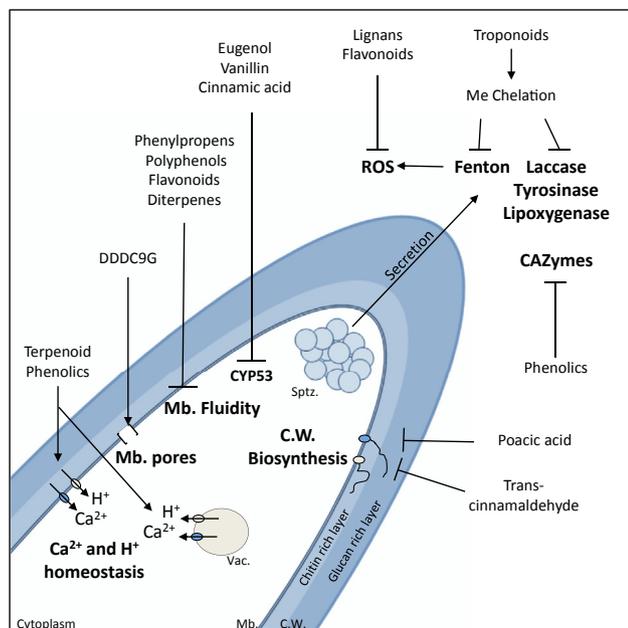


Fig. 1 – Mechanisms of extractive's toxicity summarized at the tip of a fungal hyphae. When different molecules from a same chemical family share the same effect, the name of the chemical family is mentioned. C.W.: cell wall, Mb.: plasma membrane, Vac.: vacuole, Sptz.: Spitzenkörper, ROS: reactive oxygen species, Me: metallic ions, DDDC9G: dihydrodehydrodiconiferyl alcohol 9'-O-3-D-glucoside.

treated cells of *Candida* showed alterations in cellular morphology and damage to both cell wall and plasma membrane, resulting in alteration of ergosterol content and ion leakage (Shreaz et al., 2013, 2011). In order to understand the mechanisms involved in toxicity of cinnamaldehyde, several structural studies have demonstrated that antifungal activity is correlated with the length of side chain and presence of aldehyde group conjugated with double bond (Cheng et al., 2008). Another compound (poacic acid) derived from lignocellulosic hydrolyzates of grasses, alters the growth of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Alternaria solani* by inhibiting β -1,3-glucan synthesis, causing rapid cell lysis (Piotrowski et al., 2015). Moreover, the action of β -thujaplicin onto *L. sulphureus* resulted in severe cell wall collapse on the hyphae and terminal chlamydospore, indicating that fungal cell wall might be disintegrated leading to massive cytoplasm leakage (Yen et al., 2008). Beside the cell wall, the plasma membrane can be directly targeted by wood-derived molecules. As an example, the antifungal effect of dihydrodehydrodiconiferyl alcohol 9'-O-3-D-glucoside has been attributed to its capacity to form pores within the plasma membrane, resulting in osmolarity changes and reduced cell size (Choi et al., 2012). Many other examples concerning molecules from plant extracts showed such an effect on the fungal membrane. Studies on two phenylpropenes safrole and dillapiol from essential oils of *Sassafras albidum*, and *Piper* spp. suggest that the allyl chain coupled to aromatic ring of the molecules confer those lipophilic properties (Guerrini et al., 2009). Thus they could interact with fatty-acid-chain constituents of the

membrane lipid bilayers and alter the fluidity and permeability of cellular membranes (de Almeida et al., 2009). However, some other molecules belonging to different chemical groups can have the same effect. Indeed, the polyphenolic compound curcumin, the flavonoid isoquercitrin and the diterpene clerodane underlie disruption of *Candida albicans* plasma membrane (Bhattacharya et al., 2015; Lee and Lee, 2014; Yun et al., 2015).

Perturbation of ion homeostasis

Another efficient way by which extractives can induce fungal cell death is the dysregulation of ion homeostasis (Zhang et al., 2012). Carvacrol was the major monoterpene identified in heartwood extracts of yellow-cedar, Monterey cypress, and their hybrid Leyland cypress (Kelsey et al., 2015). It is a terpenoid phenol possessing an antifungal activity against various *Candida* sp., *S. cerevisiae* but also rot fungi *Trametes hirsuta*, *Schizophyllum commune*, *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes versicolor* and *Coniophora puteana* (Dalleau et al., 2008; Voda et al., 2004; Zhang et al., 2012). Its mechanism of action has been studied in the yeast *S. cerevisiae*. Carvacrol exposition resulted in rapid transitory influx of Ca^{2+} from the extracellular medium, from the vacuole and other intracellular stores. This Ca^{2+} burst has also been highlighted for other terpenoid phenols (eugenol and thymol) but with less intensity (Rao et al., 2010). Moreover, an acidification of the cytosol and an alkalization of the vacuole were observed suggesting a loss of proton out of the vacuolar lumen. Carvacrol disrupts both Ca^{2+} and H^+ homeostasis in yeast and this leads to loss of cell viability. Furthermore, clustering analysis of microarray data revealed that the transcriptional responses to carvacrol most closely resembled the Ca^{2+} stress response and the effect of rapamycin, which is an inhibitor of the TOR signaling pathway that controls cell growth in response to nutrients and stress by regulating mRNA transcription and stability, protein translation, ribosome biogenesis and autophagy, and nutrient transport.

At sub-lethal concentrations, cinnamaldehyde, a compound found in the bark of cinnamon trees, enters periplasm and inhibits proton pumping activity of fungal plasma membrane H^+ -ATPase by nearly 40 %. Thus, the resulting depletion of ATP and the disturbance of the electrochemical proton gradient may lead to deleterious effects on the growth rate (Shreaz et al., 2016). Cinnamaldehyde has also been shown to perturb Ca^{2+} homeostasis by inducing Ca^{2+} efflux in *Phytophthora capsici* for example (Hu et al., 2013).

Chaotropic activity

While some toxic substances act on individual and specific site-of-action, the inhibitory effect of some molecules rather results from their impact on macromolecule–water interactions defined as chaotropicity. Chaotropicity is the primary cause of product-induced inhibition of microbial growth and metabolism for many compounds found within the extractives (such as alcohols and phenolics) (Cray et al., 2015). Phenol, benzyl alcohol and vanillin are strongly chaotropic at concentration of 1 M, causing an energetic increase of respectively 143, 90.2 and 174 $\text{kJ kg}^{-1}\text{mole}^{-1}$ (Cray et al.,

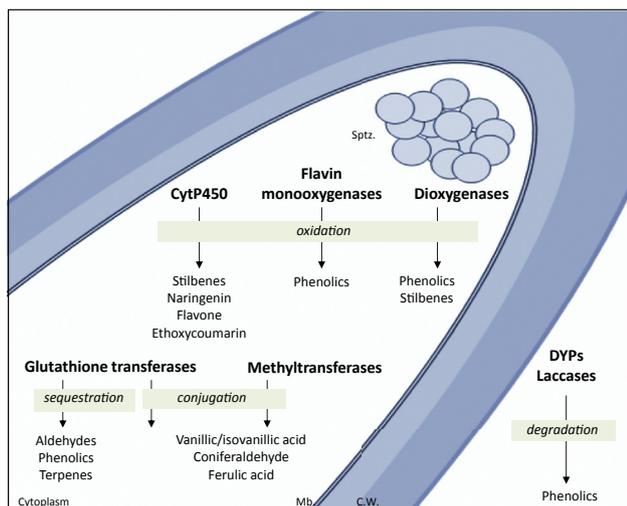


Fig. 2 – Pathways for the detoxification of wood extractives in lignolytic fungi. C.W.: cell wall, Mb.: plasma membrane, Sptz.: Spitzkörper, DYP: dye-decolorizing heme peroxidase.

2013b; Hallsworth et al., 2003). These molecules can inhibit key enzymes resulting in cellular redox imbalance and reduced energy generation (de Almeida et al., 2009). They can also disorder macromolecular structures affecting the integrity of biological membranes and other macromolecular systems inducing global oxidative stress and lipid peroxidation. It is even known that chaotropy not only limits life processes but can render potential habitats sterile (Cray et al., 2015, 2013a).

Other effects

Beside the main mechanisms of action described above, other targets of wood extractives have been identified in the last few years. For example, combretastatin A-4, a small organic molecule found in the bark of the African bush willow tree *Combretum caffrum* was identified as new potential fungicide exerting a potent inhibition of tubulin polymerization by binding to the colchicine site of tubulin and thus perturbing many cellular processes including cell structure, cell movement, intracellular transportation, and cell division (Ma et al., 2016). In *Aspergillus flavus*, the addition of resveratrol affects expression of genes related to developmental and secondary metabolic processes, resulting in decreased aflatoxin production, conidia formation and mycelial development (Wang et al., 2015). Another study revealed that vanillin, one of the major phenolic compounds produced by degradation of lignin inhibits translation, causes the accumulation of cytoplasmic mRNP granules and induces morphological phenotypes similar to those induced by mutations in the cytosolic protein component of the large ribosomal subunit in *S. cerevisiae* (Iwaki et al., 2013).

Eugenol, vanillin and cinnamic acid are also able to inhibit the activity of a cytochrome P450 monooxygenase (CYP450) from the CYP53 class that plays an important role in benzoate detoxification pathway (Harwood and Parales, 1996; Korošec et al., 2014; Podobnik et al., 2008).

3. Fungal strategies of resistance to wood extractive's toxicity

Stress responses

Since all the mechanisms described above generate an intracellular stress, the first response of fungi to the presence of these molecules is a global stress response. In particular, genes coding for proteins from the antioxidant system such as methionine sulfoxide reductase, catalase, peroxiredoxins or glutathione reductase, have been found up-regulated in *P. chrysosporium* in presence of oak extractives. The gene coding for YAP1, which is a transcription factor regulating many actors of the oxidative stress response was also induced in this condition (Thuillier et al., 2014). Additionally, in response to chaotropy, microbial cells synthesize and accumulate low-molecular-weight hydrophilic compounds such as glycerol or trehalose for example that act as protectants of macromolecular structures independently of osmotic processes (Bhaganna et al., 2010; de Lima Alves et al., 2015). Other microbial responses to chaotropy-induced stress include the up-regulation of genes coding for proteins involved in protein stabilization (chaperonins, heat-shock proteins), such as stabilization of nucleic acid and membrane structures (Bhaganna et al., 2010; Cray et al., 2015).

Extracellular degradation

The ability of white-rot fungi to secrete an enzymatic system makes them efficient candidates to prevent extractive toxicity by degrading the molecules before their cellular penetration (Fig. 2). This ability has been demonstrated in a biotechnological context by considering fungi as a biological pretreatment for decreasing the content of compounds responsible for pitch deposition during manufacture of paper pulp. Indeed, white-rot fungi are able to eliminate from 60 to 100 % of triglycerides, esterified sterols and other lipophilic compounds from softwood (Dorado et al., 2000; Gutierrez et al., 1999; Martínez-Iñigo et al., 2001). In nature, laccases could be key actors of the extracellular degradation of extractives. They are copper-dependent enzymes that catalyze the oxidation of various phenol derivatives including wood extractives as the polyphenolic catechin, one major compound of beech extracts, hydroquinones, guaiacol, 4-hydroxyindole, 2,6-dimethoxyphenol, ferulic acid and catechol (Eggert et al., 1996; Martínková et al., 2016; Tagger et al., 1998). The sharp induction of laccase production, correlated with the important degradation of extractives from *Fagus sylvatica* wood at the initial stages of wood colonization by *Trametes versicolor*, confirms that these enzymes act to remove these compounds before the action of the other wood-degrading systems (peroxidases and polysaccharides hydrolases) that are still repressed at this step (Lekounougou et al., 2008). Lignin-derived phenols can act as laccase mediators for the removal of lipophilic compounds mainly found in coniferous wood extractives and in the derived paper pulp (Gutierrez et al., 1999; Karlsson et al., 2001). Moreover, different compounds as xylidine, liginosulfonate and veratryl alcohol stimulate laccase production in the white rot *Pycnoporus cinnabarinus* (Eggert et al., 1996). Data

concerning the involvement of the lignolytic enzymes as manganese and lignin peroxidases in wood extractive removal are scarcer. Their role in pollutant degradation has been rather described (Cameron et al., 2000). Nevertheless, transcriptomic data highlighted induction of genes coding for these enzymes in *Phanerochaete chrysosporium* in presence of oak acetonic extracts (Thuillier et al., 2014). The main difference between *Phanerochaete carnososa* and *P. chrysosporium* was the higher ability of *P. carnososa* to grow on and transform phenolics of heartwood samples from softwood species containing high initial phenolic contents. This could be partially explained by difference in the distribution of LiP and MnP genes between the two species (Suzuki et al., 2000). Dye-decolorizing heme peroxidase (DyPs) are also promising biocatalysts due to their ability to catalyze the transformation of a range of recalcitrant substrates. Their contribution to lignin degradation is unlikely because of the low activity on high redox-potential substrates, but they are rather efficient oxidative enzymes on various compounds as 2,6-dimethoxyphenol, guaiacol, other substituted phenols, azo dyes (such as Reactive Black 5), ascorbic acid, b-carotene, veratryl alcohol and even lignin model dimers (Liers et al., 2013; Linde et al., 2015).

Intracellular detoxification

Facing the large diversity of potential toxic compounds, lignolytic fungi have also developed efficient intracellular detoxification pathways (Fig. 2). Basically, these pathways comprise 3 main steps. The first step corresponds to the activation of a molecule often through oxidation, the second one to a conjugation step, and the third one either to excretion or vacuolar storage of the molecule to be eliminated (Morel et al., 2013). The CytP450_{ome} (Cytochrome P450 monooxygenases) and the GST_{ome} (Glutathione transferases) respectively involved in the first and the second step of this process, are extended enzyme families in wood decay fungi. This extension could explain the increased ability of some fungi to cope with toxic molecules. Accordingly, *P. carnososa*, which removes a higher proportion of phenolic extractives in heartwood samples of softwood than *P. chrysosporium*, shows an expansion of CYP64 and CYP52 families and a high expression of the genes of these clans when grown on woody substrates (Suzuki et al., 2012). Some CytP450 from *P. chrysosporium* are able to oxidize wood-derived compounds as naringenin, flavone and 7-ethoxycoumarin (Hirose et al., 2011; Kasai et al., 2010, 2009; Santos et al., 2013). Moreover, 12 CytP450 genes were induced when *P. chrysosporium* was cultivated in presence of oak acetonic extracts (Thuillier et al., 2014). The high number of CytP450 genes likely reflects substrate specificity, as shown by using a functional library of *Postia placenta* CytP450 in yeast. In particular, this analysis revealed the ability of CytP450 from the CYP53 family to convert stilbene derivatives (Ide et al., 2012).

The following detoxification step involves conjugating enzymes as glutathione transferases for example. Globally fungal GSTs interact with wood extracts and it has been suggested that this interaction is closely related to the chemical composition of the extracts (Deroy et al., 2015). Members of the GSTFuA class from *P. chrysosporium* showed ligandin

properties with wood compounds as coniferaldehyde, vanillin, syringaldehyde and catechin hydrate (Mathieu et al., 2013, 2012). This interaction occurs at the glutathione binding site of GSTFuAs, preventing the conjugating activity of the enzymes. In this case, GSTs could rather have a role in the sequestration of toxic molecules. GSTs from the omega class (PcGSTO3 and PcGSTO4) interact with terpenes from *Fagus sylvatica* acetonic extracts, particularly with caryophyllene oxide and carene, the latter being an antifungal agent against various fungal strains (Cavaleiro et al., 2006; Meux et al., 2013). It has also been shown that gallic acid, epicatechin and quercetin modify the thermostability and activity of *Trametes versicolor* GSTOs (Deroy et al., 2015).

Other conjugating enzymes use wood compounds as substrates. This is the case for two O-methyltransferases from *P. chrysosporium* that methylate vanillic acid, coniferyl alcohol, ferulic acid, isovanillic acid (Thanh Mai Pham and Kim, 2016).

Beside this system, other enzymes participate to the intracellular degradative process of the toxic wood-derived molecules. In aerobic conditions, oxygenases activate O₂ and arrange it to generate hydroxylated compounds such as proto-catechuate. This first step called peripheral degradation is then followed by central-ring cleavage catalyzed by ring-cleaving dioxygenases (Fuchs et al., 2011). Upon addition of vanillin to *P. chrysosporium*, up-regulation of homogentisate 1,2-dioxygenase, 1,4-benzoquinone reductases, aldehyde dehydrogenase, and aryl-alcohol dehydrogenase was observed (Shimizu et al., 2005). Dioxygenase coding genes were also found up-regulated in *P. chrysosporium* in presence of oak extractives (Thuillier et al., 2014). The functional characterization of *Phanerochaete sordida* mutants overexpressing 1,4-benzoquinone reductase and homogentisate 1,2-dioxygenase show a significant acceleration in vanillin degradation (Mori et al., 2016). Flavin-containing monooxygenases (FMOs) catalyze the o-hydroxylation of a series of phenolic compounds such as phenol and catechol (Nakamura et al., 2012). Hydroxylation reactions of phenolic compounds to their corresponding o-diol derivatives are important for the biodegradation of various aromatic compounds (Ballou et al., 2005; Hao et al., 2009; Vaillancourt et al., 2006). It has even been demonstrated that *Trametes versicolor* is capable of growing with phenol as its sole carbon source and phenol hydroxylases play an important role in its catabolic system (Alexieva et al., 2010; Yemendzhiev et al., 2008).

Oxygenases act also on stilbene as resveratrol. The *Ustilago maydis* resveratrol cleavage oxygenase 1, for which homologs have been also identified in *Aspergillus fumigatus*, *Chaetomium globosum* and *Botryotinia fuckeliana*, cleaves the interphenyl C α -C β double bond of the phytoalexin resveratrol and its derivative piceatannol (Brefort et al., 2011). Additionally, fungal oxifunctionalization reactions of some common terpene substrates, such as limonene or valencene, might likewise be catalyzed by dioxygenases rather than by CytP450 enzymes (Kringes et al., 2009).

4. Conclusion

Wood is a renewable source of molecules with diverse chemical and biological properties. In this review, we have focused

on extractives that have antifungal properties, and thus could be new source of molecules to be used in medicine, agronomy or wood preservation. The antifungal effect of some isolated molecules has been demonstrated many times. However, the combining actions of several molecules accelerate the fungal death (Schultz and Nicholas, 2002). The use of whole wood extracts could thus be promising for both increasing antifungal efficiency and decreasing the probability for fungi to develop resistance. It is thus necessary to understand the mechanisms by which fungi cope with these toxic molecules. Lignolytic fungi are very good models since they are highly resistant to these molecules, they are more or less specific for wood species and they act differentially along the degradation process (Bässler et al., 2012). Indeed, fungal decay of wood could be seen as a succession of heterotrophic events mediated by various fungal populations, which have adapted their xenome to various wood features. Though the extractives have been shown to modify fungal activity, questions remain about the functional traits that explain changes in microbial communities during the decay and decomposition of wood (Prewitt et al., 2014).

Acknowledgement

This work was supported by the Laboratory of Excellence ARBRE (ANR-11-LABX-0002-01) and the Lorraine Region Council.

REFERENCES

- Alexieva, Z., Yemendzhiev, H., Zlateva, P., 2010. Cresols utilization by *Trametes versicolor* and substrate interactions in the mixture with phenol. *Biodegradation* 21, 625–635. <http://dx.doi.org/10.1007/s10532-010-9330-7>.
- Ballou, D.P., Entsch, B., Cole, L.J., 2005. Dynamics involved in catalysis by single-component and two-component flavin-dependent aromatic hydroxylases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 590–598. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.09.081>.
- Bang, K.-H., Lee, D.-W., Park, H.-M., Rhee, Y.-H., 2000. Inhibition of fungal cell wall synthesizing enzymes by *trans*-cinnamaldehyde. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 1061–1063. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.64.1061>.
- Bässler, C., Müller, J., Svoboda, M., Lepšová, A., Hahn, C., Holzer, H., Pouska, V., 2012. Diversity of wood-decaying fungi under different disturbance regimes—a case study from spruce mountain forests. *Biodivers. Conserv.* 21, 33–49. <http://dx.doi.org/10.1007/s10531-011-0159-0>.
- Beckham, G.T., Johnson, C.W., Karp, E.M., Salvachúa, D., Vardon, D.R., 2016. Opportunities and challenges in biological lignin valorization. *Curr. Opin. Biotechnol.* 42, 40–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2016.02.030>.
- Bhaganna, P., Volkers, R.J.M., Bell, A.N.W., Kluge, K., Timson, D.J., McGrath, J.W., Ruijsenaars, H.J., Hallsworth, J.E., 2010. Hydrophobic substances induce water stress in microbial cells: hydrophobic substances induce cellular water stress. *Microb. Biotechnol.* 3, 701–716. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00203.x>.
- Bhattacharya, A.K., Chand, H.R., John, J., Deshpande, M.V., 2015. Clerodane type diterpene as a novel antifungal agent from *Polyalthia longifolia* var. *pendula*. *Eur. J. Med. Chem.* 94, 1–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.02.054>.
- Brefort, T., Scherzinger, D., Limón, M.C., Estrada, A.F., Trautmann, D., Mengel, C., Avalos, J., Al-Babili, S., 2011. Cleavage of resveratrol in fungi: characterization of the enzyme Rco1 from *Ustilago maydis*. *Fungal Genet. Biol.* 48, 132–143. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2010.10.009>.
- Cameron, M.D., Timofeevski, S., Aust, S.D., 2000. Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 751–758.
- Cavaleiro, C., Pinto, E., Goncalves, M.J., Salgueiro, L., 2006. Antifungal activity of *Juniperus* essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. *J. Appl. Microbiol.* 100, 1333–1338. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02862.x>.
- Chedgy, R.J., Lim, Y.W., Breuil, C., 2009. Effects of leaching on fungal growth and decay of western redcedar. *Can. J. Microbiol.* 55, 578–586. <http://dx.doi.org/10.1139/W08-161>.
- Cheng, S.-S., Lin, C.-Y., Gu, H.-J., Chang, S.-T., 2011. Antifungal activities and chemical composition of wood and leaf essential oils from *Cunninghamia konishii*. *J. Wood Chem. Technol.* 31, 204–217. <http://dx.doi.org/10.1080/02773813.2010.515049>.
- Cheng, S.-S., Liu, J.-Y., Chang, E.-H., Chang, S.-T., 2008. Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. *Bioresour. Technol.* 99, 5145–5149. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.013>.
- Choi, H., Cho, J., Jin, Q., Woo, E.-R., Lee, D.G., 2012. Antifungal property of dihydrodehydrodiconiferyl alcohol 9'-O- β -D-glucoside and its pore-forming action in plasma membrane of *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta BBA – Biomembr.* 1818, 1648–1655. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbame.2012.02.026>.
- Cray, J.A., Bell, A.N.W., Bhaganna, P., Mswaka, A.Y., Timson, D.J., Hallsworth, J.E., 2013a. The biology of habitat dominance; can microbes behave as weeds?: the biology of habitat dominance. *Microb. Biotechnol.* 6, 453–492. <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.12027>.
- Cray, J.A., Russell, J.T., Timson, D.J., Singhal, R.S., Hallsworth, J.E., 2013b. A universal measure of chaotropicity and kosmotropicity: a universal measure of chao- and kosmotropicity. *Environ. Microbiol.* 15, 287–296. <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.12018>.
- Cray, J.A., Stevenson, A., Ball, P., Bankar, S.B., Eleutherio, E.C., Ezeji, T.C., Singhal, R.S., Thevelein, J.M., Timson, D.J., Hallsworth, J.E., 2015. Chaotropicity: a key factor in product tolerance of biofuel-producing microorganisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* 33, 228–259. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2015.02.010>.
- Dalleau, S., Cateau, E., Bergès, T., Berjeaud, J.-M., Imbert, C., 2008. In vitro activity of terpenes against *Candida* biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* 31, 572–576. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.01.028>.
- de Lima Alves, F., Stevenson, A., Baxter, E., Gillion, J.L.M., Hejazi, F., Hayes, S., Morrison, I.E.G., Prior, B.A., McGenity, T.J., Rangel, D.E.N., Magan, N., Timmis, K.N., Hallsworth, J.E., 2015. Concomitant osmotic and chaotropicity-induced stresses in *Aspergillus wentii*: compatible solutes determine the biotic window. *Curr. Genet.* 61, 457–477. <http://dx.doi.org/10.1007/s00294-015-0496-8>.
- de Almeida, R.R.P., Souto, R.N.P., Bastos, C.N., da Silva, M.H.L., Maia, J.G.S., 2009. Chemical variation in *Piper aduncum* and biological properties of its dillapiole-rich essential oil. *Chem. Biodivers.* 6, 1427–1434. <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.200800212>.
- Deroy, A., Saiag, F., Kebbi-Benkeder, Z., Touahri, N., Hecker, A., Morel-Rouhier, M., Colin, F., Dumarcay, S., Gérardin, P., Gellhaye, E., 2015. The GSTome reflects the chemical environment of white-rot fungi. *PLoS One* 10, e0137083. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0137083>.

- Diouf, P.N., Delbarre, N., Perrin, D., Gerardin, P., Rapin, C., Jacquot, J.P., Gelhaye, E., 2002. Influence of tropolone on *Poria placenta* wood degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4377–4382. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.9.4377-4382.2002>.
- Dorado, J., Claassen, F.W., van Beek, T.A., Lenon, G., Wijnberg, J.B., Sierra-Alvarez, R., 2000. Elimination and detoxification of softwood extractives by white-rot fungi. *J. Biotechnol.* 80, 231–240.
- Doussot, F., De Jéso, B., Quideau, S., Pardon, P., 2002. Extractives content in cooperage oak wood during natural seasoning and toasting; influence of tree species, geographic location, and single-tree effects. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5955–5961. <http://dx.doi.org/10.1021/jf020494e>.
- Eggert, C., Temp, U., Eriksson, K.E., 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1151–1158.
- FitzPatrick, M., Champagne, P., Cunningham, M.F., Whitney, R.A., 2010. A biorefinery processing perspective: treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresour. Technol.* 101, 8915–8922. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.125>.
- Fuchs, G., Boll, M., Heider, J., 2011. Microbial degradation of aromatic compounds—from one strategy to four. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 803–816. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2652>.
- Guerrini, A., Sacchetti, G., Rossi, D., Paganetto, G., Muzzoli, M., Andreotti, E., Tognolini, M., Maldonado, M.E., Bruni, R., 2009. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 27, 39–48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2008.08.002>.
- Gutierrez, del Rio, J.C., Martinez, Martinez, 1999. Fungal degradation of lipophilic extractives in eucalyptus globulus wood. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1367–1371.
- Hallsworth, J.E., Heim, S., Timmis, K.N., 2003. Chaotropic solutes cause water stress in *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.* 5, 1270–1280.
- Hao, D.C., Chen, S.L., Mu, J., Xiao, P.G., 2009. Molecular phylogeny, long-term evolution, and functional divergence of flavin-containing monooxygenases. *Genetica* 137, 173–187. <http://dx.doi.org/10.1007/s10709-009-9382-y>.
- Harwood, C.S., Parales, R.E., 1996. The β -ketoacid pathway and the biology of self-identity. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 553–590. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.553>.
- Hedenström, E., Fagerlund Edfeldt, A., Edman, M., Jonsson, B.-G., 2016. Resveratrol, piceatannol, and isorhapontigenin from Norway spruce (*Picea abies*) debarking wastewater as inhibitors on the growth of nine species of wood-decaying fungi. *Wood Sci. Technol.* 50, 617–629. <http://dx.doi.org/10.1007/s00226-016-0814-4>.
- Hirosue, S., Tazaki, M., Hiratsuka, N., Yanai, S., Kabumoto, H., Shinkyō, R., Arisawa, A., Sakaki, T., Tsunekawa, H., Johdo, O., Ichinose, H., Wariishi, H., 2011. Insight into functional diversity of cytochrome P450 in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of versatile monooxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 407, 118–123. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.02.121>.
- Hu, L., Wang, D., Liu, L., Chen, J., Xue, Y., Shi, Z., 2013. Ca^{2+} efflux is involved in cinnamaldehyde-induced growth inhibition of *Phytophthora capsici*. *PLoS One* 8, e76264. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0076264>.
- Ide, M., Ichinose, H., Wariishi, H., 2012. Molecular identification and functional characterization of cytochrome P450 monooxygenases from the brown-rot basidiomycete *Postia placenta*. *Arch. Microbiol.* 194, 243–253. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-011-0753-2>.
- Imai, T., Tanabe, K., Kato, T., Fukushima, K., 2005. Localization of ferruginol, a diterpene phenol, in *Cryptomeria japonica* heartwood by time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Planta* 221, 549–556. <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-004-1476-2>.
- Iwaki, A., Ohnuki, S., Suga, Y., Izawa, S., Ohya, Y., 2013. Vanillin inhibits translation and induces messenger ribonucleoprotein (mRNP) granule formation in *Saccharomyces cerevisiae*: application and validation of high-content, image-based profiling. *PLoS One* 8, e61748. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0061748>.
- Karlsson, S., Holmbom, B., Spetz, P., Mustranta, A., Buchert, J., 2001. Reactivity of *Trametes* laccases with fatty and resin acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 317–320. <http://dx.doi.org/10.1007/s002530000532>.
- Kasai, N., Ikushiro, S., Hirosue, S., Arisawa, A., Ichinose, H., Uchida, Y., Wariishi, H., Ohta, M., Sakaki, T., 2010. Atypical kinetics of cytochromes P450 catalysing 3'-hydroxylation of flavone from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biochem. (Tokyo)* 147, 117–125. <http://dx.doi.org/10.1093/jb/mvp155>.
- Kasai, N., Ikushiro, S., Hirosue, S., Arisawa, A., Ichinose, H., Wariishi, H., Ohta, M., Sakaki, T., 2009. Enzymatic properties of cytochrome P450 catalyzing 3'-hydroxylation of naringenin from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387, 103–108. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.06.134>.
- Kebbi-Benkeder, Z., Colin, F., Dumarcay, S., Gérardin, P., 2015. Quantification and characterization of knotwood extractives of 12 European softwood and hardwood species. *Ann. For. Sci.* 72, 277–284. <http://dx.doi.org/10.1007/s13595-014-0428-7>.
- Kelsey, R.G., González-Hernández, M.P., Karchesy, J., Veluthoor, S., 2015. Volatile terpenoids and tropolones in heartwood extracts of yellow-cedar, Monterey cypress, and their hybrid Leyland cypress. *Ann. For. Sci.* 72, 349–355. <http://dx.doi.org/10.1007/s13595-014-0429-6>.
- Kilpeläinen, A., Peltola, H., Ryyppö, A., Kellomäki, S., 2005. Scots pine responses to elevated temperature and carbon dioxide concentration: growth and wood properties. *Tree Physiol.* 25, 75–83.
- Kim, Y., Ximenes, E., Mosier, N.S., Ladisch, M.R., 2011. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. *Enzyme Microb. Technol.* 48, 408–415. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.01.007>.
- Kirker, G.T., Bishell, A.B., Lebow, P.K., 2016. Laboratory evaluations of durability of southern pine pressure treated with extractives from durable wood species. *J. Econ. Entomol.* 109, 259–266. <http://dx.doi.org/10.1093/jee/tov286>.
- Korošec, B., Sova, M., Turk, S., Kraševac, N., Novak, M., Lah, L., Stojan, J., Podobnik, B., Berne, S., Zupanec, N., Bunc, M., Gobec, S., Komel, R., 2014. Antifungal activity of cinnamic acid derivatives involves inhibition of benzoate 4-hydroxylase (CYP53). *J. Appl. Microbiol.* 116, 955–966. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12417>.
- Krings, U., Lehnert, N., Fraatz, M.A., Hardebusch, B., Zorn, H., Berger, R.G., 2009. Autoxidation versus biotransformation of α -pinene to flavors with *Pleurotus sapidus*: regioselective hydroperoxidation of α -pinene and stereoselective dehydrogenation of verbenol. *J. Agric. Food Chem.* 57, 9944–9950. <http://dx.doi.org/10.1021/jf901442q>.
- Kusumoto, N., Ashitani, T., Murayama, T., Ogiyama, K., Takahashi, K., 2010. Antifungal abietane-type diterpenes from the cones of *Taxodium distichum* rich. *J. Chem. Ecol.* 36, 1381–1386. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-010-9875-2>.
- Lee, W., Lee, D.G., 2014. An antifungal mechanism of curcumin lies in membrane-targeted action within *Candida albicans*: curcumin disrupts the cell membrane in *Candida albicans*. *IUBMB Life* 66, 780–785. <http://dx.doi.org/10.1002/iub.1326>.
- Lekounougou, S., Mounougou, S., Dumarcay, S., Rose, C., Courty, P.E., Garbaye, J., Gérardin, P., Jacquot, J.P., Gelhaye, E., 2008. Initial stages of *Fagus sylvatica* wood colonization by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*: enzymatic

- characterization. *Int. Biodeterior. Biodegr.* 61, 287–293. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.06.013>.
- Li, Y., Qi, B., Wan, Y., 2014. Inhibitory effect of vanillin on cellulase activity in hydrolysis of cellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 167, 324–330. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.035>.
- Liers, C., Pecyna, M.J., Kellner, H., Worrlich, A., Zorn, H., Steffen, K.T., Hofrichter, M., Ullrich, R., 2013. Substrate oxidation by dye-decolorizing peroxidases (DyPs) from wood- and litter-degrading agaricomycetes compared to other fungal and plant heme-peroxidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 5839–5849. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-012-4521-2>.
- Linde, D., Ruiz-Dueñas, F.J., Fernández-Fueyo, E., Guallar, V., Hammel, K.E., Pogni, R., Martínez, A.T., 2015. Basidiomycete DyPs: genomic diversity, structural–functional aspects, reaction mechanism and environmental significance. *Arch. Biochem. Biophys.* 574, 66–74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2015.01.018>.
- Ma, Z., Yan, X., Zhao, L., Zhou, J., Pang, W., Kai, Z., Wu, F., 2016. Combretastatin A-4 and derivatives: potential fungicides targeting fungal tubulin. *J. Agric. Food Chem.* 64, 746–751. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05119>.
- Martínez, A.T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M.J., Gutiérrez, A., del Río, J.C., 2005. Biodegradation of lignocelluloses: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol.* 8, 195–204.
- Martínez-Iñigo, M.J., Gutiérrez, A., del Río, J.C., Martínez, M.J., Martínez, A.T., 2001. Time course of fungal removal of lipophilic extractives from *Eucalyptus globulus* wood. *J. Biotechnol.* 84, 119–126.
- Martínez-Sotres, C., López-Albarrán, P., Cruz-de-León, J., García-Moreno, T., Rutiaga-Quiñones, J.G., Vázquez-Marrufo, G., Tamariz-Mascarúa, J., Herrera-Bucio, R., 2012. Medicarpin, an antifungal compound identified in hexane extract of *Dalbergia congestiflora* Pittier heartwood. *Int. Biodeterior. Biodegr.* 69, 38–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.11.016>.
- Martínez-Sotres, C., Rutiaga-Quiñones, J.G., Herrera-Bucio, R., Gallo, M., López-Albarrán, P., 2015. Molecular docking insights into the inhibition of laccase activity by medicarpin. *Wood Sci. Technol.* 49, 857–868. <http://dx.doi.org/10.1007/s00226-015-0734-8>.
- Martínková, L., Kotik, M., Marková, E., Homolka, L., 2016. Biodegradation of phenolic compounds by Basidiomycota and its phenol oxidases: a review. *Chemosphere* 149, 373–382. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.022>.
- Mathieu, Y., Prosper, P., Buee, M., Dumarcay, S., Favier, F., Gelhaye, E., Gerardin, P., Harvengt, L., Jacquot, J.-P., Lamant, T., Meux, E., Mathiot, S., Didierjean, C., Morel, M., 2012. Characterization of a *Phanerochaete chrysosporium* glutathione transferase reveals a novel structural and functional class with ligandin properties. *J. Biol. Chem.* 287, 39001–39011. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.402776>.
- Mathieu, Y., Prosper, P., Favier, F., Harvengt, L., Didierjean, C., Jacquot, J.-P., Morel-Rouhier, M., Gelhaye, E., 2013. Diversification of fungal specific class a glutathione transferases in saprotrophic fungi. *PLoS One* 8, e80298. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0080298>.
- Meux, E., Morel, M., Lamant, T., Gerardin, P., Jacquot, J.-P., Dumarcay, S., Gelhaye, E., 2013. New substrates and activity of *Phanerochaete chrysosporium* Omega glutathione transferases. *Biochimie* 95, 336–346. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2012.10.003>.
- Mhlongo, S.I., den Haan, R., Viljoen-Bloom, M., van Zyl, W.H., 2015. Lignocellulosic hydrolysate inhibitors selectively inhibit/deactivate cellulase performance. *Enzyme Microb. Technol.* 81, 16–22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.07.005>.
- Mihara, R., Barry, K.M., Mohammed, C.L., Mitsunaga, T., 2005. Comparison of antifungal and antioxidant activities of *Acacia mangium* and *A. auriculiformis* heartwood extracts. *J. Chem. Ecol.* 31, 789–804. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-005-3544-x>.
- Morel, M., Meux, E., Mathieu, Y., Thuillier, A., Chibani, K., Harvengt, L., Jacquot, J.-P., Gelhaye, E., 2013. Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi: fungal xenomic networks. *Microb. Biotechnol.* 6, 248–263. <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.12015>.
- Mori, T., Koyama, G., Kawagishi, H., Hirai, H., 2016. Effects of homologous expression of 1,4-benzoquinone reductase and homogentisate 1,2-dioxygenase genes on wood decay in hyper-lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *Curr. Microbiol.* 73, 512–518. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-016-1089-6>.
- Nakamura, T., Ichinose, H., Wariishi, H., 2012. Flavin-containing monooxygenases from *Phanerochaete chrysosporium* responsible for fungal metabolism of phenolic compounds. *Biodegradation* 23, 343–350. <http://dx.doi.org/10.1007/s10532-011-9521-x>.
- Ntougias, S., Baldrian, P., Ehaliotis, C., Nerud, F., Merhautová, V., Zervakis, G.I., 2015. Olive mill wastewater biodegradation potential of white-rot fungi – mode of action of fungal culture extracts and effects of ligninolytic enzymes. *Bioresour. Technol.* 189, 121–130. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.149>.
- Oliva-Taravilla, A., Tomás-Pejó, E., Demuez, M., González-Fernández, C., Ballesteros, M., 2016. Phenols and lignin: key players in reducing enzymatic hydrolysis yields of steam-pretreated biomass in presence of laccase. *J. Biotechnol.* 218, 94–101. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.11.004>.
- Oliva-Taravilla, A., Tomás-Pejó, E., Demuez, M., González-Fernández, C., Ballesteros, M., 2015. Inhibition of cellulose enzymatic hydrolysis by laccase-derived compounds from phenols. *Biotechnol. Prog.* 31, 700–706. <http://dx.doi.org/10.1002/btpr.2068>.
- Pietsch, K.A., Ogle, K., Cornelissen, J.H.C., Cornwell, W.K., Bönisch, G., Craine, J.M., Jackson, B.G., Kattge, J., Peltzer, D.A., Penuelas, J., Reich, P.B., Wardle, D.A., Weedon, J.T., Wright, I.J., Zanne, A.E., Wirth, C., 2014. Global relationship of wood and leaf litter decomposability: the role of functional traits within and across plant organs: global relationship of wood and leaf litter decomposability. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 23, 1046–1057. <http://dx.doi.org/10.1111/geb.12172>.
- Piotrowski, J.S., Okada, H., Lu, F., Li, S.C., Hinchman, L., Ranjan, A., Smith, D.L., Higbee, A.J., Ulbrich, A., Coon, J.J., Deshpande, R., Bukhman, Y.V., McIlwain, S., Ong, I.M., Myers, C.L., Boone, C., Landick, R., Ralph, J., Kabbage, M., Ohya, Y., 2015. Plant-derived antifungal agent poaic acid targets β -1,3-glucan. *Proc. Natl. Acad. Sci.* <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1410400112>, 201410400.
- Podobnik, B., Stojan, J., Lah, L., Kraševc, N., Seliškar, M., Rižner, T.L., Rozman, D., Komel, R., 2008. CYP53A15 of *Cochliobolus lunatus*, a target for natural antifungal compounds. *J. Med. Chem.* 51, 3480–3486. <http://dx.doi.org/10.1021/jm800030e>.
- Pollegioni, L., Tonin, F., Rosini, E., 2015. Lignin-degrading enzymes. *FEBS J.* 282, 1190–1213. <http://dx.doi.org/10.1111/febs.13224>.
- Poma, A., Pacioni, G., Colafarina, S., Miranda, M., 1999. Effect of tyrosinase inhibitors on *Tuber borchii* mycelium growth in vitro. *FEMS Microbiol. Lett.* 180, 69–75.
- Pometti, C.L., Palanti, S., Pizzo, B., Charpentier, J.-P., Boizot, N., Resio, C., Saidman, B.O., 2010. Durability of five native argentine wood species of the genera *Prosopis* and *Acacia* decayed by rot fungi and its relationship with extractive content. *Biodegradation* 21, 753–760. <http://dx.doi.org/10.1007/s10532-010-9340-5>.
- Prewitt, L., Kang, Y., Kakumanu, M.L., Williams, M., 2014. Fungal and bacterial community succession differs for three wood

- types during decay in a forest soil. *Microb. Ecol.* 68, 212–221. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-014-0396-3>.
- Prida, A., Puech, J.-L., 2006. Influence of geographical origin and botanical species on the content of extractives in American, French, and East European oak woods. *J. Agric. Food Chem.* 54, 8115–8126. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0616098>.
- Qin, L., Li, W.-C., Liu, L., Zhu, J.-Q., Li, X., Li, B.-Z., Yuan, Y.-J., 2016. Inhibition of lignin-derived phenolic compounds to cellulase. *Biotechnol. Biofuels* 9. <http://dx.doi.org/10.1186/s13068-016-0485-2>.
- Rao, A., Zhang, Y., Muend, S., Rao, R., 2010. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 5062–5069. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01050-10>.
- Royer, M., Diouf, P.N., Stevanovic, T., 2011. Polyphenol contents and radical scavenging capacities of red maple (*Acer rubrum* L.) extracts. *Food Chem. Toxicol.* 49, 2180–2188. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2011.06.003>.
- Santos, S.A.O., Vilela, C., Freire, C.S.R., Neto, C.P., Silvestre, A.J.D., 2013. Ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry applied to the identification of valuable phenolic compounds from Eucalyptus wood. *J. Chromatogr. B* 938, 65–74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.08.034>.
- Schilling, J.S., Kaffenberger, J.T., Liew, F.J., Song, Z., 2015. Signature wood modifications reveal decomposer community history. *PLoS One* 10, e0120679. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0120679>.
- Schultz, T.P., Nicholas, D.D., 2002. Development of environmentally-benign wood preservatives based on the combination of organic biocides with antioxidants and metal chelators. *Phytochemistry* 61, 555–560.
- Schultz, T.P., Nicholas, D.D., 2000. Naturally durable heartwood: evidence for a proposed dual defensive function of the extractives. *Phytochemistry* 54, 47–52.
- Shimizu, M., Yuda, N., Nakamura, T., Tanaka, H., 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. <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200401251>.
- Shreaz, S., Bhatia, R., Khan, N., Muralidhar, S., Manzoor, N., Khan, L.A., 2013. Influences of cinnamic aldehydes on H⁺ extrusion activity and ultrastructure of *Candida*. *J. Med. Microbiol.* 62, 232–240. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.036145-0>.
- Shreaz, S., Sheikh, R.A., Bhatia, R., Neelofar, K., Imran, S., Hashmi, A.A., Manzoor, N., Basir, S.F., Khan, L.A., 2011. Antifungal activity of α -methyl trans cinnamaldehyde, its ligand and metal complexes: promising growth and ergosterol inhibitors. *Biometals* 24, 923–933. <http://dx.doi.org/10.1007/s10534-011-9447-0>.
- Shreaz, S., Wani, W.A., Behbehani, J.M., Raja, V., Irshad, M., Karched, M., Ali, I., Siddiqi, W.A., Hun, L.T., 2016. Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. *Fitoterapia* 112, 116–131. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2016.05.016>.
- Stenius, P., 2000. *Papermaking Science and Technology, Book 3, Forest Products Chemistry*. Fapet, Helsinki.
- Suzuki, H., MacDonald, J., Syed, K., Salamov, A., Hori, C., Aerts, A., Henrissat, B., Wiebenga, A., vanKuyk, P.A., Barry, K., Lindquist, E., LaButti, K., Lapidus, A., Lucas, S., Coutinho, P., Gong, Y., Samejima, M., Mahadevan, R., Abou-Zaid, M., de Vries, R.P., Igarashi, K., Yadav, J.S., Grigoriev, I.V., Master, E.R., 2012. Comparative genomics of the white-rot fungi, *Phanerochaete carnososa* and *P. chrysosporium*, to elucidate the genetic basis of the distinct wood types they colonize. *BMC Genomics* 13, 444. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-13-444>.
- Suzuki, H., Ueda, T., Juránek, I., Yamamoto, S., Katoh, T., Node, M., Suzuki, T., 2000. Hinokitiol, a selective inhibitor of the platelet-type isozyme of arachidonate 12-lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 885–889. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2000.3390>.
- Tagger, S., Périssol, C., Gil, G., Vogt, G., Le Petit, J., 1998. Phenoloxidases of the white-rot fungus *Marasmius quercophilus* isolated from an evergreen oak litter (*Quercus ilex* L.). *Enzyme Microb. Technol.* 23, 372–379. [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00062-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00062-3).
- Tejirian, A., Xu, F., 2011. Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds. *Enzyme Microb. Technol.* 48, 239–247. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.11.004>.
- Thanh Mai Pham, L., Kim, Y.H., 2016. Discovery and characterization of new O-methyltransferase from the genome of the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* for enhanced lignin degradation. *Enzyme Microb. Technol.* 82, 66–73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.08.016>.
- Thuillier, A., Chibani, K., Belli, G., Herrero, E., Dumarcay, S., Gerardin, P., Kohler, A., Deroy, A., Dhalleine, T., Bchini, R., Jacquot, J.-P., Gelhaye, E., Morel-Rouhier, M., 2014. Transcriptional responses of *Phanerochaete chrysosporium* to oak acetic extracts: focus on a new glutathione transferase. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 6316–6327. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02103-14>.
- Vaillancourt, F.H., Bolin, J.T., Eltis, L.D., 2006. The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 41, 241–267. <http://dx.doi.org/10.1080/10409230600817422>.
- van Geffen, K.G., Poorter, L., Sass-Klaassen, U., van Logtestijn, R.S.P., Cornelissen, J.H.C., 2010. The trait contribution to wood decomposition rates of 15 neotropical tree species. *Ecology* 91, 3686–3697.
- Voda, K., Boh, B., Vrtacnik, M., 2004. A quantitative structure? Antifungal activity relationship study of oxygenated aromatic essential oil compounds using data structuring and PLS regression analysis. *J. Mol. Model* 10, 76–84. <http://dx.doi.org/10.1007/s00894-003-0174-5>.
- Wang, H., Lei, Y., Yan, L., Cheng, K., Dai, X., Wan, L., Guo, W., Cheng, L., Liao, B., 2015. Deep sequencing analysis of transcriptomes in *Aspergillus flavus* in response to resveratrol. *BMC Microbiol.* 15. <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-015-0513-6>.
- Weedon, J.T., Cornwell, W.K., Cornelissen, J.H.C., Zanne, A.E., Wirth, C., Coomes, D.A., 2009. Global meta-analysis of wood decomposition rates: a role for trait variation among tree species? *Ecol. Lett.* 12, 45–56. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01259.x>.
- Willför, S.M., Ahotupa, M.O., Hemming, J.E., Reunanen, M.H.T., Eklund, P.C., Sjöholm, R.E., Eckerman, C.S.E., Pohjamo, S.P., Holmbom, B.R., 2003. Antioxidant activity of knotwood extractives and phenolic compounds of selected tree species. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7600–7606. <http://dx.doi.org/10.1021/jf030445h>.
- Wu, C.-C., Wu, C.-L., Huang, S.-L., Chang, H.-T., 2012. Antifungal activity of liriodenine from *Michelia formosana* heartwood against wood-rotting fungi. *Wood Sci. Technol.* 46, 737–747. <http://dx.doi.org/10.1007/s00226-011-0428-9>.
- Ximenes, E., Kim, Y., Mosier, N., Dien, B., Ladisch, M., 2011. Deactivation of cellulases by phenols. *Enzyme Microb. Technol.* 48, 54–60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.09.006>.
- Yamashita, S., Masuya, H., Abe, S., Masaki, T., Okabe, K., 2015. Relationship between the decomposition process of coarse woody debris and fungal community structure as detected by high-throughput sequencing in a deciduous broad-leaved forest in Japan. *PLoS One* 10, e0131510. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0131510>.
- Yemendzhiev, H., Gerginova, M., Krastanov, A., Stoilova, I., Alexieva, Z., 2008. Growth of *Trametes versicolor* on phenol. *J.*

- Ind. Microbiol. Biotechnol. 35, 1309–1312. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-008-0412-z>.
- Yen, T.-B., Chang, H.-T., Hsieh, C.-C., Chang, S.-T., 2008. Antifungal properties of ethanolic extract and its active compounds from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* (Florin) heartwood. *Bioresour. Technol.* 99, 4871–4877. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.037>.
- Yun, J., Lee, H., Ko, H.J., Woo, E.-R., Lee, D.G., 2015. Fungicidal effect of isoquercitrin via inducing membrane disturbance. *Biochim. Biophys. Acta BBA – Biomembr.* 1848, 695–701. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.11.019>.
- Zhang, Y., Muend, S., Rao, R., 2012. Dysregulation of ion homeostasis by antifungal agents. *Front. Microbiol.* 3. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00133>.

Chapitre 5 : *Podospora anserina* un saprophyte coprophile modèle d'étude de la dégradation de la biomasse végétale :

P. anserina est un champignon filamenteux appartenant au groupe des ascomycètes et plus particulièrement à l'ordre des sordariales. Cet organisme vit sur les excréments d'animaux herbivores et est facilement rencontré durant l'été. Il semblerait qu'il ne possède pas de localisation géographique particulière et que l'on puisse le trouver sur toute la surface du globe. Ce champignon a un mode de vie présentant des similitudes avec celui de *P. chrysosporium* puisqu'il est capable de métaboliser des nutriments à partir de biomasse végétale prédigérée. *P. anserina* possède un système enzymatique pour convertir la totalité de la matière organique lignocellulosique, cependant le nombre de copies de gènes pour chaque classe est limité comparativement aux champignons de pourriture blanche. Son rôle biologique n'en reste pas moins important, en effet il est impliqué dans le recyclage du carbone à partir de composés végétaux récalcitrants. Cet organisme, présente un cycle de vie court et facilement maîtrisable en laboratoire. De plus, il est aisément manipulable génétiquement pour l'obtention de mutants surexprimeurs ou knock-out, permettant la caractérisation fonctionnelle de gènes d'intérêt.

1. Cycle de vie :

Le cycle de vie de cet organisme est basé sur la reproduction sexuée et est haplobiontique. Tout commence par la croissance du mycélium hétérothallique, qui dans des conditions appropriées va se différencier en deux types de structures : les ascogones femelles et les micro-conidies mâles. Ces dernières sont présentes au sein des deux types sexuels MAT+ et MAT-. Suite à cette étape, la fertilisation se produit uniquement entre un organe mâle et un organe femelle de mating type opposé. L'ascogone réalise une extension cytoplasmique (trychogyne) dans le but de capturer la micro-conidie, puis le noyau mâle pénètre dans l'ascogone. De façon intéressante, cet événement n'est pas suivi par une caryogamie mais par une division des deux noyaux dans un cytoplasme commun afin de former le syncytium.

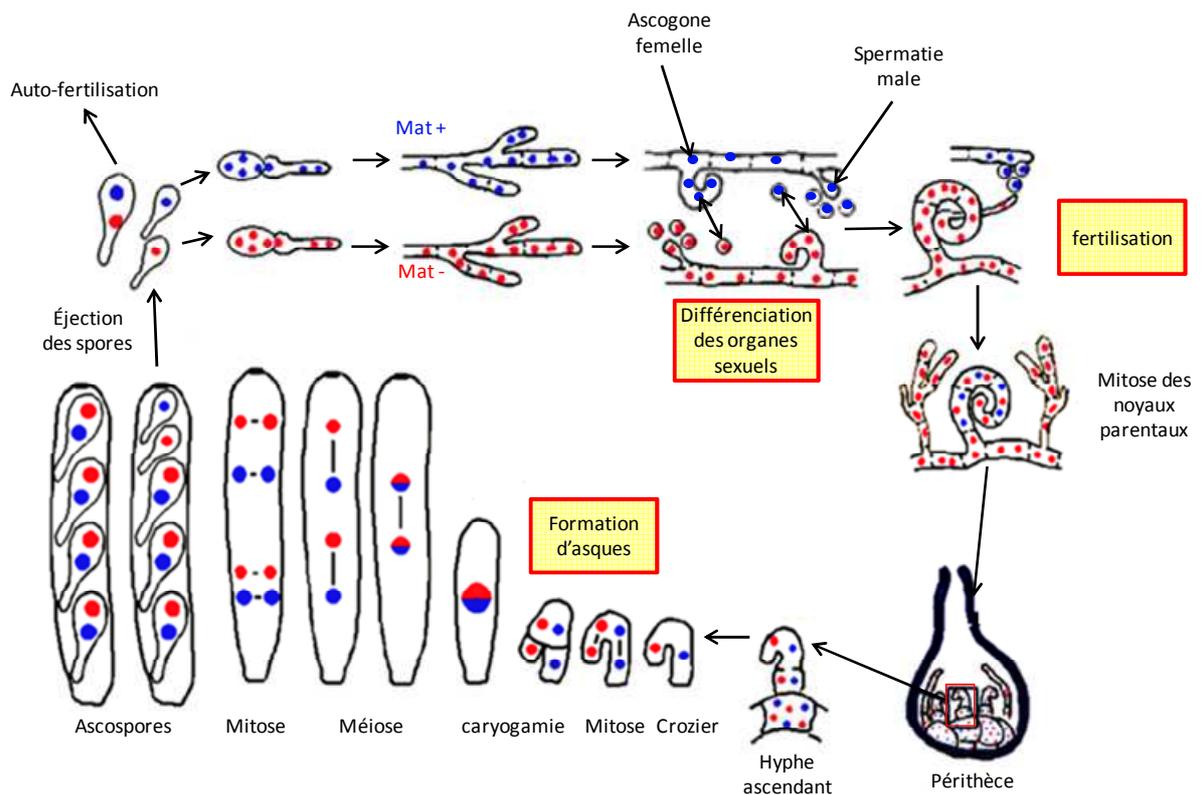


Figure 33 : Cycle de vie de *Podospira anserina* (<http://podospira.igmors.u-psud.fr/more.php>).

Lors de la croissance du mycélium, des organes sexuels mâles et femelles se différencient permettant une reproduction sexuée. Suite à la fertilisation, le péritèce se forme afin d'initialiser la formation d'asque aboutissant à l'éjection de spores donnant un nouveau mycélium.

Après plusieurs divisions, cette structure donne naissance à des cellules croziers où les noyaux se divisent de manière synchronisée. Un septum apparaît alors produisant trois cellules, il se passe alors la caryogamie à l'intérieur de la cellule supérieure qui est immédiatement suivie par une méiose, puis une mitose conduisant à l'apparition de quatre ascospores binucléées ou cinq ascospores dont trois binucléées et deux uninucléées. Tous ces événements ont lieu dans un corps de fructification : le périthèce (Figure 33). La réalisation du cycle complet de *P. anserina* dans des conditions optimales de croissance est d'environ quatre jours. A la fin, les ascospores sont éjectées du périthèce via un mécanisme faisant intervenir la pression de turgescence. Il est important de noter que cet organisme est incapable de se disperser via une reproduction asexuée car la micro-conidie ne peut germer seule.

2. *P. anserina* un véritable saprophyte :

La maîtrise de son cycle de vie rapide (1 semaine) ainsi que la manipulation génétique aisée chez ce champignon par l'introduction d'ADN exogène ou l'inactivation d'un gène par recombinaison homologue au sein du génome, a permis la réalisation de nombreuses études aboutissant à une meilleure compréhension de processus biologiques comme le vieillissement, la formation et le rôle des prions ou encore la reproduction sexuelle (Couturier et al., 2016). De plus, l'occurrence de *P. anserina* dans son habitat naturel semble être dictée par sa capacité de dégradation de la biomasse végétale. En effet, la colonisation des excréments suit une hiérarchie qui débute par l'intervention d'organismes métabolisant des sucres simples comme certains ascomycètes (stade précoce de colonisation) puis se termine par l'apparition d'espèces capable de dégrader tous les polymères de la biomasse végétale (Wicklow et al., 1980). Comme *P. anserina* est un colonisateur tardif, il semblerait qu'il ait un large panel enzymatique lui permettant de métaboliser des substrats complexes (Mäkelä et al., 2017). Cette hypothèse est confirmée depuis le séquençage de son génome (Espagne et al., 2008). Ce dernier a mis en exergue la présence de nombreux gènes impliqués dans la dégradation de la biomasse lignocellulosique. Cette donnée a entrouvert de nouvelles perspectives d'étude concernant les mécanismes de dégradation de la biomasse chez cette espèce.

3. Système enzymatique et capacité de dégradation de la biomasse végétale :

Suite à la disponibilité des données génomiques, l'annotation des gènes codant des CAZYmes par Lombard et al en 2014 a révélé une importante diversité d'activités potentielles de dégradation ainsi qu'un très grand nombre de Carbohydrate Binding Module (CBM). La comparaison avec les autres génomes disponibles montre que *P. anserina* sécrète une machinerie de dégradation de la biomasse végétale similaire à celle des pourritures blanches.

3.1 Dégradation de la cellulose et de l'hémicellulose :

Lors des processus de métabolisation des polysaccharides, *P. anserina* sécrète une large gamme d'enzymes ciblant le polymère de cellulose. Ces dernières, peuvent être regroupées dans diverses familles comme les GH6 et 7 pour les cellobiohydrolases ou les GH5, 12 et 45 pour les endoglucanases (Couturier et al., 2016). De plus, la présence d'un grand nombre de CBM (plus de 100) permet d'améliorer la spécificité et la liaison des enzymes à leur substrat et par conséquent leur activité (Várnai et al., 2014). Cet organisme possède aussi une grande quantité de Lytic Polysaccharide MonoOxygenases (GH61 ou AA9) qui sont directement impliquées dans la dégradation oxydative de la cellulose (Espagne et al., 2008). En ce qui concerne l'hémicellulose, de nombreux gènes participent aux mécanismes de dépolymérisation comme les xylanases de la famille des GH10 et 11, les mannases appartenant aux groupes des GH5 et 26, les arabidofuranosidases de la classe des GH51 et 62, et les carbohydrates esterases de type CE1 (Couturier et al., 2016). Cependant, il semblerait que *P. anserina* ne possède que très peu d'enzymes de dégradation de la pectine puisque sa croissance est limitée sur milieu enrichi avec ce substrat carboné (Espagne et al., 2008). *P. anserina* serait un organisme ayant une capacité d'adaptation à la composition de la paroi cellulaire rencontrée. Récemment, il a été montré qu'un substrat composé d'un grand nombre de polysaccharides divers et variés provoque la sécrétion d'une plus vaste gamme d'enzymes et donc une réponse adaptative (Mäkelä et al., 2017).

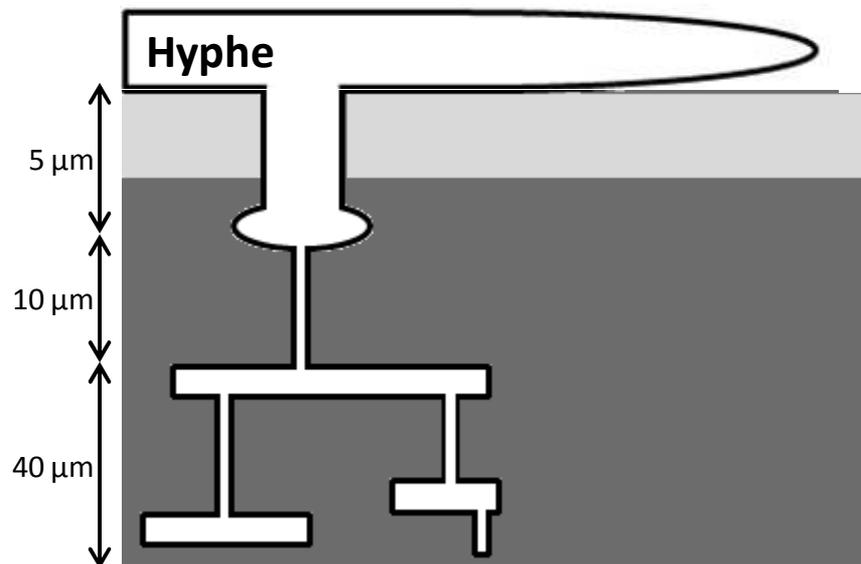
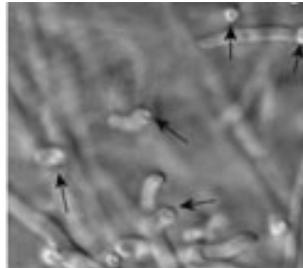


Figure 34 : Observation microscopique des appressoria et schématisation du mécanisme de pénétration (adapté de Brun et al., 2009).

Les hyphes fongiques croissent de façon parallèle au solide puis se réorientent perpendiculairement pour percer la cellophane. Il s'en suit une extension mycélienne au sein du solide puis la formation de nouvelles structures perpendiculaires jusqu'à colonisation totale.

3.2 Dégradation de la lignine :

De façon plus étonnante, il semblerait que *P. anserina* soit capable de partiellement modifier la lignine de par la présence de gènes codant pour des glucose-méthanol-choline, une pyranose oxydase, deux cellobiose déshydrogénases, une galactose oxydase, une cuivre radical oxydase, une quinone réductase, plusieurs laccases et une putative LiP/Mn/versatile peroxydase (Espagne et al., 2008). De plus, il est capable de croître avec comme seule source de carbone de la lignine (Bourdais et al., 2012; Xie et al., 2014). Cette particularité dépend de la présence de plusieurs gènes codant des laccases, des catalases et des Multi-Copper Oxidases (MCO). En effet, la croissance de mutants de délétion pour des laccases et une MCO est inhibée lorsque le milieu est riche en lignine, en naphthone, en hydroquinone, en 4-nitrophénol et en méthylhydroquinone, suggérant un rôle potentiel de ces enzymes dans la dépolymérisation de la lignocellulose et dans la détoxification de composés phénoliques. En présence de copeaux de bois, la formation d'ascospores est retardée et la production de périthèces est réduite (Xie et al., 2014). Des effets similaires apparaissent lors de la délétion des gènes codant pour les catalases, qui joueraient un rôle dans la régulation des espèces réactives de l'oxygène (Bourdais et al., 2012).

4. Implication potentielle d'un mécanisme physique dans la dégradation de la biomasse végétale, les appressorium-like :

Cet organisme possède une caractéristique peu commune et absente chez *P. chrysosporium*. Il est capable, en parallèle de son système enzymatique, de former des structures physiques afin de pénétrer directement au sein des polymères récalcitrants : les appressorium-like. Au contact d'un film de cellophane, le mycélium se développe de façon parallèle puis se réoriente perpendiculairement pour percer le polymère telle une aiguille (Brun et al., 2009) (Figure 34). Le fait qu'un champignon saprophyte puisse pénétrer de façon mécanique un composant de la paroi des végétaux, pourrait signifier que les différences entre les saprotrophes, les pathogènes et les mutualistes ne sont peut-être pas si importantes qu'on ne le pense. Ces mécanismes impliquent la présence de deux NADPH oxydases (Nox1 et Nox2) et de leur régulateur/activateur (NoxR). Cependant, la délétion de chaque élément séparé n'entraîne pas le même phénotype, ce qui signifie que leur action régulatrice est différente.

En absence de Nox1, le champignon est capable de réorienter sa croissance en direction de la couche de cellophane, puis à son contact de former des structures globulaires. Cependant, à partir de ces dernières, il est incapable de produire des structures en forme d'aiguille et de pénétrer au sein de la cellophane. Il en est de même pour les mutants Nox2, mais son absence inhibe le processus de réorientation du mycélium ainsi que toutes les étapes qui en découlent. Le mutant NoxR et le double mutant Nox1/Nox2 exhibent le même phénotype que celui de Nox2. Ce qui veut dire que l'action de Nox2 est épistatique dominante par rapport à Nox1. Il existe aussi une autre voie de régulation basée sur la concentration de glucose disponible. Confirmant ainsi que ces deux phénomènes sont régulés de façon indépendante (Brun et al., 2009). L'efficacité de dégradation de *P. anserina* provient de la sécrétion d'enzymes lignocellulosiques similaires à celle des pourritures blanches, ainsi qu'à sa capacité de réorganiser son mycélium pour former des structures de pénétration du substrat.

Objectifs de la thèse :

Depuis de nombreuses années, les scientifiques se sont évertués à comprendre les nombreux mécanismes de dégradation de la biomasse végétale par les champignons. La multitude des recherches effectuées ont permis l'acquisition d'une grande quantité de connaissances sur les processus enzymatiques et oxydatifs impliqués. A l'heure actuelle, les champignons dégradeurs de biomasse sont divisés en cinq grands groupes : les dégradeurs de litière, les coprophiles, les pourritures molles, les pourritures brunes et les pourritures blanches. Les pourritures blanches ont été définies comme des organismes étant capables de dégrader la lignine, la cellulose et l'hémicellulose tandis que les pourritures brunes sont dans l'incapacité de dégrader la lignine. Ces deux grands groupes sont les acteurs principaux de la dégradation du bois et donc les plus étudiés dans un contexte de protection du matériau bois mais également pour la valorisation de la biomasse lignocellulosique. En effet, la bio délignification de la biomasse végétale est une alternative écologique aux traditionnelles méthodes chimiques polluantes puisque l'utilisation du système enzymatique des pourritures blanches permettrait un traitement plus doux, une amélioration des rendements, une limitation des réactions parasites, une diminution de l'utilisation de produits chimiques et du temps de traitements.

Cette alternative permettrait la production de biocarburant et ainsi la réduction des émissions de CO₂, mais aussi d'améliorer les propriétés de tension et de résistance de la pâte à papier. Cependant, le traitement biologique est soumis à un coût très important, à la disponibilité des enzymes, à leur stabilité au cours du temps et à la présence de molécules pouvant inactiver le processus (Asgher et al., 2014; Pérez et al., 2002). Cette inactivation pourrait être due à la présence d'extractibles. Récemment, des données transcriptomiques de *P. chrysosporium* ont montré l'induction de gènes codant des petites protéines sécrétées de fonction inconnue, en présence d'extractibles de chêne pendant 24h (Thuillier et al., 2014). Ce type de protéines pourrait avoir un rôle direct ou indirect dans les processus de dégradation de la biomasse.

Mon projet de thèse s'est déroulé au sein de l'UMR 1136 Interactions Arbres-Microorganismes avec pour but la caractérisation biochimique et physiologique de petites protéines sécrétées chez les champignons lignolytiques et en particulier une isoforme de *P. chrysosporium* appelée SSP1. Le premier objectif était d'analyser la diversité des champignons par des approches de génomique comparative en se focalisant sur les gènes codant les petites protéines sécrétées. Pour cela, j'ai utilisé de nombreux outils informatiques mis à ma disposition comme les logiciels de BLAST associés aux bases de données du NCBI et du JGI, des logiciels d'alignement de séquences (MUSCLE, MAFFT) et un logiciel de phylogénie MEGA permettant la réalisation d'arbres phylogénétiques à partir de plusieurs matrices de calcul (Neighbor joining, maximum de parcimonie et maximum likelihood). Le deuxième objectif était de produire et caractériser SSP1 d'un point de vue biochimique afin de déterminer son état redox, sa structure ou encore une activité enzymatique propre à la protéine recombinante. Enfin, le dernier objectif était d'optimiser différentes méthodes de transformation génétique de *P. chrysosporium* pour obtenir des informations concernant la fonction de cette protéine *in vivo*. En parallèle, j'ai aussi travaillé sur d'autres organismes modèles comme la levure dans laquelle j'ai réalisé la surexpression de la protéine, mais aussi chez *P. anserina* afin d'avoir des mutants délétés pour deux protéines paralogues. L'ensemble de ces approches avaient pour but d'apporter des informations complémentaires les unes des autres pour comprendre le rôle de cette protéine dont la fonction était inconnue au début de ce travail, dans un contexte de dégradation du bois.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Chapitre 1. Matériels biologiques :

1. Souches de champignons de référence :

Phanerochaete chrysosporium est un champignon filamenteux appartenant à l'embranchement des Basidiomycètes et à la classe des Agaricomycotina. Cette espèce modèle de pourriture blanche a été intensément étudiée au cours de ces 50 dernières années. Au laboratoire, deux souches sont disponibles : la souche BKM-F1767 qui est hétéro-dicaryotique et la souche RP78 mono-caryotique dont le génome a été séquencé par Martinez et collaborateurs en 2004.

2. Souches de champignons utilisés dans des expériences de manipulation génétique :

Podopsora anserina est un champignon filamenteux appartenant à l'embranchement des Pezizomycotina et à la classe des Sordariomycètes. Il est utilisé au laboratoire pour la connaissance, la maîtrise et la rapidité de son cycle de vie (7 jours). De plus, la réalisation d'études génétiques se révèle particulièrement facile. En effet, il est possible de créer des mutants knock-out pour un gène donné et donc de faire des analyses physiologiques sur les fonctions que pourraient avoir ces gènes délétés.

Saccharomyces cerevisiae 23344c (mat a Ura3) est un organisme modèle facilement transformable et utilisé pour des expériences de localisation cellulaire ou de surexpression protéique.

3. Souches de bactéries pour la production de protéines recombinantes :

La souche Rosetta 2 (DE3) pLysS (F⁻ ompT hsdS_B (rB⁻ mB⁻) gal dcm (DE3) pRARE2 (CamR) qui dérive d'*Escherichia coli* BL21 a été conçue afin d'améliorer l'expression des protéines eucaryotes contenant des codons rarement utilisés chez la bactérie. La présence du plasmide pRARE₂ assure la production d'ARNt (via leurs promoteurs natifs) pour 7 codons rare (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC et CGG). De plus, ce dernier confère une résistance pour le chloramphénicol.

La souche *E. coli* BL21 (DE3) pSBET (F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pSBET (Kn)) est une version optimisée de la souche *E. coli* BL21 puisque la présence du plasmide pSBET permet la production de deux ARNt reconnaissant les codons rares de l'arginine (AGG et AGA). Il en résulte une augmentation de l'expression de protéines eucaryotes contenant ces codons. De plus, ce plasmide confère une résistance pour la kanamycine. Ces deux souches ont été optimisées afin de pouvoir contrôler la production de protéines de façon inductible. En effet, en présence d'IPTG (isopropyl β-D-1 thiogalactopyranoside) ces bactéries produisent une grande quantité d'ARN polymérase T7 (gène sous contrôle du promoteur *lacUV5*) grâce à la présence du prophage lambda (DE3 inclus dans le nom). Cette dernière permet l'activation du promoteur T7 (du plasmide contenant le gène d'intérêt) et donc une transcription massive du gène en aval (production de protéine). De plus, ces deux souches sont déletées pour le gène codant une protéase de la membrane externe (OmpT) dans le but de conserver l'intégrité de l'ARN polymérase T7. En effet, il a été montré que cette protéase pouvait endommager cette dernière.

4. Souche de bactéries pour la production de plasmide d'intérêt :

La souche *E. coli* DH5α (F⁻ φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk⁻, mk⁺) phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1) est une souche bactérienne optimisée pour la production de plasmide. En effet, celle-ci présente une mutation dans le gène endA1 qui provoque un dysfonctionnement de l'endonucléase 1 spécifique de l'ADN. De plus, la présence d'une seconde mutation dans le gène recA1 entrave le fonctionnement du système de recombinaison homologue. Ces deux modifications permettent d'éviter l'insertion de mutation lors de la réplication (recA1) et d'empêcher la dégradation de l'ADN plasmidique au cours d'une miniprep (endA1).

5. Carte des plasmides utilisés :

Les cartes des plasmides utilisés pour la production de plasmide et l'expression de protéines chez *E. coli*, *S. cerevisiae* et *P. chrysosporium* sont présentées en Figure 35.

AUTOCLAVER			
Glucose 20% (80g/400mL)	25mL	CaCl ₂ (1g/100mL)	5mL
Acetate de Na 100mm ph4.5 (5.44g/400mL)	25mL	KH ₂ PO ₄ et MgSO ₄ (20+5g/200mL)	10mL
Tween 1.8% (5.4mL/300mL)	12.5mL	Traces	17.5mL
H ₂ O QSP	393.75mL	Thiamine (6mg/30mL)	2.5mL
Tartrate d'ammonium (3.2g/200mL)	6.25mL	Alcool vératryl	35.1µL
Agar si solide	10g	MnCl ₂ (445mg/50mL)	2.5mL
Solution trace 500 ml			
Nitilotriacetate		1.5 g	
MgSO ₄		3 g	
NaCl		1 g	
FeSO ₄ , 7H ₂ O		0.1 g	
CoCl ₂		0.1 g	
ZnSO ₄ , 7H ₂ O		0.1 g	
CuCl ₂		0.1 g	
ALK		10 mg	
H ₃ BO ₃		10 mg	
NaMoO ₄ , 2H ₂ O		10 mg	

Tableau 1 : Composition du milieu Tien and Kirk

Chapitre 2 : Polymerase Chain Reaction et clonage du gène d'intérêt dans un vecteur d'expression :

1. Création d'une banque d'ADNc chez *P. chrysosporium* :

1.1 Extraction des ARN totaux :

Phanerochaete chrysosporium RP78 est cultivé dans 30 ml de milieu Tien and Kirk (Tableau 1) liquide pendant trois jours à 37°C. Le milieu est remplacé par un nouveau enrichi ou non en extractibles de chênes (200 mg) puis incubé 24 h à 37 °C. Le mycélium est récupéré, nettoyé à l'eau distillée stérile, séché et pesé afin de récupérer environ 100 mg de masse fraîche. Ce dernier est ensuite plongé dans de l'azote liquide et instantanément broyé jusqu'à obtention d'une poudre blanche. L'extraction des ARN totaux s'est effectuée à l'aide du Kit Plant RNeasy Extraction (Qiagen) selon le protocole du fournisseur. Une étape de traitement à la DNase a été effectuée en cours d'extraction directement sur la colonne. Enfin, une étape de précipitation au chlorure de lithium (4 M) (vol/vol) sur la nuit à -20 °C a été réalisée. Après plusieurs lavages à l'éthanol 70 %, le culot d'ARN a été resuspendu dans 30 µl d'eau RNase-free.

1.2 Reverse transcription :

La réaction de reverse transcription est réalisée à l'aide du kit commercial Masterscript RT-PCR (5 prime). Elle se décompose en deux parties : la première consiste à dénaturer les ARN et la seconde à réaliser la reverse transcription. Le mix 1 (DNTPs (10 mM chacun) 2 µl, oligo dT (10 µM) 1 µl, ARN dilué 500 ng et eau RNase free qsp 10 µl) est placé à 65°C pendant 5 min pour dénaturer les ARN puis directement à 4 °C (maintien de la dénaturation). Un second mix (Tampon RT 4 µl, Reverse transcriptase 0.5 µl, inhibiteur de Rnase 0.5 µl et eau RNase free qsp 10 µl) est ajouté au 1er mix. L'ensemble est incubé à 42°C pendant 1 h afin de synthétiser les cDNA. La réaction est stoppée par une augmentation de la température à 85 °C pendant 5 min.

2. Ligation d'un fragment d'ADN dans un vecteur d'expression :

2.1 Amplification par PCR du gène d'intérêt :

La réaction en chaîne par polymérase consiste à amplifier un fragment d'ADN à l'aide d'amorces spécifiques. Elle nécessite l'utilisation d'une enzyme de haute fidélité afin de limiter l'incorporation de mauvais nucléotides dans la séquence. Le pourcentage en GC des séquences à amplifier étant relativement élevé, le choix de la polymérase s'est porté sur l'Herculase II fusion (agilent). Les paramètres utilisés pour la réaction se composent d'une phase préliminaire de dénaturation de l'ADN double brin (1 min à 95 °C), suivi de trente cycles divisés en trois parties : dénaturation de l'ADN double brin (20 s à 95 °C), hybridation spécifique des amorces (20 s à $T_m - 5$ °C) et élongation du fragment d'ADN (60 s/Kb à 68 °C). La fin de la réaction correspond à une élongation terminale de 4 min à 68 °C. Le résultat de la PCR est vérifié par électrophorèse via l'application d'un champ électrique provoquant la migration de l'ADN au sein d'un gel d'agarose. La révélation est réalisée au moyen d'un fluorochrome : le bromure d'éthidium qui s'intercale entre les bases de l'ADN. La visualisation se fait en exposant le gel aux UV. La réalisation de cette technique s'effectue à l'aide d'un tampon Tris-Borate-EDTA pH 8 (Tris 90 mM, Borate 88,9 mM et EDTA 500 mM) mélangé avec de l'agarose 1 %. La bande d'ADN est découpée du gel puis purifiée à l'aide du kit illustra GFX PCR DNA and gel band purification (GE healthcare).

2.2 Insertion dans un vecteur d'expression :

Un vecteur d'expression est un ADN double brin cyclique, ce qui signifie que toute insertion d'ADN double brin linéaire (produit PCR) nécessite une étape de digestion. Cette dernière va permettre l'ouverture du cycle ainsi que la création d'extrémités complémentaires sur le fragment PCR. La réaction s'effectue séparément dans un volume de 90 μ l incluant le tampon de digestion 10 X et 1 unité de chaque enzyme de restriction (fast digest thermoscientific) pendant 1 h à 37 °C. L'ADN est ensuite purifié à l'aide du kit illustra GFX PCR DNA and gel band purification (GE healthcare) puis un aliquot est déposé sur gel d'agarose 1 % afin de vérifier la concentration et l'efficacité de la digestion.

Il s'en suit la ligation de l'insert dans le vecteur d'expression qui s'effectue dans un volume de 20 µl final en présence de tampon T4 DNA ligase 10 X et d'une unité de T4 DNA ligase (fermentas) durant une nuit à 4 °C. Il est important que la quantité du fragment PCR soit trois fois supérieure à celle du plasmide.

Chapitre 3 : Méthodes de transformation d'*Escherichia coli* :

1. Transformation de bactéries électro-compétentes BL21 pSBET :

La transformation de bactéries électro-compétentes nécessite la présence de matériels adéquats : un électroporateur et des cuvettes composées de deux électrodes en aluminium séparées de deux millimètres. Un mélange de BL21 pSBET (50 µl) électro-compétentes et de plasmide recombinant (15 ng) est placé dans une cuvette. Cette dernière est soumise à une décharge électrique de 5 millisecondes à 2800 V créant des micropores dans la membrane bactérienne permettant ainsi l'incorporation du plasmide. Un volume de 500 µl de milieu SOC liquide (Bactotryptone 2 %, yeast extract 0,5 %, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgSO₄ 10 mM, MgCl₂ 10 mM et glucose 0,2 %) est ajouté directement dans la cuvette puis le tout est transféré dans un tube eppendorf placé à 37 °C pendant 1 h. Ensuite les bactéries sont centrifugées pendant 30 s à 14 500 rpm afin d'éliminer 400 µl de milieu SOC. Les 100 µl restant sont étalés sur une boîte de pétri contenant du milieu LB agar solide (35 g/L) (Agar 15g, peptone 10 g, extrait de levure 5 g, NaCl 10 g et H₂O miliQ Qsp 1 l) et des antibiotiques appropriés afin de sélectionner les bactéries ayant intégré le plasmide. La croissance des bactéries se fait à 37 °C sur la nuit.

2. Transformation de bactéries thermo-compétentes Rosetta 2 et DH5α :

La transformation de bactéries thermo-compétentes nécessite la présence d'un bain marie ou d'un bain sec. Un mélange de Rosetta2 ou de DH5α (50 µl) thermo-compétentes et de plasmide recombinant (15 ng) ou de produit de ligation (5 µl) est placé dans un tube eppendorf à 4°C pendant 30 min. Un choc thermique est ensuite réalisé pendant 45 s à 42 °C. Ensuite, un volume de 500 µl de milieu SOC liquide est ajouté puis le tube est incubé à 37 °C pendant 1 h. Les étapes de sélection sur boîtes sont les mêmes que précédemment.

Chapitre 4 : Production et purification de protéines recombinantes :

1. Production de protéines recombinantes par induction à l'Isopropyl β -D-1 thiogalactopyranoside (IPTG) :

Pour réaliser un test de production, une culture de 3 ml de LB (Peptone 10 g, extrait de levure 5 g, NaCl 10 g et H₂O miliQ Qsp 1l) contenant les marqueurs de sélection estensemencée avec un cure-dent dont la pointe a été plongée dans une colonie bactérienne. La culture est ensuite incubée à 37 °C sous agitation jusqu'à atteindre un léger trouble du milieu. C'est alors que 3 μ l d'IPTG (100 μ M) sont ajoutés pendant 3h afin d'induire la production de la protéine. Un prélèvement de 200 μ l est culoté et resuspendu dans du tampon Laemmli puis chauffé à 95 °C pendant 10 min. Ce dernier est alors analysé sur gel SDS-PAGE 15 %. La production de la protéine recombinante à grande échelle nécessite une augmentation progressive du volume de culture tout en gardant la pression de sélection. La première étape consiste àensemencer une culture de 3 ml à 37 °C sur la journée et sous agitation. Un aliquot de 200 μ l est transféré dans un volume de 200 ml de LB sur la nuit à 37 °C et sous agitation. La dernière étape nécessite une culture de 800 mlensemencée avec 50 ml de préculture. Lorsque la DO atteint 0,6 un volume de 800 μ l d'IPTG (100 μ M) est ajouté pendant 4 h puis les cellules sont culottées par centrifugation à 5000 rpm pendant 25 min. Chaque culot est repris dans 15 ml de tampon adéquat et stocké à -20 °C. Avant chaque purification, les culots bactériens sont décongelés à température ambiante puis les cellules sont lysées par sonication deux fois 1 min (Sonicator ultrasonic processor XL, sonde de 1 cm de diamètre, intensité de 20 % et un cycle de 0,5 seconde d'ultrason et 0,5 seconde de repos). Le lysat est centrifugé (15 000 rpm à 4 °C pendant 20 min) afin de séparer les protéines solubles (surnageant) des débris cellulaires et des protéines insolubles (culot). Toutes les chromatographies sont effectuées sur les protéines solubles.

2. Purification des protéines sans étiquette :

2.1 Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium :

La précipitation différentielle au sulfate d'ammonium est une technique de purification permettant de séparer des protéines selon leur solubilité en solution aqueuse.

L'ajout de sulfate d'ammonium entraîne une modification de la force ionique diminuant la possibilité d'interactions entre protéines et molécules d'eau. Par conséquent et à une concentration donnée de sel certaines protéines vont devenir insolubles et précipiter. Les protéines solubles d'*E. coli* sont soumises à un gradient de concentrations de sulfate d'ammonium : 40 et 80 %. Après dissolution complète et pour chaque étape, une centrifugation de 15 min à 20 000 rpm à 4 °C est réalisée. L'augmentation du gradient s'effectue sur le surnageant de centrifugation. Par la suite, tous les culots sont re-suspendus dans un tampon Tris-HCl 30 mM, pH 8, NaCl 200 mM. La présence de la protéine d'intérêt dans l'un de ces culots est déterminée par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 15 %.

2.2 Chromatographie d'exclusion de taille :

Ce type de chromatographie constitue la seconde étape de purification des protéines sans étiquette, elle fait suite à la précipitation différentielle au sulfate d'ammonium. La résine utilisée est constituée d'acrylamide 3 % et d'agarose 4 %. Cette dernière a la capacité de séparer les protéines selon un diamètre globulaire compris entre 20 000 et 350 000 Da. Pour cela, la colonne est lavée avec un volume de 600 ml de tampon (Tris-HCl pH8, NaCl 200 mM) afin d'éliminer toutes protéines résiduelles. La partie 40-80 % de la précipitation au sulfate d'ammonium est déposée sur la colonne et les protéines sont récupérées dans différentes fractions à l'aide d'un collecteur. La présence de la protéine d'intérêt est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre (mesure de la densité optique) à 280 nm. Ensuite, les fractions sélectionnées sont analysées sur gel SDS-PAGE 15 % puis rassemblées et concentrées grâce à une cellule de concentration amicon (membrane YM10).

2.3 Chromatographie échangeuse d'ions : Diethylaminoethyl cellulose :

Ce type de chromatographie repose sur le fait qu'à un pH donné toutes les protéines ont une charge globale nette propre. Par conséquent, cela signifie que pour un pH donné, certaines protéines sont chargées positivement (pH inférieur au Point Isoélectrique), négativement (pH supérieur au Point Isoélectrique) ou ont une charge globale nette nulle (pH est égale au PI). Il est donc possible de séparer les protéines selon leur charge nette globale.

La diethylaminoethyl cellulose est une résine utilisée pour sa capacité de liaison avec des molécules chargées négativement, on dit que c'est une chromatographie échangeuse d'anions. Avant toute utilisation, il est impératif d'éliminer toute trace de NaCl au sein de la colonne et dans l'échantillon protéique. Pour se faire la colonne est rincée et les protéines dialysées avec un tampon Tris-HCl 30 mM pH 8. Ensuite ces dernières peuvent être déposées sur la colonne. L'étape de lavage se réalise avec le même tampon que précédemment et l'élution se fait progressivement à l'aide d'un gradient de NaCl de 0 à 400 mM. Les différentes fractions sont récupérées à l'aide d'un collecteur puis analysées selon la même méthode que précédemment. La concentration de l'échantillon doit être faite dans un tampon Tris-HCl 30 mM pH 8 NaCl 200 mM.

3. Purification des protéines présentant une étiquette poly-histidines :

3.1 Chromatographie d'affinité IMAC :

La résine est constituée de billes d'agarose liées à des groupements NI-NTA (Nickel-acide nitriloacétique). L'ion nickel ni^{2+} possède six liens de coordination, quatre sont utilisés par le NTA afin de le maintenir sur la résine. Les deux liens restants sont libres d'interagir avec les atomes d'azotes du cycle de la chaîne latérale des histidines. Par conséquent, cette chromatographie est utilisée pour purifier les protéines présentant une étiquette poly-histidine (6 histidines en N-terminal ou C-terminal). La résine est équilibrée avec un tampon Tris-HCl 30 mM, pH 8, NaCl 200 mM puis les protéines solubles sont chargées sur la colonne. Afin d'éliminer un maximum d'interactions aspécifiques, un lavage est réalisé avec le tampon d'équilibration de la colonne puis un second avec un tampon Tris-HCl 30 mM, pH 8, NaCl 500 mM, imidazole 10 mM. Les protéines sont de nouveau mises en contact avec la résine et ces étapes de lavage sont répétées une seconde fois. L'élution de la protéine d'intérêt s'effectue grâce à un tampon Tris-HCl 30 mM, pH 8, NaCl 500 mM, imidazole 250 mM. Cette dernière est ensuite concentrée et dialysée dans un tampon Tris-HCl 30 mM, pH 8, NaCl 500 mM. Les différentes fractions sont ensuite analysées sur gel SDS-PAGE 15 %.

3.2 Fast Protein Liquid Chromatography :

Cette technique de purification est employée dans le but d'éliminer des contaminants résiduels après purification par IMAC.

BioRad mini gels (2 gels de 0.75 mm)						
	10 %	12 %	13 %	14 %	15 %	17 %
Gel de séparation						
1.5 M Tris-HCl pH 8.85	1.875 ml					
eau	3.656 ml	3.236 ml	3.049 ml	2.86 ml	2.68 ml	2.3 ml
40 % acrylamide	1.875 ml	2.25 ml	2.437 ml	2.625 ml	2.81 ml	3.19 ml
20 % SDS	37.5 µl					
10 % AMPS (100 mg/ml)	45 µl					
TEMED	11 µl					
Gel de concentration	5 ml		3 ml		2 ml	
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	1.25 ml		0.75 ml		0.5 ml	
eau	2.95 ml		1.77 ml		1.18 ml	
40 % acrylamide	665 µl		399 µl		266 µl	
20 % SDS	25 µl		15 µl		10 µl	
10 % AMPS (100 mg/ml)	45 µl		27 µl		18 µl	
TEMED	8 µl		4.8 µl		3.2 µl	

Tableau 2 : Composition d'un gel SDS-page en fonction du pourcentage d'acrylamide

La résine est un composite d'agarose et de dextran permettant la séparation des protéines suivant un diamètre globulaire compris entre 10 000 et 600 000 Da. Le choix de la colonne utilisée (Superdex 200 16/600) est déterminé par la taille et par les capacités d'oligomérisation de la protéine d'intérêt. L'échantillon protéique doit avoir un volume maximal de 1 ml pour être injecté dans le système de pompes, les injections se font par tranche de 250 µl. Ensuite, la purification est prise en charge par le système automatisé Akta purifier (GE healthcare). La collecte se fait sous forme de fractions qui sont choisies à l'aide des spectres d'absorption à 214 et 280 nm puis déposées sur gel SDS-PAGE 15 %.

4. Séparation de macromolécules sur gel :

L'électrophorèse est une méthode permettant la séparation de macromolécules en fonction de leur taille et de leur charge électrique. La tension du champ électrique appliqué va entraîner la migration des protéines au sein d'un gel qui agit comme un tamis moléculaire. La vitesse de migration est donc dépendante de la charge électrique globale de chaque molécule et des forces de frottements au sein du gel. Cette technique est couramment utilisée pour discriminer des protéines et des fragments d'ADN.

4.1 Electrophorèse protéique sur gel polyacrylamide :

Les protéines sont placées dans un tampon Laemmli 5X (Tris 0,5 M pH 8, β-mercaptoethanol 10 %, SDS 4 %, glycérol 20 % et bleu de bromophénol 2 %) et chauffées à 95 °C pendant 10 min. Ces étapes permettent la dénaturation de ces dernières et leur confèrent une charge négative via la liaison de molécules de SDS. L'application d'un champ électrique provoque la migration des protéines au sein du gel (Tableau 2) et leur séparation en fonction de la taille. Suite à cela, les gels sont placés dans un bain de solution de coloration (Acide Acétique 10 %, éthanol 45 %, eau 45 % et bleu de coomassie R 250 1 g) pendant 15 min, puis dans un bain de décoloration (Acide Acétique 7,5 %, éthanol 5 % et eau 87,5 %).

Chapitre 5 : Caractérisation biochimique des protéines recombinantes :

1. Détermination de la taille et de l'état d'oligomérisation des protéines :

1.1 Par chromatographie d'exclusion de taille analytique couplée à une analyse sur gel SDS-PAGE :

La détermination de la taille ainsi que l'état d'oligomérisation des protéines recombinantes se fait à l'aide de deux colonnes : une Superdex 200 10/300 dont le domaine de fractionnement est compris entre 10 000 et 600 000 Da, et une Superdex 75 10/300 dont le domaine de fractionnement est compris entre 3 000 et 70 000. Les deux colonnes sont connectées à un système automatisé Akta purifier de GE healthcare. Les protéines natives présentant un état oligomérique sont réduites afin de déterminer si cet état est dû à la formation de ponts disulfure. Chaque analyse nécessite 100 µg de protéines. Les protéines natives non réduites sont déposées sur gel SDS-PAGE 15 % en présence de SDS pour savoir si la présence du détergent est suffisante pour anihiler les interactions entre sous unités protéiques dans le cas d'oligomères.

1.2 Par spectroscopie : diffusion dynamique de la lumière (DLS) :

La diffusion dynamique de la lumière fait partie des méthodes de spectroscopie non destructives. Toutes les molécules se trouvant dans un liquide sont soumises au mouvement Brownien dû à l'agitation thermique. Lorsqu'un laser est projeté sur une solution sa trajectoire va être modifiée par les molécules présentes. Cette dernière est mesurée au cours du temps (intensité de modification). Il en résulte des changements d'intensité très rapides pour de petites molécules et plus lents pour de grosses particules. A partir des données recueillies il est possible de déterminer un rayon hydrodynamique de la molécule et donc une taille. Les échantillons protéiques mesurés se trouvent dans quatre tampons différents : deux tampons phosphate 50 mM l'un à pH 5.8 et l'autre à pH 8 et deux tampons Tris-HCl 30 mM pH 8. L'appareil utilisé est de type Malvern NanoSizer.

2. Visualisation des propriétés structurales des protéines :

2.1 Microscopie à force atomique :

La microscopie à force atomique est une méthode utilisée pour déterminer la topographie d'une surface de la taille du nanomètre voir du micromètre. Elle repose sur la mesure des interactions (attraction ou répulsion) entre atomes présents sur la pointe de mesure et ceux présents sur la surface. Dans notre cas, l'appareil employé est un NanoWizard® Atomic Force Microscope (JPK, Germany) qui permet l'analyse d'une surface via le mode de contact intermittent. Un cantilever rectangulaire standard (Nonosensors NCL-W) a été utilisé pour faire les images (taux de scan de 0,5 Hz). Celui-ci possède une fréquence de résonance libre de 174 kHz et un rayon de courbure de la pointe de 10 nm. La reproductibilité de la topologie observée est vérifiée en scannant tous les échantillons au minimum trois fois dans des zones différentes. De plus, chaque préparation a été observée avec des pointes préalablement nettoyées par un traitement UV-ozone. L'échelle des images est fournie grâce au logiciel JPK data Processing software (JPK, Germany). Les mesures effectuées avec cette méthode doivent être faites sur des lamelles de verre parfaitement propres. C'est pourquoi, elles sont traitées avec un mélange piranha (acide sulfurique et peroxyde d'hydrogène) permettant l'élimination de résidus organiques puis rincées à l'eau ultra pure. La technique de séchage fait appel à un courant d'azote gazeux. Ensuite, une fine gouttelette de protéine est déposée sur la lamelle de verre chauffée à 20 °C afin de favoriser un séchage rapide (2 minutes) et ainsi éviter la formation de gradient de concentration sur le substrat. L'échantillon est ensuite immédiatement imagé par AFM.

2.2 Dichroïsme circulaire :

Le dichroïsme circulaire est une méthode basée sur la capacité d'un échantillon possédant un élément asymétrique absorbant la lumière ou placé dans un environnement asymétrique, d'absorber différemment la lumière polarisée circulairement à droite et la lumière polarisée circulairement à gauche. Le spectre dichroïque obtenu équivaut à la différence d'absorbance entre les deux lumières. Dans notre cas, l'étude de protéines, la mesure se fait dans l'UV lointain qui correspond à la zone d'absorption de la liaison peptidique.

On peut alors obtenir des informations sur la structure secondaire de la protéine (hélice α , feuillets β , tours et structures désordonnées) et estimer le pourcentage de chaque conformation à l'aide de logiciel. Pour se faire, les échantillons de protéines ont été dialysés dans un tampon phosphate 50 mM pH 5.8 ou pH 8 et analysés sur un Chirascan-plus (applied photophysics).

3. Activités enzymatiques des protéines recombinantes :

3.1 Par dosage fluorométrique :

Différentes molécules de sucres sont liées à une molécule de 4-méthylumbelliferyl (MUB), l'activité enzymatique correspondante va provoquer la libération de la molécule de MUB entraînant une émission de fluorescence à 460 nm. Cette dernière est mesurée à l'aide d'un Victor multilabel plate reader (PerkinElmer) programmé sur une longueur d'onde d'excitation de 380 nm. Les différents sucres testés sont : le 4-méthylumbelliferyl-7- β -D-xyloside, le 4-méthylumbelliferyl-N-acetyl- β -Dglucosaminide, le 4-méthylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside, le 4-méthylumbelliferyl- β -D-glucuronide hydrate et le 4-méthylumbelliferyl- β -D-xylopyranoside. Les expériences réalisées ont été menées sur du sécrétome de *P. chrysosporium* supplémenté ou non avec les SSP1 et SSP1trunc, la SSP1 seule et la SSP1trunc seule. Le volume réactionnel est de 150 μ l final comprenant 50 μ l de tampon acétate de sodium 100 mM pH 4.5, 50 μ l de substrat MUB à 500 μ M et 50 μ l des différentes conditions (SSP à 40 μ g). La solution est incubée une heure à 25 °C puis la réaction est stoppée par du tampon Tris-HCl 2,5 M pH 11. Afin d'optimiser les conditions expérimentales, une gamme de pH (4,5 à 8) et de température (25 à 60 °C) a été effectuée.

4. Modification des tampons protéiques :

4.1 Par dialyse des protéines :

La dialyse est un processus utilisant une membrane perméable visant à modifier le contenu d'une solution. La modification se fait grâce à un gradient de concentration entraînant un flux de migration de la solution la plus concentrée vers la moins concentrée jusqu'à atteindre un équilibre.

La membrane de dialyse (Spectra/Por dialysis membrane, MWCO 6-8 000) est nettoyée dans une solution d'eau ultra pure contenant 5 mM d'EDTA portée à ébullition pendant 10 min. L'élimination de l'EDTA se fait par lavage avec de l'eau ultra pure. La membrane est prête pour accueillir une solution protéique d'un volume de 1 ml dialysée contre une solution tampon de 1 L sous agitation durant une nuit à 4 °C. Le tampon est ensuite remplacé par une solution fraîchement préparée et la dialyse est réitérée pour une demi-journée supplémentaire.

4.2 Diminution de la quantité de sel par concentration et dilution :

La concentration d'un échantillon protéique est réalisée à l'aide d'une cellule de concentration amicon (membrane YM10) sous pression d'azote. Le tampon va passer à travers la membrane tandis que les protéines sont retenues permettant la diminution du volume de la solution. Après concentration, un tampon équivalent mais ne contenant pas de sel est ajouté ayant pour effet la diminution de la concentration saline. La solution est à nouveau concentrée puis ces étapes sont répétées plusieurs fois afin d'atteindre le facteur de dilution souhaité.

Chapitre 6 : Transformation génétique et caractérisation des mutants chez *S. cerevisiae* :

La transformation de levure se réalise sur deux jours, le premier est utilisé pour faire une culture overnight de 10 ml dans du milieu YPD (extrait de levure 1 %, peptone 2 % et D-glucose) à 30 °C sous agitation 190 rpm. Le lendemain matin un aliquot est récupéré afin de déterminer la densité optique de la culture. Une fois la valeur connue, 50 ml de YPD à une DO de 0,2 sontensemencés et incubés dans les mêmes conditions que précédemment. Lorsque la DO est comprise entre 0,6 et 1 (début de la phase exponentielle), les cellules sont centrifugées (4000 rpm pendant 10 min à température ambiante) afin d'éliminer le surnageant puis resuspendues dans 300 µl d'eau distillée. Pour chaque transformation 500 ng de plasmide, 50 µl de levures et 272 µl de lithium acétate/PEG 4000 (240 µl de solution PEG 50 % poids/volume plus 32 µl de lithium acétate 1 M) sont mélangés et mis à incuber à 30 °C pendant 30 min. Il s'en suit un choc thermique de 15 min à 45 °C.

Les cellules sont lentement centrifugées à 2000 rpm (température ambiante) pendant 2 min le culot est resuspendu dans 200 µl d'eau. 100 µl sont inoculés par boîte de pétri contenant un milieu de sélection Yeast nitrogen base (YNB 0.675 %, drop out 0,192 %, glucose 2 % et agar si solide 2 %) (Auxotrophie à l'uracile) puis incubés à 30 °C.

1. Western-blotting :

1.1 Préparation des cellules :

Une culture sur la nuit de 10 ml d'YNB est réalisée et incubée à 30 °C sous agitation. Cette dernière est utilisée pour ensemercer à une DO de 0,2 un volume de 50 ml d'YNB. Lorsque la DO atteint une valeur de 0,6, les cellules sont centrifugées à 4000 rpm durant 10 min à température ambiante. Le milieu YNB est éliminé puis remplacé par du YNB galactose car le gène codant la protéine d'intérêt est contrôlé par un promoteur inductible au galactose. La culture est ensuite mise sous agitation à 30 °C pendant une nuit, puis les cellules sont resuspendues dans 1 ml d'eau stérile. La première étape de l'extraction de protéines chez la levure consiste à lyser ces cellules par choc thermique. Ces dernières sont placées dans un bain d'azote liquide pendant 30 secondes puis 5 min à 70 °C. La solution est ensuite vortexée en présence de microbilles. Cette opération est répétée quatre fois.

1.2 Extraction protéique :

Un tampon d'extraction protéique (Tris-HCl 1 M pH 8,5 %, β-mercaptoethanol 14,3 M, PMSF 100 mM) est ajouté dans l'échantillon biologique préalablement lysé. La quantité de ce dernier est ajustée en fonction du volume de la solution de levure (application d'un facteur quatre). Les échantillons sont ensuite placés à 4 °C sous agitation puis centrifugés à 15 000 rpm pendant 20 min. Le surnageant contenant les protéines solubles est récupéré puis repris dans de l'acétone glaciale 100 % (1 ml de protéine pour 4 ml d'acétone) et stocké à -20 °C. Pour extraire les protéines membranaires, le culot est resuspendu dans 1 ml de solution d'extraction membranaire (Tris-HCl 1 M pH 8,5 % et SDS 10 %) puis les échantillons sont placés à 4 °C sous agitation et centrifugés à 15 000 rpm pendant 20 min. Le surnageant est collecté et stocké comme décrit précédemment.

1.3 Western blot :

Le western blot est une technique utilisée afin d'identifier une protéine de façon spécifique au sein d'un échantillon biologique. La première étape consiste à réaliser une migration lente (120 V) des protéines sur un gel SDS-PAGE 15 % et de 1 mm d'épaisseur. Au préalable, il est important de chauffer les échantillons protéiques dans du tampon Laemmli 10 min à 95 °C. Lorsque la migration est terminée, le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose est réalisé dans une solution de transfert (Tris 25 mM, glycine 192 mM et méthanol 10 %) pendant 1 h à 100 V. Ensuite, il est essentiel de bloquer les sites libres non spécifiques de la membrane avec 10 ml d'une solution de blocage (Odyssey blocking buffer) pendant une nuit à 4 °C sous agitation. Ceci afin d'éviter une fixation aspécifique de l'anticorps sur les sites libres. Après cette étape, 10 µl d'anticorps primaire (1/1000 ème) et 5 µl de tween 20 sont ajoutés directement dans la solution de blocage. L'incubation se fait pendant 2 h à température ambiante et sous agitation. Quatre lavages de 10 min sont ensuite effectués avec 10 ml d'une solution de PBS-tween (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, Tween 20 500 µl et H₂O miliQ Qsp 1 L). Une fois cette étape terminée, la membrane est à nouveau placée dans 10 ml de solution de blocage, 2 µl d'anticorps secondaire (1/5000ème), 5 µl de tween 20 et 5 µl de SDS 20 % pendant 2 h à température ambiante, sous agitation et à l'obscurité. Avant révélation de la membrane il est nécessaire de réaliser trois lavages avec du PBS tween 1X et trois lavages avec du PBS 1X. La révélation se fait grâce à un scan infrarouge de chez Li-cor (odyssey).

2. Localisation cellulaire par imagerie au microscope confocal :

Suite à la transformation génétique, un plasmide contenant une fusion protéique a été introduit chez la levure. L'expression de cette construction est régie par un promoteur inductible au galactose. C'est pourquoi, il est nécessaire de réaliser une induction avec du milieu YNB enrichi en galactose. Dans notre cas, cette étape a été réalisée sur des levures en phase exponentielle (DO de 0,6) durant 15 h à 30 °C sous agitation. La culture étant effectuée en milieu liquide, il suffit donc de déposer une goutte de culture sur une lame en verre puis de l'observer afin de déterminer une localisation cellulaire.

Nom	Séquence 5' 3'	Région amplifiée
Pa_2-3860-A	GAG TTG TTG GTT GTA GGT TTG ATG GGG AGT	Amont du gène Pa_2-3860
Pa_2-3860-B	CTA TTT AAC GAC CCT GCC CTG AAC CGA ACG CAA GGT AGG TAT GAT GAG AAG GGA TG	
Pa_2-3860-C	CTT ACC GCT GTT GAG ATC CAG TTC GAT GGT GGA AGT TGG TGG GAG CGT TAG GGA AAGG	
Pa_2-3860-D	ATT CGT AAC AGA TCC GTT GTT CGA GGC CGG	Aval du gène Pa_2-3860
Pa_2-3860-E	CAT CCC TTC TCA TCA TAC CTA CCT TGC GTT CGG TTC AGG GCA GGG TCG TTA AAT AG	Hygromycine Pa_2-3860
Pa_2-3860-F	CCT TTC CCT AAC GCT CCC ACC AAC TTC CAC CAT CGA ACT GGA TCT CAA CAG CGG TAA G	
Pa_6-2010-A	GAC TGA TAA CCT CAA CAG CGC TTT CTT GTC	Amont du gène Pa_6-2010
Pa_6-2010-B	CTA TTT AAC GAC CCT GCC CTG AAC CGC GAA ACT TAC CCC TCA AGT GAC GAG AAA TC	
Pa_6-2010-C	CTT ACC GCT GTT GAG ATC CAG TTC GAT GGT TCT TGG AGG ACT TTG AGG CTT AAG CAA G	Aval du gène Pa_6-2011
Pa_6-2010-D	CTC AAC TTT CTT CGG AAC ACT TGG GAA TCT	
Pa_6-2010-E	GAT TTC TCG TCA CTT GAG GGG TAA GTT TCG CGG TTC AGG GCA GGG TCG TTA AAT AG	généticine Pa_6-2010
Pa_6-2010-F	CTT GCT TAA GCC TCA AAG TCC TCC AAG AAC CAT CGA ACT GGA TCT CAA CAG CGG TAA G	
Pa_1-5100-A	ATG GTT CTT ACC TAT GGT TGG AGC GTT GTC	Amont du gène Pa_1-5100
Pa_1-5100-B	CTA TTT AAC GAC CCT GCC CTG AAC CGG AGG GTT GAG AGT AGC TGT CAT CTT GTT CG	
Pa_1-5100-C	CTT ACC GCT GTT GAG ATC CAG TTC GAT GAG GCG TTC TGG TAG ACC TTG GTA GAT GTG G	Aval du gène Pa_1-5101
Pa_1-5100-D	GTC GAA GCT AGG GAT TTG TGT TTG CGG TTT TAT C	
Pa_1-5100-E	CGA ACA AGA TGA CAG CTA CTC TCA ACC CTC CGG TTC AGG GCA GGG TCG TTA AAT AG	généticine Pa_1-5100
Pa_1-5100-F	CCA CAT CTA CCA AGG TCT ACC AGA ACG CCT CAT CGA ACT GGA TCT CAA CAG CGG TAA G	
Pa_5-3780-A	GTT CAA GAT TGA CAT ACG AAG ATC GGA CCA	Aval du gène Pa_5-3780
Pa_5-3780-B	CTA TTT AAC GAC CCT GCC CTG AAC CGG ATG AGG AGA AAA AGA GAG TCG GCC AAA GT	
Pa_5-3780-C	CTT ACC GCT GTT GAG ATC CAG TTC GAT GCA TCT TAT TTC CCC TAT CAT ACC CCC TTG C	Amont du gène Pa_5-3781
Pa_5-3780-D	CAC ATC AAC CCT CAT CAT CAG AAA CCA TC	
Pa_5-3780-E	ACT TTG GCC GAC TCT CTT TTT CTC CTC ATC CGG TTC AGG GCA GGG TCG TTA AAT AG	hygromycine Pa_5-3780
Pa_5-3780-F	GCA AGG GGG TAT GAT AGG GGA AAT AAG ATG CAT CGA ACT GGA TCT CAA CAG CGG	

Tableau 3 : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour obtenir les mutants chez *P. anserina*

Chapitre 7 : Réalisation de mutants knock out chez *Podospora anserina* :

Afin d'étudier la fonction de deux Glutathion transferases (Pa_1 5100 et Pa_2 3860) et deux petites protéines sécrétées (Pa_6 2010 et Pa_5 3780), chaque gène associé a été remplacé par un marqueur de sélection chez *Podospora anserina* : la généticine (Pa_1 5100 et Pa_6 2010) ou l'hygromycine (Pa_2 3860 et Pa_5 3780).

1. Réalisation de cassettes de délétion par PCR et transformation génétique :

1.1 Obtention des cassettes de délétion (Silar, 1995) :

L'obtention des mutants s'effectue par remplacement de gène et plus précisément par recombinaison homologue, c'est pourquoi il est important de réussir à amplifier les régions génomiques en amont en aval du gène d'intérêt. Suite à cela, ces dernières viendront flanquer le marqueur de sélection qui pourra par double crossover s'insérer au sein de l'ADN génomique. Pour la délétion d'un gène chez *P. anserina* six amorces sont nécessaires, celles utilisées pour obtenir les quatre mutants sont recensées dans le Tableau 3. Les cassettes de délétion sont obtenues grâce à deux étapes de PCR : la première étape (Figure 36) permet d'obtenir trois produits PCR : la région en amont (amorces d'amplification A et B) et la région en aval (amorces d'amplification C et D) du gène d'intérêt, ainsi que le marqueur de sélection (amorces d'amplification E et F). La réaction de PCR débute par une phase de dénaturation de l'ADN 2 min à 95 °C, puis s'en suit 35 cycles commençant par la dénaturation de l'ADN (30 s à 94 °C), suivie d'une phase d'hybridation (30 s à 62 °C) et se terminant par une phase d'élongation (1 min/Kb à 72 °C). La réaction se termine par une phase d'élongation de 10 min à 72 °C.

- la seconde étape (Figure 37) aboutie sur deux produits PCR : la demi-cassette de délétion amont et la demi-cassette de délétion aval. Pour obtenir ceci deux PCR ont été effectuées : une en réunissant les produits PCR des amplifications AB (région amont) et EF (marqueur de sélection), et l'autre en rassemblant les produits PCR des amplifications CD (région aval) et EF. Les oligonucléotides utilisés sont respectivement A et F, E et D. Les paramètres de la PCR sont identiques à la première.

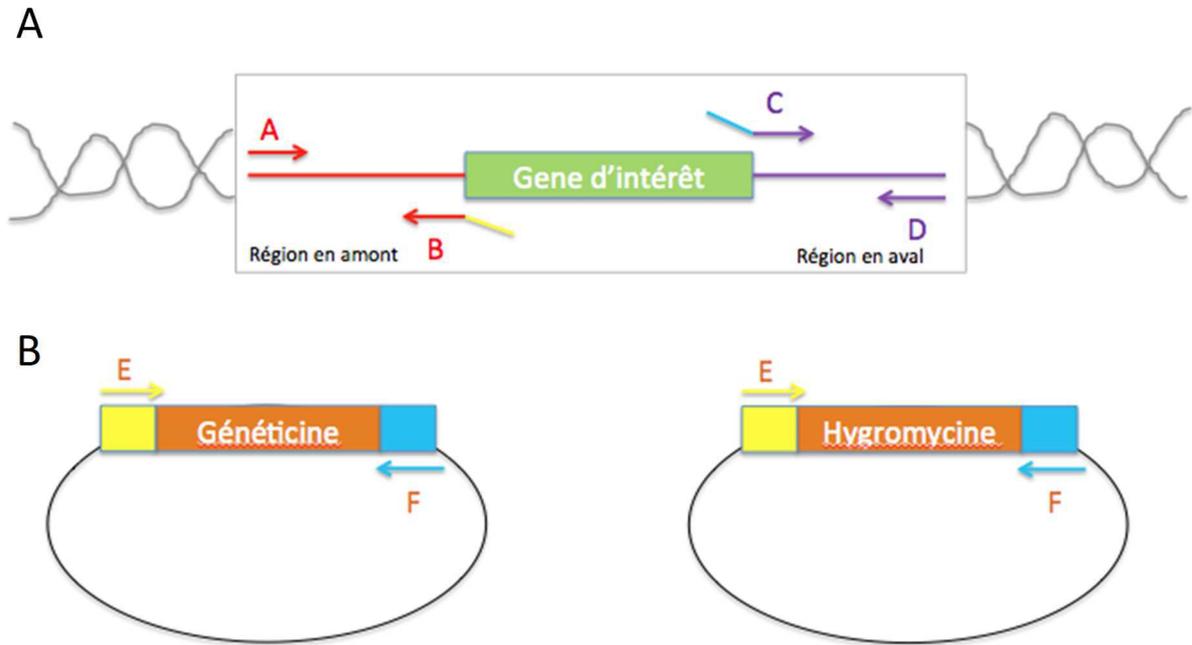


Figure 36 : Schéma des premières PCR du protocole de construction de la cassette de déletion.

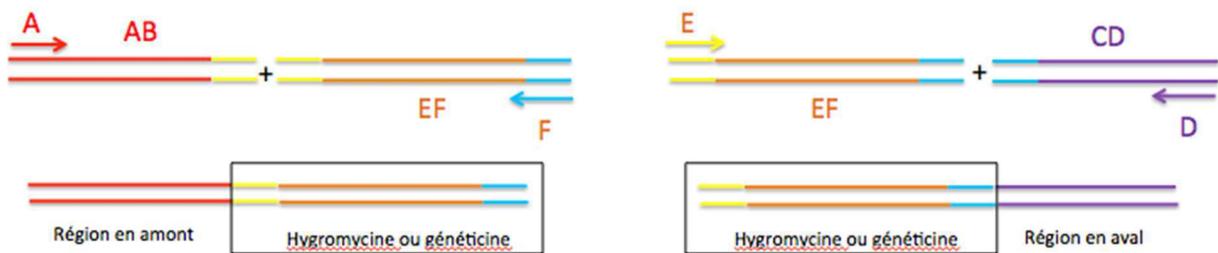


Figure 37 : Schéma des secondes PCR du protocole de construction de la cassette de déletion.

Milieu M2		Solution d'oligoéléments	
Composants	1 L	composants	500 ml
KH ₂ PO ₄ (50g/L)	5 ml	Acide citrique, 1 H ₂ O	2.5 g
K ₂ HPO ₄ (60g/L)	5 ml	sulfate de zinc (Zn SO ₄ , 7 H ₂ O)	2.5 g
MgSO ₄ (50g/L)	5 ml	alun de fer Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ , 6 H ₂ O	0.5 g
Urée (100g/L)	5 ml	CuSO ₄ , 5 H ₂ O	125 mg
Biotine (100mg/L)	0.5 ml	MnSO ₄ , 1H ₂ O	25 mg
Thiamine (100mg/L)	0.5 ml	Acide borique H ₃ BO ₃ , anhydre	25 mg
oligoéléments	1 ml	Molybdate de sodium Na ₂ Mo O ₄ , 2 H ₂ O	25 mg
Dextrine de patate	4 g	chloroforme	1 goutte
Agar	10 g		
Eau distillée	980 ml		

Tableau 4 : Composition du milieu de croissance M2.

Afin d'éviter des hybridations aspécifiques, lors de la réalisation du mix PCR la température de travail est de 4 °C puis une hot Start PCR est effectuée (les tubes sont placés dans le bloc chauffant uniquement quand celui-ci atteint une température de 70 °C). Après vérification sur gel d'agarose de la quantité (20 µg) et de la qualité des deux cassettes, elles sont réunies dans un volume de 50 µl d'eau.

1.2 Transformation génétique (Bergès et al., 1989) :

P. anserina est cultivé dans du milieu M2 liquide (Tableau 4) supplémenté en yeast extract (5 g/L) à l'obscurité et à 27 °C pendant 30 h. Le mycélium est récupéré par filtration à l'aide de gaz stérile permettant l'élimination du milieu de culture. Les traces résiduelles restantes sont éliminées par des lavages réalisés avec du tampon TPS1 (Na₂HPO₄ 5 mM, KH₂PO₄ 45 mM et saccharose 20%). Le mycélium est ensuite digéré dans une solution enzymatique contenant un 1 ml de TPS1 par gramme de mycélium et un cocktail enzymatique (glucanex) à une concentration comprise entre 10 et 40 mg/ml. La digestion est réalisée à 37 °C sous agitation lente pendant 1 à 4 h.

Les débris cellulaires et les fragments non digérés sont séparés des protoplastes par filtration avec de la gaz stérile. Afin de récupérer une plus grande quantité de protoplastes, une solution de sorbitol 0,6 M est versée sur la gaz. La concentration des protoplastes dans une solution hypertonique (0,6M saccharose, 10 mM CaCl₂, 10 mM Tris, pH 7,5) est réalisée par centrifugation des cellules pendant 10 min à 3000 rpm. Le calcul de la concentration se fait au moyen d'une cellule de Malassez : le nombre de protoplastes par ml correspond au nombre de cellules dans 20 petits carrés multiplié par 100 000. Les protoplastes peuvent être conservés à -80°C indéfiniment ou être directement utilisés pour une transformation. Une transformation optimale de *P. anserina* requiert un minimum de 2.10⁷ protoplastes. L'entrée d'ADN dans ces cellules est possible uniquement lorsque la membrane est perméable. Ceci est tout d'abord réalisé au moyen d'un choc thermique : 5 min à 48 °C puis 30 s à 4 °C et 5 min à température ambiante. 5 à 10 µg d'ADN sont ajoutés et une incubation de 15 min à température ambiante est réalisée. Pour optimiser la déstabilisation des membranes, 2 ml d'une solution (tampon D) contenant du PEG 4000 60 %, du CaCl₂ 10 mM et du Tris 10 mM pH 7,5 sont ajoutés.

Nom	Séquence 5' 3'	Région amplifiée
Pa-2010 verif for	TGC GAG ATC GAA CAA ACG	Amont de la cassette de déletion du gène 2010
Pa-2010 verif rev	TCT TAA CTG GGC TGG CAT GT	Aval de la cassette de déletion du gène 2010
Pa-3860 verif for	GGT CGG TTG GAG AGA GAA AA	Amont de la cassette de déletion du gène 3860
Pa-3860 verif rev	CGT CTC GGA CCA TCA TCA TT	Aval de la cassette de déletion du gène 3860
Pa-3780 verif for	GGG ATC TGT GGG AAA AGC TA	Amont de la cassette de déletion du gène 3780
Pa-3780 verif rev	ATG CCA TTG TCC TCA ACC TC	Aval de la cassette de déletion du gène 3780
Pa-5100 verif for	CGT GCG GTG TTT AGG CTA TT	Amont de la cassette de déletion du gène 5100
Pa-5100 verif rev	ATC GAA CCA ACG TAC CCT GA	Aval de la cassette de déletion du gène 5100
verif hygro for	GTT GCA AGA CCT GCC TGA A	Amorce couplée avec des oligos verif rev
verif hygro rev	CACATG GGG ATC AGC AAT C	Amorce couplée avec des oligos verif for
verif gene for	TGA CTG GGC ACA ACA GAC A	Amorce couplée avec des oligos verif rev
verif gene rev	CTT CCC GCT TCA GTG ACA A	Amorce couplée avec des oligos verif for

Tableau 5 : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour vérifier l'insertion de la cassette de déletion dans l'ADN génomique

Le mélange est incubé 15 min à température ambiante puis centrifugé 10 min à 3200 rpm. Il est important d'éliminer précautionneusement la totalité du tampon D avant de resuspendre les protoplastes dans 5 ml de RG liquide (M2 supplémenté avec 205 g/l de saccharose) pour régénération pendant une nuit à 27 °C. Le milieu RG est éliminé par centrifugation (10 min à 3200 rpm) de façon à ne conserver que 200 µl qui sont étalés sur milieu M2 supplémenté en marqueur de sélection (hygomycine à 75 µg/ml ou généticine à 500 µg/ml). Les transformants apparaissent sous deux-trois jours puis sont repiqués sur du milieu de sélection afin de maintenir définitivement l'insertion de la cassette de résistance.

2. Vérification des mutants par PCR :

2.1 Extraction d'ADNg (Lecellier et Silar, 1994) :

P. anserina est cultivé sur une fine couche de cellophane apposée sur du milieu M2 pour éviter de contaminer le mycélium avec des fragments de gélose. Après 48 h d'incubation à 27 °C, le mycélium est récupéré et repris dans 600 µl de TNE 1X (Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM et SDS 2 %). La lyse cellulaire est réalisée grâce à l'ajout de billes de verre couplé à une forte agitation produite par un fast prep 2 fois 20 s à 5000 rpm. Tous les composants cellulaires se retrouvent ainsi en solution, l'extraction de l'ADNg est réalisée suivant 3 étapes : la première consiste à ajouter un volume de phénol de 600 µl puis de centrifuger 3 min à 14 500 rpm et de récupérer la phase aqueuse. La seconde est identique à la première à l'exception du phénol qui est remplacé par 300 µl de phénol et 300 µl de chloroforme. Pour terminer, dans la troisième phase le phénol est substitué par du chloroforme. La précipitation de l'ADN se fait sur un volume de 100 µl de solution aqueuse mélangé à 50 µl de sodium acétate 3 M et 1 ml d'éthanol 100 % puis le mélange est centrifugé 15 min à 14 500 rpm. Le surnageant est éliminé puis le culot est lavé deux fois à l'éthanol 70 % avant d'être resuspendu dans 100 µl d'eau.

2.2 PCR :

La vérification de l'insertion des cassettes de délétion est réalisée par amplification PCR avec un couple d'amorces spécifiques (Tableau 5), l'une est située à l'extérieur de la séquence insérée et l'autre à l'intérieur de la séquence du marqueur de sélection. Les résultats obtenus permettent de confirmer l'insertion mais ne permettent pas de dire s'il y a eu de multiples insertions.

ADNg	Enzyme de restriction	Taille des fragments
$\Delta 2010$	NcoI	2.8 Kb
WT	NcoI	2.6 et 1.7 Kb
$\Delta 3780$	PstI	4 et 3 Kb
WT	PstI	5.55 Kb
$\Delta 3860$	SacI	8 et 2.9 Kb
WT	SacI	8.3 Kb
$\Delta 5100$	HincII	1.9 et 0.7 Kb
WT	HincII	1.1 Kb

Tableau 6 : Bilan des enzymes de restriction utilisées pour le southern blot et taille des fragments associés à la digestion de l'ADN génomique du mutant et du sauvage

2.3 Elimination de mutations génomique et détermination du génotype :

La transformation de *P. anserina* par recombinaison homologue peut entraîner des mutations indésirables dans le génome. Afin de remédier à cela, un croisement avec deux souches sauvage (MAT+ et MAT-) est réalisé conduisant à la formation de périthèces et à la libération des spores. Ces dernières sont récupérées à l'aide d'une gélose apposée comme un couvercle. Une fois cette étape terminée et pour obtenir le génotype souhaité, 24 spores homocaryotiques contenant un seul noyau (microspore) sont repiquées sur milieu G (<http://podospora.igmors.u-psud.fr/methods.php>). Ensuite, différents tests sont réalisés permettant de déterminer le génotype de chaque microspore. Les tests de résistance se font sur milieu M2 supplémenté en hygromycine, généticine ou phléomycine. Si la spore croît alors elle est résistante sinon elle est sensible. La détermination du type sexuel se fait à l'aide de croisements avec des souches sauvages dont on connaît le MAT. Lorsque le mycélium sauvage rencontre le mycélium du transformant et que les deux sont de MAT opposé alors des périthèces apparaissent.

3. Southern Blotting :

Le southern blot est une technique d'étude permettant la détection de fragment d'ADN au sein de génome et par conséquent la détection d'insertion de séquence exogène. La comparaison du génome d'une souche sauvage de *P. anserina* avec celui d'un mutant de délétion grâce à cette méthode permet de confirmer la transformation.

3.1 Digestion des ADN génomiques :

La première étape consiste à utiliser une enzyme de restriction générant des profils de digestion différents pour la souche sauvage et le mutant (Tableau 6). Cependant, il existe une limitation technique concernant la taille des fragments identifiés en southern blot : ils doivent être compris entre 500 pb à 10 kb. Une fois l'extraction de l'ADNg réalisée, celui-ci est digéré pendant une nuit à 37 °C dans un mix de digestion de 100 µl contenant 50 µl d'ADNg, 10 µl de tampon 10 X, 5 µl d'enzyme, 1 µl de RNase et 34 µl d'eau. Il s'en suit une étape de concentration de l'ADNg dans un volume final de 15 µl.

Tampon 5X	10 μ l
MgCl ₂	4 μ l
Amorce 1	2 μ l
Amorce 2	2 μ l
dNTP	2 μ l
ADN	1 μ l
dUTP-dig	3 μ l
Gotap	0.5 μ l
H ₂ O	25.5 μ l

Tableau 7 : Mix de réaction PCR pour réaliser une sonde digoxigénine

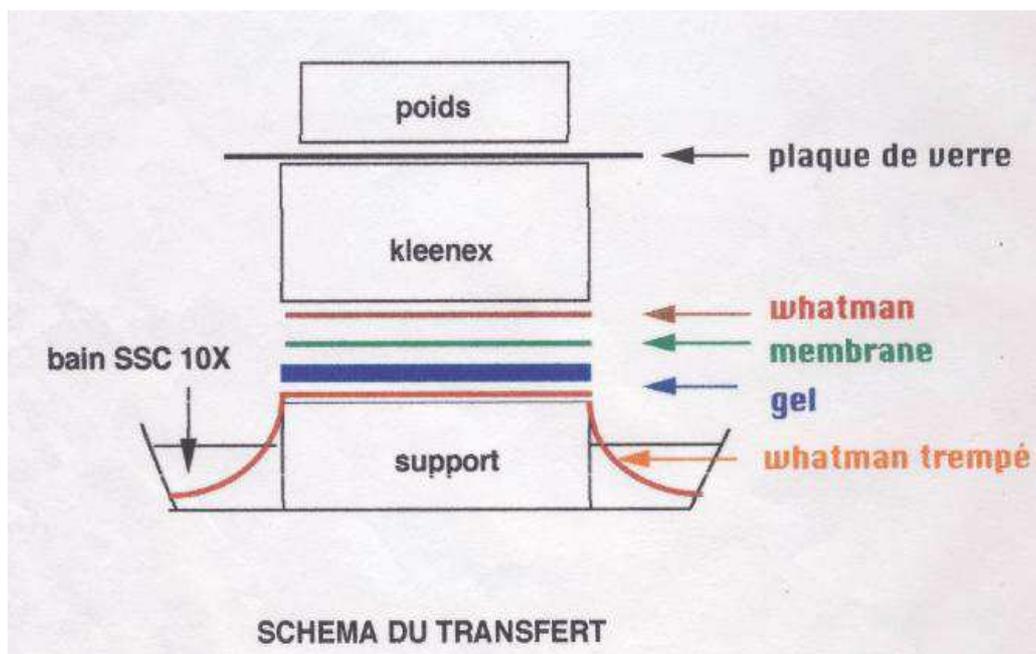


Figure 38 : Schéma représentant la construction du mécanisme de transfert de l'ADN sur la membrane.

3.2 Préparation des sondes :

La construction de la séquence d'ADN utilisée comme sonde lors du southern blot est produite par PCR avec les amorces spécifiques des régions en amont et en aval des gènes délétés. Les paramètres de la réaction sont donc identiques à ceux utilisés précédemment. Cependant la solution de réaction est légèrement différente afin d'incorporer des nucléotides marqués : des digoxygénase-dUTP (Tableau 7). L'incorporation de ces derniers est vérifiée sur gel d'agarose en comparant la migration avec celle du fragment PCR classique. La présence de digoxygénase entraîne un retard de migration.

3.3 Transfert sur membrane :

La migration lente des ADN digérés (5 µg minimum) sur gel d'agarose 0,8 % est effectuée à 50 V pendant 3 à 4 h. Cette étape permet la discrimination des différents fragments d'ADN produits durant la digestion. Elle est ensuite vérifiée rapidement sous UV. La préparation du gel et de l'ADN pour le transfert sur membrane comporte plusieurs étapes, tout d'abord une étape dite de dépurination qui consiste à plonger le gel pendant 10 minutes dans une solution contenant de l'HCl fumant 37 % (5 mM final) avant son élimination à l'eau miliQ stérile. La présence de l'acide provoque l'hydrolyse des parties puriques de l'ADN puis sa fragmentation. Le gel est alors mis en contact deux fois 15 minutes dans une solution de dénaturation (NaOH 0,5 M) dans le but d'obtenir uniquement des ADN simples brin puis rincé à l'eau miliQ stérile. Enfin, une solution de neutralisation (0,5 M Tris-HCl pH 7,5) est ajoutée deux fois 15 min puis éliminée afin de placer le gel aussitôt dans une solution de Sel Sodium-Citrate (SSC) 10X pH 7 pendant 10 minutes. L'ADN est alors prêt à être transféré par capillarité sur membrane une nuit à température ambiante (Figure 38).

3.4 Pré-hybridation et hybridation :

Après le transfert, la membrane est récupérée puis rincée rapidement dans une solution de SSC 2X. Les ADN sont ensuite fixés par UV sur la membrane puis celle-ci est placée dans une solution de pré-hybridation (Dig easy Hyb de chez roche) à 42 °C sous agitation durant 30 min à 3 h.

Les sondes (20 µl de sonde amont et aval dans 50 µl d'eau) sont mises à 100 °C pendant 5 min puis rapidement plongée dans la glace. Le tout est alors ajouté dans le tube contenant la membrane et la solution de pré-hybridation. L'incubation se fait sous agitation à 42 °C toute une nuit.

3.5 Marquage et détection

La solution d'hybridation est transférée dans un Falcon puis conservée à -20 °C car elle peut être utilisée cinq fois. La membrane est rincée deux fois 5 min avec une solution low stringency (SSC 2X et SDS 0,1 %) puis incubée à 65 °C deux fois 15 min avec le tampon high stringency (SSC 0,5X et SDS 0.1 %) lui même préchauffé à 65 °C. Ensuite elle est lavée avec le tampon washing (acide maléique 97 mM, NaCl 145 mM et 3 % de tween 20)1X à température ambiante pendant 2 min, puis la solution est remplacée par 20 ml de tampon de blocage 1X durant 30 min à 3 h sous agitation et à température ambiante. La solution contenant les anticorps anti-dig (1/10 000 ème) est réalisée avec 30 ml de tampon de blocage. La membrane est alors transférée dans cette dernière pendant 30 min puis lavée deux fois 15 min avec le tampon washing 1X. La membrane est ensuite placée dans une solution de détection (Tris-HCl pH 9.5, NaCl 1 M) pendant 3 min puis appliquer 1 ml de CSPD, et incuber 5 min à température ambiante puis 10 min à 37 °C. Le signal est révélé par émission de fluorescence.

4. Caractérisation des mutants Knock-out :

4.1 Test de croissance en présence de rouge congo et diamide :

Les tests de croissances sont réalisés à partir d'un milieu M2 supplémenté avec du rouge congo (100 µg/ml) qui est une molécule interférant avec l'intégrité de la paroi cellulaire et avec du diamide (1 et 2 mM) une molécule provoquant un stress oxydant. Afin de normaliser un maximum, le mycélium de chaque souche doit avoir le même âge au moment de l'implantation sur la boîte ainsi qu'être prélevé au même endroit. Suite à cela, les cultures sont incubées 10 jours à 27 °C.

4.2 Test de fructification sur différentes sources de carbone :

Pour ces tests, il est nécessaire de préparer des échantillons hétérokaryotiques à partir de plug de mycélium de type MAT+ et de type MAT-, l'homogénéisation se fait dans de l'eau et grâce à un fast prep. Suite à cela, 5 µl sont déposés au centre de boîte de pétri contenant du milieu M2, du milieu M0 et du papier, du milieu M4 (cellulose), du milieu M0 supplémenté en glycérol, du milieu M0 supplémenté avec des copeaux de bois, du milieu M0 supplémenté avec du miscanthus et du milieu M0 supplémenté avec du foin. Les boîtes sont ensuite incubées 7 à 10 jours à 27 °C à la lumière qui est une condition essentielle pour la fructification.

4.3 Test de croissance sur différentes sources de carbone :

Ces expériences ont été réalisées à partir de mycélium de type sexuel MAT+ sur des milieux de types M2 dans lesquels la dextrine a été remplacée par du glucose, du fructose, de la carboxyméthylcellulose (CMC), de la pectine, de l'avicel, de la cellobiose et du xylan. Afin de normaliser l'état physiologique de l'inoculum, celui-ci est prélevé sur un mycélium de 48 h et à proximité du plug de départ. La croissance est ensuite observée pendant 48 h à 27 °C.

4.4 Test du phénomène de crippled growth :

Ce test se réalise à partir de mycélium frais cultivé sur un milieu M2, on découpe alors une bande en partant du centre (mycélium âgé) et en allant vers l'extérieur (mycélium jeune). Cette dernière est ensuite inoculée sur deux milieux : un milieu M2 et un milieu M2 supplémenté en yeast extract

4.5 Test de croissance en présence d'extractibles de bois et de molécules toxiques :

On dispose des lignes de disques de papier whatman en alternance avec des lignes d'inocula de *P. anserina* sur des boîtes de pétri (245 par 245 mm) contenant du milieu M2. Sur chaque disque de papier sont déposés 10 µl d'extractibles à 1 mg/ml ou des molécules pures telles que la vanilline, l'oxyresveratrol, du benzophénone, du nitrophénol et de la quercétine à 1, 10 et 100 µM ou 1 et 10 mM. Puis la croissance est observée après 48 h d'incubation à 27 °C.

4.6 Test de dégradation du bois :

Des petites pièces de bois sont séchées dans une étuve à 100 °C afin d'éliminer toutes traces d'humidité puis pesées. Suite à cela, elles sont disposées à 1 cm l'une de l'autre dans une boîte de pétri contenant du milieu M2. Une solution d'eau stérile contenant les deux types sexuels est préparée par broyat d'un inoculum de MAT+ et de MAT-. Ensuite 10 µl sont déposés au milieu des deux pièces de bois puis les boîtes sont mises à 27 °C pendant 3 mois. Suite à cela, le mycélium est éliminé afin de récupérer les pièces de bois qui sont directement séchées à 100 °C et pesées. La différence entre la masse de départ et la masse d'arrivée permet de calculer le pourcentage de dégradation du bois provoquée par le champignon pendant ces 3 mois.

4.7 Test de formation des appressoriums like :

Afin d'observer la formation de ces structures, *P. anserina* est inoculé sur un film de cellophane lui-même déposé sur du milieu M2. Après 48 h de culture à 27 °C, le mycélium est déposé sur une lame de verre puis une observation au microscope confocal à l'aide d'un Z stack est réalisée. Ceci permet d'observer la profondeur de ces structures.

RESULTATS

Analyse génomique et protéomique de petites protéines sécrétées (SSP) chez des espèces d'Aspergillus :

Ces dernières années, suite à l'avènement des analyses « omiques », la présence de petites protéines sécrétées s'est révélée être ubiquitaire au sein des organismes fongiques. Elles ont tout d'abord été caractérisées en tant qu'« effecteurs » essentiels à l'établissement de la symbiose chez les champignons ectomycorhiziens (Plett et al., 2011), et dans la modulation des défenses de la plante favorisant la virulence des organismes pathogènes (Pazzagli et al., 1999). Cependant, très peu d'études se sont focalisées sur l'importance de ces petites protéines sécrétées chez les champignons saprophytes, et par conséquent sur le potentiel réservoir de nouvelles fonctions qu'elles représentent. Récemment, il a été mis en évidence un lien entre la dégradation de la biomasse végétale et la sécrétion de petites protéines (Vaaje-Kolstad et al., 2017). Afin de mieux comprendre leur importance au sein de ces processus, des études de génomique et de protéomique comparatives ont été réalisées sur huit espèces d'*Aspergillus* (*Aspergillus fischeri*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus oryzae* et *Aspergillus flavus*). En effet, ces Ascomycètes sont connus pour sécréter de nombreuses enzymes de dégradation du matériel lignocellulosique, et par conséquent pour avoir un fort potentiel de dégradation de la biomasse. Chez ces huit espèces d'*Aspergillus*, la proportion des gènes codant des petites protéines sécrétées par rapport au nombre total de gènes est de l'ordre de 2 à 3%. Ce pourcentage est similaire pour des champignons de pourriture blanche tels que *Phanerochaete chrysosporium* et *Trametes versicolor*, ainsi que le champignon ectomycorhizien : *Laccaria bicolor*. L'analyse plus fine des SSP des différentes espèces d'*Aspergillus* a montré que la nature des protéines sécrétées est variable et dépendante de la composition du milieu et de l'espèce étudiée, suggérant une spécialisation de ces SSP selon les espèces. La même observation a été faite concernant les CAZYmes montrant que le pool d'enzymes est spécifique de chaque espèce d'*Aspergillus*, probablement en lien avec leurs capacités de dégradation (Benoit et al., 2015). Parmi les SSP, certaines, nommées HSBA pour hydrophobic surface binding protein A sont présentes dans les sécrétomes et pourraient avoir un rôle direct dans la dégradation de la biomasse.

Ces protéines, appartenant à la famille des hydrophobines sont capables de recruter des enzymes comme des cutinases et ainsi favoriser les processus de dégradation (Terauchi et al., 2017). De plus, cette analyse protéomique a été réalisée en cultivant les champignons sur des milieux présentant des fortes valeurs d'activité de l'eau, induisant probablement un stress pour ces espèces d'*Aspergillus* qui sont plutôt xérophiles. En accord avec cette hypothèse, nous avons identifié la présence de superoxide dismutase dans les sécrétomes et émis l'hypothèse que les SSP pourraient également avoir un rôle dans la réponse au stress dans ces conditions.

Tous ces résultats sont présentés sous formes d'un article scientifique qui a été publié le 27 mars 2016 dans la revue *Microbial Biotechnology* :

Article 1: Secretion of small proteins is species-specific within *Aspergillus* sp

Nicolas Valette,^{1,2} Isabelle Benoit-Gelber,³ Marcos DiFalco,⁴ Ad Wiebenga,³ Ronald P. de Vries,³ Eric Gelhaye^{1,2} and Melanie Morel-Rouhier^{1,2,*}

doi:10.1111/1751-7915.12361

Secretion of small proteins is species-specific within *Aspergillus* sp

Nicolas Valette,^{1,2} Isabelle Benoit-Gelber,³ Marcos Di Falco,⁴ Ad Wiebenga,³ Ronald P. de Vries,³ Eric Gelhaye^{1,2} and Mélanie Morel-Rouhier^{1,2,*}

¹Faculté des Sciences et Technologies BP 70239, UMR1136 INRA-Université de Lorraine "Interactions Arbres/Micro-organismes", Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, F-54506, France.

²Faculté des Sciences et Technologies BP 70239, UMR1136 INRA-Université de Lorraine "Interactions Arbres/Micro-organismes", INRA, Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, F-54506, France.

³Fungal Physiology, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre & Fungal Molecular Physiology, Utrecht University, Uppsalalaan 8, Utrecht, 3584 CT, The Netherlands.

⁴Center for Structural and Functional Genomics, Concordia University, 7141 Sherbrooke Street West, Montreal, QC H4B 1R6, Canada.

Summary

Small secreted proteins (SSP) have been defined as proteins containing a signal peptide and a sequence of less than 300 amino acids. In this analysis, we have compared the secretion pattern of SSPs among eight aspergilli species in the context of plant biomass degradation and have highlighted putative interesting candidates that could be involved in the degradative process or in the strategies developed by fungi to resist the associated stress that could be due to the toxicity of some aromatic compounds or reactive oxygen species released during degradation. Among these candidates, for example, some stress-related superoxide dismutases or some hydrophobic surface binding proteins (HsbA) are specifically secreted according to the species. Since

these latter proteins are able to recruit lytic enzymes to the surface of hydrophobic solid materials and promote their degradation, a synergistic action of HsbA with the degradative system may be considered and need further investigations. These SSPs could have great applications in biotechnology by optimizing the efficiency of the enzymatic systems for biomass degradation.

Introduction

During the last decades, the expansion of large-scale analyses revealed that fungi, independently from their lifestyle, excrete small proteins, designed as small secreted proteins (SSP) containing a signal peptide and a sequence of less than 300 amino acids. Only few of them have been functionally characterized. For example, in *Laccaria bicolor*, an ectomycorrhizal fungus (ECM), Missp7 has a role in symbiosis establishment by suppressing the plant defence reactions (Plett *et al.*, 2011). In pathogenic fungi, some of these proteins, referred to as 'effectors', are key factors of infection since they are able to suppress plant defence responses and modulate plant physiology to accommodate fungal invaders and provide them with nutrients (Dodds *et al.*, 2009; Presti *et al.*, 2015). In saprobic fungi, some of them could be involved in the degradative capabilities of fungi as described for the *Trichoderma reesei* swollenin, that depolymerizes cellulose, facilitating the further action of carbohydrate-degrading enzymes (CAZymes) (Saloheimo *et al.*, 2002). Moreover, due to the small size of some of them, particular CAZymes or other degradative enzymes could be part of SSPs. Another example showed that several genes coding for SSP are induced in the ligninolytic fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown in the presence of oak extracts (Thuillier *et al.*, 2014). Some SSPs are more ubiquitous, being found in ECM, pathogenic and saprobic fungi. This is, for example, the case for hydrophobins (Wösten, 2001). These small proteins have been first described as surface proteins that enhance growth of aerial hyphae by lowering surface tension between interface of air and water (Wösten *et al.*, 1999). Then, additional roles have been highlighted. In particular, hydrophobins can stimulate enzymatic hydrolysis of poly(ethylene terephthalate) in *Trichoderma* spp. (Espino-Rammer *et al.*, 2013). Additionally to alter the physicochemical properties of

Received 21 December, 2015; accepted 27 March, 2016. *For correspondence: E-mail: Melanie.Morel@univ-lorraine.fr; Tel. +33 3 68 42 28; +33 3 83 68 42 92

Microbial Biotechnology (2016) 0(0), 000–000
doi:10.1111/1751-7915.12361

Funding Information

This work was supported by the Laboratory of Excellence ARBRE (ANR-11-LABX-0002-01) and the Lorraine Region Council (project FORBOIS). We thank Emmanuelle Morin and Francis Martin for genomic analyses and Frank J.J. Segers from CBS-KNAW for the water activity measurement.

© 2016 The Authors. *Microbial Biotechnology* published by John Wiley & Sons Ltd and Society for Applied Microbiology.

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.

surfaces, they may also be able to physically bind degradative enzyme as cutinase and induce changes in the conformation of its active centre to increase activity (Ribitsch *et al.*, 2015). In aspergilli, most SSP-related studies have focused on the characterization of antimicrobial proteins because of their potential use in the combat against fungal contaminations and infections (Marx, 2004; Meyer, 2008). However, aspergilli have a great potential in plant biomass degradation through the production of lignocellulose-degrading enzymes that are valuable for the bioenergy industry (Culleton *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013; Miao *et al.*, 2015). Yet, optimization of the efficiency of these enzymatic systems is required for industrial applications. We suggest here that SSPs, which have not yet been functionally characterized, could be a reservoir of new functions of interest related to the degradative properties of fungi.

In this study, we have performed a comparative analysis of both the copy numbers of SSP-coding genes and the occurrence of the corresponding proteins within secretome data obtained previously for saprobic fungi with biotechnological interest: *Aspergillus fischeri*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus flavus* (Benoit *et al.*, 2015).

Material and methods

Identification of SSP genes in Aspergilli genomes

Prediction of SSP-coding genes was performed in genomes of eight aspergilli: *A. niger* ATCC1015, *A. fumigatus* af293, *A. clavatus* NRRL 1, *A. flavus* NRRL 3357, *A. oryzae* RIB40, *A. nidulans* AspGD, *A. terreus* NIH 2624 and *A. fischeri* NRRL181, available at the Joint Genome Database (JGI) (<http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>) (Grigoriev *et al.*, 2011). The prediction was performed using a custom bioinformatic pipeline described previously (Pellegrin *et al.*, 2015). Briefly, genes were considered as SSP-coding genes if (i) a signal peptide was detected in the sequence using SignalP with D-cutoff values set to 'sensitive' (version 4.1; option eukaryotic; Petersen *et al.*, 2011) and if (ii) the sequence was smaller than 300 amino acids.

Comparative analysis of SSP in Aspergilli secretomes

To ascertain the occurrence of SSPs within the secretomes of the various aspergilli, we queried mass spectrometry proteomics data (available at ProteomeXchange Consortium, <http://proteomecentral.proteomeexchange.org>, with the dataset identifier PXD000982) against the predicted SSP set using BLASTP. This proteomic analysis has been performed for the eight aspergilli grown on either sugar beet pulp (SBP) or wheat bran (WB) (Benoit

et al., 2015). The quantity of SSPs for both substrates was reported in Table S1 as the area under curve normalized with bovine serum albumin (BSA) signal, for two independent experiments. The orthologues of each SSP has been searched within the other aspergilli genomes using BLASTP, and accession numbers corresponding to the best hit proteins, such as their occurrence in the secretomes have been reported in Table S1. These data are presented in a principal component analysis (PCA) using a matrix based on the BSA normalized area under curve values as input. PCA was performed using XLSTAT and graphical representation using STATISTICA.

Phylogenetic analysis

Sequences of hydrophobic surface binding protein A (HsbA) were obtained from JGI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using BLASTP with the sequences retrieved from the proteomic analysis, and *A. oryzae* (Prot ID 4766) and *A. niger* (Prot ID 1180625) sequences as input (Ohtaki *et al.*, 2006; Delmas *et al.*, 2012). Amino acid sequence alignments were performed with Muscle in MEGA version 5 (Tamura *et al.*, 2011). The evolutionary history was inferred using the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987). Bootstrap tests were conducted using 500 replicates.

Water activity measurement

The water activity (a_w) of the two non-inoculated media, SBP and WB, were measured after autoclave using a Novasina labmaster- a_w (Novasina, Lachen, Switzerland).

Sugar quantification

Individual sugar concentrations were determined by HPLC (Thermo Scientific 5000+ HPLC-PAD system; Thermo Fisher Scientific Inc Waltham, Massachusetts, USA) using a multistep gradient. A flow rate of 0.3 ml min^{-1} was used on a CarboPac PA1 column (Guard column: Dionex CarboPac PA1 BioLC $2 \times 50 \text{ mm}$ and main column: Dionex CarboPac PA1 BioLC $2 \times 250 \text{ mm}$). The column was equilibrated before injection with a pre flow of 18 mM sodium hydroxide (NaOH). During a total running time of 50 min, the following solutions were used: A, water; B, 100 mM NaOH; C, 100 mM NaOH with 1 M sodium acetate. During the first 20 min, 18% of B was applied, followed by a 10 min linear gradient to 40% C and 0% B, and 100% C for 5 min. To rinse the acetate, 100% B was used for 5 min, and 10 min of 18% B was used to rinse the column. The quantification was performed based on external standard calibration. Reference sugars (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Netherlands) were used in a concentration range from 2.5

to 200 μ M. The data obtained are the results of two independent biological replicates and for each replicate three technical replicates were assayed.

Results and discussion

SSP-gene copy numbers in *Aspergilli*

In *aspergilli*, according to the species, SSP-coding genes represent between 2% and 3% of the predicted gene models (Table 1). This similar percentage among the eight *aspergilli* studied here, suggests a correlation between genome size and copy numbers of SSP-coding genes. These percentages are similar to those calculated for the ligninolytic fungi *P. chrysosporium* (2.6%) and *Trametes versicolor* (2.4%) or the ectomycorrhizal fungus *L. bicolor* (2.1%) (Pellegrin *et al.*, 2015). However, when SSP copy numbers are considered independently of the number of predicted gene models, huge differences were revealed among species (from 205 for *A. fumigatus* to 398 for *A. flavus*).

Proteomic analysis of SSP

We propose here to analyse the occurrence of these SSPs in the secretomes of saprobic *aspergilli* in the context of biomass degradation. In a previous study, total proteins present in the secretomes of eight *aspergilli* were compared by mass spectrometry analysis during growth on either SBP or WB (Benoit *et al.*, 2015). Between 8% and 20% of the predicted SSP-coding genes were identified as proteins in the *aspergilli* secretomes (Table 1). Moreover, we showed that the proportion of SSPs among the total of secreted proteins, combining both conditions, varied for the species, *A. flavus* secreting the higher number of SSP. While most of SSPs were secreted in both conditions, some

are specifically secreted depending on the medium (Fig. 1 and Table S2). Among them, some glycoside hydrolases, pectate lyases, esterases or lipases have been identified. Moreover, other proteins not directly involved in substrate degradation exhibit substrate specificities, such as allergens, hydrophobins and HsbA.

To have a global view, a PCA was implemented to compare the species based on their SSP patterns. The quantity of secreted proteins (BSA normalized data of area under curve reported in Table S1) was used as input for the eight *aspergilli*. The proteins were found widespread in the graphical representation (F1, F2 and F3 accounted of 40% of the total variance) with a clear clustering into four groups, based on ANOVA analysis (Fig. 2). The distinct separation between the groups showed that the substrate is not the factor explaining the distribution; rather species secrete their own set of SSPs. Group 1 corresponds to *A. terreus*, group 2 corresponds to *A. oryzae*, group 3 corresponds to *A. flavus* and group 4 corresponds to *A. nidulans*, *A. niger*, *A. fischeri*, *A. clavatus* and *A. fumigatus*, suggesting specificities within secreted SSPs, especially for *A. terreus*, *A. oryzae* and *A. flavus* when compared with the others. In particular, the diversity between *A. terreus* and *A. flavus* is explained by the repartition of the proteins along the F1 and F2 axis, respectively, and the diversity between *A. oryzae* and the others is rather explained by the F3 axis.

Hydrophobic surface binding proteins, HsbA

The contribution of the various SSPs to this repartition is given in Table S3. Among the best candidates that could explain the diversity, some CAZymes, cutinase, HsbA, superoxide dismutase and hypothetical proteins can be pointed out. Moreover, the secretion of some of these proteins is species specific (Table S4). Interestingly,

Table 1. Genomic and proteomic analysis of SSP in *aspergilli* genomes and secretomes in comparison with *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* and *Laccaria bicolor*.

Species	Genome size (Mbp)	Gene models	Number of SSP-coding genes ^a	Number of SSPs in the secretomes ^b	Proportion of SSPs within total secretomes ^c
<i>A. fumigatus</i>	29.39	9781	205 (2.0%)	41 (20.0%)	6.6%
<i>A. clavatus</i>	27.86	9121	236 (2.5%)	23 (9.7%)	6.2%
<i>A. nidulans</i>	30.48	10 680	248 (2.3%)	34 (13.7%)	6.0%
<i>P. chrysosporium</i>	35.15	13 602	257 (2.6%)		
<i>A. fischeri</i>	32.55	10 406	263 (2.5%)	21 (7.9%)	4.4%
<i>A. niger</i>	34.85	11 910	269 (2.2%)	28 (10.4%)	5.1%
<i>A. terreus</i>	29.33	10 406	289 (2.7%)	52 (18.0%)	8.6%
<i>A. oryzae</i>	37.88	12 030	337 (2.8%)	50 (14.8%)	11.3%
<i>T. versicolor</i>	44.79	14 296	340 (2.4%)		
<i>A. flavus</i>	36.79	12 604	398 (3.1%)	59 (14.8%)	12.0%
<i>L. bicolor</i>	60.71	23 132	486 (2.1%)		

a. Percentages are calculated according to the total of SSP-coding genes.

b. Percentages are calculated according to the total of SSP-coding genes.

c. Percentages are calculated according to the total of proteins identified by mass spectrometry in *Aspergilli* secretomes.

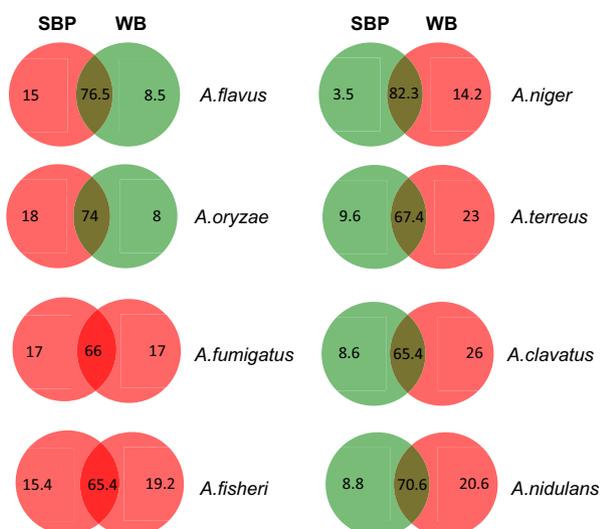


Fig. 1. Venn diagrams showing the percentage of SSPs secreted on sugar beet pulp (SBP) or wheat bran (WB) or both. Red and green colours correspond, respectively, to percentages higher and lower than 10% of the total SSP for a species. Details concerning isoform annotation and peptide quantification are given in Table S2.

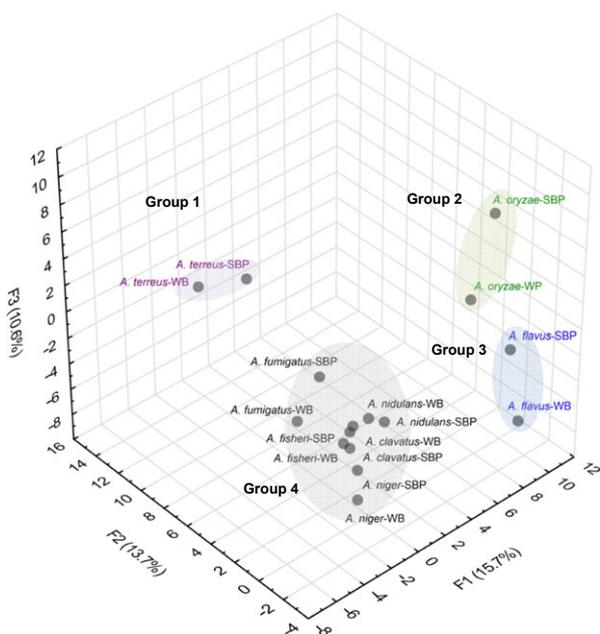


Fig. 2. Principal component analysis plot showing the distribution of *Aspergillus* species based on their SSP secretion pattern. The values corresponding to the quantity of SSP secreted in sugar beet pulp (SBP) and wheat bran (WB) media were used as input (values reported in Table S1). The distribution of the proteins along F1, F2 and F3 axes explains the diversity for 15.7%, 13.7% and 10.6% respectively. These proteins are listed in Table S3. Four groups can be distinguished based on ANOVA analysis (data not shown).

A. terreus, *A. flavus* and *A. niger* specifically secrete HsbA. HsbA is a small protein able to recruit lytic enzymes to the surface of hydrophobic solid materials

and promote their degradation (Ohtaki *et al.*, 2006). As an example, HsbA of *A. oryzae* has been shown to associate with the synthetic polyester polybutylene succinatecoadipate and promote its degradation through the recruitment of a specific polyesterase (CutL1). In *A. niger*, two genes encoding hydrophobin family proteins and one HsbA were strongly induced by the switch from glucose to wheat straw suggesting that these proteins could have also a role in recruiting degradative enzymes to the straw surface (Delmas *et al.*, 2012). From two to four genes with HsbA domains have been identified within the genomes of aspergilli. The phylogenetic analysis of the amino acid sequences revealed two distinct clusters that we have identified as group A and B in Figure 3. The sequences coding for the isoforms that have been functionally characterized in *A. oryzae* (Ohtaki *et al.*, 2006) and in *A. niger* (Delmas *et al.*, 2012) belong to group B, however, they are not (or very few) secreted by the tested fungi on SBP and WB. By contrast, one isoform for each species belonging to group A is secreted in both conditions at variable amounts. The isoform of *A. flavus* (prot ID 30243) is preferentially secreted on SBP, while the ones from *A. terreus* (Prot ID 8344), *A. clavatus* (Prot ID 1985) and *A. niger* (Prot ID 1141551) are produced on WB. Considering both the specificities of aspergilli regarding their biomass degradative systems previously highlighted (Benoit *et al.*, 2015), and the described role of HsbA as helper-proteins for degradation, a synergistic action of these proteins may be considered and needs further investigation.

SSP as stress-related proteins

Aspergillus species grow well in sugar-rich habitats and are thus highly tolerant in relation to solute-induced stresses (Chin *et al.*, 2010; de Lima Alves *et al.*, 2015). Although SBP and WB are mostly made of polysaccharides, the sugar analysis of these two substrates after autoclaving and before inoculation with the fungi (see material and methods), revealed a relatively poor free-sugar content. Only glucose, fructose and sucrose were detected. Glucose and fructose concentrations were very low and similar between both substrates (Table 2). The concentration of sucrose was significant and twice as high in SBP as in WB, but far from the molar concentration that can be found in sugar-rich habitats (Lievens *et al.*, 2015). In accordance, measuring the water activity (a_w) revealed no significant difference between the two media, which both exhibit a very high water activity. However, aspergilli are mostly xerophilic and optimal growth could be observed for low a_w , as for two strains of *A. penicilliodes*, which are capable of mycelial growth down to a water activity of 0.647 a_w , with an optimal

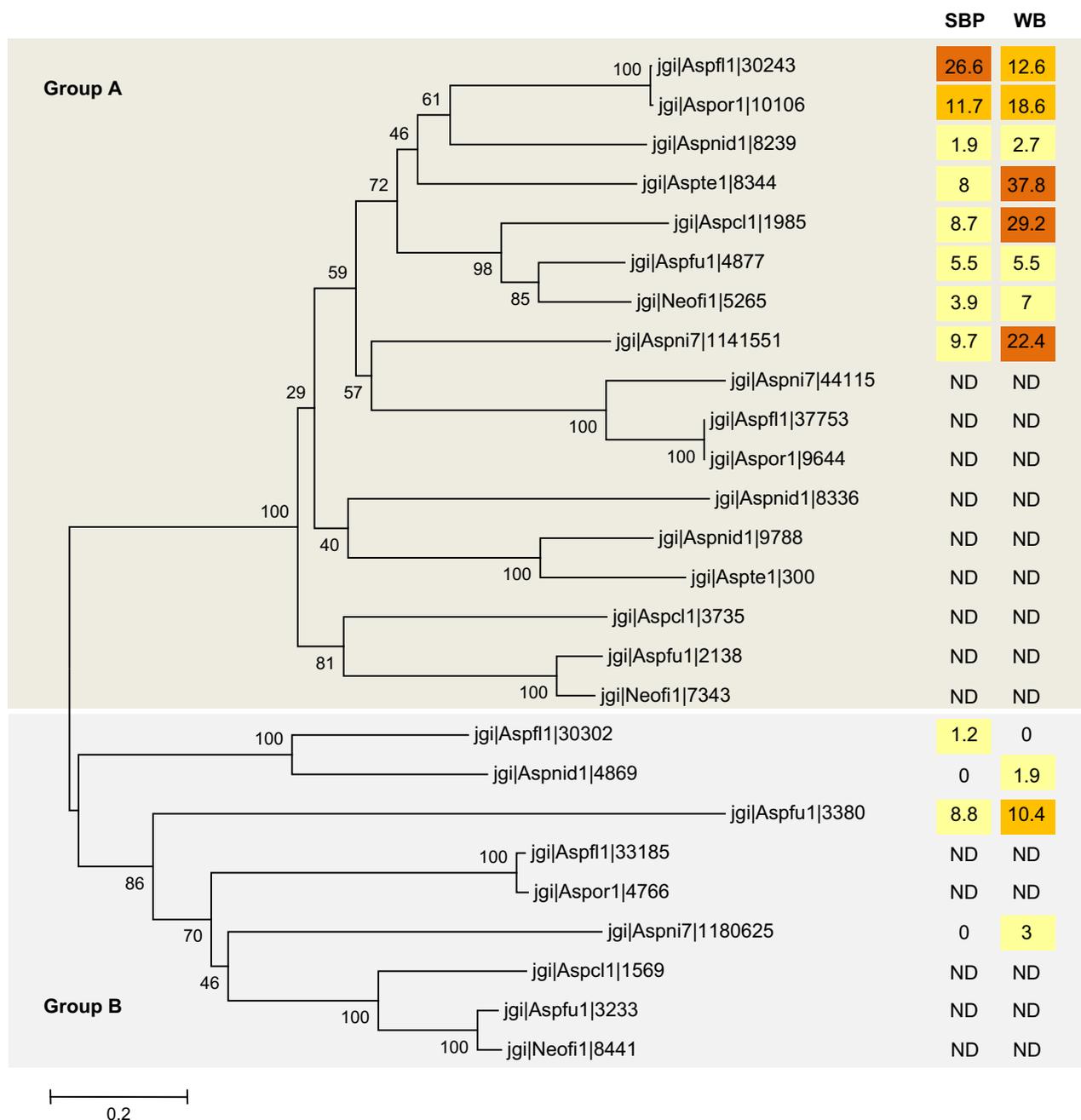


Fig. 3. Neighbor joining phylogenetic tree of the HsbA coding genes identified in the genomes of the various aspergilli. The accession numbers are those retrieved from the JGI. The tree was constructed with MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011). Aspf1: *A. flavus*, Aspor1: *A. oryzae*, Aspnid1: *A. nidulans*, Aspte1: *A. terreus*, Aspcl1: *A. clavatus*, Aspfu1: *A. fumigatus*, Neofi1: *A. fisheri*, Aspni7: *A. niger*. Bootstrap values are reported and the scale marker represents 0.2 substitutions per residue. Quantity of secreted proteins are reported as normalized area under curve for both substrates (SBP: sugar beet pulp and WB: Wheat bran) (See Table S1). The values correspond to the mean of two experiments.

Table 2. Free sugar composition and water activity of the wheat bran and sugar beet pulp media. Sugar concentrations are given in millimolar. Details are given in Materials and methods part.

Substrate	Glucose	Fructose	Sucrose	a_w
Wheat bran	0.3	0.2	10.5	0.990 ± 0.001
Sugar beet pulp	0.5	0.2	20.2	0.992 ± 0.002

growth between 0.800 and 0.820 a_w (Stevenson *et al.*, 2015). According to these results, it could be pointed out that the culture conditions used in this study could be stressful for fungi when compared with their natural habitat. Accordingly, extracellular superoxide dismutase has been highlighted within the aspergilli secretomes, especially for *A. terreus*, *A. flavus*, *A. oryzae* and *A. nidulans*

(Table S1). The secretion of some SSPs could thus be a way to resist stress as suggested for the lignolytic fungus *P. chrysosporium* that induces expression of several SSP-coding genes in the presence of toxic oak extracts (Thuillier et al., 2014).

Conclusion

In this study, we show that, similar to the degradative enzymatic system, the secretion of non-CAZy SSPs is fungal species dependent. Our hypothesis is that these proteins could participate to plant biomass degradation, with a similar process as described for the hydrophobins or HsbA. SSPs could recruit enzymes at the surface of the substrate or directly interact with the enzymes to increase their activity. They may also be involved in the strategy developed by fungi to resist the stress that could be due to the toxicity of some aromatic compounds or reactive oxygen species released during the degradative process. The SSP candidates highlighted in this study are mostly functionally uncharacterized and are therefore an interesting potential source of new functions for plant biomass conversion.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Benoit, I., Culleton, H., Zhou, M., DiFalco, M., Aguilar-Osorio, G., Battaglia, E., et al. (2015) Closely related fungi employ diverse enzymatic strategies to degrade plant biomass. *Biotechnol Biofuels* **8**: 107.
- Chin, J.P., Megaw, J., Magill, C.L., Nowotarski, K., Williams, J.P., Bhaganna, P., et al. (2010) Solutes determine the temperature windows for microbial survival and growth. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 7835–7840.
- Culleton, H., McKie, V., and de Vries, R.P. (2013) Physiological and molecular aspects of the degradation of plant polysaccharides by fungi: what have we learned from *Aspergillus*? *Biotechnol J* **8**: 884–894.
- Delmas, S., Pullan, S.T., Gaddipati, S., Kokolski, M., Malla, S., Blythe, M.J., et al. (2012) Uncovering the genome-wide transcriptional responses of the filamentous fungus *Aspergillus niger* to lignocellulose using RNA sequencing. *PLoS Genet* **8**: e1002875.
- Dodds, P.N., Rafiqi, M., Gan, P.H.P., Hardham, A.R., Jones, D.A., and Ellis, J.G. (2009) Effectors of biotrophic fungi and oomycetes: pathogenicity factors and triggers of host resistance. *New Phytol* **183**: 993–1000.
- Espino-Rammer, L., Ribitsch, D., Przulucka, A., Marold, A., Greimel, K.J., Acero, E.H., et al. (2013) Two novel class II hydrophobins from *Trichoderma* spp. stimulate enzymatic hydrolysis of poly (ethylene terephthalate) when expressed as fusion proteins. *Appl Environ Microbiol* **79**: 4230–4238.
- Grigoriev, I.V., Cullen, D., Goodwin, S.B., Hibbett, D., Jeffries, T.W., Kubicek, C.P., et al. (2011) Fueling the future with fungal genomics. *Mycology* **2**: 192–209.
- Lievens, B., Hallsworth, J.E., Pozo, M.I., Belgacem, Z.B., Stevenson, A., Willems, K.A., and Jacquemyn, H. (2015) Microbiology of sugar-rich environments: diversity, ecology and system constraints. *Environ Microbiol* **17**: 278–298.
- de Lima Alves, F., Stevenson, A., Baxter, E., Gillion, J.L., Hejazi, F., Hayes, S., et al. (2015) Concomitant osmotic and chaotropicity-induced stresses in *Aspergillus wentii*: compatible solutes determine the biotic window. *Curr Genet* **61**: 457–477.
- Liu, D., Li, J., Zhao, S., Zhang, R., Wang, M., Miao, Y., et al. (2013) Secretome diversity and quantitative analysis of cellulolytic *Aspergillus fumigatus* Z5 in the presence of different carbon sources. *Biotechnol Biofuels* **6**: 149.
- Marx, F. (2004) Small, basic antifungal proteins secreted from filamentous ascomycetes: a comparative study regarding expression, structure, function and potential application. *Appl Microbiol Biotechnol* **65**: 133–142.
- Meyer, V. (2008) A small protein that fights fungi: AFP as a new promising antifungal agent of biotechnological value. *Appl Microbiol Biotechnol* **78**: 17–28.
- Miao, Y., Liu, D., Li, G., Li, P., Xu, Y., Shen, Q., and Zhang, R. (2015) Genome-wide transcriptomic analysis of a superior biomass-degrading strain of *A. fumigatus* revealed active lignocellulose-degrading genes. *BMC Genom* **16**: 459.
- Ohtaki, S., Maeda, H., Takahashi, T., Yamagata, Y., Hasegawa, F., Gomi, K., et al. (2006) Novel hydrophobic surface binding protein, HsbA, produced by *Aspergillus oryzae*. *Appl Environ Microbiol* **72**: 2407–2413.
- Pellegrin, C., Morin, E., Martin, F.M., and Veneault-Fourrey, C. (2015) Comparative analysis of secretomes from ectomycorrhizal fungi with an emphasis on small-secreted proteins. *Front Microbiol* **6**: 1278.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* **8**: 785–786.
- Plett, J.M., Kempainen, M., Kale, S.D., Kohler, A., Legué, V., Brun, A., et al. (2011) A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. *Curr Biol* **21**: 1197–1203.
- Presti, L.L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., et al. (2015) Fungal effectors and plant susceptibility. *Annu Rev Plant Biol* **66**: 513–545.
- Ribitsch, D., Acero, E.H., Przulucka, A., Zitzenbacher, S., Marold, A., Gamerith, C., et al. (2015) Enhanced cutinase-catalyzed hydrolysis of polyethylene terephthalate by covalent fusion to hydrophobins. *Appl Environ Microbiol* **81**: 3586–3592.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406–425.
- Saloheimo, M., Paloheimo, M., Hakola, S., Pere, J., Swanson, B., Nyyssönen, E., et al. (2002) Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant

- expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *Eur J Biochem* **269**: 4202–4211.
- Stevenson, A., Cray, J.A., Williams, J.P., Santos, R., Sahay, R., Neuenkirchen, N., *et al.* (2015) Is there a common water-activity limit for the three domains of life? *ISME J* **9**: 1333–1351.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**: 2731–2739.
- Thuillier, A., Chibani, K., Belli, G., Herrero, E., Dumarçay, S., Gérardin, P., *et al.* (2014) Transcriptomic responses of *Phanerochaete chrysosporium* to oak acetic extracts: focus on a new glutathione transferase. *Appl Environ Microbiol* **80**: 6316–6327.
- Wösten, H.A. (2001) Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annu Rev Microbiol* **55**: 625–646.
- Wösten, H.A.B., van Wetter, M.A., Lugones, L.G., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., and Wessels, J.G.H. (1999) How a fungus escapes the water to grow into the air. *Curr Biol* **9**: 85–88.

Caractérisation biochimique de SSP1 de P. chrysosporium :

Une analyse de l'expression des gènes a été réalisée chez *P. chrysosporium* cultivé en présence d'extractibles de chêne pendant 24h. Les données ont montré une surexpression de plusieurs gènes codant pour des SSPs (Thuillier et al., 2014). Parmi ces gènes, un a retenu notre attention puisque son orthologue protéique avait également été identifié dans une analyse protéomique réalisé sur *Trametes versicolor* en présence d'extrait de chêne (Deroy et al, non publié).

L'analyse de la séquence protéique (SSP1 : Prot ID 2981896) a mis en évidence trois parties distinctes : un peptide signal de sécrétion, une partie N-terminale conservée contenant quatre résidus cystéine et une région C-terminale variable riche en résidus alanine et glycine. Le gène SSP1 est très répandu chez les agaricomycotina. Les plus proches homologues ont été retrouvés chez des pourritures blanches, cependant il a également été identifié dans des génomes de pourritures brunes, de décomposeurs de litière et de champignons ectomycorhiziens. La présence de ce gène n'est pas dépendante de la taxonomie puisque des séquences orthologues sont présentes chez des organismes appartenant aux ascomycètes, blastocladiomycètes ou chytridiomycètes.

Deux formes de la protéine ont été produites et purifiées : SSP1 pleine longueur et sa forme tronquée sans la région C-terminale variable. La caractérisation biochimique et biophysique de ces protéines a mis en évidence une organisation particulière sous forme de fibres qui est dépendante de la présence de la partie C-terminale riche en résidus alanine et glycine. De plus, cette organisation particulière est nécessaire à l'activité de SSP1, qui de manière inattendue est capable d'assurer une activité β -glucuronidase. Ces résultats ainsi que les hypothèses quant à la fonction de cette protéine sont présentés dans la publication ci-dessous.

Self-assembly of the small secreted protein SSP1 from *Phanerochaete chrysosporium* is required for β -glucuronidase activity

Nicolas Valette^{1,2}, Antonio José Fernández-González^{1,2}, Stéphane Cuenot³, Eric Gelhaye^{1,2}, Mélanie Morel-Rouhier^{1,2}.

¹Université de Lorraine, UMR1136 INRA-Université de Lorraine "Interactions Arbres/Micro-organismes", Faculté des Sciences et Technologies BP 70239, F-54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

²INRA, UMR1136 INRA-Université de Lorraine "Interactions Arbres/Micro-organismes", Faculté des Sciences et Technologies BP 70239, F-54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

³Institut des Matériaux Jean Rouxel, Université de Nantes, 2 rue de la Houssinière, 44322 Nantes Cedex 3, France

§**Corresponding author:** Mélanie Morel-Rouhier, Université de Lorraine, UMR1136 INRA-Université de Lorraine "Interactions Arbres/Micro-organismes", Faculté des Sciences et Technologies BP 70239, F-54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France. Melanie.Morel@univ-lorraine.fr, phone: +33 3 72 74 51 60.

ABSTRACT

Small proteins secreted by fungi are still functionally unknown, despite their occurrence in all fungi from various taxonomic origin and different ways of life. In this study, we present the biochemical and biophysical characterization of a small secreted protein from *Phanerochaete chrysosporium* (PcSSP1). Its amino acid sequence is atypical in that it is split into two domains, a quite well conserved one with 4 cysteines residues, and a more variable one rich in alanine and glycine residues. The presence of this AG-rich domain confers self-assembly property of the protein, allowing the formation of fibers. Interestingly, a β -glucuronidase activity has been measured for the recombinant SSP1 and this activity is dependent on the self-assembly state of the protein. Since, the occurrence of this gene is widespread within the fungal kingdom, being found in fungi with various ways of life, the role of this protein is discussed in relation with cell wall maintenance or remodeling processes allowing fungal growth in stress conditions.

INTRODUCTION

During evolution, fungi had to adapt to environmental constraints leading to apparition of several ways of life. The secretome, ie the proteins secreted in the extracellular medium, is a good marker of adaptation in fungi since it is responsible for various, important nutritional modes. Indeed, the secretome is involved in the first steps of the establishment of symbiosis or infection and is essential for plant biomass degradation (Bouws et al., 2008; Kämper et al., 2006; Vincent et al., 2012). The fungal secretomes are composed of degradative enzymes as proteases, lipases, Carbohydrate-Active enZymes (CAZymes), and lignolytic enzymes for some wood-decaying species (Pellegrin et al., 2015; Zhu et al., 2016). This degradative system has been intensively studied since it has application in lignocellulose biomass valorisation. Beside these well-known enzymes, other proteins can be secreted by fungi. Some of them have been named SSP for Small Secreted Proteins (Alfaro et al., 2014). These proteins have been described in mycorrhizal and pathogenic fungi. For example, the establishment of symbiosis between plant and fungi is mediated by the secretion of MISSP7 of *Laccaria bicolor*. This protein enters plant cells by endocytosis and is transferred into nuclear compartment in order to modify gene expression. This event causes cell wall disruption allowing hyphal penetration and symbiosis (Plett et al., 2011). In pathogenic fungi, cerato-platanins (CP) are effectors involved in plant pathogenesis, human diseases or allergic reaction. In *Botrytis cinerea*, BcSpl1 is secreted during early stages of pathogenesis and is essential for virulence, likely by disrupting non-covalent bonds of cell wall polysaccharides, like expansins (Bacelli et al., 2014; Frías et al., 2011b; Pazzagli et al., 1999). Although many studies have concerned the role of SSP in plant-fungal interactions, very few concern the role of SSP in saprophytic fungi. The percentage of SSP-coding genes within the genomes of saprophytic fungi as *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* or *Aspergillus* species is similar to the one of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (between 2 and 3 % of the predicted gene models) (Pellegrin et al., 2015; Valette et al., 2017a) Proteomic data comparing the secretomes of eight *Aspergillus* species efficient in biomass conversion revealed that SSP represent between 4.4% and 12% of the proteins identified within the secretomes.

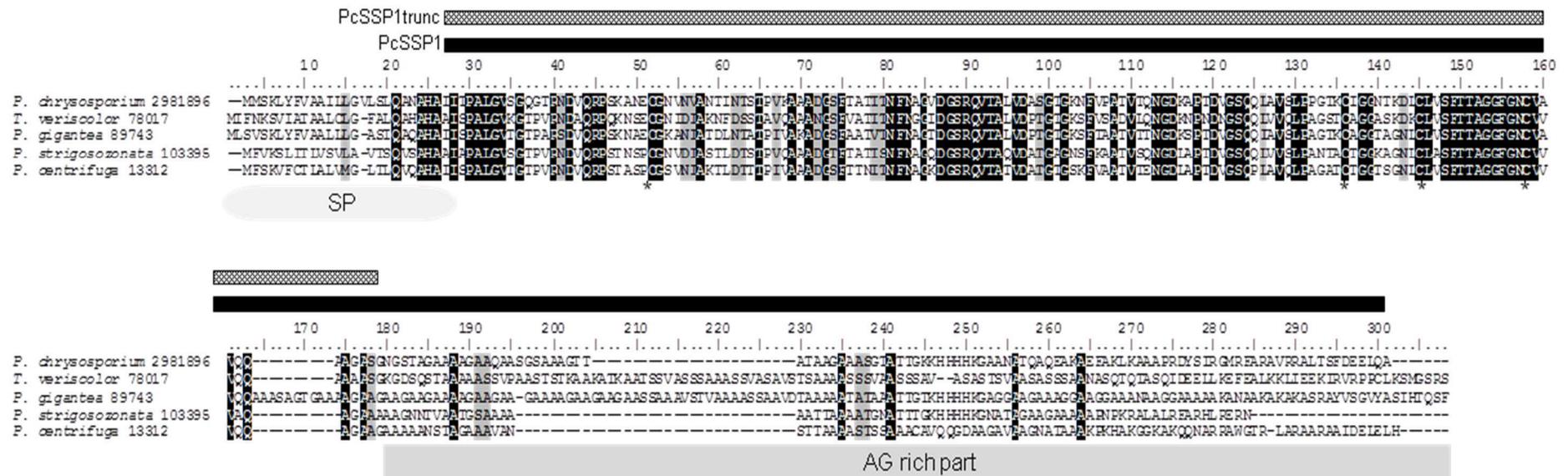


Figure 1: Sequence alignment of SSP1 orthologues. The alignment has been performed by MUSCLE with PcSSP1 amino acid sequence and the 4 best hit sequences retrieved using Blastp on NCBI. The ProtID are reported. Sequences of the recombinant PcSSP1 and PcSSP1trunc that we used in the biochemical analysis are located by black and striped bars respectively. These five sequences share strong homologies in their N-terminal part: black cluster corresponds to identical amino acids whereas grey cluster represents amino acids with up to 80 % similarity. The conserved cysteines are labeled with an asterisk. The AG rich part is located by a grey bar. SP: signal peptide of secretion.

By comparing the distribution of these SSP within the species, we showed that, similarly to what has been described for the degradative enzymatic system, the strains secrete their own set of SSP independently of the substrate used (Valette et al., 2017a). These proteins could thus have important functions in saprophytes in relation with their way of life.

In this study, we present the characterization of a Small Secreted Protein of *Phanerochaete chrysosporium* (SSP1), which shows no annotation and no sequence homology with known proteins in the databases. We focused on this protein since the corresponding gene was found upregulated in a transcriptomic analysis of *P. chrysosporium* grown in presence of oak extractives (Thuillier et al., 2014). Extractives are non-cell wall small molecules from wood that can be toxic for fungal cells during the degradative process (Valette et al., 2017b). Our biochemical data reveal an interesting structuration of the protein into fibers, which is required for a β -glucuronidase activity *in vitro*. These results are discussed in relation with the putative function of PcSSP1 in cell protection during the wood degradative process.

RESULTS

PcSSP1 sequence analysis

PcSSP1 amino acid sequence exhibits a signal peptide for secretion, a quite well conserved N-terminal part containing 4 conserved cysteines and a more variable C-terminal domain, which is rich in alanine and glycine residues (Fig. 1). The occurrence of this gene is widespread within the Agaricomycotina group, and while the closest orthologues have been identified within the genomes of white rot fungi, some have also been identified in brown rots, litter decomposers and ectomycorrhizal fungi (Table S1).

Among the Basidiomycetes, PcSSP1 orthologues can also be found in some Pucciniomycotina, in particular in the leaf litter yeasts *Sporobolomyces linderiae*, *Naiadella fluitans*, and *Meredithblackwellia eburnea*. In Ascomycetes, orthologues of PcSSP1 have been identified in the nematode-trapping fungus *Monacrosporium haptotylum* (Orbiliomycetes), and in various plant pathogens and saprotrophs from the Dithideomycete and Sordariomycete groups. Sequences are also present in the Blastocladiomycota and Chytridiomycota, the representative of the basal fungal lineage (Table S1).

Phylum	Subphylum	Genus	Species	Protein ID	Protein Length	AG-tail		
Basidiomycota	Agaricomycota	Catharina	wood decay	1235598	no			
		Cydindella	wood decay	246703	yes			
		Cydindella	wood decay	246534	no			
		Hebeloma	white rot	148682	yes			
		Phaeococha	white rot	2981696	yes			
		Tametes	white rot	85634	yes			
		Tametes	white rot	90078	no			
		Tametes	white rot	75792	no			
		Antrodia	white rot	495262	no			
		Antrodia	white rot	606510	yes			
		Antrodia	white rot	805847	yes			
		Antrodia	white rot	821134	no			
		Cucubulum	white rot	652301	yes			
		Gaeodermis	white rot	153344	yes			
		Gymnopilus	white rot	170096	yes			
		Gymnopilus	white rot	1733746	yes			
		Lactonema	white rot	136328	yes			
		Lactonema	white rot	1242247	yes			
		Lentinus	white rot	570836	yes			
		Lentinus	white rot	75971	no			
		Lentinus	white rot	624245	yes			
		Phlebia	white rot	71651	yes			
		Phlebia	white rot	138823	no			
		Phlebia	white rot	13312	yes			
		Phlebia	white rot	89743	no			
		Pleurotus	white rot	1501879	yes			
		Pleurotus	white rot	127549	yes			
		Pleurotus	white rot	1525340	no			
		Polygona	white rot	565054	yes			
		Polygona	white rot	1130538	no			
		Pseudotsuga	white rot	103395	yes			
		Pyrenopeziza	white rot	1013606	yes			
		Pyrenopeziza	white rot	5929	yes			
		Pyrenopeziza	white rot	3815	yes			
		Pyrenopeziza	white rot	1047646	yes			
		Pyrenopeziza	white rot	785087	yes			
		Pyrenopeziza	white rot	1374338	yes			
		Pyrenopeziza	white rot	1375840	yes			
		Pyrenopeziza	white rot	753940	yes			
		Pyrenopeziza	white rot	498242	yes			
		Pyrenopeziza	white rot	1666280	yes			
		Pyrenopeziza	white rot	1674808	yes			
		Pyrenopeziza	white rot	1666817	yes			
		Tametes	white rot	1410238	yes			
		Tametes	white rot	274517	no			
		Tametes	white rot	1316648	yes			
		Tametes	white rot	1332440	yes			
		Tametes	white rot	608802	no			
		Tametes	white rot	908250	yes			
		Tametes	white rot	10540	yes			
		Tametes	white rot	5573	yes			
		Tametes	white rot	28017	no			
		Tametes	white rot	51128	yes			
		Tametes	white rot	138858	no			
		Tametes	white rot	509659	yes			
		Tametes	white rot	746456	no			
		Tametes	white rot	1672876	yes			
		Tametes	white rot	737651	yes			
		Tametes	white rot	916822	no			
		Tametes	white rot	1132630	no			
		Tametes	white rot	932920	yes			
		Tametes	white rot	1657180	yes			
		Tametes	white rot	163922	no			
		Tametes	white rot	2657346	yes			
		Tametes	white rot	638138	yes			
		Tametes	white rot	915958	yes			
		Tametes	white rot	843099	yes			
		Tametes	white rot	1885706	no			
		Tametes	white rot	279521	no			
		Tametes	white rot	682227	yes			
		Tametes	white rot	1816628	yes			
		Tametes	white rot	1023594	no			
		Tametes	white rot	1072430	no			
		Tametes	white rot	1393199	no			
		Tametes	white rot	1323370	yes			
		Tametes	white rot	117038	no			
		Tametes	white rot	410235	yes			
		Tametes	white rot	178938	no			
		Tametes	white rot	1176120	yes			
		Tametes	white rot	1144387	no			
		Tametes	white rot	834975	no			
		Tametes	white rot	732282	no			
		Tametes	white rot	191237	no			
		Tametes	white rot	191228	no			
		Tametes	white rot	2734638	no			
		Tametes	white rot	88803	no			
		Tametes	white rot	352194	no			
		Tametes	white rot	233204	no			
		Tametes	white rot	215237	no			
		Tametes	white rot	189626	no			
		Tametes	white rot	213119	no			
		Tametes	white rot	185131	no			
		Tametes	white rot	155522	no			
		Tametes	white rot	495	yes			
		Tametes	white rot	556009	no			
		Tametes	white rot	5466	no			
		Tametes	white rot	150973	yes			
		Tametes	white rot	631182	no			
		Tametes	white rot	83235	yes			
		Tametes	white rot	211187	no			
Tametes	white rot	242524	yes					
Tametes	white rot	692413	yes					
Tametes	white rot	315169	no					
Tametes	white rot	485959	no					
Tametes	white rot	77211	no					
Tametes	white rot	404517	no					
Tametes	white rot	542670	no					
Tametes	white rot	377382	no					
Tametes	white rot	428561	no					
Tametes	white rot	55347	no					
Tametes	white rot	650745	no					
Tametes	white rot	8729	no					
Tametes	white rot	115216	no					
Tametes	white rot	786914	no					
Tametes	white rot	634911	no					
Tametes	white rot	605318	no					
Tametes	white rot	4289	no					
Tametes	white rot	1794	no					
Tametes	white rot	486329	no					
Tametes	white rot	616751	no					
Tametes	white rot	676477	no					
Tametes	white rot	480208	no					
Tametes	white rot	334057	no					
Tametes	white rot	1278338	no					
Tametes	white rot	236606	no					
Ascomycota	Dothideomycetes	Monosporium	neurospora	495	yes			
		Amelioria	white rot	556009	no			
		Periconia	white rot	5466	no			
		Periconia	white rot	150973	yes			
		Phaeosphaeria	white rot	631182	no			
		Sclerotinia	white rot	83235	yes			
		Sclerotinia	white rot	211187	no			
		Sclerotinia	white rot	242524	yes			
		Sclerotinia	white rot	692413	yes			
		Sclerotinia	white rot	315169	no			
		Sclerotinia	white rot	485959	no			
		Sclerotinia	white rot	77211	no			
		Sclerotinia	white rot	404517	no			
		Sclerotinia	white rot	542670	no			
		Sclerotinia	white rot	377382	no			
		Sclerotinia	white rot	428561	no			
		Sclerotinia	white rot	55347	no			
		Sclerotinia	white rot	650745	no			
		Sclerotinia	white rot	8729	no			
		Sclerotinia	white rot	115216	no			
		Sclerotinia	white rot	786914	no			
		Sclerotinia	white rot	634911	no			
		Sclerotinia	white rot	605318	no			
		Sclerotinia	white rot	4289	no			
		Sclerotinia	white rot	1794	no			
		Sclerotinia	white rot	486329	no			
		Sclerotinia	white rot	616751	no			
		Sclerotinia	white rot	676477	no			
		Sclerotinia	white rot	480208	no			
		Sclerotinia	white rot	334057	no			
		Sclerotinia	white rot	1278338	no			
		Sclerotinia	white rot	236606	no			
		Lower fungi	Blasidiales	Caenaria	parasitic	120593	no	
				Caenaria	parasitic	146340	no	
				Blasidiales	aprophytic	175118	no	
				Blasidiales	aprophytic	406852	no	
				Blasidiales	aprophytic	374308	no	
				Chytridium	aprophytic	367812	no	

Table S1: In silico analysis of SSP1 orthologues in fungal genomes. PcSSP1 amino acid sequence was used as a template for Blastp search on all fungal subdivisions from the Joint Genome Institute database. Positive hits (cut-off of 10-5) are reported in the table below. The ProtID are those determined by the JGI. The presence/absence of the AG-tail is also reported.

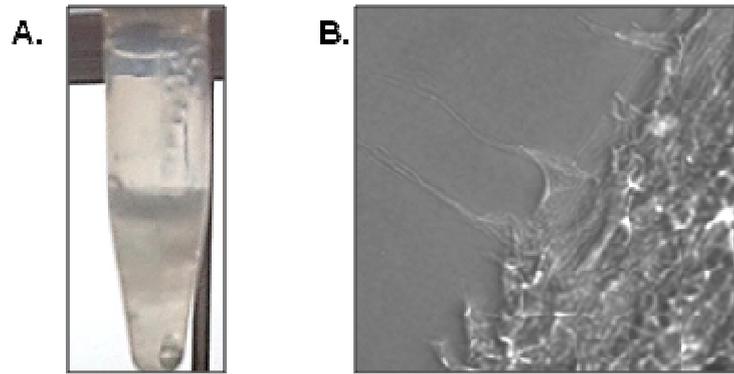


Figure 2: Macroscopic and microscopic observation of PcSSP1 aggregation. Recombinant PcSSP1 forms a kind of gel after purification in Tris-NaCl buffer, visible in Eppendorf tube (A). Microscopic observation of the gel (X40) (B).

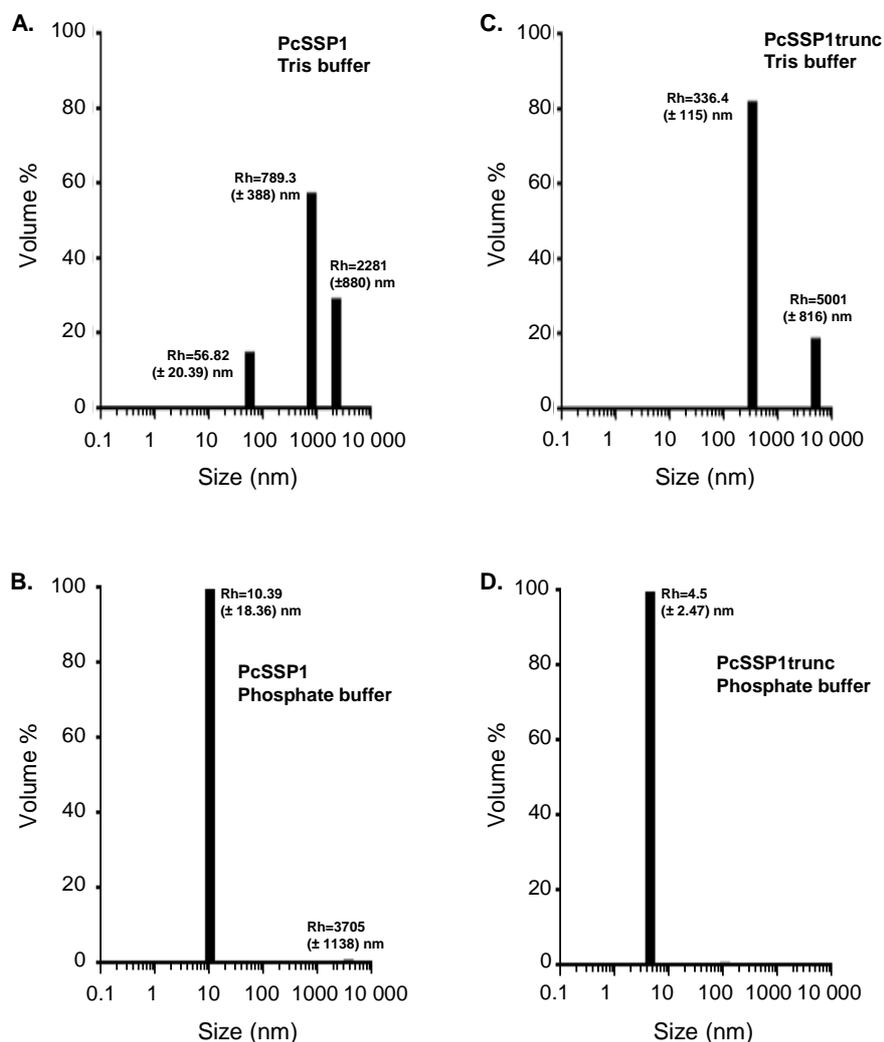


Figure 3: Dynamic light scattering analysis of the aggregation state of PcSSP1 and PcSSP1trunc. The percentage of the various oligomerization states of the proteins are represented as black bars for PcSSP1 (A and B), and PcSSP1trunc solutions (C and D), either in Tris-NaCl (A and C) or Phosphate buffer (C and D), in function of their hydrodynamic radiuses (Rh).

Several gene copy numbers have been identified (from 2 to 4) in some white rot fungi (*Trametes sp*, *Artolenzites elegans*, *Lentinus tigrinus*, *Phlebia brevispora*, *Pleurotus ostreatus*, and *Pycnoporus sp*). Moreover, most of the retrieved sequences from basidiomycotina possess the alanine/glycine rich C-terminal domain. It is not the case for lower fungi and ascomycotina (in particular no Sordariomycetes sequence possesses the AG tail). This suggests, even though the sequence is widespread in the fungal kingdom, saprophytic fungi and in particular white rot fungi can possess several copies of the gene and most of them possess the AG rich domain, suggesting a putative role of SSP1 in the degradative capacities of the fungi.

The alanine and glycine-rich C-terminal part of PcSSP1 drives changes in secondary structure and protein self-assembly *in vitro*

Two forms of the protein from *P. chrysosporium* have been produced in *Escherichia coli* and purified. The first one corresponds to the full length protein except the signal peptide (PcSSP1) and the second one is the truncated form of PcSSP1 devoid of the C-term AG-rich part of the protein (PcSSP1trunc) (Fig. 1). Both proteins have been successfully produced in *E. coli* and around 3 and 10 mg/L of culture of pure proteins were obtained respectively for PcSSP1 and PcSSP1trunc in 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl (Tris-NaCl buffer). The sizes and predicted molecular masses of the proteins are 240 amino acids and 23 951 Da for PcSSP1, and 151 amino acids and 14 787 Da for PcSSP1trunc.

Interestingly, PcSSP1 is able to form a kind of gel after purification after freezing and defreezing even in presence of 500 mM of NaCl (Fig 2). All the following analyses were performed after a step of freezing. A dialysis of the protein performed directly after purification in 50 mM phosphate buffer pH 8.0 (phosphate buffer) drastically reduced the formation of this gel. In accordance, dynamic light scattering (DLS) analysis of PcSSP1 confirmed a loss of PcSSP1 self-assembly in phosphate buffer compared to Tris-NaCl buffer suggesting that this process is driven by ionic strength (Fig. 3A and B). Moreover, the presence of the C-terminal part of the protein strongly influenced the formation of macromolecular structures in Tris-NaCl buffer, PcSSP1 having a huge hydrodynamic radius (Rh) of 789.3 ± 388 nm and $2\,281 \pm 880$ nm for respectively 56.7% and 28.7% of the protein solution, while PcSSP1trunc forms macromolecular structures of smaller size showing 81.7 % of protein with a Rh of 336.4 ± 115 nm (Fig. 3A and C).

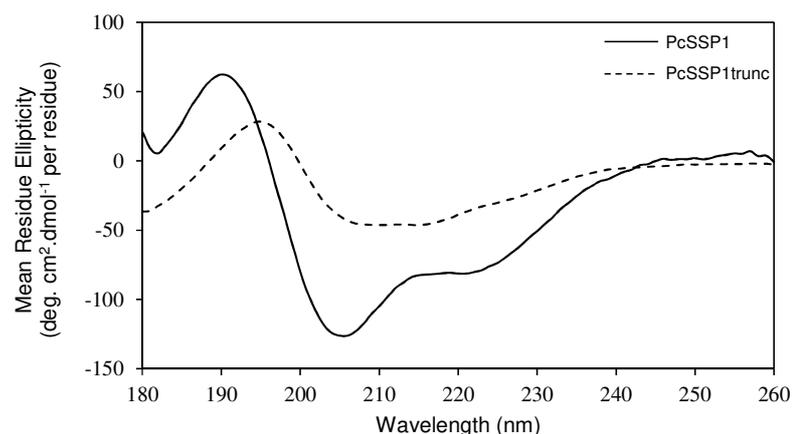


Figure 4: Secondary structures of recombinant proteins.

Circular dichroism spectra of PcSSP1 and PcSSP1trunc. Spectra were recorded in 50 mM Phosphate buffer pH 8.0 with 66 μ M of proteins. PcSSP1 spectrum shows signals at 190, 208 and 222 nm, while the one of PcSSP1trunc shows signals at 195, 208 and 215 nm suggesting an organization enriched in alpha helices for the full length SSP1 compared to the truncated form, which is rather organized as β -sheets.

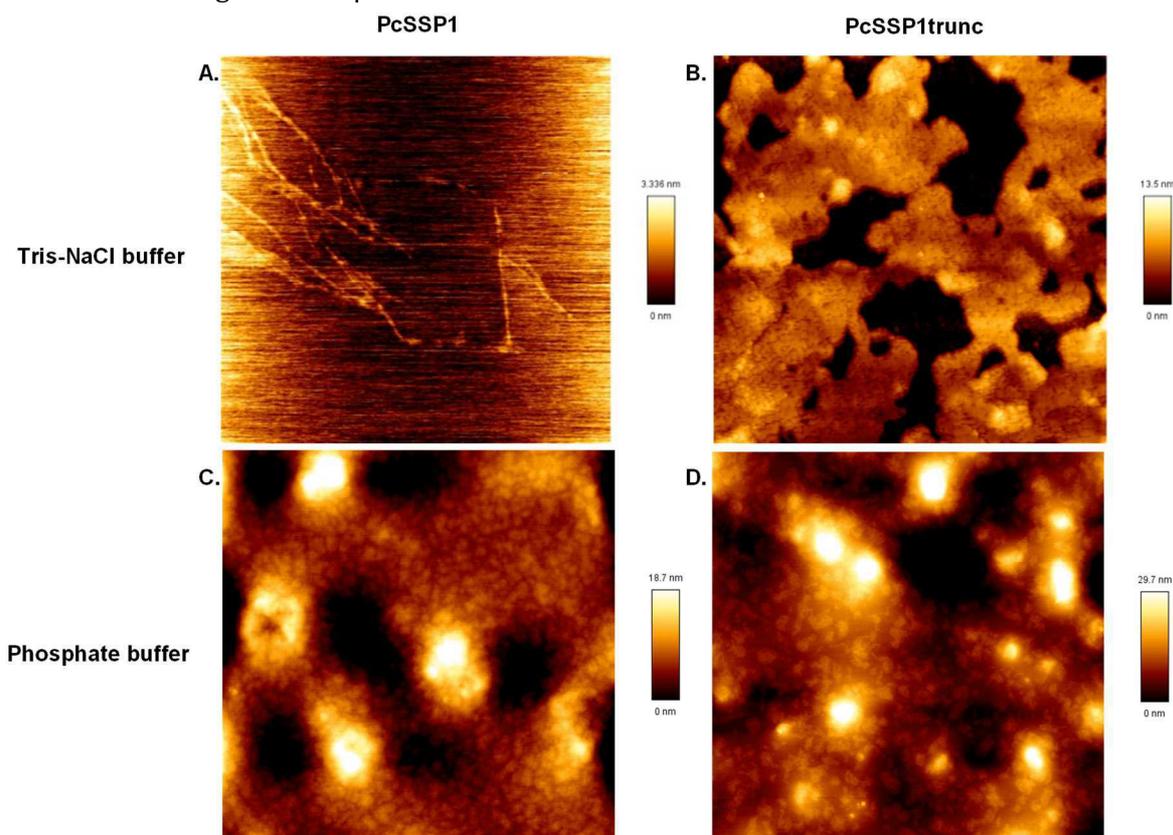


Figure 5: Atomic Force Microscopy of PcSSP1 and PcSSP1trunc in Tris-NaCl and Phosphate buffers. AFM height images showing the influence of buffers and AG-rich domain of SSP1, on protein assembly. PcSSP1 self-assembles in fibers with a mean diameter of 3.3 nm in Tris-NaCl buffer (A) whereas it has a particular crown organization in Phosphate buffer (C). PcSSP1trunc does not have the ability to organize in fibers since it is observed under monolayer form with a mean diameter of 13.5 nm (B) in Tris-NaCl buffer. In Phosphate buffer, PcSSP1trunc has no particular organization (D). Image size 3 \times 3 μ m.

The analysis of secondary structures of PcSSP1 and PcSSP1trunc was achieved by Far-UV circular dichroism. Due to the incompatibility of Tris-NaCl buffer, which absorbs between 180 and 260 nm, the spectra were monitored for both proteins exclusively in phosphate buffer. The comparison of PcSSP1 and PcSSP1trunc spectra indicates that both proteins exhibit secondary structures but some differences can be highlighted depending on the presence or absence of the C-terminal part. PcSSP1trunc exhibits a positive band at 195 nm and 2 negative bands at 208 and 215 nm which correspond to the presence of both beta sheets and alpha helices. Interestingly, PcSSP1 spectrum rather shows a positive band at 190 nm and 2 negative bands at 208 and 222 nm, suggesting an organization enriched in alpha helices (Fig. 4).

PcSSP1 self-assembles into fibers

The morphology of PcSSP1 assemblies was then assessed by Atomic Force Microscopy (AFM). Both recombinant protein solutions (PcSSP1 and PcSSP1trunc) in Tris-NaCl and phosphate buffers were deposited onto glass substrates prior to be imaged by AFM. In Tris-NaCl buffer, PcSSP1 is able to self-assemble into fibers with a mean diameter of 3.3 nm, whereas PcSSP1trunc self-assembles into a monolayer of 13.5 nm thickness (Fig. 5A and B). In phosphate buffer, truncated protein forms little aggregates with a size of 29.7 nm, while a crown structure was evidenced for the full length protein with a mean diameter of 18.7 nm (Fig. 5C and D).

PcSSP1 exhibits β -glucuronidase activity under fiber forms

PcSSP1 and PcSSP1trunc have been tested for β -xylosidase, β -glucosidase, β -glucuronidase and cellobiohydrolase activities using substrates coupled to the fluorescent methylumbelliferone. Interestingly, the results showed that PcSSP1 in Tris-NaCl buffer was active with 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide hydrate substrate. This activity is optimal at high temperature (up to 60°C) and pH 6.0 (Fig. 6A and B). By contrast, PcSSP1trunc did not exhibit any activity. The β -glucuronidase activity was also tested for both proteins dialysed in phosphate buffer and none of them was able to cleave the tested fluorescent substrates. These results suggest that the self-assembly of the protein could be required for activity, since only the fiber-forming form of the protein is active in the β -glucuronidase assay.

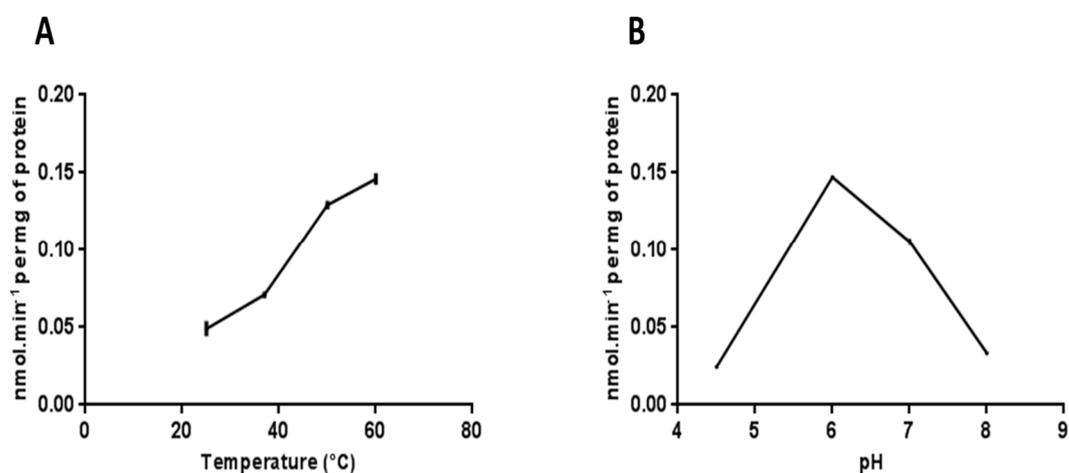


Figure 6: β -glucuronidase activity of fiber-forming PcSSP1.

The activity was only detected for PcSSP1 full length in Tris-NaCl buffer (i.e under fiber forms). The activity was measured in microplate using the fluorescent methylumbeliferone-coupled glucuronide as substrate. An incubation time of 30 min at different temperatures in phosphate buffer pH 6.0 was performed and the activity is reported as nmol of substrate cleaved per minute per mg of protein (A). The optimal pH was determined by measuring the activity after 30 min incubation at 60°C in acetate and phosphate buffers with pH ranging from 4.5 to 8.

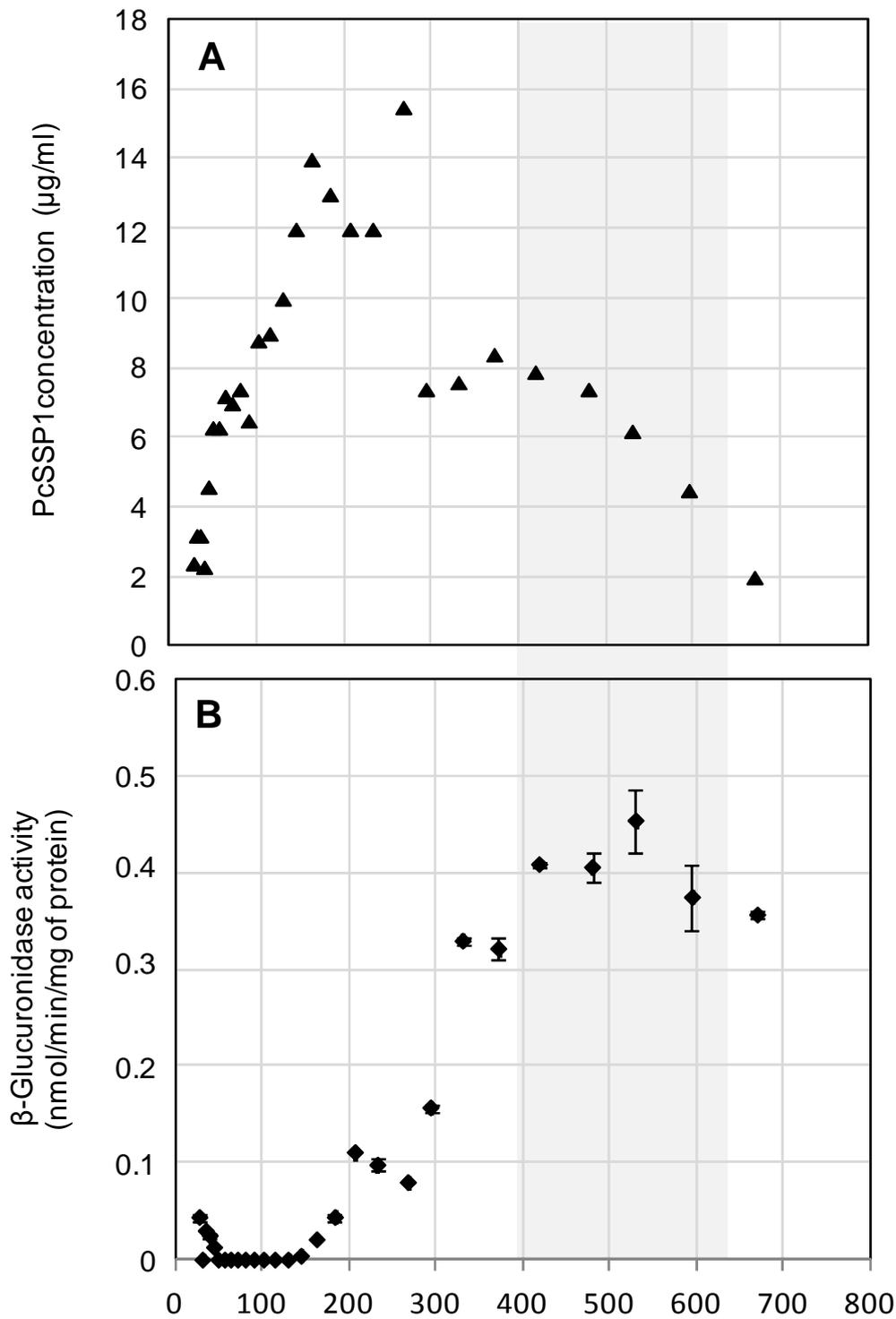


Figure 7: β-glucuronidase activity of PcSSP1 in relation with its oligomerization state. PcSSP1 was loaded on a FPLC exclusion size column and fractions containing recombinant proteins were harvested corresponding to protein sizes from 25 kDa (size of the monomer) to 670 kDa. Each fraction was assayed separately to determine protein concentration (A) and to measure specific β-glucuronidase activity (B). The conditions used for β-glucuronidase activity assay were those identified as optimal (60°C and pH 6.0). While most of the protein retrieved has a size of around 200 kDa, the higher specific activity was measured for the samples corresponding to protein oligomerization with a size between 400 and 600 kDa.

In order to check whether the activity was correlated with the aggregation state of PcSSP1, the fractions obtained after FPLC purification (see material and method section) were separately tested for β -glucuronidase activity (Fig 7). PcSSP1 was found in fractions from 25 kDa, corresponding to the monomer size, up to 680 kDa. PcSSP1 was present in all these fractions with a maximum of protein found in fractions corresponding to size between 150 to 250 kDa (Fig 7A). Interestingly, the maximum of β -glucuronidase activity was measured for high oligomerization state of PcSSP1, in fractions corresponding to size higher than 400 kDa (Fig 7B). The self-assembly of the protein is thus required for catalysis. None of the three other activities were detected in any of the protein forms and buffer tested.

DISCUSSION

Aggregation of proteins have been widely studied in medicine since this phenomenon and in particular amyloid formation has deleterious effects in humans, being associated with a range of increasingly common disorders, including Alzheimer and Parkinson diseases, type II diabetes, and a number of systemic amyloidosis (Chiti and Dobson, 2017). However, protein self-assembly can also have important functions in nature. For example, several arthropods (spider, scorpion or silkworm) are able to secrete proteins that self-assemble in order to produce silk thread. This phenomenon is tightly regulated by environment acidification from pH 7.2 to pH 6.4, and by ion content (Dicko et al., 2004). Indeed, in the spider *Nephila* the presence of Na^{2+} , Ca^{2+} and Mg^{2+} have no particular effect whereas an enrichment in K^{+} content induce a strong increase of nanofibrils formation (Chen et al., 2002). A similar phenomenon was observed in *Bombyx mori* in presence of Ca^{2+} (Kundu et al., 2013). In fungi, various proteins have been studied for their ability to self-assemble. For example, cerato-platanins (CP) form amyloid-like aggregates that interact with hydrophobic surfaces and enhance the hypersensitive response of plants (Pazzagli et al., 2009). It is a family of fungal small secreted proteins that can interact with polysaccharides (Bonazza et al., 2015; Gaderer et al., 2014). They are not able to enzymatically degrade cellulose; rather they can induce swollen areas and cotton fibers breakdown (Bacelli et al., 2014). Moreover, their capacities to form monolayer at hydrophobic/hydrophilic interface, associated with their ability to bind chitin suggest a potential role in cell wall expansion (de Oliveira et al., 2011; Pazzagli et al., 2009).

This is supported by both (i) high CP gene expression during hyphal growth, and (ii) reduced germination, hyphal elongation, branching, biomass formation and sporulation in CP knock-out mutants (Djonovic et al., 2007; Frischmann et al., 2013). Hydrophobins are also fungal small secreted proteins well known for their amphiphilic properties allowing monolayer formation at hydrophobic/hydrophilic interface (Delcour et al., 2015; Zykwiniska et al., 2014). They are defined by the presence of eight highly conserved cysteine residues and the presence of beta strands stabilized by four disulfide bridges. Most of the studied hydrophobins are directed to the extracellular medium through the secretory pathway. However, they often remain associated with the fungal cell wall and can be found inside fruiting bodies and on the surfaces of hyphae, spores and conidia (Bretherton and Munholland, 1999; Linder, 2009). Their roles mainly concern the attachment of fungal structures to different kinds of surfaces and the development of hyphae at the water/air interface (Wessels, 1996; Wessels et al., 1991). In fungal pathogens, hydrophobins might act as virulence factors to enhance fungal infection (Karlsson et al., 2007; Kubicek et al., 2008; Müller et al., 2008; Ruocco et al., 2015), while in symbiotic associations, these proteins can be involved in mycorrhizae formation (Plett et al., 2012).

For CP and hydrophobins, the self-assembly mechanism leads to the formation of amyloid-like structure that can be evidenced *in vitro* using fluorescent tool as thioflavin T, which binds to beta sheet-rich structures (Groenning, 2010). PcSSP1 does not belong to these classes of proteins. Moreover, it is likely that it does not assemble under amyloid structure since no thioflavin T fluorescence was detected in various conditions of temperatures and buffers (data not shown). Moreover, classical β -amyloid fibrils are formed after a direct transition between monomeric to oligomeric states with enrichment in β -sheets (Nelson et al., 2005). Conversely, the fiber structure of PcSSP1 is defined by enrichment in α -helices, due to the presence of alanine and glycine-rich C-terminal domain. The spider proteins called spidroins possess alanine-rich and glycine-rich regions as well (Heim et al., 2009). It has been demonstrated that poly-alanine regions in silk predominantly form distinct and orderly β -sheet crystal domains while disorderly regions are formed by glycine-rich repeats that consist of helix type structures and β -turns (Bratzel and Buehler, 2012).

Moreover, PcSSP1 assembly is dependent on the ionic strength. A crown organization was highlighted by AFM for SSP1 in phosphate buffer.

Such an organization has already been described in transient states of α -synuclein fibril formation (Apetri et al., 2006; Lashuel et al., 2002). This result, combined to the ones obtained by DLS, suggest that the ionic strength of phosphate buffer could delay the formation of PcSSP1 fibers compared to the Tris-NaCl buffer. Interestingly, we have shown that this fiber structuration is needed for β -glucuronidase activity. The biochemical mechanism is still unknown but we have evidenced that this activity is displayed by PcSSP1 and not by β -glucuronidase from *E. coli* that could be co-purified with PcSSP1. Indeed, some SSP can bind enzymes to increase their activity. It was previously demonstrated that hydrophobic surface binding proteins A (HSBA) can recruit enzymes such as cutinase in order to enhance degradation of hydrophobic materials as it was demonstrated for plastic polybutylene succinate co-adipate (PBSA) (Takahashi et al., 2015; Terauchi et al., 2017). To ensure that no bacterial β -glucuronidase was bound to PcSSP1, fingerprint mass spectrometry analysis was performed (i) on the pure PcSSP1 solution, (ii) on SDS-page gel slices (cut between 60 and 80 kDa since the monomer size of β -glucuronidase from *E. coli* is 68.2 kDa), and (iii) in the FPLC fraction showing the maximum of activity (see figure 7). No bacterial β -glucuronidase was detected in any of the samples analyzed, suggesting that PcSSP1 can display the activity by itself. According to this result and the fact that SSP1 gene is also present in fungi with various ways of life, the function of PcSSP1 could be not directly involved in the degradative process but rather on cell wall maintenance or remodeling, and fungal growth in response to stress. This is in accordance with the induction of the gene by extractives (Thuillier et al., 2014) and the fact that white rot fungi, which are exposed to highly toxic environment during the wood degradative process, possess several copy numbers of SSP1 genes within their genomes.

MATERIALS AND METHODS

PcSSP1 cloning

100 mg of *Phanerochaete chrysosporium* mycelium was harvested from a liquid culture in TK medium (Tien and Kirk, 1988) supplemented with oak extractives as described previously (Thuillier et al., 2014). Total RNA was extracted and purified using the RNeasy plant minikit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

RNA was treated with DNase I during purification as recommended in the manufacturer's protocol. An additional purification step was performed by precipitating RNA with 2 M LiCl. RNAs were reverse transcribed using the masterscript kit (5 prime) following the manufacturer's protocol. The PCR reactions to amplify PcSSP1 (Prot ID 2981896 in the Joint Genome Institute database) have been performed with Herculase Taq (Agilent technologies) using for 5' CCCC_CATATG GCT ATT ATC ACG CCC GCG 3') and rev 5' CCCC_GCGGCCGC TGC TTG GAG CTC CTC ATC 3' primers for the full length, and for 5' CCCC_CATATG GCT ATT ATC ACG CCC GCG 3' and rev 5' CGAGT_GCGGCCGC TCC CGC GGT CGA ACC GTT 3' for PcSSP1trunc. PCR products were purified using illustra GFX PCR DNA and gel band purification kit (GE healthcare life science) and cloned in pEt26b (Novagen) between NdeI and NotI restriction sites allowing the further production of His-tagged PcSSP1 and PcSSP1trunc.

Heterologous expression of PcSSP1 and PcSSP1trunc in *Escherichia coli* and purification of the recombinant proteins

Expression of both recombinant proteins have been performed in *E. coli* Rosetta2 (DE3) strain containing pLysS plasmid (F⁻ ompT hsdS_B (rB⁻ mB⁻) gal dcm (DE3) pRARE2 (CamR)). The bacteria were cultivated in LB medium supplemented with 50µg/ml kanamycin and 50µg/ml chloramphenicol at 37°C. At OD₆₀₀ of 0.6, the expression of the recombinant proteins was induced by adding 0.1 mM isopropyl β-D-1 thiogalactopyranoside (IPTG) during 4h. Cells were harvested by centrifugation and resuspended in Tris-NaCl buffer (30 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl) and stored at -20°C. The purification of His-tagged PcSSP1 and PcSSP1trunc was performed by affinity chromatography on IMAC columns (Sigma Aldrich) from the soluble fraction obtained after a 30 min centrifugation (27,000 x g) of cells lysed by sonication. The washing buffer was 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 M NaCl in a first step and 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl and 10 mM imidazole in a second step. The elution buffer was 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 250 mM imidazole. Both proteins were dialyzed against a 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl buffer by ultrafiltration on YM10 membranes, concentrated and loaded on Sephadex 75 16/600 column (AKTA purifier) equilibrated with 30 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl. Purified proteins were finally concentrated and analyzed on 15% SDS-PAGE gel to check the purity. The concentration of the protein was determined by BC assay (interchim).

Circular dichroism (CD)

Proteins were first dialyzed in 50 mM phosphate buffer pH 8.0 using dialysis membrane (Spectra/Por, MWCO 6-8 000). Circular Dichroism spectra of PcSSP1 and PcSSP1trunc were obtained in 50 mM phosphate buffer pH 8.0 at 25 °C in a quartz cuvette (1-mm path length) from 180 to 260 nm with a bandwidth of 1 nm using a Chirascan Plus spectropolarimeter (Applied Photophysics, Ltd, UK). The mean residue ellipticity $[\theta]_{MR}$ was calculated using Pro-Data Viewer (Applied Photophysics, Ltd, UK) software and expressed in $\text{deg. cm}^2\text{.dmol}^{-1}$ per residue.

Dynamic Light Scattering (DLS)

The homogeneity of the solutions, the aggregation state and particle sizes were analyzed by granulometry on a Zetasizer Nano-S model (Malvern Instruments, Malvern, UK). Each protein solution was analyzed by DLS at final concentrations of 4 mg/ml either in 50 mM phosphate buffer pH8.0 or 30 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl buffer. The supernatant of each sample was gently transferred into a quartz cuvette of 12 μl and the particle size measurements were performed in triplicate at 37°C, with alight diffusion at 173°. The data were collected in automatic mode and analyzed using the associated software DTS version 4.2 (Malvern Instruments).

Atomic Force Microscopy (AFM)

PcSSP1 and PcSSP1trunc were analysed both in 50 mM phosphate buffer (pH 8.0) and 30 mM Tris-HCl and NaCl 200 mM buffer (pH 8.0) at a starting protein concentration of 6 mg/ml for SSP1 and 10 mg/ml for SSP1trunc. The different protein solutions were carefully dialyzed to remove NaCl and diluted 10X prior to AFM observations. A glass coverslip was cleaned with a piranha treatment and washed in ultrapure water, before being dried in a stream of nitrogen gas. A tiny droplet of each diluted protein solution was deposited onto the glass coverslip heated at 20°C to promote a rapid drying (within 2 minutes) while avoiding the formation of concentration gradients on the substrate. The sample was then immediately imaged by AFM. A NanoWizard® Atomic Force Microscope (JPK, Germany) operating in intermittent contact mode under ambient conditions was used to image the protein solutions deposited onto the glass coverslip.

A standard rectangular cantilever (Nanosensors NCL-W) was employed for imaging (scan rate of 0.5 Hz), with a free resonance frequency of 174 kHz and a curvature radius of the tip of 10 nm. In order to check the reproducibility of the observed morphology, all samples were scanned at least on three different zones. Each sample was investigated using fresh tips previously cleaned by UV-ozone treatment. The height measurements were done using JPK Data Processing software (JPK, Germany).

Enzymatic assays

The enzymatic measurements were based on the release of the fluorescent methylumbelliferone (MU). The substrates 4-methylumbelliferyl- β -D-xylopyranoside, 4-methylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside, 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide hydrate and 4-methylumbelliferyl- β -D-cellobioside were used to measure β -xylosidase, β -glucosidase, β -glucuronidase and cellobiohydrolase activities, respectively. All chemicals were purchased from Sigma Aldrich Chemicals (Lyon, France). 5 mM stock of substrates and calibration solution (4-methylumbelliferone 98%) were prepared in 2-methoxyethanol, and diluted with sterile ultra-pure water to a final substrate concentration of 500 μ M. A calibration curve was performed by triplicate using five serial dilutions with dilution factor of 1:2 from 8.33 μ M of starting concentration of MU. The quantity of MU of each dilution (from 1.25 nmol in the most concentrated) was taken into account to obtain and to express the activity in nmol/min per mg of protein. The assays were performed in microplates with 50 μ l of 50 mM sodium phosphate buffer at various pH from 6.0 to 8.0 or sodium acetate buffer at pH from 4.5 to 6.0, 50 μ l of 500 μ M substrates and 50 μ l of recombinant proteins (400 ng/ μ l). After various incubation times under agitation at 800 rpm, 100 μ l of stopping buffer (Tris 2.5 M, pH 10–11) was added. Measurements were carried out with a EnSight multimode Plate Reader (PerkinElmer) with excitation wavelength set to 380 nm and emission wavelength to 460 nm.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant overseen by the French National Research Agency (ANR) as part of the "Investissements d'Avenir" program (ANR-11-LABX-0002-01, Lab of Excellence ARBRE) and the Region Lorraine Research Council. We thank Alexandre Kriznic and Jean-Baptiste Vincourt from UMR-7365 CNRS-Université de Lorraine, Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA), for circular dichroism data and mass spectrometry analyses.

REFERENCES

- [1] J. Kämper, R. Kahmann, M. Bölker, L.-J. Ma, T. Brefort, B.J. Saville, F. Banuett, J.W. Kronstad, S.E. Gold, O. Müller, M.H. Perlin, H.A.B. Wösten, R. de Vries, J. Ruiz-Herrera, C.G. Reynaga-Peña, K. Snetselaar, M. McCann, J. Pérez-Martín, M. Feldbrügge, C.W. Basse, et al., Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*, *Nature*, 444 (2006) 97–101.
- [2] H. Bouws, A. Wattenberg, H. Zorn, Fungal secretomes—nature’s toolbox for white biotechnology, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 80 (2008) 381–388.
- [3] D. Vincent, A. Kohler, S. Claverol, E. Solier, J. Joets, J. Gibon, M.-H. Lebrun, C. Plomion, F. Martin, Secretome of the Free-living Mycelium from the Ectomycorrhizal Basidiomycete *Laccaria bicolor*, *J. Proteome Res.*, 11 (2012) 157–171.
- [4] N. Zhu, J. Liu, J. Yang, Y. Lin, Y. Yang, L. Ji, M. Li, H. Yuan, Comparative analysis of the secretomes of *Schizophyllum commune* and other wood-decay basidiomycetes during solid-state fermentation reveals its unique lignocellulose-degrading enzyme system, *Biotechnol. Biofuels*, 9 (2016).
- [5] C. Pellegrin, E. Morin, F.M. Martin, C. Veneault-Fourrey, Comparative Analysis of Secretomes from Ectomycorrhizal Fungi with an Emphasis on Small-Secreted Proteins, *Front. Microbiol.*, 6 (2015).
- [6] M. Alfaro, J.A. Oguiza, L. Ramírez, A.G. Pisabarro, Comparative analysis of secretomes in basidiomycete fungi, *J. Proteomics*, 102 (2014) 28–43.
- [7] J.M. Plett, M. Kempainen, S.D. Kale, A. Kohler, V. Legué, A. Brun, B.M. Tyler, A.G. Pardo, F. Martin, A Secreted Effector Protein of *Laccaria bicolor* Is Required for Symbiosis Development, *Curr. Biol.*, 21 (2011) 1197–1203.
- [8] L. Pazzagli, G. Cappugi, G. Manao, G. Camici, A. Santini, A. Scala, Purification, characterization, and amino acid sequence of cerato-platanin, a new phytotoxic protein from *Ceratocystis fimbriata* f sp *platani*, *J. Biol. Chem.*, 274 (1999) 24959–24964.
- [9] M. Frías, C. González, N. Brito, BcSpl1, a cerato-platanin family protein, contributes to *Botrytis cinerea* virulence and elicits the hypersensitive response in the host, *New Phytol.*, 192 (2011) 483–495.
- [10] I. Baccelli, S. Luti, R. Bernardi, A. Scala, L. Pazzagli, Cerato-platanin shows expansin-like activity on cellulosic materials, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98 (2014) 175–184.
- [11] N. Valette, I. Benoit-Gelber, M.D. Falco, A. Wiebenga, R.P. de Vries, E. Gelhaye, M. Morel-Rouhier, Secretion of small proteins is species-specific within *Aspergillus* sp, *Microb. Biotechnol.*, 10 (2017) 323–329.
- [12] A. Thuillier, K. Chibani, G. Belli, E. Herrero, S. Dumarcay, P. Gerardin, A. Kohler, A. Deroy, T. Dhalleine, R. Bchini, J.-P. Jacquot, E. Gelhaye, M. Morel-Rouhier, Transcriptomic Responses of *Phanerochaete chrysosporium* to Oak Acetonic Extracts: Focus on a New Glutathione Transferase, *Appl. Environ. Microbiol.*, 80 (2014) 6316–6327.
- [13] N. Valette, T. Perrot, R. Sormani, E. Gelhaye, M. Morel-Rouhier, Antifungal activities of wood extractives, *Fungal Biol. Rev.*, 31 (2017) 113–123.
- [14] F. Chiti, C.M. Dobson, Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade, *Annu. Rev. Biochem.*, (2017).
- [15] C. Dicko, J.M. Kenney, D. Knight, F. Vollrath, Transition to a β -Sheet-Rich Structure in Spidroin in Vitro: The Effects of pH and Cations [†], *Biochemistry (Mosc.)*, 43 (2004) 14080–14087.
- [16] X. Chen, D.P. Knight, F. Vollrath, Rheological Characterization of *Nephila* Spidroin Solution, *Biomacromolecules*, 3 (2002) 644–648.
- [17] B. Kundu, R. Rajkhowa, S.C. Kundu, X. Wang, Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 65 (2013) 457–470.

- [18] L. Pazzagli, C. Zoppi, L. Carresi, B. Tiribilli, F. Sbrana, S. Schiff, T.A. Pertinhez, A. Scala, G. Cappugi, Characterization of ordered aggregates of cerato-platanin and their involvement in fungus–host interactions, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, 1790 (2009) 1334–1344.
- [19] R. Gaderer, K. Bonazza, V. Seidl-Seiboth, Cerato-platanins: a fungal protein family with intriguing properties and application potential, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98 (2014) 4795–4803.
- [20] K. Bonazza, R. Gaderer, S. Neudl, A. Przylucka, G. Allmaier, I.S. Druzhinina, H. Grothe, G. Friedbacher, V. Seidl-Seiboth, The fungal cerato-platanin protein EPL1 forms highly ordered layers at hydrophobic/hydrophilic interfaces, *Soft Matter*, 11 (2015) 1723–1732.
- [21] A.L. de Oliveira, M. Gallo, L. Pazzagli, C.E. Benedetti, G. Cappugi, A. Scala, B. Pantera, A. Spisni, T.A. Pertinhez, D.O. Cicero, The Structure of the Elicitor Cerato-platanin (CP), the First Member of the CP Fungal Protein Family, Reveals a Double $\psi\beta$ -Barrel Fold and Carbohydrate Binding, *J. Biol. Chem.*, 286 (2011) 17560–17568.
- [22] A. Frischmann, S. Neudl, R. Gaderer, K. Bonazza, S. Zach, S. Gruber, O. Spadiut, G. Friedbacher, H. Grothe, V. Seidl-Seiboth, Self-assembly at Air/Water Interfaces and Carbohydrate Binding Properties of the Small Secreted Protein EPL1 from the fungus *Trichoderma atroviride*, *J. Biol. Chem.*, 288 (2013) 4278–4287.
- [23] S. Djonovic, W.A. Vargas, M.V. Kolomiets, M. Horndeski, A. Wiest, C.M. Kenerley, A Proteinaceous Elicitor Sm1 from the Beneficial Fungus *Trichoderma virens* Is Required for Induced Systemic Resistance in Maize, *PLANT Physiol.*, 145 (2007) 875–889.
- [24] A. Zykwińska, T. Guillemette, J.-P. Bouchara, S. Cuenot, Spontaneous self-assembly of SC3 hydrophobins into nanorods in aqueous solution, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics*, 1844 (2014) 1231–1237.
- [25] J.A. Delcour, H. Verachtert, P. Wagner, G. Derdelinckx, Comparison of structure, sequence, physical interactions and its effects on primary gushing among several class II hydrophobins, *Monatsschrift Für Brauwiss.*, 68 (2015) 38.
- [26] I. Bretherton, K.A. Munholland, Internal working models in attachment relationships: A construct revisited, (1999).
- [27] M.B. Linder, Hydrophobins: Proteins that self assemble at interfaces, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 14 (2009) 356–363.
- [28] J.G. Wessels, O.M. De Vries, S.A. Asgeirsdottir, F.H. Schuren, Hydrophobin genes involved in formation of aerial hyphae and fruit bodies in *Schizophyllum*, *Plant Cell*, 3 (1991) 793–799.
- [29] J.G.H. Wessels, Fungal hydrophobins: proteins that function at an interface, *Trends Plant Sci.*, 1 (1996) 9–15.
- [30] M. Ruocco, S. Lanzuise, N. Lombardi, S.L. Woo, F. Vinale, R. Marra, R. Varlese, G. Manganiello, A. Pascale, V. Scala, D. Turrà, F. Scala, M. Lorito, Multiple Roles and Effects of a Novel *Trichoderma* Hydrophobin, *Mol. Plant. Microbe Interact.*, 28 (2015) 167–179.
- [31] M. Karlsson, J. Stenlid, A. Olson, Two hydrophobin genes from the conifer pathogen *Heterobasidion annosum* are expressed in aerial hyphae, *Mycologia*, 99 (2007) 227–231.
- [32] O. Müller, P.H. Schreier, J.F. Uhrig, Identification and characterization of secreted and pathogenesis-related proteins in *Ustilago maydis*, *Mol. Genet. Genomics*, 279 (2008) 27–39.
- [33] C.P. Kubicek, S.E. Baker, C. Gamauf, C.M. Kenerley, I.S. Druzhinina, Purifying selection and birth-and-death evolution in the class II hydrophobin gene families of the ascomycete *Trichoderma/Hypocrea*, *BMC Evol. Biol.*, 8 (2008) 4.

- [34] J.M. Plett, J. Gibon, A. Kohler, K. Duffy, P.J. Hoegger, R. Velagapudi, J. Han, U. Kües, I.V. Grigoriev, F. Martin, Phylogenetic, genomic organization and expression analysis of hydrophobin genes in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*, *Fungal Genet. Biol.*, 49 (2012) 199–209.
- [35] M. Groenning, Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils—current status, *J. Chem. Biol.*, 3 (2010) 1–18.
- [36] R. Nelson, M.R. Sawaya, M. Balbirnie, A.Ø. Madsen, C. Riek, R. Grothe, D. Eisenberg, Structure of the cross- β spine of amyloid-like fibrils, *Nature*, 435 (2005) 773
- [37] M. Heim, D. Keerl, T. Scheibel, Spider Silk: From Soluble Protein to Extraordinary Fiber, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 48 (2009) 3584–3596.
- [38] G. Bratzel, M.J. Buehler, Sequence-structure correlations in silk: Poly-Ala repeat of *N clavipes* MaSp1 is naturally optimized at a critical length scale, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 7 (2012) 30–40.
- [39] H.A. Lashuel, B.M. Petre, J. Wall, M. Simon, R.J. Nowak, T. Walz, P.T. Lansbury, α -Synuclein, Especially the Parkinson's Disease-associated Mutants, Forms Pore-like Annular and Tubular Protofibrils, *J. Mol. Biol.*, 322 (2002) 1089–1102.
- [40] M.M. Apetri, N.C. Maiti, M.G. Zagorski, P.R. Carey, V.E. Anderson, Secondary Structure of α -Synuclein Oligomers: Characterization by Raman and Atomic Force Microscopy, *J. Mol. Biol.*, 355 (2006) 63–71.
- [41] T. Takahashi, T. Tanaka, Y. Tsushima, K. Muragaki, K. Uehara, S. Takeuchi, H. Maeda, Y. Yamagata, M. Nakayama, A. Yoshimi, K. Abe, Ionic interaction of positive amino acid residues of fungal hydrophobin RolA with acidic amino acid residues of cutinase CutL1: Ionic interaction between hydrophobin and cutinase, *Mol. Microbiol.*, 96 (2015) 14–27.
- [42] Y. Terauchi, Y.-K. Kim, T. Tanaka, K. Nanatani, T. Takahashi, K. Abe, Asp30 of *Aspergillus oryzae* cutinase CutL1 is involved in the ionic interaction with fungal hydrophobin RolA, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 81 (2017) 1363–1368.
- [43] M. Tien, T.K. Kirk, Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*, in: *Methods Enzymol.*, Elsevier, 1988: pp. 238–249.

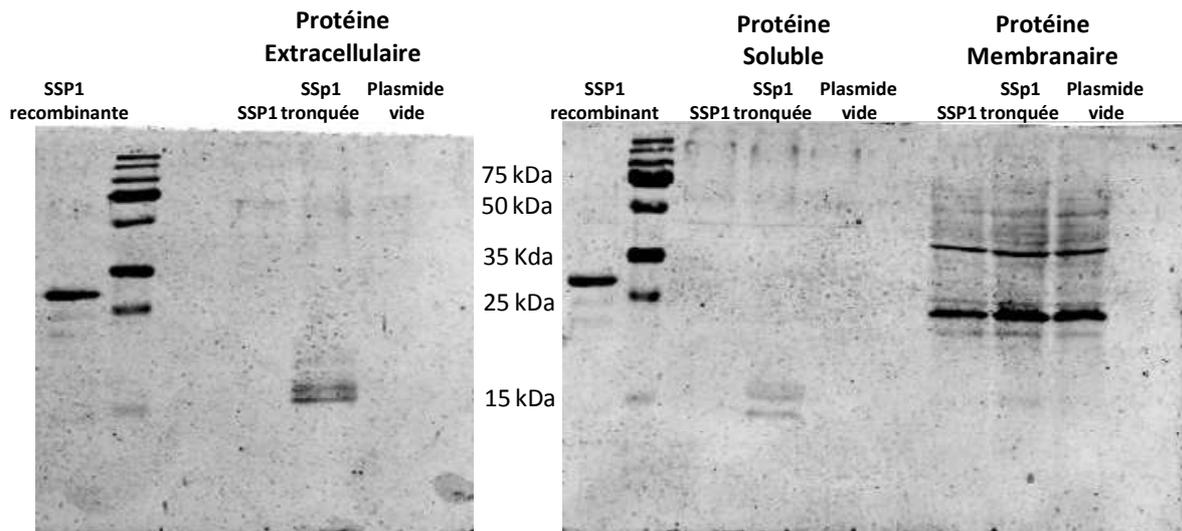


Figure 39: Western Blot montrant l'expression de SSP1 et SSP1trunc après surexpression chez *S. cerevisiae*

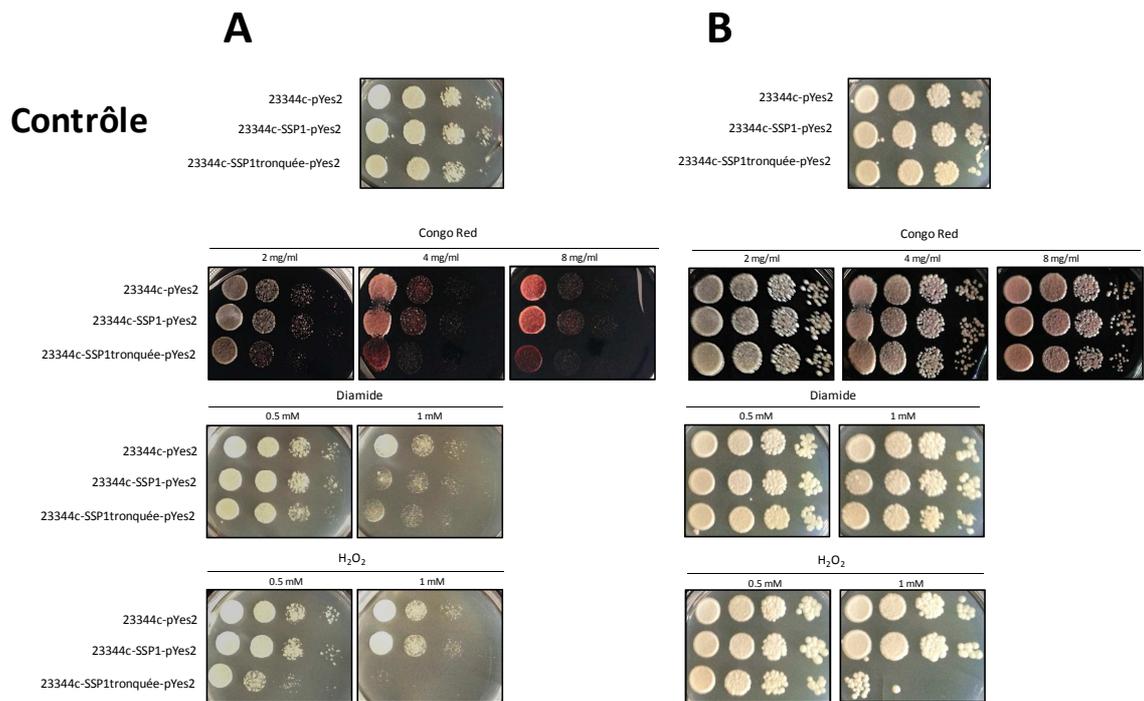


Figure 40 : Phénotypage des mutants de levures surexprimant SSP1 et SSP1trunc. Des tests en gouttes ont été réalisés sur différents milieux (rouge congo, diamide et peroxyde d'hydrogène à différentes concentrations). Les levures ont été cultivées sur la nuit en présence de glucose et une culture sur galactose a été réalisée le lendemain jusqu'à obtenir un DO de 0,6 permettant l'expression des protéines. Des gouttes ont été déposées sur les différents milieux avec une DO de départ de 0,6 et des dilutions en cascades (X10). Les résultats sont présentés après 2 jours (A) et 5 jours de croissance (B). Les résultats obtenus pour la SSP1 ne peuvent être pris en compte car l'expression de la protéine n'a pas été validée par western blot.

Approches physiologiques et utilisation d'organismes modèles pour la caractérisation fonctionnelle de SSP1 :

1. Expression de SSP1 et SSP1trunc chez *S. cerevisiae* :

La levure *S. cerevisiae* a été choisie dans un premier temps pour la caractérisation *in vivo* de SSP1 à cause de sa simplicité d'utilisation en tant qu'outil génétique. Des mutants surexprimant les protéines SSP1 et SSP1trunc ont été générés par transformation de la souche sauvage 23344c avec un plasmide contenant les gènes SSP1 pleine longueur ou tronqué sous la dépendance d'un promoteur inductible au galactose. L'expression des protéines a été vérifiée par western-blot sur des extraits protéiques intracellulaires (solubles et membranaires) et extracellulaires (Figure 39). Seules les souches exprimant la SSP1trunc présentent un signal montrant la surexpression de la protéine à la fois au niveau des protéines intracellulaires solubles et dans le sécrétome. Aucun signal n'a été détecté pour SSP1 pleine longueur, suggérant que la protéine n'est pas exprimée ou que sa conformation *in vivo* ne permet pas sa détection par western blot. Des expériences de phénotypage ont été menées sur milieu riche supplémenté par différentes molécules induisant un stress oxydant (peroxyde d'hydrogène et diamide) ou déstabilisant la paroi cellulaire (rouge congo) (Figure 40). En condition contrôle, les mutants ne présentent pas de phénotypes particuliers par rapport au sauvage après 2 ou 5 jours de culture. Concernant les traitements, seul H₂O₂ semble avoir un effet significatif sur la croissance de la souche exprimant la version tronquée de SSP1. L'absence de phénotype concernant SSP1 pleine longueur pourrait être due au défaut d'expression mentionné ci-dessus. Un retard de croissance peut tout de même être souligné pour le mutant SSP1trunc sur rouge congo et diamide à 2 jours qui n'est plus visible à 5 jours suggérant que les concentrations utilisées pour ces molécules ne sont pas assez importantes pour révéler clairement le phénotype. Bien que la version tronquée ne soit capable que de former des petits agrégats solubles, il est tout à fait envisageable que l'induction de l'expression de la protéine soit toxique chez la levure expliquant ainsi le défaut de croissance observé en condition de stress. Cependant, ces résultats ne permettent pas de préciser la fonction de SSP1 *in vivo*, d'autant plus que l'utilisation de *S. cerevisiae* est limitée dans le sens où aucun orthologue de SSP1 n'a été détecté dans le génome de la levure ; les expériences de complémentation fonctionnelles de mutants knock-out sont par conséquent inenvisageables.

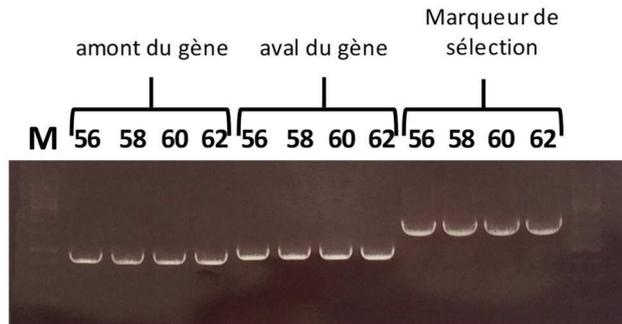


Figure 41 : Profils d'amplification des trois fragments d'ADN nécessaire à la réalisation d'une cassette de délétion permettant le remplacement d'un gène chez *P. anserina*.

Chaque PCR est réalisée avec quatre températures d'hybridation différentes (56, 58, 60 et 62°C) afin de limiter au maximum les hybridations aspécifiques.

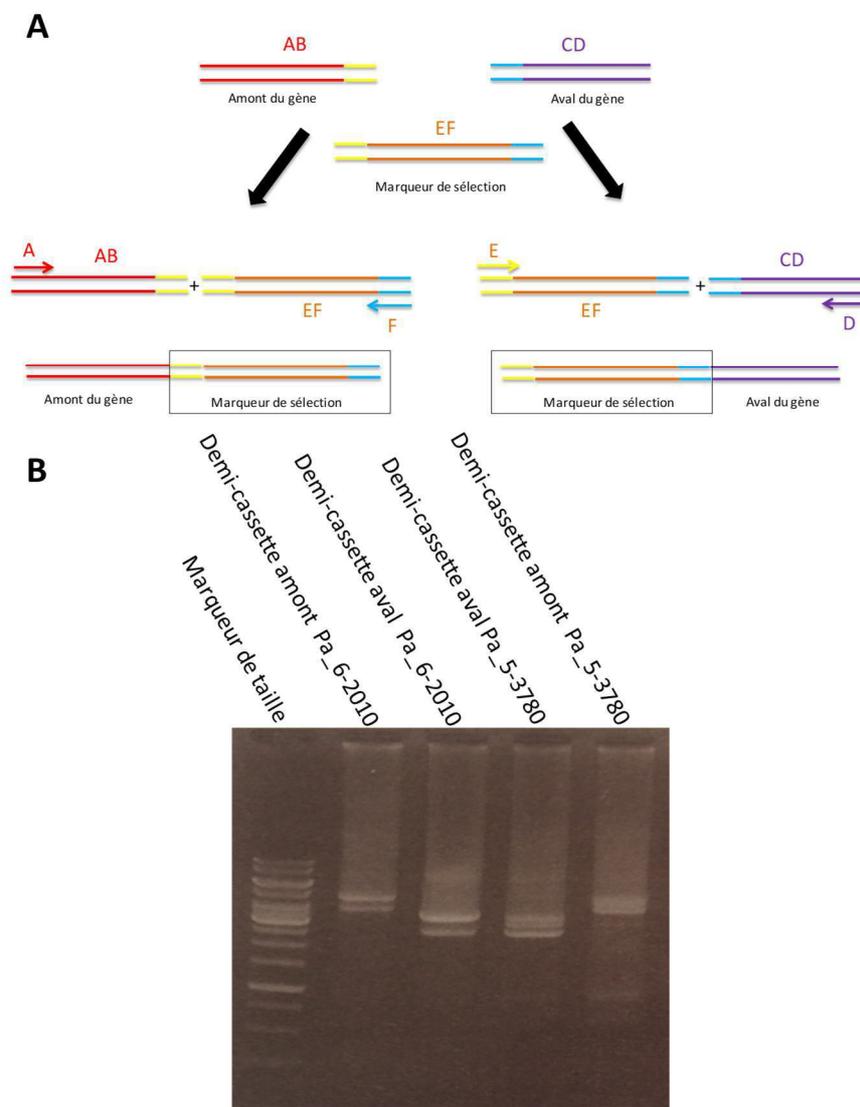


Figure 42 : Profils d'amplification des demi-cassettes utilisées pour la transformation génétique de *P. anserina*.

Bien que les températures d'hybridations utilisées soient de 62°C les profils d'amplification montrent des hybridations aspécifiques.

Production et caractérisation de mutants délétés pour 2 orthologues de SSP1 chez P. anserina.

P. anserina a été choisi pour cette étude puisque qu'il partage certaines caractéristiques physiologiques avec *P. chrysosporium* : c'est un champignon filamenteux saprophyte qui possède des capacités de dégradation du matériel lignocellulosique. De plus, 2 séquences orthologues à SSP1 ont été identifiées dans son génome. C'est alors qu'est né un projet de recherche en collaboration avec le Pr Philippe Silar et les membres du Laboratoire Interdisciplinaire des Energies de Demain (LIED, université Paris Diderot) pour générer et caractériser des mutants délétés pour ces gènes.

1. Obtention des mutants knock-out :

La première étape de cette approche repose sur la réalisation de mutants knock-out des gènes Pa_6_2010 et Pa_5_3780 codant pour les deux protéines homologues préalablement identifiées. Le remplacement de ces gènes par des cassettes de résistance s'effectue par recombinaison homologue, ce qui nécessite la construction d'un fragment d'ADN particulier contenant des régions homologues à celles de l'ADN génomique entourant le gène ciblé. Pour se faire, différentes étapes de hot-start PCR ont été effectuées, la première consistait à amplifier les séquences génomiques en amont et en aval du gène ainsi que le marqueur de sélection (Figure 41). Pour chaque amplification quatre températures ont été testées afin de limiter un maximum les hybridations aspécifiques. Ces dernières donnant des résultats similaires et satisfaisants, nous avons retenu la plus élevée qui est de 62 °C.

La cassette de délétion se compose de deux fragments d'ADN linéaires correspondant à la fusion de la partie génomique amont ou aval avec le marqueur de sélection. Cette étape de fusion est possible car des amorces spécifiques ont été utilisées afin d'ajouter à la partie amont ou aval une séquence nucléotidique homologue au marqueur de sélection. Suite à cela, la seconde étape de PCR permet l'amplification de la fusion du gène de sélection avec la partie de l'ADNg aval ou amont afin de former les deux demi-cassettes de résistance (Figure 42) : bien que des précautions aient été prises (utilisation d'une température élevée pour l'hybridation), on observe la présence d'amplifications aspécifiques. Cependant, la proportion de ces dernières n'impactera pas le bon déroulement de l'insertion de la cassette de délétion.



Figure 43 : Transformants isolés sur milieu de sélection (Généticine).

Cette photo fait suite à l'inoculation des premiers transformants apparus sur milieu M2 enrichi en généticine. On y observe des mutants isolés sur milieu de sélection riche en généticine.

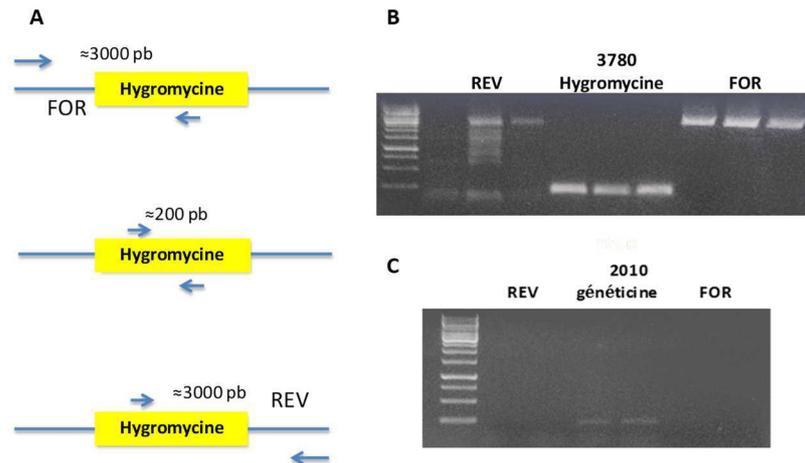


Figure 44 : Etape de vérification de l'insertion des cassettes de délétion chez *P. anserina*.

Schéma représentant les trois PCR de vérification dont l'une est réalisée avec une amorce en amont de la partie 5' de la cassette et une amorce interne à la séquence du gène de résistance, la seconde est interne au gène de résistance et la troisième est effectuée avec une amorce externe à la partie 3' de la cassette associée avec une amorce interne à la séquence du gène de résistance (A). Photo des trois PCR réalisées sur l'ADNg du mutants Pa_5-3780 (B) et Pa_6-2010 (C).

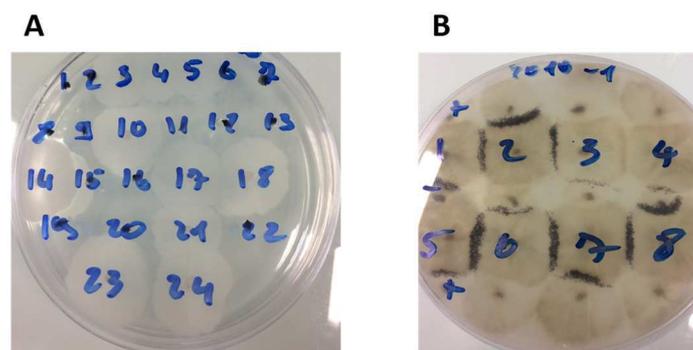


Figure 45 : Photo des étapes de génotypage des 24 microspores.

Inoculation des 24 microspores des mutants Pa_5-3780 sur milieu supplémenté en hygromycine ou phléomycine et des mutants Pa_6-2010 sur milieu supplémenté en phléomycine ou généticine afin de déterminer leur résistance pour ces molécules fongicides (A). Mise en coculture de *P. anserina* sauvage de type sexuel MAT+, MAT- et de microspores des mutants Pa_5-3780 et Pa_6-2010 aux types sexuels non définis. La présence de périthèces à l'interface d'un mycélium sauvage et d'un mycélium provenant d'une microspore permet de déterminer le type sexuel de la microspore (B).

Ces deux demi-cassettes sont ensuite rassemblées puis introduites dans des protoplastes de *P. anserina* dans lesquelles, par un événement de triple crossover, le marqueur de sélection va remplacer le gène d'intérêt. Les protoplastes transformés présentant alors la capacité de résister à des molécules fongicides comme l'hygromycine ou la généticine, sont donc sélectionnés sur des milieux supplémentés avec ces molécules (Figure 43). Suite à cela, la bonne insertion du gène de résistance introduit a ensuite été vérifiée par extraction d'ADN des transformants et trois PCR différentes permettant d'amplifier la partie interne de la cassette de résistance, deux portions externes en amont et en aval de l'insertion (Figure 44). Les résultats de ces PCR révèlent au minimum la présence d'un amplicon interne correspondant à la séquence nucléotidique du gène de résistance introduit chez les deux mutants Pa_6_2010 et les trois mutants du gène Pa_5_3780. Cependant, les fragments en amont et en aval n'ont pu être détectés que pour les mutants Δ 3780. La confirmation de l'insertion sera faite par Southern Blot. Il est important de noter que cette étape ne permet pas de dire si l'insertion s'est faite en une seule copie ou en multi-copie dans le génome. Par conséquent, une étape de reproduction sexuée avec une souche sauvage a été réalisée pour permettre de « laver » le fond génétique et ainsi éliminer toutes mutations non souhaitées dans le génome. De ce croisement, 24 microspores (haploïdes) sont repiquées puis testées pour différentes résistances et pour définir leur type sexuel (Figure 45). Les résultats sont reportés dans un tableau (tableau 8) présentant les caractéristiques de chaque spore, les génotypes souhaités sont ainsi sélectionnés. La dernière étape a pour but de valider le remplacement de gène ainsi que de confirmer l'insertion du fragment d'ADN en monocopie. Elle s'effectue par Southern Blot permettant de discriminer les profils génomiques des souches mutantes par rapport à la souche sauvage (Figure 46). Les résultats obtenus permettent de confirmer l'obtention des souches silencieuses et donc du remplacement des gènes Pa_6-2010 et Pa_5-3780 chez *P. anserina*. Le double mutant $\Delta\Delta$ 2010-3780 a également été généré par reproduction sexuée de ces simples mutants.

Numéro de la spore	Mutants $\Delta 3780$									Mutant $\Delta 2010$		
	1			2			3			2		
	Hygromycine	Mat	Phleomycine	Hygromycine	Mat	Phleomycine	Hygromycine	Mat	Phleomycine	Geneticin	Mat	Phleomycine
1	S	-	R	S	+	R	R	+	R	R	+	S
2	R	+	S	R	+	S	R	-	R	S	-	S
3	S	-	R	R	+	R	R	+	R	R	+	R
4	S	+	S	S	+	S	S	-	R	R	-	R
5	R	+	R				S	+	S	R	+	R
6	R	-	R	S	-	S	S	+	S	S	-	S
7	S	+	S	R	-	S	S	-	R	S	-	S
8	S	-	R	S	+	S	R	-	S	S	-	S
9	S	+	R	S	-	S	S	-	S	S	-	S
10	R	+	R	S	+	S	S	-	S	R	-	R
11	S	*	R	S	+	R	S	+	R	S	-	S
12	R	+	S	S	+	S	R	-	R	R	+	S
13	S	+	R	R	+	S	R	-	R	S	-	S
14	S	+	R				S	+	S	R	+	R
15	S	+	S				S	+	S	S	-	S
16	S	+	R				R	+	S	S	+	S
17	R	-	R				R	+	S	R	+	R
18	S	-	S				S	-	R	R	+	R
19	S	-	R				S	-	R	S	-	S
20	S	+	S				R	-	R	S	+	S
21	R	+	S				R	+	S	R	-	R
22	R	+	S				S	+	R	S	-	S
23							S	-	S	R	+	R
24										R	+	R

 Génotype de résistance attendu et type sexuel Mat +
 Génotype de résistance attendu et type sexuel Mat -

Tableau 8 : Liste des phénotypes obtenus pour chaque microscopores des mutants $\Delta 3780$ et $\Delta 2010$.

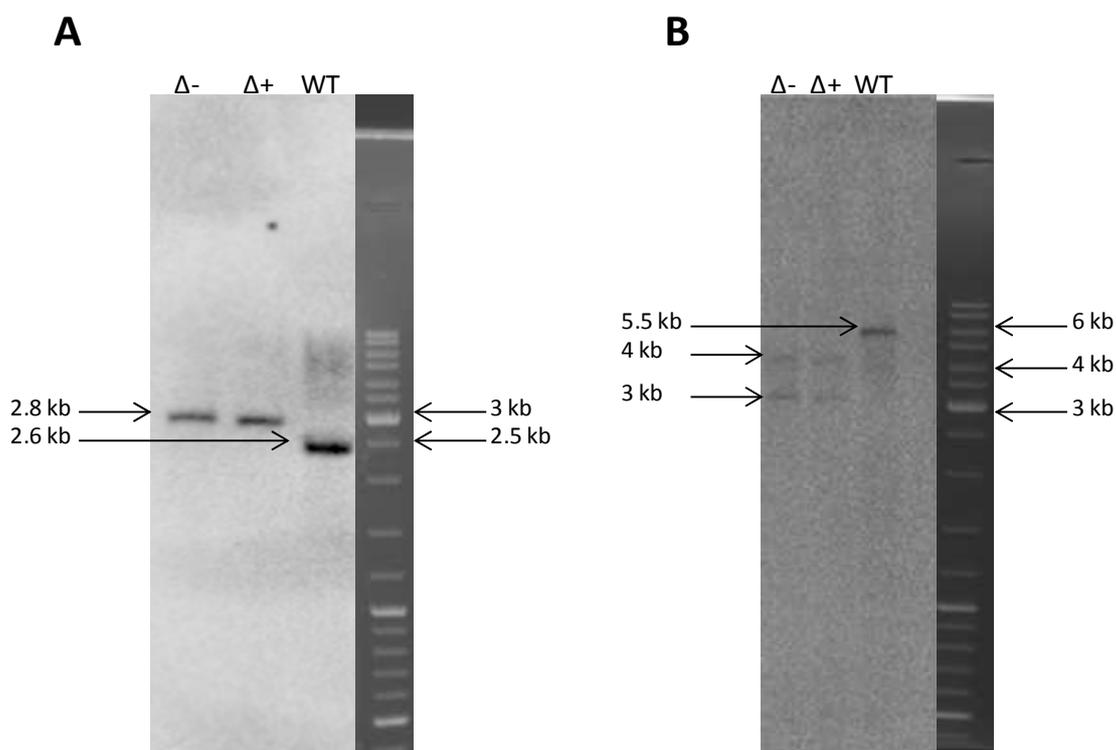


Figure 46 : Résultats des Southern Blot réalisés sur les souches délétées pour Pa_6-2010 et Pa_5-3780.

Suite au remplacement du gène Pa_6-2010 par la séquence codante de la généticine, une digestion des ADNg sauvage et mutant par l'enzyme de restriction NcoI a été réalisée. Les profils de migration révélés par le southern blot pour les mutants (bande à 2.8 kb) et le sauvage (bande à 2.6 kb) sont équivalents à ceux attendus (A). Le remplacement du gène Pa_5-3780 par le marqueur de sélection hygromycine est vérifié par digestion de l'ADNg avec l'enzyme de restriction PstI. Les profils de migration révélés par le Southern Blot pour les souches mutantes (bande à 4 et 3 kb) et pour la souche sauvage (bande à 5,5 kb) sont similaires à ceux attendus (B).

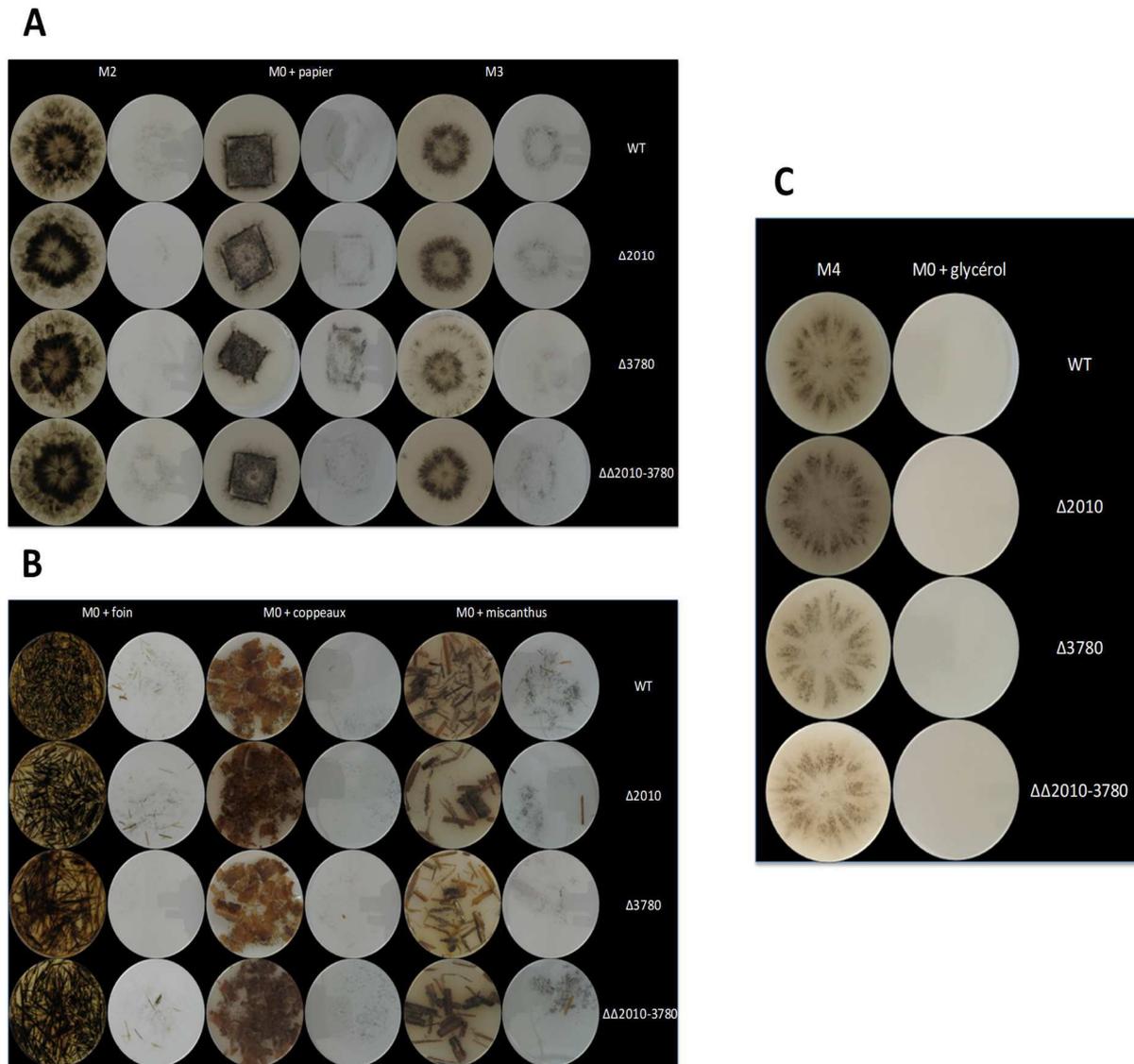


Figure 47 : Formation de périthèces et libération de spores des mutants de *P. anserina* sur diverses sources de carbone.

Lorsque les souches mutantes réalisent leurs cycles de vie en présence de dextrine (M2), de papier ou d'urée (M3), elles sont capables de former des périthèces et de sporuler tout comme la souche sauvage (A). Lorsque les mutants utilisent un apport nutritif plus complexe tel que la cellulose cristalline (M4), le foin, le miscanthus et des copeaux de bois, elles sont toujours capables de former des périthèces et de sporuler (donnée non montrée pour M4) tout comme la souche sauvage (B et C). A l'inverse, aucune souche n'est capable de croître en présence de glycérol (C).

2- Caractérisation des mutants

2.1 Cycle de vie et croissance sur diverses sources carbonées :

Des expériences de phénotypage ont été réalisées afin de déterminer une potentielle implication de ces gènes dans les différents processus du cycle de vie du champignon comme la fertilité, la croissance sur différentes sources de carbone, la sporulation et la sénescence. L'observation de la mise en place de certains mécanismes par *P. anserina* (fertilité et sporulation) nécessite la présence des deux types sexuels MAT+ et MAT-. Les mutants correspondants aux deux types sexuels MAT+ et MAT- ont été incubés sur des milieux avec différentes sources de carbone : de la cellulose, du glycérol, de l'urée, des copeaux de bois, du miscanthus, du foin, du papier et de la dextrine (Figure 47).

Aucune différence phénotypique entre la souche sauvage et les souches knock-out n'ont été mises en évidence. En effet, elles sont toutes capables de former des périthèces, de sporuler et de croître normalement sur des milieux contenant de la dextrine, de la cellulose, du foin, du miscanthus, des copeaux de bois, de la cellulose cristalline ou du papier. De plus, on observe un phénomène de sénescence similaire dans toutes les conditions testées. Lorsque l'unique source de carbone est sous forme de glycérol, aucune souche n'est capable de l'assimiler pour croître.

En parallèle à cela, diverses sources de carbone (xylan, cellobiose, fructose, glucose, avicel, carboxyméthylcellulose (CMC) et pectine) ont été testées sur la croissance des mutants MAT+ (Figure 48). Après 4 jours de culture, aucune différence de croissance n'est observable entre les souches mutantes et la souche sauvage. De plus, un suivi a été effectué chaque jour ne révélant aucun retard de croissance. Par conséquent, les gènes codant ces petites protéines ne semblent pas être impliqués dans des processus de fertilité, de croissance, de sporulation et de sénescence, dans les conditions que nous avons testées.

2.2 Crippled growth :

Le phénomène de crippled growth est observable lorsque *P. anserina* est cultivé en milieu riche supplémenté en extrait de levure. Cet événement particulier n'engendre pas la mort de l'organisme mais conduit à la formation de secteurs de croissance aisément observables.

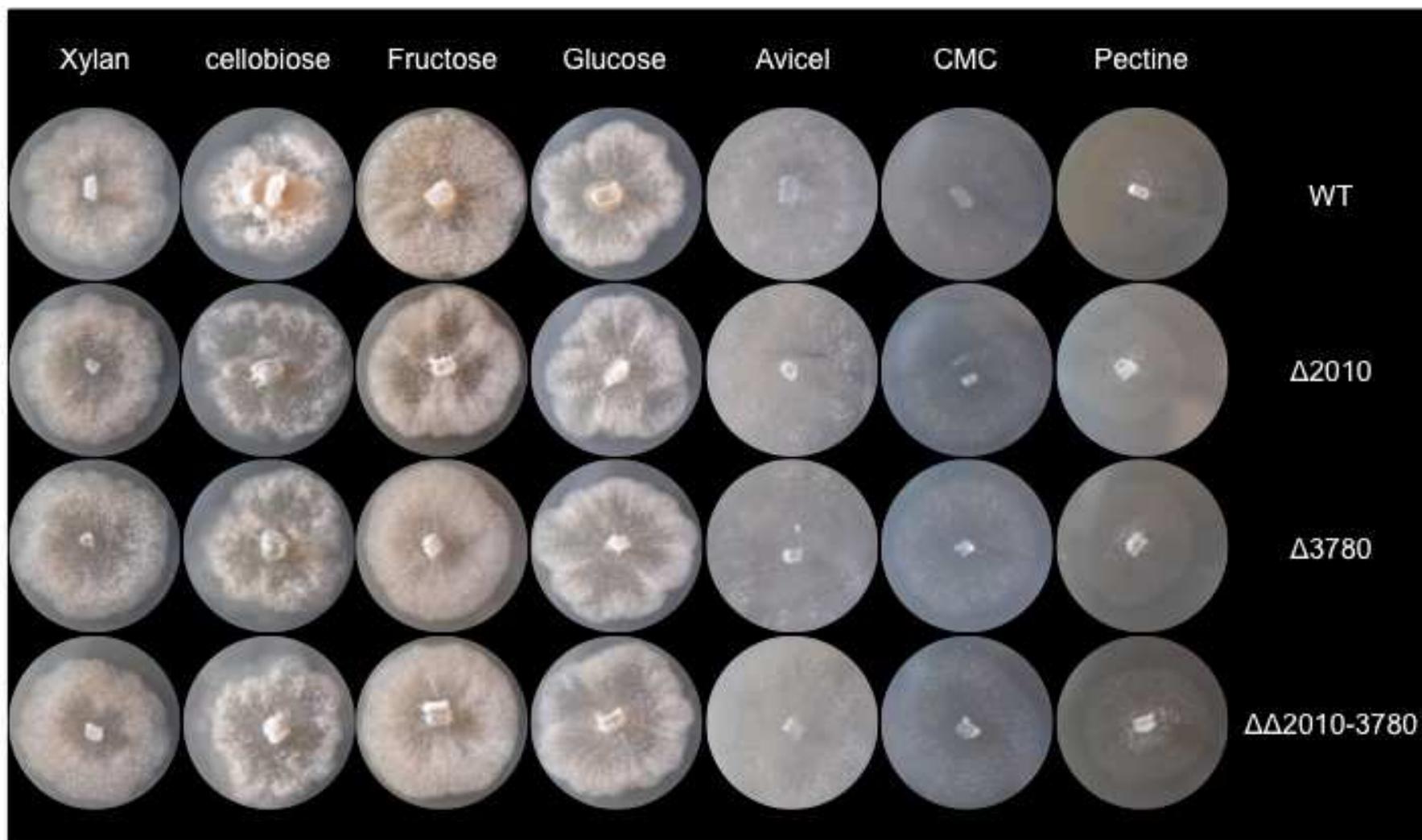


Figure 48 : Tests de croissance des souches sauvage et mutées en présence de diverses sources carbonées (milieu M2 supplémenté avec différents sucres à une concentration finale de 4 g/l).
 Concernant ces expériences seules les souches MAT+ ont été testées.

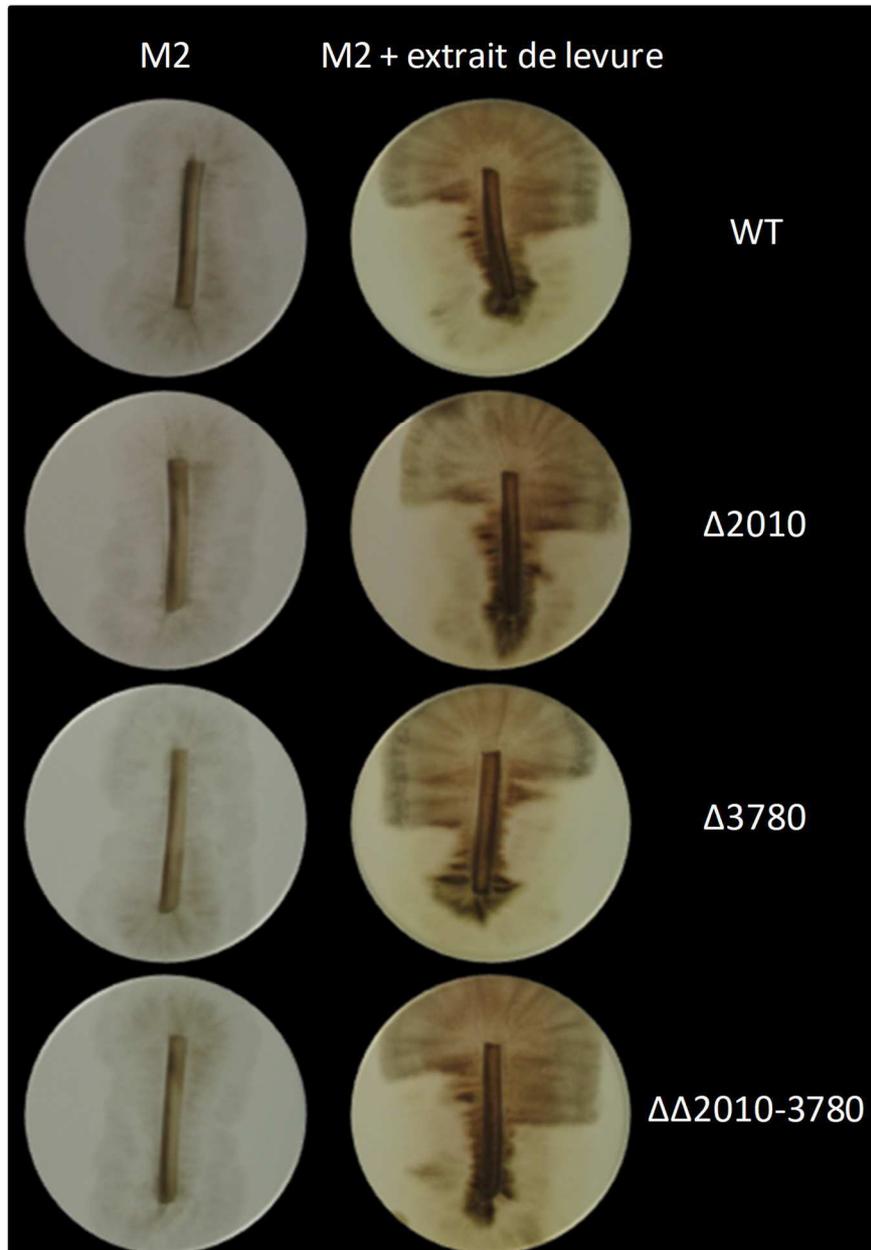


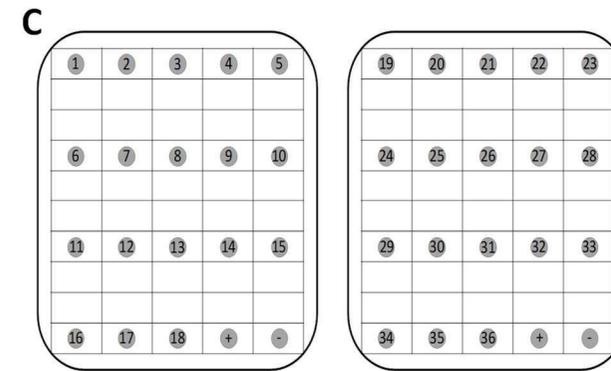
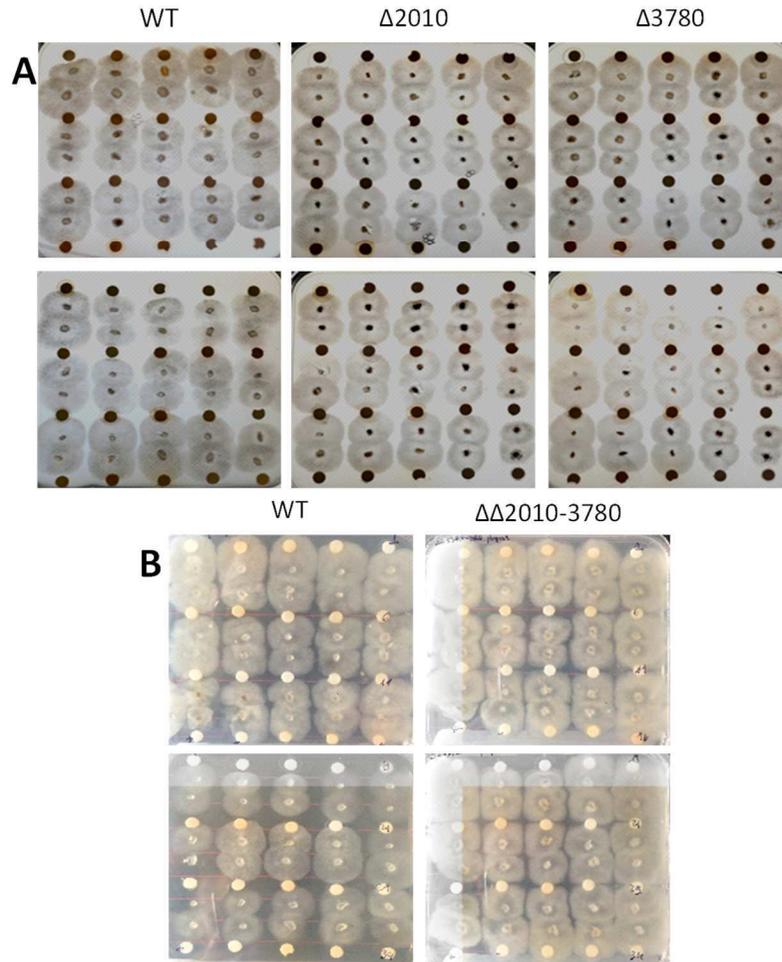
Figure 49 : Test d'identification du phénomène de croissance : crippled growth.

L'inoculum des souches mutantes ainsi que celui de la souche sauvage révèlent une croissance mycélienne normale sur milieu M2. A l'inverse lorsque le milieu est supplémenté en extrait de levure, on observe le phénomène de crippled growth pour les quatre souches testées.

En effet, le mycélium se compartimente en plusieurs parties dont l'une est similaire à une croissance normale et l'autre dans laquelle l'organisme ne se développe pas. L'observation de ce phénomène est dépendante de l'âge de l'inoculum puisqu'il est corrélé avec le passage en phase stationnaire du champignon. Ceci se traduit par la présence d'un phénotype crippled growth systématique lorsque le mycélium est âgé de deux jours. A l'inverse si celui-ci est plus jeune le phénomène est réversible. A l'heure actuelle les mécanismes liés à ce phénomène ne sont pas encore tous connus, c'est pourquoi nos souches mutantes ont été testées pour celui-ci. La première étape consiste à réaliser des cultures sur milieu M2 pendant plus de deux jours permettant d'obtenir un gradient de mycélium selon l'âge. Ceci est réalisé par découpe d'une bande de mycélium allant du plug vers l'extérieur du mycélium. Cette bande est ensuite inoculée sur un milieu M2 et un milieu M2 supplémenté en extrait de levure (Figure 49). Après que la croissance des souches soit terminée, un phénotype normal est observé pour les quatre souches sur milieu M2, ce qui correspond à une répartition de croissance similaire tout au long de la bande inoculée. A contrario, la présence d'un phénotype crippled growth est constatée pour les quatre souches sur milieu M2 supplémenté en extrait de levure. En effet, la partie jeune de l'inoculum présente une croissance tout à fait normale tandis que la partie ancienne ne croît que très peu. Par conséquent, les gènes codant les petites protéines sécrétées ne sont pas impliqués dans ce phénomène de croissance irrégulière du mycélium de *P. anserina*.

2.3 Croissance en présence de diverses molécules toxiques :

Le gène codant pour la protéine SSP1 est sur-exprimé par *P. chrysosporium* en présence d'extractibles de chêne suggérant une potentielle implication de cette protéine dans des mécanismes de détoxification. Le phénotype des mutants Pa_2010, Pa_3780 et du double mutant a été testé en présence d'extractibles provenant de différentes essences végétales (Figure 50). Après plusieurs jours d'incubation, certains extractibles provoquent une réduction de croissance de *P. anserina*. Cependant, ces observations sont similaires pour les quatre souches ce qui suggère que l'absence de petites protéines sécrétées n'impactent pas la croissance de *P. anserina* en présence d'extractibles.



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Wapa Dichlorométhane	Wapa Acétone	Wapa Toluène/Ethanol	Wapa Eau	Amarante Dichlorométhane	Amarante Acétone	Amarante Toluène/Ethanol	Amarante Eau	St Martin rouge Dichlorométhane	St Martin rouge Acétone	St Martin rouge Toluène/Ethanol	St Martin rouge Eau
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Grignon Dichlorométhane	Grignon Acétone	Grignon Toluène/Ethanol	Grignon Eau	Ebene vert Dichlorométhane	Ebene vert Acétone	Ebene vert Toluène/Ethanol	Ebene vert Eau	Bagasse Dichlorométhane	Bagasse Acétone	Bagasse Toluène/Ethanol	Bagasse Eau
25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
Courbaril Dichlorométhane	Courbaril Acétone	Courbaril Toluène/Ethanol	Courbaril Eau	Angélique Dichlorométhane	Angélique Acétone	Angélique Toluène/Ethanol	Angélique Eau	Cerisier Dichlorométhane	Cerisier Acétone	Cerisier Toluène/Ethanol	Cerisier Eau

Figure 50 : Test de résistance des souches mutantes à des extractibles de bois.

10 μ l d'extractibles à 1 mg/ml ont été déposés sur des patches de papier whatman et déposés sur des milieux M2 solides. Deux inocula fongiques ont été déposés entre les patches et la croissance a été comparée de manière qualitative après deux jours d'incubation à 27°C, pour les souches simple mutantes (A) et double mutante (B) en comparaison avec la souche sauvage dans les mêmes conditions. Les différents extractibles testés sont reportés sur un schéma (C).

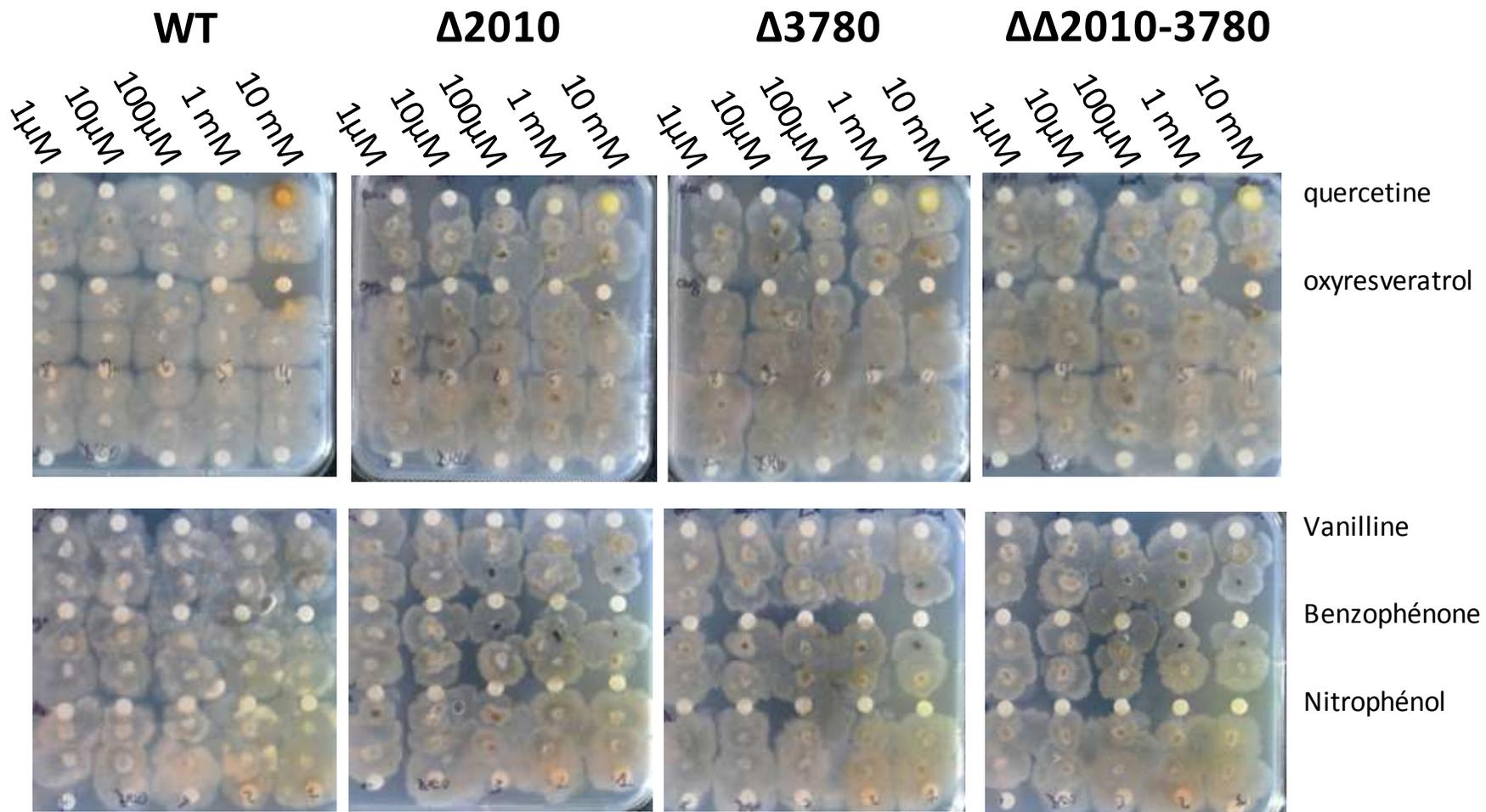


Figure 51 : Test de résistance des souches mutantes contre des molécules toxiques pures.

La croissance mycélienne des souches sauvage et mutantes a été testée avec les mêmes dispositifs expérimentaux que celui décrit ci-dessus mais en présence de nitrophénol, benzophénone, vanilline ou de quercetine (10 μ l ont été déposés sur des patches de papier whatman à partir de solutions concentrées à 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1 mM et 10 mM). Les images montrent la croissance mycélienne après 2 jours de culture à 27°C.

Afin d'aller plus loin, des molécules pures connues pour être toxiques envers certains organismes fongiques telles que la quercétine, l'oxyresveratrol, la vanilline, le benzophénone et le nitrophénol ont été utilisées pures à différentes concentrations de 10 μ M, 100 μ M, 1 mM et 10 mM (Figure 51). La croissance des différentes souches n'est pas impactée par la présence de quercétine et de vanilline. L'oxyresveratrol engendre une forte diminution de croissance mais à une concentration élevée de 100 mM et chez toutes les souches. Par conséquent, ce phénotype n'implique pas la délétion des gènes Pa_6-2010 et Pa_5-3780. En ce qui concerne le benzophénone et le nitrophénol, ils provoquent une légère diminution de croissance proportionnel à la concentration utilisée. Il semblerait que le simple mutant Δ 3780 soit plus impacté que le simple mutant Δ 2010. L'effet de ces deux délétions ne semble pas s'additionner puisqu'un phénotype similaire est observé pour la souche $\Delta\Delta$ 2010-3780. Ces résultats restent préliminaires et doivent être approfondis afin de confirmer un réel effet de ces molécules sur la croissance des souches testées.

2.4 Processus de dégradation du bois :

P. anserina est un champignon saprophyte possédant de nombreux gènes lui permettant de dégrader une grande majorité des composants du bois. C'est pourquoi, la délétion des gènes pourrait entraîner des conséquences néfastes sur ses capacités de dégradation de la biomasse végétale. Afin de mesurer l'impact de la délétion des deux gènes Pa_2010 et Pa_3780 sur la capacité de dégradation du bois de *P. anserina*, la souche double mutante $\Delta\Delta$ _2010-3780 a été cultivée sur éprouvettes de chêne comme seule source de carbone. La dégradation du bois a été mesurée après 3 mois par perte de masse. Aucune différence de perte de masse n'a été observée entre la souche sauvage et le double mutant, signifiant que l'absence de ces deux protéines n'influence pas les processus de dégradation chez *P. anserina* (Figure 52). Les pourcentages de dégradation mesurés sont respectivement de 8,04 % et 8,41 % pour le double mutant et le sauvage. La délétion de ces deux gènes chez *P. anserina* ne semble pas affecter ses capacités de dégradations du bois. De plus, des sécrétions importantes sont observées pour la souche sauvage et pour le double mutant (Figure 53). Ces sécrétions vont être analysées en spectrométrie de masse afin de comparer et déterminer leur composition.

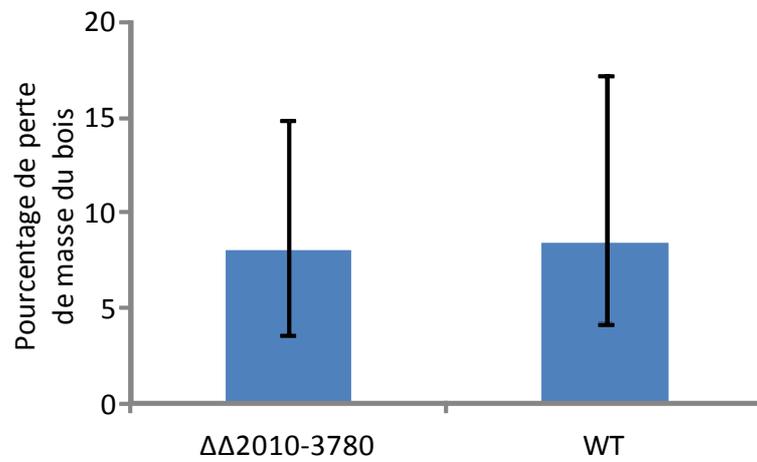


Figure 52 : Pourcentages moyens de dégradation du bois par la souche sauvage et par la souche double mutante.

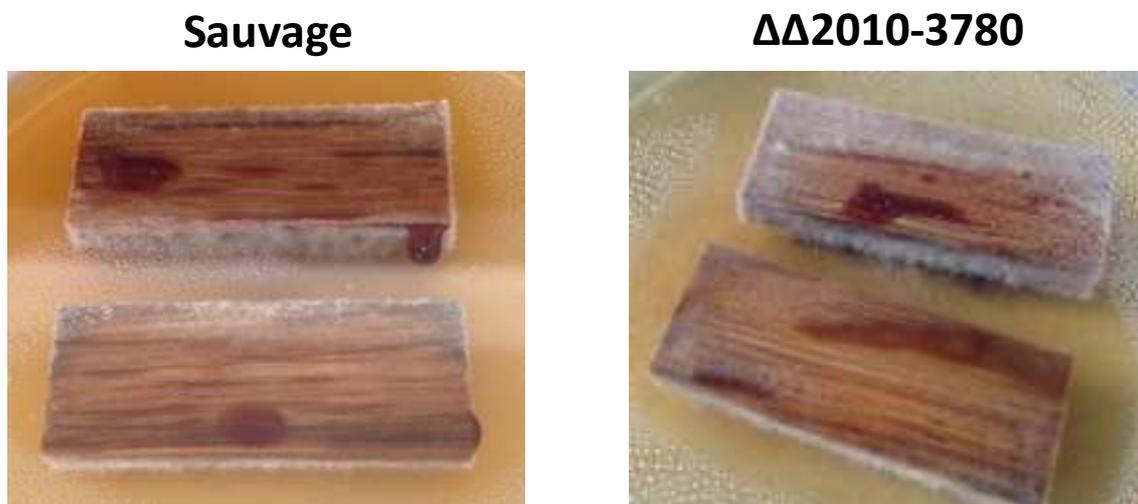


Figure 53 : Photo des sécrétions de la souche sauvage et du double mutant sur bois après 3 mois de culture à 27°C.

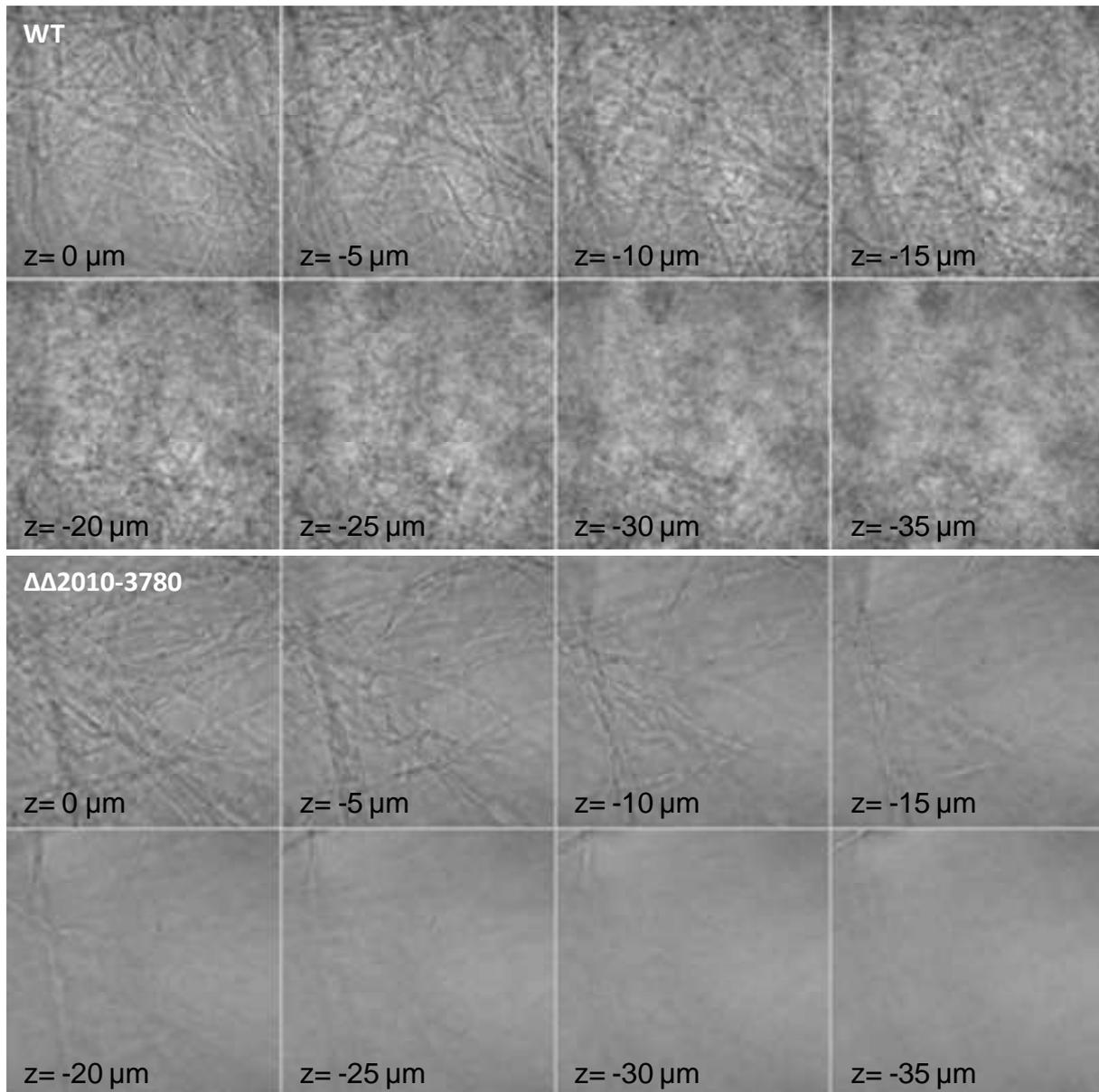


Figure 54 : Observation au microscope confocal des appressorium-like chez le sauvage et le double mutant.

Chaque souche a été cultivée sur cellophane posé sur milieu M2 gélosé. Des petits morceaux de cellophane sur lesquels le mycélium s'est développé ont été coupés et montés entre lame et lamelle. Chaque préparation a été observée en partant de la surface (0 μm) afin d'atteindre une profondeur équivalente à 35 μm.

La sécrétion d'enzymes extracellulaires chez *P. anserina* pourrait être associée à un autre phénomène puisque cet organisme possède une capacité particulière lui permettant de former des structures nommées appressorium-like afin de pénétrer et de passer au travers d'un solide (Brun et al., 2009). En effet, suite à l'expansion mycélienne sur le support, une réorganisation structurale provoque l'apparition d'hyphes dont la croissance perpendiculaire permet de pénétrer le substrat. En recherchant, des homologues de séquences pour Pa_2010 et Pa_3780 dans les bases de données fongiques, des homologues ont été identifiées avec CAS1 de *Colletotrichum gloeosporioides* et MAS3 de *Magnaporthe grisea*. Ces protéines appartiennent à la famille des glycolipid anchored proteins (GAS) dont la fonction est importante pour le pouvoir pathogène du champignon. Lors de la délétion du gène codant pour CAS1, *C. gloeosporioides* perd sa capacité à former des appressorium, tandis que la délétion de MAS3 engendre une forte perte de pénétration de ces structures (Bakar et al.; Xue et al., 2002). C'est pourquoi, nous avons testé les souches knock-out en utilisant le protocole décrit dans Brun et al 2009 (Figure 54). Suite aux observations microscopiques, aucun défaut de formation des appressorium-like n'a pu être mis en évidence pour les souches mutées. En effet, le nombre de ces structures ainsi que leurs apparences morphologiques sont similaires pour la souche sauvage et le double mutant. Par conséquent, la délétion de ces gènes n'impacte pas la formation et la morphogénèse des appressorium-like.

2.5 Croissance sur milieu oxydant ou en présence de molécules déstabilisatrices de la paroi cellulaire :

L'analyse *in silico* des deux protéines délétées chez *P. anserina* a aussi mis en évidence d'autres homologues de séquences avec des protéines appartenant à la famille des Glycolipid Anchored Surface (GAS). Ces dernières sont connues pour avoir une activité enzymatique β -1,3-glucanotransférase nécessaire dans le remodelage de la paroi cellulaire. La délétion de gène codant pour des GAS protéines chez la levure ou chez *Magnaporthe oryzae* provoque des effets indésirables sur la structure de la paroi cellulaire affectant la croissance en présence de rouge congo, en milieu oxydant ou en milieu hyper-osmotique (Samalova et al., 2017). C'est pourquoi, les souches mutantes ont également été testées en conditions oxydatives, hyper-osmotiques ou en présence d'une molécule déstabilisant les parois cellulaires : le rouge congo (Ram and Klis, 2006).

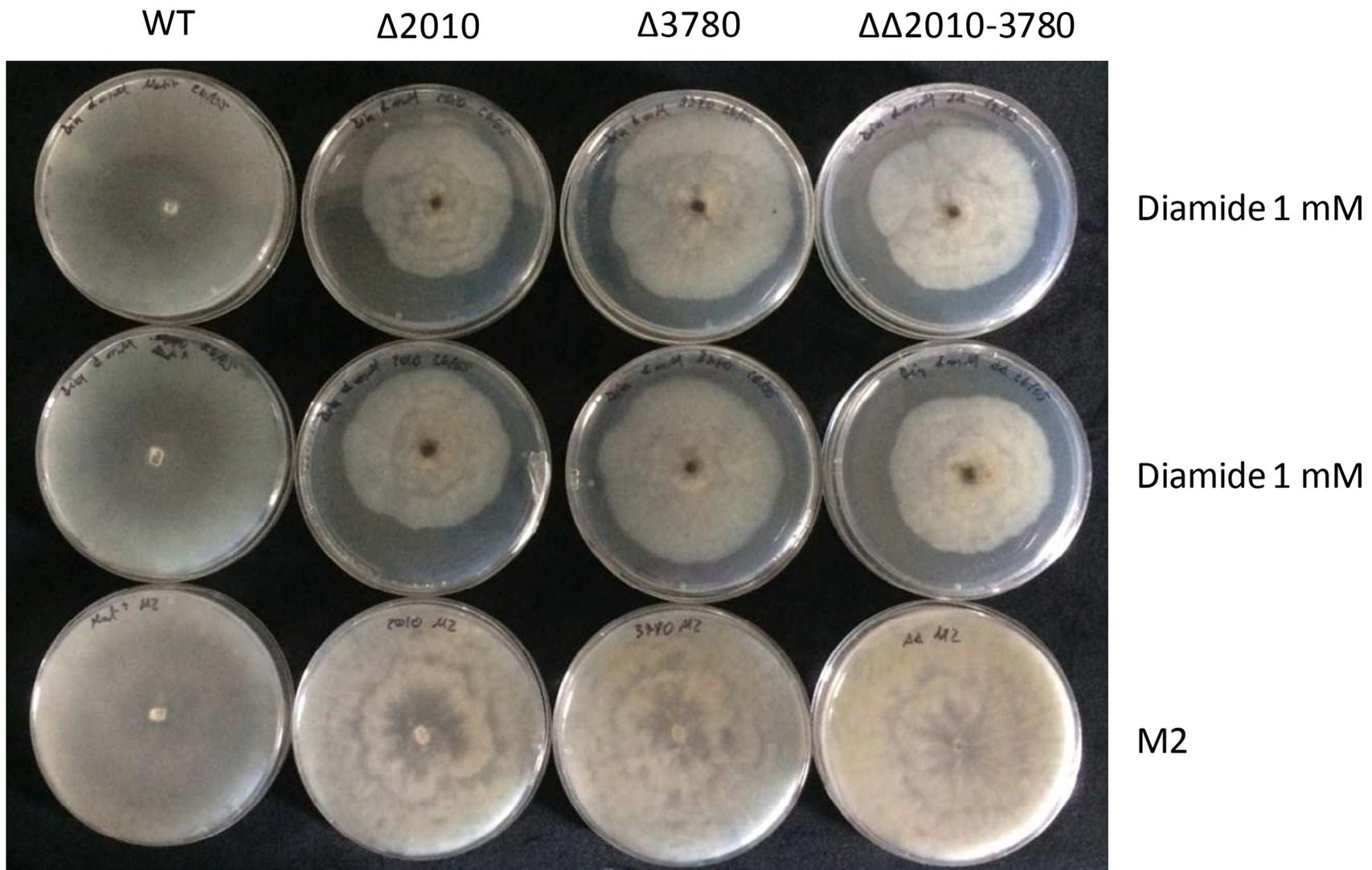


Figure 55 : Test de croissance des souches sauvage et mutantes sur milieu oxydant.

Les souches mutantes ainsi que la souche sauvage ont été incubées 10 jours à 27°C sur milieu M2 supplémenté en diamide (1 mM).

L'absence de ces gènes se traduit par une diminution de croissance de *P. anserina* en présence de diamide, une molécule engendrant un stress au niveau de la balance redox par oxydation du glutathion (Zong et al., 2013). De plus, l'effet de chaque délétion semble être cumulatif comme l'indique la croissance du double mutant. Ces résultats indiquent donc une potentielle implication dans des voies de tolérance au stress oxydatif (Figure 55). Un autre phénotype a été observé en présence de rouge congo puisque l'absence du gène Pa_6_2010 provoque un retard de croissance mais aussi une morphologie mycélienne différente. Ce dernier est également observé en l'absence du gène Pa_5_3780 mais avec une intensité moins importante. Le phénotype du double mutant semble correspondre à l'accumulation des effets provoqués par chacune des délétions (Figure 56). Il semblerait donc que ces gènes soient impliqués dans des processus de modulation de la composition de la paroi cellulaire. En leur absence, cette dernière est fragilisée provoquant une diminution de croissance sur rouge congo. Par la suite, afin de confirmer ces différents phénotypes des expériences de complémentations seront effectuées.

Mise au point de techniques de transformation génétique chez Phanerochaete chrysosporium :

Tous les détails techniques concernant cette partie sont décrits dans la partie Matériels et Méthodes.

1. Tests de différents cocktails enzymatiques pour l'obtention de protoplastes :

La paroi des champignons filamenteux est majoritairement composée de polysaccharides (50 à 60 %) de glucose liés par des liaisons β -1,3 et β -1,6, de 10 à 20 % de chitine permettant le maintien de son intégrité et de glycoprotéines modifiées par la présence d'oligosaccharides (20 à 30 %) (Bowman and Free, 2006). L'obtention de protoplastes par digestion enzymatique est donc fortement dépendante de la composition de la paroi cellulaire. Afin d'obtenir ce type de cellules chez *P. chrysosporium*, des cellulases provenant de la souche ATCC 26921 de *Trichoderma reesei* et des chitinases extraites de *Streptomyces griseus* ont été testées tout comme une solution commerciale appelée Glucanex.

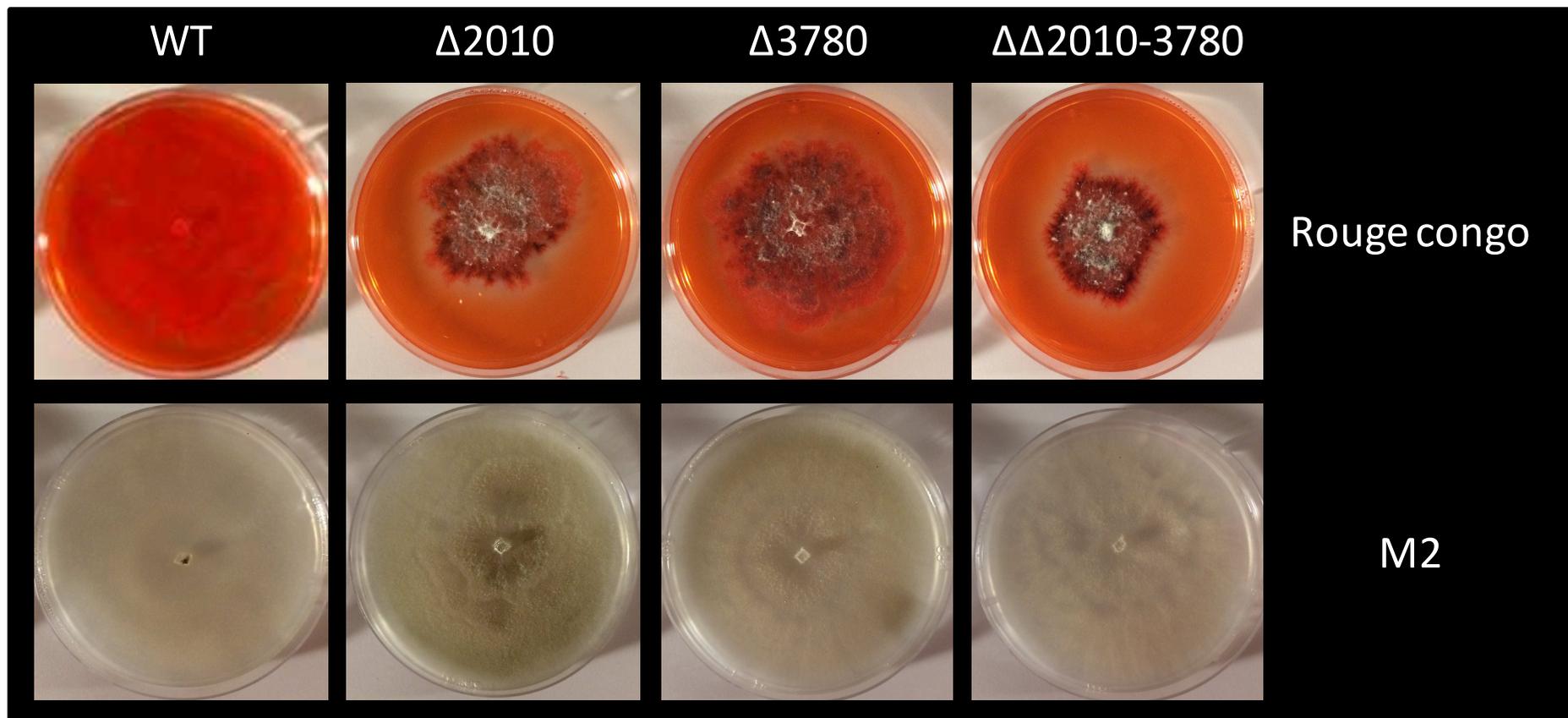


Figure 56 : Test de croissance des souches sauvage et mutantes sur milieu permettant la fragilisation des parois cellulaires.
Les souches mutantes ainsi que la souche sauvage ont été incubées 10 jours à 27°C sur milieu M2 supplémenté ou non en rouge congo (100 µg/ml).

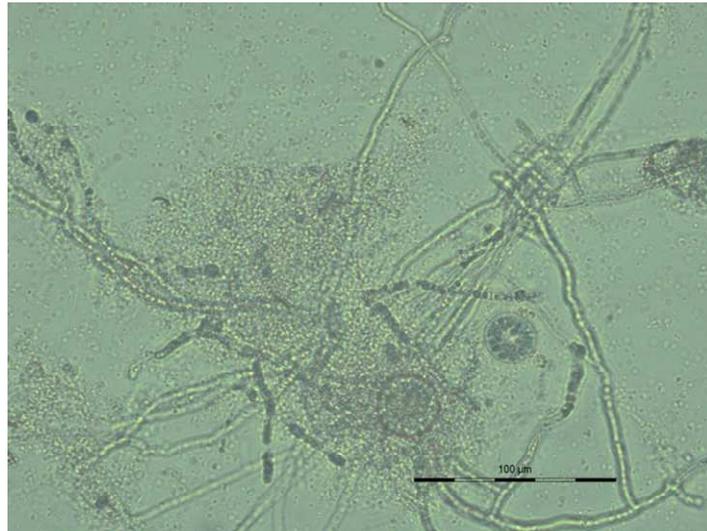


Figure 57 : Image prise au microscope optique (X40) après la digestion du mycélium de *P. chrysosporium* par du glucanex.

On observe un nombre important d'hyphes fongiques non digérés mettant en évidence l'inefficacité de cette solution enzymatique sur le mycélium de *P. chrysosporium*.

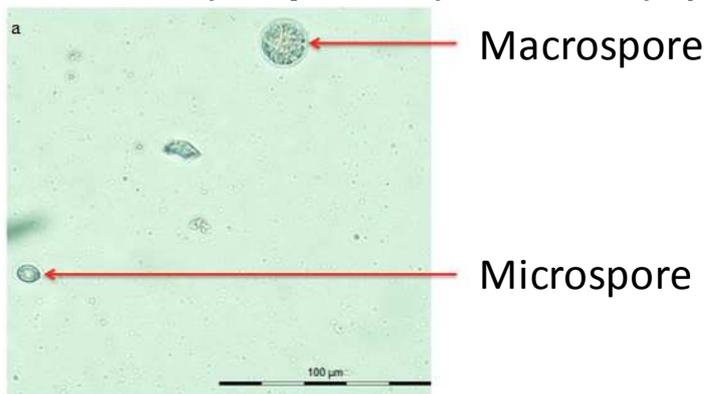


Figure 58 : Observation microscopique (X40) d'une macrospore et d'une microspore produite par *P. chrysosporium*.

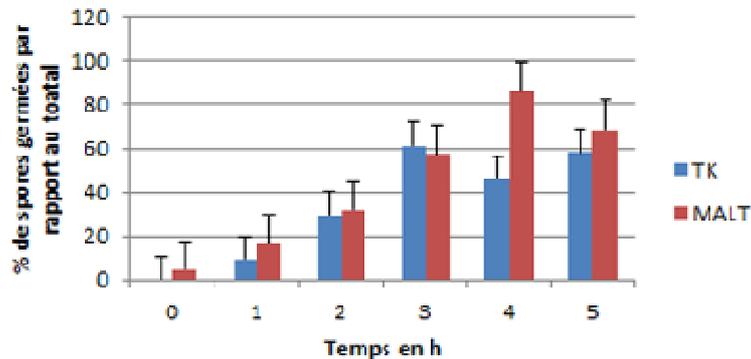


Figure 59 : Pourcentage de spores germées au cours du temps en fonction du milieu de culture.

Le suivi réalisé sur milieu minimum montre un maximum de spores germées (60 %) après 3h de culture tandis que celui effectué sur milieu riche met en évidence un maximum de spores germées (83 %) après 4h de culture.

P. chrysosporium est un organisme produisant différents types cellulaires c'est pourquoi l'obtention de protoplastes a été effectuée à la fois sur des hyphes mycéliens et des spores.

1.1 Digestion enzymatique du mycélium :

Le protocole utilisé pour obtenir des protoplastes à partir de mycélium de *P. anserina* a été utilisé sur *P. chrysosporium*. Cette technique qui requiert l'utilisation de glucanex n'a pas permis d'obtenir une digestion de la paroi satisfaisante à partir d'hyphes de *P. chrysosporium* (Figure 57). Les mêmes résultats ont été obtenus lorsque le glucanex a été remplacé par une solution contenant des cellulases et des chitinases. La composition de la paroi cellulaire mycélienne chez *P. chrysosporium* diffère donc de celle de *P. anserina* empêchant la production de protoplastes.

1.2 Digestion enzymatique de spores :

Nous avons deux souches de *P. chrysosporium* au laboratoire, une souche « parentale » hétérodicaryotique BKM et une souche « fille » monocaryotique séquencée RP78. Ces dernières produisent principalement des macrospores (environ 25 µm de diamètre) qui sont des cellules à parois épaisses produites en réponse à un stress provenant du milieu de culture. Cependant, après observation microscopique, un second type de spore a été identifié comme étant des microspores avec une paroi plus fine qui pourraient par conséquent être plus facilement digérables (Figure 58). Afin d'optimiser la production de ces petites spores, plusieurs milieux de culture ont été utilisés comme le milieu Malt (Malt 2 %), ATCC (peptone 5 g/l et malt 2 %) et YMG (extrait de levure 4 g/l et malt 1 %). Ces deux derniers se sont révélés être efficaces pour la souche RP78 tandis que la souche BKM produit de grandes quantités de microspores en milieu malt. Ces petites spores ont été digérées par une solution enzymatique contenant des cellulases et des chitinase (Figure 59). Cependant, la proportion de protoplastes générés n'a pas pu être calculée du fait de la trop petite taille des microspores et des difficultés de visualisation des parois. Il existe un moment physiologique bien précis pendant lequel la paroi des spores est fragilisée : la germination. L'utilisation de ce stade pourrait permettre une meilleure action des enzymes de dégradation et par conséquent d'améliorer le rendement en protoplastes.

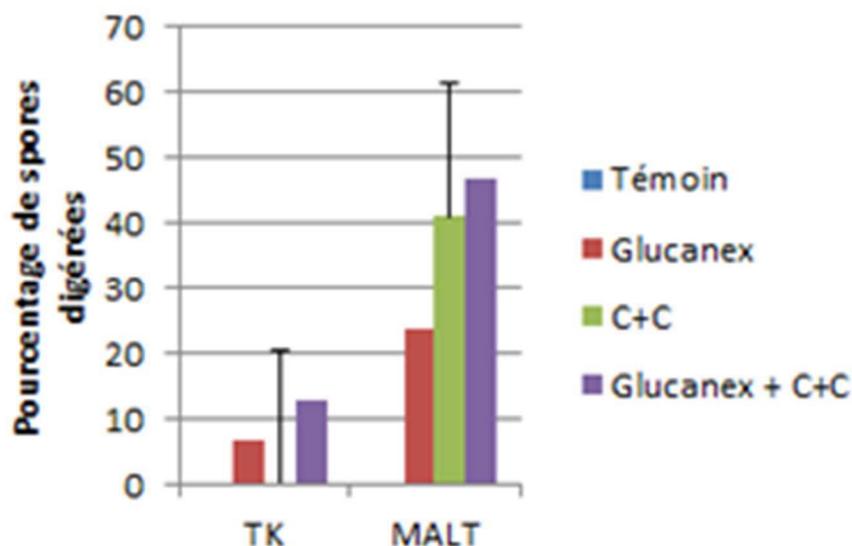


Figure 60 : Pourcentage de spores digérées en fonction du milieu de culture et du cocktail enzymatique utilisés.

Les spores germées provenant d'un milieu de culture minimum ne sont que très peu digérées par les différentes solutions enzymatiques. En effet, la valeur maximale de 20% est atteinte pour le mélange cellulase/chitinase (C+C) tandis que le glucanex a un rendement bien inférieur de 8 %. A l'inverse la digestion enzymatique de spores germées provenant d'un milieu riche montre des rendements bien supérieurs qui peuvent atteindre 60 % avec la solution cellulase/chitinase. En ce qui concerne le glucanex, son rendement de production en milieu riche est quasiment trois fois inférieur puisqu'il est de l'ordre de 20 %.

Afin de déterminer à quel moment on a le plus grand nombre de spores en germination, un suivi de ce processus a été réalisé au cours du temps (Figure 60). Cette analyse a été réalisée sur des macrospores. Pour se faire, un milieu minimum et un milieu riche ont été utilisés, ce dernier est le plus efficace des deux avec une valeur maximale de germination atteinte après 4 h d'incubation à 37 °C. Les conditions optimales étant définies, l'application du cocktail enzymatique glucanex et d'une solution de cellulase/chitinase sur ces spores germées a permis d'obtenir des protoplastes. Tout comme précédemment, différents temps de digestion ont été appliqués montrant que le rendement est optimal après deux heures en présence du mélange cellulase/chitinase. Bien que le nombre soit limité, toutes ces expérimentations ont permis d'obtenir des protoplastes de *P. chrysosporium*. Différents protocoles de transformation génétique ont alors été testés sur ces protoplastes

2. Transformation par méthode chimique : utilisation de PolyEthyleneGlycol/CaCl₂

Ce protocole de transformation repose sur les interactions de molécules chimiques avec l'ADN et les membranes cellulaires. Le PolyEthyleneGlycol va permettre de concentrer l'ADN en solution et de réduire les répulsions membranes/ADN. En parallèle, le CaCl₂ donne naissance en solution aux ions Ca²⁺ qui de part leurs charges positives vont former des trous réversibles au sein de la membrane cellulaire. Ces deux actions combinées provoquent l'entrée du fragment d'ADN ou du plasmide d'intérêt dans la cellule. Cette technique de transformation a donc été utilisée sur des solutions de protoplastes en suspension de *P. chrysosporium* (BKM et RP78) afin d'insérer différentes constructions provenant d'un plasmide Pyes-HpH (la carte est présentée dans la partie matériels et méthodes). Cependant, après régénération puis sélection des transformants sur hygromycine, aucune croissance fongique n'a été observée traduisant l'absence de résistance pour la molécule fongicide et donc aucune transfection. Afin d'optimiser cette méthode de transformation, un choc thermique a été au préalable appliqué sur la solution de protoplastes. En effet, ce dernier provoque la formation de trous réversibles dans les membranes cellulaires ce qui pourrait améliorer les rendements de transfection. La sélection des potentiels transformants s'est révélée positive puisqu'après deux sélections, des hyphes fongiques sont apparus.

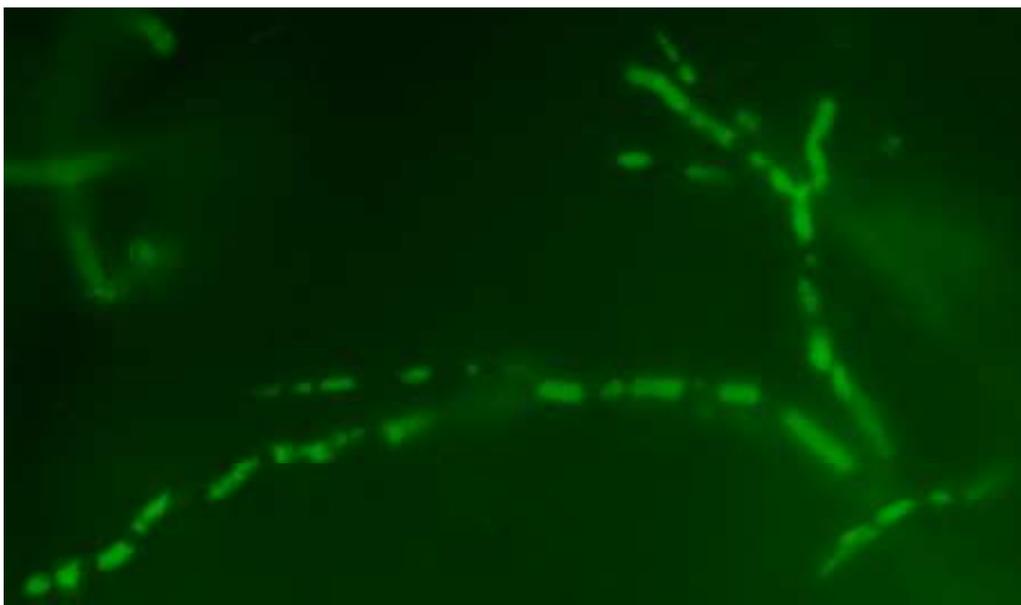


Figure 61 : Validation de la fluorescence de la GFP introduite chez *P. chrysosporium* RP78.

L'image de microscopie (X63) prise à l'aide d'un microscope à épi-fluorescence a permis de valider l'insertion de la construction GFP dans les hyphes de *P. chrysosporium* via l'utilisation de la biolistique.

Cependant, l'introduction des constructions SSP1, SSP1trunc, SSP1-GFP et SSP1trunc-GFP n'a pas pu être confirmée par microscopie ou Western-Blot.

3. Transformation par électroporation :

Cette technique de transformation génétique a été utilisée sur de nombreux organismes vivants tels que des plantes, des bactéries, des levures ou encore des champignons filamenteux. Il a été montré une importante efficacité de transformation sur des conidies germées provenant de *Neurospora crassa*, *Aspergillus oryzae*, *Leptosphaeria maculans* et *Penicillium urticae* (Chakraborty et al., 1991). Cette technique repose sur la formation de pores transitoires dans la membrane provoquée par une pulsation électrique à haute intensité facilitant ainsi l'entrée d'ADN exogène. De plus, elle est facile à mettre en place, rapide à exécuter et hautement reproductible (Prasanna and Panda, 1997). C'est pourquoi, nous avons décidé de l'utiliser pour transformer des spores de *P. chrysosporium* BKM et RP78. Cependant, suite à la phase de régénération aucun transformant n'est apparu.

4. Adaptation d'une méthode de transformation utilisée chez les plantes : la biolistique :

A ses débuts, cette méthode fut développée afin de délivrer de l'ADN exogène à travers les parois des cellules végétales et induire son expression au sein de la plante (Sanford et al., 1987). Suite à cela, elle fut rapidement adaptée avec succès à d'autres organismes et en particulier aux champignons, puisqu'elle permet de façon simple de cibler des cellules sans traitement particulier et ne nécessite pas la formation au préalable de protoplastes (Armaleo et al., 1990; Davidson et al., 2000; Ruiz-Díez, 2002). De plus, il a été montré que le taux de transformation est plus important que celui de la méthode protoplaste/PEG chez des espèces tels que : *Paecilomyces fumosoroseus*, *Trichoderma harzanium* ou *Gliocladium virens* (Barreto et al., 1997; Lorito et al., 1993). Cette méthode a donc été testée sur *P. chrysosporium*. Les différentes tentatives réalisées avaient pour but d'introduire la GFP et une fusion SSP1-GFP afin d'identifier facilement les transformants par microscopie à fluorescence et déterminer la localisation cellulaire de SSP1. Des transformants ont pu être obtenus après régénération et sélection sur hygromycine pour les 2 constructions, cependant l'émission de fluorescence GFP n'a pu être détectée que pour les transformants exprimant la GFP seule (Figure 61).

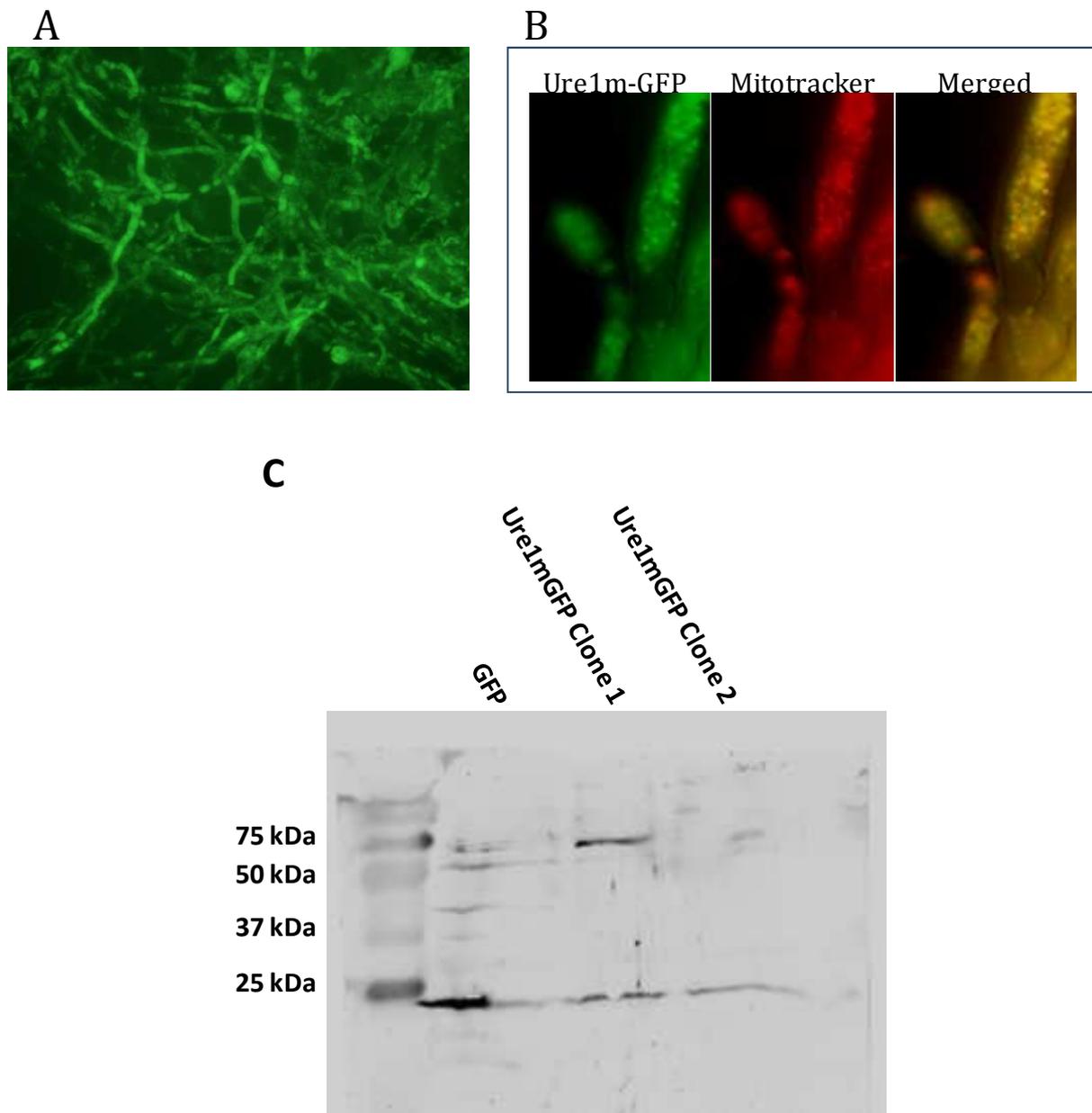


Figure 62 : Visualisation de la fluorescence de la GFP pour les constructions GFP seule (A) et Ure1m-GFP (B) introduites chez *P. chrysosporium* BKM par lipotransfection.

Confirmation de l'expression de la protéine Ure1mGFP par Western-Blot (C). Le marquage des mitochondries a été réalisé en utilisant le mitotracker et la fluorescence a été visualisée au microscope à épifluorescence. La détection des protéines a été réalisée sur des échantillons de 30 µg à l'aide d'un anticorps anti-GFP.

5. La lipotransfection une nouvelle méthode de transformation génétique pour les champignons :

La lipotransfection est une méthode de transformation génétique permettant l'introduction d'ADN exogène au sein d'une cellule via la formation au préalable d'un complexe lipide-cationique/ADN. Elle est principalement utilisée pour l'insertion d'ADN exogène chez les mammifères et son succès repose sur l'intégration de l'ADN dans une structure lipidique, sur l'adhésion de ce complexe à la membrane cellulaire, sur l'internalisation par endocytose qui doit être suivie de la déstabilisation de la membrane endocytotique ou endosomale par le lipoplexe, sur la libération par dissociation de l'ADN et enfin de son transport dans le noyau (Duzgunes et al., 2003; Ewert et al., 2010). L'utilisation de cette technique chez les champignons requiert une fragilisation de la paroi afin que le complexe ADN/lipide puisse adhérer et être internalisé dans la cellule. La paroi étant très peu sensible à la digestion enzymatique, la fragilisation de cette dernière a été effectuée mécaniquement par broyage du mycélium. Plusieurs constructions ont été testées exprimant : la GFP seule, une fusion Ure1m-GFP (correspondant à un gène codant une glutathion transférase prédite comme étant localisée à la mitochondrie), SSP1 pleine longueur, une fusion SSP1-GFP et une fusion SSP1 tronquée-GFP. Après plusieurs étapes de sélection, uniquement deux types de mutants ont permis la visualisation de la GFP en microscopie à fluorescence : mutant contenant le plasmide codant pour la GFP seule et un mutant exprimant la fusion Ure1m-GFP (Figure 62). L'expression de la fusion Ure1m-GFP a pu être confirmée par Western-Blot. En revanche, la fluorescence correspondant aux fusions SSP1-GFP et SSP1 tronquée-GFP n'a pas pu être détectée. Les Western Blot permettant de révéler la surexpression de SSP1 seule ou fusionnée à la GFP dans ces souches sont actuellement en cours.

*Etude de l'expression précoce des gènes de *P. chrysosporium* en contact avec des extractibles de chêne*

Lors de la dégradation du bois, une importante quantité de molécules toxiques sont libérées : les extractibles. Ces composés organiques sont de nature chimique variable et peuvent avoir un effet toxique pour les cellules fongiques. En effet, certaines molécules impactent la croissance fongique par divers procédés tels que la modification de la balance homéostatique en perméabilisant les parois et les membranes ou l'inhibition des enzymes de dégradation (Valette et al 2017). *P. chrysosporium* doit donc faire face à un environnement hostile lors du processus de dégradation. Pour comprendre quels mécanismes sont impliqués dans cette résistance, une approche transcriptomique a été réalisée pour analyser l'expression des gènes en présence d'extractibles à des temps précoces (1h, 3h et 6h). Les résultats montrent l'induction de gènes du système de détoxification en 3 phases : la phase I permet la modification des extractibles par oxydation, hydroxylation ou peroxydation, la phase II dite de conjugaison a pour but de solubiliser, dégrader ou de stocker ces molécules par ajout de groupement sulfate, glycosyl ou molécule de glutathion puis il s'en suit la phase III qui concerne l'excrétion et le stockage des molécules (Aranda et al 2016). Dans ce cadre, une nouvelle glutathion transférase a été identifiée et caractérisée. Les données biochimiques montrent qu'il existe une interaction physique entre cette protéine et les extractibles de chêne. Tous ces résultats sont présentés sous forme d'un article scientifique :

The early responses of *Phanerochaete chrysosporium* to oak extractives reveal the involvement of new detoxification enzymes

Antonio José Fernández-González^{1,2}, Nicolas Valette^{1,2}, Annegret Kohler^{1,2}, Rodnay Sormani^{1,2}, Eric Gelhaye^{1,2} and Mélanie Morel-Rouhier^{1,2,§}.

¹Université de Lorraine, UMR1136 INRA-Université de Lorraine "Interactions Arbres/Micro-organismes", Faculté des Sciences et Technologies BP 70239, F-54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

²INRA, UMR1136 INRA-Université de Lorraine "Interactions Arbres/Micro-organismes", Faculté des Sciences et Technologies BP 70239, F-54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

§Corresponding author: Mélanie Morel-Rouhier, Université de Lorraine, UMR1136 INRA-Université de Lorraine "Interactions Arbres/Micro-organismes", Faculté des Sciences et Technologies BP 70239, F-54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France. Melanie.Morel@univ-lorraine.fr, phone: +33 3 72 74 51 60.

Introduction

Wood is mainly composed of polysaccharides (cellulose and hemicelluloses) and lignin. A smaller part called extractives, contains organic molecules which represent approximately 5 to 10 % of wood (Pettersen et al 1984). They include a variety of chemical compounds like waxes, alkaloids, phenols, polyphenols, terpenes, and resins (Telmo et al 2011). These extractives play a major role in wood durability preventing biotic and abiotic attacks. The antifungal effects of such molecules have been described (Valette et al., 2017). Extractives can inhibit the extracellular enzymatic system that lignolytic fungi have developed to use wood as carbon source. In particular, they can physically bind onto carbohydrate-degrading enzymes or scavenge metals and free radical that are needed for the process of wood decomposition. The toxicity of these molecules can also be due to disruption of membrane integrity and perturbation of ionic homeostasis. A number of transcriptome analyses concerned the gene expression pattern of lignolytic fungi during wood degradation (Sato et al. 2009, Wymelenberg et al. 2009, 2010 and 2011, Gaskell et al. 2014, Skyba et al. 2016, Korripally et al. 2015, Wang et al. 2016).

A

Prot ID	T1vsT0	Annotation
7087*	4.66	Glycoside hydrolase GH13
2989503	4.39	4-coumarate--CoA ligase
2990416*	4.21	SSP
2988631	4.05	Unknown
3006107	3.65	Aldo/keto reductase
2905476	3.57	Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase
2336174	3.57	Unknown
11055	3.53	Aldo/keto reductase
2990396	3.24	Unknown
3029206	3.23	Glucose oxidase
2908585	3.22	Aldehyde dehydrogenase
2956261	3.13	Aldo/keto reductase
3006969	3.08	Unknown
5858*	3.06	SSP
2980008*	2.99	Cytochrome P450 CYP2
2909718	2.99	Cytochrome P450
3026055	2.86	Purine-cytosine permease
2971090*	2.84	Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase
2905657	2.80	Cytochrome P450
2827689	2.73	Unknown
2984191*	2.61	Unknown

B

Prot ID	T3vsT0	Annotation
3023196	4.73	Cytochrome P450 CYP2
3030138*	3.96	Hydrophobin
3027085*	3.36	Hydrophobin
2969986	3.34	Alcohol dehydrogenase
2899951	3.25	Cytochrome P450 CYP2
2989503	3.24	4-coumarate--CoA ligase
2711029	3.10	Unknown
2977571*	3.07	SSP
3031832	3.06	Rhodopsin-like
3036104	2.95	Chaperone (DnaJ)
3027217	2.95	Zinc finger, MYND-type
1605199*	2.94	SSP
3029302	2.89	Ricin B-related lectin
3032302	2.87	Zinc finger, MYND-type
2977526	2.80	Unknown
2988631	2.76	Unknown
2956261	2.74	Aldo/keto reductase
1604548	2.73	C-type lectin fold
2971090*	2.70	Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase
2932699	2.67	Glutathione transferase
2975220*	2.66	Unknown

C

Prot ID	T6vsT0	Annotation
3023196	4.54	Cytochrome P450 CYP2
2711029	3.07	Unknown
2899951	3.03	Cytochrome P450 CYP2
3027085*	3.03	Hydrophobin
2956261	3.01	Aldo/keto reductase
2966528	2.97	HSP20-like chaperone
2969986	2.97	Alcohol dehydrogenase
2989503	2.94	4-coumarate--CoA ligase
2932699	2.86	Glutathione transferase
2977526	2.84	Unknown
2978558*	2.80	Hydrolase
3031832	2.78	Rhodopsin-like
2484321	2.74	Sulfate adenyltransferase
3036104	2.70	Chaperone (DnaJ)
2968520	2.68	Hydrolase
3032302	2.68	Zinc finger, MYND-type
2913961*	2.67	SSP
2728512*	2.63	Unknown
2981684	2.63	Rhodopsin-like
2900871	2.59	Enolase
3029302	2.59	Ricin B-related lectin

Table 1: Lists of the 25 most up-regulated genes after 1h (A), 3h (B) and 6h (C) of oak extractive treatment with a p value<0.01. The Prot ID are those retrieved from JGI *Phanerochaete chrysosporium* genome v2.2. The log2 fold changes are reported and the annotation is a consensus based on InterPro, KOG, GO, KEGG, SwissProt and Non-redundant protein sequences (nr) (see Supplemental Table S1 for more details). The predicted secreted proteins are labelled with an asterisk. SSP: Small Secreted Proteins. The colors highlight the genes which share an induction profile in the other conditions (blue: genes induced at T1 and T3; Green: genes induced at T3 and T6 and purple: genes induced in the 3 conditions).

However, the process of wood degradation concerns both the degradative mechanisms and the detoxifying systems to cope with extractive toxicity. A previous study analyzing global gene expression of *P. chrysosporium* in presence of oak extractive for 24h, revealed that in complement to the extracellular machinery of degradation, intracellular antioxidant and detoxification systems contribute to the lignolytic capabilities of fungi, presumably by preventing cellular damages and maintaining fungal health (Thuillier et al., 2014). This detoxification system is composed of enzyme families that are extended in wood-decaying fungi, and are called xenome (Morel et al. 2013). The efficiency of biomass degradation by lignolytic fungi is thus closely dependent both on the efficiency of the enzymatic system of degradation but also on its capacity to cope with extractive toxicity. Accordingly, a phylogenomic analysis clearly showed that among the gene families that appear to be evolutionarily correlated with the powerful mode of plant cell wall decay in which lignin and carbohydrates are both degraded i.e. white rot, the identified families encode well characterized decay enzymes (class II peroxidases and cellobiohydrolases) but also enzymes involved in import and detoxification pathways (Nagy et al., 2016). These results showed the complexity of the degradative process and suggest that its evolution has involved a general elaboration of the decay apparatus, including numerous gene families related to detoxification but also with as-yet unknown exact functions (Nagy et al., 2016). In this study, we have analyzed the responses of *P. chrysosporium* after short exposure to oak extractives to access the very early mechanisms allowing the fungus to bypass the toxicity of these molecules to ensure growth and efficient wood degradation.

Results and discussion

1-Global RNA-Seq analysis

A global gene expression analysis was carried out in *P. chrysosporium* after 1, 3 and 6 hours of oak extractives treatment. The results show that 1020 genes are significantly up-regulated (p -value <0.05 and \log_2 fold-change >1) at least at one time-point of the kinetic. 162 genes are up-regulated in the 3 conditions compared to the control. The 25 most up-regulated genes for each condition are presented in Table 1.

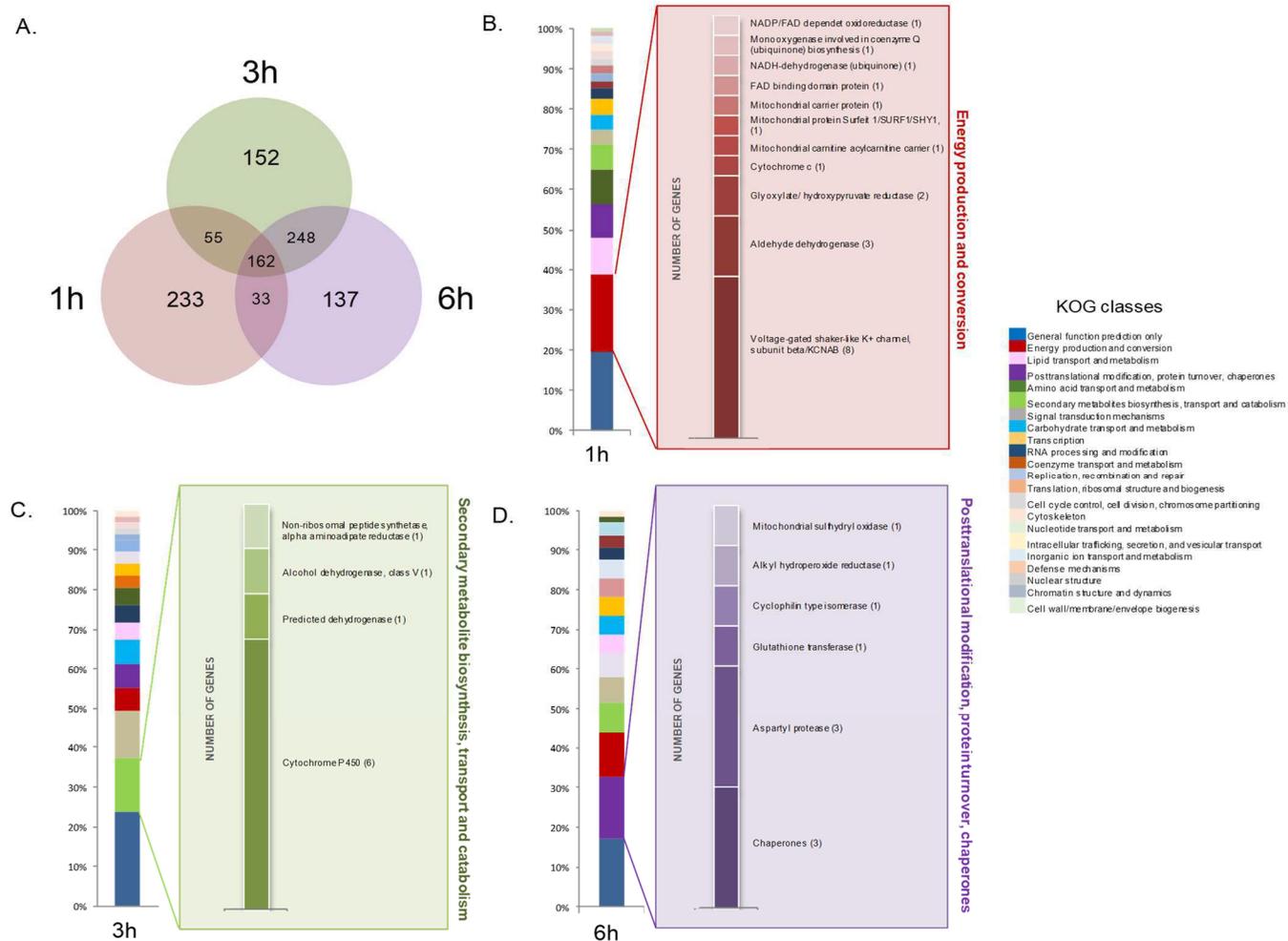


Figure 1: KOG classes of the most up-regulated genes at 1h, 3h and 6h of oak extractives treatment. A.

Venn diagram showing the number of genes specifically induced in the 3 time points of the kinetic in presence of extractives compared to the control, such as genes showing a shared up-regulation profile. B. Proportion of the different KOG classes of the genes that are specifically induced at 1h. A focus is made on the most abundant class showing gene annotation and number of genes in brackets. C. Proportion of the different KOG classes of the genes that are specifically induced at 3h. D. Proportion of the different KOG classes of the genes that are specifically induced at 6h.

Globally, the genes listed in this table mainly code for proteins involved in detoxification/degradation pathways (Cytochrome P450, dioxygenase, glutathione transferase and reductases), in cell surface protection with the up-regulation of genes coding for hydrophobins, and sugar degradation (glycoside hydrolase, carbohydrate binding module protein CBM13 and lectin). This analysis reveals that the time course can be split into 2 steps: a very early response after 1h of extractives treatment and a second one after 3h and 6h since numerous of the most up-regulated genes are shared by both conditions.

Considering all the 1020 up-regulated genes, 233 genes have been identified as being specifically induced after 1h, 152 genes after 3h and 137 genes after 6h of extractives treatment (Fig 1A). ProtID (from the JGI database), putative functional annotations and expression details are given in Supplementary Table S1. Around 48% and 73% of the up-regulated genes remained not annotated in KOG and KEGG databases, respectively. Considering the annotated genes based on KOG annotation, it seems that the very early response of *P. chrysosporium* to oak extractives is related to “energy production and conversion” in particular genes coding for ion channels and mitochondrial proteins (Fig 1B). Since oak extractives include some chaotropic molecules that reduce energy generation and unbalance the redox state of the fungal cells (Valette et al., 2017), it seems that the earliest genetic response of *P.chrysosporium* to extractives is devoted to cope with these inhibitory effects. After 3h, genes specifically induced mainly code for proteins of the secondary metabolite biosynthesis, transport and catabolism and in particular cytochrome P450, dehydrogenases and a reductase involved in the first step of the detoxification pathways (Fig 1C). The specific response after 6h of treatment is related to the cellular stress response with the induction of a gene coding for a glutathione transferase, related to the second step of detoxification, and genes coding for chaperones and oxidative stress related proteins such as hydroperoxide reductases (Fig 1D). Genes belonging to the general function prediction are not described here since they have been grouped together because they cannot be classified in other defined KOG classes. It is noticeable that 248 genes are up-regulated after both 3h and 6h of treatment. They fall in the “Posttranslational modification, protein turnover, chaperones” group and the predominant functions belong to chaperones and glutathione transferases.

Prot ID	log2fold T1vsT0	log2Fold T3vsT0	log2Fold T6vsT0	Putative annotation
2913961	1.75	1.54	2.67	Ribonuclease
3030138	1.93	3.96	2.20	Hydrophobin
2977571	1.64	3.07	1.95	
3029137	2.01	2.08	1.41	
3027085	1.74	3.36	3.03	Hydrophobin
2981015	1.91	1.26	1.59	Thaumatococcus
2990416	4.21	1.50	-	
5858	3.06	1.35	-	
2463459	1.06	1.46	-	
1681402	2.42	1.93	-	
2978936	1.53	1.14	-	Chloroperoxidase
3005609	-	1.36	1.93	
2903128	-	1.24	1.28	
2623086	-	1.14	1.32	
2988893	-	1.47	1.74	
3023986	-	2.24	2.00	
2985535	-	1.54	1.62	
1605199	-	2.94	1.75	
2987747	-	1.85	1.56	
2990420	2.30	-	-	
2990395	1.63	-	-	
2983584	1.97	-	-	
3018571	1.89	-	-	
2980813	1.00	-	-	
2882851	1.51	-	-	
2963666	1.44	-	-	Small GTP-binding protein
2978067	2.06	-	-	Chorismate mutase
2900268	1.26	-	-	

Table 2: List of SSP genes that are significantly up-regulated in response to oak extractives.

The ProtID are from the *P. chrysosporium* genome v2.2 of the Joint Genome Institute. The log2 fold changes are reported for the 3 time points of the kinetic. A dash means value < 0.01) and thus has not been reported. A putative annotation based both on Ipr and SwissProt is reported that the value is not significant (p -value < 0.01) and thus has not been reported.

2-The extracellular detoxification system

Being a white-rot fungus, *P. chrysosporium* is able to secrete Class II peroxidases for extracellular degradation of lignin and aromatic compounds. *P. chrysosporium* possesses in its genome 10 and 5 genes coding respectively for lignin peroxidases and manganese peroxidases. Interestingly, while we have previously shown that some of these genes were induced after 24h of oak extractives treatment (Thuillier et al., 2014), it seems that they are not involved in the early response of the fungus to these compounds since none of them are regulated in this study. Rather, we have highlighted the induction of 43 SSP (Small Secreted Proteins) (Table 2). SSP have been defined as proteins of less than 300 amino acids and possessing a signal peptide of secretion and at least 4 cysteines in their sequences. Except for hydrophobins that are well annotated, the other genes code for proteins with unknown function. These proteins named effectors in pathogenic or symbiotic systems are still poorly studied in saprophytic fungi. We have previously shown that similarly to the degradative enzymatic system, the secretion of SSPs in *Aspergilli* is fungal species dependent (Valette et al., 2016). Our hypothesis is that these proteins could participate in plant biomass degradation, with a similar process as described for some hydrophobins or HsbA, which could recruit enzymes at the surface of the substrate or directly interact with the degradative enzymes to increase their activity.

3-The intracellular detoxification system

Cytochrome P450

The most common pathway for degradation of a toxic molecule within the cells is the so-called 3 step detoxification pathway. It consists in a first step of activation of the molecule by oxidation due to the activity of enzymes as cytochrome P450, monooxygenases or dioxygenases; a second step of conjugation performed by glutathione transferases and glycosyltransferases, and a last step of secretion of the modified molecule or its sequestration within the vacuole. 27 CYP genes are induced at least in one time-point of the kinetic, and 6 are induced in the 3 conditions (Table 3).

Prot ID	log2fold T1vsT0	log2Fold T3vsT0	log2Fold T6vsT0	CYP name	Substrate
2980008	2.99	1.55	1.30	CYP5037B3	7-ethoxycoumarin
2951702	1.93	1.34	1.35	CYP5037	
3023196	1.92	4.73	4.54	CYP5145A1	
2976129	1.75	1.62	1.26	CYP5144C3	
3034633	1.23	1.28	1.59	CYP512D1	
2692082	1.09	1.10	1.29	CYP5144B1	
3086734	1.80	1.13	-	CYP512J1	
2925643	1.07	1.10	-	CYP5150B1	Dehydroabietic acid, flavone, diclofenac
3022655	-	1.64	1.09	CYP5144C2	
2899951	-	3.25	3.03	CYP5145A2	
5054	-	1.51	1.32	CYP5144A13	Carbazole, dibenzothiophene
2902416	-	1.40	1.24	CYP5141C1	Testosterone, progesterone, carbazole, naphtalene, 7-ethoxycoumarin, dehydroabietic acid, flavone, naproxen
2914282	-	1.28	1.11	CYP5137A2	
2919343	-	1.83	1.54	CYP5142C1	
2909718	2.99	-	-	CYP5035A2	Naproxen
2905657	2.80	-	-	CYP5035A5	Flavone
2928469	1.34	-	-	CYP5142A2	Flavone
137435	1.27	-	-	CYP505D3	
3022677	-	1.81	-	CYP5144A11	
2910204	-	1.44	-	CYP5136A2	
139141	-	1.03	-	CYP63A1	
3023652	-	1.07	-	CYP63A2	Pyrene, fluoranthene, benzo(a)pyrene, benzo(ghi)perylene, alkylphenols and n-alkanes
3029010	-	1.72	-	CYP5136A3	Testosterone, progesterone, carbazole, dibenzofuran, fluorene, dibenzithiophene, naphtalene, 7-ethoxycoumarin, ethoxybenzoic acid, compactin, alkylphenols

Table 3: List of CYP450 genes that are significantly up-regulated in response to oak extractives.

The ProtID are from the *P. chrysosporium* genome v2.2 of the Joint Genome Institute. The log2 fold changes are reported for the 3 time points of the kinetic. A dash means that the value is not significant (p -value<0.01) and thus has not been reported. The substrates of some CYP450 have been reported based on previous functional analyses (Hiroshue et al; Syed et al., 2011).

Only few of these CYPs have been functionally characterized. CYP63A1 and CYP63A2 genes, which show a weak induction after 3h of oak treatment, have been previously shown to be induced by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) of varying ring size, including naphthalene, phenanthrene, pyrene, benzo(a)anthracene and benzo(a)pyrene. Both proteins, such as CYP5136A3, which shows the same expression profile in our study, possess an oxidizing capability toward structurally diverse hydrocarbons belonging to mutagenic/carcinogenic fused-ring higher-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons, endocrine-disrupting long-chain alkylphenols, and crude oil aliphatic hydrocarbon *n*-alkanes (Doddapaneni et al., 2005; Doddapaneni and Yadav, 2004; Bhattacharya et al., 2013; Syed et al., 2011; Syed et al., 2013a; Syed et al., 2013b). Some other substrates including steroids, petrochemicals, pharmacochemicals and plant-related compounds have been identified for some of the CYP members, which gene expression induced by oak treatment (Table 3) (Hirosue et al., 2011). This broad oxidizing capability toward structurally diverse molecules suggests a putative involvement of these enzymes in oak extractives degradation.

Dioxygenases

The dioxygenase family groups enzymes that incorporate dioxygen into a substrate using various cofactors. They have been classified mainly based on the way that they use dioxygen and their substrate specificity (Wang et al 2017). The most widely involved cofactor in deoxygenation reactions is iron, but in some cases copper can also be used, as described for quercetin 2,3 dioxygenases, enzyme that catalyze the dioxygenolytic cleavage of quercetin (Schaab et al., 2006). These enzymes have been described in *Bacillus* sp and *Aspergillus* sp (Bug et al 2003, Barney et al 2004). Since quercetin is present in oak extractives, we have check the expression of quercetin 2, 3 dioxygenases in *P. chrysosporium*, however no homologue has been found within its genome (Hofmann et al 2014). Using both Blastp tool (ProtID 2922705) and keyword search (“dioxygenase”) within the InterPro annotation, we have identified 52 genes coding for putative dioxygenases within the genome of *P. chrysosporium*.

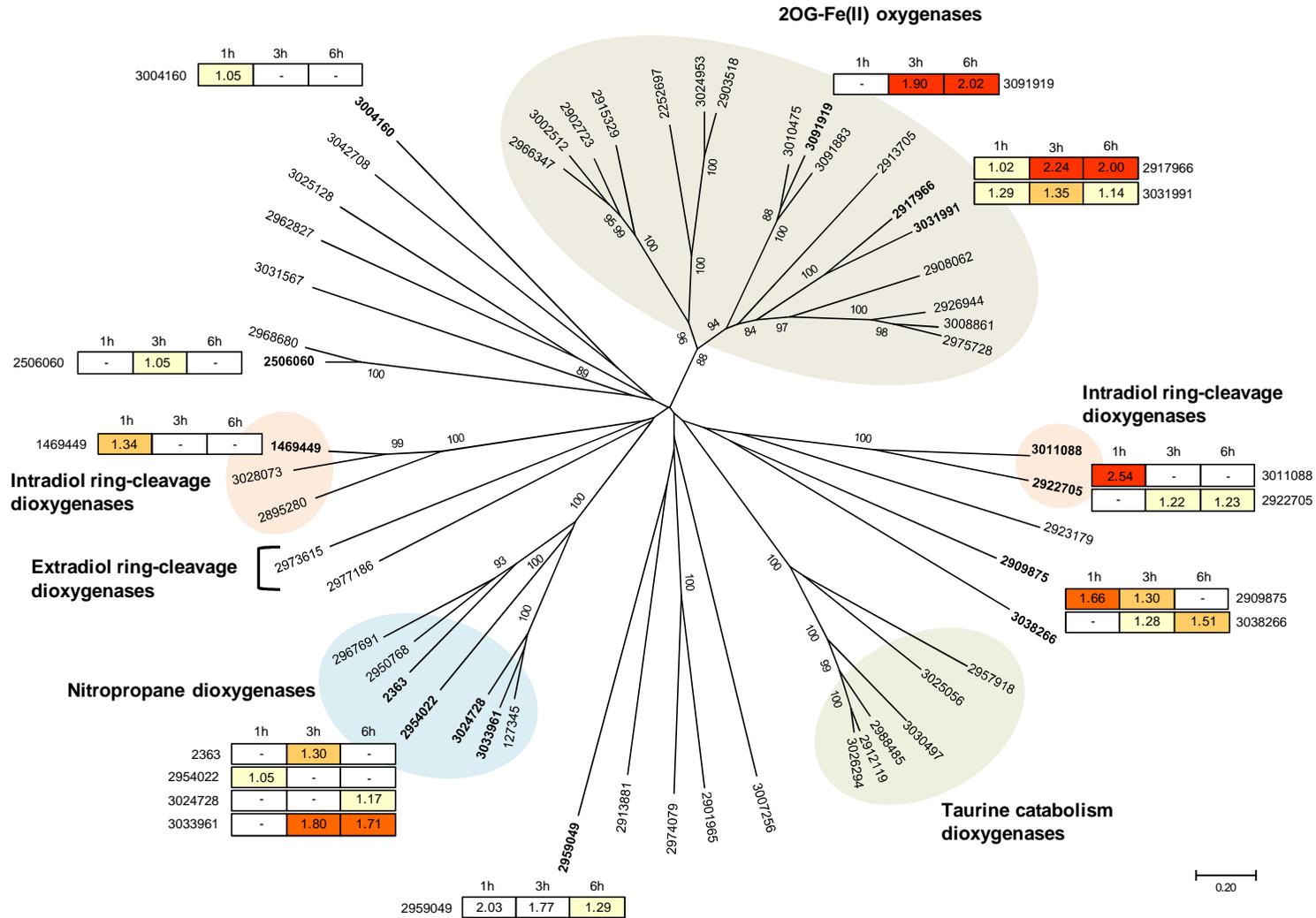


Figure 2: Neighbor-Joining method tree of 52 dioxygenase coding sequences of *P. chrysosporium*. The evolutionary distances were computed using the Poisson correction method and are in the units of the number of amino acid substitutions per site. All ambiguous positions were removed for each sequence pair. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7. The ProtID from the Joint Genome Database such as the significant fold change values are reported. A dash means that the gene is not induced or the value is not statistically significant

The variability among this family is very high and a phylogenetic analysis allows us to distinguish various clusters based on sequence homology and functional annotation: one corresponding to the 2-oxoglutarate (2OG)-dependent dioxygenases (2OG-Fe(II) oxygenase), some intra- and extradiol ring cleavage dioxygenases, taurine catabolism dioxygenases and nitropropane dioxygenases (Fig. 2). Among these 52 genes, 15 are up-regulated at least at one time-point of the kinetic with oak extractives. The most up-regulated genes belong to the nitropropane dioxygenases (ProtID 3033961), the intradiol ring-cleavage dioxygenases (ProtID 3011088) and the 2OG-Fe(II) oxygenases (ProtID 3091919 and 2917966). This suggests a putative involvement of these enzymes in extractives detoxification. This is in accordance with the results obtained by the characterization of a homogentisate 1, 2-dioxygenase in *Phanerochaete sordida*, showing that it has both a role in holocellulose degradation and in the metabolism of low molecular weight lignin fragments during wood degradation (Mori et al. 2016).

Glutathione transferases

The molecules that have been activated by the oxygenases described above can then be conjugated to glutathione by glutathione transferases (GST) to increase their solubility and favor their elimination. In lignolytic fungi, the extension of this family of enzymes has been attributed to the need of these microorganisms to cope with various putative toxic molecules and in particular wood extractives (Thuillier et al 2011). Among the 37 GST coding genes in *P. chrysosporium*, 5 are induced in our conditions (Table 4). We have previously characterized 3 of them at a functional level: PcGSTFuA2 belongs to a class that is fungal specific and which has the particularity to have ligandin properties with wood molecules (Mathieu et al., 2013). PcGTO4 is particular in that it is able to remove glutathione from a conjugate thanks to a catalytic cysteine. By screening putative ligands within beech extracts, we have previously shown that it could interact with terpenes (Meux et al., 2013). PcUre2pA5 belongs to the extended Ure2p class that exhibits glutathionylation activity (Roret et al., 2015). Moreover, the gene was found upregulated in a previous study, in relation with lignolytic conditions (Korripally et al., 2015). Interestingly, the most up-regulated GST gene in this study codes for an isoform that has never been detected before (PcGST293). It is even part of the 25 most up-regulated genes of *P. chrysosporium* after both 3 and 6 h of oak treatment (Table 1).

Annotation	Prot ID	log2Fold T1vsT0	log2Fold T3vsT0	log2Fold T6vsT0
GST293	2932699	-	2.67	2.86
GSTFuA2	2687275	-	1.09	1.17
Ure2pA5	2978588	-	1.34	-
MAPEG	3027623	-	1.30	-
GSTO4	2971108	-	-	1.18

Table 4: List of GST genes that are significantly up-regulated in response to oak extractives. The ProtID are from the *P. chrysosporium* genome v2.2 of the Joint Genome Institute. The log2 fold changes are reported for the 3 time points of the kinetic. A dash means that the value is not significant (p -value<0.01) and thus has not been reported. The annotation is based on previous phylogenetic and functional analyses (Morel et al., 2009; Mathieu et al., 2013, Meux et al, Roret et al).

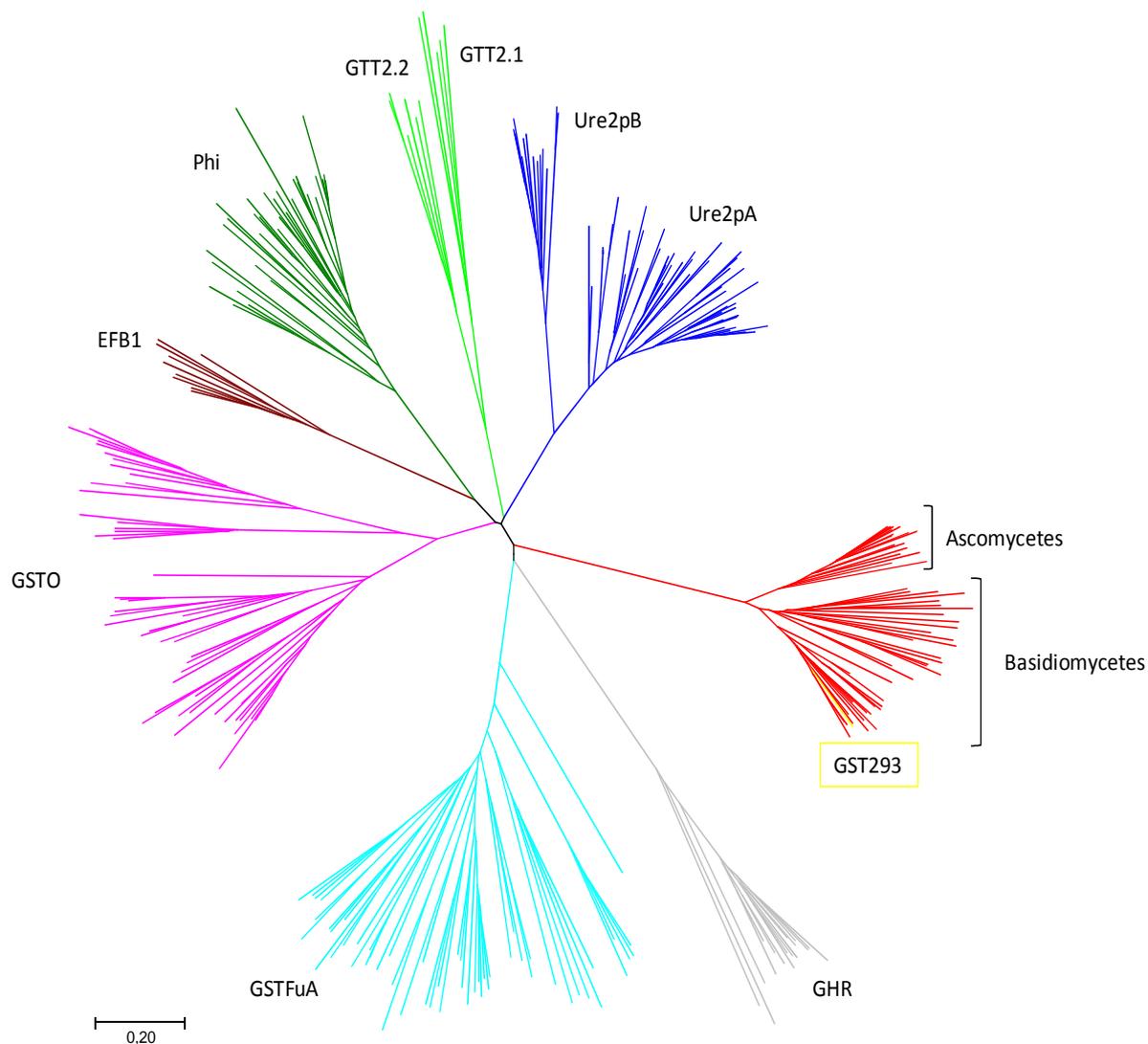


Figure 3: Phylogenetic analysis of fungal GSTs.

Neighbor-Joining method was used. The evolutionary distances were computed using the Poisson correction method and are in the units of the number of amino acid substitutions per site. All ambiguous positions were removed for each sequence pair. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7. Sequences were retrieved from *P. chrysosporium*, *Agaricus bisporus*, *Coprinus cinerea*, *Gloephylum trabeum*, *Heterobasidion annosum*, *Laccaria bicolor*, *P. carnosa*, and *Trametes versicolor*. For the new class, some close homologues have been retrieved both in ascomycetes and basidiomycetes species.

A phylogenetic analysis mainly based on basidiomycete sequences revealed that it doesn't fall into the main classes that have been previously described (Morel et al., 2009; Morel et al., 2013) (Fig. 3). Some ascomycete orthologues of this isoform, retrieved by Blast onto some ascomycete genomes available at the JGI, have been added in the tree. Interestingly, the sequences cluster according to the taxonomy of the fungi for this new GST class, suggesting an early differentiation of this isoform during fungal evolution. Excluding fungi in the Blast search, the closest isoforms have been found in some bacteria. The best hits are sequences from *Halomonas anticariensis*, *Noviherbaspirillum massiliense*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella ansorpilii* (Fig. 4). These bacteria have all been found in metabarcoding analysis of oak wood (Mieskin, personal communication), supporting a putative role related to extractive detoxification.

4- Interaction of GST293 with wood extractives

The recombinant GST293 has been produced in *E. coli* and purified. The enzymatic activities of GST293 have been measured using the classical substrates for measuring GST activity. GST293 displays glutathionylation activity against CDNB, but no peroxidase activity with H₂O₂ tertbutyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide, nor deglutathionylation activity using HED as substrate. The catalytic parameters show a GSH transferring activity onto CDNB with a kcat of 266.3 min⁻¹. Moreover, it has good affinities for CDNB (km=400µM) and GSH (km=235µM). A deeper insight in the interaction between GST293 and oak wood extractives was performed by CDNB glutathionylation's interference. An inhibitory effect on the GST293 activity was found in presence of 100 µg/ml of oak wood extractives in the reaction mix. In fact, the activity was reduced in an 89% but, there also was a high absorbance signal at 340 nm due to aromatic compounds contained in the extractives (data not shown). Therefore, a HPLC fractioning of the oak wood extractives was performed and the 34 fractions corresponding to picks in the profile were tested in the same way. None of the fractions showed a significant signal at 340 nm by themselves but, 25 out of 34 showed a statistically significant reduction in CDNB glutathionylation activity of GST293, 4 of which had less than 12% of the activity being the fraction 10 (F10) the most effective with only a 9.84% (Fig. 5A).

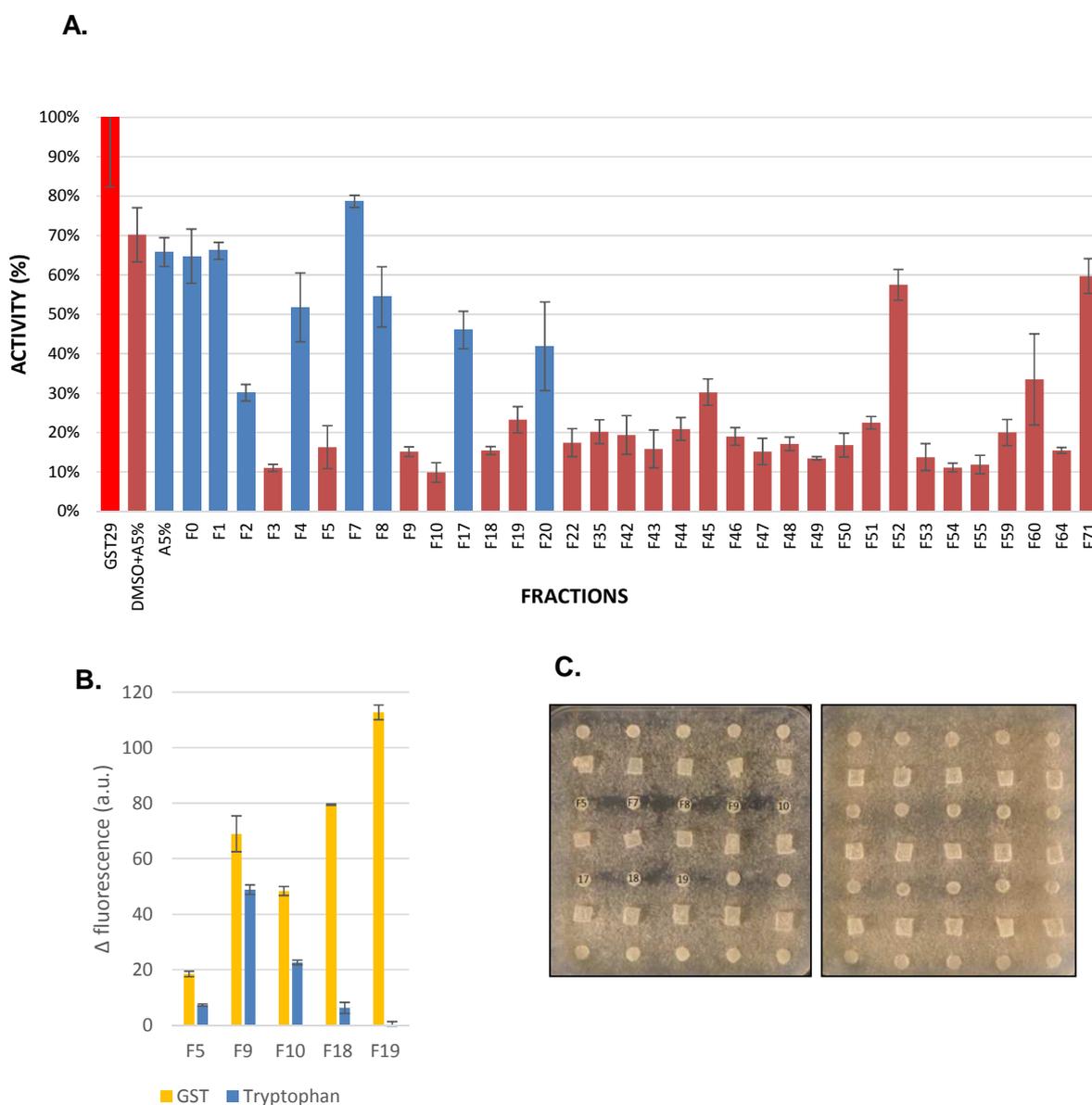


Figure 5: Effect of oak extractive fractions onto GST293 activity and *P. chrysosporium* growth.

A Percentage of remaining activity of GST293 in presence of the various fractions. Red bars represent fractions that have been dissolved in DMSO/acetone and blue bars represent fractions dissolved in acetone alone. B. Decrease of tryptophan fluorescence measured for GST293 in presence of some of the fractions compared to the control (yellow bars). The quenching effect of the molecules has been tested by measuring the decrease of fluorescence of the pure amino acid tryptophan (blue bars). C. The effect of these fractions on fungal growth was visualized after 5 days of growth in minimal medium in presence of 10 μ l of each wood extractives fraction loaded on small patches of Whatman paper. A growth inhibitory effect was observed for 8 fractions (F5, F7, F8, F9, F10, F17, F18 and F19).

This suggests that either the molecules present in these fractions are putative GST substrates or inversely they are inhibitors by binding onto the protein and thus could prevent its activity, as it was already demonstrated for GST with ligandin properties (Mathieu et al., 2013). The interaction between GST and some of the fractions has been confirmed by comparing the modification of the intrinsic fluorescence of GST293 due to the presence of a tryptophan residue close to the active site. It was compared with the decrease in fluorescence obtained in pure tryptophan by the resultant quenching effect of the presence of these compounds in the sample (Fig. 5B). We have focused on these fractions because they are part of the ones that are able to inhibit fungal growth, highlighting the toxicity of these molecules for fungal cells (Supplementary Video and Fig. 5C).

Conclusion

The early response of *P. chrysosporium* to extractive toxicity is related to cellular stress rescue and detoxification processes within the cell rather than extracellular degradation of the compounds. The paradigm of the intracellular detoxification mechanism has been commonly accepted as having 3 phases: phase I related to oxidation of toxic molecules, phase II related to conjugation of the oxidized intermediates obtained in the previous phase and phase III related to the excretion or storage of the utterly less toxic products. Nevertheless, it has never been experimentally demonstrated the timeline of this complex mechanism in *P. chrysosporium*. For the first time, in this study we demonstrate that there is a delay between the genes related to phase II in comparison with genes related to phase I. These conditions allowed also highlighting the involvement of a GST from a class that has never been described before. These new data could give some new clues for developing new methods to avoid fungal invasion of wood material.

Experimental Procedures

Oak acetonetic extract preparation and culture conditions

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 performed with high-performance liquid chromatography (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) to a final concentration of 200 mg/ml. *Phanerochaete chrysosporium* homocaryon RP78 was maintained in malt agar medium. Fungal plugs were used to inoculate liquid minimal medium containing 5 mM sodium acetate pH 4.5, 1% glucose, 1 mM ammonium tartrate, 1% (vol/vol) base medium (20 g liter⁻¹ KH₂PO₄, 5 g liter⁻¹ MgSO₄, 1 g liter⁻¹ CaCl₂), 7% (vol/vol) trace medium [1.5 g liter⁻¹ nitrilotriacetate, 3 g liter⁻¹ MgSO₄, 1 g liter⁻¹ NaCl, 0.1 g liter⁻¹ FeSO₄ · 7H₂O, 0.1 g liter⁻¹ CoCl₂, 0.1 g liter⁻¹ ZnSO₄ · 7H₂O, 0.1 g liter⁻¹ CuSO₄, 10 mg liter⁻¹ AlK(SO₄) · 12H₂O, 10 mg liter⁻¹ H₃BO₃, 10 mg liter⁻¹ NaMoO₄ · 2H₂O], and 225 μM MnCl₂ (Tien and Kirk, 1988). Static culturing in 20 ml of medium was performed at 37°C for 4 days and oak extractives were then added at a final concentration of 100 μg/ml. The treatments were done per triplicate at 37°C for 1h (T1), 3h (T3) and 6h (T6). The mycelium was harvested, rinsed with distilled water and frozen in liquid nitrogen for further RNA extraction. For the control (T0), the treatment was done per triplicate and the mycelium was harvested immediately.

RNA extraction, RNA sequencing and data analysis

Total RNA from *P. chrysosporium* was extracted using the RNeasy PowerSoil Total RNA Kit (MoBio, Qiagen), following their standard protocol. Quantification and integrity check were conducted using an Experion Automated Electrophoresis Station (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). For each time-point three replicates were used for RNA-Seq. Preparation of libraries from total RNA (PolyA) and 2 x 125bp Illumina HiSeq2500 sequencing (RNA-Seq) was performed at IGA Technology Services (Udine, Italy) following their standard protocol. Trimmed reads were aligned to the *P. chrysosporium* reference transcripts (<http://genome.jgi.doe.gov/Phchr2/Phchr2.home.html>) using CLC Genomics Workbench 9 (http://www.clcsupport.com/clcgenomicsworkbench/900/index.php?manual=RNA_Seq_analysis.html) and as described before (Kohler et al., 2015). From the different samples 5-20 M paired reads mapped to the reference transcripts. Differentially regulated transcripts were identified by using the total read counts from CLC as input for the DESEQ2 package (Love et al., 2014, <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html>).

Transcripts with an adjusted p-value<0.05 and a log2fold-change>1 were considered as differentially regulated. The complete RNA-Seq data were submitted to NCBI GEO as GEO series XXX.

Cloning of PcGST293, heterologous expression and purification of the recombinant protein.

The open reading frame sequence encoding *P. chrysosporium* GST293 (PcGST293; JGI ProtID 2932699) was amplified from a *P. chrysosporium* cDNA library using the following forward and reverse primers: 5'CCCCCATGGCCATGTCCAAGGAAGTC3' and 5'CCCCGCGGCCGC CTG CTC GCC GTC CAG CTC3'. The sequence was cloned into the NcoI and NotI restriction sites of pET-26b (Novagen) the plasmid was introduced in the *Escherichia coli* Rosetta2 (DE3) pLysS strain (Novagen). The amplified sequence encoded a protein in which an alanine has been added to improve protein production. Culture was progressively amplified up to 2 liters in LB medium supplemented with chloramphenicol 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 then were centrifuged for 15 min at 4,400 g. The pellet was 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 times for 1 min each 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 then was 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 by 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 to 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 concentration was determined spectrophotometrically using a molar extinction coefficient at 280 nm of 27850 M⁻¹ cm⁻¹.

Activity measurements

The activity of PcGST293 was tested using the classical substrates used for GST activity measurement *in vitro*: hydroxyethyl disulfide (HED) for thiol transferase activity, dehydroascorbate (DHA) for reduction activity, phenethyl isothiocyanate (ITC) prepared in 2% (vol/vol) acetonitrile and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) prepared in ethanol for transferase activity and various peroxides (hydrogen peroxide [H₂O₂], *tert*-butyl hydroperoxide [tBOOH], and cumene hydroperoxide [CuOOH]) for peroxidase activity according to the protocols described previously (Couturier et al., 2009; Thuillier et al., 2014). The reactions were monitored at 274 nm for ITC and 340 nm for CDNB following the increase in absorbance arising from the formation of the glutathionylated adduct. The reactions with CDNB were performed in triplicate in 30 mM Tris-HCl buffer, pH 8, in the presence of glutathione (1 mM), while the reaction with ITC was performed in 100 mM phosphate buffer at pH 6.5 with an identical GSH concentration. The *K_m* value for GSH and CDNB were determined using a GSH concentration ranging from 0 to 2 mM in the presence of 2 mM of CDNB, and a CDNB concentration ranging from 0 to 4 mM in the presence of 1 mM GSH. The apparent *K_{cat}* value for CDNB was determined in the presence of 1 mM GSH using a CDNB concentration ranging from 0 to 4 mM. The reactions were started by addition of the purified enzyme and monitored with a Cary 50 UV-visible spectrophotometer (Varian). The catalytic parameters were calculated using GraphPad software. In the tests with the extractives fractions, the reactions were performed in triplicate in 30 mM Tris-HCl buffer, pH 8, GSH at 1 mM, 5 µl of fraction, GST293 at 200 nM and CDNB at 1 mM. Fractions were substituted by acetone 5% or a mix of DMSO/acetone 5% (1:1) as controls.

HPLC fractioning

The oak extractives dissolved in DMSO at 10 mg/ml were centrifuged to remove insoluble molecules and 1 ml (5 times 200 µl) was injected for HPLC fractioning on a Kinetex biphenyl (260 x 4,6 mm) column with a methanol gradient from 0 to 100% for 45 minutes. Finally, 87 fractions of 1 ml were collected and dried in Vacuum Concentrator Centrifuge (UniEquip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH, Germany) for 4 days. They were then resuspended in DMSO, acetone 5% or a mix of both solvents (1:1) depending on the solubility of the extracts.

Growth inhibition assay

34 fractions obtained from HPLC fractioning of oak extractives were tested for their inhibitory effect by cultivating *P. chrysosporium* on minimum medium (TK medium) in presence of discs of Whatman paper containing 10 µl of each fraction. DMSO, acetone 5%, or a mix of them (1:1) were also tested as negative control. Itraconazole (16 µg) was tested as positive control. To track the fungal growth, a picture was taken every 10 minutes in an incubator at 30°C for 3 days.

Fluorescence spectroscopy assay

A Varian Cary 50 Bio UV Vis spectrophotometer (Exapro) was used to analyze the interaction of GST293 with the 5 selected fractions of oak extractives. This assay is based on the decrease of fluorescence emitted by tryptophan contained in the protein (excited at 290nm and emitting at 340nm) when it is interacting with some ligands. The tests were performed in 500 µl of final volume in Tris-HCl 30 mM buffer at pH8, 2 µM of GST293 and 10 µl of each fraction. The same volume was used for negative controls with the above described solvents. CDNB and GSH were tested at 100 µM as positive controls. To test the quenching effect of the fractions, pure tryptophan was assayed alone with each fraction in the following conditions: 585 µl of Tris-HCl 30 mM buffer at pH8, tryptophan at 500 µM and 10 µl of each fraction.

Acknowledgments

This work was supported by a grant overseen by the French National Research Agency (ANR) as part of the "Investissements d'Avenir" program (ANR-11-LABX-0002-01, Lab of Excellence ARBRE) and the Region Lorraine Research Council.

REFERENCES :

- Barney, B.M., Schaab, M.R., LoBrutto, R., and Francisco, W.A. (2004). Evidence for a new metal in a known active site: purification and characterization of an iron-containing quercetin 2,3-dioxygenase from *Bacillus subtilis*. *Protein Expr. Purif.* *35*, 131–141.
- Bhattacharya, S.S., Syed, K., Shann, J., and Yadav, J.S. (2013). A novel P450-initiated biphasic process for sustainable biodegradation of benzo[a]pyrene in soil under nutrient-sufficient conditions by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Hazard. Mater.* *261*, 675–683.
- Bugg, T.D.H. (2003). Dioxygenase enzymes: catalytic mechanisms and chemical models. *Tetrahedron* *59*, 7075–7101.
- Doddapaneni, H., and Yadav, J. (2004). Differential regulation and xenobiotic induction of tandem P450 monooxygenase genes *pc-1* (CYP63A1) and *pc-2* (CYP63A2) in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *65*.
- Doddapaneni, H., Subramanian, V., and Yadav, J.S. (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 Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Curr. Microbiol.* *50*, 292–298.
- Gaskell, J., Marty, A., Mozuch, M., Kersten, P.J., Splinter BonDurant, S., Sabat, G., Azarpira, A., Ralph, J., Skyba, O., Mansfield, S.D., et al. (2014). Influence of *Populus* Genotype on Gene Expression by the Wood Decay Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* *80*, 5828–5835.
- Hirosue, S., Tazaki, M., Hiratsuka, N., Yanai, S., Kabumoto, H., Shinkyō, R., Arisawa, A., Sakaki, T., Tsunekawa, H., Johdo, O., 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.
- Hofmann, T., Nebehaj, E., Es\Ho, I., Fehér, S., Albert, L., and Stefanovits-Bányai, É. (2014). Comparative analysis of antioxidant extractives in the bark tissues of selected wood species.
- Korripally, P., Hunt, C.G., Houtman, C.J., Jones, D.C., Kitin, P.J., Cullen, D., and Hammel, K.E. (2015). Regulation of Gene Expression during the Onset of Ligninolytic Oxidation by *Phanerochaete chrysosporium* on Spruce Wood. *Appl. Environ. Microbiol.* *81*, 7802–7812.
- Mathieu, Y., Prosper, P., Favier, F., Harvengt, L., Didierjean, C., Jacquot, J.-P., Morel-Rouhier, M., and Gelhaye, E. (2013). Diversification of Fungal Specific Class A Glutathione Transferases in Saprotrophic Fungi. *PLoS ONE* *8*, e80298.
- Meux, E., Morel, M., Lamant, T., Gérardin, P., Jacquot, J.-P., Dumarçay, S., and Gelhaye, E. (2013). New substrates and activity of *Phanerochaete chrysosporium* Omega glutathione transferases. *Biochimie* *95*, 336–346.
- 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.

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.

Mori, T., Koyama, G., Kawagishi, H., and Hirai, H. (2016). Effects of Homologous Expression of 1,4-Benzoquinone Reductase and Homogentisate 1,2-Dioxygenase Genes on Wood Decay in Hyper-Lignin-Degrading Fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *Curr. Microbiol.* 73, 512–518.

Nagy, L.G., Riley, R., Bergmann, P.J., Krizsán, K., Martin, F.M., Grigoriev, I.V., Cullen, D., and Hibbett, D.S. (2016). Genetic bases of fungal white rot wood decay predicted by phylogenomic analysis of correlated gene-phenotype evolution. *Mol. Biol. Evol.* 34, 35–44.

Pettersen, R.C. (1984). *The chemical composition of wood.* (ACS Publications), p.

Roret, T., Thuillier, A., Favier, F., Gelhaye, E., Didierjean, C., and Morel-Rouhier, M. (2015). Evolutionary divergence of Ure2pA glutathione transferases in wood degrading fungi. *Fungal Genet. Biol.* 83, 103–112.

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

Schaab, M.R., Barney, B.M., and Francisco, W.A. (2006). Kinetic and Spectroscopic Studies on the Quercetin 2,3-Dioxygenase from *Bacillus subtilis* †. *Biochemistry (Mosc.)* 45, 1009–1016.

Skyba, O., Cullen, D., Douglas, C.J., and Mansfield, S.D. (2016). Gene Expression Patterns of Wood Decay Fungi *Postia placenta* and *Phanerochaete chrysosporium* Are Influenced by Wood Substrate Composition during Degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 4387–4400.

Syed, K., Porollo, A., Lam, Y.W., and Yadav, J.S. (2011). A Fungal P450 (CYP5136A3) Capable of Oxidizing Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Endocrine Disrupting Alkylphenols: Role of Trp129 and Leu324. *PLoS ONE* 6, e28286.

Syed, K., Porollo, A., Lam, Y.W., Grimmett, P.E., and Yadav, J.S. (2013a). CYP63A2, a Catalytically Versatile Fungal P450 Monooxygenase Capable of Oxidizing Higher-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Alkylphenols, and Alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2692–2702.

Syed, K., Porollo, A., Miller, D., and Yadav, J.S. (2013b). Rational engineering of the fungal P450 monooxygenase CYP5136A3 to improve its oxidizing activity toward polycyclic aromatic hydrocarbons. *Protein Eng. Des. Sel.* 26, 553–557.

Telmo, C., and Lousada, J. (2011). The explained variation by lignin and extractive contents on higher heating value of wood. *Biomass Bioenergy* 35, 1663–1667.

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, 1–9.

Thuillier, A., Chibani, K., Belli, G., Herrero, E., Dumarcay, S., Gerardin, P., Kohler, A., Deroy, A., Dhalleine, T., Bchini, R., et al. (2014). Transcriptomic Responses of *Phanerochaete chrysosporium* to Oak Acetonic Extracts: Focus on a New Glutathione Transferase. *Appl. Environ. Microbiol.* *80*, 6316–6327.

Valette, N., Perrot, T., Sormani, R., Gelhaye, E., and Morel-Rouhier, M. (2017a). Antifungal activities of wood extractives. *Fungal Biol. Rev.* *31*, 113–123.

Valette, N., Benoit-Gelber, I., Falco, M.D., Wiebenga, A., de Vries, R.P., Gelhaye, E., and Morel-Rouhier, M. (2017b). Secretion of small proteins is species-specific within *Aspergillus* sp. *Microb. Biotechnol.* *10*, 323–329.

Vanden Wymelenberg, A., Gaskell, J., Mozuch, M., Kersten, P., Sabat, G., Martinez, D., and Cullen, D. (2009). Transcriptome and Secretome Analyses of *Phanerochaete chrysosporium* Reveal Complex Patterns of Gene Expression. *Appl. Environ. Microbiol.* *75*, 4058–4068.

Vanden Wymelenberg, A., Gaskell, J., Mozuch, M., Sabat, G., Ralph, J., Skyba, O., Mansfield, S.D., Blanchette, R.A., Martinez, D., Grigoriev, I., 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., Splinter BonDurant, S., Sabat, G., Ralph, J., Skyba, O., Mansfield, S.D., Blanchette, R.A., Grigoriev, I.V., 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.

Wang, M., and Lu, X. (2016). Exploring the Synergy between Cellobiose Dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* and Cellulase from *Trichoderma reesei*. *Front. Microbiol.* *7*.

Wang, Y., Li, J., and Liu, A. (2017). Oxygen activation by mononuclear nonheme iron dioxygenases involved in the degradation of aromatics. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* *22*, 395–405.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le bois est une ressource utilisée depuis de nombreuses années par l'Homme pour le chauffage, les constructions, les outils, le papier ou encore les biocarburants. C'est pourquoi les études scientifiques le concernant se sont multipliées afin d'appréhender toutes ses propriétés et ainsi en tirer un meilleur bénéfice, comme en atteste une des premières études réalisées par Richter et ses collaborateurs en 1931 sur les fibres de cellulose dans l'industrie du papier. Cependant, ce matériau essentiel pour l'Homme, est soumis à des attaques de champignons dégradateurs de biomasse provoquant d'énormes dégâts associés à d'importantes pertes économiques. Parmi ces organismes, les champignons de pourriture blanche ont été les plus largement étudiés du fait de leur capacité unique de dégradation leur permettant de dépolymériser tous les composants du bois. Pour comprendre ces mécanismes de dégradation et en particulier les processus associés impliqués dans la résistance au stress généré lors de la dégradation, nous avons combiné des approches à la fois biochimiques et physiologiques. Ces études ont nécessité l'utilisation d'organismes modèles qui s'avèrent ne pas être toujours adaptés dans le cas de ces systèmes très spécifiques aux champignons de pourriture.

Apport et limitation de l'utilisation d'organismes modèles :

Au cours de ma thèse, *Saccharomyces cerevisiae* un organisme modèle eucaryote connu pour sa facilité de transformation génétique et pour la maîtrise et la rapidité (temps de génération de 67min) de son cycle de vie (Burns, 1956; Feyder et al., 2015) a dans un premier temps été utilisé afin de comprendre la fonction de la protéine SSP1.

L'expression des fusions SSP1-GFP et SSP1 tronquée-GFP n'a pas pu être confirmée chez la levure S. cerevisiae :

Afin de visualiser et d'obtenir des informations sur la localisation cellulaire de la protéine, celle-ci a été fusionnée en C-terminal avec la Green Fluorescent Protein. En effet, il a été montré que cette technique était généralement non toxique pour les cellules vivantes et que la détection de la fluorescence était facile et rapide sans manipulation particulière sur les tissus vivants (Misteli and Spector, 1997). Des Western blots ont été réalisés sur les souches exprimant SSP1-GFP et SSP1trunc-GFP, cependant aucun signal n'a été détecté avec les anticorps anti-SSP dans les extraits de protéines solubles, membranaires et extracellulaires.

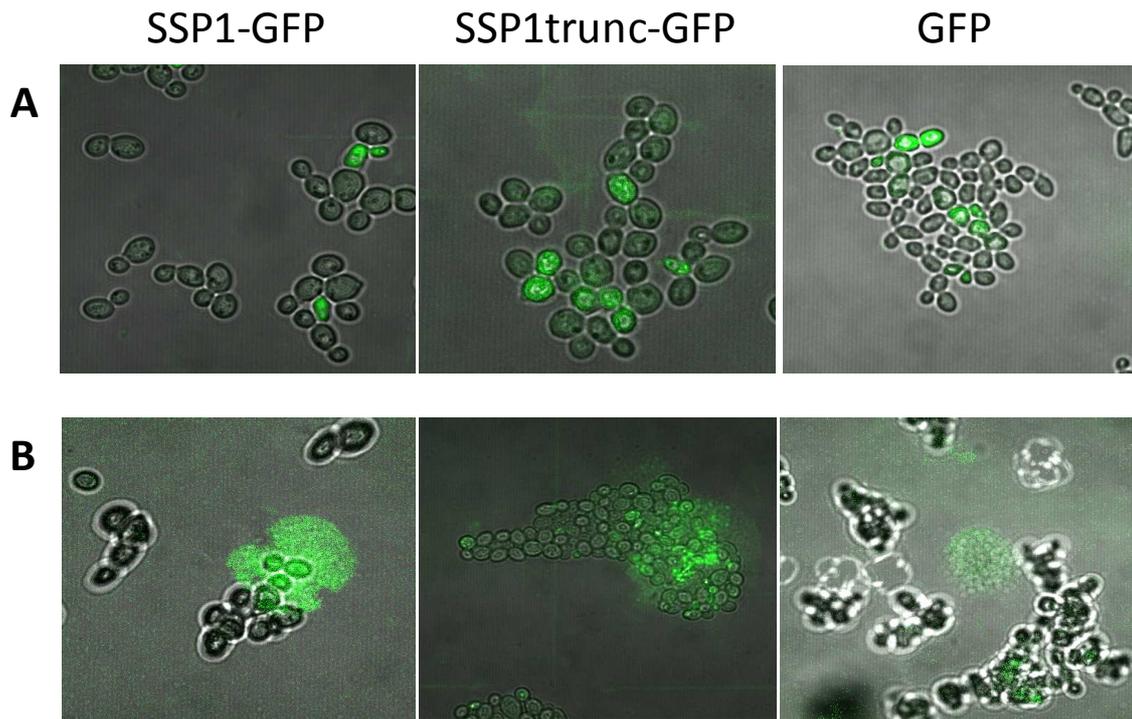


Figure 63 : Localisation de la SSP1-GFP et SSP1trunc-GFP chez *S. cerevisiae*.

Image de microscopie montrant un signal intracellulaire pour les constructions SSP1-GFP, SSP1trunc-GFP et GFP (A) et extracellulaire (B).

De plus, les images en microscopie des levures surexprimant les fusions SSP-GFP sont similaires à celles de la protéine GFP seule (Figure 63A). Il est possible que le signal soit dû à un phénomène d'auto-protéolyse engendrant la libération de la GFP au niveau intracellulaire (Cavazzini et al., 2013; Tatsumi et al., 1991). Des signaux fluorescents ont tout de même été détectés au niveau extracellulaire (Figure 63B). Cependant, ceci pourrait s'expliquer par une mort cellulaire, puisque le signal est confondu avec des petites granules similaires à des débris cellulaires. Ceci pourrait être dû à un temps trop long d'induction. En effet nous avons utilisé un promoteur inductible au galactose et la détection de la GFP pour les mutants exprimant les fusions SSP1-GFP n'a eu lieu qu'après une nuit d'induction. La protéine SSP1trunc non fusionnée à la GFP a été détectée dans le milieu extracellulaire par Western-Blot chez *S. cerevisiae*. Elle est donc sécrétée par cet organisme contrairement à la fusion correspondante. L'ajout de la GFP en C-terminal pourrait provoquer des changements de conformation conduisant à un blocage de la sécrétion et donc une accumulation dans la cellule induisant probablement une mort cellulaire.

L'expression de la protéine SSP1trunc provoque une diminution de croissance chez S. cerevisiae sur milieu oxydant :

L'obtention de mutants exprimant la SSP1 et la SSP1trunc avait pour but d'étudier l'impact de ces protéines sur la croissance de *S. cerevisiae* sur différents milieux de culture. Cependant, l'expression de la protéine pleine longueur n'a jamais pu être confirmée par Western-Blot, contrairement à la version tronquée, suggérant que dans les conditions que nous avons utilisées, cette forme n'est pas exprimée ou forme des agrégats intracellulaires non détectables par Western Blot. L'expression de la protéine SSP1trunc chez *S. cerevisiae* provoque une diminution de croissance après cinq jours sur milieu oxydant (H₂O₂). L'apparition d'un phénotype sensible peut être la conséquence d'un effet néfaste de la surexpression de la protéine ou de l'intégration d'ADN exogène dans le génome de *S. cerevisiae* par recombinaison homologue (HR) ou non homologue appelée non-homologous DNA end-joining (NHEJ) (Orr-Weaver et al., 1981; Takata et al., 1998). Ces réarrangements d'ADN sont des vecteurs occasionnant la disparition de certaines fonctions associées à des séquences codantes.

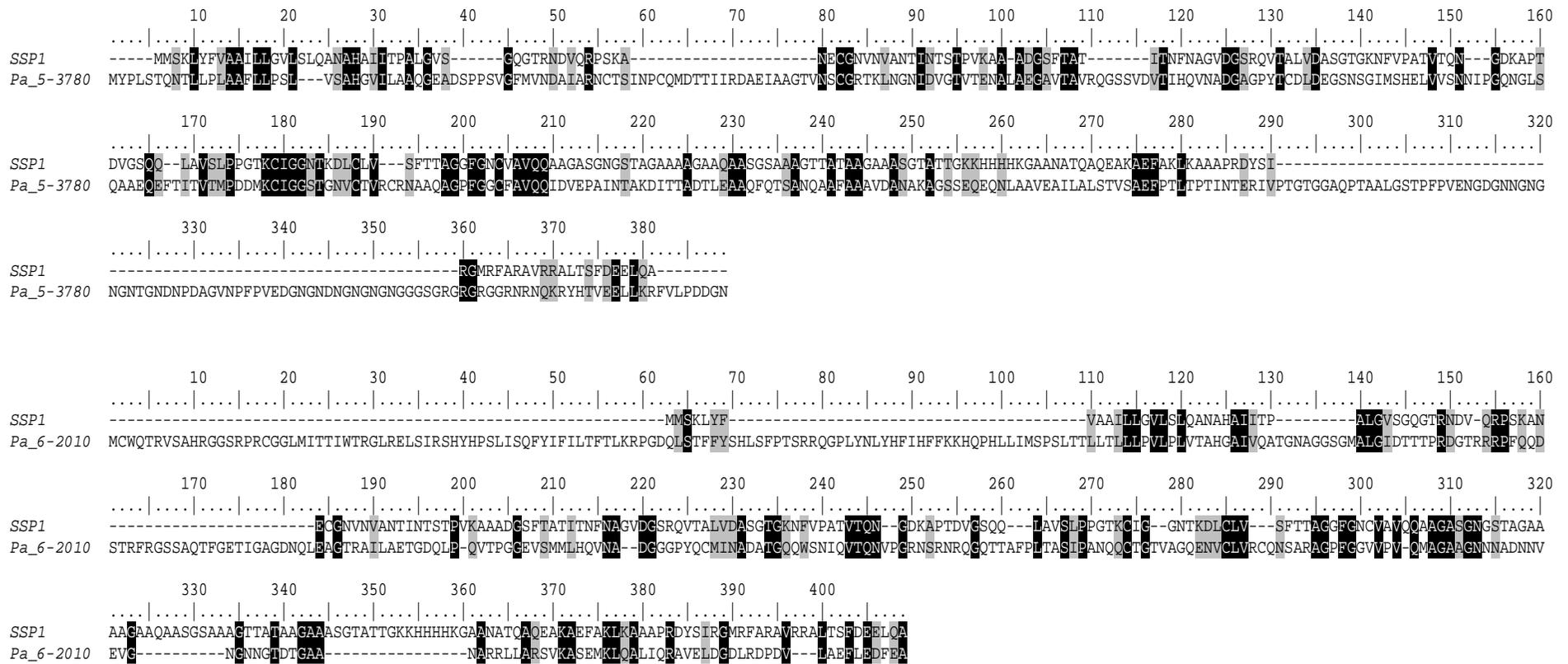


Figure 64 : Aligement des séquences protéiques de *P. anserina* avec la SSP1 de *P. chrysosporium*.

Par conséquent, un événement intégratif aléatoire peut conduire à l'apparition de phénotypes sensibles à divers stress (Idnurm et al., 2004). La réalisation d'un Southern Blot permettrait de confirmer ou non une intégration d'ADN plasmidique au sein du génome. Les analyses *in silico* réalisées chez *S. cerevisiae* n'ont pas révélé de séquences protéiques homologues à celle de SSP1, il est donc possible que l'expression des deux formes de la protéine induit un stress toxique pour l'organisme se traduisant par une diminution de croissance. Le gène n'étant pas présent dans cet organisme, la caractérisation de mutants knock-out est impossible. Dans ce cas précis, la levure s'est avérée ne pas être un bon modèle pour la caractérisation physiologique de SSP1.

Utilisation d'un organisme saprophyte coprophile : P. anserina

Les approches de complémentation de mutants knock-out sont très informatives concernant la caractérisation fonctionnelle de protéines d'intérêt. Cependant, elles nécessitent d'avoir à disposition un organisme qui présente des gènes codant des protéines similaires à la protéine à étudier et dont la manipulation génétique est facile. Des analyses *in silico* ont permis d'identifier un organisme saprophyte coprophile répondant à ces critères : *Podospora anserina*. De plus, il possède un arsenal enzymatique lui permettant de métaboliser la cellulose et l'hémicellulose, mais aussi de partiellement dégrader la lignine (Espagne et al., 2008). Ceci implique qu'il pourrait partager de nombreuses voies métaboliques avec *P. chrysosporium*. Notre démarche scientifique s'est donc basée sur l'obtention de mutants knock-out des deux gènes codant des orthologues de SSP1 identifiés chez *P. anserina*. A l'heure actuelle, ces deux mutants ont été validés par Southern-Blot et des phénotypes ont été identifiés. Suite à cela, des expériences de complémentation fonctionnelle seront réalisées à l'aide des protéines correspondantes mais aussi avec la SSP1 de *P. chrysosporium*. En ce qui concerne cette dernière, l'importance de la divergence évolutive des séquences aura un impact sur les résultats obtenus. En effet, lorsque l'on observe un alignement de séquences on constate d'importantes disparités (Figure 64). L'évolution des séquences protéiques peut provoquer l'apparition de nouvelles fonctions en réponse aux pressions environnementales. On peut donc envisager que l'adaptation de ces deux organismes ont conduit ces protéines à évoluer différemment. Cette approche scientifique permettra donc la caractérisation des deux protéines de *P. anserina* et pourrait apporter des éléments importants concernant le rôle de SSP1 de *P. chrysosporium*.

Utilisation d'un système bactérien pour la production de protéine recombinantes : Escherichia coli

Le système de production hétérologue *E. coli* est un des plus utilisés car il permet d'obtenir d'importants taux de protéines recombinantes de manière rapide et peu onéreuse. Au cours de ma thèse, ce système a été utilisé pour produire des protéines fongiques. Suite à l'optimisation du processus de production et de purification, des quantités de l'ordre de quelques mg/l de culture ont été obtenues pour SSP1 permettant sa caractérisation biochimique. A contrario, des quantités insuffisantes d'isoformes protéiques provenant de *Laccaria bicolor* et *Trametes versicolor* ont été obtenues. Par conséquent, la démarche visant à comparer les propriétés biochimiques des trois protéines n'a pu être menée. *E. coli* est un organisme procaryote ne possédant pas les capacités de glycosylation, de lipidation ou de phosphorylation des eucaryotes (Daly and Hearn, 2005). A l'heure actuelle, il existe d'autres stratégies de production de protéines hétérologues utilisant différents organismes comme des levures ou des champignons filamenteux, des cellules d'insectes, des cellules de mammifères ou des cultures de plantes. Cependant certaines d'entre elles sont compliquées à mettre en œuvre et n'offrent pas l'assurance d'avoir un important taux de production (Nevalainen et al., 2005). Pour la production de protéines fongiques, il existe donc deux alternatives intéressantes : les champignons filamenteux (*Aspergillus ssp.* ou *Trichoderma reesei*) et les levures (*Pichia pastoris* ou *Saccharomyces cerevisiae*) qui sont des organismes eucaryotes dont les coûts d'utilisation et le temps de mise en œuvre sont relativement identiques à celui d'*E. coli* (Alberti et al., 2017; Daly and Hearn, 2005; Druzhinina and Kubicek, 2017; Nevalainen et al., 2005). Dans certains cas, les levures peuvent supplanter l'utilisation d'*E. coli* afin de produire des enzymes fongiques actives. Par exemple, la production et la purification de la forme active de la versatile sterol-esterase d'*Ophiostoma piceae* nécessite l'utilisation de *S. cerevisiae* ou de *Pichia Pastoris*. En effet, la production obtenue grâce au système bactérien n'est pas active du fait du manque de modifications post-traductionnelles. De plus, *P. pastoris* s'est révélée être plus efficace que *S. cerevisiae* pour la production de l'enzyme (Vaquero et al., 2015). Les champignons filamenteux ont été beaucoup utilisés pour produire de nombreuses mycotoxines comme l'aflatoxine, l'ochratoxine ou encore les lovastatines (Alberti et al., 2017), mais aussi des protéines hétérologues comme en atteste la production de la geodine d'*Aspergillus terreus* chez *Aspergillus nidulans* (Nielsen et al., 2013).

Limite actuelle du modèle d'étude *Phanerochaete chrysosporium* :

La physiologie de *P. chrysosporium* étant très spécifique de ses capacités à dégrader le bois, le meilleur moyen de caractériser d'un point de vue fonctionnel certaines de ses enzymes est de pouvoir le manipuler génétiquement. Au cours des années 60, cet organisme fut isolé par différents groupes de chercheurs lui associant alors plusieurs noms comme par exemple celui de *Sporotrichum pulverulentum* (Carmichael, 1962; Lindgren and Eslyn, 1961; Novobranova et al 1972). Cependant, ce n'est qu'en 1974 que Burdsall et Eslyn décrivent entièrement cette pourriture blanche et lui attribue le nom de *Phanerochaete chrysosporium*. Depuis cette époque, l'attrait porté sur les champignons capables de minéraliser la cellulose, l'hémicellulose et la lignine est grandissant puisqu'ils représentent une importante source de potentielles applications industrielles (Young and Akhtar, 1998). De nombreuses études ont porté sur *P. chrysosporium*. Elles ont ainsi permis la caractérisation des mécanismes enzymatiques de dégradation du bois par des approches biochimiques et physiologiques (Alic et al., 1987; Gold et al., 1982; Kirk et al., 1978). Des expériences effectuées *in vivo* font référence à l'utilisation de cellules dépourvues de paroi permettant la transformation génétique de *P. chrysosporium* par insertion de fragment d'ADN exogène. Dans les années 80, les protoplastes de *P. chrysosporium* ont été obtenus grâce à la digestion enzymatique de la paroi fongique par une solution commerciale : le novozyme 234 (Gold et al., 1983). A l'heure actuelle, l'arrêt de sa commercialisation associé à une non connaissance de sa composition à engendré une perte de savoir faire et constitue par conséquent un véritable frein pour les analyses *in vivo* chez *P. chrysosporium*.

Développement de nouvelles méthodes de transformation génétique de P. chrysosporium :

L'obtention de protoplastes de *P. chrysosporium* étant difficile je me suis tourné vers des méthodes ne nécessitant pas de traitements enzymatiques de la paroi et dont l'efficacité a été prouvée chez d'autres organismes.

1. La biolistique :

Cette méthode utilisée au cours de ma thèse a donné de premiers résultats encourageants avec l'introduction d'un plasmide exprimant la GFP dans la souche RP78 de *P. chrysosporium* suivie de son observation au microscope. Bien que cette méthode permette d'obtenir des transformants stables dans le temps, elle peut engendrer l'insertion de multiples copies d'ADN en tandem au sein du génome tout comme provoquer l'apparition de certains phénotypes non souhaités (Idnurm et al., 2004; Lorito et al., 1993). En effet, l'intégration aléatoire d'ADN au sein d'une séquence codante provoque une perte de la fonction associée. Outre la formation de mutants stables intégrant le fragment d'ADN dans leur génome, il existe aussi des cas où l'expression du gène est transitoire générant des mutants stables uniquement dans un laps de temps très court (48 à 72h) (Durand et al., 1997). Cette technique pourrait donc être utilisée en l'état pour déterminer la localisation cellulaire de protéines au sein de notre champignon modèle *P. chrysosporium*. Cependant, une optimisation de celle-ci pourrait permettre la formation de mutants knock-out stables. En effet, il est tout à fait envisageable d'introduire un fragment d'ADN contenant un gène de sélection flanqué de deux séquences génomiques permettant de réaliser un remplacement de gène par recombinaison homologue chez *P. chrysosporium* (Berezikov et al., 2004).

2. La lipotransfection :

Au cours de ma thèse, cette technique a été employée afin d'introduire différentes constructions chez *P. chrysosporium*. Les premiers résultats obtenus ce sont révélés encourageants puisqu'une fusion GST-GFP et une construction exprimant la GFP seule ont été introduites. Cette méthode permet d'obtenir des mutants stables dans le temps (Felgner et al., 1987). Ce procédé de transformation repose sur l'endocytose de vésicules lipidiques ayant encapsulé l'ADN à transférer. Cette endocytose n'est possible uniquement que par contact des vésicules avec la membrane plasmique. Par conséquent, l'utilisation de cette méthode chez les champignons requiert une étape de fragilisation de la paroi afin de permettre l'interaction entre les vésicules lipidiques et la membrane. C'est sur cette étape que nos efforts vont se focaliser pour optimiser la méthode. En effet, même si cette technique s'est avérée efficace, le rendement de transformation est très faible.

	Prot ID	époxyde hydrolase	dioxygénase
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	2981896	oui	oui
<i>Phanerochaete carnososa</i>	251987	oui	oui
<i>Phlebia brevispora</i>	73631	oui	oui
<i>Phlebia centrifuga</i>	13312	oui	oui
<i>Phlebiopsis gigantea</i>	89743	oui	oui
<i>Trametopsis cervina</i>	1388565	oui	oui
<i>Pycnoporus coccineus</i>	753940	oui	/
<i>Lentinus tigrini</i>	503143	oui	/
<i>Trametes versicolor</i>	51128	oui	/
<i>leiotrametes sp BRFM</i>	1363228	oui	/
<i>Trametes pubescens</i>	1573	oui	/
<i>Trametes gibbosa</i>	1316484	oui	/
<i>Trametes cingulata</i>	274517	oui	/

Tableau 9 : Tableau représentant des espèces fongiques possédant une organisation génomique de SSP1 similaire à celle de *P. chrysosporium*.

L'apport de la génomique comparative

L'analyse des séquences génomiques est devenue une étape essentielle pour la compréhension de la biologie d'un organisme. L'année 1977 constitue un véritable bouleversement puisque le premier génome viral (bactériophage ϕ X174) a été séquencé par Sanger et collaborateurs (Sanger et al., 1977). Suite à cela, ils furent les premiers à utiliser des techniques d'assemblage aléatoire conduisant à l'assemblage de plusieurs génomes viraux et d'organelles (Anderson et al., 1982). En 1995, Fleischmann et collaborateurs ont séquencé le premier génome appartenant à une cellule vivante : *Haemophilus influenzae*, bactérie responsable d'infections broncho-pulmonaires (Fleischmann et al., 1995). Au cours de ces dernières années, de spectaculaires progrès ont été réalisés ce qui a permis l'obtention de nombreux génomes provenant de tous les domaines du vivant. Le domaine fongique est constitué d'environ 1,5 millions d'espèces représentant une grande partie du vivant. Afin d'appréhender cette diversité et son rôle au sein des différents écosystèmes, des projets de séquençage collaboratifs tel que 1000 Fungal Genomes Community sont menés par le Joint Genome Institut (<http://1000.fungalgenomes.org/home/>). La disponibilité de ces informations permet de comparer de nombreuses séquences protéiques afin de découvrir des informations sur les potentielles fonctions associées. Dans certains cas, les données de génomique comparative permettent d'appréhender la physiologie des organismes et leur histoire évolutive (Floudas et al., 2012). De plus, les comparaisons de séquences peuvent apporter des informations sur l'activité potentielle de certaines protéines basées sur la conservation de certains domaines identifiés.

Une organisation génomique particulière : un cluster de gènes codant des enzymes de détoxification impliquant SSP1 chez P. chrysosporium

L'environnement génomique de SSP1 a mis en évidence la présence de deux gènes codant pour des enzymes intervenant dans des voies de détoxification de part et d'autre du gène SSP1. Ces gènes codent pour une époxyde hydrolase (ProtID 2981895) et une catéchol-dioxygénase (ProtID 3011088), enzymes pouvant intervenir au niveau de la prise en charge précoce des molécules toxiques (phase I de détoxification). Ce cluster est conservé chez plusieurs espèces fongiques, certaines ne présentant que le gène codant pour l'époxyde hydrolase (Tableau 9).

1. Des gènes codant des enzymes de la phase I de détoxification :

Les époxyde hydrolases sont des enzymes ubiquitaires présentes chez les animaux, les plantes, les champignons et les bactéries. Elles interviennent dans différentes voies métaboliques comme la détoxification ou la régulation de signaux moléculaires (Arand et al., 1999; Morisseau and Hammock, 2005). Les époxydes se forment suite à l'oxydation des alcènes créant un éther cyclique formé de trois atomes. Ces derniers sont considérés comme des groupements hautement réactifs dûs à l'électronégativité de l'oxygène. L'action des époxyde hydrolases permet la conversion de l'éther cyclique en trans-dihydrodiol correspondant (Wilson et al., 2017). Chez les champignons, ces enzymes tout comme les cytochromes P450 font partie de la phase I de détoxification des composés xénobiotiques (Aranda, 2016).

Dans la nature, il existe des organismes capables de transformer les composés polycycliques de la lignine en molécules aromatiques plus stables. Pour se faire, l'une des stratégies mis en place consiste à incorporer de l'oxygène permettant l'ouverture du cycle et conduisant à la formation de produit pouvant être utilisé dans le cycle de Krebs (Wang et al., 2017). Parmi les enzymes réalisant ce type de réaction on trouve des catéchol-dioxygénases qui comme leur nom l'indique catalysent l'ouverture du cycle du catéchol pour former de l'acide muconique. Ce dernier est ensuite converti par hydrogénation pour donner l'acide β -cetoadipique (β -keto adipic acid) et ainsi rentrer dans le cycle de Krebs (Bugg and Rahmanpour, 2015; Martins et al., 2015). Par conséquent, les catéchol-dioxygénases sont importantes pour la détoxification des molécules aromatiques produites lors de la dégradation du bois.

2. La SSP1 pourrait être impliquée dans des voies de détoxification :

Après 24 h de culture en présence d'extractibles de chêne, l'expression des gènes codant la SSP1 et l'époxyde hydrolase chez *P. chrysosporium* est augmenté respectivement d'un facteur de 5,72 et de 2,4 par rapport au contrôle (Thuillier et al., 2014). Récemment, dans les mêmes conditions de culture, l'analyse de la réponse précoce n'a pas révélé de surexpression de ces deux gènes (Fernandez-Gonzalez et al en préparation). Ceci pourrait suggérer un rôle tardif de ces protéines au sein des mécanismes de détoxification.



Figure 65 : Schéma de l'organisation génomique des séquences codantes de l'époxyde hydrolase, de la SSP1 et de la dioxygénase.

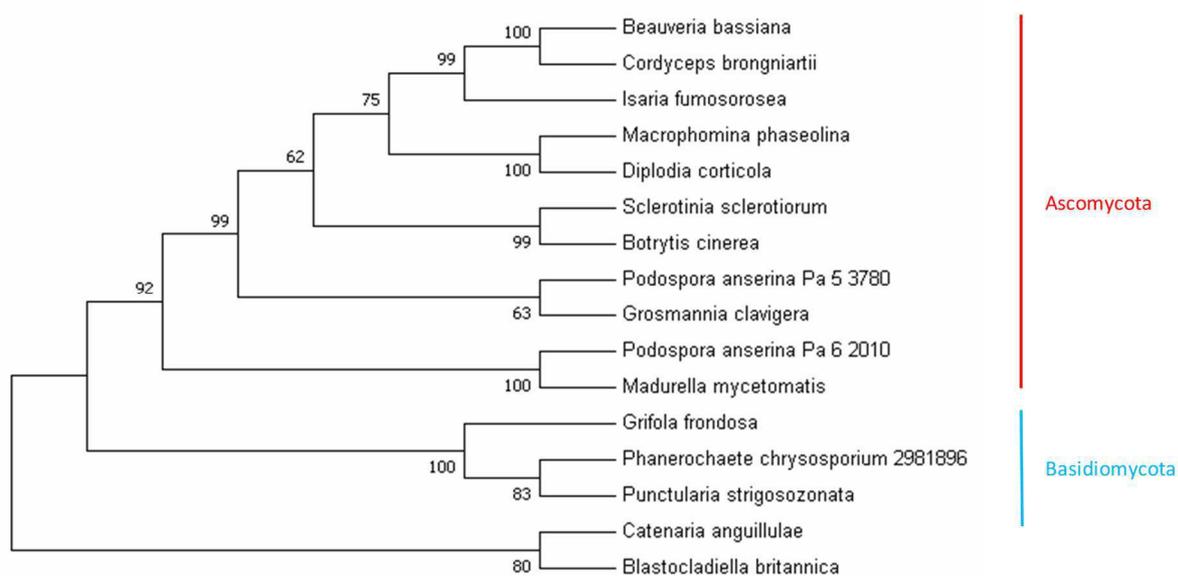


Figure 66 : Arbre phylogénétique de séquences homologues aux SSP de *P. anserina*.

De plus, la disposition particulière des gènes codant pour la SSP1 et l'époxyde hydrolase pourrait être liée à un processus de régulation post-transcriptionnel impliquant un mécanisme similaire à celui des RNAi (RNA interference). En effet, une partie des séquences codantes se superposent, l'une étant située sur le brin sens et l'autre sur le brin anti-sens (Figure 65).

Le gène codant la catéchol-dioxygénase est induit à la fois à des temps précoces (1 h) et tardif (24h) de traitement aux extractibles (Thuillier et al., 2014) Fernandez-Gonzalez et al en préparation). De la même manière, un autre gène codant pour une catéchol-dioxygénase (ProtID 2922705) est induit après 24h de traitement (15,64 fois).

Au cours de ma thèse, j'ai produit et purifié la dioxygénase 2922705. Cette protéine se trouve sous une forme dimérique de 75 kDa dont le maintien est assuré par des interactions non covalentes. La caractérisation biochimique de cette enzyme est en cours ainsi que la production de l'autre isoforme (ProtID 3011088).

Les petites protéines sécrétées par P. anserina pourraient être des GAS protéines :

L'analyse *in silico* des séquences homologues des 2 SSP de *P. anserina* (Pa_5-3780 et Pa_6-2010) a révélé un regroupement en fonction de la taxonomie des champignons. (Figure 66). En particulier, ces séquences auraient évolué à partir de séquences présentes chez les champignons inférieurs : les blastocladiomycota. L'analyse plus fine de certaines des séquences identifiées montre une homologie avec des Glycolipid Anchored Surface proteins (GAS) encore appelées Glucan Elongation proteins (GEL) ou GEgh16 selon les espèces (Caracuel et al., 2005; Xue et al., 2002). Ces protéines sont décrites comme étant des β -1,3-glucanosyltransferases intervenant dans l'élongation et la dynamique des parois fongiques. En effet, les chaînes linéaires de β -1,3-glucan sécrétées dans l'espace péri-plasmique vont être clivées par ces enzymes afin de créer de nouvelles extrémités réduites. Ces dernières sont ensuite transférées sur la chaîne de glucan présente dans la paroi (Mouyna et al., 2000; Shematek and Cabib, 1980). Cette fonction est extrêmement importante puisque les chaînes de β -1,3-glucan de la paroi servent de point d'ancrage pour les autres polysaccharides comme la chitine et les galactomannanes (Fontaine et al., 1997).

La fonction associée à ces protéines semble être répandue au sein du domaine fongique et indépendamment liée au mode de vie de l'organisme. En effet, de nombreuses séquences ont été retrouvées chez des ascomycètes ectomycorrhiziens ou parasites de plantes, chez des levures et chez des basidiomycètes pathogènes (Sillo et al., 2013; Samalova et al., 2017). La délétion des gènes codant les protéines GEL, GAS et GEgh16 provoque des défauts de croissance en présence de molécules modifiant l'intégrité de la paroi et lors de stress oxydant (Ando et al., 2006; Liu et al., 2006; Samalova et al., 2017). Ces phénotypes corroborent ceux que nous avons pu mettre en évidence pour les mutants de *P. anserina* délétés pour Pa_5-3780 et Pa_6-2010, suggérant un rôle putatif de ces protéines dans le maintien de l'intégrité de la paroi en condition de stress. Ces résultats seront confirmés par complémentation fonctionnelle de ces mutants avec les gènes Pa_5-3780 et Pa_6-2010, mais également avec les gènes GAS de levure et le gène codant la SSP1 de *P. chrysosporium*. Chez *Neurospora crassa*, des simples mutants de délétion ont été réalisés pour chaque gène codant des protéines GEL. L'observation de ces derniers a révélé des phénotypes propres à certaines souches silencieuses comme en atteste une modification de la morphologie du mutant Δ GEL3 seulement, sur milieu minimum. Il existe aussi des phénotypes partagés entre certains mutants : Δ GEL2, Δ GEL4 et Δ GEL5 (Kamei et al., 2013). Chez *S. cerevisiae* cinq gènes codent des protéines GAS dont les profils de glycosylation associés sont tous différents. De plus, ces protéines présentent toutes une activité β -1,3-glucanosyltransferase sauf GAS3. L'analyse des séquences a permis de les classer en deux groupes correspondant à la présence (GAS 1 et 2) ou à l'absence (GAS 3, 4 et 5) d'un domaine GH72 (Ragni et al., 2007). De plus, chez *S. pombe* les cellules du mutant Δ GAS1 sont viables uniquement en présence d'un milieu osmotique alors que les mutants Δ GAS2 et Δ GAS5 ont un phénotype similaire à celui de la souche sauvage (de Medina-Redondo et al., 2010). De nombreuses espèces possèdent plusieurs isoformes de ces protéines qui peuvent avoir des fonctions propres ou partagées. Ceci peut être dû à l'apparition de nouvelles fonctions protéiques en réponse à des pressions de sélection, engendrant une diversification des séquences protéiques. En effet, les GAS peuvent avoir ou non un nombre de cystéines conservées dans un domaine appelé cys-box (de 6 à 8), une région riche en résidus sérine et thréonine, la présence ou l'absence d'un domaine GH72, ou encore des régions C-terminale et N-terminale hautement variables (Grell et al., 2003; Sillo et al., 2013).

P. anserina possède deux isoformes dont les séquences protéiques sont conservées dans leurs parties centrales et divergentes au niveau de leurs régions C-terminales. Le domaine GH72 n'est présent dans aucune des 2 séquences. De plus, le nombre de cystéine diffère chez ces deux protéines puisque l'isoforme Pa_5_3780 en possède 8 tandis que la séquence de Pa_6_2010 en possède seulement 6. La caractérisation biochimique de ces protéines permettra d'étudier cette variabilité au niveau fonctionnel. Les constructions nécessaires à la production et la purification de ces protéines dans le système hétérologue *E. coli* sont en cours de réalisation. Suite à cela, il sera important de déterminer la présence ou l'absence d'activité β -1,3-glucanosyltransferase en utilisant le protocole décrit par Ragni et collaborateur (Ragni et al., 2007).

L'apport de la biologie structurale :

Il existe deux techniques permettant d'obtenir la structure tridimensionnelle des protéines : la résonance magnétique nucléaire (RMN) ou la diffraction de rayons X par des cristaux de protéine. La première méthode nécessite que les protéines soient de petites tailles (toutes les séquences résolues font moins de 300 acides aminés) et la seconde est dépendante de l'obtention de cristaux et la disponibilité de modèles dans les bases de données pour pouvoir reconstruire la structure 3D de la protéine. La détermination de la structure de SSP1 n'a pu être réalisée bien qu'elle est été envisagée. En effet, de nombreux problèmes sont apparus tout d'abord concernant la solution tampon dans laquelle SSP1 était stockée. En effet, la concentration saline y est élevée et ne peut être suffisamment diluée pour ne pas influencer les conditions de cristallisation. De plus, cette technique requiert l'introduction de résidus méthionine ou cystéine séléniés. Cependant, SSP1 ne possède qu'une méthionine tandis que ses résidus cystéines sont oxydés et donc non modifiables car certainement impliqués dans la structuration tridimensionnelle. C'est pourquoi, nous avons ensuite envisagé la résolution de la structure par RMN mais cette technique requiert une grande quantité de protéine et un marquage de certains atomes. La production de ce type de protéine diminue fortement les rendements qui dans le cas de SSP1 ne sont pas élevés. Par conséquent, je me suis tourné vers l'utilisation de logiciels de prédiction de structure tridimensionnelle comme i-Tasser un pipeline permettant de recouper des informations provenant de plusieurs bases de données (PDB, LOMETS et BioLiP) (Berman et al., 2000; Yang et al., 2015).

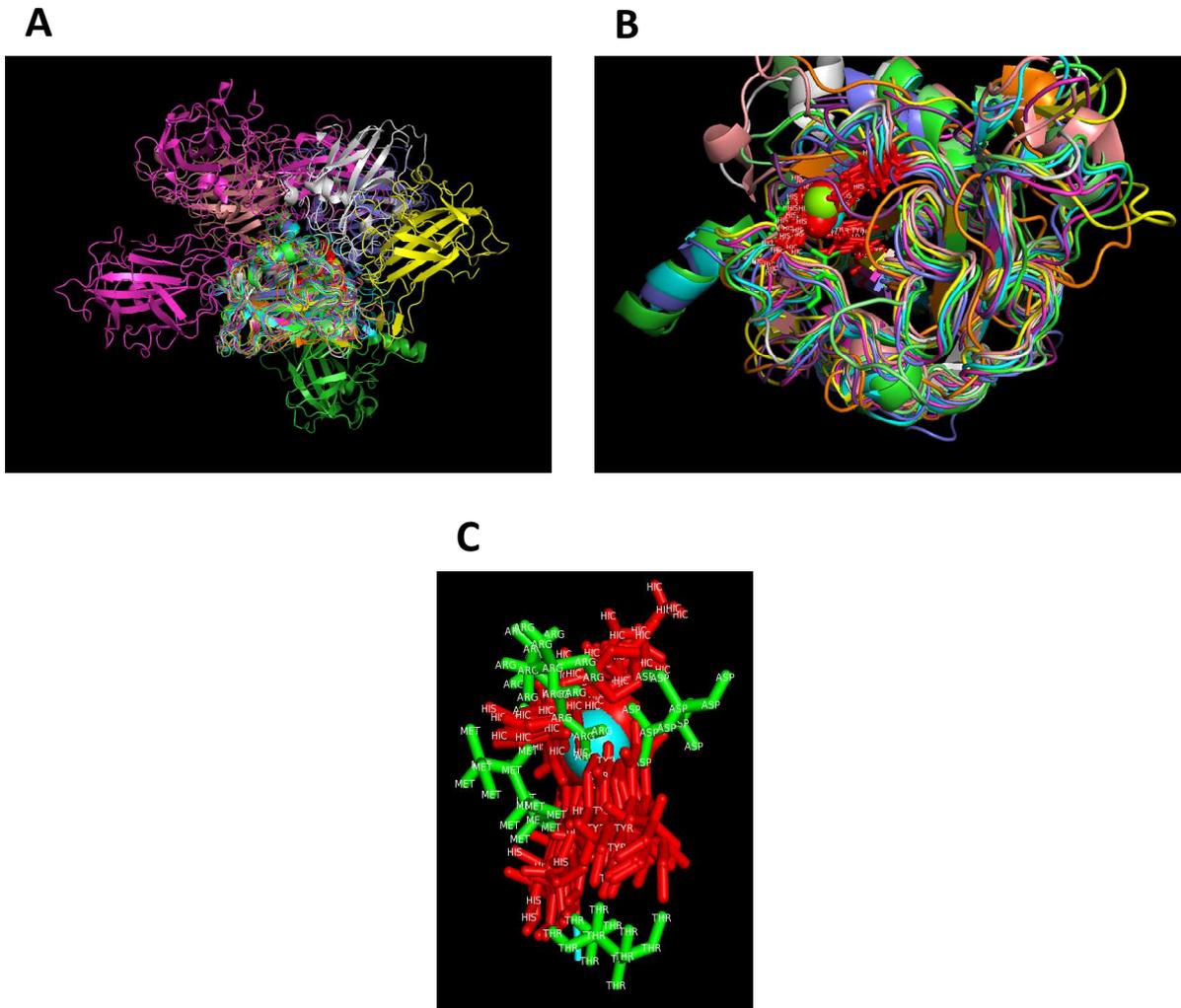


Figure 67 : Image de la superposition des modèles de PcSSP1 et LPMO à partir de Pymol.

Superposition de la séquence de la PcSSP1trunc sur des structures de LPMO (A) puis uniquement sur un monomère avec le site de fixation du cuivre (B). Zoom sur les atomes impliqués dans la fixation du cuivre chez les LPMO (rouge) en comparaison avec ceux de la PcSSP1trunc en vert (C).

Cette approche a permis d'obtenir un modèle structural de SSP1trunc qui se superpose avec une sous unités de LPMO (Figure 67). Les LPMO sont des métalloprotéines à cuivre ayant une activité de dégradation des polysaccharides. La superposition des acides aminés permettant la fixation du cuivre chez les LPMOs avec ceux de PcSSP1 montre des divergences. Pour déterminer si PcSSP1 était capable de fixer du cuivre, des tests ont été réalisés par titration calorimétrique isotherme (ITC) mais n'ont pas permis de mettre en évidence une interaction cuivre/PcSSP1. La similarité de structure entre les deux protéines, ainsi que leur capacité à métaboliser des sucres, pourrait laisser penser à un rôle de PcSSP1 dans les processus de dégradation de la biomasse végétale. Les banques de données structurales associées aux logiciels de prédiction permettent de comparer des séquences protéiques inconnues avec des protéines caractérisées sur la base de leur organisation structurale, permettant dans certains cas de prédire une fonction commune. La détermination de cette dernière est d'autant plus facile que depuis 1971 la Protein Data Bank ne cesse de collecter des données de structures tridimensionnelles (Berman et al., 2000).

Perspectives à long terme :

1. Utilisation du système enzymatique des pourritures blanches dans les biotechnologies :

Les champignons de pourriture blanche présentent le système enzymatique le plus complet et le plus varié des organismes saprophytes. Par conséquent, de nombreuses industries souhaitent développer et optimiser l'utilisation de ces enzymes dans des processus divers tels que la bioremédiation des sols, la dépollution des eaux usées, la fabrication de pâte à papier ou les biocarburants (Yadav and Yadav, 2015).

1.1 Des enzymes extracellulaires au service de la bioremédiation des sols et des eaux usées :

Depuis de nombreuses années, les activités humaines libèrent de grandes quantités de molécules toxiques pour l'environnement. La majorité de ces composés ont une structure similaire à ceux qui constituent la lignine. Les enzymes de dégradation de ce polymère sécrétées par les champignons de pourriture blanche ont une activité non spécifique leur permettant ainsi de dégrader une vaste gamme de molécules (Rhodes, 2014).

En effet, les laccases illustrent bien ce propos car elles sont connues pour dégrader les composés phénoliques, les hydrocarbures polycycliques, les polychlorophénols ou encore des herbicides (Ruggaber and Talley, 2006). Ce qui signifie que le traitement enzymatique de certains terrains ou eaux usées contaminés par plusieurs types de molécules pourrait être une alternative aux traitements chimiques devant ensuite être éliminés (Ahuja et al., 2004). Bien que cette technologie soit innovante et bénéfique, il existe plusieurs facteurs limitant son développement. La bioremédiation enzymatique requiert une période de traitement plus importante que les méthodes traditionnelles mais aussi une très grande quantité d'enzymes. En effet, il a été démontré que certaines enzymes pouvaient perdre leur activité suite à l'interaction avec un polluant (Gianfreda and Rao, 2004). De plus, bien qu'elles soient actives dans une large gamme d'environnement, elles ne sont pas capables de s'adapter à des changements de conditions pouvant provoquer leur destruction (Ruggaber and Talley, 2006). Tous ces désavantages sont « minimes » vis-à-vis du coût engendré par l'achat des enzymes : 1000 unités de LiP provenant de *P. chrysosporium* coutent 100 \$, 5000 unités de Horseradish peroxidase coutent 4000 \$ et 100 000 unités de laccase coutent 155 000 \$ (Durán and Esposito, 2000).

L'utilisation des micro-organismes pourrait être une alternative à cette méthode mais elle est soumise à un nombre de contraintes plus importante. En effet, l'organisme va devoir s'adapter à l'environnement, interagir avec d'autres espèces (compétition), aura une très faible mobilité, doit être préalablement cultivé, le polluant doit être bio disponible et il devra faire face à des prédateurs (Ahuja et al., 2004; Chen et al., 2015). Ceci se confirme pour le traitement des eaux usées puisque l'organisme fongique doit faire face à des pH alcalins, une faible disponibilité en oxygène et en glucose impactant fortement les capacités de dépollution (Kamali and Khodaparast, 2015).

1.2 Prétraitement du matériel lignocellulosique, des perspectives biologiques :

Les activités humaines engendrent une libération importante de dioxyde de carbone connu pour être un gaz à effet de serre. Afin de réduire nos émissions, les industriels recherchent des alternatives aux carburants d'origine pétrolière, l'une d'elle pourrait être l'utilisation de biocarburant.

Sa production nécessite une étape de transformation du matériel lignocellulosique par hydrolyse des polymères de cellulose et d'hémicellulose. Cependant, ils sont entourés par un polymère de lignine très résistant devant être éliminé par le biais de traitements chimiques, physiques ou une combinaison des deux. Cette étape pourrait être optimisée et plus écologique grâce à l'utilisation d'enzymes sécrétées par des organismes de type pourriture blanche. En effet, ce processus permettrait un traitement plus doux conduisant à une amélioration des rendements via la diminution de réactions parasites, tout en diminuant l'utilisation de produits chimiques et le temps de traitements (Asgher et al., 2014; Pérez et al., 2002). Cependant, le traitement biologique reste soumis à diverses contraintes freinant le développement de cette technologie : les coûts importants liés à son utilisation, la disponibilité des enzymes et leur stabilité au cours du temps et une potentielle inactivation dû à la présence de certaines molécules comme les protéases (Asgher et al., 2014; Pérez et al., 2002). Cette technologie ne se limite pas uniquement au secteur des biocarburants puisqu'elle peut aussi être utilisée dans la fabrication de la pâte à papier. En effet, la production de cette dernière fait appel aux mêmes étapes de transformation du matériel lignocellulosique. Dans ce secteur, le traitement biologique permettrait d'améliorer les propriétés de tension et de résistance du produit final. Ces applications industrielles pourraient à l'avenir offrir de nouvelles perspectives écologiques et économiques. Cependant, à l'heure actuelle il est nécessaire d'optimiser les processus de fabrication des enzymes extracellulaires afin de diminuer les coûts tout en améliorant la production. De plus, les recherches scientifiques sur les processus de dégradation du bois pourraient aboutir à la découverte de nouvelles enzymes ou de systèmes accessoires permettant une meilleure efficacité de ces technologies. Le travail que j'ai réalisé au cours de ma thèse pourrait apporter des éléments nouveaux sur le rôle de petites protéines accessoires favorisant les processus de dégradation du bois ou les voies de détoxification. Ces dernières pourraient par conséquent être introduites au sein d'un processus industriel afin d'augmenter les rendements ou la qualité.

Conclusion

Au cours de ma thèse, l'étude des petites protéines et en particulier celle de PcSSP1 a nécessité l'utilisation de plusieurs organismes modèles permettant d'obtenir des informations sur la fonction de la protéine. Cette approche m'a permis d'apprendre et de transférer une méthode de transformation génétique utilisée par l'équipe du LIED sur *P. anserina* au sein de l'UMR 1136. J'ai aussi contribué au développement de techniques de transformation génétique sur *P. chrysosporium* qui ont abouti à l'obtention de plusieurs transformants dont un exprimant une fusion protéique GST-GFP. Par la suite, l'optimisation de ces dernières pourrait permettre à terme d'utiliser des approches de transformation génétique pour caractériser des fonctions protéiques. En combinant ces approches physiologiques avec des analyses biochimiques, mon travail a permis d'apporter des éléments nouveaux sur le rôle de PcSSP1, qui au début de ma thèse était une protéine qui n'avait jamais été étudiée et dont on ne connaissait absolument rien.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

A

Ahuja, S.K., Ferreira, G.M., and Moreira, A.R. (2004). Utilization of Enzymes for Environmental Applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* *24*, 125–154.

Ai, M.-Q., Wang, F.-F., Zhang, Y.-Z., and Huang, F. (2014). Purification of pyranose oxidase from the white rot fungus *Irpex lacteus* and its cooperation with laccase in lignin degradation. *Process Biochem.* *49*, 2191–2198.

Alberti, F., Foster, G.D., and Bailey, A.M. (2017). Natural products from filamentous fungi and production by heterologous expression. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *101*, 493–500.

Alfaro, M., Oguiza, J.A., Ramírez, L., and Pisabarro, A.G. (2014). Comparative analysis of secretomes in basidiomycete fungi. *J. Proteomics* *102*, 28–43.

Alic, M., Letzring, C., and Gold, M.H. (1987). Mating System and Basidiospore Formation in the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* *53*, 1464–1469.

Anderson, S., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Eperon, I.C., Sanger, F., and Young, I.G. (1982). Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* *156*, 683–717.

Ando, A., Nakamura, T., Murata, Y., Takagi, H., and Shima, J. (2006). Identification and classification of genes required for tolerance to freeze–thaw stress revealed by genome-wide screening of *Saccharomyces cerevisiae* deletion strains. *FEMS Yeast Res.* *7*, 244–253.

Apetri, M.M., Maiti, N.C., Zagorski, M.G., Carey, P.R., and Anderson, V.E. (2006). Secondary Structure of α -Synuclein Oligomers: Characterization by Raman and Atomic Force Microscopy. *J. Mol. Biol.* *355*, 63–71.

Arand, M., Hemmer, H., Dürk, H., Baratti, J., Archelas, A., Furstoss, R., and Oesch, F. (1999). Cloning and molecular characterization of a soluble epoxide hydrolase from *Aspergillus niger* that is related to mammalian microsomal epoxide hydrolase. *Biochem. J.* *344 Pt 1*, 273–280.

Aranda, E. (2016). Promising approaches towards biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons with Ascomycota fungi. *Curr. Opin. Biotechnol.* *38*, 1–8.

Arantes, V., Qian, Y., Milagres, A.M.F., Jellison, J., and Goodell, B. (2009). Effect of pH and oxalic acid on the reduction of Fe³⁺ by a biomimetic chelator and on Fe³⁺ desorption/adsorption onto wood: Implications for brown-rot decay. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* *63*, 478–483.

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

Arantes, V., Jellison, J., and Goodell, B. (2012). Peculiarities of brown-rot fungi and biochemical Fenton reaction with regard to their potential as a model for bioprocessing biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *94*, 323–338.

Armaleo, D., Ye, G.-N., Klein, T.M., Shark, K.B., Sanford, J.C., and Johnston, S.A. (1990). Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. *Curr. Genet.* *17*, 97–103.

Asgher, M., Shahid, M., Kamal, S., and Iqbal, H.M.N. (2014). Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. *J. Mol. Catal. B Enzym.* *101*, 56–66.

Ashton, H. (2009). Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi (10th edition) 2009229 Edited by Paul M. Kirk, Paul F. Cannon, David W. Minter and Joost A. Stalpers. *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi (10th edition)*. Wallingford, CT: CABI 2008. xi + 771 pp., ISBN: 978 0 85199 826 8 £70/\$140. *Ref. Rev.* *23*, 42–42.

B

Bacelli, I., Luti, S., Bernardi, R., Scala, A., and Pazzagli, L. (2014). Cerato-platanin shows expansin-like activity on cellulosic materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *98*, 175–184.

Bacic, A., Harris, P.J., and Stone, B.A. (1988). Structure and function of plant cell walls. *Biochem. Plants* *14*, 297–371.

Bakar, F.D.A., Priyatno, T.P., Redzuan, R.A., Zamrod, Z., Mahadi, N.M., and Murad, A.M.A. functional analysis of novel genes specifically expressed in the appressoria of *Colletotrichum gloeosporioides*.

Baldrian, P. (2006). Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.* *30*, 215–242.

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

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

Barreto, C.C., Alves, L.C., Aragão, F.J., Rech, E., Schrank, A., and Vainstein, M.H. (1997). High frequency gene transfer by microprojectile bombardment of intact conidia from the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *FEMS Microbiol. Lett.* *156*, 95–99.

Becker, B., and Marin, B. (2009). Streptophyte algae and the origin of embryophytes. *Ann. Bot.* *103*, 999–1004.

- Beeson, W.T., Phillips, C.M., Cate, J.H.D., and Marletta, M.A. (2012). Oxidative Cleavage of Cellulose by Fungal Copper-Dependent Polysaccharide Monooxygenases. *J. Am. Chem. Soc.* *134*, 890–892.
- Benoit, I., Culleton, H., Zhou, M., DiFalco, M., Aguilar-Osorio, G., Battaglia, E., Bouzid, O., Brouwer, C.P.J.M., El-Bushari, H.B.O., Coutinho, P.M., et al. (2015). Closely related fungi employ diverse enzymatic strategies to degrade plant biomass. *Biotechnol. Biofuels* *8*.
- Berbee, M.L., James, T.Y., and Strullu-Derrien, C. (2017). Early Diverging Fungi: Diversity and Impact at the Dawn of Terrestrial Life. *Annu. Rev. Microbiol.* *71*, 41-59.
- Bergès, T., and Barreau, C. (1989). Heat shock at an elevated temperature improves transformation efficiency of protoplasts from *Podospira anserina*. *Microbiology*, *135*(3), 601-604.
- Berezikov, E., Bargmann, C.I., Plasterk, R.H.A. (2004). Homologous gene targeting in *Caenorhabditis elegans* by biolistic transformation. *Nucleic Acids Res.* *32*, 40e-40.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., and Bourne, P.E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* *28*, 235–242.
- Bertrand et al (1896). Coexistence of laccase and tyrosinase in certain fungi. *C. R. Hebd. Seances Acad Sci* *123*: 463–465.
- Blanchette, R.A. (2000). A review of microbial deterioration found in archaeological wood from different environments. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* *46*, 189–204.
- Blanchette, R.A., Held, B.W., Jurgens, J.A., McNew, D.L., Harrington, T.C., Duncan, S.M., and Farrell, R.L. (2004). Wood-Destroying Soft Rot Fungi in the Historic Expedition Huts of Antarctica. *Appl. Environ. Microbiol.* *70*, 1328–1335.
- Bonazza, K., Gaderer, R., Neudl, S., Przylucka, A., Allmaier, G., Druzhinina, I.S., Grothe, H., Friedbacher, G., and Seidl-Seiboth, V. (2015). The fungal cerato-platanin protein EPL1 forms highly ordered layers at hydrophobic/hydrophilic interfaces. *Soft Matter* *11*, 1723–1732.
- Bond, W.J. (1989). The tortoise and the hare: ecology of angiosperm dominance and gymnosperm persistence. *Biol. J. Linn. Soc.* *36*, 227–249.
- Bonfante, P., and Genre, A. (2008). Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective. *Trends Plant Sci.* *13*, 492–498.
- Boominathan, K., and Reddy, C.A. (1992). cAMP-mediated differential regulation of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase production in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *89*, 5586–5590.
- Bourdais, A., Bidard, F., Zickler, D., Berteaux-Lecellier, V., Silar, P., and Espagne, E. (2012). Wood Utilization Is Dependent on Catalase Activities in the Filamentous Fungus *Podospira anserina*. *PLoS ONE* *7*, e29820.

Bouws, H., Wattenberg, A., and Zorn, H. (2008). Fungal secretomes—nature's toolbox for white biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *80*, 381–388.

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

Bratzel, G., and Buehler, M.J. (2012). Sequence-structure correlations in silk: Poly-Ala repeat of *N. clavipes* MaSp1 is naturally optimized at a critical length scale. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* *7*, 30–40.

Bretherton, I., and Munholland, K.A. (1999). Internal working models in attachment relationships: A construct revisited. *Handbook of attachment: theory, research and clinical applications.* 89-111.

Brown, R.M. (2004). Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21st century? *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* *42*, 487–495.

Brun, S., Malagnac, F., Bidard, F., Lalucque, H., and Silar, P. (2009). Functions and regulation of the Nox family in the filamentous fungus *Podospora anserina* : a new role in cellulose degradation. *Mol. Microbiol.* *74*, 480–496.

Bugg, T.D., and Rahmanpour, R. (2015). Enzymatic conversion of lignin into renewable chemicals. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *29*, 10–17.

Burdsall, H. H. (1998). Taxonomy of industrially important white-rot fungi. *Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry*, 259-272.

Burdsall, H. H., & Eslyn, W. E. (1974). A new Phanerochaete with a chrysosporium imperfect state. *Mycotaxon*, *1(2)*, 123-133.

Burns, V.W. (1956). Temporal studies of cell division. I. The influence of ploidy and temperature on cell division in *S. cerevisial*. *J. Cell. Physiol.* *47*, 357–375.

C

Calaça, F.J.S., and Xavier-Santos, S. (2016). New records of coprophilous ascomycetes (Fungi: Ascomycota) from Brazil and Neotropical Region. *Check List* *12*.

Camarero, S., Sarkar, S., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., and Martínez, Á.T. (1999). Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *J. Biol. Chem.* *274*, 10324–10330.

Canale-Parola, E. (1970). Biology of the sugar-fermenting Sarcinae. *Bacteriol. Rev.* *34*, 82-97.

- Caracuel, Z., Martínez-Rocha, A.L., Di Pietro, A., Madrid, M.P., and Roncero, M.I.G. (2005). *Fusarium oxysporum* gas1 encodes a putative β -1, 3-glucanoyltransferase required for virulence on tomato plants. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *18*, 1140–1147.
- Carmichael, J.W. (1962). *Chrysosporium* and some other aleuriosporic hyphomycetes. *Can. J. Bot.* *40*, 1137–1173.
- Carreiro, M.M., Sinsabaugh, R.L., Repert, D.A., and Parkhurst, D.F. (2000). Microbial enzyme shifts explain litter decay responses to simulated nitrogen deposition. *Ecology* *81*, 2359–2365.
- Cavazzini, D., Meschi, F., Corsini, R., Bolchi, A., Rossi, G.L., Einsle, O., and Ottonello, S. (2013). Autoproteolytic Activation of a Symbiosis-regulated Truffle Phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* *288*, 1533–1547.
- Chakraborty, B.N., Patterson, N.A., and Kapoor, M. (1991). An electroporation-based system for high-efficiency transformation of germinated conidia of filamentous fungi. *Can. J. Microbiol.* *37*, 858–863.
- Chen, M., Xu, P., Zeng, G., Yang, C., Huang, D., and Zhang, J. (2015). Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. *Biotechnol. Adv.* *33*, 745–755.
- Chen, X., Knight, D.P., and Vollrath, F. (2002). Rheological Characterization of *Nephila* Spidroin Solution. *Biomacromolecules* *3*, 644–648.
- Chiti, F., and Dobson, C.M. (2017). Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu. Rev. Biochem.* *86*, 35.1-35.42.
- Couturier, M., Tangthirasunun, N., Ning, X., Brun, S., Gautier, V., Bennati-Granier, C., Silar, P., and Berrin, J.-G. (2016). Plant biomass degrading ability of the coprophilic ascomycete fungus *Podospora anserina*. *Biotechnol. Adv.* *34*, 976–983.
- Crane, P.R., Friis, E.M., and Pedersen, K.R. (1995). The origin and early diversification of angiosperms. *Nature* *374*, 27–33.
- Cziferszky, A., Mach, R.L., and Kubicek, C.P. (2002). Phosphorylation Positively Regulates DNA Binding of the Carbon Catabolite Repressor Cre1 of *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *J. Biol. Chem.* *277*, 14688–14694.

D

- Daly, R., and Hearn, M.T.W. (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.* *18*, 119–138.

- Daniel, G. (1994). Use of electron microscopy for aiding our understanding of wood biodegradation. *FEMS Microbiol. Rev.* *13*, 199–233.
- Daniel, G., Volc, J., and Kubatova, E. (1994). Pyranose oxidase, a major source of H₂O₂ during wood degradation by *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, and *Oudemansiella mucida*. *Appl. Environ. Microbiol.* *60*, 2524–2532.
- Danneel, H.-J., Rössner, E., Zeeck, A., and Giffhorn, F. (1993). Purification and characterization of a pyranose oxidase from the basidiomycete *Peniophora gigantea* and chemical analyses of its reaction products. *FEBS J.* *214*, 795–802.
- Daou, M., and Faulds, C.B. (2017). Glyoxal oxidases: their nature and properties. *World J. Microbiol. Biotechnol.* *33*: 87.
- Daou, M., Piumi, F., Cullen, D., Record, E., and Faulds, C.B. (2016). Heterologous Production and Characterization of Two Glyoxal Oxidases from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl. Environ. Microbiol.* *82*, 4867–4875.
- Dashtban, M., Schraft, H., Syed, T.A., and Qin, W. (2010). Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* *1*, 36-50.
- Davidson, R.C., Cruz, M.C., Sia, R.A.L., Allen, B., Alspaugh, J.A., and Heitman, J. (2000). Gene Disruption by Biolistic Transformation in Serotype D Strains of *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet. Biol.* *29*, 38–48.
- De Koker, T.H., Nakasone, K.K., Haarhof, J., Burdsall, H.H., and Janse, B.J.H. (2003). Phylogenetic relationships of the genus *Phanerochaete* inferred from the internal transcribed spacer region. *Mycol. Res.* *107*, 1032–1040.
- Delcour, J.A., Verachtert, H., Wagner, P., and Derdelinckx, G. (2015). Comparison of structure, sequence, physical interactions and its effects on primary gushing among several class II hydrophobins. *Monatsschrift Für Brauwiss.* *68*, 38-45.
- Dhawale, S.S. (1993). Is an activator protein-2-like transcription factor involved in regulating gene expression during nitrogen limitation in fungi? *Appl. Environ. Microbiol.* *59*, 2335–2338.
- Dicko, C., Kenney, J.M., Knight, D., and Vollrath, F. (2004). Transition to a β -Sheet-Rich Structure in Spidroin in Vitro: The Effects of pH and Cations †. *Biochemistry (Mosc.)* *43*, 14080–14087.
- Djonovic, S., Vargas, W.A., Kolomiets, M.V., Horndeski, M., Wiest, A., and Kenerley, C.M. (2007). A Proteinaceous Elicitor Sm1 from the Beneficial Fungus *Trichoderma virens* Is Required for Induced Systemic Resistance in Maize. *Plant Physiol.* *145*, 875–889.
- Douzery, E.J., Snell, E.A., Baptiste, E., Delsuc, F., and Philippe, H. (2004). The timing of eukaryotic evolution: does a relaxed molecular clock reconcile proteins and fossils? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 15386–15391.

Druzhinina, I.S., and Kubicek, C.P. (2017). Genetic engineering of *Trichoderma reesei* cellulases and their production. *Microb. Biotechnol.* *10*, 1485-1499.

Dudani, S.N., Mahesh, M.K., Chandran, M.S., and Ramchandra, T.V. (2014). Pteridophyte diversity in wet evergreen forests of Sakleshpur in Central Western Ghats. *Ind J PltSci* *3*, 28–39.

Durán, N., and Esposito, E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Appl. Catal. B Environ.* *28*, 83–99.

Durand, R., Rasclé, C., Fischer, M., and Fèvre, M. (1997). Transient expression of the β -glucuronidase gene after biolistic transformation of the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Curr. Genet.* *31*, 158–161.

Duzgunes, N., de Ilarduya, C., Simões, S., Zhdanov, R.I., Konopka, K., and de Lima, M.C. (2003). Cationic liposomes for gene delivery: novel cationic lipids and enhancement by proteins and peptides. *Curr. Med. Chem.* *10*, 1213–1220.

E

Emiliani, G., Fondi, M., Fani, R., and Gribaldo, S. (2009). A horizontal gene transfer at the origin of phenylpropanoid metabolism: a key adaptation of plants to land. *Biol. Direct* *4*, 7.

Espagne, E., Lespinet, O., Malagnac, F., Da Silva, C., Jaillon, O., Porcel, B.M., Couloux, A., Aury, J.-M., Ségurens, B., Poulain, J., et al. (2008). The genome sequence of the model ascomycete fungus *Podospora anserina*. *Genome Biol.* *9*, R77.

Evans, C.S., Dutton, M.V., Guillén, F., and Veness, R.G. (1994). Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* *13*, 235–240.

Ewert, K.K., Zidovska, A., Ahmad, A., Boussein, N.F., Evans, H.M., McAllister, C.S., Samuel, C.E., and Safinya, C.R. (2010). Cationic liposome-nucleic acid complexes for gene delivery and silencing: pathways and mechanisms for plasmid DNA and siRNA. *Top. Curr. Chem.* *296*, 191–226.

F

Farmer, V.C., Henderson, M.E., and Russell, J.D. (1960). Aromatic-alcohol-oxidase activity in the growth medium of *Polystictus versicolor*. *Biochem. J.* *74*, 257-262.

Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., and Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 7413–7417.

Fernández-Fueyo, E., Castanera, R., Ruiz-Dueñas, F.J., López-Lucendo, M.F., Ramírez, L., Pisabarro, A.G., and Martínez, A.T. (2014). Ligninolytic peroxidase gene expression by *Pleurotus ostreatus*: Differential regulation in lignocellulose medium and effect of temperature and pH. *Fungal Genet. Biol.* 72, 150–161.

Ferreira, P., Hernández-Ortega, A., Herguedas, B., Rencoret, J., Gutiérrez, A., Martínez, M.J., Jiménez-Barbero, J., Medina, M., and Martínez, Á.T. (2010). Kinetic and chemical characterization of aldehyde oxidation by fungal aryl-alcohol oxidase. *Biochem. J.* 425, 585–593.

Ferreira, P., Hernández-Ortega, A., Lucas, F., Carro, J., Herguedas, B., Borrelli, K.W., Guallar, V., Martínez, A.T., and Medina, M. (2015). Aromatic stacking interactions govern catalysis in aryl-alcohol oxidase. *FEBS J.* 282, 3091–3106.

Feyder, S., De Craene, J.-O., Bär, S., Bertazzi, D., and Friant, S. (2015). Membrane Trafficking in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Model. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 1509–1525.

Filley, T.R., Blanchette, R.A., Simpson, E., and Fogel, M.L. (2001). Nitrogen cycling by wood decomposing soft-rot fungi in the “King Midas tomb,” Gordion, Turkey. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 13346–13350.

Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., and Merrick, J.M. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269, 496–512.

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

Fontaine, T., Mouyna, I., Hartland, R.P., Paris, S., and Latgé, J.P. (1997). From the surface to the inner layer of the fungal cell wall. *Biochem. Soc. Trans.* 25, 194–199.

Frankland, J.C. (1998). Fungal succession unravelling the unpredictable. *Mycol. Res.* 102, 1–15.

Frías, M., González, C., and Brito, N. (2011). BcSpl1, a cerato-platanin family protein, contributes to *Botrytis cinerea* virulence and elicits the hypersensitive response in the host. *New Phytol.* 192, 483–495.

Frischmann, A., Neudl, S., Gaderer, R., Bonazza, K., Zach, S., Gruber, S., Spadiut, O., Friedbacher, G., Grothe, H., and Seidl-Seiboth, V. (2013). Self-assembly at Air/Water Interfaces and Carbohydrate Binding Properties of the Small Secreted Protein EPL1 from the fungus *Trichoderma atroviride*. *J. Biol. Chem.* 288, 4278–4287.

G

- Gaderer, R., Bonazza, K., and Seidl-Seiboth, V. (2014). Cerato-platanins: a fungal protein family with intriguing properties and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *98*, 4795–4803.
- Gianfreda, L., and Rao, M.A. (2004). Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme Microb. Technol.* *35*, 339–354.
- Givaudan, A., Effosse, A., Faure, D., Potier, P., Bouillant, M.-L., and Bally, R. (1993). Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: evidence for laccase activity in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiol. Lett.* *108*, 205–210.
- Glenn, J.K., and Gold, M.H. (1985). Purification and characterization of an extracellular Mn (II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* *242*, 329–341.
- Goedegebuur, F., Fowler, T., Phillips, J., van der Kley, P., van Solingen, P., Dankmeyer, L., and Power, S. (2002). Cloning and relational analysis of 15 novel fungal endoglucanases from family 12 glycosyl hydrolase. *Curr. Genet.* *41*, 89–98.
- Gold, M.H., Mayfield, M.B., Cheng, T.M., Krisnangkura, K., Shimada, M., Enoki, A., and Glenn, J.K. (1982). A *Phanerochaete chrysosporium* mutant defective in lignin degradation as well as several other secondary metabolic functions. *Arch. Microbiol.* *132*, 115–122.
- Gold, M.H., Cheng, T.M., and Alic, M. (1983). Formation, Fusion, and Regeneration of Protoplasts from Wild-Type and Auxotrophic Strains of the White Rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* *46*, 260–263.
- Gomez-Toribio, V., Garcia-Martin, A.B., Martinez, M.J., Martinez, A.T., and Guillen, F. (2009). Induction of Extracellular Hydroxyl Radical Production by White-Rot Fungi through Quinone Redox Cycling. *Appl. Environ. Microbiol.* *75*, 3944–3953.
- Goodell, B. (2003). Brown-Rot Fungal Degradation of Wood: Our Evolving View. In *Wood Deterioration and Preservation*, B. Goodell, D.D. Nicholas, and T.P. Schultz, eds. (Washington, DC: American Chemical Society), pp. 97–118.
- Gradstein, S.R., Churchill, S.P., and Salazar Allen, N. (2001). *Guide to the Bryophytes of tropical America* (Bronx, N.Y: New York Botanical Garden Press).
- Grell, M.N., Mouritzen, P., and Giese, H. (2003). A *Blumeria graminis* gene family encoding proteins with a C-terminal variable region with homologues in pathogenic fungi. *Gene* *311*, 181–192.
- Groenning, M. (2010). Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils—current status. *J. Chem. Biol.* *3*, 1–18.

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

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

H

Haemmerli, S.D., Leisola, M.S., Sanglard, D., and Fiechter, A. (1986). Oxidation of benzo (a) pyrene by extracellular ligninases of *Phanerochaete chrysosporium*. Veratryl alcohol and stability of ligninase. *J. Biol. Chem.* *261*, 6900–6903.

Haemmerli, S.D., Schoemaker, H.E., Schmidt, H.W., and Leisola, M.S. (1987). Oxidation of veratryl alcohol by the lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* Involvement of activated oxygen. *FEBS Lett.* *220*, 149–154.

Hamed, S.A.M. (2013). In-vitro studies on wood degradation in soil by soft-rot fungi: *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* *78*, 98–102.

Hammel, K., and Cullen, D. (2008). Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Curr. Opin. Plant Biol.* *11*, 349–355.

Hammel, K.E., Jensen, K.A., Mozuch, M.D., Landucci, L.L., Tien, M., and Pease, E.A. (1993). Ligninolysis by a purified lignin peroxidase. *J. Biol. Chem.* *268*, 12274–12281.

Hammel, K.E., Kapich, A.N., Jensen, K.A., and Ryan, Z.C. (2002). Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. *Enzyme Microb. Technol.* *30*, 445–453.

Harvey, P.J., Schoemaker, H.E., and Palmer, J.M. (1986). Veratryl alcohol as a mediator and the role of radical cations in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* *195*, 242–246.

Heim, M., Keerl, D., and Scheibel, T. (2009). Spider Silk: From Soluble Protein to Extraordinary Fiber. *Angew. Chem. Int. Ed.* *48*, 3584–3596.

Hemsworth, G.R., Henrissat, B., Davies, G.J., and Walton, P.H. (2014). Discovery and characterization of a new family of lytic polysaccharide monooxygenases. *Nat. Chem. Biol.* *10*, 122–126.

Henriksson, G., Zhang, L., Li, J., Ljungquist, P., Reitberger, T., Pettersson, G., and Johansson, G. (2000). Is cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* a lignin degrading enzyme? *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* *1480*, 83–91.

Henrissat, B., and Davies, G. (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *7*, 637–644.

Hernández-Ortega, A., Ferreira, P., and Martínez, A.T. (2012). Fungal aryl-alcohol oxidase: a peroxide-producing flavoenzyme involved in lignin degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *93*, 1395–1410.

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

I

Idnurm, A., Reedy, J.L., Nussbaum, J.C., and Heitman, J. (2004). *Cryptococcus neoformans* Virulence Gene Discovery through Insertional Mutagenesis. *Eukaryot. Cell* *3*, 420–429.

Izumi, Y., Furuya, Y., and Yamada, H. (1990). Purification and Properties of Pyranose Oxidase from Basidiomycetous Fungus No. 52. *Agric. Biol. Chem.* *54*, 1393–1399.

J

James, T.Y., and Berbee, M.L. (2012). No jacket required - new fungal lineage defies dress code: Recently described zoosporic fungi lack a cell wall during trophic phase. *BioEssays* *34*, 94–102.

Janse, B.J., Gaskell, J., Akhtar, M., and Cullen, D. (1998). Expression of *Phanerochaete chrysosporium* genes encoding lignin peroxidases, manganese peroxidases, and glyoxal oxidase in wood. *Appl. Environ. Microbiol.* *64*, 3536–3538.

Janusz, G., Kucharzyk, K.H., Pawlik, A., Staszczak, M., and Paszczynski, A.J. (2013). Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. *Enzyme Microb. Technol.* *52*, 1–12.

Johansson, T., Nyman, P.O., and Cullen, D. (2002). Differential Regulation of *mnp2*, a New Manganese Peroxidase-Encoding Gene from the Ligninolytic Fungus *Trametes versicolor* PRL 572. *Appl. Environ. Microbiol.* *68*, 2077–2080.

K

Kaal, E.E., de Jong, E.D., and Field, J.A. (1993). Stimulation of ligninolytic peroxidase activity by nitrogen nutrients in the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. *Appl. Environ. Microbiol.* *59*, 4031–4036.

Kaal, E.E., Field, J.A., and Joyce, T.W. (1995). Increasing ligninolytic enzyme activities in several white-rot basidiomycetes by nitrogen-sufficient media. *Bioresour. Technol.* *53*, 133–139.

Kamali, M., and Khodaparast, Z. (2015). Review on recent developments on pulp and paper mill wastewater treatment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* *114*, 326–342.

- Kamei, M., Yamashita, K., Takahashi, M., Fukumori, F., Ichiishi, A., and Fujimura, M. (2013). Deletion and expression analysis of beta-(1,3)-glucanoyltransferase genes in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* *52*, 65–72.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L.-J., Brefort, T., Saville, B.J., Banuett, F., Kronstad, J.W., Gold, S.E., Müller, O., et al. (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* *444*, 97–101.
- Kantvilas, G. (2003). *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. Ninth Edition Edited by P. M. Kirk, P. F. Cannon, J. C. David and J. A. Stalpers. 2001. Wallingford: CAB International. Pp. 655. ISBN 0 85199 377 X. Price: £49.95, US\$90.00. *The Lichenologist* *35*, 365–366.
- Karlsson, M., Stenlid, J., and Olson, A. (2007). Two hydrophobin genes from the conifer pathogen *Heterobasidion annosum* are expressed in aerial hyphae. *Mycologia* *99*, 227–231.
- Kawai, S., Umezawa, T., and Higuchi, T. (1988a). Degradation mechanisms of phenolic β -1 lignin substructure model compounds by laccase of *Coriolus versicolor*. *Arch. Biochem. Biophys.* *262*, 99–110.
- Kawai, S., Umezawa, T., Shimada, M., and Higuchi, T. (1988b). Aromatic ring cleavage of 4,6-di(tert-butyl)guaiacol, a phenolic lignin model compound, by laccase of *Coriolus versicolor*. *FEBS Lett.* *236*, 309–311.
- Kawai, S., Nakagawa, M., and Ohashi, H. (2002). Degradation mechanisms of a nonphenolic β -O-4 lignin model dimer by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *Enzyme Microb. Technol.* *30*, 482–489.
- Kebbi-Benkeder, Z., Colin, F., Dumarçay, S., and Gérardin, P. (2015). Quantification and characterization of knotwood extractives of 12 European softwood and hardwood species. *Ann. For. Sci.* *72*, 277–284.
- Kersten, P., and Cullen, D. (2007). Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Fungal Genet. Biol.* *44*, 77–87.
- Kersten, P.J., and Kirk, T.K. (1987). Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* *169*, 2195–2201.
- Kersten, P.J., Kalyanaraman, B., Hammel, K.E., Reinhammar, B., and Kirk, T.K. (1990). Comparison of lignin peroxidase, horseradish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes. *Biochem. J.* *268*, 475–480.
- Kido, R., Takeeda, M., Manabe, M., Miyagawa, Y., Itakura, S., and Tanaka, H. (2015). Presence of Extracellular NAD⁺ and NADH in Cultures of Wood-Degrading Fungi. *Biocontrol Sci.* *20*, 105–113.

Kirk, T.K., and Farrell, R.L. (1987). Enzymatic “Combustion”: The Microbial Degradation of Lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* *41*, 465–505.

Kirk, T.K., Schultz, E., Connors, W.J., Lorenz, L.F., and Zeikus, J.G. (1978). Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* *117*, 277–285.

Kishi, K., Wariishi, H., Marquez, L., Dunford, H.B., and Gold, M.H. (1994). Mechanism of manganese peroxidase compound II reduction. Effect of organic acid chelators and pH. *Biochemistry (Mosc.)* *33*, 8694–8701.

Kjaergaard, C.H., Qayyum, M.F., Wong, S.D., Xu, F., Hemsworth, G.R., Walton, D.J., Young, N.A., Davies, G.J., Walton, P.H., Johansen, K.S., et al. (2014). Spectroscopic and computational insight into the activation of O₂ by the mononuclear Cu center in polysaccharide monooxygenases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 8797–8802.

Kracher, D., Scheiblbrandner, S., Felice, A.K.G., Breslmayr, E., Preims, M., Ludwicka, K., Haltrich, D., Eijsink, V.G.H., and Ludwig, R. (2016). Extracellular electron transfer systems fuel cellulose oxidative degradation. *Science* *352*, 1098–1101.

Kubicek, C.P., Baker, S.E., Gamauf, C., Kenerley, C.M., and Druzhinina, I.S. (2008). Purifying selection and birth-and-death evolution in the class II hydrophobin gene families of the ascomycete *Trichoderma/Hypocrea*. *BMC Evol. Biol.* *8*, 4.

Kuga, S., and Malcolm Brown, R. (1988). Silver labeling of the reducing ends of bacterial cellulose. *Carbohydr. Res.* *180*, 345–350.

Kundu, B., Rajkhowa, R., Kundu, S.C., and Wang, X. (2013). Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *65*, 457–470.

Kurek, B., and Kersten, P.J. (1995). Physiological regulation of glyoxal oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* by peroxidase systems. *Enzyme Microb. Technol.* *17*, 751–756.

Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A., and Gold, M.H. (1984). Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* *169*, 247–250.

Kwan, A.H.Y., Winefield, R.D., Sunde, M., Matthews, J.M., Haverkamp, R.G., Templeton, M.D., and Mackay, J.P. (2006). Structural basis for rodlet assembly in fungal hydrophobins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 3621–3626.

L

Langston, J.A., Shaghasi, T., Abbate, E., Xu, F., Vlasenko, E., and Sweeney, M.D. (2011). Oxidoreductive Cellulose Depolymerization by the Enzymes Cellobiose Dehydrogenase and Glycoside Hydrolase 61. *Appl. Environ. Microbiol.* *77*, 7007–7015.

Lashuel, H.A., Petre, B.M., Wall, J., Simon, M., Nowak, R.J., Walz, T., and Lansbury, P.T. (2002). α -Synuclein, Especially the Parkinson's Disease-associated Mutants, Forms Pore-like Annular and Tubular Protofibrils. *J. Mol. Biol.* 322, 1089–1102.

Leatham, G.F., and Kent Kirk, T. (1983). Regulation of ligninolytic activity by nutrient nitrogen in white-rot basidiomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* 16, 65–67.

Lecellier, G., and Silar, P. (1994). Rapid methods for nucleic acids extraction from Petri dish-grown mycelia. *Current genetics*, 25(2), 122-123.

Leisola, M.S.A., Ulmer, D.C., Waldner, R., and Fiechter, A. (1984). Role of veratryl alcohol in lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biotechnol.* 1, 331–339.

Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtaś-Wasilewska, M., Cho, N.-S., Hofrichter, M., and Rogalski, J. (1999). Biodegradation of Lignin by White Rot Fungi. *Fungal Genet. Biol.* 27, 175–185.

Li, D., Alic, M., and Gold, M.H. (1994). Nitrogen regulation of lignin peroxidase gene transcription. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3447–3449.

Li, L., Popko, J.L., Umezawa, T., and Chiang, V.L. (2000). 5-Hydroxyconiferyl aldehyde modulates enzymatic methylation for syringyl monolignol formation, a new view of monolignol biosynthesis in angiosperms. *J. Biol. Chem.* 275, 6537–6545.

Li, L., Cheng, X.F., Leshkevich, J., Umezawa, T., Harding, S.A., and Chiang, V.L. (2001). The last step of syringyl monolignol biosynthesis in angiosperms is regulated by a novel gene encoding sinapyl alcohol dehydrogenase. *Plant Cell* 13, 1567–1586.

Linder, M.B. (2009). Hydrophobins: Proteins that self assemble at interfaces. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 14, 356–363.

Lindgren, R.M., and Eslyn, W.E. (1961). Biological deterioration of pulpwood and pulp chips during storage. *TAPPI J.* 44, 419–429.

Liu, Y.W., Lee, S.W., Lee, F.J.S. (2006). Arl1p is involved in transport of the GPI-anchored protein Gas1p from the late Golgi to the plasma membrane. *J. Cell Sci.* 119, 3845–3855.

Lorito, M., Hayes, C.K., Di Pietro, A., and Harman, G.E. (1993). Biolistic transformation of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* using plasmid and genomic DNA. *Curr. Genet.* 24, 349–356.

M

Mäkelä, M.R., Bouzid, O., Robl, D., Post, H., Peng, M., Heck, A., Altelaar, M., and de Vries, R.P. (2017). Cultivation of *Podospora anserina* on soybean hulls results in an efficient enzyme cocktail for plant biomass hydrolysis. *New Biotechnol.* 37, 162–171.

- Malherbe, S., and Cloete, T.E. (2002). Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* *1*, 105–114.
- Martin, F., Aerts, A., Ahrén, D., Brun, A., Danchin, E.G.J., Duchaussoy, F., Gibon, J., Kohler, A., Lindquist, E., Pereda, V., et al. (2008). The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* *452*, 88–92.
- Martin, F.M., Uroz, S., and Barker, D.G. (2017). Ancestral alliances: Plant mutualistic symbioses with fungi and bacteria. *Science* *356*, eaad4501.
- Martinez, D., Larrondo, L.F., Putnam, N., Gelpke, M.D.S., Huang, K., Chapman, J., Helfenbein, K.G., Ramaiya, P., Detter, J.C., Larimer, F., et al. (2004). Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nat. Biotechnol.* *22*, 695–700.
- Martins, T.M., Hartmann, D.O., Planchon, S., Martins, I., Renaut, J., and Silva Pereira, C. (2015). The old 3-oxoadipate pathway revisited: New insights in the catabolism of aromatics in the saprophytic fungus *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* *74*, 32–44.
- McCarter, J.D., and Withers, G.S. (1994). Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *4*, 885–892.
- de Medina-Redondo, M., Arnáiz-Pita, Y., Clavaud, C., Fontaine, T., del Rey, F., Latgé, J.P., and Vázquez de Aldana, C.R. (2010). $\beta(1,3)$ -Glucanoyl-Transferase Activity Is Essential for Cell Wall Integrity and Viability of *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS ONE* *5*, e14046.
- Misteli, T., and Spector, D.L. (1997). Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. *Nat. Biotechnol.* *15*, 961–964.
- Morant, M., Jorgensen, K., Schaller, H., Pinot, F., Moller, B.L., Werck-Reichhart, D., and Bak, S. (2007). CYP703 Is an Ancient Cytochrome P450 in Land Plants Catalyzing in-Chain Hydroxylation of Lauric Acid to Provide Building Blocks for Sporopollenin Synthesis in Pollen. *Plant cell online* *19*, 1473–1487.
- Morisseau, C., and Hammock, B.D. (2005). Epoxide hydrolases: Mechanisms, Inhibitor Designs, and Biological Roles. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *45*, 311–333.
- Mottiar, Y., Vanholme, R., Boerjan, W., Ralph, J., and Mansfield, S.D. (2016). Designer lignins: harnessing the plasticity of lignification. *Curr. Opin. Biotechnol.* *37*, 190–200.
- Mouyna, I., Monod, M., Fontaine, T., Henrissat, B., Léchenne, B., and Latgé, J.-P. (2000). Identification of the catalytic residues of the first family of β (1–3) glucanoyltransferases identified in fungi. *Biochem. J.* *347*, 741–747.
- Müller, O., Schreier, P.H., and Uhrig, J.F. (2008). Identification and characterization of secreted and pathogenesis-related proteins in *Ustilago maydis*. *Mol. Genet. Genomics* *279*, 27–39.

Munk, L., Sitarz, A.K., Kalyani, D.C., Mikkelsen, J.D., and Meyer, A.S. (2015). Can laccases catalyze bond cleavage in lignin? *Biotechnol. Adv.* 33, 13–24.

N

Narra, M., Dixit, G., Divecha, J., Kumar, K., Madamwar, D., and Shah, A.R. (2014). Production, purification and characterization of a novel GH 12 family endoglucanase from *Aspergillus terreus* and its application in enzymatic degradation of delignified rice straw. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 88, 150–161.

Nelson, R., Sawaya, M.R., Balbirnie, M., Madsen, A.Ø., Riek, C., Grothe, R., and Eisenberg, D. (2005). Structure of the cross- β spine of amyloid-like fibrils. *Nature* 435, 773–778.

Nevalainen, K.M.H., Te'o, V.S.J., and Bergquist, P.L. (2005). Heterologous protein expression in filamentous fungi. *Trends Biotechnol.* 23, 468–474.

Nielsen, M.T., Nielsen, J.B., Anyaogu, D.C., Holm, D.K., Nielsen, K.F., Larsen, T.O., and Mortensen, U.H. (2013). Heterologous Reconstitution of the Intact Geodin Gene Cluster in *Aspergillus nidulans* through a Simple and Versatile PCR Based Approach. *PLoS ONE* 8, e72871.

O

Ohtaki, S., Maeda, H., Takahashi, T., Yamagata, Y., Hasegawa, F., Gomi, K., Nakajima, T., and Abe, K. (2006). Novel Hydrophobic Surface Binding Protein, HsbA, Produced by *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2407–2413.

de Oliveira, A.L., Gallo, M., Pazzagli, L., Benedetti, C.E., Cappugi, G., Scala, A., Pantera, B., Spisni, A., Pertinhez, T.A., and Cicero, D.O. (2011). The Structure of the Elicitor Ceratoplatanin (CP), the First Member of the CP Fungal Protein Family, Reveals a Double $\psi\beta$ -Barrel Fold and Carbohydrate Binding. *J. Biol. Chem.* 286, 17560–17568.

Orr-Weaver, T.L., Szostak, J.W., and Rothstein, R.J. (1981). Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 6354–6358.

Osono, T. (2007). Ecology of ligninolytic fungi associated with leaf litter decomposition. *Ecol. Res.* 22, 955–974.

P

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

Pauly, M., Gille, S., Liu, L., Mansoori, N., de Souza, A., Schultink, A., and Xiong, G. (2013). Hemicellulose biosynthesis. *Planta* 238, 627–642.

- Pazzagli, L., Cappugi, G., Manao, G., Camici, G., Santini, A., and Scala, A. (1999). Purification, characterization, and amino acid sequence of cerato-platanin, a new phytotoxic protein from *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platanii*. *J. Biol. Chem.* *274*, 24959–24964.
- Pazzagli, L., Zoppi, C., Carresi, L., Tiribilli, B., Sbrana, F., Schiff, S., Pertinhez, T.A., Scala, A., and Cappugi, G. (2009). Characterization of ordered aggregates of cerato-platanin and their involvement in fungus–host interactions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1790*, 1334–1344.
- Pellegrin, C., Morin, E., Martin, F.M., and Veneault-Fourrey, C. (2015). Comparative Analysis of Secretomes from Ectomycorrhizal Fungi with an Emphasis on Small-Secreted Proteins. *Front. Microbiol.* *6*: 1278.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T., and Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.* *5*, 53–63.
- Pettersen, R.C. (1984). The chemical composition of wood. (The chemistry of solid wood. *2*, 57-126.
- Phillips, C.M., Beeson, W.T., Cate, J.H., and Marletta, M.A. (2011). Cellobiose Dehydrogenase and a Copper-Dependent Polysaccharide Monooxygenase Potentiate Cellulose Degradation by *Neurospora crassa*. *ACS Chem. Biol.* *6*, 1399–1406.
- Plett, J.M., Kemppainen, M., Kale, S.D., Kohler, A., Legué, V., Brun, A., Tyler, B.M., Pardo, A.G., and Martin, F. (2011). A Secreted Effector Protein of *Laccaria bicolor* Is Required for Symbiosis Development. *Curr. Biol.* *21*, 1197–1203.
- Plett, J.M., Gibon, J., Kohler, A., Duffy, K., Hoegger, P.J., Velagapudi, R., Han, J., Kües, U., Grigoriev, I.V., and Martin, F. (2012). Phylogenetic, genomic organization and expression analysis of hydrophobin genes in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *Fungal Genet. Biol.* *49*, 199–209.
- Plett, J.M., Daguerre, Y., Wittulsky, S., Vayssieres, A., Deveau, A., Melton, S.J., Kohler, A., Morrell-Falvey, J.L., Brun, A., Veneault-Fourrey, C., et al. (2014). Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus *Laccaria bicolor* stabilizes the *Populus* JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 8299–8304.
- Popescu, C.-M., Mihaela Tibirna, C., Manoliu, A.L., Gradinariu, P., and Vasile, C. (2011). Microscopic study of lime wood decayed by *Chaetomium globosum*. *Cellul. Chem. Technol.* *45*, 565-569.
- Popper, Z. (2008). Evolution and diversity of green plant cell walls. *Curr. Opin. Plant Biol.* *11*, 286–292.

Prasanna, G.L., and Panda, T. (1997). Electroporation: basic principles, practical considerations and applications in molecular biology. *Bioprocess Biosyst. Eng.* *16*, 261–264.

Purahong, W., Wubet, T., Lentendu, G., Schloter, M., Pecyna, M.J., Kapturska, D., Hofrichter, M., Krüger, D., and Buscot, F. (2016). Life in leaf litter: novel insights into community dynamics of bacteria and fungi during litter decomposition. *Mol. Ecol.* *25*, 4059–4074.

R

Ragni, E., Fontaine, T., Gissi, C., Latgè, J.P., and Popolo, L. (2007). The Gas family of proteins of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization and evolutionary analysis. *Yeast* *24*, 297–308.

Ram, A.F.J., and Klis, F.M. (2006). Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. *Nat. Protoc.* *1*, 2253–2256.

Renault, H., Alber, A., Horst, N.A., Basilio Lopes, A., Fich, E.A., Kriegshauser, L., Wiedemann, G., Ullmann, P., Herrgott, L., Erhardt, M., et al. (2017). A phenol-enriched cuticle is ancestral to lignin evolution in land plants. *Nat. Commun.* *8*, 14713.

Rhodes, C.J. (2014). Mycoremediation (bioremediation with fungi) – growing mushrooms to clean the earth. *Chem. Speciat. Bioavailab.* *26*, 196–198.

Richardson, M.J. (2001). Diversity and occurrence of coprophilous fungi. *Mycol. Res.* *105*, 387–402.

Ruggaber, T.P., and Talley, J.W. (2006). Enhancing bioremediation with enzymatic processes: a review. *Pract. Period. Hazard. Toxic Radioact. Waste Manag.* *10*, 73–85.

Ruiz-Díez, B. (2002). Strategies for the transformation of filamentous fungi. *J. Appl. Microbiol.* *92*, 189–195.

Ruiz-Deñás, F.J., Camarero, S., Pérez-Boada, M., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (2001). A new versatile peroxidase from *Pleurotus*. *Biochem. Soc. Trans.* *29*, 116–122.

Ruiz-Deñás, F.J., Morales, M., Pérez-Boada, M., Choinowski, T., Martínez, M.J., Piontek, K., and Martínez, Á.T. (2007). Manganese Oxidation Site in *Pleurotus eryngii* Versatile Peroxidase: A Site-Directed Mutagenesis, Kinetic, and Crystallographic Study. *Biochemistry (Mosc.)* *46*, 66–77.

Ruiz-Deñás, F.J., Morales, M., Mate, M.J., Romero, A., Martínez, M.J., Smith, A.T., and Martínez, Á.T. (2008). Site-Directed Mutagenesis of the Catalytic Tryptophan Environment in *Pleurotus eryngii* Versatile Peroxidase. *Biochemistry (Mosc.)* *47*, 1685–1695.

Ruiz-Duenas, F.J., Morales, M., Garcia, E., Miki, Y., Martinez, M.J., and Martinez, A.T. (2009). Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. *J. Exp. Bot.* *60*, 441–452.

Ruocco, M., Lanzuise, S., Lombardi, N., Woo, S.L., Vinale, F., Marra, R., Varlese, R., Manganiello, G., Pascale, A., Scala, V., et al. (2015). Multiple Roles and Effects of a Novel *Trichoderma* Hydrophobin. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *28*, 167–179.

S

Sachs, I.B., Clark, I.T., and Pew, J.C. (1963). Investigation of lignin distribution in the cell wall of certain woods. In *Journal of Polymer Science: Polymer Symposia*, (Wiley Online Library), pp. 203–212.

Samalova, M., Mérida, H., Vilaplana, F., Bulone, V., Soanes, D.M., Talbot, N.J., and Gurr, S.J. (2017). The β -1,3-glucanosyltransferases (Gels) affect the structure of the rice blast fungal cell wall during appressorium-mediated plant infection. *Cell. Microbiol.* *19*, e12659.

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

Sanford, J.C., Klein, T.M., Wolf, E.D., and Allen, N. (1987). delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Part. Sci. Technol.* *5*, 27–37.

Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, C.A., Hutchison, C.A., Slocombe, P.M., and Smith, M. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* *265*, 687–695.

Schoemaker, H.E., Lundell, T.K., Hatakka, A.I., and Piontek, K. (1994). The oxidation of veratryl alcohol, dimeric lignin models and lignin by lignin peroxidase: The redox cycle revisited. *FEMS Microbiol. Rev.* *13*, 321–331.

Scholtmeijer, K., de Vocht, M.L., Rink, R., Robillard, G.T., and Wösten, H.A.B. (2009). Assembly of the Fungal SC3 Hydrophobin into Functional Amyloid Fibrils Depends on Its Concentration and Is Promoted by Cell Wall Polysaccharides. *J. Biol. Chem.* *284*, 26309–26314.

Schopf, J.W., Kudryavtsev, A.B., Agresti, D.G., Wdowiak, T.J., and Czaja, A.D. (2002). Laser-Raman imagery of Earth's earliest fossils. *Nature* *416*, 73–76.

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

Sharma, P., Goel, R., and Capalash, N. (2007). Bacterial laccases. *World J. Microbiol. Biotechnol.* *23*, 823–832.

Shematek, E.M., and Cabib, E. (1980). Biosynthesis of the yeast cell wall. II. Regulation of beta-(1 leads to 3) glucan synthetase by ATP and GTP. *J. Biol. Chem.* *255*, 895–902.

Shida, Y., Furukawa, T., and Ogasawara, W. (2016). Deciphering the molecular mechanisms behind cellulase production in *Trichoderma reesei*, the hyper-cellulolytic filamentous fungus. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *80*, 1712–1729.

Silar, P. (1995). Two new easy to use vectors for transformations. *Fungal Genetics Reports*, *42*(1), 73.

Sillo, F., Gissi, C., Chignoli, D., Ragni, E., Popolo, L., and Balestrini, R. (2013). Expression and phylogenetic analyses of the Gel/Gas proteins of *Tuber melanosporum* provide insights into the function and evolution of glucan remodeling enzymes in fungi. *Fungal Genet. Biol.* *53*, 10–21.

Singh, D., and Chen, S. (2008). The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *81*, 399–417.

Sitarz, A.K., Mikkelsen, J.D., and Meyer, A.S. (2016). Structure, functionality and tuning up of laccases for lignocellulose and other industrial applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* *36*, 70–86.

Skyba, O., Niemz, P., and Schwarze, F.W.M.R. (2008). Degradation of thermo-hygro-mechanically (THM)-densified wood by soft-rot fungi. *Holzforschung* *62*, 277-283.

Šnajdr, J., Cajthaml, T., Valášková, V., Merhautová, V., Petránková, M., Spetz, P., Leppänen, K., and Baldrian, P. (2011). Transformation of *Quercus petraea* litter: successive changes in litter chemistry are reflected in differential enzyme activity and changes in the microbial community composition. *FEMS Microbiol. Ecol.* *75*, 291–303.

Srebotnik, E., Messner, K., and Foisner, R. (1988). Penetrability of white rot-degraded pine wood by the lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* *54*, 2608–2614.

Stahl, J.D., Rasmussen, S.J., and Aust, S.D. (1995). Reduction of Quinones and Radicals by a Plasma Membrane Redox System of *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* *322*, 221–227.

Stricker, A.R., Grosstessner-Hain, K., Wurleitner, E., and Mach, R.L. (2006). Xyr1 (Xylanase Regulator 1) Regulates both the Hydrolytic Enzyme System and D-Xylose Metabolism in *Hypocrea jecorina*. *Eukaryot. Cell* *5*, 2128–2137.

Sundaramoorthy, M., Youngs, H.L., Gold, M.H., and Poulos, T.L. (2005). High-Resolution Crystal Structure of Manganese Peroxidase: Substrate and Inhibitor Complexes. *Biochemistry (Mosc.)* *44*, 6463–6470.

T

- Takahashi, T., Tanaka, T., Tsushima, Y., Muragaki, K., Uehara, K., Takeuchi, S., Maeda, H., Yamagata, Y., Nakayama, M., Yoshimi, A., et al. (2015). Ionic interaction of positive amino acid residues of fungal hydrophobin RolA with acidic amino acid residues of cutinase CutL1. *Mol. Microbiol.* *96*, 14–27.
- Takano, M., Nakamura, M., and Yamaguchi, M. (2010). Glyoxal oxidase supplies hydrogen peroxide at hyphal tips and on hyphal wall to manganese peroxidase of white-rot fungus *Phanerochaete crassa* WD1694. *J. Wood Sci.* *56*, 307–313.
- Takata, M., Sasaki, M.S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, A., and Takeda, S. (1998). Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J.* *17*, 5497–5508.
- Tanaka, H., Yoshida, G., Baba, Y., Matsumura, K., Wasada, H., Murata, J., Agawa, M., Itakura, S., and Enoki, A. (2007). Characterization of a hydroxyl-radical-producing glycoprotein and its presumptive genes from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biotechnol.* *128*, 500–511.
- Tatsumi, H., Murakami, S., Ogawa, Y., Masaki, A., Ishida, Y., Murakami, K., Kawabe, H., Arimura, H., Nakano, E., and Motai, H. (1991). Autoproteolytic processing and processing-dependent secretion of *Aspergillus oryzae* alkaline protease in yeast. *Agric. Biol. Chem.* *55*, 3099–3101.
- Telmo, C., and Lousada, J. (2011). The explained variation by lignin and extractive contents on higher heating value of wood. *Biomass Bioenergy* *35*, 1663–1667.
- Terauchi, Y., Kim, Y.-K., Tanaka, T., Nanatani, K., Takahashi, T., and Abe, K. (2017). Asp30 of *Aspergillus oryzae* cutinase CutL1 is involved in the ionic interaction with fungal hydrophobin RolA. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *81*, 1363–1368.
- Thuillier, A., Chibani, K., Belli, G., Herrero, E., Dumarcay, S., Gerardin, P., Kohler, A., Deroy, A., Dhalleine, T., Bchini, R., et al. (2014). Transcriptomic Responses of *Phanerochaete chrysosporium* to Oak Acetonic Extracts: Focus on a New Glutathione Transferase. *Appl. Environ. Microbiol.* *80*, 6316–6327.
- Thurston, C.F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* *140*, 19–26.
- Tien, M., and Kirk, T.K. (1988). Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. In *Methods in Enzymology*. *161*, 238–249.
- Torruella, G., de Mendoza, A., Grau-Bové, X., Antó, M., Chaplin, M.A., del Campo, J., Eme, L., Pérez-Cordón, G., Whipps, C.M., Nichols, K.M., et al. (2015). Phylogenomics Reveals Convergent Evolution of Lifestyles in Close Relatives of Animals and Fungi. *Curr. Biol.* *25*, 2404–2410.

Tsukamoto, K., Itakura, H., Sato, K., Fukuyama, K., Miura, S., Takahashi, S., Ikezawa, H., and Hosoya, T. (1999). Binding of Salicylhydroxamic Acid and Several Aromatic Donor Molecules to *Arthromyces ramosus* Peroxidase, Investigated by X-ray Crystallography, Optical Difference Spectroscopy, NMR Relaxation, Molecular Dynamics, and Kinetics. *Biochemistry (Mosc.)* *38*, 12558–12568.

Tucker, S.L., and Talbot, N.J. (2001). Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* *39*, 385–417.

V

Vaaje-Kolstad, G., Forsberg, Z., Loose, J.S., Bissaro, B., and Eijsink, V.G. (2017). Structural diversity of lytic polysaccharide monooxygenases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *44*, 67–76.

Valette, N., Benoit-Gelber, I., Falco, M.D., Wiebenga, A., de Vries, R.P., Gelhaye, E., and Morel-Rouhier, M. (2017a). Secretion of small proteins is species-specific within *Aspergillus* sp. *Microb. Biotechnol.* *10*, 323–329.

Valette, N., Perrot, T., Sormani, R., Gelhaye, E., and Morel-Rouhier, M. (2017b). Antifungal activities of wood extractives. *Fungal Biol. Rev.* *31*, 113–123.

Vaquero, M.E., Barriuso, J., Medrano, F.J., Prieto, A., and Martínez, M.J. (2015). Heterologous expression of a fungal sterol esterase/lipase in different hosts: Effect on solubility, glycosylation and production. *J. Biosci. Bioeng.* *120*, 637–643.

Várnai, A., Mäkelä, M.R., Djajadi, D.T., Rahikainen, J., Hatakka, A., and Viikari, L. (2014). Carbohydrate-Binding Modules of Fungal Cellulases. In *Advances in Applied Microbiology*. *88*, 103–165.

Vincent, D., Kohler, A., Claverol, S., Solier, E., Joets, J., Gibon, J., Lebrun, M.-H., Plomion, C., and Martin, F. (2012). Secretome of the Free-living Mycelium from the Ectomycorrhizal Basidiomycete *Laccaria bicolor*. *J. Proteome Res.* *11*, 157–171.

Voříšková, J., and Baldrian, P. (2013). Fungal community on decomposing leaf litter undergoes rapid successional changes. *ISME J.* *7*, 477–486.

de Vries, J., de Vries, S., Slamovits, C.H., Rose, L.E., and Archibald, J.M. (2017). How Embryophytic is the Biosynthesis of Phenylpropanoids and their Derivatives in Streptophyte Algae? *Plant Cell Physiol.* *58*, 934–945.

W

Wang, B., Yeun, L.H., Xue, J.-Y., Liu, Y., Ané, J.-M., and Qiu, Y.-L. (2010). Presence of three mycorrhizal genes in the common ancestor of land plants suggests a key role of mycorrhizas in the colonization of land by plants. *New Phytol.* *186*, 514–525.

- Wang, Y., Li, J., and Liu, A. (2017). Oxygen activation by mononuclear nonheme iron dioxygenases involved in the degradation of aromatics. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 22, 395–405.
- Wariishi, H., Akileswaran, L., and Gold, M.H. (1988). Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: spectral characterization of the oxidized states and the catalytic cycle. *Biochemistry (Mosc.)* 27, 5365–5370.
- Wariishi, H., Valli, K., and Gold, M.H. (1992). Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. *J. Biol. Chem.* 267, 23688–23695.
- Weng, J.-K., and Chapple, C. (2010). The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytol.* 187, 273–285.
- Weng, J.-K., Li, X., Stout, J., and Chapple, C. (2008). Independent origins of syringyl lignin in vascular plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 7887–7892.
- Wessels, J.G.H. (1996). Fungal hydrophobins: proteins that function at an interface. *Trends Plant Sci.* 1, 9–15.
- Wessels, J.G.H. (2000). Hydrophobins, unique fungal proteins. *Mycologist* 14, 153–159.
- Wessels, J.G., De Vries, O.M., Asgeirsdottir, S.A., and Schuren, F.H. (1991). Hydrophobin genes involved in formation of aerial hyphae and fruit bodies in *Schizophyllum*. *Plant Cell* 3, 793–799.
- Wicklow, D.T., Detroy, R.W., and Adams, S. (1980). Differential Modification of the Lignin and Cellulose Components in Wheat Straw by Fungal Colonists of Ruminant Dung: Ecological Implications. *Mycologia* 72, 1065-1076.
- Wilson, C., De Oliveira, G.S., Adriani, P.P., Chambergo, F.S., and Dias, M.V.B. (2017). Structure of a soluble epoxide hydrolase identified in *Trichoderma reesei*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* 1865, 1039–1045.
- Windeisen, E., and Wegener, G. (2009). Significance, Analysis and Potential of Utilization of Extractives from Wood: Different Aspects and Examples. *Mater. Sci. Forum* 599, 79–106.
- Wongnate, T., and Chaiyen, P. (2013). The substrate oxidation mechanism of pyranose 2-oxidase and other related enzymes in the glucose-methanol-choline superfamily. *FEBS J.* 280, 3009–3027.
- Wösten, H.A., and de Vocht, M.L. (2000). Hydrophobins, the fungal coat unravelled. *Biochim. Biophys. Acta* 1469, 79–86.
- Wu, S.-H. (1998). Nine new species of *Phanerochaete* from Taiwan. *Mycol. Res.* 102, 1126–1132.

Wurleitner, E., Pera, L., Wacenovsky, C., Cziferszky, A., Zeilinger, S., Kubicek, C.P., and Mach, R.L. (2003). Transcriptional Regulation of *xyn2* in *Hypocrea jecorina*. *Eukaryot. Cell* 2, 150–158.

X

Xie, N., Chapeland-Leclerc, F., Silar, P., and Ruprich-Robert, G. (2014). Systematic gene deletions evidences that laccases are involved in several stages of wood degradation in the filamentous fungus *Podospora anserina*: Wood degradation by laccases in *Podospora anserina*. *Environ. Microbiol.* 16, 141–161.

Xue, C., Park, G., Choi, W., Zheng, L., Dean, R.A., Xu, J.R. (2002). Two Novel Fungal Virulence Genes Specifically Expressed in Appressoria of the Rice Blast Fungus. *Plant cell* 14, 2107–2119.

Y

Yadav, M., and Yadav, H.S. (2015). Applications of ligninolytic enzymes to pollutants, wastewater, dyes, soil, coal, paper and polymers. *Environ. Chem. Lett.* 13, 309–318.

Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., and Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods* 12, 7–8.

Yoshida, H. (1883). LXIII. chemistry of lacquer (Urushi). Part I. communication from the chemical society of Tokio. *J. Chem. Soc. Trans.* 43, 472–486.

Young, R. A., & Akhtar, M. (Eds.). (1998). *Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry*. John Wiley & Sons.

Z

Zakzeski, J., Bruijninx, P.C.A., Jongerius, A.L., and Weckhuysen, B.M. (2010). The Catalytic Valorization of Lignin for the Production of Renewable Chemicals. *Chem. Rev.* 110, 3552–3599.

Zhu, N., Liu, J., Yang, J., Lin, Y., Yang, Y., Ji, L., Li, M., and Yuan, H. (2016). Comparative analysis of the secretomes of *Schizophyllum commune* and other wood-decay basidiomycetes during solid-state fermentation reveals its unique lignocellulose-degrading enzyme system. *Biotechnol. Biofuels* 9.

Zong, L., Li, H., Yang, R., Wang, C., Ao, J., and others (2013). Growth of *Trichosporon asahii* in presence of the oxidants, hydrogen peroxide, diamide and menadione. *Afr. J. Microbiol. Res.* 6, 7147–7155.

Zykwinska, A., Guillemette, T., Bouchara, J.-P., and Cuenot, S. (2014). Spontaneous self-assembly of SC3 hydrophobins into nanorods in aqueous solution. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* 1844, 1231–1237.

Résumé :

Durant ces dernières décennies, les systèmes enzymatiques de dégradation du bois sécrétés par les champignons ont fait l'objet de nombreuses études aboutissant à la caractérisation fonctionnelle et biochimique des enzymes extracellulaires majeures agissant directement sur le polymère. Cependant, les systèmes annexes associés au processus de dégradation n'ont à l'heure actuelle été que peu étudiés. En particulier, les systèmes de détoxification et de réponses des champignons au stress généré par le processus de dégradation ainsi que les mécanismes lui permettant de croître dans cet environnement hostile sont encore peu connus. Ce stress est majoritairement dû à la présence de radicaux et d'extractibles. Les extractibles sont des molécules issues du métabolisme secondaire de l'arbre qui sont synthétisés pour augmenter la durabilité du bois face aux attaques biotiques et abiotiques. Une analyse transcriptomique réalisée au laboratoire a mis en évidence la surexpression de gènes codant des petites protéines sécrétées (SSP) chez *Phanerochaete chrysosporium* lors d'une culture en présence d'extractibles de chêne. La fonction de ce type de protéines chez les champignons lignolytiques est inconnue. Mon projet de thèse a porté sur la caractérisation d'une de ces SSP (SSP1). Les résultats obtenus ont révélé des propriétés biochimiques atypiques pour cette protéine qui est capable de former une structure fibrillaire, notamment grâce à la présence d'un domaine C-terminal riche en alanine et glycine. De plus, nous avons pu montrer que cette protéine présentait une activité β -glucuronidase *in vitro*, qui est dépendante de son état d'oligomérisation. Une approche physiologique a également été abordée grâce à l'obtention de mutants knock-out de SSP de *Podospora anserina*. La caractérisation de ces mutants a montré un défaut de croissance en condition de stress oxydant et en présence de molécules perturbant l'intégrité de la paroi cellulaire. Enfin, une analyse *in silico* des orthologues de SSP1 a montré la présence de ce gène dans les génomes d'organismes saprophytes, ectomycorhiziens ou pathogènes suggérant un rôle indirect de cette protéine dans les processus de dégradation du bois, probablement en lien avec la gestion du stress associé.

Mots-clé : *Phanerochaete chrysosporium*, petites protéines sécrétées (SSP), dégradation du bois, extractibles, saprophytes, stress

Abstract:

During the last decades, the enzymatic systems involved in wood degradation have been intensively studied in fungi. This has led to functional and biochemical characterization of the main extracellular enzymes that are involved in the process. However, other systems associated to the degradation mechanisms have been poorly studied. In particular, the detoxification and stress response pathways allowing the fungus to grow in and resist the toxic conditions that are associated to the degradative process are still unknown. This stress is mostly due to the presence of radicals and extractives. Extractives are putative toxic compounds produced as secondary metabolites in tree to enhance wood durability against biotic and abiotic attacks. A transcriptomic analysis performed in the laboratory highlighted the up-regulation of genes coding for small secreted proteins (SSP) in *Phanerochaete chrysosporium* in presence of oak extractives. The functions of these SSP are unknown in lignolytic fungi. My PhD project was focused on the characterization of one of these SSP (namely SSP1) of *P. chrysosporium*. The biochemical data revealed atypical features for SSP1. Indeed, it is able to form fibrillar structure, thanks to an alanine-rich and glycine-rich C-terminal domain. Moreover, we have shown that this protein exhibits β -glucuronidase activity *in vitro* which is dependent on its oligomerization state. Physiological data were obtained thanks to the obtention of SSP knock-out mutants in *Podospora anserina*. These mutants have growth defect in oxidizing stress condition and in presence of cell wall-disruptive compounds. Finally, the *in silico* analysis of SSP1 orthologues revealed the presence of this gene in genomes of saprophytic, ectomycorrhizal or pathogenic fungi, suggesting an indirect role of this protein in wood degradation processes, probably linked to the associated stress.

Key-words: *Phanerochaete chrysosporium*, small secreted proteins (SSP), wood degradation, extractives, saprophytic fungi, stress