

Diversité fonctionnelle des systèmes de détoxication chez les champignons lignolytiques

Thomas Perrot

▶ To cite this version:

Thomas Perrot. Diversité fonctionnelle des systèmes de détoxication chez les champignons lignolytiques. Biologie végétale. Université de Lorraine, 2018. Français. NNT: 2018LORR0140. tel-01917674

HAL Id: tel-01917674 https://theses.hal.science/tel-01917674

Submitted on 9 Nov 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

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





MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR, DE LA RECHERCHE ET DE L'INNOVATION





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

IFR 110 EFABA Ecosystèmes Forestiers, Agroressources, Bioprocédés et Alimentation Unité Mixte de Recherche INRA/UL 1136 Interactions Arbres/Micro-organismes

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de **Docteur de l'Université de Lorraine** en Biologie et Ecologie des Forêts et des Agrosystèmes

Par

Thomas PERROT

Diversité fonctionnelle des systèmes de détoxication chez les champignons lignolytiques

Soutenance prévue le 26 septembre 2018

Membres du jury :

Rapporteurs :

	Mme. Catherine RAFIN	MCF. Université du Littoral Côte d'Opale	
	Mr. Gabriel PAES	DR. INRA-Université de Reims Champagne-Ardenne	
Examinateurs :			
	Mme. Sabine FILLINGER	DR. INRA-AgroParisTech	
	Mr. Nicolas NAVROT	MCF. Université de Strasbourg	
	Mr. Fabrice NEIERS	MCF. Université de Bourgogne	
	Mr. Claude DIDIERJEAN	MCF. Université de Lorraine	
Directeurs de thèse :			
	Mr. Éric GELHAYE	DR. INRA-Université de Lorraine	

Mme. Mélanie MOREL-ROUHIER PR. Université de Lorraine

UMR INRA/UL 1136 Interactions Arbres/Micro-organismes, Faculté des Sciences et Techniques, Boulevard des Aiguillettes, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury, Catherine Rafin, Sabine Filinger, Gabriel Paës, Nicolas Navrot, Fabrice Neiers et Claude Didierjean d'avoir accepté de lire ce manuscrit et d'évaluer mes travaux de thèse. Je souhaite aussi remercier toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer : Frédérique Favier, Éric Record, Sawsan Amara, Stéphane Dumarçay et Nadine Amusant. Un merci tout particulier à Mathieu Schwartz pour ton esprit de collaboration et pour ta sympathie lors de formations doctorales où j'ai pu découvrir notamment, ton talent d'orateur pour expliquer le mode de vie des thésards !

Ma mémoire me fait peut-être défaut, mais je crois que tout a commencé le 24 juin 2015 lorsque tu as accepté de me prendre pour me lancer dans cette thèse. Très honnêtement Éric, je ne sais pas par où commencer pour te remercier. Alors je me lance ! Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir laissé une grande part d'autonomie, de m'avoir permis d'aller à de nombreux congrès : que ce soit à la montagne à Aussois, à Paris pour l'ECFG13th en ayant oublié les posters à la gare de l'Est et surtout un grand MERCI de m'avoir accordé le droit d'assister à l'ECFG14th en Israël (qui était génial). Je ne te remercierais jamais assez pour ta bienveillance, ton tact, ton optimisme et ton sourire au cours de ces trois années. Merci aussi pour le temps que tu as pris à vérifier mes fautes, à contempler la lourdeur de mes phrases et le manque de sens de certaines d'entre elles. Sincèrement, je le répète : MERCI POUR TOUT. Je considère que j'ai eu beaucoup de chance de t'avoir eu comme directeur de thèse.

Un grand merci à ma co-directrice de thèse, Mélanie, pour m'avoir permis de participer à la rédaction d'une revue et pour m'avoir fait part de tes remarques lors de la relecture du manuscrit. Dans un autre contexte, merci quand même pour tes astuces pour tenir debout sur deux skis. Certes, je passe plus de temps à manger la neige mais qui sait avec le temps, je vais progresser ... ou pas !

Merci à Nicolas pour ton dynamisme, ta rigueur et pour l'importance que tu portes aux autres notamment pour s'améliorer à présenter nos travaux de recherche lors des séances de « labmeeting ». Je voulais également saluer ton sens de l'hospitalité pour les nombreuses fois où avec Mélanie vous nous avez invité pour se retrouver autour d'un bon barbeuc.

Merci aussi à Jean-Pierre pour le temps que tu as consacré à améliorer mon anglais et surtout pour m'avoir « encadré » lors d'une session mémorable en montagne, (avec des scènes dignes du film « Les bronzés font du ski », c'est dire le niveau).

Merci également à toute l'équipe du 3 : Muriel, Raphaël, Jean-Michel (pour ta bonne humeur, ton port de la chemise, tes jeux de mots à foison et les très bons moments passés devant le SwitchSense), Jérémy (le plus grand fan de Kaamelott que je connaisse), Rodnay (pour m'avoir fait découvrir les chevaliers du Zodiaque sous un angle décalé et pour ta complicité lors des enseignements de mycologie), Tiphaine, Arnaud (un grand fan du PAL et des Center Parcs, je me rappelle que c'était toi

qui m'avais parlé en premier de cette offre de thèse quand j'étais alors en stage de M2), Elena (même si tu préfères dire « chocolatine » au lieu de pain au chocolat), Vuong, Matthieu et Anna. Je voulais aussi remercier tous les postdocs et stagiaires que j'ai pu côtoyer au cours de ces trois ans et notamment Guillaume Salzet (pour ton travail conséquent et ton implication sans failles).

Je voulais quand même remercier les « anciens » : d'abord P-A (pour m'avoir filé une astuce pour solubiliser le PAP-SG), le bon vieux Henri-*sensei* bien sûr (le fait d'avoir suivi, partiellement, ton quotidien de thésard quand j'étais en stage de master, m'a poussé à me lancer dans une thèse ; je voulais te remercier pour ça), Fanny (pour ta joie de vivre et ton travail considérable, je te souhaite un maximum de réussite dans la suite de ton projet professionnel). Je remercie aussi Johnny (je vais essayer de faire court) pour ta présence lors des fins de journées au labo (lorsque la nuit tombe et que la lumière des néons se reflète sur les paillasses, c'est le moment de chanter :« Eh ça fait piquer les noeil-noeils !»), pour le week-end exceptionnel au Mans (l'attente d'une journée pour voir Rossi, le bruit exaspérant des motos la nuit, et sans oublier, le coup de la casquette taille « Kid » évidemment). Même si tu es parti en Suède, tu restes omniprésent dans le bureau avec tout ce que tu as laissé : les murs peints en jaune, les posters de Vale, les figurines de moto, les cannettes de Monster et le puzzle sphérique MotoGP ; bref ce bureau est unique en son genre et je doute sérieusement que je vais en retrouver un aussi bien décoré.

Je tenais à remercier mes collègues doctorants qui m'ont beaucoup aidé pendant cette thèse. Je commence par celui qui fut mon complice dans quasiment tous les congrès, Nico. Ça été une fierté d'assister à différents congrès avec toi car à chacun d'entre eux, j'ai un souvenir immuable. D'abord à Aussois où tu as enflammé la piste de danse (lors de deux éditions consécutives et avec un déguisement de qualité), à Reims (avec ton escalade improvisée à la place d'Erlon sur un arbre qui n'en demandait pas tant), à Marburg (avec le fameux accueil impossible à oublier à l'auberge de jeunesse, ta facilité déconcertante à boire une sixaine de bières devant les regards interloqués des conférenciers), à Paris (où nous nous sommes faits DEVORER par probablement des punaises de lit à l'Ibis Hôtel). Mis à part les congrès, je voulais te remercier pour ton attitude zen, ton franc parler, ton accent de la Haute-Saône, ta connaissance du patois (ce qui m'a permis de me sentir moins seul), ta passion pour One Piece (« Hey jeudi hein ! ») et surtout ta philosophie à la Claude Makelele. Merci à Mélanie pour sa bonne humeur, pour les soirées McDo-Labo et pour ta fine analyse du film Blade Runner 2049 : « Mais ! Il manque trois minutes à ce film ! ... » ; bien joué Mélanie ! Merci à Flavien, pour ton humour trash, ta passion de la bière artisanale, ton amour du munster, et pour la touche vosgienne que tu insuffles dans le bureau. Merci à Elodie, pour ton sourire éclatant surtout les fins de semaine où j'ai toujours droit à ta devise « Vendredi, tout est permis ! ». Dorénavant Elodie, l'avenir des GSTs repose entre tes mains !

Enfin, j'adresse un grand merci à mes parents avec qui je n'ai pas été très causant lorsque je devais rédiger ce manuscrit, sachez que ma gratitude envers vous est sans fin.

Table des Matières

TABLE DES MATIERES

Table des Matières

Remerciements		3
TABLE DES MA	TIERES	5
Abréviations		11
INTRODUCTIO	N	15
Chapitre I : La c	lurabilité naturelle du bois est partiellement liée à sa composition chimique	17
1. Définition	on et généralités	17
2. La comp	position chimique du bois	17
2.1. Les	trois principaux polymères du bois	17
2.1.1.	La cellulose	17
2.1.2.	Les hémicelluloses	18
2.1.3.	La lignine	18
2.2. Les	cendres : des composés minoritaires	20
2.3. Les	extractibles	20
2.3.1.	Définition et généralités	20
2.3.2.	Les principales classes chimiques d'extractibles	21
2.3.2.1.	Les lignanes	21
2.3.2.2.	Les flavonoïdes	22
2.3.2.3.	Les tannins	24
2.3.2.4.	Les benzophénones	25
2.3.2.5.	Les stilbènes	27
2.3.2.6.	Les terpènes	29
2.3.2.7.	Les acides gras	30
2.3.3.	Relation entre les extractibles et la durabilité naturelle du bois	31
2.3.4.	Propriétés et intérêts des extractibles	31
2.3.4.1.	Activités antifongiques d'extraits de bois	31
Chapitre II : Le sont interconnec	s systèmes de dégradation du bois et de détoxication des champignons saprophetés	1ytes 50
1. Générali	tés sur le règne fongique : classification et taxonomie	50
2. Les diffe	érents types trophiques	50
2.1. Les	champignons symbiotiques	50
2.2. Les	champignons pathogènes	51
2.3. Les	champignons saprophytes	51
2.3.1.	Généralités	51
2.3.2.	Les champignons de pourriture molle	53
2.3.3.	Les champignons de pourriture brune	53
2.3.4.	Les champignons de pourriture blanche	55
2.3.4.1.	Description du modèle Trametes versicolor utilisé dans cette étude	56
3. Analyse	et comparaison génomique des champignons décomposeurs de bois	57
3.1. Con	nfirmation de l'importance physiologique des PODs et des CAZymes	60
4. Les méc	anisme de dégradation enzymatique des champignons	60

	4.1.	La dégradation enzymatique des polysaccharides	. 60
	4.1.	La dégradation de la cellulose	. 61
	4.1.2	2. La dégradation des hémicelluloses	. 62
	4.1.3	3. La dégradation de la pectine	. 63
	4.2.	Les mécanismes de dégradation enzymatique de la lignine	. 63
	4.2.	1. Les lignine peroxydases (LiPs)	. 64
	4.2.2	2. Les manganèse peroxydases (MnPs)	. 65
	4.2.3	3. Les versatile peroxydases (VPs)	. 66
	4.2.4	4. Evolution des trois familles de peroxydases de classe II	. 67
	4.2.5	5. Les peroxydases décolorantes de pigments (DyPs)	. 69
	4.2.0	5. Les laccases	. 70
5.	Le s	ystème de détoxication chez les champignons saprophytes	. 71
5	.1.	Présentation générale	. 71
5	.2.	La phase I d'activation	. 72
	5.2.	I. L'activation extracellulaire	. 72
	5.2.2	2. L'activation intracellulaire	. 72
5	.3.	La phase II dite de conjugaison	. 74
5	.4.	La phase III d'excrétion et/ou de séquestration	. 75
Chapi	tre III	: Les glutathion transférases : une famille multigénique aux fonctions diverses	. 76
1.	Le g	lutathion	. 76
2.	Les	glutathion transférases (GSTs)	. 76
2	.1.	Découvertes des GSTs	. 76
2	.2.	Structure des GSTs	. 77
	2.2.	Le monomère et le site actif	. 77
	2.2.2	2. Le dimère	. 79
2	.3.	Fonctions catalytiques des GSTs	. 80
	2.3.	1. L'activité de glutathionylation	. 80
	2.3.2	2. L'activité peroxydase	. 81
	2.3.3	3. L'activité isomérase	. 82
	2.3.4	4. L'activité de déglutathionylation	. 83
2	.4.	Classification générale des GSTs	. 84
	2.4.	1. Les GSTs mitochondriales (les GSTs Kappa)	. 84
	2.4.2	2. Les GSTs microsomales (MAPEGs)	. 85
	2.4.3	3. Les GSTs solubles	. 85
	2.4.4	4. Evolution des GSTs solubles	. 87
2	.5.	Les classes de GSTs solubles au sein du règne fongique	. 88
	2.5.	1. La classe des GTT1	. 91
	2.5.2	2. La classe des GTT2	. 91
	2.5.3	3. La classe Phi (GSTFs)	. 92

	2.5.4.	La classe Xi (GSTXs)	
	2.5.5.	La classe des GSTFuA	
	2.5.6.	La classe Ure2p	
	2.5.7.	La classe Omega (GSTO)	
PROBL	EMATIC	QUE DE RECHERCHE ET OBJECTIFS DE THESE	
RESUL	ГАТЅ		
Chapi	tre I : Etu	ude d'une classe de GSTs en extension chez Trametes versicolor : la c	classe Omega
Intr	oduction	sur l'étude des GSTs de la classe Omega chez Trametes versicolor	109
Etu.	de des GS	STs de la classe Omega de Trametes versicolor à cystéine catalytique	(TvGSTOC)
Etu (Tv	de des Ga GSTOS)	STs de la classe Omega de Trametes versicolor ayant une sérine dan - Recherche et découverte de ligands : les polyphénols	s le site actif 151
Etue (Tv bois	de des G GSTOS)	STs de la classe Omega de Trametes versicolor ayant une sérine dan - Utilisation des TvGSTOS comme outils pour évaluer la composition	s le site actif chimique du
Cor	clusion s	ur l'étude des GSTs de la classe Omega chez Trametes versicolor	
Chapir classe	tre II : Eti Xi	ude d'une classe de GSTs conservée mais minoritaire chez Trametes v	<i>versicolor</i> : la 225
Cor	clusion s	ur l'étude des GSTs de la classe Xi chez Trametes versicolor	
DISCUS	SION E	T PERSPECTIVES	
Chapi	tre I : Ext	ension de la classe Omega chez Trametes versicolor	
1.	Etude ge	énomique de la classe Omega dans le règne fongique	
2.	Etude pł	hylogénétique des GSTOs : émergence des GSTs possédant une sérine	
3.	Propriét	és biochimiques des GSTs des classes Omega et Xi de Trametes versico	olor 266
4.	Evolutio	on des classes Xi et Omega dans le règne fongique	
5.	Découve	erte d'une fonction ligandine redondante et spécifique chez les TvGSTC	DS 268
6.	Spécific	ités d'interactions entre les TvGSTOS	
Chapi	tre II : Ve	ers la recherche de nouveaux substrats	
1. vers	Recherc	he de substrats et/ou de ligands à partir d'extraits de carpophores	de Trametes
2. déte	Etude d xication.	u lien fonctionnel entre les phases d'activation et de conjugaison de	u système de
Chapi glycos	tre III : syltransféi	Similarités fonctionnelles entre les glutathion transférases (Grases (GTs)	STs) et les
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES			
ANNEX	Е		
Résumé	:		

Abréviations

ABC :	ATP Binding Cassette
CAZymes :	Enzymes réactives vis-à-vis des carbohydrates
CDNB :	1-Chloro-2,4-dinitrobenzène
CYP450s :	Cytochromes P450 monooxygénases
DMAPP :	Diméthylallyldiphosphate
DyPs :	Peroxydases décolorantes de pigments
GSH :	Glutathion réduit
GSSG :	Glutathion oxydé
GSTs :	Glutathion transférases
GSTOs :	Glutathion transférases de la classe Omega
GSTXs :	Glutathion transférases de la classe Xi
H_2O_2 :	Peroxyde d'hydrogène
HBPs :	Hydroxybenzophénones
IPP :	Isopentényldiphosphate
LiPs :	Lignine peroxydases
MAPEG :	Membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism
MEN-SG :	Ménadione glutathionylée
MFS :	Major Facilitator Superfamily
MnPs :	Manganèse peroxydases
MRP :	Multidrug resistance-associated protein
NATs :	N-acétyltransférases
PAP-SG :	Phénylacétophénone glutathionylé
PEITC :	Phénéthyl isothiocyanate
PODs :	Peroxydases réactives vis-à-vis de la lignine
T _d :	Température de dénaturation
TvGSTOs	Glutathion transférases de la classe Omega de Trametes versicolor
TvGSTXs	Glutathion transférases de la classe Xi de Trametes versicolor
VPs :	Versatile peroxydases

Au cours de ma thèse intitulée « Diversité fonctionnelle du système de détoxication chez les champignons lignolytiques », je me suis intéressé à une famille d'enzymes, les glutathion transférases (GSTs) chez *Trametes versicolor*, organisme choisi comme modèle d'étude.

Ce manuscrit sera organisé en trois parties :

- D'abord, une introduction qui comportera trois chapitres : le premier abordera le bois et en particulier sa composition chimique. Le second chapitre sera dédié aux champignons saprophytes, notamment leurs mécanismes de dégradation et de détoxication. Le dernier chapitre se focalisera sur la famille des glutathion transférases dans le règne fongique. Enfin, la problématique de recherche et les objectifs de thèse seront décrits.
- Dans la seconde partie de ce manuscrit, les résultats de mes travaux seront présentés sous la forme de publications scientifiques.
- Enfin, dans une dernière partie, les résultats de mes travaux seront discutés et des perspectives de recherche seront proposées.

Introduction

INTRODUCTION

Introduction

<u>Chapitre I : La durabilité naturelle du bois est partiellement liée à sa composition</u> <u>chimique</u>

1. <u>Définition et généralités</u>

Au sein du règne végétal, le bois possède plusieurs rôles. D'abord celui de support mécanique notamment car il soutient les feuilles qui sont les organes impliqués dans les processus de photosynthèse. De plus, le bois permet à l'organisme, de résister à la gravité et au vent (Alméras et al., 2018). D'autre part, il a un rôle de conducteur de l'eau et d'éléments minéraux prélevés par la partie souterraine dans le sol via le système racinaire. Enfin, il a aussi un rôle de stockage de différents composés tels que les oses et les lipides.

D'un point de vue histologique, le bois (également appelé xylème secondaire) est désigné comme un tissu secondaire produit à partir du cambium de type libéro-ligneux. Ce tissu permet la croissance en largeur de la plante. Dans le règne végétal, le bois est principalement présent dans deux groupes de plantes terrestres, les gymnospermes (plus couramment appelées les résineux) et les angiospermes (Pettersen, 1984).

En fonction du groupe phylogénétique, le bois est différent d'un point de vue morphologique et deux types peuvent être identifiés (Blanchette, 2000) :

- le bois de résineux, (en anglais « softwood ») qui contient exclusivement des trachéides reliées à des rayons de cellules du parenchyme.
- le bois de feuillus, (en anglais « hardwood ») qui contient des pores (pouvant aussi être appelés des vaisseaux) présents entre les cellules du parenchyme et les fibres.

Le bois contient des cellules dont les parois sont composées de trois polymères majeurs : la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. De plus, celui-ci contient aussi une faible quantité de molécules qui sont appelées les extractibles. Ces différents composants seront décrits par la suite.

2. La composition chimique du bois

2.1. Les trois principaux polymères du bois

2.1.1. La cellulose

La cellulose représente 30 à 47% de la composition chimique du bois (Pettersen, 1984), c'est un polymère linéaire composé de résidus d' α -D glucopyranosyl reliées par des liaisons de type β -1,4. L'ensemble de deux molécules d' α -D glucopyranosyl liées par ce type de liaison forme le cellobiose qui correspond à l'unité de base de la cellulose (Figure n°1).



Figure n°1 : Section de la chaîne principale de la cellulose avec entre crochets l'unité cellobiose et au centre la liaison osidique β -1,4 (issue de https://easychem.com).

2.1.2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses sont des polymères polysaccharidiques et représentent de 12 à 26% de la masse sèche du bois. La structure des hémicelluloses est diverse à cause de la pluralité des oses qui en font partie. Par exemple, on peut y retrouver notamment du glucose, du mannose, du xylose, du galactose, de l'arabinose, de l'acide galacturonique et de l'acide glucuronique (Pérez et al., 2002). L'organisation des hémicelluloses varie en fonction de l'espèce végétale. Dans le bois des angiospermes, le glucuronoxylane est majoritaire tandis que chez les gymnospermes, il s'agit du glucomannane (Figure $n^{\circ}2$; Pérez et al., 2002).



Figure n°2: (A) Structure chimique du glucuronoxylane, majoritaire chez les angiospermes. (B) Structure chimique du glucomannane, majoritaire chez les gymnospermes (issue de Pérez et al., 2002). À titre d'exemple, deux liaisons osidiques β -1,4 et α -1,2 sont respectivement entourées en rouge et en vert.

2.1.3. La lignine

La lignine est un hétéropolymère composé de différentes sous-unités. Ces sous-unités sont des composés phénoliques appelés des monolignols. Les monolignols sont issus de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes dont l'acide p-coumarique (formé à partir de l'acide cinnamique par la cinnamate 4-hydroxylase) est le précurseur. Il existe trois différents types de monolignols: l'alcool coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique (Figure n°3A ; Pettersen, 1984).

En fonction de l'appartenance d'une espèce végétale au groupe des gymnospermes ou à celui des angiospermes, la distribution des trois monolignols n'est pas la même. Dans le bois des résineux, c'est surtout l'alcool coniférylique qui est le plus retrouvé tandis que dans le bois d'angiospermes, ce sont les alcools coniférylique et sinapylique qui sont majoritaires (Pettersen, 1984). Pour permettre la synthèse de la lignine, les monolignols sont d'abord oxydés (par une réaction de déshydrogénation) sous l'action de peroxydases et/ou de laccases (Boerjan et al., 2003 ; Weng, Chapple, 2010 ; Whetten, Sederoff, 1995). Ensuite, une phase de couplage entre les monolignols oxydés et une liaison covalente entre les deux monomères va s'établir. Ce couplage se fera préférentiellement au niveau du carbone situé en position β et peut donner lieu à différentes types de liaison (Figure n°3B, en rouge ; Vanholme et al., 2010). Cependant, d'autres liaisons impliquant d'autres atomes de carbone peuvent également s'établir (Figure n°3B, en bleu, Husarcíková et al., 2018).



Figure n°3 : (A) Structure des trois monolignols à l'origine de la formation de la lignine (issu de Pollegioni et al., 2015). (B) Ebauche de structure de la lignine avec différents types de liaison (issue de Husarcíková et al., 2018).

2.1.4. La pectine

Un quatrième polymère extrêmement minoritaire (représentant 1 à 4 % de la composition chimique du bois) peut être retrouvé et il s'agit des pectines. Les pectines correspondent à des polysaccharides linéaires composés d'acides galacturoniques et de rhamnoses reliés par des liaisons α -(1, 4) (Green et al., 1996).

2.2. Les cendres : des composés minoritaires

Une catégorie extrêmement minoritaire dans la composition du bois peut être identifiée et il s'agit des cendres. Brièvement, les cendres (représentant par exemple 0,3 % de la composition chimique du bois d'hêtre, *Fagus sylvatica*) regroupent des substances minérales comme le calcium, le magnésium, le phosphate mais aussi quelques éléments métalloïdes comme le fer et le manganèse.

2.3. Les extractibles

2.3.1. Définition et généralités

Les extractibles correspondent à une faible quantité de petites molécules qui peuvent être extraites du bois par des solvants. Les extractibles ne sont pas des éléments structuraux du bois. Ces molécules sont présentes soit dans la cavité cellulaire ou soit accrochées aux parois lignocellulosiques des cellules du bois (Pettersen, 1984).

Dans la composition chimique du bois, la part des extractibles est comprise entre 5 et 20% de la masse sèche. Ce pourcentage varie en fonction de l'essence forestière et aussi du climat dans lequel elle se développe. Par exemple, il a été montré que les teneurs les plus importantes en extractibles sont mesurées chez les essences tropicales. De plus, la teneur en extractibles n'est pas la même dans toutes les parties boisées de l'arbre. Même si les extractibles sont présents dans le duramen et dans une moindre mesure dans l'aubier, les quantités en extractibles sont surtout les plus élevées à la base des branches, dans les écorces et dans les nœuds (Kebbi-Benkeder et al., 2015). D'autre part, à l'échelle d'une même espèce forestière et d'une même zone boisée (duramen, aubier, zone de transition), la teneur en extractibles peut varier en fonction des saisons (Mbakidi-Ngouaby et al., 2018).

L'origine des extractibles pourrait s'expliquer par un processus de dépôt de ces petites molécules dans le bois de duramen pendant sa formation. Ce processus peut aussi se réaliser dans la zone frontalière (ou zone de transition) entre le duramen et l'aubier (Taylor et al., 2002). La synthèse de ces molécules est souvent induite dans le cas où l'arbre est soumis à des stress environnementaux (biotiques et abiotiques).

Les extractibles représentent des molécules appartenant à différents groupes chimiques dérivant du métabolisme primaire (lipides) et secondaire (lignanes, flavonoïdes, tannins, benzophénones, stilbènes et terpènes). Ces groupes chimiques sont de deux types : les composés phénoliques (regroupant les lignanes, les flavonoïdes, les tannins, les benzophénones et les stilbènes) et l'ensemble des composés aliphatiques et alicycliques (regroupant les terpènes et les acides gras). Pour chaque classe chimique, les structures et les rôles identifiés de ces molécules seront décrits plus en détails dans la section suivante.

2.3.2. Les principales classes chimiques d'extractibles

2.3.2.1. Les lignanes

Les lignanes sont des composés de nature polyphénolique issus de la voie des phénylpropanoïdes. Les constituants de ces composés sont les mêmes que ceux de la lignine. En effet, les structures des lignanes sont composées d'un dimère de monolignols. Brièvement, les monomères de monolignols s'associent par des liaisons établies entre les atomes de carbone à la position 8 (Figure n°4).



Figure n°4: (A) Structure de deux alcools coniféryliques avec en rouge, la position des carbones impliqués dans la liaison entre les deux monolignols afin de former le lignane pinorésinol. (B) Structure d'un lignane caractéristique des gymnospermes, l'acide plicatique. (C) Structure d'un lignane caractéristique des angiospermes, l'acide nordihydroguaïarétique. (D) Structure d'un lignane provenant de bois de *Picea abies* ayant un effet antifongique sur la croissance d'*Heterobasidion annosum* : le matairésinol (issue de Lamblin et al., 2008 et de Davin, Lewis, 2003).

Les lignanes représentent la classe chimique majoritaire dans les extractibles de bois de différentes espèces ligneuses ; par exemple le sapin baumier (*Abies balsamea*), le sapin de Sibérie (*Abies sibirica*), l'épicéa (*Picea abies*), le sapin Douglas (*Pseudotsuga menziesii*), le mélèze d'Europe (*Larix decidua*) (Willför et al., 2003). Les lignanes représentent plus de 200 molécules et possèdent plusieurs propriétés biologiques comme par exemple des activités antitumorale, insecticide, antibactérienne et peuvent agir comme des inhibiteurs de la croissance racinaire de certaines espèces végétales (MacRae, Towers, 1984).

Une propriété antifongique a également été identifiée chez plusieurs lignanes provenant de bois d'épicéa (*Picea abies* avec le lignane matairesinol), d'essences forestières appartenant au genre *Prunus sp* (avec le lignane isoolivil) et de tulipier de Virginie (*Liriodendron tulipifera* avec le lignane syringaresinol), suggérant leur rôle protecteur vis-à-vis du bois (MacRae, Towers, 1984). Cette propriété antifongique pourrait s'expliquer par la capacité de certains lignanes à inhiber le fonctionnement d'enzymes extracellulaires (comme par exemple les cellulases et les laccases) (MacRae, Towers, 1984).

2.3.2.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une classe chimique bien connue pour plusieurs raisons ; (i) d'abord par un nombre très élevé de molécules qui en font partie (plus de 6000 identifiées à ce jour) ; (ii) par la présence ubiquitaire dans le règne végétal des gènes impliqués dans la biosynthèse de ces composés et enfin, (iii) par leurs multiples rôles physiologiques. Ces trois aspects seront décrits plus en détails cidessous. Basée sur l'étude structurale, la classification des flavonoïdes a révélé l'existence de six groupes majeurs : les chalcones, les flavones, les flavonols, les flavandiols, les anthocyanines et les proanthocyanidines (également appelées les tannins condensés qui seront décrits dans la section suivante, Figure n°5A, Falcone Ferreyra et al., 2012). Le squelette de base des flavonoïdes est constitué de deux cycles aromatiques (notés A et B) avec entre les deux un cycle hétérogène (noté C, Figure n°5B). Les voies de synthèse des flavonoïdes font partie du métabolisme secondaire et elles dérivent de la voie des phénylpropanoïdes. La synthèse de ces polyphénols débute par la transformation de phénylalanine en 4-coumaroyl-coenzyme A. Cette dernière sous l'action de la chalcone synthase va être transformée en naringénine chalcone qui est le premier flavonoïde synthétisé (Figure n°5C).



Figure n°5 : (A) Structure des principaux groupes de flavonoïdes (issue de Falcone Ferreyra et al., 2012). (B) Annotations de la structure de la quercétine avec la nomenclature : les lettres représentent la localisation des cycles aromatiques tandis que les chiffres correspondent aux positions. (C) Aperçu non exhaustif de la voie de biosynthèse des flavonoïdes (modifiée de Falcone Ferreyra et al., 2012).

A l'échelle de l'arbre, les flavonoïdes sont présents dans tous les organes (feuilles, racines, tronc, branches, ...). Dans cette partie, l'état des connaissances à propos des flavonoïdes retrouvés dans le bois sera uniquement décrit. Des analyses en chromatographie gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse ont mis en évidence la présence généralisée de flavonoïdes (comme par exemple la naringénine et le dihydrokaempférol) dans des extraits de bois issus de troncs (duramen, aubier) et de nœuds chez trois espèces de peuplier (Populus tremula, tremuloides et grandidentata). Cependant, les flavonoïdes sont répartis de façon hétérogène dans l'arbre. Par ordre décroissant, la plus forte teneur est retrouvée dans les nœuds puis dans le duramen et enfin dans l'aubier où les quantités sont plus faibles (Pietarinen et al., 2006). Il a été montré que ces molécules retrouvées dans le duramen de Dicorynia guianensis (Angélique), possèdent des propriétés antioxydantes (Anouhe et al., 2018). D'autre part, certains flavonoïdes (comme par exemple la téracadidine) ont une capacité antiradicalaire pouvant inhiber le fonctionnement d'enzymes oxydatives extracellulaires comme les laccases (Mihara et al., 2005). Des modifications post-synthétiques comme la glycosylation peuvent se produire et peuvent modifier leurs propriétés biologiques. En effet, en comparant la capacité antiradicalaire des formes glycosylées de deux flavonoïdes (dihydrokaempférol 7-O-β-glucoside et la naringénine 7-O-βglucoside) par rapport à celles des formes aglycones (dihydrokaempférol et naringénine), Neacsu et coll. ont constaté une diminution de celle-ci pour les formes glycones (Neacsu et al., 2007). En effet, l'établissement d'une liaison osidique entre le groupe hydroxyle de l'ose et celui du flavonoïde (à une position donnée), va diminuer la capacité du flavonoïde à fixer des radicaux libres.

2.3.2.3. Les tannins

Les tannins, issus du métabolisme secondaire, sont des polyphénols dont la masse moléculaire est comprise entre 300 et 20 000 Da. La multitude de molécules pouvant être classées comme tannins a rendu difficile la caractérisation de ce groupe de molécules à tel point que la définition des tannins fut le sujet de controverses dans les années 1990. En effet, à l'heure actuelle au moins 1000 structures de tannins ont pu être identifiées. C'est en se basant sur l'étude structurale des tannins qu'il fut possible de proposer la définition suivante selon laquelle les tannins regroupent les molécules qui contiennent soit des esters d'acides galliques liés à des hétérosides, soit des assemblages de flavonoïdes couplés entre eux (Khanbabaee, van Ree, 2001).

Ces molécules peuvent être classées en quatre groupes (Figure n°6) :

- Les gallotannins, qui contiennent une molécule d'acide gallique liée avec une molécule de monosaccharide (par exemple le glucose).
- Les ellagitannins qui sont des molécules contenant deux unités d'acide gallique reliées entre elles.
- Les tannins complexés dont la structure est composée d'une molécule de catéchine liée par un groupement glycosidique à un gallotannin ou à un ellagitannin.
- Les tannins condensés qui sont issus de l'assemblage de molécules de catéchines liées par une liaison ente le carbone à la position 4 d'une catéchine et le carbone aux positions 6 et/ou 8 de la seconde catéchine. Les tannins condensés sont aussi qualifiés de proanthocyanidines.



Figure n°6 : Classification des tannins en fonction de leurs structures (selon Khanbabaee, van Ree, 2001). Les symboles ***** et ***** représentent la position des carbones aux positions 4 et 8, ces atomes de carbone étant impliqués dans l'association des molécules de catéchine formant le motif de base des tannins condensés.

Généralement le rôle biologique des tannins est souvent lié à la protection face à des infections et à des attaques d'herbivores (insectes et animaux). D'autre part, les tannins représentent un intérêt pour l'Homme de par leurs diverses propriétés : agent diurétique, astringent, anti-inflammatoire et antiseptique (Samardžić et al., 2018).

2.3.2.4. Les benzophénones

Les benzophénones représentent une classe contenant plus de 300 membres et qui possèdent une grande diversité structurale mais qui partagent en commun un motif de base. Ce motif est composé de deux cycles phénoliques reliés par une liaison carbonyle. La synthèse de ce squelette moléculaire est permise par deux voies de biosynthèse bien distinctes. La première voie permettant de synthétiser le cycle benzène A est la voie de l'acide shikimique. Ce cycle A peut porter jusqu'à 2 groupements. Le cycle B quant à lui, provient de la voie du mévalonate.

A contrario du cycle A, le cycle B peut subir des modifications chimiques (par exemple des réactions de prénylation et de géranylation) pouvant entraîner la formation d'une grande variété de molécules. Le couplage des cycles A et B est permis par l'action de la benzophénone synthétase (Beerhues, Liu, 2009). Mise à part chez les végétaux où les benzophénones ont été identifiées dans le duramen (Mosedale et al, 1998), dans l'écorce (Magadula et al., 2008) et dans plusieurs organes végétaux (comme les feuilles, les tiges et les racines, (Wu et al., 2014)), ces composés peuvent également être synthétisés chez les champignons. A l'intérieur de cette classe de molécules aux structures diverses et variées, les benzophénones peuvent être classées en deux groupes majeurs (Figure n°7).

Le premier groupe, appelé « les benzophénones simples » désigne les benzophénones dont le squelette est basique, c'est-à-dire que les cycles A et B sont complets.

Le second groupe, nommé « les benzophénones polyprénylées » quant à lui représente les benzophénones dont le cycle A est complet mais dont le cycle B est attaché à des groupements lipidiques. Les modifications du cycle B peuvent avoir comme conséquences l'apparition de plusieurs cycles (de 2 jusqu'à 5 cycles additionnels), mais également l'ajout de groupements tels que des groupements époxydes et peroxydes.



Provenance du cycle A (voie du shikimate)

Figure n°7: (A) Voie de biosynthèse des benzophénones. L'acronyme BPS symbolise la benzophénone synthétase. Les deux grands groupes de benzophénones : simples et polyprénylées sont représentés par les acronymes BS et BP. (B) Squelettes moléculaires et classification des benzophénones (issues de Wu et al., 2014). Les termes « Prenyl » et « Geranyl » symbolisent respectivement les modifications de prénylation et de géranylation. Les lettres A et B représentent les cycles A et B faisant partie du motif de base des benzophénones.

De par l'analyse des structures des benzophénones, il a été possible de mettre en relation l'importance des positions et de la nature des groupements avec les propriétés qu'elles confèrent (Jantan, Saputri, 2012). En effet, la présence de groupes hydroxyles sur les cycles A et B est requise pour leur activité antioxydante (Figure n°8). De plus, il a été observé que la présence d'un groupement méthoxy à la position 4 du cycle A conférerait des propriétés cytotoxiques.



Figure n°8 : Aperçu de quelques relations entre la structure et les propriétés des benzophénones simples (modifié de Wu et al., 2014). Les groupements hydroxyle et méthoxy sont respectivement mentionnés par les diminutifs OH et OMe.

2.3.2.5. Les stilbènes

Les stilbènes sont des molécules polyphénoliques, issues du métabolisme secondaire, produites uniquement chez les plantes. Ces molécules dérivent de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes dont les intermédiaires suivants : l'acide trans-cinnamique et l'acide p-coumarique en sont les précuseurs. Un précurseur supplémentaire est aussi impliqué dans la voie de biosynthèse des stilbènes, il s'agit de l'acide caféique. Ces trois précurseurs vont être liés à une molécule d'acétyl-coenzyme A (CoA) sous l'action de la 4-coumarate-CoA ligase (EC 6.2.1.12). Ensuite, la stilbène synthetase (EC 2.3.1.95) en présence de 3 molécules de malonyl-coenyme A, va transformer ces trois nouveaux produits pour former directement des stilbènes. Outre ces trois voies qui débouchent sur une multitude de stilbènes, des modifications post-synthétiques sont susceptibles de se produire. Ces modifications peuvent être de différentes natures comme la glycosylation, la méthylation, l'oligomérisation et la prénylation et entraînent la formation de nouvelles structures de stilbènes (Figure n°9, Dubrovina, Kiselev, 2017). C'est à travers l'étude du resvératrol que les propriétés des stilbènes ont été découvertes. Ces propriétés sont multiples : activité antioxydante, rôle dans l'immunomodulation, propriété anti-inflammatoire (Roat, Saraf, 2015). De plus, ces molécules ont des effets cardioprotecteurs et peuvent être utilisées dans la prévention face aux risques de cancers.



Figure n°9 : Voie de biosynthèse des stilbènes. Les acronymes PAL, TAL, CL et STS représentent les enzymes impliquées qui sont dans l'ordre : la phénylalanine ammonia-lyase, la tyrosine ammonia-lyase, la 4-coumarate-CoA ligase et la stilbène synthétase. Pour chacune des modifications (glycosylation, méthylation, oligomérisation et prénylation), des exemples de structures ont été représentés (dans l'ordre) : le resvératrol-3-O- β -D-glucopyranoside, le mono-méthyle de pinosylvine, la viniférine et la *trans*-arachidin-1 (modifié de Dubrovina, Kiselev, 2017).

C'est surtout dans le bois de gymnospermes que des stilbènes ont pu être identifiés. Par des analyses chromatographiques couplées à de la spectrométrie de masse et à de la résonnance magnétique nucléaire menées sur des extraits d'écorce racinaire chez l'épicéa (*Picea albies*), plusieurs stilbènes ont été caractérisés sous formes glycone et aglycone (Mulat et al., 2014). Présents dans le bois de résineux, les stilbènes ont un rôle anti-termite (Shibutani et al., 2004). Shibutani et coll. ont aussi observé que la présence d'un groupement glycosidique dans la structure de l'isorhapontine diminuait son effet anti-termite par rapport à la forme non glycosylée. De plus, le rôle antifongique des stilbènes dans le bois fut aussi confirmé. En effet, un extrait de bois d'épicéa (contenant dix-neuf stilbènes) présente un effet antifongique sur le développement du champignon phytopathogène *Plasmopara viticola* (Gabaston et al., 2017).

2.3.2.6. Les terpènes

Les terpènes, aussi appelées les huiles, sont des molécules polyisopréniques qui contiennent un motif isoprène. Ce motif, composé de 5 atomes de carbone, est lié à deux groupements phosphate pour former une molécule initiatrice qui se nomme l'isopentényldiphosphate (IPP). L'IPP est un produit issu de la voie de synthèse du mévalonate. De plus, un second précurseur est requis pour permettre la synthèse de terpènes, il s'agit du diméthylallyldiphosphate (DMAPP). Ce-dernier est synthétisé à l'issue de la voie du méthylérythritol phosphate. Ensuite, une réaction de condensation aura lieu entre une molécule de DMAPP avec une ou plusieurs molécules d'IPP en fonction du type de terpène à synthétiser (Tholl, 2006). Cette réaction est véritablement le point de départ et le nombre d'IPP conditionne le type de terpène qui sera synthétisé. Puis, la synthèse finale d'un terpène en particulier est rendue possible par l'action directe d'une enzyme spécialisée ; par exemple la synthèse d'un monoterpène comme le limonène sera catalysée par la limonène synthétase (EC 4.2.3.16). De par leur diversité structurale, les terpènes sont classés en plusieurs types (Figure n°10).

Il existe six groupes de terpènes :

- Les monoterpènes, résultant de la condensation avec 1 molécule d'IPP, qui contiennent 10 atomes de carbone dans leur structure.
- Les sesquiterpènes, résultant de la condensation avec 2 molécules d'IPP, ayant 15 atomes de carbone.
- Les diterpènes, résultant de la condensation avec 3 molécules d'IPP, ayant 20 atomes de carbone.
- Les triterpènes, ayant 30 atomes de carbone.
- Les tétraterpènes, ayant 40 atomes de carbone.
- Les polyterpènes dont le nombre de carbone va de 40 jusqu'à plus de 100.



Figure n°10 : Classification des terpènes en fonction de leur structure. Pour chaque type de terpène, un exemple de structure est représenté.

Les fonctions biologiques de ces molécules sont souvent liées à la protection de l'organisme producteur. Les terpènes possèdent différentes propriétés : antibactériennes, antifongiques et insecticides. Les terpènes sont surtout présents dans le bois de résineux et sont à l'origine de la formation d'une résine. Cette résine peut contenir des monoterpènes et des diterpènes. Les monoterpènes sont plus volatiles et circulent plus rapidement dans la résine que les diterpènes. De plus, les monoterpènes agissent comme des toxines envers les organismes herbivores et aussi comme des inhibiteurs de la croissance des champignons. En effet, il a été démontré que plusieurs monoterpènes issus d'une chimiothèque inhibaient la croissance de trois champignons saprophytes de pourriture blanche (Zhang et al., 2016). En comparaison, les diterpènes sont aussi des toxines pour les herbivores mais en raison de leur faible volatilité, ces composés peuvent polymériser entre eux afin de cicatriser les blessures au sein d'un tissu (Gershenzon, Dudareva, 2007).

2.3.2.7. Les acides gras

Les acides gras (ou composés lipidiques) sont des composés à longue chaîne carbonée portant au moins une fonction carboxylique. Ce sont des composés hydrophobes, c'est-à-dire des composés solubles dans des solvants apolaires (comme par exemple le cyclohexane, le dichlorométhane ou l'éther de pétrole). De plus, ces composés peuvent porter des doubles liaisons, on parle alors d'acides gras insaturés (dans le cas contraire, sans double liaison, ce sont des acides gras saturés). En utilisant différents solvants apolaires, une multitude d'acides gras a pu être identifiée dans le bois d'aubier et dans des copeaux de bois provenant de hêtre (*Fagus sylvatica*, Figure n°11, Vek et al., 2016). En dépit de la caractérisation structurale des acides gras et de l'identification de la plupart de ces composés dans le bois de différentes essences forestières, le rôle biologique des acides gras dans le bois reste incertain. Une hypothèse serait que ces composés protégeraient le bois d'organismes envahisseurs.



Figure n°11 : Exemples d'acides gras retrouvés dans des extraits de bois de hêtre (*Fagus sylvatica*).

2.3.3. Relation entre les extractibles et la durabilité naturelle du bois

De par la mixité des classes chimiques présentes dans les extractibles de bois, l'analyse des propriétés de ces-derniers s'avère complexe. En effet, au-delà des propriétés biologiques spécifiques de chacune des molécules composant un extrait de bois, les interactions entre les molécules d'un même extrait et leurs effets synergiques doivent être pris en compte. Par exemple, Schultz et Nicholas ont testé les effets de deux molécules ayant, individuellement, des propriétés différentes : l'une ayant une propriété antioxidante et la seconde une très faible activité antifongique. Ces deux molécules ont été téstées séparément et en association sur les capacités de dégradation de deux champignons décomposeurs (*Trametes versicolor* et *Gloeophyllum trabeum*). Les résultats ont montré qu'ensemble, les deux molécules réduisaient fortement le pourcentage de perte de résistance de l'aubier (*Pinus spp*) passant de 95% (séparément) à 39% (Schultz, Nicholas, 2000). Ainsi, c'est l'ensemble des propriétés spécifiques et synergiques des molécules d'un même extrait qui conditionne le niveau de défense du bois face à des organismes décomposeurs. Dès lors, les extractibles contribuent en partie à la durabilité naturelle du bois (Kirker et al., 2013a). La notion de durabilité naturelle du bois désigne la capacité du bois à résister à la dégradation d'origine biologique.

2.3.4. Propriétés et intérêts des extractibles

De par la diversité des activités biologiques des extractibles : antioxydante, antimicrobienne, antifongique et insecticide ; les extractibles représentent un intérêt majeur pour l'Homme dans différents secteurs d'intérêts économiques comme ceux de la cosmétique, pharmaceutique et du bâtiment pour la protection du bois de construction.

2.3.4.1. Activités antifongiques d'extraits de bois

Une multitude d'études ont démontré l'activité antifongique de plusieurs extractibles de bois. Afin de faire un état des lieux des connaissances actuelles sur cette propriété, j'ai contribué à la rédaction d'une revue intitulée « Antifungal activities of wood extractives » publié dans le journal Fungal Biology Reviews. Plus précisément, mon implication dans cette revue fut de récapituler les principales stratégies de défense des champignons pour lutter contre la toxicité des extractibles de bois.

Antifungal activities of wood extractives

Nicolas VALETTE^a, Thomas PERROT^a, Rodnay SORMANI^a, Eric GELHAYE^a, Melanie MOREL-ROUHIER^a*

^a Université de Lorraine, Interactions Arbres Microorganismes, UMR1136, F-54500 Vandoeuvre-les-Nancy, France

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.

Keywords

Detoxification, Extractives, Lignolytic fungi, Wood

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 (Martinez 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 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 noncell 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-offlight 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 synthetized 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 nonleached 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.

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 $[Fe(trop)_3]$ or $[Fe(trop)_2]$ precipitates respectively, and the inhibition of Fe(III) reduction avoiding initiation of the Fenton reaction (Diouf *et al.*, 2002; Yen *et al.*, 2008). β -thujaplicin, one of the most known troponoids reduces the activity of laccase, but also other metal-containing enzymes as tyrosinase and lipoxygenase (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).

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 taxodioneª	Diterpene	Taxodium distichum	Trametes versicolor; Fomitopsis palustris				
Ferruginol taxodone ^a	Diterpene	T. distichum	F. palustris				
Alpha terpineol ^b	Monoterpene	Cunninghami a konishii	T. versicolor				
Borneol ^b	Terpene	C. konishii	T. versicolor; Pestalotiopsis funereal				
Cedrol ^b	Sesquiterpene alcohol	C. konishii	T. versicolor; Gloeophyllum trabeum; Lenzites betulina; Laetiporus sulphureus; Fusarium oxysporum; Fusarium solani; Rhizoctonia solani; P. funereal; Ganoderma australe				
Endo fenchol ^b	Terpene	C. konishii	T. versicolor; L. betulina				
Isorhapontigenin piceatannol ^c	Stilbene	Picea abies	Antrodia sinuosa; Antrodia xantha; Coniophora puteana; Fomitopsis pinicola; Gloeophyllum sepiarium; Phlebiopsis gigantea; Serpula lacrymans; Serpula himantoides				
Resveratrol ^c	Stilbene	P. abies	Heterobasidion paviporum; P. gigantea; S. lacrymans				
Combretastatin ^d	Stilbene	Combretum caffrum	R. solani; Pyricularia oryzae				
Tetrahydroxyflavanone	Flavonoid	Acacia auriculiformis	Phellinus badius				
teracacidin ^e							
Medicarpin ^f	Flavonoid	Dalbergia congestiflora	T. versicolor				
Thujaplicin ^g	Troponoid	Calocedrus macrolepis	L. betulina; Pycnoporus coccineus; T. versicolor; Schizophyllum commune; L. sulphureus; Phaeolus schweinitzii; G. trabeum; F. pinicola; G. australe; P. funereal; F. solani; Colletotrichum gloeosporioides; Trichoderma viride; Penicillium citrinum; Asper gillus niger				
Tropolone ^h	Troponoid	Cupressaceous trees	Postia placenta				
Cinnamaldehyde ^{ij}	Phen ylpropan oid	Cinnamomum sp.	Aspergillus flavus; L. sulphureus; T. versicolor; Saccharomyces cerevisiae; A. niger; Candida albicans; C. gloeosporioides; R. solani; F. solani; G. australe; L. betulina; Phytophthora capsici				
Dihydrodehydrodiconiferyl alcohol 9'-O-β-D-glucoside ^k	Neolignan glucoside	Styrax japonica	C. albicans; C. parapsilosis; Trichosporon beigelii; Malassezia furfur				
Liriodenin e ¹	Isoquinoline alkaloid	Michelia formosana	L. betulina; T. versicolor; L. sulphureus; G. trabeum; F. pinicola				

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); ^cMihara 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); ⁱWu et al. (2012).

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 (Martinez-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 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 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 with in 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).



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.

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 alkalinization 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 Ca²⁺ homeostasis by inducing Ca²⁺ 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 kJ kg¹mole¹ (Cray *et al.*, 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 chaotropicity 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; Korosec *et al.*, 2014; Podobnik *et al.*, 2008).

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 chaotropicity, 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 chaotropicity-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).



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

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; Martınez-Inigo *et al.*, 2001). In nature, laccases could be key actors of the extracellular degradation of extractives. They are copper-depending 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; Martinkova *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, lignosulfonate 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 carnosa and P. chrysosporium was the higher ability of P. carnosa 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 CytP450ome (Cytochrome P450 monooxygenases) and the GSTome (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. carnosa*, 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 (Hirosue *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 Omethyltransferases 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 O_2 and arrange it to generate hydroxylated compounds such as protocatechuate. 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, 1,4benzoquinone 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 1,4benzoquinone 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 (Krings et al., 2009).

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 (Bassler *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, 625e635. 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, 590e598. 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, 1061e1063. http://dx.doi.org/10.1271/bbb.64.1061.
- Bassler, C., M€ uller, J., Svoboda, M., Lep€ sova, A., Hahn, C., Holzer, H., Pouska, V., 2012. Diversity of wood-decaying fungi under different disturbance regimesda case study from spruce mountain forests. Biodivers. Conserv. 21, 33e49. //dx.doi.org/10.1007/s10531-011-0159-0.
- Beckham, G.T., Johnson, C.W., Karp, E.M., Salvachua, D., Vardon, D.R., 2016. Opportunities and challenges in biological lignin valorization. Curr. Opin. Biotechnol. 42, 40e53. 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., Ruijssenaars, H.J., Hallsworth, J.E., 2010. Hydrophobic substances induce water stress in microbial cells: hydrophobic substances induce cellular water stress. Microb. Biotechnol. 3, 701e716. http://dx.doi.org/10.1111/j.17517915.2010.00203.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, 1e7. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.02.054.
- Brefort, T., Scherzinger, D., Limon, 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, 132e143. http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2010.10.009.

- Cameron, M.D., Timofeevski, S., Aust, S.D., 2000. Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium*. Biotechnol. 54, 751e758.
- 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, 1333e1338. 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, 578e586. 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, 204e217. 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, 5145e5149. 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 90-O-b-D-glucosideanditsporeformingactioninplasmamembraneof*Candida albicans*. Biochim. Biophys. Acta BBA e Biomembr. 1818,1648e1655. http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.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, 453e492. http://dx.doi.org/10.1111/17517915.12027.
- 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, 287e296. http://dx.doi.org/10.1111/14622920.12018.
- 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, 228e259. http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio. 2015.02.010.
- Dalleau, S., Cateau, E., Berges, T., Berjeaud, J.-M., Imbert, C., 2008. In vitro activity of terpenes against *Candida* biofilms. Int. J. Antimicrob. Agents 31, 572e576. 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, 457e477. http://dx.doi.org/10.1007/s00294015-0496-8.
- 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, 1427e1434. 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., Gerardin, P., Gelhaye, E., 2015. The GST omereflects the chemical environment of whiterot 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, 4377e4382. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.9.4377-4382.2002.
- Dorado, J., Claassen, F.W., van Beek, T.A., Lenon, G., Detoxification of softwood extractives by white-rot fungi. J. Biotechnol. 80, 231e240.
- Doussot, F., De Jeso, 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, 5955e5961. 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, 1151e1158.
- 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, 8915e8922. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.125.

- Fuchs, G., Boll, M., Heider, J., 2011. Microbial degradation of aromatic compoundsdfrom one strategy to four. Nat. Rev. Microbiol. 9, 803e816. 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, 39e48. 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, 1367e1371.
- Hallsworth, J.E., Heim, S., Timmis, K.N., 2003. Chaotropic solutes cause water stress in *Pseudomonas putida*. Environ. Microbiol. 5, 1270e1280.
- Hao, D.C., Chen, S.L., Mu, J., Xiao, P.G., 2009. Molecular phylogeny, long-term evolution, and functional divergence of flavincontaining monooxygenases. Genetica 137, 173e187. http: //dx.doi.org/10.1007/s10709-009-9382-y.
- Harwood, C.S., Parales, R.E., 1996. The b-ketoadipate pathway and the biology of self-identity. Annu. Rev. Microbiol. 50, 553e590. http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.553.
- Hedenstrom, 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, 617e629. http://dx.doi.org/10.1007/s00226-016-0814-4.
- Hirosue, S., Tazaki, M., Hiratsuka, N., Yanai, S., Kabumoto, H., Shinkyo, 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, 118e123. 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^{2b} efflux is involved in cinnamaldehydeinduced 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, 243e253. 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, 549e556. http://dx.doi.org/10.1007/s00425004-1476-2.
- 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, 317e320. 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 30-hydroxylation of flavone from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biochem. (Tokyo) 147, 117e125. 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 30-hydroxylation of naringenin from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 387, 103e108. http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.06.134.
- Kebbi-Benkeder, Z., Colin, F., Dumarc, ay, S., Gerardin, P., 2015. Quantification and characterization of knotwood extractives of 12 European softwood and hardwood species. Ann. For. Sci. 72, 277e284. http://dx.doi.org/10.1007/s13595-014-0428-7.
- Kelsey, R.G., Gonzalez-Hern andez, 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, 349e355. http://dx.doi.org/10.1007/s13595-014-0429-6.

- Kilpelainen, A., Peltola, H., Ryyppo, A., Kello, S., 2005. Scotspine responses to elevated temperature and carbon dioxide concentration: growth and wood properties. Tree Physiol. 25, 75e83.
- Kim, Y., Ximenes, E., Mosier, N.S., Ladisch, M.R., 2011. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. Enzyme Microb. Technol. 48, 408e415. 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, 259e266. http://dx.doi.org/10.1093/jee/tov286.
- Korosec, B., Sova, M., Turk, S., Krasevec, 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, 955e966. 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 apinene to flavors with *Pleurotus sapidus*: regioselective hydroperoxidation of a-pinene and stereoselective dehydrogenation of verbenol. J. Agric. Food Chem. 57, 9944e9950. http://dx.doi.org/10.1021/jf901442q.
- Kusumoto, N., Ashitani, T., Murayama, T., Ogiyama, K., Takahashi, K., 2010. Antifungal abietanetype diterpenes from the cones of *Taxodium distichum* rich. J. Chem. Ecol. 36, 1381e1386. 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, 780e785. http://dx.doi.org/10.1002/iub.1326.
- Lekounougou, S., Mounguengui, S., Dumarc, ay, S., Rose, C., Courty, P.E., Garbaye, J., Gerardin, 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, 287e293. 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, 324e330. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.035.
- Liers, C., Pecyna, M.J., Kellner, H., Worrich, A., Zorn, H., Steffen, K.T., Hofrichter, M., Ullrich, R., 2013. Substrate oxidation by dye-decolorizing peroxidases (DyPs) from woodand litter-degrading agaricomycetes compared to other fungal and plant heme-peroxidases. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97, 5839e5849. http://dx.doi.org/10.1007/s00253-012-4521-2.
- Linde, D., Ruiz-Duenas, F.J., Fern~ andez-Fueyo, E., Guallar, V., Hammel, K.E., Pogni, R., Martinez, A.T., 2015. Basidiomycete DyPs:genomicdiversity,structuralefunctionalaspects,reaction mechanism and environmental significance. Arch. Biochem. Biophys. 574, 66e74. 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, 746e751. http: //dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05119.
- Martinez, A.T., Speranza, M., Ruiz-Duen~as, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillen, F., Martinez, M.J., Gutierrez, A., del Rio, J.C., 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol. 8, 195e204.
- Martinez-Inigo, M.J., Gutierrez, A., del Rio, J.C., Martinez, M.J., Martinez, A.T., 2001. Time course of fungal removal of lipophilic extractives from *Eucalyptus globulus* wood. J. Biotechnol. 84, 119e126.
- Martinez-Sotres, C., Lopez-Albarran, P., Cruz-de-Leon, J., Garc 1a-Moreno, T., Rutiaga-Quinones, J.G., V~ azquez-Marrufo, G., Tamariz-Mascarua, J., Herrera-Bucio, R., 2012. Medicarpin, an antifungal compound identified in hexane extract of *Dalbergia congestiflora* Pittier heartwood. Int. Biodeterior. Biodegr. 69, 38e40. http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.11.016.
- Martinez-Sotres, C., Rutiaga-Quinones, J.G., Herrera-Bucio, R.Gallo,M.,Lopez-Albarran,P.,2015.Molecular docking insights into the inhibition of laccase activity by medicarpin. Wood Sci. Technol. 49, 857e868. http://dx.doi.org/10.1007/s00226-015-0734-8. Martinkova, L., Kotik, M., Markov a, E., Homolka, L., 2016. Biodegradation of phenolic compounds by

Basidiomycota and its phenol oxidases: a review. Chemosphere 149, 373e382. 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, 39001e39011. 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., Dumarc, ay, S., Gelhaye, E., 2013. New substrates and activity of *Phanerochaete chrysosporium* Omega glutathione transferases. Biochimie 95, 336e346. 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, 16e22. 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, 789e804. 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, 248e263. http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.12015.
- Mori, T., Koyama, G., Kawagishi, H., Hirai, H., 2016. Effects of homologous expression of 1,4benzoquinone reductase and homogentisate 1,2-dioxygenase genes on wood decay in hyper-lignindegrading fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. Curr. Microbiol. 73, 512e518. http://dx.doi.org/10.1007/s00284016-1089-6.
- Nakamura, T., Ichinose, H., Wariishi, H., 2012. Flavin-containing monooxygenases from *Phanerochaete chrysosporium* responsible for fungal metabolism of phenolic compounds. Biodegradation 23, 343e350. http://dx.doi.org/10.1007/s10532-0119521-x.
- Ntougias, S., Baldrian, P., Ehaliotis, C., Nerud, F., Merhautova, V., Zervakis, G.I., 2015. Olive mill wastewater biodegradation potential of white-rot fungi e mode of action of fungal culture extracts and effects of ligninolytic enzymes. Bioresour. Technol. 189, 121e130. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.149.
- Oliva-Taravilla, A., Tomas-Pejo, E., Demuez, M., Gonz alez- Fernandez, C., Ballesteros, M., 2016. Phenols and lignin: key players in reducing enzymatic hydrolysis yields of steampretreated biomass in presence of laccase. J. Biotechnol. 218, 94e101. http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.11.004.
- Oliva-Taravilla, A., Tomas-Pejo, E., Demuez, M., Gonz alez- Fernandez, C., Ballesteros, M., 2015. Inhibition of cellulose enzymatic hydrolysis by laccase-derived compounds from phenols. Biotechnol. Prog. 31, 700e706. http://dx.doi.org/10.1002/btpr.2068.
- Pietsch, K.A., Ogle, K., Cornelissen, J.H.C., Cornwell, W.K.,Bonisch, 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, 1046e1057. 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 poacic acid targets b-1,3-glucan. Proc. Natl. Acad. Sci. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1410400112, 201410400.
- Podobnik, B., Stojan, J., Lah, L., Krasevec, N., Seliskar, M., Rizner, T.L., Rozman, D., Komel, R., 2008. CYP53A15 of *Cochliobolus lunatus*, a target for natural antifungal compounds. J. Med. Chem. 51, 3480e3486. http://dx.doi.org/10.1021/jm800030e.
- Pollegioni, L., Tonin, F., Rosini, E., 2015. Lignin-degrading enzymes. FEBS J. 282, 1190e1213. 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, 69e75.
- 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, 753e760. http://dx.doi.org/10.1007/s10532-0109340-5.
- 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, 212e221. 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, 8115e8126. 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/s13068-0160485-2.
- 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, 5062e5069. http://dx.doi.org/10.1128/AAC.0105010.
- 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, 2180e2188. 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, 65e74. 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, 555e560.
- Schultz, T.P., Nicholas, D.D., 2000. Naturally durable heartwood: evidence for a proposed dual defensive function of the extractives. Phytochemistry 54, 47e52.
- 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, 3919e3931. 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 Hb extrusion activity and ultrastructure of *Candida*. J. Med. Microbiol. 62, 232e240. 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 a-methyl trans cinnamaldehyde, its ligand and metal complexes: promising growth and ergosterol inhibitors. Biometals 24, 923e933. 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, 116e131. 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 carnosa* 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., Juranek, 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, 885e889. http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2000.3390.
- Tagger, S., Perissol, C., Gil, G., Vogt, G., Le Petit, J., 1998. Pheno- loxidases of the white-rot fungus *Marasmius quercophilus* isolated from an evergreen oak litter (*Quercus ilex* L.). Enzyme Microb. Technol. 23, 372e379. http://dx.doi.org/10.1016/S01410229(98)00062-3.
- Tejirian, A., Xu, F., 2011. Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds. Enzyme Microb. Technol. 48, 239e247. 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, 66e73. 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. Transcriptomic responses of *Phanerochaete chrysosporium* to oak acetonic extracts: focus on a new glutathione transferase. Appl. Environ. Microbiol. 80, 6316e6327. 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, 241e267. 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, 3686e3697.
- 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, 76e84. 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, 45e56. http://dx.doi.org/10.1111/j.14610248.2008.01259.x
- Willfor, S.M., Ahotupa, M.O., Hemming, J.E., Reunanen, M.H.T.Eklund, P.C., Sjoholm, 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, 7600e7606. 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, 737e747. 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, 54e60. 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 highthroughput 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, 1309e1312. 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, 4871e4877. 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 e Biomembr. 1848, 695e701. 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.

<u>Chapitre II : Les systèmes de dégradation du bois et de détoxication des champignons</u> <u>saprophytes sont interconnectés</u>

Dans ce second chapitre, une courte introduction sera dédiée aux champignons de façon générale. Volontairement, les champignons saprophytes seront décrits plus en détails. A la fin de ce chapitre, l'ensemble des mécanismes de dégradation et de détoxication seront abordés.

1. <u>Généralités sur le règne fongique : classification et taxonomie</u>

Le règne fongique regroupe plus d'un million d'espèces, ce sont des organismes eucaryotes et hétérotrophes. En raison de la diversité d'organismes appartenant à ce règne, la classification des champignons fut difficile à établir. Néanmoins, ce règne peut être divisé en cinq groupes majeurs : les Chytridiomycètes, les Gloméromycètes, les Zygomycètes, les Ascomycètes et les Basidiomycètes. D'un point de vue morphologique, ces organismes peuvent être de deux types : unicellulaires et pluricellulaires filamenteux. D'autre part, les organismes fongiques se distinguent par la présence d'une paroi riche en chitine et d'une membrane plasmique qui contient de l'ergostérol.

2. Les différents types trophiques

Une autre caractéristique mettant en évidence la diversité au sein de ces organismes est l'existence de différents types trophiques pour accéder aux éléments nutritifs. Chez les champignons, il existe trois principaux types trophiques qui s'incrivent dans un continuum évolutif composé dans l'ordre suivant : le saprotrophisme, la symbiose mutualiste et le parasitisme (Jones, Smith, 2004 ; Veneault-Fourrey, Martin, 2011). Les deux premiers seront brièvement décrits ci-dessous alors que les champignons saprophytes seront décrits plus en détails.

2.1. Les champignons symbiotiques

Les champignons symbiotiques (ou mycorhiziens) établissent des relations de symbiose avec les racines des plantes. Il existe deux types de symbioses : les ectomycorhizes formant un manteau mycélien entourant les racines et qui s'insinuent entre les cellules du cortex racinaire via le réseau de Hartig et les endomycorhizes pour lesquelles les hyphes pénètrent dans les cellules racinaires et développent des structures arbusculaires (Duponnois et al., 2013). Au cours de ces interactions, des échanges d'éléments nutritifs et de minéraux entre les deux partenaires vont avoir lieu. En effet, des composés osidiques produits par la plante lors du processus de photosynthèse vont être puisés par l'organisme fongique. Le réseau mycélien de ce-dernier va favoriser l'acquisition par l'hôte végétal de l'eau et des minéraux (Duponnois et al., 2013).

2.2. Les champignons pathogènes

Les champignons pathogènes sont des organismes capables de provoquer des maladies à l'hôte qu'ils contaminent. En raison de la large gamme d'hôtes pouvant être infectés, les champignons pathogènes ont été très étudiés et différentes revues scientifiques décrivent plus en détails les caractéristiques et les mécanismes moléculaires gouvernant ces interactions (Lo Presti et al., 2015; Wang, Wang, 2017; Nigg, Bernier, 2017).

2.3. Les champignons saprophytes

2.3.1. Généralités

Les champignons saprophytes sont des organismes qui se nourrissent de matière organique et donc qui contribuent à sa décomposition. Au sein des écosystèmes forestiers, ces organismes jouent un rôle crucial dans le recyclage de la matière organique, une des étapes clés du cycle du carbone. Afin de dégrader les principaux polymères des parois de cellules végétales, les champignons saprophytes ont différentes approches. Dans la majorité des cas, les hyphes des champignons vont dégrader les parois depuis l'intérieur des cellules (Figure n° 12). D'autre part, les hyphes à l'extérieur sont aussi capables de perforer les parois végétales dans le but d'y pénétrer et d'y débuter la dégradation (Schwarze, 2007). Selon les capacités de dégradation des champignons décomposeurs, les polymères ciblés ne sont pas les mêmes (Figure n°12; Schwarze, 2007). Les champignons dégradeurs de bois peuvent être divisés en trois groupes écologiques : les champignons de pourriture molle, de pourriture brune et de pourriture blanche. Dans le cas des pourritures brunes et blanches, ces deux groupes appartiennent au phylum des Basidiomycètes (Blanchette, 2000) tandis que la plupart des agents de pourriture molle font partie des Ascomycètes (Blanchette et al., 2004).



Figure n°12 : (A) Exemple de dégradation de cellules de bois par un champignon de pourriture brune. Dans un premier temps, des petites molécules radicalaires diffusent dans la paroi (petits ravons rouges). Ensuite des enzymes sont sécrétées et vont dégrader la paroi secondaire en ciblant la cellulose et les hémicelluloses. Il ne reste que la paroi primaire et la lamelle moyenne qui contiennent la lignine. (B) Dégradation sélective de la lignine par un champignon de pourriture blanche. Dans un premier temps, l'hyphe dégrade les hémicelluloses et la lignine dans la cavité cellulaire. Ensuite la dégradation de la lignine et de la pectine présente dans la lamelle moyenne a pour conséquence de désolidariser les cellules entre elles. La cellulose quant à elle, n'est pas impactée. (C) Dégradation simultanée de tous les composants de la paroi par un champignon de pourriture blanche. Par la suite les hyphes ramifiés peuvent perforer les parois et la lamelle moyenne pour pénétrer dans une seconde cellule. (D) Dégradation par un champignon de pourriture molle. L'hyphe à l'intérieur de la cellule peut pénétrer dans la paroi secondaire et peut provoquer des cavités à l'intérieur de celle-ci. Par la suite, la paroi secondaire sera entièrement dégradée contrairement à la paroi primaire accolée à la lamelle moyenne. Les hyphes sont représentés en noir. La flèche (en forme de Z) symbolise l'évolution de la dégradation pour chaque type de champignon saprophyte. La lamelle moyenne permettant la jonction entre les cellules et qui contient de la pectine et de la lignine est représentée en orange (issue de Schwarze, 2007).

2.3.2. Les champignons de pourriture molle

Les champignons de pourriture molle (en anglais « soft-rot fungi ») regroupent principalement les Ascomycètes. Ces organismes sont capables de former des cavités dans la paroi des cellules de bois et sont capables de dégrader entièrement la paroi secondaire (Figure n°12D ; Hatakka et Hammel, 2011).

2.3.3. Les champignons de pourriture brune

Les champignons de pourriture brune se distinguent par la présence d'une coloration brune du bois en cours de décomposition. D'un point de vue écologique, ces champignons sont principalement retrouvés sur des bois de conifères (Gilbertson, 1980).

Différentes pourritures brunes sont utilisées comme modèle d'étude, on peut citer à titre d'exemple *Serpula lacrymans, Gloeophyllum trabeum* ou *Postia placenta* (Figure n°13). Parmi eux, *Serpula lacrymans*, couramment appelée la mérule, pose des problèmes sociétaux à cause des dommages qu'elle occasionne vis-à-vis des habitations (Gabriel et Švec, 2017).



Figure n°13 : Photographies de *Serpula lacrymans* (http://www.smhv.net/merule-serpula-lacrymans.ws), *Gloeophyllum trabeum* (https://genome.jgi.doe.gov/Glotr1_1/Glotr1_1.home.html) et de *Postia placenta* (https://www.first-nature.com/fungi/postia-placenta.php).

La coloration brune s'explique par la présence enrichie en lignine qui est chimiquement modifiée par les agents de pourriture brune (Cowling, 1961). En effet, ces organismes ont subi plusieurs évènements évolutifs (voir la section « Analyse génomique des champignons de pourriture ») qui ont eu pour conséquence de diminuer leur capacité à minéraliser la lignine. Au même titre que leurs ancêtres (les pourritures blanches), les pourritures brunes possèdent un système enzymatique extracellulaire hydrolytique ainsi qu'un système oxydatif permettant de dégrader les deux polysaccharides (cellulose et hémicellulose). En comparaison avec leurs ancêtres, les pourritures brunes dégradent plus efficacement les polysaccharides (Blanchette, 2000, Daniel, 1994). En revanche, les agents de pourritures brunes ont recours à des processus oxydatifs pour modifier chimiquement la lignine. Au même titre que les pourritures blanches, ces organismes sont capables de développer la réaction de Fenton (Hammel et al., 2002), au cours de laquelle il y a production de radicaux hydroxyles (Figure n°14).

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

Figure n°14 : Réaction de Fenton permettant la production de radicaux hydroxyles.

La présence en forte quantité d'agents oxydants a pour conséquence de modifier chimiquement la lignine et cela dans le but de rendre plus accessible les polysaccharides aux enzymes hydrolytiques, comme par exemple les glycosides hydrolases.

Pour permettre la réaction de Fenton, les champignons de pourriture brune ont développé un système permettant de recycler le Fe^{3+} (Jensen et al., 2001). Pour cela, il a été montré que l'agaricomycète, *Gloeophyllum trabeum*, secrète deux composés : la 2,5-diméthoxyhydroquinone et la 4,5-diméthoxycatéchol qui réduisent le Fe^{3+} en Fe^{2+} et s'oxydent pour former des semiquinones (qui sont des radicaux). Ces semiquinones vont ensuite réduire du dioxygène ainsi que du Fe^{3+} pour former des radicaux hydroperoxydes et à nouveau du Fe^{2+} (Figure n°15). Pendant cette étape, les semiquinones sont transformées en quinones (Suzuki et al., 2006).



Figure n°15 : Mécanisme de la réaction enclenchée par le 4,5-diméthoxycatéchol secrété par *Gloeophyllum trabeum* pour régénérer les ions Fe^{2+} dans le but de réalimenter la réaction de Fenton (issue et modifiée de Suzuki et al., 2006).

D'autre part, les agents de pourriture brune sont capables de sécréter des molécules d'oxalate qui vont abaisser le pH environnant (Espejo and Agosin, 1991). Dans des conditions acides, l'oxalate va rapidement chélater le fer ferrique (Fe^{3+}) (Jensen et al., 2001). Cette chélation va permettre de solubiliser le fer. Le complexe entre la molécule d'oxalate et de Fe^{3+} pourra être ensuite réduit par d'autres composés (comme le 4,5-diméthoxycatéchol) afin d'initier la réaction de Fenton (Hammel et al., 2002).

2.3.4. Les champignons de pourriture blanche

Les champignons de pourriture blanche sont capables de dégrader tous les composants de la paroi des cellules végétales que ce soit la cellulose, les hémicelluloses et la lignine (Blanchette, 2000). Comme leur nom l'indique, ces agents de pourriture se distinguent par une coloration blanche du bois en cours de dégradation, cette coloration blanchâtre témoignant de la dégradation de la lignine. Les stratégies de dégradation utilisées par les champignons de pourriture blanche ne sont pas toujours les mêmes. En effet, même si la plupart d'entre eux attaque en même temps la lignine, les hémicelluloses et la cellulose (c'est le cas par exemple de *Trametes versicolor* et de *Phanerochaete chrysosporium*), certains dégradent sélectivement et préférentiellement la lignine (comme par exemple *Dichomitus squalens*, (Dashtban et al., 2010)).

Au même titre que les champignons de pourriture brune, les agents de pourritures blanches utilisent aussi des processus oxydatifs comme la réaction de Fenton pour produire des radicaux hydroxyles lors de la dégradation de la biomasse lignocellulosique (Arantes et al., 2011 ; Tanaka et al., 1999). Pour dégrader la lignine, les agents de pourritures blanches utilisent également une multitude d'oxydoréductases comme les peroxydases et les laccases. Ces enzymes seront décrites plus en détails dans la section « c. Mécanisme de dégradation enzymatique de la lignine ». *A contrario* des champignons de pourriture brune, les agents de pourriture blanche sont principalement retrouvés sur les bois de feuillus. Les deux principaux modèles de pourriture blanche sont *Phanerochaete chrysosporium* (Figure n°16), dont le génome pour la souche RP78 a été séquencé pour la première fois en 2004 ; (Martinez et al., 2004) et *Trametes versicolor* (dont le génome a été séquencé en 2012 (Floudas et al., 2012)).



Figure n°16 : Photographie de *Phanerochaete chrysosporium* (https://genome.jgi.doe.gov/Phchr2).

2.3.4.1. Description du modèle *Trametes versicolor* utilisé dans cette étude *Trametes versicolor* est un champignon filamenteux appartenant à l'ordre des polypores (Figure n°17).



Figure n°**17 :** Photographies de *Trametes versicolor* dans son environnement (à gauche, photographie issue de Justo et Hibbett, 2011 ; et à droite, photographie personnelle prise en forêt de Champenoux - 54280).

D'un point de vue écologique, *T. versicolor* est généralement retrouvé sur du bois mort issus d'arbres encore debout ou tombés au sol. C'est un champignon très répandu en forêt tempérée et notamment sur le continent européen où il fut identifié dans plusieurs pays tels que les Pays-Bas, l'Allemagne et la France. A l'échelle mondiale, *Trametes versicolor* peut être retrouvé sur au moins 295 essences de bois et sous différents climats : tempéré, boréal et tropical (Figure n°18, Carlson et al., 2014).

Cependant, ses substrats préférentiels sont surtout les bois d'angiospermes (*Quercus sp, Fraxinus sp, Betula sp, Populus sp*) et aussi certains bois de gymnospermes (*Picea sp*, Derbsch, Schmitt, 1987; J Kriegelsteiner, 2000; Kuyper, 1995).



Figure n°18 : Répartition géographique de *Trametes versicolor* disponible sur la base de données des champignons, « Fungal databases – Fungus-Host Distributions » à l'adresse suivante https://nt.ars grin.gov/fungaldatabases/fungushost/new_frameFungusHostReport.cfm. Cette carte a été obtenue en utilisant le logiciel en ligne, http://umap.openstreetmap.fr.

Au même titre que *P. chrysosporium*, *T. versicolor* est un champignon très étudié pour ses capacités de dégradation mais aussi pour son aptitude à décomposer des composés récalcitrants dans un contexte de bioremédiation (Ryan et al., 2007). Enfin, tout comme le champignon *Ganoderma lucidum*, *T. versicolor* est également utilisé dans la médecine asiatique. En effet, il a été montré que des extraits glucidiques de *T.versicolor* pouvaient avoir des effets thérapeutiques sur la santé animale et humaine (Wasser, Weis, 1999).

3. <u>Analyse et comparaison génomique des champignons décomposeurs de bois</u>

Ces dernières années, le domaine de la génomique a connu un essor important grâce à l'amélioration des techniques et des méthodes de séquençage. A l'heure actuelle, dans le cadre du projet « 1000 Fungal Genomes Project », plus de 1000 génomes d'organismes fongiques ont été séquencés (à la date du 24 avril 2018). Appliquées aux champignons décomposeurs, ces méthodes ont apporté des avancées considérables pour l'étude de ces organismes (Ohm et al., 2014).

Ce fut en 2004 que le génome du premier champignon décomposeur de bois *Phanerochaete chrysosporium* (une pourriture blanche), fut séquencé (Martinez et al., 2004). Son génome présente un nombre important de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la dégradation de la lignine. C'est le cas des enzymes de type oxydase (EC 1.10.3.2) et peroxydase (EC 1.11.1.7).

Certaines d'entre elles, les lignine peroxydases (LiPs), les manganèse peroxydases (MnPs) et les versatile peroxydases (VPs) en font partie. Ces trois familles appartiennent aux peroxydases de classe II. La classe II correspond à des peroxydases fongiques qui sont sécrétées et qui participent à la dégradation de la lignine (Hiner et al., 2002). Les peroxydases nécessitent la présence de peroxyde d'hydrogène pour effectuer leur cycle catalytique. Dans le génome de *P. chrysosporium*, des gènes codant pour des enzymes synthétisant du peroxyde d'hydrogène telles que les glyoxal oxydases et les aryl-alcool oxydases, ont aussi été identifiés (Martinez et al., 2004).

D'autre part, un nombre très important de gènes (environ 240) codant pour des enzymes réactives visà-vis des polysaccharides, les CAZymes, a pu être détecté dans le génome de ce champignon (Martinez et al., 2004). Par ordre décroissant du nombre de gènes codant des CAZymes, une majorité code pour les glycoside hydrolases (GH), puis les glycosyltransférases (GT) et enfin les carbohydrates estérases. Le terme « cellulase » désigne les enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose. Les cellulases appartiennent à différentes sous-familles de GH : 1, 3, 5-9, 12 et 45 (Rytioja et al., 2014). Dans le génome de *P. chrysosporium*, au sein des GH, les gènes codant des cellulases, plus précisément pour des endoglucanases (GH 3, 5, 6, 7, 9, 12 et 45), des cellobiohydrolases (GH 6 et 7) ainsi que des glucosidases (GH 1 et 3) ont également été retrouvés.

D'autre part, un nombre important de gènes codant pour des cytochromes P450 monooxygénases (148 CYP450s), enzymes impliquées dans les voies de détoxication et dans le métabolisme secondaire a pu être detecté. Un grand nombre de gènes (113) codant pour les « Major Facilitator Superfamily » (MFS) a aussi été identifié. Les MFS sont des protéines de transport impliquées dans les processus de détoxication, car elles participent notamment à l'exportation de composés toxiques (Morschhäuser, 2010). Ces résultats ont aussi été confirmés pour d'autres génomes de pourriture blanche comme ceux de *Ceriporiopsis subvermispora* (Fernandez-Fueyo et al., 2012), *Ganoderma lucidum* (Chen et al., 2012) et pour ceux issus du genre *Armillaria sp* (Sipos et al., 2017).

Chez les champignons de pourriture brune, le génome de *Postia placenta* fut l'un des premiers à être séquencé. Un nombre de CAZymes aussi important que celui du modèle de pourriture blanche, *P. chrysosporium*, a pu être quantifié (242 pour *P. placenta* contre 240 pour *P. chrysosporium*). Cependant, dans son génome aucun gène codant pour des exocellobiohydrolases et des endoglucanases n'a été detécté. En effet, certaines sous-familles de GH sont absentes dans son génome : les GH 5, 6, 7 et 11. Par ailleurs, d'autres familles de gènes codant pour des peroxydases réactives vis-à-vis de la lignine (LiPs, MnPs, VPs), n'ont pas été identifiées.

A partir du nombre de gènes codant pour des peroxydases (réactives vis-à-vis de la lignine, POD) collectés sur une trentaine de génomes de champignons et en utilisant une méthode basée sur l'inférence bayésienne, il a été possible de proposer les différents évènements évolutifs qui ont eu lieu sur ces enzymes. En effet, les Basidiomycètes seraient apparus il y a 521 millions d'années et ils ne possédaient qu'une seule copie de gènes de POD. Cependant, lors de l'apparition des Agaricomycètes (il y a 290 millions d'années), un phénomène de divergence évolutive aurait conduit à une extension des POD dont le nombre de copie serait passé de 2 à 7 (Figure n°19).

Par la suite, des phénomènes d'extension de POD se seraient effectués dans certains ordres de champignons tels que les Auriculariales, les Hyménochaetales, les Corticiales, les Polypores et les Russules (Figure n°19, traits bleus). Ce phénomène d'extension aurait permis l'apparition des pourritures blanches. En revanche, des phénomènes de contraction de POD auraient eu lieu dans l'ordre des Boletales, des Gloeophyllales, des Dacrymycètales et aussi pour certaines espèces de l'ordre des Polypores (Figure n°19, traits rouges). Ces phénomènes de contraction seraient à l'origine des pourritures brunes.



Figure n°19 : Chronogramme des champignons en relation avec le nombre de copies de gènes codant pour des peroxydases actives vis-à-vis de la lignine (issue de Floudas et al., 2012).

Par ailleurs, des analyses phylogénomiques ont montré que plus de 400 familles de gènes sont corrélées avec l'évolution des champignons de pourriture blanche. Parmi ces familles, il y a celles impliquées dans la dégradation des parois des cellules végétales comme les POD, les cellobiohydrolases et les monooxygénases de polysaccharides (LPMO). De plus, d'autres familles d'enzymes impliquées dans le transport (les « Major Facilitator Superfamily ») et dans la détoxication (CYP450s et les glutathion transférases) ont également été identifiées comme marqueurs des agents de pourriture blanche (Nagy et al., 2017).

3.1. Confirmation de l'importance physiologique des PODs et des CAZymes

Suite à l'identification des gènes obtenue par la génomique comparative, l'utilisation de méthodes complémentaires a permis de confirmer les rôles biologiques des POD et des CAZymes lors de la dégradation de la biomasse lignocellulosique.

Une première méthode vise à étudier les niveaux d'expression des gènes. En effet, plusieurs études dites « transcriptomiques », se sont attachées à évaluer l'expression des gènes codant pour des POD et des CAZymes lorsque les champignons se développent sur du bois. L'ensemble des résultats a montré une surexpression des gènes codant des POD et des CAZymes confirmant ainsi leurs implications potentielles (Thuillier et al., 2014 ; Korripally et al., 2015).

Une seconde méthode est dédiée à l'identification des protéines synthétisées lors de la dégradation de la biomasse lignocellulosique par un champignon. En effet, l'optimisation des méthodes d'extraction, de séparation et de caractérisation des protéines sécrétées par les dégradeurs de bois a aussi permis de confirmer les rôles physiologiques des POD et des CAZymes (Abbas et al., 2005 ; Bouws et al., 2008 ; Manavalan et al., 2011).

4. Les mécanismes de dégradation enzymatique des champignons

4.1. La dégradation enzymatique des polysaccharides

Les CAZymes correspondent à des enzymes qui sont réactives vis-à-vis des carbohydrates, ces enzymes sont classées en cinq grandes familles : les glycoside hydrolases (GHs), les glycosyltransférases (GTs), les polysaccharide lyases (PLs), les carbohydrate estérases (CEs) et les enzymes à activités auxiliaires (AAs ; http://www.cazy.org/).

Chez les Basidiomycètes, que ce soit dans la dégradation des polymères de cellulose, des hémicelluloses et de la pectine, quatre grandes familles de CAZymes, contenant plusieurs sous-familles, sont impliquées (Rytioja et al., 2014) :

- Les GH 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 25, 26, 28, 30, 35, 36, 37, 43, 45, 51, 53, 54, 62, 67, 74, 78, 93 et 115
- Les CE 1, 5, 8, 12, 15 et 16
- Les PL 1, 3, 4, 9 et 11
- Les AA 3 et 9

4.1.1. La dégradation de la cellulose

Afin de dégrader le polymère de cellulose, les champignons sont capables de sécréter des cellulases. Les cellulases sont des enzymes hydrolytiques qui hydrolysent les liaisons osidiques de type β -1,4 au sein de la cellulose (Pérez et al., 2002). Les cellulases sont divisées en trois catégories qui sont les endoglucanases et les cellobiohydrolases et les β -glucosidases (Rytioja et al., 2014). Les endoglucananes (EC 3.2.1.4) clivent préférentiellement les liaisons osidiques dans les zones amorphes de la cellulose (Figure n° 20). Les cellobiohydrolases (EC 3.2.1.176 et EC 3.2.1.91) agissent sur les extrémités réductrices de la cellulose et aussi sur les produits de dégradation des endoglucanases. Ensemble, les deux classes d'enzymes peuvent dégrader la cellulose cristalline (Baldrian, Valásková, 2008). Pour ces deux classes d'enzymes, le produit de dégradation est le même et il s'agit d'une molécule de cellobiose. Ensuite, les unités de cellobiose seront clivées en deux molécules de glucose sous l'action des β -glucosidases (EC 3.2.1.21, Figure n°20). D'autre enzymes en association avec celles citées ci-dessus, participent à la dégradation de la cellulose ; il s'agit des cellobiose deshydrogénases (CDHs, EC 1.1.99.18) et des monooxygénases de polysaccharides (LPMOs).



Figure n°20 : (A) Dégradation enzymatique de la cellulose (issue et modifiée de Rytioja et al., 2014). (B) Mécanisme d'action des CDHs (issue de Baldrian et al., 2008). (C) Clivage oxydatif de la cellulose par les LPMOs (issue de Hemsworth et al., 2015). (D) Aperçu du site actif contenant l'atome de cuivre stabilisé par l'histidine conservée. Cet atome de cuivre va fixer une molécule de dioxygène (issue de Walton, Davies, 2016).

Les CDHs sont des enzymes extracellulaires qui sont capables d'oxyder les unités cellobiose issues de l'hydrolyse de la cellulose (Baldrian, Valásková, 2008). Ces enzymes contiennent dans leurs structures un hème et un domaine permettant la fixation de la flavine adénine dinucléotide (FAD). C'est à partir de ce domaine que deux électrons sont retirés du cellobiose (Payne et al., 2015). L'hème contribue au transfert des électrons provenant du domaine FAD à destination d'accepteurs d'électrons. Parmi ces accepteurs, il a été suggéré que les CDHs fourniraient les électrons à l'atome de cuivre présent dans le site actif des LMPOs pour initier leur cycle catalytique (Tan et al., 2015).

Les LPMOs ont été découvertes récemment (en 2010) et des études récentes ont montré que ces enzymes sont capables d'oxyder directement la cellulose et provoquent le clivage des liaisons osidiques (Villares et al., 2017). Ces enzymes peuvent oxyder à deux positions différentes le cellobiose : aux positions 1 et 4 (Hemsworth et al., 2015). L'oxydation a pour conséquence de cliver les deux sous-unités générant l'une d'entre elles sous forme de lactone (ce qui correspond à un hétérocycle comportant une fonction cétone, Figure n°20C). Les LPMOs peuvent cliver d'autres polysaccharides comme la chitine, le xylane, l'amidon et le glucomannane (Hemsworth et al., 2015). La caractérisation structurale des LPMOs a permis de révéler l'organisation de leur site actif. En effet, celui-ci est composé d'acides aminés aromatiques qui auraient pour rôle de fixer le substrat (la cellulose). De plus, le site actif est configuré pour accueillir un atome de cuivre. Cet atome de cuivre est stabilisé via des interactions avec une histidine conservée (Figure n°20D ; Walton, Davies, 2016).

4.1.2. La dégradation des hémicelluloses

De par la diversité des oses présents dans la structure des hémicelluloses, les champignons utilisent plusieurs enzymes pour dégrader ces polysaccharides (Shallom, Shoham, 2003). A titre d'exemple, pour dégrader le xylane qui est le constituant majeur des hémicelluloses, les champignons possèdent des β -1,4-endoxylanases (EC 3.2.1.8), des xylobiohydrolases (EC 3.2.1) et des β -1,4-xylosidases (EC 3.2.1.37, Rytioja et al., 2014). Pour les autres constituants des hémicelluloses, le tableau ci-dessous récapitule les enzymes spécifiques dédiées à leur dégradation (Tableau n°1 ; Rytioja et al., 2014). Par ailleurs, les LPMOs sont aussi capables de dégrader les hémicelluloses (en particulier le xylane et le xyloglucane, voir le paragraphe précédent) (Agger et al., 2014).

Substrats et structures	Enzymes	Classification de l'enzyme
Xylane wood and we way	β-1,4-endoxylanase	3.2.1.8
instration of the	Xylobiohydrolase	3.2.1
" " The second s	β-1,4-Xylosidase	3.2.1.37
Galactomannane	alactomannane β-1,4-Endomannanase	
OH	β-1,4-Mannosidase	3.2.1.25
HO HO H	β-1,4-Galactosidase	3.2.1.23
и и нон и ни но и и нон и ни но и п нон и ни но	α-1,4-Galactosidase	3.2.1.22
	α-Arabinofuranosidase	3.2.1.55
	Galactomannane acétyl estérase	3.1.1.
Xyloghucane	Xyloglucane β-1,4-endoglucanase	3.2.1.151
E e e e e e e e e e e e e e e e e e e e	α-Arabinofuranosidase	3.2.1.55
но то он но он	α-Xylosidase	3.2.1.177
NOT ON OCTOR OF ON ON	α-Fucosidase	3.2.1.51
HOTO	α-1,4-Galactosidase	3.2.1.22
1	β-1,4-Galactosidase	3.2.1.23
Arabinoxylane	Arabinoxylane arabinofuranohydrolase/arabinofuranosidase	3.2.1.55
-A	a-Glucuronide	3.2.1.139
de esta de la de	α-1,4-Galactosidase	3.2.1.22
Here here here	β-1,4-Galactosidase	3.2.1.23
APT APA HA	Acétyl xylane estérase	3.1.1.72
1259 - Seri 7 - 88	Féruloyl estérase	3.1.1.73

Tableau n°1 : Enzymes impliquées dans la dégradation des hémicelluloses (issue de Rytioja et al., 2014).

4.1.3. La dégradation de la pectine

Il existe une diversité d'enzymes fongiques permettent la dégradation de la pectine, c'est le cas des endopolygalacturonases (EC 3.2.1.15) et des exopolygalacturonases (EC 3.2.1.67). De plus, les champignons de pourriture brune et blanche sont aussi capables de sécréter des molécules d'oxalate. L'oxalate va chélater les ions calcium présents dans la structure des pectines ce qui va permettre de déstructurer les pectines et de les rendre plus accessible à l'action des polygalacturonases (Green et al., 1996).

4.2. Les mécanismes de dégradation enzymatique de la lignine

Les champignons de pourriture blanche sont capables de sécréter des enzymes lignolytiques extracellulaires qui sont des oxydoréductases. Dans cette partie, les mécanismes de deux types d'oxydoréductases seront décrits : les peroxydases et les laccases.

Les peroxydases représentent une grande famille d'oxydoréductases qui utilise une molécule de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pour oxyder un substrat. La plupart des peroxydases contiennent un hème comme co-facteur. Dans le cadre de la dégradation de la lignine, il existe différentes familles de peroxydases. Volontairement, je décrirai plus en détails quatre d'entre elles, les lignine peroxydases (LiPs), les manganèse peroxydases (MnPs), les versatile peroxydases (VPs) et les peroxydases décolorantes de pigments (DyPs). Dans les génomes des champignons de pourriture blanche, ce sont surtout les gènes codant les LiPs et les MnPs qui sont présents de façon majoritaire (Tableau n°2).

Espèces	Lignine peroxydase	Manganèse peroxydase	Versatile peroxydase	Peroxydases décolorantes de pigments
Bjerkandera adusta	12	6	1	10
Phlebia brevispora	5	6	0	3
Phanerochaete chrysosporium	10	5	0	0
Dichomitus squalens	0	9	3	1
Ganoderma sp	0	6	2	3
Trametes versicolor	10	12	3	2
Gelatoporia subvermispora	1	13	1	0
Serpula lacrymans	0	0	0	0
Gloeophyllum trabeum	0	0	0	0
Postia placenta	0	0	0	2

Tableau n°2 : Répartition du nombre de gènes codant pour les LiPs, les MnPs, les VPs et les DyPs pour certains champignons de pourriture blanche (fond blanc) et de pourriture brune (fond orange) (disponible sur le site du Joint Genome Institute).

4.2.1. Les lignine peroxydases (LiPs)

Ce fut au début des années 1980 que les premières lignines peroxydases (LiPs, EC 1.11.1.14) furent découvertes chez les champignons de pourriture blanche. En effet, Glenn et collaborateurs ont mis en évidence une enzyme sécrétée par *Phanerochaete chrysosporium* qui, dans le milieu extracellulaire, était capable de catalyser des réactions de clivage oxydatif de modèles de lignine (Glenn et al., 1983). Cette découverte fut aussi confirmée par Tien et Kirk, ces-derniers ont aussi pu identifier l'implication de cette enzyme dans les processus oxydatifs de dégradation de la lignine (Tien, Kirk, 1983). Par ailleurs, à partir de cultures liquides de *P. chrysosporium* et à l'aide de techniques chromatographiques, ces chercheurs sont parvenus à purifier la première LiP. Dans le même temps, ils ont aussi pu démontré l'importance de la présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en tant que donneur d'électrons, pour permettre son activité (Tien, Kirk, 1983). A partir de cette première découverte, l'étude des LiPs a connu un essor important avec la caractérisation de LiPs issues de plusieurs champignons décomposeurs (Hofrichter et al., 2010). En général, les LiPs sont des enzymes dont la masse moléculaire est comprise entre 38 et 43 kDa.

Ces enzymes sont capables d'oxyder une large gamme de composés : phénoliques (l'alcool vératrylique), non-phénoliques (la liaison aryl-glycérol β -aryl éther) et des méthoxybenzènes (Pollegioni et al., 2015). D'un point de vue structural, à l'intérieur du site d'oxydation des LiPs se trouve un tryptophane catalytique qui permet le transfert d'électron en direction de l'hème (Hofrichter et al., 2010). Les LiPs ont un rôle dans la dégradation de la lignine car elles sont capables de cliver directement les liaisons latérales entre deux atomes de carbone (Figure n° 21, Pollegioni et al., 2015) et notamment entre les carbones C α et C β . Le peroxyde d'hydrogène pourrait provenir, en partie, de l'action d'enzymes comme les glyoxal oxydases (EC 1.2.3.15) et les aryl alcool oxydases (EC 1.1.37) elles-mêmes sécrétées par le champignon (Whittaker et al., 1999).



Figure n°21 : Mécanisme d'action des LiPs sur un modèle de lignine (issue de Pollegioni et al., 2015).

4.2.2. Les manganèse peroxydases (MnPs)

D'un point de vue génomique, les manganèse peroxydases (MnPs, EC 1.11.1.13) sont autant présentes que les lignine peroxydases. L'analyse des séquences peptidiques a montré que les MnPs présentent une vingtaine d'acides aminés de plus que les LiPs et possèdent donc une masse moléculaire plus importante (45-60 kDa). D'autre part ces enzymes sont spécifiques de l'oxydation de l'ion manganèse en conditions acides. Pour permettre cette réaction, les MnPs possèdent un site de fixation du manganèse proche du site de fixation de l'hème. Afin que la protéine puisse interagir avec le manganèse, trois acides aminés sont impliqués pour établir des liaisons électrostatiques, il s'agit de deux glutamates et d'une asparagine (Hofrichter et al., 2010).

Le cycle catalytique des MnPs débute par la fixation d'un groupement peroxyde sur l'atome de fer contenu dans l'hème de la protéine ce qui va avoir pour conséquence de former un état intermédiaire avec un atome de fer sous forme Fe^{4+} (Figure n°22, étape 1). Pour réduire ce premier état intermédiaire, un ion manganèse (Mn²⁺) va donner un électron, entraînant la réduction de l'atome de fer et la production d'une molécule de Mn³⁺ (Figure n°22, étape 2).

Puis, une seconde étape de réduction similaire à la première permettra de produire une seconde molécule de Mn^{3+} . Lors de cette même étape, l'atome de fer est de nouveau réduit et redevient accessible pour initier un nouveau cycle catalytique (Figure n°22, étape 3, Hofrichter, 2002).



Figure n°22 : Mécanisme d'action d'une manganèse peroxydase. Le symbole délimitant l'atome de fer représente l'hème de la protéine. Les formes chélatées des ions Mn^{2+} et Mn^{3+} sont symbolisés par des cercles gris (issue de Hofrichter, 2002).

Les ions Mn³⁺, issus de l'oxydation du Mn²⁺, sont ensuite chélatés par des molécules d'oxalate sécrétées par le champignon. La chélation du Mn³⁺ a pour conséquence de diminuer sa capacité oxydante. Sous cette forme chélatée, le Mn³⁺ ne peut pas oxyder les structures non-phénoliques de la lignine. Cependant, elle peut oxyder des composés phénoliques (comme ceux présents aux extrémités de la lignine), des groupements amines, des groupements thiols, ou des acides carboxyliques (Hofrichter, 2002, Pérez et al., 2002). Contrairement aux LiPs (Figure n°21), les MnPs ne sont pas capables d'oxyder directement la lignine et cela peut s'expliquer par l'absence du tryptophane dans le site actif (Hammel, Cullen, 2008).

4.2.3. Les versatile peroxydases (VPs)

Les versatile peroxydases (VPs, EC 1.11.1.16) sont des enzymes partageant des similitudes d'activités avec les LiPs et les MnPs. C'est à la fin des années 1990 que les premières versatile peroxydases furent découvertes. D'abord en 1998, Mester et Field ont observé chez *Bjerkandera sp* qu'une protéine était capable d'oxyder divers substrats comme par exemple le 2,6-dimethoxyphenol (un dérivé de la dépolymérisation de la lignine) et l'alcool vératrylique (un substrat connu des LiP) avec ou sans manganèse (Mester, Field, 1998).

Ensuite en 1999, ce fut la découverte d'une versatile peroxydase provenant de *Pleurotus eryngii*. Camarero et collaborateurs sont parvenus à purifier une enzyme ayant la capacité d'oxyder des ions manganèse Mn^{2+} en ions Mn^{3+} en présence de H_2O_2 . De plus, cette même enzyme oxydait un substrat modèle de lignine peroxydase, l'alcool vératrylique. Cependant, contrairement aux LiPs, cette protéine était aussi capable d'oxyder des composés phénoliques (Camarero et al., 1999). D'un point de vue structural, la propriété hybride des VPs s'explique par la présence d'un site de fixation des ions manganèse (Mn^{2+}) similaire à celui trouvé chez les manganèse peroxydases (Figure n°23, Ruiz-Dueñas et al., 2009).



Figure n°23 : Aperçu du site de fixation de l'hème montrant le tryptophane catalytique pour les lignine peroxydases et versatile peroxydases. Le site de fixation du manganèse (représenté sous la forme d'une sphère de couleur grise) pour la MnP et la VP est composé de trois acides aminés qui sont deux glutamates (en position 35/36 et 39/40) et d'une asparagine (en position 175/179). Les sphères rouges représentent des molécules d'eau (issue de Ruiz-Dueñas et al., 2009).

4.2.4. Evolution des trois familles de peroxydases de classe II

Une combinaison d'approche phylogénétique, structurale et biochimique a permis de construire un modèle évolutif des trois familles de peroxydases de classe II (Ayuso-Fernández et al., 2017, 2018).

Selon ce modèle, l'ancêtre commun des trois familles de peroxydases serait une MnP qui contenait un site de fixation du Mn²⁺ et une alanine (aux alentours de la position 170). Ensuite, deux voies évolutives indépendantes seraient apparues. Dans la première, l'alanine serait conservée et dans la deuxième celle-ci serait remplacée par une asparagine (Figure n°24A). Puis, une nouvelle étape de substitution aurait eu lieu pour remplacer les deux acides aminés (alanine ou asparagine) par un tryptophane. L'apparition de ce tryptophane aurait donné naissance aux versatile peroxydases (VPs). Ainsi, d'après ce modèle, deux ancêtres de VPs existeraient (Figure n°24A). Suite à la substitution de l'alanine en un tryptophane, les VPs formées auraient perdu leur site de fixation du manganèse. Cette perte va occasionner l'apparition des lignine peroxydases (Ayuso-Fernández et al., 2018). L'approche structurale montre que pour l'une des deux voies évolutives (représentée en rouge dans la figure n°24A), les charges de surface à proximité du résidu (à la position 170/171/172) sont de plus en plus négatives, ce qui rend cet environnement plus acide (Figure n°24A). La forte présence de charges négatives augmenterait le pouvoir oxydant du tryptophane et favoriserait aussi la fixation de composés chargés positivement (Ayuso-Fernández et al., 2018).

Des caractéristiques biochimiques telles que la fonctionnalité à pH acide et la stabilité thermique sur les ancêtres des trois familles de peroxydases ont aussi été étudiées. Dans l'une des deux voies évolutives, la stabilité fonctionnelle à pH 3 des ancêtres de VPs (VP-A) et de LiPs est fortement augmentée après l'apparition du tryptophane catalytique (Figure n°24B). De plus, les températures de dénaturation des ancêtres de MnPs et de VPs sont similaires alors que celle de l'ancêtre des LiPs est diminuée (Figure n°24C). Ce résultat suggère que la présence du site de fixation du manganèse contribuerait à une meilleure stabilité thermique (Ayuso-Fernández et al., 2018).



Figure n°24 : (A) Evolution des trois familles de peroxydases de classe II. L'ancêtre serait une MnP ayant un site de fixation du manganèse (demi-cercle bleu clair) et une alanine en position 170 (en vert). Ensuite, deux voies évolutives seraient apparues : l'une, en rouge, ayant gardée l'alanine et l'autre, en bleue, où l'alanine aurait été remplacée par une asparagine (demi-cercle en violet). Ensuite, un tryptophane (demi-cercle orange) aurait remplacé les deux acides aminés (alanine ou asparagine) dans les deux voies donnant naissance aux VPs. Enfin, dans la première voie évolutive (en rouge), une innovation évolutive s'effectuerait par la disparition du site de fixation du manganèse (demi-cercle blanc). Cette disparition permettrait l'apparition des LiPs. La répartition des charges de surface dans l'environnement proche du résidu (impliqué dans l'interaction avec la lignine) est représentée pour les ancêtres de chaque famille de peroxydases (les charges positives en bleu et les charges négatives en rouge). (B) Activité résiduelle des peroxydases à pH 3 pour les deux voies évolutives. (C) Thermostabilité des peroxydases appartenant aux deux voies évolutives (issue de Ayuso-Fernández et al., 2018).

4.2.5. Les peroxydases décolorantes de pigments (DyPs)

Les peroxydases décolorantes de pigments (DyPs, EC 1.11.1.19) sont des enzymes extra- et intracellulaires qui ont été découvertes pour la première fois en 1999 chez le champignon *Geotrichum candidum* (Kim, Shoda, 1999). Les DyPs sont présentes dans tout le domaine du vivant : archées, bactéries et eucaryotes (Sugano, 2009, Colpa et al., 2014).

Dans la famille des DyPs, quatre groupes phylogénétiques existent : les DyP de type A, B, C et D. D'un point de vue évolutif, l'ancêtre des DyPs appartiendrait au groupe A. Ce groupe A est composé des séquences de DyPs de bactéries thermophiles facultativement anaérobies issues des Firmicutes. A partir du groupe A, les DyPs auraient évoluées de façon alternative : soit pour former des DyPs de type C et D, soit pour donner naissance aux DyPs de type B. Les représentants des DyPs de type C sont retrouvés chez des Cyanobactéries, des Actinobactéries et de Protéobactéries. Concernant les DyPs de type D, elles regroupent uniquement les DyPs retrouvées chez les Basidiomycètes et les Ascomycètes. Enfin, les DyPs de type B sont issues de divers organismes (procaryotiques et eucaryotiques) (Zámocký et al., 2015).

Les DyPs sont des protéines structurellement stables jusqu'à de fortes températures (environ 60°C) et sous haute pression (environ 8kbar ; Pühse et al., 2009). Les substrats de ces enzymes sont variés (Figure n°25) : les colorants synthétiques (Sugano, 2009), les composés phénoliques (Kim, Shoda, 1999), les composés non phénoliques (Singh, Eltis, 2015), les tétraterpènes (comme les caroténoïdes ; Scheibner et al., 2008), les composés azobenzènes (Hofrichter et al., 2010) et l'ion manganèse (Mn^{2+} ; Fernández-Fueyo et al., 2015). D'autre part, il a été montré que les DyPs pouvaient oxyder un modèle non phénolique de lignine (l'alcool vératrylique) occasionnant le clivage de la liaison β -aryl éther (une des liaisons majoritaires dans la structure de la lignine ; Liers et al., 2010). Cette aptitude suggère une implication potentielle des DyPs dans les processus de dégradation de la lignine.

D'un point de vue structural, les DyPs sont des peroxydases héminiques. Généralement, les peroxydases héminiques contiennent dans le site de fixation de l'hème, une histidine. Ce résidu permet le clivage de l'H₂O₂. Cependant chez les DyPs, deux résidus sont impliqués : un acide aspartique et une arginine (Sugano, 2009). Ces deux résidus sont localisés au-dessus de l'hème. Cette prédisposition expliquerait une meilleure affinité des DyPs vis-à-vis de l'H₂O₂ par rapport aux LiPs et aux VPs (Liers et al., 2013). D'autre part, les DyPs ont des spécificités de substrats car elles clivent plus rapidement les colorants synthétiques que les LiPs et les VPs (Liers et al., 2013).



Figure n°25 : Récapitulatif non exhaustif des réactions catalysées par les DyPs et de leurs cibles moléculaires (modifiée de Hofrichter et al., 2010).

4.2.6. Les laccases

Les laccases (EC 1.10.3.2) sont des enzymes ayant une activité de type phénol-oxydase. Généralement leur masse moléculaire est comprise entre 60 et 80 kDa. Au même titre que les peroxydases et les CAZymes, la plupart des études biochimiques portant sur les laccases, ont mis en évidence une modification post-traductionnelle sur ces enzymes (Piontek et al., 1993 ; Rubio et al., 2016). Cette modification correspond à une réaction de glycosylation au cours de laquelle il y a un à plusieurs ajouts de groupements glycosidiques (Otterbein et al., 2000). D'un point de vue structural, les laccases contiennent quatre ions cuivre (Cu²⁺, Figure n°26). Un premier ion cuivre est localisé dans le site T1 et il est à l'origine de la couleur bleue de l'enzyme. Ce premier ion cuivre est également fixé de manière covalente à l'atome de soufre d'une cystéine (Ducros et al., 1998). Les trois autres ions cuivre sont regroupés ensemble (on parle de centre trinucléaire) dans les sites T2 et T3. Pour coordonner ces trois ions cuivre, plusieurs histidines sont présentes (Pollegioni et al., 2015).

Les laccases sont capables de simultanément réduire une molécule de dioxygène en deux molécules d'eau et d'oxyder une large gamme de substrats. La nature chimique de ces substrats est variée, en effet les laccases peuvent oxyder des ions métalloïdes, des composés phénoliques et non phénoliques (Pérez et al., 2002). De plus, il a été montré qu'une laccase de *T. versicolor* était capable de polymériser des fragments de la lignine (Bourbonnais et al., 1995). Les laccases représentent un intérêt majeur notamment dans les domaine des biotechnologies (biocarburants, bioremédiation) (Mate et Alcalde, 2017).


Figure n°26 : (A) Structure d'une laccase de *Trametes versicolor* représentant la localisation des sites T1, T2 et T3. (B) Aperçu du site actif d'une laccase et du positionnement des sites T1-3. Les sphères de couleur orange représentent les ions cuivre (Cu^{2+} , issue de Pollegioni et al., 2015).

5. Le système de détoxication chez les champignons saprophytes

5.1. Présentation générale

Le système de détoxication désigne l'ensemble des mécanismes permettant à l'organisme de résister à la réactivité de molécules toxiques. Ce système est divisé en 3 phases (Figure n°27; Morel et al., 2013; Harms et al., 2011).



Figure n°27 : Système de détoxication chez les champignons saprophytes (issue de Morel et al., 2013 ; Harms et al., 2011).

Lors de la colonisation du bois par les champignons, les produits de dégradation de la lignine (les composés phénoliques et non-phénoliques) ainsi que les extractibles libérés peuvent être transformés par le système de détoxication. De plus, d'autres composés exogènes (ou xénobiotiques) comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAHs), les composés halogènes et chlorés sont aussi d'autres cibles de ce système (Harms et al., 2011).

5.2. La phase I d'activation

Lors de la première phase, le composé toxique va subir une étape d'activation qui correspond généralement à des réactions d'oxydation, d'hydroxylation et d'époxydation. Au cours de cette première étape, le composé va subir l'incorporation d'un groupement électrophile dans sa structure. Chez les champignons décomposeurs de bois, cette première phase peut avoir lieu en dehors et à l'intérieur de la cellule (Figure n°25).

5.2.1. L'activation extracellulaire

Des enzymes sécrétées comme les PODs et les laccases sont aussi impliquées dans la détoxication. Ces enzymes peuvent oxyder des composés toxiques conduisant dans certains cas, à leurs dégradations. En effet, il a été montré que celles-ci étaient capables de dégrader une large gamme de composés xénobiotiques comme les PAHs (anthracène et phénanthrène), les pesticides et les pentachlorophénols (Hammel, 1995 ; Rabinovich et al., 2004 ; Reddy, Gold, 2000). Cette étape de dégradation empêche des molécules potentiellement toxiques de rentrer dans la cellule fongique.

Par ailleurs, les PODs et les laccases jouent aussi un rôle dans la détoxication des produits de dégradation. C'est notamment le cas des laccases qui sont capables d'oxyder plusieurs molécules phénoliques issues de la dégradation bois comme par exemple, le guaiacol et le catéchol (Martínková et al., 2016).

5.2.2. L'activation intracellulaire

Plusieurs familles multigéniques d'enzymes peuvent intervenir lors de la phase d'activation intracellulaire. C'est le cas par exemple de la famille des cytochromes P450 monooxygénases (CYP450s). Les CYP450s correspondent à une famille très représentée dans les génomes de champignons (Martinez et al., 2004 ; Chen et al., 2012) et il a également montré que cette famille a évolué avec les champignons de pourriture blanche (Nagy et al., 2017). De plus, le nombre de gènes codant pour les CYP450s est plus important chez les champignons dégradeurs de bois que chez les champignons pathogènes et symbiotiques (Tableau n°3) (Morel et al., 2013). Cette extension de CYP450s suggère que ces enzymes sont impliquées dans la détoxication des molécules de bois et on ne peut pas exclure qu'elles interviennent dans des voies de biosynthèse du métabolisme secondaire. Les CYP450s sont divisées en plusieurs sous-familles, chacune ayant une spécificité de substrat (Hirosue et al., 2011).

Par exemple, la sous famille des CYP53 provenant de *P. placenta* catalyse l'hydroxylation des certains stilbènes (Ide et al., 2012). D'autre part, il a été observé que deux CYP450s de la sous famille des CYP50c et des CYP142c issues de *P. chrysosporium* catalysaient des réactions d'hydroxylation sur une molécule de flavone pour former une molécule de 3'-hydroxyflavone (Kasai et al., 2010).

Type trophique	Noms	Nombre de gènes codant des CYP450s		
Pathogène	Aspergillus fumigatus	75		
	Melampsora larici-populina	30		
	Candida albicans	10		
Symbiotique	Laccaria bicolor	98		
	Hebeloma cylindrosporum	97		
Décomposeur	Coprinopsis cinerea	138		
	Agaricus bisporus	120		
Pourriture brune	Postia placenta	250		
	Serpula lacrymans	163		
	Gloephyllum trabeum	128		
Pourriture blanche	Phanerochaete chrysosporium	148		
	Trametes versicolor	186		
	Dichomitus squalens	185		
	Ganoderma lucidum	219		

Tableau n°3 : Répartition du nombre de gènes codant pour des CYP450s.

A l'instar des CYP450s, d'autres familles d'enzymes peuvent être impliquées dans la phase d'activation dans la cellule fongique, il s'agit des flavine monoxygénases (FMOs). Les FMOs catalysent des réactions d'hydroxylation sur plusieurs composés phénoliques comme le catéchol et le pyrogallol (Nakamura et al., 2012).

5.3. La phase II dite de conjugaison

Au cours de la phase II, le composé activé est conjugué. La phase de conjugaison fait intervenir des familles multigéniques capables de catalyser différentes réactions : la glycosylation, l'acétylation, la sulfatation, la malonylation, la glutathionylation ; ces réactions peuvent être assurées par différentes familles d'enzymes (Jancova et al., 2010). La conséquence de l'étape de conjugaison est de diminuer la toxicité des molécules.

La réaction de glycosylation correspond à l'ajout de groupements glycosidiques à une molécule. Chez les plantes, la réaction de glycosylation est très connue pour son implication dans le transport de métabolites secondaires comme les flavonoïdes en vue d'une séquestration dans la vacuole (Offen et al., 2006; Zhao, 2015). Chez les champignons, la glycosylation peut se produire par l'action de différentes glycosyltransférases. A titre d'exemples les glucosyltransférases utilisent une molécule de glucose alors que les glucuronosyltransférases utilisent l'acide glucuronique pour la conjugaison. Par ailleurs pour permettre leur catalyse, ces enzymes ont besoin d'utiliser un ose initialement activé et qui est lié à une molécule d'uridine diphosphate.

La réaction d'acétylation catalysée par les N-acétyltransférases (NATs, EC 2.3.1.5) est aussi un mécanisme impliqué dans la détoxication. En effet, il a été montré que la présence du gène codant pour la protéine NAT2 chez *Podospora anserina* était requise pour la survie de ce champignon quand celui-ci se trouve en présence de 3,4-dichloroaniline, un herbicide retrouvé dans des sols contaminés (Silar et al., 2011). De plus, des mesures d'activité enzymatique des NATs issues de *Fusarium sp* et d'*Aspergillus sp* envers différents substrats ont montré que celles-ci catalysaient des réactions d'acétylation vis-à-vis de composés arylamines et arylhydrazines comme par exemple le 2-aminophénol et le 3,4-dichloroaniline (Karagianni et al., 2015).

Malgré la difficulté à détecter la présence de molécules conjuguées à une (ou des) molécule(s) de sulfate, il est possible que la réaction de sulfatation via l'action des sulfotransférases, fasse partie de la seconde étape de conjugaison (Walle, 2004).

Par ailleurs, il a été montré que dans certaines voies de détoxication vis-à-vis de composés phénoliques, une double étape de conjugaison peut se produire. En effet, c'est chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, que des chercheurs ont pu observer que des composés sous forme glycosylée pouvaient subir une réaction de malonylation par l'intermédiaire de AtPMaT1, une malonyltransférase (EC 2.3.1) (Taguchi et al., 2010). Le fait de greffer une molécule de malonate sur le groupement glycosidique du composé à détoxiquer permettrait un transport plus efficace du composé toxique du cytosol à destination de la vacuole.

La réaction de glutathionylation correspondant à l'ajout d'une molécule de glutathion sur une molécule électrophile est permise par l'action des glutathion transférases (GSTs, EC 2.5.1.18). La famille multigénique des GSTs sera décrite plus en détails dans le chapitre suivant.

5.4. La phase III d'excrétion et/ou de séquestration

Enfin, lors de la phase III, le composé conjugué peut être soit excrété en dehors de la cellule, soit stocké dans la vacuole.

Lors de cette dernière phase, deux principales familles de transporteurs interviennent : les ATP Binding Cassette (ABC) et les Major Facilitator Superfamily (MFS).

Les transporteurs ABC utilisent l'ATP comme source d'énergie pour réaliser le transport, alors que les MFS utilisent l'énergie générée par l'import d'un proton pour effectuer l'export d'un composé (Morschhäuser, 2010). Ces deux familles contribuent à la résistance face à une diversité de composés toxiques tels que les composés azolés, les macrolides, certains alcaloïdes et des dérivés d'acriflavines (Gulshan, Moye-Rowley, 2007 ; Grkovic et al., 2002).

Dans le règne fongique, les transporteurs ABC ont d'abord été étudiés chez la levure (*S. cerevisiae*; Gulshan, Moye-Rowley, 2007). Chez cet organisme, la famille des ABC est composée de cinq classes : la classe PDR (pleiotropic drug resistance), MDR (multridrug resistance), MRP (multidrug resistance-associated protein), RLI (RNase L inhibitor) / ALDP (adrenoleukodystrophy protein) et YEF3 (yeast elongation factor EF-3; Lamping et al., 2010). Certains de ces transporteurs ATP-dépendants, sont capables d'excréter des composés glutathionylés (provenant de la phase de conjugaison), en dehors de la cellule (Keppler, 1999).

A l'aide de la microscopie électrochimique à balayage, il a été possible d'observer la phase III d'excrétion lorsque des cellules de *S. cerevisiae* sont incubées en présence de ménadione (un composé toxique). Dans la levure, la ménadione est conjuguée à une molécule de glutathion (ce qui va former de la thiodone) et c'est la forme conjuguée qui va être excrétée en dehors de la cellule par l'intermédiaire des MPRs. A cet égard, Mauzeroll et Bard sont parvenus à quantifier et à estimer l'efflux de thiodone excrétée. En effet, à l'échelle d'une cellule de levure, environ 30 000 molécules de thiodone seraient excrétées par seconde (Mauzeroll, Bard, 2004).

<u>Chapitre III : Les glutathion transférases : une famille multigénique aux fonctions</u> <u>diverses</u>

1. <u>Le glutathion</u>

Le glutathion (GSH) est un tripeptide, c'est-à-dire une molécule composée de trois acides aminés qui sont : le glutamate, la cystéine et la glycine (Figure n°27).



Figure n°27 : Structure et composition de glutathion.

Le glutathion est synthétisé en deux étapes. A partir d'un glutamate, il y a l'ajout d'une cystéine par l'intermédiaire de la γ -glutamyltranspeptidase qui est dépendante d'une molécule d'adénosine triphosphate (ATP). A la suite de la formation du résidu γ -glutamylcystéine, une glycine va être ajoutée sous l'action de la glutathion synthétase (elle aussi dépendante d'une molécule d'ATP) pour donner une molécule de glutathion (Pócsi et al., 2004). Dans la cellule, le GSH est présent sous deux formes : réduite (GSH où le soufre de la cystéine est sous forme thiol, SH sur la figure n°27) ou oxydée (dimère lié par une liaison disulfide entre les deux atomes de soufre, GSSG). Le rapport entre la forme réduite et la forme oxydée (GSH/GSSG) est utilisé comme un indicateur du stress oxydatif cellulaire. Lors d'un stress oxydatif, l'homéostasie rédox de la cellule est impacté et la concentration en GSSG est susceptible d'augmenter provoquant la diminution du ratio (pouvant passer de 100 à 10 ; Pastore et al., 2003). Les rôles du glutathion dans la cellule sont divers. En effet, le tripeptide joue le rôle d'agent antioxydant impliqué dans la défense des cellules en intervenant dans la détoxication de radicaux libres et de composés xénobiotiques ainsi que dans la signalisation cellulaire par l'intermédaire de modifications post-traductionnelles via la réaction de glutathionylation (Pastore et al., 2003; Zhang, Forman, 2012).

2. Les glutathion transférases (GSTs)

2.1. Découvertes des GSTs

Les glutathion transférases (GSTs) sont une famille d'enzymes présente dans la majorité des organismes vivants. Le caractère ubiquitaire des GSTs suggère que c'est une famille ancestrale. Comme mentionné à la fin du second chapitre, les GSTs agissent au sein du système de détoxication et interviennent dans la phase II de conjugaison. En effet, les GSTs ont été découvertes pour leur aptitude à conjuguer une molécule de glutathion avec un substrat électrophile. Cette réaction se nomme la glutathionylation.

Les composés glutahionylés produits à la suite de cette réaction sont moins toxiques et plus solubles ce qui facilite leur stockage dans un compartiment cellulaire ou leur excrétion en dehors de la cellule. Ce sont d'abord les GSTs de mammifères qui furent étudiées dans les années 1960s (Booth et al., 1961). Chez ces organismes, l'activité des GSTs dans la détoxication de composés exogènes (drogues thérapeutiques) a été mesurée dans différents organes (majoritairement dans des reins et des foies de patients; Sherman et al., 1983 ; Singh et al., 1987). Chez les plantes, l'étude des GSTs a débuté dans les années 1980s. Ce sont surtout les GSTs de plantes céréalières qui ont été étudiées pour leurs capacités à détoxiquer des herbicides. L'un des premiers herbicides glutathionylés découvert est celui de l'atrazine sous l'action d'une GST de maïs (Shimabukuro et al., 1971). C'est bien plus tardivement que les GSTs fongiques furent ensuite étudiées (vers la fin des années 1990s).

2.2. Structure des GSTs

Les GSTs correspondent à des protéines dont la masse moléculaire du monomère peut varier de 25 à 30 kDa et le nombre d'acides aminés dans la séquence est compris entre 200 et 250 (Frova, 2006 ; Board, Menon, 2013). L'état d'oligomérisation des GSTs est majoritairement dimérique mais il existe des GSTs sous forme monomérique. Néanmoins, certaines GSTs adoptant un autre état d'oligomérisation ont été décrites. C'est le cas par exemple de la GST TDR1 issue du parasite *Leishmania major*. La caractérisation structurale a révélé que TDR1 adopte une forme trimérique et présente une masse moléculaire de 150 kDa (Fyfe et al., 2012).

2.2.1. Le monomère et le site actif

Chaque monomère comprend deux domaines. Le domaine N-terminal qui est conservé, présente un repliement de type thiorédoxine (TRX) dont l'enchaînement des feuillets β et des hélices α est le suivant : $\beta\alpha\beta\alpha\beta\beta\alpha$. Ce repliement est également observé dans d'autres familles d'enzymes (telles que les glutarédoxines et les glutathion peroxydases) appartenant à la superfamille des thiorédoxines. De plus, ce domaine contient aussi un site responsable de la fixation du glutathion nommé le site G (Figure n°28). En revanche, le domaine C-terminal est entièrement composé d'un enchaînement d'hélices α (entre 4 et 7), il est d'ailleurs nommé le domaine hélicoïdal. Ce domaine est de nature hydrophobe et il contient un site H qui est composé de résidus apolaires (Board, Menon, 2013). Ensemble, le site G (permettant de fixer le glutathion) et le site H (permettant de fixer des substrats et des ligands hydrophobes) forment le site actif (Mannervik, Danielson, 1988 ; Oakley et al., 1999). Les deux sites seront décrits brièvement dans la suite de cette section.



Figure n°28 : Structure typique du monomère d'une GST (issue de Cummins et al., 2011). Le composé fixé dans le site G est une molécule d'hexyle de glutathion.

Tout d'abord, le site G est contenu dans le repliement de type TRX. Par des analyses structurales, il a été possible d'identifier à l'intérieur de ce repliement, une région conservée qui permet la reconnaissance du glutathion. Cette région correspond à la succession de deux feuillets β 3 et β 4 suivis d'une hélice α 3 (Armstrong, 1997). La majorité des résidus impliqués dans le site G proviennent du domaine N-terminal. Toutefois, pour certaines GSTs, quelques résidus du domaine C-terminal peuvent être aussi impliqués dans la formation du site G (Board, Menon, 2013). En général, les résidus contribuant à la formation du site G sont conservés parmi les GSTs (Board, Menon, 2013).

Malgré cette conservation, il apparait que le résidu impliqué dans les réactions catalytiques peut varier entre les différentes classes de GSTs. Sur l'ensemble des classes de GSTs, certaines possèdent une cystéine (par exemple les classes Lambda, DHARs, Omega, Xi), d'autres possèdent une sérine (par exemple les classes Phi, Delta, Theta, Zeta, Tau) et enfin d'autres contiennent une tyrosine (par exemple les classes Alpha, Mu, Pi ; Figure n°29B). D'un point de vue structural, ces trois résidus sont généralement localisés au début de l'hélice α 1. L'ensemble des analyses structurales a permis de mieux comprendre l'orientation de ces résidus et leur proximité avec le glutathion (Figure n°29C). Par exemple, dans le cas d'une tyrosine, le groupement hydroxyle situé à l'extrémité du cycle aromatique est à proximité du groupement thiol appartenant au glutathion (Armstrong, 1997). Pour ce qui concerne la sérine, son groupement hydroxyle lui permet d'interagir avec le soufre de la cystéine du glutathion (Deponte, 2013). Enfin, dans le cas d'une GST ayant une cystéine dans le site actif, cet acide aminé est susceptible de former une liaison disulfide avec le glutathion.



Figure n°29 : (A) Variabilité structurale du monomère chez certaines classes de GSTs. Le domaine thiorédoxine est à gauche tandis que le domaine hélicoïdal est à droite. Différents composés glutathionylés fixés au site G sont représentés (issue de Armstrong, 1997). (B) Superposition structurale de la tyrosine catalytique pour 20 GSTs (Tyr-GSTs), de la sérine catalytique pour 14 GSTs (Ser-GSTs) et de la cystéine catalytique pour 8 GSTs (Cys-GSTs ; issue de Bocedi et al., 2013). (C) Orientation des 3 résidus catalytiques majeurs par rapport au glutathion : la chaine bleue porte une cystéine (dont le soufre est représenté en jaune), la chaîne verte porte une sérine (dont le groupe hydroxyle est représenté en gris avec en son extrémité le groupement hydroxyle coloré en rouge ; issue de Bocedi et al., 2013).

Concernant le site H, celui-ci est essentiellement composé de résidus appartenant au domaine Cterminal. Contrairement à ceux impliqués dans la formation du site G, les résidus du site H varient d'une GST à l'autre. De nombreuses études considèrent que ces résidus ne sont pas conservés parmi les GSTs (Frova, 2006 ; Board, Menon, 2013 ; Cummins et al., 2011a). La variabilité de ces résidus cause une diversité de structure du site H entre GSTs (Figure n°29A). Cette diversité a pour conséquence une hétérogénéité de substrats reconnus par ces enzymes (Board, Menon, 2013 ; Deponte, 2013).

2.2.2. Le dimère

A l'état dimérique, il existe aussi un troisième site, le site L, qui permet la fixation de ligands (Oakley, 2011). L'utilisation de ce site ne serait pas à des fins catalytiques et selon la classe de GSTs, le site L n'est pas systématiquement présent. De plus, la localisation du site L est variable. D'abord, ce site est connu pour être présent à l'interface du dimère (Figure n°30; McTigue et al., 1995; Brock et al., 2013).

D'autre part, un autre site de fixation de ligands pourrait être présent dans le site actif, soit à l'intérieur du site H (Oakley et al., 1999) ou soit à proximité du site G (Mathieu et al., 2012). Dans le cas d'un site L présent dans le site H, deux sites responsables de la fixation de ligands peuvent être présents par dimère.



Figure n°30 : (A) Structure tridimensionnelle typique d'une GST à l'état dimérique avec en orange le site L présent à l'interface de dimérisation (issue de Board, Menon, 2013). (B) Structure tridimensionnelle d'une GSTs de *Schistosoma japonica* (SjGST) contenant dans son interface de dimérisation une molécule de praziquantel. Deux conformations de praziquantel (molécule anthelminthique) sont possibles pour la fixation de cette molécule dans le site L de SjGST. Les deux monomères sont colorés en jaune et en bleu (issue de McTigue et al., 1995).

2.3. Fonctions catalytiques des GSTs

Outre l'activité de glutathionylation, les GSTs ont aussi des activités peroxydase, isomérase et de déglutathionylation. Pour toutes ces réactions, les GSTs utilisent le glutathion. Les mécanismes mis en jeu pour permettre ces différentes activités seront volontairement décrits de façon succincte.

2.3.1. L'activité de glutathionylation

Les GSTs sont des enzymes capables de catalyser des réactions de glutathionylation, ce qui signifie qu'elles peuvent greffer une molécule de glutathion sur un composé électrophile. Le composé électrophile peut être de nature chimique variée ce qui inclut les composés aromatiques, aliphatiques ou hétérocycliques (Figure n°31A ; Deponte, 2013). Pour permettre cette activité, les GSTs doivent d'abord fixer une molécule de glutathion dans le site G.

De plus, plusieurs résidus comme par exemple l'asparagine, la cystéine, la sérine et la tyrosine vont abaisser le pKa de la cystéine du glutathion (Deponte, 2013 ; Board, Menon, 2013). Initialement, ce pKa est d'environ de 9 et il va être abaisser à environ 6.5. Dans la cellule, le pH intracellulaire est généralement neutre. Ainsi, à ce pH, l'abaissement du pKa à une valeur de 6.5 va favoriser la déprotonation du groupement thiol et donc la formation d'un groupement thiolate nucléophile. C'est sous cette forme que le glutathion va effectuer une attaque nucléophile sur un substrat électrophile proche.

Il existe deux types d'attaque nucléophile : soit par substitution (par exemple sur un atome de chlore ; Figure n°31B), soit par réduction d'un composé accepteur d'électrons via l'addition de Michael (Figure n°31C ; Deponte, 2013).



Figure n°31 : (A) Vue d'ensemble de la réaction de glutathionylation catalysée par les GSTs. (GSH : glutathion, GSR : produit glutathionylé, R : substrat électrophile ; issue de Deponte et al., 2012). (B) Substitution de l'atome de chlore du CDNB en GS-DNB. (C) Réduction d'une molécule de glutathion sur l'acide éthacrynique (proposée par Deponte, 2013). (D) Autres composés accepteurs de Michael.

2.3.2. L'activité peroxydase

Les GSTs ont aussi une activité de type peroxydase, elles sont en effet capables de réduire le groupement peroxyde de certains composés. Lors de cette réaction, le glutathion déprotoné et fixé dans le site G va réduire et cliver le groupement peroxyde.

De plus, cette réduction du peroxyde va entrainer l'oxydation de l'atome de soufre par la formation d'un groupement sulfénique. En présence d'un groupement sulfénique, le glutathion est instable et plusieurs possibilités existent pour le réduire (par une seconde molécule de glutathion réduit, par exemple). Cependant, ces mécanismes ne sont pas clairement identifiés. Au cours de cette réaction, une molécule de glutathion oxydée (sous forme de dimère covalent) et le produit de la réaction portant un groupement alcool sont générés (Figure n°32).



Figure n°32 : (A) Vue générale de l'activité peroxydase effectuée par les GSTs. Différents composés ayant un groupement peroxyde (ROOH) peuvent être testés comme des substrats de GSTs. (B) Mécanisme de l'activité peroxydase des GSTs effectuée par les GSTs. (GSH : glutathion réduit, GSSG : glutathion oxydé, HOR : produit ayant un groupement alcool ; issue de Deponte et al., 2013).

2.3.3. L'activité isomérase

Certaines enzymes appartenant à la classe Zeta, sont capables de catalyser des réactions de type isomérase. En effet, les GSTZs sont aussi appelées les maleylacétoacétate isomérases car elles peuvent transformer le 4-maleylacétoacétate et le maléylpyruvate pour former respectivement du fumarylacétoacétate et du fumarylpyruvate (exemple du maléylpyruvate dans la Figure n°33A; Sheehan et al., 2001). En catalysant ces réactions, les GSTZs jouent un rôle important dans le catabolisme des tyrosines et des phénylalanines (Deponte, 2013). Si les réactions d'isomérisations des GSTZs ne sont pas clairement identifiées (Board et al., 2003 ; Marsh et al., 2008), un modèle a été néanmoins proposé.

Dans ce modèle, l'un des résidus des GSTZs (généralement une histidine, une thréonine ou une sérine) abaisse le pKa du soufre de la cystéine du glutathion permettant à ce dernier d'effectuer une attaque nucléophile sur le carbone à la position 2 du substrat (Figure n°33B). Puis, la liaison double entre les carbones aux positions 2 et 3 devient une liaison simple (Figure n°33C). Cette liaison va pouvoir effectuer une rotation de 180° modifiant ainsi la configuration : passant de la configuration *cis* à *trans* (Figure n°33D). Ensuite l'adduit de glutathion est retiré formant ainsi la molécule de fumarylpyruvate (Figure n°33E).



Figure n°33 : Réaction d'isomérisation de la configuration *cis* à *trans* catalysée par les GSTZs (issue de Marsh et al., 2008).

2.3.4. L'activité de déglutathionylation

L'activité de déglutathionylation désigne la capacité des GSTs à retirer le groupement glutathionylé d'un substrat conjugué. Généralement, l'activité de déglutathionylation est permise par l'action d'une cystéine catalytique qui va attaquer l'adduit de glutathion d'une molécule ce qui va avoir pour conséquence la formation d'une liaison disulfide entre le soufre de la cystéine de la protéine et le soufre de la cystéine du glutathion. Par la suite, une seconde molécule de glutathion va réduire le pont disulfure, libérant la cystéine de la protéine et donc la rendant à nouveau fonctionnelle pour effectuer un nouveau cycle catalytique (Figure n°34). Toutefois, la présence de la cystéine n'est pas toujours requise car des exceptions existent. Par exemple, il a été montré qu'une GST possédant une asparagine dans son site actif, catalysait aussi la réaction de déglutathionylation (Roret et al., 2015).



Figure n°34 : (A) Réaction de déglutathionylation. (B) Exemples de substrats de GSTs à cystéine catalytique.

2.4. Classification générale des GSTs

Il existe différents types de GSTs : les GSTs mitochondriales (les Kappa), les GSTs microsomales (les MAPEGs) et les GSTs solubles. Les deux premiers types de GSTs seront brièvement décrits.

2.4.1. Les GSTs mitochondriales (les GSTs Kappa)

Les GSTs mitochondriales ou également appelées, les GST Kappa (GSTK), sont codées par très peu de gènes. Par exemple, seulement un gène code une GSTK chez les mammifères (Frova, 2006). Ce sont des enzymes capables de catalyser des réactions de glutathionylation et qui possèdent également une activité de type peroxydase (Hayes et al., 2005). L'une des classes de GSTs mitochondriales, la classe des métaxines, correspond à des protéines situées dans la membrane externe des mitochondries. Cette classe est retrouvée aussi bien chez les plantes que chez les champignons. Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, une étude a proposé qu'une métaxine pourrait être impliquée dans l'import de protéines (Lister et al., 2007). Chez les organismes fongiques, les GSTs mitochondriales ont été relativement peu étudiées (Sheehan et al., 2001).

2.4.2. Les GSTs microsomales (MAPEGs)

Les GSTs microsomales, plus généralement appelées les MAPEG, sont présentes dans tout le domaine du vivant. Le terme MAPEG correspond aux protéines associées aux membranes et qui sont impliquées dans le métabolisme de l'éicosanoïde. Les éicosanoïdes sont des petites molécules qui agissent comme des hormones et qui sont impliquées dans plusieurs processus physiologiques. Les éicosanoïdes regroupent plusieurs molécules : les prostaglandines, les lipoxines et les leucotriènes. A partir de l'acide arachidonique, les MAPEGs participent à la synthèse des eicosanoïdes (Hayes et al., 2005). Pour cela, les MAPEGs sont capables de catalyser différentes réactions : la glutathionylation, la réduction des groupements hydroperoxydes et l'isomérisation (Bresell et al., 2005 ; Dixon, Edwards, 2010a). Dans le cas des MAPEGs qui interagissent avec les leucotriènes, ces enzymes effectuent des réactions de type peroxydase (Dixon, Edwards, 2010a). Afin de contribuer à la synthèse des différentes molécules appartenant aux éicosanoïdes, les MAPEGs sont divisées en plusieurs classes : les GSTs microsomales de type 1 (MGST1), de type 2 (MGST2), de type 3 (MGST3), les microsomales prostaglandines E-synthétases (mPGES), les leucotriènes C4 synthétase (LTC₄) et les protéines activant la 5-lipoxygénase (FLAP pour « 5-lipoxygenase-activating protein »; Bresell et al., 2005). En fonction de la classe de MAPEGs, ces protéines peuvent être actives selon différents états d'oligomérisation : monomérique, homodimérique, hétérodimérique, homotrimérique et hétérotrimérique (Frova, 2006). Les MAPEGs sont aussi présentes chez les organismes fongiques, cependant très peu d'études existent à l'heure actuelle (Bresell et al., 2005).

2.4.3. Les GSTs solubles

Anciennement appelées GSTs cytosoliques, les GSTs solubles sont beaucoup plus representées que les GSTs mitochondriales et microsomales car un nombre plus important de gènes code pour ces enzymes. Les GSTs solubles peuvent avoir différentes localisations subcellulaires : cytosoliques, plastidiales, mitochondriales (dans la matrice) ou peroxysomales.

Les GSTs solubles sont divisées en plusieurs classes dont les caractéristiques (telles que la localisation subcellulaire, l'état d'oligomérisation et les résidus constituant le site actif) sont variées. La classification des GSTs solubles repose sur le pourcentage d'identité de séquences peptidiques entre deux protéines. Si ce pourcentage d'identité est supérieur à 40% alors les deux séquences appartiennent à la même classe. De plus, si deux séquences font partie de deux classes distinctes, alors le pourcentage d'identité de séquence doit être inférieur à 20% (Hayes et al., 2005 ; Morel et al., 2013). Dans le but d'harmoniser la classification des GSTs, une nomenclature est généralement appliquée. Dans cette nomenclature, les noms données aux classes de GSTs correspondent à une lettre grecque (par exemple : Omega, Lambda, Phi, Epsilon, etc. ; Mannervik et al., 1992, 2005).

Classes de GST solubles	Symbole	Organismes	Etat d'oligomérisation	Résidu du site actif	Activités potentielles
Déshydroascorbate réductase (DHAR)	-	Plantes	Monomère	Cystéine	Reductase
Lambda	L	Plantes	Monomère	Cystéine	Déglutathionylation
Iota	I	Bryophytes	Dimère	Cystéine	Non découverte
Hémérythrine	H	Bryophytes	Dimère	Cystéine	Non découverte
Glutathionyl-hydroquinone réductase ou Xi	GHR / Xi	Plantes, champignons et bactéries	Dimère	Cystéine	Déglutathionylation
Omega	0	Aniamux et champignons	Dimère	Cystéine	Déglutathionylation et Reductase
Beta	В	Bactéries	Dimère	Cystéine	Glutathionylation et Déglutathionylation
Tétrachlorohydroquinone déshalogénases (TCHQD)	-	Plantes et bactéries	Dimère	Sérine et Cystéine	Glutathionylation et Déglutathionylation
Tau	U	Plantes	Dimère	Sérine	Glutathionylation et Peroxydase
Zeta	Z	Animaux, plantes et bactéries	Dimère	Sérine	Isomérase et Peroxydase
Theta	Т	Animaux, plantes et bactéries	Dimère	Sérine	Peroxydase
Phi	F	Plantes et champignons	Dimère	Sérine	Glutathionylation et Peroxydase
GSTFuA	-	Champignons et bactéries	Dimère	Sérine	Glutathionylation et Peroxydase
Delta	D	Insectes	Dimère	Sérine	Glutathionylation
Epsilon	E	Insectes	Dimère	Sérine	Glutathionylation
Ure2p	-	Champignons	Dimère	Asparagine	Glutathionylation, réductase et peroxydase
Nu	N	Bactéries	Dimère	Non déterminé	Reductase
GTT1	-	Champignons	Dimère	Non déterminé	Glutathionylation
GTT2	-	Champignons	Dimère	Non déterminé	Glutathionylation et Peroxydase
Alpha	Α	Mammifères	Dimère	Tyrosine	Glutathionylation, Peroxydase et isomérase
Mu	Μ	Mammifères	Dimère	Tyrosine	Glutathionylation, Peroxydase et isomérase
Pi	Р	Mammifères	Dimère	Tyrosine	Glutathionylation, Peroxydase et isomérase
Sigma	S	Invertébrés	Dimère	Tyrosine	Glutathionylation, Peroxydase et isomérase

Tableau n°4 : Liste des principales classes de GSTs chez les êtres vivants.

Chez les classes de GSTs de type soluble, certaines GSTs sont spécifiques à une catégorie d'organismes (Tableau n°4). Par exemple, la classe Beta est uniquement retrouvée chez les bactéries, la classe Tau est spécifique des plantes et les classes Epsilon et Delta sont typiques des insectes (Tableau n°4).

Chez les champignons, sept classes de GSTs ont été décrites jusqu'à présent : les classes GTT1, GTT2, Phi, Xi, GSTFuA, Ure2p et Omega. Certaines de ces classes sont aussi retrouvées dans d'autres organismes. Par exemple, la classe Phi est aussi présente chez les plantes, la classe Xi chez les plantes et les bactéries et la classe Omega chez les animaux.

2.4.4. Evolution des GSTs solubles

Afin d'expliquer l'apparition des différents types et des différentes classes au sein des GSTs solubles, plusieurs études ont proposé un modèle évolutif (Armstrong, 1997 ; Hayes et al., 2005 ; Frova, 2006). Selon Frova, l'évolution des GSTs solubles s'est effectuée en 2 phases (phase I et phase II). Toutes les GSTs dériveraient d'un ancêtre commun qui serait une glutarédoxine (GRX). Les GRX sont des enzymes monomériques qui contiennent uniquement un domaine portant un repliement de type thiorédoxine (TRX, décrit dans la section « Le monomère et le site actif »).

Tout d'abord, la phase I se caractériserait par l'ajout du domaine hélicoïdal. L'ajout de ce domaine aurait pu se réaliser de deux manières, soit à la suite du domaine N-terminal (TRX), soit dans le domaine TRX. Dans le premier cas (addition), les GSTs qui en résultent sont les GSTs solubles tandis que dans le second cas (insertion), ce sont les GSTs Kappa (Figure n°35A ; Frova, 2006). Par la suite les GSTs solubles et les GSTs Kappa auraient évolué de manière indépendante (Hayes et al., 2005).

Puis, lors de la phase II, une étape de dimérisation se serait produite chez les GSTs solubles. A ce stade, les classes de GSTs qui en résultent seraient les classes Omega, Xi et Beta (Figure n°35B). Ensuite, deux processus de substitution se seraient successivement réalisés.

Une première substitution aurait remplacé la cystéine catalytique (présent dans le site actif) par une sérine, ce qui aurait eu pour conséquence l'apparition de plusieurs classes comme par exemple les classes Theta, Phi, Zeta, Tau, Delta (Figure n°35B). Puis, une seconde substitution se serait réalisée afin de remplacer la sérine par une tyrosine (Figure n°35B). Cette seconde substitution serait à l'origine de la formation d'autres classes telles que celles des Sigma, Alpha, Mu et Pi (Figure n°35B).

L'ensemble des deux substitutions successives serait à l'origine de la capacité des GSTs à catalyser des réactions de glutathionylation. Jusqu'à présent, très peu d'arguments ont été proposés pour expliquer les conséquences de la substitution de la sérine en tyrosine. En effet, cette mutation ne permet pas d'améliorer l'affinité entre la protéine et le glutathion. Cependant, il a été suggéré que le remplacement de la sérine par une tyrosine permettrait aux GSTs d'être impliquée dans la protection cellulaire face à un stress induit par l'oxyde nitrique (Bocedi et al., 2013).

En effet, par comparaison avec des GSTs ayant une cystéine ou une sérine, Bocedi et collaborateurs ont montré que les GSTs à tyrosine présentaient les meilleures affinités pour se lier à une toxine intracellulaire particulière. La structure de cette toxine est composée de deux molécules de glutathion reliées entre leur atome de soufre à un atome de fer dinitrosylé. Une fois dans la cellule, cette toxine jouerait le rôle de donneuse d'oxyde nitrique (Bocedi et al., 2013).



Figure n°35 : Evolution des GSTs solubles à partir d'un ancêtre de type glutarédoxine (modifiée de Frova, 2006).

Cependant, ce modèle évolutif n'est pas tout à fait complet car il ne prend pas en compte toutes les classes de GSTs. A l'instar des classes de GSTs possédant l'un des trois résidus majoritaires (cystéine, sérine ou tyrosine), d'autres classes peuvent contenir un autre acide aminé. Par exemple, les GSTs de la classe Ure2p contiennent une arginine dans leur site actif (Tableau n°4).

2.5. Les classes de GSTs solubles au sein du règne fongique

Dans cette section, la phylogénie des classes de GSTs solubles de champignons ainsi que l'état actuel des connaissances sur ces classes seront exclusivement décrits.

Grace aux progrès dans le domaine de la génomique via l'amélioration des techniques de séquençage, il a été possible d'estimer le nombre de gènes codant pour des GSTs chez les champignons. De façon intéressante, il a été observé que le nombre de gènes codant des GSTs était plus important chez les champignons saprophytes que les champignons pathogènes et symbiotiques (Figure n°36; (Morel et al., 2013).



Figure n°36 : Répartition du nombre de gènes par classe de GSTs en fonction du type trophique des champignons (issue de Morel et al., 2013).

Le nombre élevé de GSTs chez les champignons saprophytes pourrait s'expliquer par l'extension de certaines classes spécifiques telles que les classes GSTFuA et Ure2p (Figure n°36 et Figure n°37). En effet, la plupart des champignons décomposeurs de bois possèdent entre 2 et 17 gènes codant pour des GSTFuA. En revanche, les champignons pathogènes possèdent peu de GSTFuA ; aucune chez *Puccinia graminis* et deux chez *Alternaria brassicicola* (Calmes et al., 2015 ; Mathieu et al., 2013). De plus, l'analyse phylogénétique a montré qu'il existait deux types d'Ure2p chez les champignons (Ure2pA et Ure2pB). Les Ure2pA sont très majoritairement retrouvées chez les champignons décomposeurs de bois, avec un nombre de séquences variant entre 3 et 14. En revanche, les Ure2pA sont très faiblement présentes chez les champignons pathogènes (entre 0 et 3 séquences). Les Ure2pB sont quant à elles, conservées dans la plupart des organismes fongiques avec un nombre de séquences compris entre 1 et 6 (Thuillier et al., 2011a ; Calmes et al., 2015).

De plus, une corrélation basée sur le nombre de gènes codant pour des GSTs et celui pour des CYP450s a été observée suggérant l'existence d'un lien fonctionnel étroit entre les enzymes des phases I et II du système de détoxication (Morel et al., 2013). D'autre part, chez le champignon décomposeur *Phanerochaete carnosa*, il a été démontré que l'expression de ses gènes codant pour certaines GSTs et certaines CYP450s était induite dans des conditions similaires (par exemple lorsque le champignon se développe sur du bois provenant de différentes espèces : sapin, pin, épicéa, érable ; (MacDonald et al., 2011 ; Morel et al., 2013). La famille des CYP450s étant elle aussi étendue, l'extension de ces deux familles pourrait s'expliquer par l'adaptation des champignons décomposeurs à leur environnement.



Figure n°37 : Arbre phylogénétique de séquences de GSTs à partir des génomes séquencés de champignons appartenant à l'ordre des Basidiomycètes. Les séquences ont été récupérées à partir du site du Joint Genome Institute, puis alignées via le programme CLUSTALW et l'arbre fut construit en utilisant le logiciel MEGA (issue de Morel et al., 2013).

Dans la suite de cette partie, les fonctions découvertes à propos des sept classes de GSTs solubles chez les champignons seront décrites.

2.5.1. La classe des GTT1

La classe des GTT1 (pour GlutaThion Transférase) fut découverte en premier lieu chez la levure. En utilisant la bactérie *Escherichia coli* comme système de production, Choi et collaborateurs ont produit et purifié une GTT1 de *Saccharomyces cerevisiae* (ScGTT1). Les mêmes auteurs ont montré que ScGTT1 possède une activité de glutathionylation envers le CDNB (Choi et al., 1998). Puis, le rôle de ScGTT1 lors d'un stress oxydatif a été étudié. Pour cela, différents marqueurs de ce stress incluant : la vitesse de croissance, les taux de protéines carbonylées et de peroxydation des lipides et l'activité de la glucose 6-phosphate deshydrogénase (G6PDH), intervenant dans la voie des pentoses phosphates, ont été mesurés. Ces marqueurs ont été comparés entre une souche sauvage de levure (BY4741) et une souche mutante qui ne peut synthétiser la protéine ScGTT1 (*gtt1*Δ) lorsqu'elles sont incubées ou non en présence de peroxyde d'hydrogène (Mariani et al., 2008).

Que ce soit chez la souche sauvage ou chez la souche mutante, exposées ou non à du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), les taux de croissance sont similaires, indiquant que l'absence de ScGTT1 n'influence pas la vitesse de croissance. En revanche, le taux de peroxydation des lipides est plus important chez la souche *gtt1* Δ que chez la souche sauvage après 2h d'incubation avec du H₂O₂. De plus, le pourcentage de protéines carbonylées est lui aussi plus important chez la souche mutante après 24h d'incubation en présence de H₂O₂ (45% par rapport à 0%). D'autre part, l'activité de la G6PDH est fortement réduite après 24h d'incubation pour la souche mutante. La conséquence de la réduction de l'activité de la G6PDH est la diminution de la production de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). Le NADPH étant le cofacteur essentiel de la glutathion réductase, il participe à la protection de la cellule vis-à-vis du stress oxydant. L'ensemble de ces résultats suggère que ScGTT1 jouerait un rôle dans la réponse à un stress oxydatif (Mariani et al., 2008).

2.5.2. La classe des GTT2

Au même titre que la classe des GTT1, celle des GTT2 fut aussi découverte chez la levure (ScGTT2; Choi et al., 1998). La protéine recombinante (également produite et purifiée à partir d'*E. coli*) ScGTT2, possède une activité de glutathionylation. Le pourcentage d'identité de séquence ScGTT1 et ScGTT2 est de 11% ce qui indique que ces deux protéines n'appartiennent pas à la même classe (voir section « Les GSTs solubles »). Après avoir été caractérisé d'un point de vue biochimique, le rôle physiologique de ScGTT2 dans les processus de détoxication envers la ménadione a été étudié. La ménadione est un composé toxique qui peut agir de deux manières : soit comme un oxydant ou soit comme un composé électrophile. Ce composé peut diffuser dans la cellule et en milieu intracellulaire, il est rapidement conjugué à une molécule de glutathion (formant la thiodone, MENSG). Cette forme conjuguée peut être excrétée en dehors de la cellule (voir section « La phase III : excrétion et/ou séquestration »).

Lorsque la levure est exposée à une concentration de 500 μ M de ménadione, le gène codant pour ScGTT2 est surexprimé ce qui indique que ScGTT2 serait impliquée dans la réponse au stress initié par la ménadione (Castro et al., 2007). De plus, l'analyse phénotypique d'une souche mutante de *S. cerevisiae* (*gtt2* Δ), déficiente dans la synthèse de ScGTT2, a montré l'importance de la protéine dans la réponse au stress induit par la ménadione. En effet, lorsque la souche *gtt2* Δ est ensemencée sur un milieu riche en glucose et contenant une forte concentration de ménadione (20 mM), aucune colonie ne se développe au bout de 72 h d'incubation à 28°C (Castro et al., 2007). La structure tridimensionnelle de ScGTT2 a été élucidée et il apparaît que cette protéine est homodimérique. De façon intéressante, cette protéine ne présente aucun des trois acides aminés majeurs retrouvés dans le site actif des GSTs (cysténe, sérine et tyrosine) mais possède à la place une glycine (Ma et al., 2009).

Chez le champignon décomposeur *P. chrysosporium*, l'expression du gène codant pour la protéine PcGTT2.1 a aussi été étudiée. En effet, lorsque *P.chrysosporium* se développe sur un milieu minimum en présence d'extraits de bois de chêne, l'analyse transcriptomique a montré que le gène codant PcGTT2.1 était surexprimé (Thuillier et al., 2014b). De plus, la caractérisation biochimique menée sur cette protéine a permis de montrer sa capacité à catalyser des réactions de type peroxydase vis-à-vis de certains substrats tels que l'hydroperoxyde de tert-butyle (tBOOH), l'hydroperoxyde de cumène (CuOOH) mais pas avec le peroxyde d'hydrogène. Jusqu'à présent, il existe relativement peu d'études visant à démontrer le rôle biologique des GSTs de la classe GTT2.

2.5.3. La classe Phi (GSTFs)

La classe Phi est présente chez les végétaux, les champignons, les bactéries et les protistes (Munyampundu et al., 2016). Cette classe a essentiellement été étudiée chez les organismes végétaux, en particulier par des approches structurales et biochimiques. Les GSTFs sont des enzymes actives sous forme homodimérique, possédant une sérine catalytique leur permettant de catalyser des réactions de glutathionylation et de réduction des hydroperoxydes (Pégeot et al., 2014). L'activité de glutathionylation a pu être mise en évidence sur des herbicides renforçant l'hypothèse selon laquelle ces protéines auraient un rôle dans les processus de détoxication (Cho, Kong, 2007).

Certaines isoformes de GSTFs interagissent avec des métabolites secondaires (Dixon et al., 2010) : comme l'indole-3-aldéhyde (Dixon et al., 2011a), les anthocyanes, afin de participer à leur stockage dans la vacuole (Kitamura et al., 2004a), l'indole-3-acétonitrile, qui est conjugué à une molécule de glutathion pour permettre la production d'un glucosinolate : la camalexine (Geu-Flores et al., 2011) et aussi avec les flavonoïdes (avec l'exemple de la quercétine sous forme glycone et aglycone ; (Ahmad et al., 2017).

En comparaison avec les plantes, la classe Phi dans le règne fongique a été beaucoup moins étudiée. Néanmoins, l'une des premières caractérisations de GSTs de la classe Phi remonte à la fin des années 1990s. A partir de cultures du champignon décomposeur *Phanerochaete chrysosporium* sur un milieu riche en nutriments, Dowd et collaborateurs ont purifié une GST (PcGST1 ; Dowd et al., 1997). L'utilisation de substrats traditionnels de GSTs a permis de constater que cette protéine catalyse des réactions de glutathionylation. Néanmoins, au cours de cette étude, Dowd et collaborateurs ne sont pas parvenus à classer cette GST. Il apparaît que les premiers acides aminés séquencés du domaine N-terminal de PcGST1 (obtenus par la dégradation d'Edman dans l'étude de Dowd et collaborateurs) concordent avec ceux d'une protéine (Prot ID : 2971755, disponible sur le site du Joint Genome Institute). De plus, par mesure du pourcentage d'identité de séquence de cette protéine (2971755) avec une autre GSTF, il a été possible de classer cette protéine dans la classe Phi (Figure n°38). Jusqu'à présent, la classe Phi a été très peu étudiée chez les organismes fongiques, le (ou les) rôle(s) de ces enzymes reste(nt) à découvrir.



Figure n°38 : (A) Séquençage des premiers résidus du domaine N-terminal après la dégradation d'Edman de GST 1 (issue de Dowd et al., 1997). (B) Séquence complète de PcGST1 dont l'identifiant est 2971755 disponible sur le site du Joint Genome Institute (nom et version du génome : *« Phanerochaete chrysosporium* RP-78 v2.2 »).

2.5.4. La classe Xi (GSTXs)

Anciennement qualifiée GHRs (pour glutathionyl-hydroquinones réductases), la classe Xi est présente chez les bactéries, les plantes et les champignons (Belchik, Xun, 2011). C'est chez la bactérie *Sphingobium chlorophenolicum*, que la première GSTXi (PcpF) a été étudiée. La caractérisation biochimique et fonctionnelle de la protéine PcpF a mis en évidence que celle-ci était impliquée dans les processus de dégradation du pentachlorophénol (Huang et al., 2008). Le pentachlorophénol est une molécule antifongique qui a été utilisée par l'Homme pour le traitement des eaux usées et pour la protection du bois de construction.

Une autre classe de GSTs différente des GSTXs, retrouvée également chez les bactéries, est aussi impliquée dans la dégradation du pentachlorophénol, il s'agit des tétrachlorohydroquinone déshalogénases (TCHQDs ; McCarthy et al., 1997).

Plus précisément, les TCHQDs agissent sur un intermédiaire de la voie de dégradation des pentachlorophénols : le tétrachloro-1,4-hydroquinone (TCHQ). Le cycle catalytique des TCHQDs est composé d'une dualité d'activité de glutathionylation et de déglutathionylation nécessitant deux molécules de glutathion. D'abord, une première molécule de glutathion est conjuguée au TCHQ et substitue un atome de chlore. Puis, l'adduit de glutathion est retiré par la TCHQD par l'intermédiaire d'une cystéine conservée. Ensuite, une seconde molécule de glutathion libère la première molécule du glutathion liée à la cystéine, permettant ainsi de recycler l'enzyme (Figure n°39 ; McCarthy et al., 1996). Chez les champignons, l'analyse des génomes a révélé l'absence de gènes codant pour cette classe. Pourtant, il a été démontré que des extraits protéiques provenant de cultures de *P. chrysosporium* incubés en présence de glutathion pouvaient dégrader le TCHQ (Reddy, Gold, 1999).



Figure n°39 : Cycle catalytique des TCHQDs vis-à-vis du tétrachloro-1,4-hydroquinone (TCHQ) (issue de McCarthy et al., 1996). Les facteurs promouvant l'étape de glutathionylation (-SG) ne sont pas clairement identifiés. Deux mécanismes sont possibles : soit le glutathion conjugue spontanément, soit la glutathionylation s'effectue par la TCHQDs grâce à la présence d'une sérine conservée. Concernant l'étape de déglutathionylation, celle-ci est permise sous l'action d'une cystéine (aussi conservée, à la position 13). Une molécule de glutathion oxydé (GSSG), résulte de la phase de « recyclage » de la cystéine.

C'est à partir des années 2010 que l'étude de la classe Xi a débuté (Xun et al., 2010). La caractérisation biochimique a montré que les GSTXs possèdent une activité de déglutathionylation qui est permise par une cystéine catalytique présente dans le site actif. Cette activité a pu être démontrée sur un substrat initialement conjugué : la thiodone (correspondant à une molécule de ménadione conjuguée avec une molécule de glutathion, MENSG ; Green et al., 2012), à plusieurs reprises : chez deux GSTXs de peuplier (*Populus trichocarpa*, PtGSTX1 et PtGSTX2 ; Lallement et al., 2015), une GSTX de *P. chrysosporium* (PcGSTX1 ; Meux et al., 2011) et une de *Saccharomyces cerevisiae* (ScECM4 : Schwartz et al., 2016). D'autres substrats dont le squelette moléculaire est similaire aux hydroquinones et qui portent un adduit de glutathion à différentes positions, ont également été identifiés (Figure n°40) (Lam et al., 2012). Par ailleurs, la caractérisation structurale menée sur les GSTXs a montré que ces enzymes existent à l'état homodimérique (Lallement et al., 2015 ; Meux et al., 2011 ; Schwartz et al., 2016).



Figure n°40 : Structures des substrats des GSTXs (issue de Lam et al., 2012).

2.5.5. La classe des GSTFuA

Le premier nom de cette classe était celui des GTE pour désigner les glutathion transférases ayant une activité de type éthérase (Morel et al., 2009). Cette activité consiste à l'action simultanée du clivage d'une liaison éther-aryle et de l'ajout d'un adduit glutathionylé (Figure n°41).



Figure n°41 : Schéma de la réaction d'une activité de type β -éthérase.

Les premières enzymes caractérisées et montrant une activité β -éthérase sont les protéines LigE et LigF de la bactérie *Sphingobium sp* (souche SYK-6). Ces enzymes sont capables de cliver un modèle de lignine et de le réduire en y ajoutant une molécule de glutathion (Masai et al., 2003). L'analyse des séquences peptidiques entre la séquence de LigE et celles des GSTFuA montre que ces enzymes sont similaires entre elles. Par exemple, des identités de séquences proches de 20% ont été obtenues entre LigE et deux GSTFuA de *Phanerochaete chrysosporium*. Cependant, chez les champignons, toutes les GSTFuA ne possèdent pas systématiquement une activité β -éthérase et c'est pour cela qu'elles ont été renommées. Toutefois, les modèles de lignine utilisés comme substrats dans plusieurs études n'étaient pas forcément les mêmes et cela pourrait expliquer, en partie, l'absence ou non d'activité β -éthérase. En effet, même si cette activité a été observée pour des GSTFuA des champignons de pourriture blanche : *Dichomitus squalens* (Marinović et al., 2018a) et *Ceriporiopsis subvermispora* (Osman et al., 2018), celle-ci est absente chez une GSTFuA de *P. chrysosporium* (Mathieu et al., 2012).

Pour cette dernière, différents ligands dont les structures sont similaires à celles des sous-unités de la lignine, ont été identifiés : la vanilline, la coniféraldéhyde et le syringaldéhyde (Mathieu et al., 2012).

D'un point de vue structural, les GSTFuA sont dimériques et contiennent dans leur site actif une sérine. La présence de cette sérine pourrait partiellement expliquer la capacité des GSTFuA à catalyser des réactions de glutathionylation et aussi de type peroxydase (Mathieu et al., 2013 ; Osman et al., 2018). Par ailleurs, la classe des GSTFuA a aussi été étudiée chez le champignon pathogène *Alternaria brassicicola*, où il a été montré que le gène codant la protéine AbGSTFuA1 était surexprimé lorsque l'agent pathogène était exposé à des composés isothiocyanates (Calmes et al., 2015).

2.5.6. La classe Ure2p

Le nom de la classe Ure2p a été donné suite à des études menées sur une protéine de levure, Ure2. Chez *S. cerevisiae*, la protéine Ure2 a un rôle de répresseur de la transcription des gènes impliqués dans le catabolisme de l'azote. L'étude de la séquence peptidique de Ure2 a indiqué que cette protéine possède les domaines caractéristiques d'une GST (c'est-à-dire un domaine contenant le repliement de type TRX et un second domaine hélicoïdal). La conversion de la forme native de Ure2 à la forme prion (Ure2p) a pour conséquence de produire des agrégats d'Ure2p supprimant le rôle initial de répresseur (Wickner, 1994). De plus, la protéine Ure2 est requise dans les processus de détoxication face aux métaux lourds et serait impliquée dans la réponse au stress oxydatif (Rai et al., 2003).

L'analyse des séquences d'Ure2p chez les Ascomycètes et les Basidiomycètes a montré qu'il existait deux types d'Ure2p : type A et type B. Malgré certaines exceptions, les deux types d'Ure2p sont présents chez la plupart des organismes fongiques. Il est à noter que les Ure2pA sont présentes en plus grand nombre chez les champignons décomposeurs de bois.

L'expression des gènes codant des Ure2p a été étudiée chez *P. chrysosporium* et montre une induction de certains d'entre eux (PcUre2pA4 et PcUre2pA6) en présence d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Les protéines PcUre2p4 et PcUre2p6 ont été caractérisées biochimiquement et toutes les deux possèdent une activité de glutathionylation (Thuillier et al., 2011a ; Roret et al., 2015a). De plus, la caractérisation biochimique des Ure2pA, a montré que ces protéines étaient dimériques et qu'elles pouvaient fixer une molécule de glutathion oxydé (Roret et al., 2015).

La caractérisation structurale d'une Ure2pB (PcUre2p1) a aussi permis d'identifier l'état dimérique de cette protéine et la fixation d'une molécule de glutathion oxydé stabilisée par une asparagine au sein de la structure de PcUre2p1. Par ailleurs, les alignements structuraux montrent que cette protéine présente des similarités avec deux protéines bactériennes d'*Escherichia coli* : EcYfcG et EcYghU (Thuillier et al., 2013). Ces deux protéines font partie de la famille des GSTs et plus précisément de la classe Nu (Stourman et al., 2011). La résolution de leurs structures a révélé la présence de deux molécules de glutathion (soit un exemplaire de GSSG, soit deux exemplaires de GSH).

Récemment, il a été suggéré que les GSTs de la classe Nu (GSTNs) seraient impliquées dans la prise en charge de molécules issues de la dégradation du polymère de lignine (Kontur et al., 2018). En utilisant un modèle de lignine (le GGE pour « guaiacylglycerol- β -guaiacyl ether »), il a été possible de caractériser le système de clivage des liaisons β -éther mis en place chez certaines bactéries. Ce système est composé de trois phases (Figure n°42).

Dans la première phase, il va y avoir une réaction d'oxydation sur le GGE qui est réalisée par des déshydrogénases (LigL, LigN, LigD et LigO; Sato et al., 2009). Ensuite, des enzymes ayant une activité β -éthérase (LigF, LigE et LigP) vont cliver la liaison β -aryl éther. Ces mêmes enzymes vont également réduire le carbone β en y ajoutant une molécule de glutathion. Ainsi, deux produits sont formés : le GS-HPV pour « β -glutathionyl- γ -hydroxypropiovanillone » et le guaiacol.

Lors de la troisième phase, d'autres enzymes (GST3, GSTNs et LigG) vont retirer la molécule du glutathion du GS-HPV formant de l'hydroxypropiovanillone (HPV) (Ohta et al., 2015). Une molécule de glutathion oxydée est également produite lors de cette dernière étape.



Figure n°42 : Système de clivage d'un modèle de lignine (issue de Kontur et al., 2018).

Outre l'implication des Ure2p dans la détoxication de molécules xénobiotiques ou dans la dégradation de la lignine, certaines d'entre elles peuvent être impliquées dans le métabolisme secondaire. Chez *Aspergillus fumigatus,* il a été montré qu'une GST de la classe Ure2p était requise pour la synthèse d'une mycotoxine, la gliotoxine. D'un point de vue biochimique, il a été proposé que la protéine GliG serait susceptible de glutathionyler à deux reprises un intermédiaire (le 2,5-pyrazinedione) pour poursuivre la voie de biosynthèse conduisant *in fine* à la formation de la gliotoxine (Figure n°43 ; Davis et al., 2011).



Figure n°43 : (A) Réaction catalysée par l'Ure2p GliG d'*Aspergillus fumigatus* dans la voie de biosynthèse de la gliotoxine. (B) Proposition de voie de biosynthèse de la gliotoxine (issue de Davis et al., 2011).

2.5.7. La classe Omega (GSTO)

La classe Omega a été principalement étudiée chez les mammifères et notamment chez l'Homme. Parmi les deux isoformes présentes chez ce-dernier, une étude a montré que la protéine humaine GSTO1-1 est sous forme dimérique et contient une cystéine catalytique (Board et al., 2000). Cette enzyme possède des activités réductase envers l'acide déshydroascorbique et de déglutathionylation vis-à-vis du phénylacétophénone glutathionylé (PAPSG ; (Board, Anders, 2007)) et du 4nitrophenacylacétophénone (4NPG ; Board et al., 2008). L'ensemble des travaux menés sur cette classe a permis de constater que les GSTOs sont impliquées dans différents processus physiologiques, en particulier l'aptitude de GSTO1-1 à interagir avec un canal calcique localisé dans le réticulum endoplasmiques (Board, 2011). Une étude structurale supplémentaire a montré qu'une molécule de glutathion oxydé était retrouvée dans le site actif de la protéine et qu'une molécule de 4NPG était localisée dans le site L au niveau de l'interface de dimérisation (Brock et al., 2013).

Au même titre que chez l'humain, la classe Omega fut également étudiée chez les insectes. Par exemple les espèces du genre *Drosophila sp* contiendraient 3 à 5 gènes codant pour des GSTOs (Walters et al., 2009).

De plus chez le modèle *Drosophila melanogaster*, il a été montré qu'un membre de la classe Omega serait impliqué dans la couleur des yeux (Kim et al., 2006). D'autre part, la caractérisation biochimique de la protéine BmGSTO issue du Bombyx du murier (*Bombyx mori*), a montré que cette protéine était stable jusqu'à 50°C et que son pH optimal était de 7.5 (Yamamoto et al., 2009). Chez ce même organisme, la caractérisation structurale d'une autre GSTO, BmGSTO3-3, a confirmé l'état dimérique des GSTOs (Chen et al., 2011). Chez l'abeille (*Apis cerana cerana*), la protéine AccGSTO1 semblerait être impliquée dans la réponse au stress oxydatif (Meng et al., 2014).

Dans le règne fongique, les GSTOs ont été beaucoup moins étudiées. Une première caractérisation fut réalisée chez la levure où la protéine ScGSTO1 présentait des activités de type réductase (Garcerá et al., 2006). Chez le champignon décomposeur *P. chrysosporium*, certaines GSTO catalysent des réactions de déglutathionylation envers le PAP-SG et peuvent interagir avec des ligands issus d'extraits de hêtre tels que des terpènes (Meux et al., 2013). Des études transcriptomiques ont montré que le gène codant pour PcGSTO4 était induit lorsque *P. chrysosporium* colonise du bois d'épicéa (*Picea glauca*; (Korripally, Hunt, et al., 2015). Par ailleurs, la protéine bactérienne LigG qui possède une cystéine catalytique et qui est impliquée dans la déglutathionylation du GS-HPV (Figure n°42) présente des similarités structurales (au niveau du site H sous la forme d'une poche hydrophobe) et biochimiques (capable aussi de déglutathionyler le PAPSG) avec la classe Omega (Meux et al., 2012). Ainsi, les derniers résultats obtenus suggèrent que le rôle physiologique de cette classe chez les organismes décomposeurs de bois serait en lien avec la dégradation de la lignine et aussi avec la détoxication des produits de dégradation du bois.

Problématique de recherche et Objectifs de thèse

PROBLEMATIQUE DE RECHERCHE ET OBJECTIFS DE

THESE

Problématique de recherche et Objectifs de thèse

Contexte

Les champignons décomposeurs de bois représentent un intérêt pour l'Homme dans le domaine de la bioraffinerie pour la production de biocarburants (Canam et al., 2013) et aussi dans la bioremédiation afin de réduire la teneur en molécules polluantes dans les sols (Pointing, 2001). A l'inverse, ces organismes peuvent représenter des risques notamment dans la dégradation de bois de construction dans les habitations (Gabriel, Švec, 2017). Dans la littérature scientifique, ces organismes ont surtout été étudiés pour leur aptitude à dégrader la biomasse lignocellulosique (Rytioja et al., 2014 ; Payne et al., 2015 ; Pollegioni et al., 2015). La combinaison d'approches génomique, transcriptomique et protéomique a permis de mieux comprendre les mécanismes de dégradation mis en place par ces organismes.

Ce projet de thèse a été réalisé dans l'Unité Mixte de Recherche INRA/Université de Lorraine 1136 Interactions Arbres Microorganismes (IAM). Ce laboratoire s'intéresse aux interactions entre les champignons (pathogènes, symbiotiques et saprophytes) et leurs hôtes. Dans le cas des organismes saprophytes, c'est principalement le champignon modèle de pourriture blanche *P. chrysosporium* qui a été étudié au laboratoire IAM.

Comme il a été rappelé dans le chapitre II de l'introduction, l'analyse de génomique comparative a montré que l'évolution de plusieurs familles d'enzymes est corrélée à celles des pourritures blanches. Certaines d'entre elles sont impliquées dans la dégradation de la biomasse (PODs), d'autres dans la détoxication (Nagy et al., 2017). La famille des glutathion transférases a été étudiée à plusieurs reprises chez *P. chrysosporium* au laboratoire IAM. Ces études ont notamment porté sur la caractérisation de classes majoritaires de GSTs telles que les classes Omega, GSTFuA et Ure2p (Mathieu et al., 2013 ; Thuillier et al., 2013 ; Meux et al., 2013).

Le modèle d'étude choisi pendant ce projet doctoral a été *Trametes versicolor*. *T. versicolor* est un champignon saprophyte de pourriture blanche appartenant au règne des Basidiomycètes et à l'ordre des Polypores. Dans son génome, l'analyse *in silico* indique que 44 gènes codent pour des GSTs et parmi eux, 16 font partie de la classe Omega (TvGSTOs) ce qui fait d'elle la classe majoritaire. *A contrario*, d'autres classes sont beaucoup moins représentées telles que la classe Xi qui ne compte que trois représentants. Malgré l'initiation de l'étude des GSTs chez ce champignon par la doctorante précédente Aurélie Deroy, les fonctions potentielles de ces enzymes restent jusqu'à présent inconnues.

Objectifs de thèse

Dès lors, l'objectif principal de ce projet de thèse était d'étudier les fonctions de deux classes de GSTs chez *Trametes versicolor* : les classes Omega et Xi. En investiguant les caractéristiques des isoformes appartenant à ces deux classes, cette thèse a eu pour but d'évaluer l'existence de redondances ou de spécificités fonctionnelles pouvant être dues à des processus de néofonctionalisation.

A partir de cet objectif global, deux objectifs sous-jacents ont été définis :

- le premier était de caractériser d'un point de vue biochimique les fonctionnalités de deux classes de GSTs de *T. versicolor* et d'identifier leurs substrats et/ou ligands potentiels.

Pour répondre à ce premier objectif, les protéines utilisées ont été obtenues sous forme recombinante. Ensuite, les fonctionnalités de ces protéines ont été évaluées vis-à-vis de plusieurs substrats classiques de GSTs (précédemment décrits dans la littérature scientifique) par des méthodes spectrophotométriques et chromatographiques. Concernant la recherche de cibles moléculaires, une méthode de screening basée sur l'étude de la thermostabilté des protéines a été appliquée envers une banque de molécules et d'extraits de bois. Les extraits de bois ont été obtenus en collaboration avec le laboratoire d'Etude et de Recherche sur le Matériau Bois et le laboratoire Ecologie des Forêts de Guyane.

- le second objectif était de caractériser d'un point de vue structural les deux classes.

Pour cela, une étroite collaboration avec le laboratoire Cristallographie, Résonance Magnétique et Modélisations (CRM²) a été mise en place. Dans le cadre de la thèse de Mathieu Schwartz, doctorant au laboratoire CRM², des expériences de cristallogenèse ont été effectuées afin de caractériser les structures tridimensionnelles de certaines isoformes appartenant aux deux classes de GSTs. De plus, des expériences de co-cristallisation de protéines avec des cibles moléculaires ont été effectuées.

Démarche scientifique

La méthodologie adoptée pendant cette thèse est résumée dans la figure ci-dessous (Figure n°44).



Figure n°44 : Méthodologie utilisée lors de ce projet de thèse

Les résultats obtenus seront organisés en deux chapitres : le premier concernera la classe Omega et le second sera dédié à la classe Xi. Tous les résultats seront présentés sous la forme d'articles scientifiques (au nombre de quatre) qui sont soit en préparation, soit publié, soit en cours de soumission. Chacun de ces articles sera précédé d'une introduction afin de préciser le contexte et les objectifs de l'étude. L'ensemble des résultats obtenus pour chacun des articles sera résumé sous la forme d'une conclusion à la fin des deux chapitres.

En somme, la partie « Résultats » sera organisée de la façon suivante :

Chapitre I : Etude d'une classe de GSTs en extension chez Trametes versicolor : la classe Omega

Article n°1: Biochemical characterization of an omega glutathione transferase produced by the whiterot basidiomycete *Trametes versicolor* (en préparation pour le journal Environmental Microbiology)

Article n°2: Molecular recognition of wood polyphenols by phase II detoxification enzymes of the white rot *Trametes versicolor* (publié dans Scientific Reports)

Article n°3: Fungal glutathione transferases as tools to explore the chemical diversity of Amazonian wood extractives (en cours de révision dans ACS Sustainable Chemistry and Engineering)

<u>Chapitre II : Etude d'une classe de GSTs conservée mais minoritaire chez *Trametes versicolor* : la classe Xi</u>

Article n°4: *Trametes versicolor* Glutathione Transferase Xi 3, a dual Cys-GST with catalytic specificities of both Xi and Omega classes (en cours de révision dans FEBS Letter)
<u>Résultats</u>

RESULTATS

<u>Résultats</u>

<u>Chapitre I : Etude d'une classe de GSTs en extension chez Trametes versicolor : la classe</u> <u>Omega</u>

Introduction sur l'étude des GSTs de la classe Omega chez Trametes versicolor

Dans le génome de *T. versicolor*, 16 gènes codent pour des GSTs de la classe Omega (TvGSTOs). Ces 16 gènes sont localisés de façon hétérogène dans différents scafflod. En effet, le scaffold n°17 contient six gènes de GSTOs alors que les scaffolds n° 1, 5, 11, 12 et les scaffolds n° 2, 7, 9 contiennent respectivement 1 et 2 gènes codant pour des GSTOs (Figure n°45).



Figure n°45 : Localisation des 16 gènes codant les GSTOs chez Trametes versicolor dans les différents scaffolds. Disponible sur le site du Joint Genome Institute (JGI) (https://genome.jgi.doe.gov/Trave1/Trave1.home.html), le génome de Trametes versicolor est, à l'heure actuelle, assemblé en 22 scaffolds. Dans cette figure, chaque scaffold est représenté en rectangle orange et la position de chacun des gènes a été répertoriée. Pour les protéines non caractérisées, les lettres (S) et (C) symbolise l'acide aminé présent dans le site actif de la protéine synthétisée et elles correspondent respectivement à une sérine et à une cystéine. La localisation dans les scaffolds est mentionnée entre parenthèses.

Dans la littérature scientifique, les études ont montré que la classe Omega regroupe des GSTs ayant une cystéine catalytique dans leur site actif (Board, 2011). Or, l'analyse des séquences peptidiques des 16 TvGSTOs a révélé que 4 possèdent une cystéine dans le site actif alors que les 12 restantes contiennent une sérine à la place (Figure n°46) (Deroy, 2015).

Une sélection de neuf isoformes parmi les 16 TvGSTOs a été effectuée pour initier la caractérisation de la classe Omega. Cette sélection est composée de 3 TvGSTOs ayant une cystéine (TvGSTO1-3C) et de 6 TvGSTOs contenant une sérine (TvGSTO1-6S) (Figure n°46).



Figure n°46 : Alignement entier (A) et partiel (B) des séquences peptidiques des 16 TvGSTOs. Les séquences ont été obtenues à partir du site du JGI (https://genome.jgi.doe.gov/Trave1/Trave1.home.html). Ensuite, elles ont été alignées en utilisant le programme d'alignement ClustalW (avec 1000 répétitions) installé dans le logiciel BioEdit (Sequence Alignment Editor). Le rectangle bleu entoure le résidu impliqué dans l'abaissement du pKa du glutathion.

Globalement, les 9 TvGSTOs sélectionnées partagent des pourcentages d'identité de séquence compris entre 35 et 70 % (Tableau n°5). En revanche, les pourcentages d'identités entre TvGSTO3C et les autres TvGSTOs sont beaucoup plus faibles, entre 22 et 27 %.



Tableau n°5 : Pourcentages d'identité de séquences des neuf TvGSTOs sélectionnées et étudiées. L'alignement des séquences peptidiques et la détermination des pourcentages d'identité ont pu être effectués avec le logiciel MatGat (« Matrix Global Alignment Tool » en utilisant la matrice BLOSUM50 « BLOcks SUbstitution Matrix ». Les protéines sélectionnées ont été utilisées sous forme recombinante après les avoir produites et purifiées à l'aide de la bactérie *Escherichia coli* (souche Rosetta). Les séquences de gène ont été synthétisées et insérées dans un vecteur plasmidique (pET26b) de façon à ce que les protéines portent une étiquette poly(hexa)-histidine à l'extrémité C-terminal pour faciliter leur purification. Cette purification est réalisée à l'aide d'une résine d'agarose contenant des molécules d'acide nitrilotriacétique qui immobilisent des ions nickels. Ces ions nickels vont établir des liaisons électrostatiques avec les histidines de la protéine permettant à celle-ci d'être retenue. Un exemple de purification d'une protéine (TvGSTO1S) est présenté sur le gel d'acrylamide ci-dessous (Figure n°47).



Figure n°47 : Analyse des étapes de purification de la protéine TvGSTO1S par chromatographie d'affinité aux ions nickels (Ni2+) immobilisés sur une résine d'agarose couplée à des acides nitrilotriacétatiques par électrophorèse dénaturante sur gel d'acrylamide 15%. **Mq :** Marqueur de taille, **kDa :** kiloDaltons, **CT :** Culture Totale, **FI :** Fraction Insoluble, **FS :** Fraction Soluble, **P :** Passage à travers, **L :** Lavage et **E :** Elution.

Pour les trois articles dédiés à l'étude des neuf TvGSTOs, une méthode de recherche de substrats et/ou de ligands potentiels a été utilisée et il s'agit de l'étude de la modification de la thermostabilité des protéines. Le principe de cette méthode est de suivre la dénaturation des protéines en fonction d'un gradient de température et en présence d'un marqueur fluorescent (SYPRO[®] Orange). Pendant le gradient croissant de température, la protéine sera plus susceptible d'exposer ses régions hydrophobes. C'est précisément dans un environnement hydrophobe que la sonde fluorescente va se fixer et, après excitation, va émettre un signal fluorescent. Il est à rappeler que le signal de fluorescence est uniquement possible lorsque la sonde se trouve dans une zone hydrophobe.

En fonction du gradient de température, ce signal fluorescent va former une courbe sigmoïdale. A partir de cette courbe, il est possible de déterminer la température de détermination (T_d) qui correspond à la température nécessaire pour obtenir la moitié de la protéine sous forme dénaturée (Figure n°48A).



Figure n°48 : (A) Courbe de dénaturation thermique d'une protéine. (B) Exemples de courbes de dénaturation thermique de la protéine TvGSTO2S selon différentes conditions. La courbe bleue représente la protéine seule. La courbe rouge représente la protéine TvGSTO2S incubée en présence d'une molécule ayant un effet destabilisateur. La courbe verte correspond à la dénaturation thermique de TvGSTO2S en présence d'une molécule stabilisatrice. La différence entre la T_d obtenue et celle de la condition « protéine seule » correspond au décalage thermique (ΔT_d). Ce décalage peut être négatif (effet destabilisateur) ou positif (effet stabilisateur).

Les T_d obtenues pour chacune des conditions (avec ou sans la molécule testée) seront comparées ce qui permettra de déterminer le décalage thermique (ΔT_d) et d'estimer les interactions entre les deux partenaires (Figure n°48B). Outre la recherche de cibles moléculaires (substrats ou ligands), l'étude de la dénaturation thermique apporte d'autres avantages comme par exemple la possibilité d'optimiser les conditions de stabilité d'une protéine et aussi d'étudier les interactions protéine-protéine (Boivin et al., 2013). Etude des GSTs de la classe Omega de Trametes versicolor à cystéine catalytique (TvGSTOC)

Article n°1: Biochemical characterization of an omega glutathione transferase produced by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*

A. Deroy, T. Perrot, M. Schwartz, S. Amara, J.G. Berrin, C. Didierjean, S. Dumarçay, F. Favier, P. Gérardin, J.M. Girardet, A. Kohler, D. Navarro, D. Chevret, E. Record, C. Rose, R. Sormani, M. Morel-Rouhier, and E. Gelhaye

Cet article est en cours de préparation pour soumission dans Environmental Microbiology.

Avant mon arrivée au laboratoire, la doctorante précédente Aurélie Deroy avait montré que différentes souches de *Trametes versicolor* produisaient des gouttelettes colorées (entre jaune et rouge foncé), nommées des exudats, lorsqu'elles se développent sur un milieu malt-agar, mais également en présence de plaquettes de bois de chêne ou de hêtre. En collaboration avec le laboratoire Biodiversité et Biotechnologies Fongiques, une approche protéomique a été menée sur les exudats produits par les différentes souches de *T. versicolor* afin d'identifier les protéines sécrétées. Pour l'une de ces souches, BRFM1218, l'analyse protéomique du sécrétome produit sur du bois de chêne a révélé la présence de plusieurs peroxydases. Parmi elles, une peroxydase décolorante de pigments (dye-decolorizing peroxidase, *TvDyP1*) et une versatile peroxydase (*TvVP2*) furent identifiées. Ces deux peroxydases ont été caractérisées d'un point de vue biochimique et ces travaux, auxquels j'ai participé, ont été valorisés sous la forme d'une publication scientifique (disponible en **Annexe**). L'analyse protéomique de la souche BRFM1218 a aussi indiqué la présence de plusieurs GSTs dans l'exsudat produit sur milieu riche, dont une de la classe Omega (TvGSTO1C) retrouvée également dans l'exsudat produit sur plaquettes de bois de chêne.

Le premier objectif des travaux présentés dans ce premier article a été d'étudier des exsudats de BRFM1218 (observation microscopique, composition protéïque). Dans la continuité, TvGSTO1C (issue de deux exudats produits sur milieu riche et en présence de bois de chêne) ainsi que deux autres isoformes : TvGSTO2C et TvGSTO3C ont été caractérisées d'un point de vue biochimique.

<u>Résultats – Chapitre I – Article nº1</u>

Biochemical characterization of an omega glutathione transferase produced by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*

A. Deroy^a, T. Perrot^a, M. Schwartz^b, S. Amara^c, J.G. Berrin^c, C. Didierjean^b, S. Dumarçay^d, F. Favier^b, P. Gérardin^d, J.M. Girardet^a, A. Kohler^a, D. Navarro^{c,e}, D. Chevret^f, E. Record^c, C. Rose^g, R. Sormani^a, M. Morel-Rouhier^a, and E. Gelhaye^a*

a : Université de Lorraine, INRA, IAM, F-54000 Nancy, France

b : Université de Lorraine, CNRS, CRM2, F-54000 Nancy, France

c : Université d'Aix-Marseille INRA, BBF, F-13009 Marseille, France

d : Université de Lorraine, INRA, LERMAB, F-54000 Nancy, France

e: CIRM-CF, International Center for Microbial Resources collection-Filamentous fungi, INRA, Aix Marseille Université, UMR1163 Biodiversité et Biotechnologie Fongiques, F-13009 Marseille, France

f: Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France

* Corresponding author: E. Gelhaye: eric.gelhaye@univ-lorraine.fr.

Originality-Significance Statement

Basidiomycetes fungi are efficient degraders of woody biomass. In this process, they have to cope with the myriad of potential toxic molecules abundant in wood. In this study, we report the production of exudate droplets by the white-rot *Trametes versicolor* that contain enzymes involved in degradation and detoxification systems. We propose that fungi could use this strategy to extract from wood and degrade potential toxic molecules to facilitate the wood-decaying process.

Summary

Even often observed, the exudate production in fungi remains mainly unstudied. During growth on oak wood and on nutrient-rich medium, we observed one strain of the white-rot fungus *Trametes versicolor* (BRFM1218) produce red-brown and yellow liquid droplets. Microscopic analysis of this exudate revealed that the droplets are surrounded by a thin hyphal network. The exudate contains enzymes involved in aromatic compounds oxidation such as peroxidases and carbohydrate-active enzymes. In addition, the proteomic study revealed also the presence of enzymes belonging to the detoxification system involving glutathione related systems such as glutathione transferases. Among glutathione transferases retrieved in exudates, an Omega glutathione transferase has been detected in both conditions (on malt and on oak sapwood). From these observations, a biochemical characterization of this protein has been done, showing in particular that the enzyme is able to catalyze deglutathionylation and thioltransferase reactions. The potential function of these enzymes is then discussed.

Keywords: Trametes versicolor, exudate, secretome, oak, wood degradation, detoxification system

Introduction

Plant biomass, the major source of terrestrial carbon source, is mainly composed of cellulose, hemicelluloses and lignin. Among micro-organisms able to degrade and mineralize these components, saprophytic and particularly wood-decaying fungi are intensively studied in particular due to their involvement in the organic matter recycling. These latter are separated in several functional classes depending on wood decomposition strategy (white-rot, brown-rot and soft-rot) (Eastwood et al., 2011; Floudas et al., 2012b; Riley et al., 2014a). Beside the main wood polymers, wood-decaying fungi have also to deal with various other wood components. These compounds usually called "wood extractives" are extremely diverse, their nature and concentration varying according to many factors such as the considered tree species (softwood versus hardwood for instance), the environmental conditions encountered during the "tree life", the tree part (branches or trunk, heartwood or sapwood), ... (Doussot et al., 2002a; Prida et al., 2007; Kebbi-Benkeder et al., 2015). Wood extractives play a central role on the natural durability of the considered wood displaying often anti-microbial activity (Kirker et al., 2013b; Valette et al., 2017a). As a consequence, they usually induce a stress response in fungi leading to an up-regulation of genes involved in the different phases of intracellular xenobiotic detoxification such as cytochrome P450 monooxygenases (phase I) or glutathione transferases (phase II) (Hori et al., 2014; Thuillier et al., 2014a). These multigenic families are particularly extended in wood decayers in agreement with the necessity for these microorganisms to deal with the huge diversity of potential toxic compounds encountered in their environment and/or coming from the oxidative wood degradation process (Morel et al., 2013a; Nagy et al., 2017a). The fungal glutathione transferases family is subdivided into several classes and among them, three are extended, the Ure2p, GSTFuA and omega classes. A phylogenetic analysis showed that the Ure2p class is composed of two subgroups: Ure2pA and Ure2pB, the first one being specific of wood degraders (Thuillier et al., 2011a). Moreover, it has been showed that the GSTFuA class was more abundant in wood-decaying fungi (Mathieu et al., 2013b). The Omega class is subdivided into two subclasses (II and III) and is mainly found in the genome of symbiotic and saprophytic fungi (Morel et al., 2013a). Structural and biochemical approaches have indeed highlighted similarities between some isoforms of Omega class and the protein LigG from Sphingobium sp involved in the catabolic pathway of lignin (Meux et al., 2012).

Furthermore, filamentous fungi are known to be able to translocate different molecules through their mycelial network. In particular, some fungi have been shown to translocate polycyclic aromatic hydrocarbons (Furuno *et al.*, 2012). This mechanism is probably involved in global detoxification strategy used by fungal wood decayers (Banitz *et al.*, 2013), and more globally by wood-decaying microbial communities (Banitz et al., 2013 ; Hervé et al., 2014a ; 2016a).

Recently, proteomic analysis of the secretome of *T. versicolor* BRFM 1218 grown on oak wood has been performed by our group (Amara *et al.*, 2018). During these experiments, we observed that this strain was able to produce red/brown dark exudate during oak degradation. In addition, this strain was also able to produce consistently a yellow liquid after one month at 25°C on a rich medium containing malt agar. To better understand this phenomenon, we report here a proteomic approach, showing that such exudate production is linked to the induction of both extracellular and intracellular detoxification systems. This latter was characterized by the identification of enzymes related to glutathione-linked systems, and in particular of glutathione transferases belonging to the omega class. One isoform, named TvGSTO1C has been biochemically characterized by determining its molecular weight, its oligomerization state and also by investigating its catalytic properties. Finally, in order to research potential substrates and ligands of TvGSTO1C, a high throughput screening method has been used.

Results

Trametes versicolor BRFM1218 produces exudate

During previous experiments, BRFM1218 strain of *T. versicolor* was grown on malt agar in the presence of either oak or beech wood blocks (Amara *et al.*, 2018). Colored droplets (from yellow to dark red) accumulated near or on the colonized heartwood and sapwood of oak. In contrast, such colored droplets have not been observed in the experiments dealing with beech wood blocks (Figure 1). Furthermore, BRFM1218 strain was also able to produce consistently a yellow liquid after one month at 25°C on a rich medium containing malt agar (Figure 1).



Figure 1: Exudate production of BRFM1218 strain after 4 or 12 weeks on beech, heartwood and sapwood oak wood blocks.

As shown in Figure 2B and 2C, scanning electron microscopy performed on droplets-producing areas on malt-agar medium (Figure 2A) revealed that exudate production was correlated with the formation of a thick network of hyphae structured as a basket surrounding the observed droplets (Figure 2B). In contrast, the inside parts of the droplets appeared clearly less organized (Figure 2C). The ultracentrifugation of the harvested exudate did not lead to the separation of solid pellets suggesting an absence of structured vesicles.



Figure 2: Scanning electron microscopy performed on droplets-producing culture of the strain BRFM1218, showing mycelial network surrounding the observed droplets (A) and the inside part of the droplets (B).

Protein composition of BRFM1218 exudate

Using a proteomic approach, the protein composition of the BRFM1218 exudate produced on malt has been analyzed and then compared with proteins secreted during oak sapwood and beech degradation previously described (Supplemental Tables 1, 2 and 3) (Amara et al., 2018). 352 proteins have been detected on malt agar and interestingly more than 45% are also present in the oak or beech secretomes (Figure 3).



Figure 3: Venn diagram of protein content in the exudate produced on malt and in the secretomes collected from beech and oak cultures with T. versicolor strain BRFM1218.

A detailed examination revealed the presence of enzymes involved in the degradation of lignocellulosic materials. In particular several peroxidases involved in the oxidation/detoxification of aromatic molecules have been detected, e.g., four manganese peroxidases (MnPs, Prot ID 131080, 130496, 44897 and 51375), a DyP (Prot ID 48870) and a versatile peroxidase (VP, Prot ID 26239).

In addition, a large number of carbohydrate-active enzymes (CAZymes), most of them being involved in the degradation of the fungal cell-wall (Prot ID 170938, 62730, 25402, 23498 and 31361) are also present. Only one cellulose-acting enzyme (Prot ID 63826; GH6) and one hemicellulose-acting enzyme (Prot ID 144893; GH10) were identified.

The second feature of the protein composition of the studied exudate is the presence of enzymes involved in the detoxification system and in particular in the glutathione-linked systems. Since these antioxidant and detoxification enzymes are known to be intracellular, these proteins were probably located in the mycelium surrounding the observed droplets and/or on the deconstructed mycelia present in droplets. Two peroxiredoxins (Prot ID 130108 and 60144), which are proteins involved in the thiol-based antioxidant/detoxification are found.

These enzymes could be involved both in peroxide reduction and in oxidative stress signaling pathway (Morel *et al.*, 2008; Tachibana *et al.*, 2009). A glutathione reductase (Prot ID 36446), and a NADPH thioredoxin reductase (Prot ID 156571) have been also detected.

In the exudate produced on malt, five glutathione transferases (GSTs) were also detected and two of them were present in the most 100 abundant proteins. These two GSTs belong to the Ure2p (Prot ID 62807) and Omega (Prot ID 157166) classes. Interestingly, this omega glutathione transferase (Prot ID 157166) was also retrieved in the oak secretome but not in the beech secretome (Amara *et al.*, 2018).

Phylogenetic analysis of TvGSTOs

The fact to identify one GST (Prot ID 157166) in this exudate, which has been previously detected in oak sapwood secretome led us to characterize biochemically this protein. A phylogenetic analysis revealed that this protein belongs to the Omega class which is one of the most extended classes in wood-decaying agaricomycetes (Morel et al., 2013a). In *Trametes versicolor*, 16 genes encoding GSTOs have been detected in the genome and several resulting proteins have been structurally and biochemically characterized (Deroy et al., 2015; Schwartz et al., 2018). In contrast with previously studied TvGSTOs, the identified GSTO (Prot ID 157166), named here TvGSTO1C, possess a cysteinyl residue in its putative catalytic site (Figure S1). This feature is also shared by three other GSTOs in *Trametes versicolor*. Two of them, one belonging to the subclass II (TvGSTO3C, Prot ID 60698) and one belonging to the subclass III (TvGSTO2C, Prot ID 67635) have been also produced and purified as comparison.

Biochemical characterization

The molecular weight of the native form of TvGSTO1C has been determined by mass spectrometry. The results showed a supplemental weight of 305 Da which corresponds to the presence of glutathionylated adduct linked to the protein by a covalent bond (Table S4A). After a reduction step (by adding 1,4-dithiothreitol ten more concentrated than the protein), this adduct could be removed and the molecular weight obtained corresponded to the expected theoretical mass (26,503 Da) (Table S4A). As TvGSTO1C possesses one cysteine in its sequence and that this cysteine is present in the active site, we postulated the presence of a disulfide bond between the catalytic cysteine and the glutathione adduct. The thiol titration of the native and reduced protein confirmed this hypothesis, since the reduction step allowed to restore both the titration of one thiol group per protein and the release of one glutathione (Figure S4C). The oligomerization state of TvGSTO1C investigated by size-exclusion chromatography, suggested that the protein was present at a dimeric state in the tested conditions (Table S4B). To evaluate the consequences of reducing treatment on the structure of the protein, the hydrodynamic diameter (DH) of TvGSTO1C was measured according the redox state of the protein (Table S4D).

The results showed that the DH of both states (oxidized and reduced) were similar suggesting that the redox state would not modify the structure of the protein. All these features are mainly shared by the two other studied isoforms TvGSTO2C and TvGSTO3C (Table S4).

To characterize the biochemical functionalities of TvGSTO1C, enzymatic tests have been performed toward six substrates (Figure S2). As expected for the three studied TvGSTOC, no glutathionylation activity was detected against the three tested substrates (1-chloro 2,4-dinitrobenzene (CDNB), phenethyl isothiocyanate (PEITC) and benzyl isothiocyanate (BEITC) (Table 1). The three isoforms are also not able to reduce CuOOH. In contrast, the studied proteins exhibited deglutathionylation (toward glutathionyl-phenylacetophenone, GS-PAP) and thioltransferase (toward 2-hydroxyethyl disulfide, HED) activities. The catalytic efficiently (k_{cat}/K_M) measured for the three enzymes were higher for the deglutathionylation activity than for the thioltransferase activity. Moreover, the apparent affinities obtained for the deglutathionylation activity of TvGSTO1C and TvGSTO3C were similar (305.3 and 365.8 μ M). In contrast, the catalytic efficiently obtained for thioltransferase activity were higher for TvGSTO2C (4420 M⁻¹. s⁻¹) and TvGSTO3C (12100 M⁻¹. s⁻¹) than TvGSTO1C (381.9 M⁻¹. s⁻¹).

	CDNB	PEITC	BEITC	CuOOH	HED	GS-PAP
$K_{\rm M}(\mu M)$						
TvGSTO1S	$(2.03 \pm 0.21)E + 03$	80.82 ± 6.80	47.97 ± 3.43	630.40 ± 52.20	ND	ND
TvGSTO2S	764.60 ± 75.76	29.71 ± 2.84 (^{γ})	15.31 ± 1.68	$(1.33 \pm 0.12)E{+}03$	ND	ND
TvGSTO3S	$897.80 \pm 85.21 (*)$	12.20 ± 1.44 (*)	10.28 ± 1.09	ND	ND	ND (*)
TvGSTO4S	$(2.90\pm 0.38)E{+}03$	21.52 ± 3.09	$26.21\pm\!2.42$	(1.11 ± 0.16) E+04	ND	ND
TvGSTO5S	$(3.09\pm 0.22)\text{E}{+}03$	77.66 ± 8.13	$148.30 \!\pm\! 10.43$	$(2.10\pm 0.15)\text{E}{+}03$	ND	ND
TvGSTO6S	$910.40 \pm 86.77 (*)$	24.51 ± 2.99 (*)	13.33 ± 2.43	243.60 ± 28.26	663.60 ± 54.70	ND (*)
TvGSTO1C	ND	ND	ND	ND	(1.33 ± 0.28) E+03	305.30 ± 51.98
TvGSTO2C	ND	ND	ND	ND	$104.50 \!\pm\! 16.01$	817.90 ± 179.10
TvGSTO3C	ND	ND	ND	ND	$199.70 \!\pm\! 25.09$	365.80 ± 169.00
k _{cat} (s ⁻¹)						
TvGSTO1S	6.04 ± 0.27	6.45 ± 0.19	11.35 ± 0.22	1.56 ± 0.05	ND	ND
TvGSTO2S	0.21 ± 0.01	12.04 ± 0.26 (^{γ})	32.65 ± 0.62	1.19 ± 0.05	ND	ND
TvGSTO3S	$26.67 \pm 0.95 \ (*)$	3.08 ± 0.05 (*)	2.80 ± 0.06	ND	ND	ND (*)
TvGSTO4S	0.42 ± 0.03	0.39 ± 0.01	3.06 ± 0.07	1.25 ± 0.11	ND	ND
TvGSTO5S	1.26 ± 0.04	0.75 ± 0.02	1.34 ± 0.04	0.70 ± 0.02	ND	ND
TvGSTO6S	$4.94 \pm 0.17 (*)$	11.39 ± 0.36 (*)	11.58 ± 0.64	1.60 ± 0.05	$0.12 \pm (4.40 \text{E-03})$	ND (*)
TvGSTO1C	ND	ND	ND	ND	0.51 ± 0.06	7.00 ± 0.39
TvGSTO2C	ND	ND	ND	ND	0.46 ± 0.02	30.55 ± 3.26
TvGSTO3C	ND	ND	ND	ND	2.41 ± 0.08	15.33 ± 0.52
$k_{cat}/K_M(M^{-1}.s^{-1})$						
TvGSTO1S	$(2.97\pm 0.13)\text{E}{+}03$	(7.98 ± 0.23) E+04	$(2.37\pm 0.05)E{+}05$	(2.47 ± 0.07) E+03	ND	ND
TvGSTO2S	276.30 ± 9.25	$(4.05\pm 0.09)E{+}05(^{\gamma})$	(2.13 ± 0.04) E+06	887.40 ± 39.44	ND	ND
TvGSTO3S	(2.97 ± 0.11) E+04(*)	(2.53 ± 0.42) E+05(*)	(2.72 ± 0.06) E+05	ND	ND	ND (*)
TvGSTO4S	145.90 ± 11.42	(1.80 ± 0.04) E+04	(1.17 ± 0.03) E+05	111.20 ± 10.02	ND	ND
TvGSTO5S	407.50 ± 14.31	(9.67 ± 0.22) E+03	(9.02 ± 0.24) E+03	331.20 ± 9.83	ND	ND
TvGSTO6S	(5.43 ± 0.18) E+03(*)	$(4.65 \pm 0.15)E + 05(*)$	$(8.69 \pm 0.49) E{+}05$	(6.59 ± 0.20) E+03	$179.50 \!\pm\! 6.59$	ND (*)
TvGSTO1C	ND	ND	ND	ND	381.90 ± 43.76	(2.29 ± 0.13) E+04
TvGSTO2C	ND	ND	ND	ND	(4.42 ± 0.17) E+03	(3.74 ± 0.07) E+04
TvGSTO3C	ND	ND	ND	ND	(1.21 ± 0.04) E+04	(4.19 ± 0.13) E+04

Table 1: Kinetic parameters of nine TvGSTO towards six substrates. All values have been obtained from the GraphPad Prism software by using the non-linear regression representation based on the Michaelis-Menten model. The tested substrates are summarized as follow: "CDNB" for 1-chloro-2,4-dinitrobenzene , "PEITC" for phenethyl isothiocyanate, "BEITC" for benzyl isothiocyanate, "CuOOH" for cumene hydroperoxide, "HED" for 2-hydroxyethyl disulfide and "GS-PAP" for glutathionyl-phenylacetophenone. ND means not activity has been detected. The values accompanied of (*) and (γ) have been obtained in previous works (Schwartz et al., 2018 and Perrot et al., *submitted*), respectively. For the other values, all have been determined in this study.

Research and identification of natural ligands

In previous work, we showed that other isoforms of omega class from *Trametes versicolor* (TvGSTOS) interacted with molecules from wood extracts (Deroy *et al.*, 2015a; Schwartz *et al.*, 2018). In order to check this ability for TvGSTO1C, we used a high throughput screening method based on the thermal denaturation of proteins. Our first observation was the difference of denaturation temperature (T_d) between the native and the reduced form of TvGSTO1C (Table S5). At the reduced state, the T_d of TvGSTO1C is decreased of 17,98°C compared to native state suggesting that the tripeptide greatly stabilizes the protein.

The reduced form of TvGSTO1C has been used for investigating the potential interactions towards previously obtained wood extracts (Deroy *et al.*, 2015a; Kebbi-Benkeder *et al.*, 2015). A preliminary screening of the protein against 76 wood extracts from ten wood species has been done (Figure S3, S4 and S5). We observed that wood extracts from oak, cherry-wood, beech and larch increased the T_d of TvGSTO1C whereas wood extracts from sweet chestnut tree destabilized the protein. The thermal effects of wood extracts from pine, spruce, cedar, metasequoia and walnut tree induced both effects (stabilizing and destabilizing) according to the solvent used.

Because oak extractives exhibited stabilizing effects, we focused our attention on the molecules present in oak extractives. It has been showed that polyphenols are found in the chemical composition of oak wood, in particular the presence of flavonoids such as quercetin and catechin (Zhang *et al.*, 2015). We also tested the thermal effects induced by these both compounds in addition of eight other flavonoids (Figure 4). The results showed that three flavonoids: quercetin ($\Delta T_d = + 3.56^{\circ}$ C), chrysin ($\Delta T_d = + 1,35^{\circ}$ C) and naringenin ($\Delta T_d = + 0.54^{\circ}$ C) increased the T_d of TvGSTO1C. The seven other flavonoids induced destabilizing effects on TvGSTO1C in particular scutellarein ($\Delta T_d = - 4.24^{\circ}$ C) and baicalein ($\Delta T_d = - 2.99^{\circ}$ C) (Figure 4A). The thermal responses obtained for TvGSTO2C were similar of TvGSTO1C, excepted that chrysin did not stabilize the protein (Figure 4B). Concerning TvGSTO3C, most of the tested flavonoids stabilized the protein (usually with a ΔT_d which does not exceed +2.00°C) (Figure 4C).



Figure 4: Effects of ten flavonoids on the thermostability of reduced TvGSTOC. The effects of these polyphenols on the reduced forms of TvGSTO1C, TvGSTO2C and TvGSTO3C are represented in (A), (B) and (C) respectively. The tested flavonoids are summarized as follow, « QUER » for quercetin, « CATE » for catechin, « NARE » for naringenin, « NARI » for naringin, « WOSI » for wogonoside, « CHRY » for chrysin, « BAIA » for baicalein, « SCUT » for scutellarein » and « WOGO » for wogonin and « PINO » for pinocembrin.

In vitro coupling of the oxidation and detoxification systems: study of a potential relationship

The proteomic analysis of the exudates produced on malt revealed the presence of enzymes involved in the oxidation system (MnPs, VP, DyP) and also in the detoxification system (TvGSTO1C). From this observation, we investigated the potential relationship between a versatile peroxidase (Prot ID 26239, TvVP2) and the omega glutathione transferases previously characterized (TvGSTO1C, 2C and 3C). In a previous work, we showed that TvVP2 was able to oxidize two flavonoids : quercetin and catechin (Amara, *et al.*, 2018). Within the scope of the first step of activation from the detoxification system, a preliminary incubation of two flavonoids (quercetin and catechin) in presence of TvVP2, hydrogen peroxide (H₂O₂) and glutathione (GSH) has been performed during ten minutes. Then, the reactional mixture was filtrated in order to separate the peroxidase and to stop the reaction. After removing TvVP2 from the reactional mixture, the potential interactions between the reaction products and the three reduced glutathione transferases from *Trametes versicolor* (TvGSTO1-3C) was analysed using a thermal stability assay and fluorescent profile on immobilized protein. During this experiment, we supposed that oxidized molecules are reduced by glutathione and forming glutathionylated compounds or oxidation of glutathione by peroxidase and then glutathionylation (Gelhaye et al., 2006). However, we cannot exclude that an interaction between TvVP2 and glutathione can occur and generate oxidized glutathione. Oxidation of quercetin in the presence of GSH and H_2O_2 by TvVP2 led to compounds stabilizing the three TvGSTOC. Increases of 18.67 °C, 16.67 °C and 20.08 °C of the denaturation temperature were indeed observed for the reduced TvGSTO1C, TvGSTO2C and TvGSTO3C respectively. In contrast, no significant stabilizing effects on the three isoforms were observed when quercetin is replaced by catechin. Nevertheless, we also observed, in the case of TvGSTO1C, that the T_d was significantly increased of 3.39 °C and 2.73 °C by incubation of glutathione and H₂O₂ with quercetin and catechin respectively (Figure 5).



Figure 5: Effects of reaction mixture after filtration of TvVP2 on the thermostability of reduced TvGSTOC. The effects of these mixtures on the reduced form of TvGSTO1C, TvGSTO2C and TvGSTO3C are represented in (A), (B) and (C) respectively. The legends for each reagent are summarized as follow: "QUE": quercetin, "CAT": catechin and "GSH": glutathione. Asterisks (*) means that the thermal effect of the condition is significantly different of the thermal effect of the phosphate buffer. The statistical analyses have been done with the GraphPad Prism software by using the Tukey's multiple comparisons test.

In order to study the potential involvement of the catalytic cysteine, interaction tests including a fluorescent probe, the 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA) have been made on acrylamide gel (Figure 6). In the reduced form, the catalytic cysteine is able to bind CMFDA, allowing a detection after gel migration. In contrast, the oxidation of the cysteine prohibits the interaction with the fluorogenic probe. The compounds (from the mix composed of the quercetin incubated with TvVP2, H_2O_2 and GSH) which stabilized the three TvGSTOC did not cause a decrease of fluorescence suggesting that the cysteine present in the G-site is not involved in the recognition of the reaction products (Figure 6, mix n°5).



Figure 6: Fixation of CMFDA on reduced TvGSTO1-3C in presence of oxidation mixtures after filtrating TvVP2. In (A) are represented the fluorescence signal after excitation with UV via GelDoc. In (B) are represented the presence and the quantity of protein colored by Coomassie blue. The graph (C) represents the level of the fluorescence signal of CMFDA bound to TvGSTO3C in presence of different mixtures which are summarized as follow: "1" with only phosphate buffer, "2" with 80 μ M of PAP-SG, "3" with 2 μ L of mixture containing 60 μ M of quercetin incubated with 100 μ M of H₂O₂ and glutathione (GSH), "4" with 2 μ L of mixture containing 60 μ M of quercetin incubated with 100 μ M of H₂O₂, 100 μ M of GSH and 0.2 μ M of TvVP2.

Discussion

Wood decayers fungi have to deal with complex substrates containing different potential toxic molecules. To deal with these molecules, these fungi have both developed efficient extracellular enzymatic systems and extended intracellular detoxification systems (Morel *et al.*, 2013; Nagy *et al.*, 2017). In this study, we report the ability of *T. versicolor* BRFM 1218 strain to secrete a yellow liquid during its growth on rich medium (malt) and a brown/red liquid during oak wood degradation. We postulate that *T. versicolor* BRFM 1218 secretes exudate droplets in response to environmental stress such as a carbon deficiency and also in presence of potential toxic compounds from wood.

A proteomic analysis revealed, in these exudates, the presence of enzymes involved in extracellular degradation of aromatic molecules including manganese peroxidases and a versatile peroxidase which belong to the class II peroxidases and also a dye-decolorizing peroxidase. These enzymes are able to oxidize a broad variety of substrates (Hofrichter, 2002; Pollegioni et al., 2015a). Moreover, this proteomic analysis confirmed on malt, the presence of proteins belonging to the glutathione/thioredoxin-related systems. These intracellular antioxidant systems are central systems regulating the redox state of the cells (Navrot et al., 2007) and were induced for instance in Phanerochaete chrysosporium in presence of oak extracts (Thuillier et al., 2014a). In the other hand, enzymes involved in the detoxification system have been also detected such as glutathione transferases. Recently, the proteome of Bjerkandera adusta, a white-rot fungus, has been analyzed when the fungus grows on beech sapwood. This proteome was composed of membrane transporters (major facilitator superfamily), sugar-metabolizing protein like carbohydrate-active enzymes (CAZymes), enzymes involved in the detoxification processes: for example cytochrome P450 monooxygenases and glutathione transferases (Moody et al., 2018). In our study, we did not identify cytochromes P450 monooxygenases in the secretomes.

However, five glutathione transferases (GSTs) were detected on exudate produced on malt and one of them was also identified in oak secretome. This GST, named TvGSTO1C belong to the type III omega class. We characterized the biochemical properties of TvGSTO1C. Firstly, the mass spectrometry analysis indicated that the native form of the protein contains a molecule of glutathione linked by a covalent bond. This glutathione confers a higher thermal stability to TvGSTO1C. The presence of glutathione has also been observed for omega glutathione transferases from another white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium* (PcGSTO3 and PcGSTO4) (Meux et al., 2011b ; 2013b). Concerning the functional abilities of TvGSTO1C, this enzyme exhibited thioltransferase and deglutathionylation activities. These activities were also noticed for PcGSTO3 and PcGSTO4 (Meux et al., 2011b ; 2013b). In comparison, TvGSTO1C possesses a lower catalytic constant for the deglutathionylation activity than PcGSTO3 (19 s⁻¹) and PcGSTO4 (180 s⁻¹). Moreover, TvGSTO1C has also a lower thioltransferase activity toward HED compared to PcGSTO3 (16 s⁻¹) and PcGSTO4 (20 s⁻¹).

A high throughput screening method has been used for searching potential ligands for TvGSTO1C. In presence of oak extractives, the denaturation temperature of TvGSTO1C was increased. It's known that flavonoids are found in the chemical composition of oak wood, in particular quercetin and catechin (Zhang *et al.*, 2015). The thermal effect of both flavonoids was tested and the results obtained were different. Indeed, quercetin stabilizes TvGSTO1C whereas catechin decreases the T_d . The stabilising effect of quercetin was also observed for other isoforms of the omega class from *Trametes versicolor* (Schwartz *et al.*, 2018).

In order to mimic the two possible steps (oxidation and conjugation) which could occur in the exudates, we established an enzymatic model based on the combining of the simultaneous action of one versatile peroxidase (TvVP2) and TvGSTO1C. The results showed that the oxidation of quercetin mediated by TvVP2 in presence of H_2O_2 allowed to product electrophilic groups which could undergo a nucleophilic attack from glutathione which produced glutathionylated compounds. These conjugated compounds might be recognized by TvGSTOCs. In plants, it has been showed that some GSTs belonging to the lambda class, are able to recognize glutathionylated quercetin (Dixon, Edwards, 2010c ; Lallement et al., 2014a). Thereafter; it will be interesting to identify the binding site involved in the recognition of the potential glutathionylated compound (either in the H-site or either in the L-site at the dimer interface).

Taking together of these results, we can suggest that TvGSTO1C could at least have two roles in exudates. Firstly, the ability to catalyze deglutathionylation and thioltransferase reactions would confer to TvGSTO1C the ability to regulate the activity of other proteins by changing their redox state (reduction of disulfide bridges and removing glutathionylated groups). Secondly, the ability to interact with wood molecules resulting of the wood degradation and could contribute to the survival of *T. versicolor*.

The white-rot fungus, *Trametes versicolor* has to cope with various extractives (for example polyphenols and terpenes) released during wood degradation. From this study, we suggest that the production of such exudate could be a way for the fungus to complete these detoxification processes allowing extracting and concentrating the potential toxic molecules found in wood. The formation of the mycelial network could be a way to translocate substances within hyphae to dilute them. This mechanism has been particularly well studied in mycorrhizal fungi and also shown for the transport of polycyclic aromatic pollutants (Furuno *et al.*, 2012; Banitz *et al.*, 2013). In this latter case, the toxic molecules are translocated through the fungal hyphae via cytoplasmic streaming (fungal pipelines) (Furuno *et al.*, 2012). This kind of fungal active transport could be also involved in the wood degradation process mediated by white-rot fungi allowing them to remote potential toxic molecules from wood. Further experimental studies are therefore required to confirm this hypothesis.

Experimental procedures

Materials

1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB, 99% MW 202.55), 2-hydroxyethyl disulfide (HED, 95%, MW 154.25) were purchased from Acros Organics (Geel, Belgium). The glutathionylated substrates: glutathionyl-phenylacetophenone (GS-PAP) has been *in vitro* synthesized as previously (Meux et al., 2011b). 1,4-dithiothreitol (DTT) was bought from Euromedex (Souffelweyersheim, France). L-glutathione reduced, phenethyl isothiocyanate (PEITC), benzyl isothiocyanate (BEITC), cumene hydroperoxide (CuOOH), pinocembrin (PINO), scutellarein (SCUT), baicalein (BAIA), chrysin (CHRY), naringenin (NARE), catechin hydrate (CATE), quercetin (QUER), oxyresveratrol (OXYR), naringin (NARI) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Wogonin (WOGO) and wogonoside (WOSI) has been purchased from Extrasynthese (Genay, France) and Abcam (Cambridge, England, United Kingdom) respectively. The tested wood extracts provide from Deroy and collaborators (2015).

Trametes versicolor strain

BRFM1218 was collected from CIRM : Centre International de Ressources Microbiennes – Champignons Filamenteux, Marseille (https://www6.inra.fr/cirm). This strain has been isolated from oak wood and collected in France. The strain was maintained at 25°C on 4% malt agar slants.

Secretome extraction

One month colonized wood blocks were removed carefully from agar plates, the mycelium surrounding wood blocks being excised. The extraction of secretomes was performed by soaking the wood chips in 10 ml of potassium acetate buffer (100 mM pH 4.5) during 15 minutes at room temperature. The obtained secretome was conserved at -20°C before further analysis.

Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis

Scanning electron microscopy (SEM) observations were performed using a Zeiss (LEO) 1450VP scanning microscope equipped with Energy Dispersive spectrometer (EDS) (SDD 80 mm2 X-Max, Oxford Instruments) and Wavelength Dispersive Spectrometer (WDS) (INCA Wave, Oxford Instruments).

Proteomic analysis

Short SDS-PAGE runs (pre-casted 4 to 12% Bis-Tris Mini Gels, Invitrogen, France) were performed, allowing proteins diafiltered from secretomes (15 μ g) to migrate on a 0.5 cm length, and gels were stained with Coomassie blue (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). The electrophoresis lane was cut into two slices of gel (2 mm in width) and protein identification was performed using PAPPSO ("Plate-forme d'Analyse Protéomique de Paris Sud-Ouest") platform facilities.

In-gel digestion was carried out according to a standard trypsinolysis protocol. Gel pieces were washed twice with 50% (v/v) acetonitrile (ACN), 25 mM NH₄CO₃ and incubated in the presence of 10 mM dithiothreitol (DTT) for 1 hour at 56°C. After cooling, the supernatant was removed and the samples were incubated with 55 mM iodoacetamide at room temperature in the dark. Gel plugs were washed with ACN and then dried in a vacuum speed concentrator. Digestion was performed for 8 hours at 37°C with 200 ng of modified trypsin (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) dissolved in 25 mM NH₄CO₃. Tryptic peptides were first extracted with 50% (v/v) ACN, 0.5% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA), and then with pure ACN. Peptide extracts were dried in a vacuum speed concentrator (Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France) and suspended in 25 µL of 2% (v/v) ACN, 0.05% (v/v) TFA and 0.08% (v/v) formic acid. HPLC was performed on a NanoLC-Ultra system (Eksigent, Les Ulis, France). Trypsic digestion products were first concentrated and desalted on a pre-column cartridge (PepMap 100 C18, 0.3×5 mm, Dionex, Thermo Fisher Scientific) with 0.1% HCOOH at 7.5 µL/min-1 for 3 minutes. The pre-column cartridge was connected to the separating column (C18, 0.075×0.15 mm, Biosphere Nanoseparations, Nieuwkoop, The Netherlands) and the peptides were eluted with a linear gradient from 5 to 35% ACN in 0.1% HCOOH for 40 minutes at 300 nL/min-1. On-line analysis of peptides was performed with a Q-exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, United States), using a nanoelectrospray ion source. Ionization (1.8 kV ionization potential) was performed with a stainless steel emitter (30 µm inner diameter, Thermo Electron, Villebon sur Yvette, France). Peptide ions were analyzed using Xcalibur 2.1 (Thermo Scientific, Villebon sur Yvette, France with the following data-dependent acquisition steps: (step 1) full MS scan (mass-to-charge ratio (m/z) 400 to 1,400, resolution 70,000) and (step 2) MS/MS (normalized collision energy =30%, resolution 17,500). Step 2 was repeated for the eight major ions detected in step 1. Dynamic exclusion was set to 40 seconds. The raw mass data were first converted to mzXML format with the ReAdW software (SPC Proteomics Tools, Seattle, USA). Protein identification was performed querying MS/MS data against database from genome sequencing of **Trametes** versicolor FP-101664 **SS1** strain (jgi http://genome.jgi.doe.gov/Trave1/Trave1.home.html), together with an in-house contaminant database, using the X!Tandem software (X!Tandem Cyclone, Jouy en Josas, France) with the following parameters: one trypsin missed cleavage allowed, alkylation of cysteine and conditional oxidation of methionine, precursor and fragment ion set at 2 ppm and 0.005 Da, respectively. A refined search was added with similar parameters except that semi-tryptic peptides, possible N-term acetylation, and histidine mono- and di-methylations were searched. All peptides matched with an E-value lower than 0.05 were parsed with X!Tandem pipeline software. Proteins identified with at least two unique peptides and a log (E-value) lower than -2.6 were validated. A list of proteins and peptides with

masses and log (E-value) is provided in Additional file 2.

Production and purification of proteins

The production in *E.coli* (Rosetta2 DE3 pLysS strain, Novagen) and purification of the nine selected TvGSTOs (accession number in the JGI database: TvGSTO1C: 157166; TvGSTO2C: 67635; TvGSTO3C: 60698; TvGSTO1S: Tv75639; TvGSTO2S: Tv56280; TvGSTO3S: Tv48691; TvGSTO4S: Tv65402; TvGSTO5S: Tv54358 and TvGSTO6S: Tv23671) were performed as explained previously (Deroy *et al.*, 2015b).

Reduction treatment on TvGSTOC

The native His_6 -tagged TvGSTOC were reduced by using 1,4-dithiothreitol (DTT), a reducing agent. An excess of DTT with a concentration ten times more important than the protein was added in a 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA buffer containing the protein. After 2 hours of incubation at room temperature, the reduction reaction mixture was dialyzed in a 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl buffer in order to remove DTT.

Mass spectrometry analysis

Untreated and reduced forms of His₆-tagged TvGSTOC were analyzed by direct introduction by electrospray ionization (ESI).

Oligomeric state identification

The oligomeric state of the untreated and reduced forms of TvGSTOC has been identified by using a fast protein liquid chromatography (FPLC, GE Healthcare, Äkta PurifierTM, Box, pH/C, UV, P-900). An analytical size exclusion chromatography has been done at 10°C (UniEquip, Unichromat 1500) by injecting 200 μ L of proteins (200 – 500 μ g) in an appropriate column (GE Healthcare, SuperdexTM 75 10/300 GL) equilibrated in a 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl buffer with a flow rate of 0.3 mL/min. The experimental masses were obtained with the help of a standard curve.

Determination of free thiol groups

To determine the number of free thiol groups, we used a spectrophotometric method based on the cleavage of the Ellman's Reagent, 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DNTB) allowed by free cysteines. Untreated and reduced forms of TvGSTOC (10 μ M) were incubated with 200 μ M of DTNB in 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, SDS 1% for a final volume of 500 μ L. The reaction mixture is incubated at room temperature during thirty minutes in the dark. After that, the absorbance of each condition was measured at 412 nm. The concentration of TNB, corresponding to the cleavage product of DNTB, was calculated by dividing the absorbance measured with the molar absorption coefficient ($\varepsilon_{TNB} = 13900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Then, the ratio between the concentrations of TNB and protein used were determined in order to obtain the number of free thiol group. For each condition, two replicates have been made.

Determination of the hydrodynamic diameter

The hydrodynamic diameter of untreated and reduced forms for the three His₆-tagged TvGSTOC was monitored using a switchSENSE® DRX-2400 instrument (Dynamic Biosensors GmbH, Planegg, Germany). First, the protein studied is prepared at 500 nM in a 10-mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 40 mM NaCl, 0.05% Tween20, 50 μ M EDTA, and 50 μ M EGTA (PE40 buffer). After that, this solution of protein is injected in the instrument in order to be retained in a MPC-48-2-R1-S biochip. Inside this chip equilibrated in the PE40 buffer, real-time data have been obtain from the motion of His₆-tagged proteins conjugated to DNA. These data were analyzed with a "lollipop" model allowing to give the hydrodynamic diameter (DH) of the protein sphere (for more information, see Langer et al., 2014). The measurements have been performed with four replicates.

Enzymatic activities of the both subclasses toward synthetic substrates

To check the functionality of the recombinant proteins after purification, we performed enzymatic tests for the nine enzymes. For the glutathionylation tests, three susbtrates have been tested: 1-chloro 2,4-dinitrobenzene (CDNB), phenethyl isothiocyanate (PEITC) and benzyl isothiocyanate (BEITC). The measurement of these activities has been done by following the absorbance due to the formation of the glutathionylated product: 340 nm in the case of the CDNB (Habig *et al.*, 1974), and 274 nm for both isothiocyanate compounds. According to the substrate tested, the solution buffer (in a final volume of 500 µL) was different; a 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA buffer in the case of the CDNB assays and a 100 mM phosphate buffer pH 6.4 for the isothiocyanate derivatives tests. All experiments were conducted at 25 °C. Several concentrations of CDNB (500 – 3000 µM), PEITC (25 – 500 µM) and BEITC (25 – 500 µM) were used with a fixed concentration of reduced glutathione of 1 mM added in the reaction mixture, excepted for tests with TvGSTO3S (4 mM).

To check the reductase and the peroxidase activities of the TvGSTOs, several concentrations of 2-hydroxyethyl disulfide (HED, $50 - 2000 \mu$ M) and cumene hydroperoxide (CuOOH, $100 - 2500 \mu$ M) were respectively tested by following the consumption of NADPH (at 340 nm) catalyzed by glutathione reductase. At 25°C, the reaction mixture was composed of a 500 μ L of 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA buffer containing 1 mM of reduced glutathione, 180 μ M of NADPH, 0.5 units of yeast glutathione reductase. For all the experiments above, the analysis of data and the establishing of kinetic parameters have been performed as previously explained (Pégeot et al., 2014b).

Kinetic parameters of the deglutathionylation activity for the nine isoforms towards S-glutathionylphenylacetophenone (PAP-SG) have been performed by using high performance liquid chromatography. These enzymatic tests have been done as previously explained (Lallement et al., 2014a).

Thermal stability assay

These assays were performed as described in Deroy et al. (2015) in 96 well microplates (Harshell, Biorad) and the measurements were carried out using a real time PCR detection system (CFX 96 touch, Biorad). The assays were achieved as follow: 5 µL of Tris-HCl (150 mM) pH 8 buffer, 2 µL of wood extracts (initial concentration of 10 mg/mL) or molecules (initial concentration of 1250 µM) or oxidation reaction products (from the filtered reaction mixture), 5 µL of proteins at a final concentration of 20 µM for TvGSTOC, 2 µL of SYPRO orange previously diluted 80-fold and 11 µL of ultra-pure water for a total volume of 25 μ L per well. The plate was centrifuged 30 seconds at 4000xg. The fluorescence was measured (at excitation at 485 nm and emission at 530 nm) each minute starting with 3 minutes at 5°C and increasing temperature from 5° to 95°C with a step of 1°C per minute. The denaturation temperature (Td), which corresponds to the temperature where 50% of the total fluorescence is measured, was determined by using the non-linear regression Boltzmann sigmoidal model in GraphPad Prism 6 software of the obtained data in presence of potential ligands. For each compound or reaction mixture tested, three replicates have been performed. As reference, similar experiments were conducted adding only dimethyl sulfoxide (DMSO) allowing the determination of T_{dRef} . The thermal shifts (ΔT_d) of the tested condition corresponding to the difference between the obtained T_d and the T_{dRef} were calculated.

Natural plant molecules (catechin and quercetin) oxidation by peroxidases

The potential relationship between peroxidases and glutathione transferases was studied as follows. 60 μ M of flavonoids were incubated for 10 minutes in presence of 0.2 μ M peroxidases, the reaction mixture containing 100 μ M of GSH and 100 μ M of H₂O₂ in 100 mM phosphate buffer pH 5.8. After 10 min of incubation at room temperature, reactional mixtures were filtered by using Centrikons (Amicon®Ultra Centrifugal Filters 0.5 mL 10K, Ultracel) and then used to test their potential effects on glutathione transferases (see below).

Investigation of the binding property of TvGSTOC by using a fluorescent probe

Interaction tests between 5-chloromethylfluorescein diacetate (Green CMFDA® - Invitrogen) and His_{6} -tagged proteins were done by SDS-PAGE described as previously (Meux et al., 2013b) with some modifications. The emission of the fluorescent signal is due to the cleavage of the two esterase linkages. In a final volume of 90 µL composed of 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA buffer, 8 µM of protein, 80 µM of molecules (or 2 µL of oxidation reaction mixture) and 2 µM of green CMFDA® were added in the correct order. Then, the mixture is incubated ten minutes, at room temperature in the dark. After that, 10 µL of the mixture and 10 µL of Laemmli loading buffer were stirred together in order to be dropped in SDS-PAGE. The separation of fluorescent probe bound to the proteins was allowed during the migration. Finally, the decrease of the fluorescence of the probe fixed to the protein was observed by using Geldoc®.

Acknowledgements

This work is 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). The PhD grant of AD is funded by ANR-11-LABX-0002-01. The authors declare that they have no conflict of interest

References

AMARA, Sawsan, PERROT, Thomas, NAVARRO, David, DEROY, Aurélie, BENKHELFALLAH, Amine, CHALAK, Amani, DAOU, Marianne, CHEVRET, Didier, FAULDS, Craig B., BERRIN, Jean Guy, MOREL-ROUHIER, Mélanie, GELHAYE, Eric et RECORD, Eric, 2018. Enzyme activities of two recombinant heme-including peroxidases TvDyP1 and TvVP2 identified from the secretome of Trametes versicolor. In : Applied and Environmental Microbiology. 16 février 2018. p. AEM.02826-17. DOI 10.1128/AEM.02826-17.

BANITZ, Thomas, JOHST, Karin, WICK, Lukas Y., SCHAMFUß, Susan, HARMS, Hauke et FRANK, Karin, 2013. Highways versus pipelines: contributions of two fungal transport mechanisms to efficient bioremediation. In : Environmental Microbiology Reports. avril 2013. Vol. 5, n° 2, p. 211-218. DOI 10.1111/1758-2229.12002.

BENNATI-GRANIER, Chloé, GARAJOVA, Sona, CHAMPION, Charlotte, GRISEL, Sacha, HAON, Mireille, ZHOU, Simeng, FANUEL, Mathieu, ROPARTZ, David, ROGNIAUX, Hélène, GIMBERT, Isabelle, RECORD, Eric et BERRIN, Jean-Guy, 2015. Substrate specificity and regioselectivity of fungal AA9 lytic polysaccharide monooxygenases secreted by Podospora anserina. In : Biotechnology for Biofuels. 2015. Vol. 8, p. 90. DOI 10.1186/s13068-015-0274-3.

BOIVIN, Stephane, KOZAK, Sandra et MEIJERS, Rob, 2013. Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens. In : Protein Expression and Purification. octobre 2013. Vol. 91, n° 2, p. 192-206. DOI 10.1016/j.pep.2013.08.002.

DEROY, Aurélie, SAIAG, Fanny, KEBBI-BENKEDER, Zineb, TOUAHRI, Nassim, HECKER, Arnaud, MOREL-ROUHIER, Mélanie, COLIN, Francis, DUMARCAY, Stephane, GÉRARDIN, Philippe et GELHAYE, Eric, 2015. The GSTome Reflects the Chemical Environment of White-Rot Fungi. In : PloS One. 2015. Vol. 10, n° 10, p. e0137083. DOI 10.1371/journal.pone.0137083.

DOUSSOT, Franck, DE JÉSO, Bernard, QUIDEAU, Stéphane et PARDON, Patrick, 2002. Extractives content in cooperage oak wood during natural seasoning and toasting; influence of tree species, geographic location, and single-tree effects. In : Journal of Agricultural and Food Chemistry. 9 octobre 2002. Vol. 50, n° 21, p. 5955-5961.

EASTWOOD, Daniel C., FLOUDAS, Dimitrios, BINDER, Manfred, MAJCHERCZYK, Andrzej, SCHNEIDER, Patrick, AERTS, Andrea, ASIEGBU, Fred O., BAKER, Scott E., BARRY, Kerrie, BENDIKSBY, Mika, BLUMENTRITT, Melanie, COUTINHO, Pedro M., CULLEN, Dan, DE VRIES, Ronald P., GATHMAN, Allen, GOODELL, Barry, HENRISSAT, Bernard, IHRMARK, Katarina, KAUSERUD, Hävard, KOHLER, Annegret, LABUTTI, Kurt, LAPIDUS, Alla, LAVIN, José L., LEE, Yong-Hwan, LINDQUIST, Erika, LILLY, Walt, LUCAS, Susan, MORIN, Emmanuelle, MURAT, Claude, OGUIZA, José A., PARK, Jongsun, PISABARRO, Antonio G., RILEY, Robert, ROSLING, Anna, SALAMOV, Asaf, SCHMIDT, Olaf, SCHMUTZ, Jeremy, SKREDE, Inger, STENLID, Jan, WIEBENGA, Ad, XIE, Xinfeng, KÜES, Ursula, HIBBETT, David S., HOFFMEISTER, Dirk, HÖGBERG, Nils, MARTIN, Francis, GRIGORIEV, Igor V. et

WATKINSON, Sarah C., 2011. The plant cell wall-decomposing machinery underlies the functional diversity of forest fungi. In : Science (New York, N.Y.). 5 août 2011. Vol. 333, n° 6043, p. 762-765. DOI 10.1126/science.1205411.

FLOUDAS, Dimitrios, BINDER, Manfred, RILEY, Robert, BARRY, Kerrie, BLANCHETTE, Robert A., HENRISSAT, Bernard, MARTÍNEZ, Angel T., OTILLAR, Robert, SPATAFORA, Joseph W., YADAV, Jagjit S., AERTS, Andrea, BENOIT, Isabelle, BOYD, Alex, CARLSON, Alexis, COPELAND, Alex, COUTINHO, Pedro M., DE VRIES, Ronald P., FERREIRA, Patricia, FINDLEY, Keisha, FOSTER, Brian, GASKELL, Jill, GLOTZER, Dylan, GÓRECKI, Paweł, HEITMAN, Joseph, HESSE, Cedar, HORI, Chiaki, IGARASHI, Kiyohiko, JURGENS, Joel A., KALLEN, Nathan, KERSTEN, Phil, KOHLER, Annegret, KÜES, Ursula, KUMAR, T. K. Arun, KUO, Alan, LABUTTI, Kurt, LARRONDO, Luis F., LINDQUIST, Erika, LING, Albee, LOMBARD, Vincent, LUCAS, Susan, LUNDELL, Taina, MARTIN, Rachael, MCLAUGHLIN, David J., MORGENSTERN, Ingo, MORIN, Emanuelle, MURAT, Claude, NAGY, Laszlo G., NOLAN, Matt, OHM, Robin A., PATYSHAKULIYEVA, Aleksandrina, ROKAS, Antonis, RUIZ-DUEÑAS, Francisco J., SABAT, Grzegorz, SALAMOV, Asaf, SAMEJIMA, Masahiro, SCHMUTZ, Jeremy, SLOT, Jason C., ST JOHN, Franz, STENLID, Jan, SUN, Hui, SUN, Sheng, SYED, Khajamohiddin, TSANG, Adrian, WIEBENGA, Ad, YOUNG, Darcy, PISABARRO, Antonio, EASTWOOD, Daniel C., MARTIN, Francis, CULLEN, Dan, GRIGORIEV, Igor V. et HIBBETT, David S., 2012. The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. In : Science (New York, N.Y.). 29 juin 2012. Vol. 336, n° 6089, p. 1715-1719. DOI 10.1126/science.1221748.

FURUNO, Shoko, FOSS, Susan, WILD, Ed, JONES, Kevin C., SEMPLE, Kirk T., HARMS, Hauke et WICK, Lukas Y., 2012. Mycelia Promote Active Transport and Spatial Dispersion of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In : Environmental Science & Technology. 2012. Vol. 46, n° 10, p. 5463-5470. DOI 10.1021/es300810b.

HABIG, W. H., PABST, M. J. et JAKOBY, W. B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. In : The Journal of Biological Chemistry. 25 novembre 1974. Vol. 249, n° 22, p. 7130-7139.

HERVÉ, Vincent, KETTER, Elodie, PIERRAT, Jean-Claude, GELHAYE, Eric et FREY-KLETT, Pascale, 2016. Impact of Phanerochaete chrysosporium on the Functional Diversity of Bacterial Communities Associated with Decaying Wood. In : PLoS ONE [en ligne]. 29 janvier 2016. Vol. 11, n° 1. [Consulté le 6 mars 2018]. DOI 10.1371/journal.pone.0147100. Disponible à l'adresse : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4732817/.

HERVÉ, Vincent, LE ROUX, Xavier, UROZ, Stéphane, GELHAYE, Eric et FREY-KLETT, Pascale, 2014. Diversity and structure of bacterial communities associated with Phanerochaete chrysosporium during wood decay. In : Environmental Microbiology. juillet 2014. Vol. 16, n° 7, p. 2238-2252. DOI 10.1111/1462-2920.12347.

HOFRICHTER, Martin, 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). In : Enzyme and Microbial Technology. 16 avril 2002. Vol. 30, n° 4, p. 454-466. DOI 10.1016/S0141-0229(01)00528-2.

HORI, Chiaki, ISHIDA, Takuya, IGARASHI, Kiyohiko, SAMEJIMA, Masahiro, SUZUKI, Hitoshi, MASTER, Emma, FERREIRA, Patricia, RUIZ-DUEÑAS, Francisco J., HELD, Benjamin, CANESSA, Paulo, LARRONDO, Luis F., SCHMOLL, Monika, DRUZHININA, Irina S., KUBICEK, Christian P., GASKELL, Jill A., KERSTEN, Phil, JOHN, Franz St, GLASNER, Jeremy, SABAT, Grzegorz, BONDURANT, Sandra Splinter, SYED, Khajamohiddin, YADAV, Jagjit,

MGBEAHURUIKE, Anthony C., KOVALCHUK, Andriy, ASIEGBU, Fred O., LACKNER, Gerald, HOFFMEISTER, Dirk, RENCORET, Jorge, GUTIÉRREZ, Ana, SUN, Hui, LINDQUIST, Erika, BARRY, Kerrie, RILEY, Robert, GRIGORIEV, Igor V., HENRISSAT, Bernard, KÜES, Ursula, BERKA, Randy M., MARTÍNEZ, Angel T., COVERT, Sarah F., BLANCHETTE, Robert A. et CULLEN, Daniel, 2014. Analysis of the Phlebiopsis gigantea Genome, Transcriptome and Secretome Provides Insight into Its Pioneer Colonization Strategies of Wood. In : PLOS Genetics. 4 décembre 2014. Vol. 10, n° 12, p. e1004759. DOI 10.1371/journal.pgen.1004759.

KEBBI-BENKEDER, Zineb, COLIN, Francis, DUMARÇAY, Stéphane et GÉRARDIN, Philippe, 2015. Quantification and characterization of knotwood extractives of 12 European softwood and hardwood species. In : Annals of Forest Science. 1 mars 2015. Vol. 72, n° 2, p. 277-284. DOI 10.1007/s13595-014-0428-7.

KIRKER, G. T., BLODGETT, A. B., ARANGO, R. A., LEBOW, P. K. et CLAUSEN, C. A., 2013. The role of extractives in naturally durable wood species. In : International Biodeterioration & Biodegradation. 1 août 2013. Vol. 82, p. 53-58. DOI 10.1016/j.ibiod.2013.03.007.

LALLEMENT, Pierre-Alexandre, MEUX, Edgar, GUALBERTO, José M., PROSPER, Pascalita, DIDIERJEAN, Claude, SAUL, Frederick, HAOUZ, Ahmed, ROUHIER, Nicolas et HECKER, Arnaud, 2014. Structural and enzymatic insights into Lambda glutathione transferases from Populus trichocarpa, monomeric enzymes constituting an early divergent class specific to terrestrial plants. In : The Biochemical Journal. 15 août 2014. Vol. 462, n° 1, p. 39-52. DOI 10.1042/BJ20140390.

LEKOUNOUGOU, Serge, JACQUOT, Jean-Pierre, GÉRARDIN, Philippe et GELHAYE, Eric, 2008. Effects of propiconazole on extra-cellular enzymes involved in nutrient mobilization during Trametes versicolor wood colonization. In : Wood Science and Technology. 1 février 2008. Vol. 42, n° 2, p. 169-177. DOI 10.1007/s00226-007-0158-1.

MASAI, Eiji, ICHIMURA, Atsushi, SATO, Yusuke, MIYAUCHI, Keisuke, KATAYAMA, Yoshihiro et FUKUDA, Masao, 2003. Roles of the enantioselective glutathione S-transferases in cleavage of beta-aryl ether. In : Journal of Bacteriology. mars 2003. Vol. 185, n° 6, p. 1768-1775.

MATHIEU, Yann, PROSPER, Pascalita, FAVIER, Frédérique, HARVENGT, Luc, DIDIERJEAN, Claude, JACQUOT, Jean-Pierre, MOREL-ROUHIER, Mélanie et GELHAYE, Eric, 2013. Diversification of fungal specific class a glutathione transferases in saprotrophic fungi. In : PloS One. 2013. Vol. 8, n° 11, p. e80298. DOI 10.1371/journal.pone.0080298.

MEUX, Edgar, MOREL, Mélanie, LAMANT, Tiphaine, GÉRARDIN, Philippe, JACQUOT, Jean-Pierre, DUMARÇAY, Stéphane et GELHAYE, Eric, 2013. New substrates and activity of Phanerochaete chrysosporium Omega glutathione transferases. In : Biochimie. février 2013. Vol. 95, n° 2, p. 336-346. DOI 10.1016/j.biochi.2012.10.003.

MEUX, Edgar, PROSPER, Pascalita, MASAI, Eiji, MULLIERT, Guillermo, DUMARÇAY, Stéphane, MOREL, Mélanie, DIDIERJEAN, Claude, GELHAYE, Eric et FAVIER, Frédérique, 2012. Sphingobium sp. SYK-6 LigG involved in lignin degradation is structurally and biochemically related to the glutathione transferase ω class. In : FEBS letters. 16 novembre 2012. Vol. 586, n° 22, p. 3944-3950. DOI 10.1016/j.febslet.2012.09.036.

MEUX, Edgar, PROSPER, Pascalita, NGADIN, Andrew, DIDIERJEAN, Claude, MOREL, Mélanie, DUMARÇAY, Stéphane, LAMANT, Tiphaine, JACQUOT, Jean-Pierre, FAVIER, Frédérique et GELHAYE, Eric, 2011. Glutathione transferases of Phanerochaete chrysosporium: S-glutathionyl-p-

hydroquinone reductase belongs to a new structural class. In : The Journal of Biological Chemistry. 18 mars 2011. Vol. 286, n° 11, p. 9162-9173. DOI 10.1074/jbc.M110.194548.

MOODY, S. C., DUDLEY, E., HISCOX, J., BODDY, L. et EASTWOOD, D. C., 2018. Interdependence of Primary Metabolism and Xenobiotic Mitigation Characterizes the Proteome of Bjerkandera adusta during Wood Decomposition. In : Applied and Environmental Microbiology [en ligne]. 2 janvier 2018. Vol. 84, n° 2. [Consulté le 21 juin 2018]. DOI 10.1128/AEM.01401-17. Disponible à l'adresse : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5752865/.

MOREL, Mélanie, KOHLER, Annegret, MARTIN, Francis, GELHAYE, Eric et ROUHIER, Nicolas, 2008. Comparison of the thiol-dependent antioxidant systems in the ectomycorrhizal Laccaria bicolor and the saprotrophic Phanerochaete chrysosporium. In : The New Phytologist. 2008. Vol. 180, n° 2, p. 391-407. DOI 10.1111/j.1469-8137.2008.02498.x.

MOREL, Mélanie, MEUX, Edgar, MATHIEU, Yann, THUILLIER, Anne, CHIBANI, Kamel, HARVENGT, Luc, JACQUOT, Jean-Pierre et GELHAYE, Eric, 2013. Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi. In : Microbial biotechnology. mai 2013. Vol. 6, n° 3, p. 248-263. DOI 10.1111/1751-7915.12015.

NAGY, László G., RILEY, Robert, BERGMANN, Philip J., KRIZSÁN, Krisztina, MARTIN, Francis M., GRIGORIEV, Igor V., CULLEN, Dan et HIBBETT, David S., 2017. Genetic Bases of Fungal White Rot Wood Decay Predicted by Phylogenomic Analysis of Correlated Gene-Phenotype Evolution. In : Molecular Biology and Evolution. janvier 2017. Vol. 34, n° 1, p. 35-44. DOI 10.1093/molbev/msw238.

NAVROT, Nicolas, ROUHIER, Nicolas, GELHAYE, Eric et JEAN-PIERRE, Jacquot, [sans date]. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. In : Physiologia Plantarum. Vol. 129, n° 1, p. 185-195. DOI 10.1111/j.1399-3054.2006.00777.x.

PÉGEOT, Henri, KOH, Cha San, PETRE, Benjamin, MATHIOT, Sandrine, DUPLESSIS, Sébastien, HECKER, Arnaud, DIDIERJEAN, Claude et ROUHIER, Nicolas, 2014. The poplar Phi class glutathione transferase: expression, activity and structure of GSTF1. In : Frontiers in Plant Science [en ligne]. 23 décembre 2014. Vol. 5. [Consulté le 19 juin 2018]. DOI 10.3389/fpls.2014.00712. Disponible à l'adresse : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4274894/.

PIETARINEN, Suvi P., WILLFÖR, Stefan M., VIKSTRÖM, Frank A. et HOLMBOM, Bjarne R., 2006. Aspen Knots, a Rich Source of Flavonoids. In : Journal of Wood Chemistry and Technology. 2006. Vol. 26, n° 3, p. 245-258. DOI 10.1080/02773810601023487.

POLLEGIONI, Loredano, TONIN, Fabio et ROSINI, Elena, 2015. Lignin-degrading enzymes. In : The FEBS journal. avril 2015. Vol. 282, n° 7, p. 1190-1213. DOI 10.1111/febs.13224.

PRIDA, Andrei, DUCOUSSO, Alexis, PETIT, Rémy J., NEPVEU, Gérard et PUECH, Jean-Louis, 2007. Variation in wood volatile compounds in a mixed oak stand: strong species and spatial differentiation in whisky-lactone content. In : Annals of Forest Science. 1 janvier 2007. Vol. 64, n° 3, p. 313-320. DOI 10.1051/forest:2007008.

RILEY, Robert, SALAMOV, Asaf A., BROWN, Daren W., NAGY, Laszlo G., FLOUDAS, Dimitrios, HELD, Benjamin W., LEVASSEUR, Anthony, LOMBARD, Vincent, MORIN, Emmanuelle, OTILLAR, Robert, LINDQUIST, Erika A., SUN, Hui, LABUTTI, Kurt M., SCHMUTZ, Jeremy, JABBOUR, Dina, LUO, Hong, BAKER, Scott E., PISABARRO, Antonio G., WALTON, Jonathan D., BLANCHETTE, Robert A., HENRISSAT, Bernard, MARTIN, Francis, CULLEN, Dan, HIBBETT, David S. et GRIGORIEV, Igor V., 2014. Extensive sampling of

basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. In : Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 8 juillet 2014. Vol. 111, n° 27, p. 9923-9928. DOI 10.1073/pnas.1400592111.

RORET, Thomas, THUILLIER, Anne, FAVIER, Frédérique, GELHAYE, Eric, DIDIERJEAN, Claude et MOREL-ROUHIER, Mélanie, 2015. Evolutionary divergence of Ure2pA glutathione transferases in wood degrading fungi. In : Fungal genetics and biology: FG & B. octobre 2015. Vol. 83, p. 103-112. DOI 10.1016/j.fgb.2015.09.002.

ROYER, Mariana, HERBETTE, Gaëtan, EPARVIER, Véronique, BEAUCHÊNE, Jacques, THIBAUT, Bernard et STIEN, Didier, 2010. Secondary metabolites of Bagassa guianensis Aubl. wood: a study of the chemotaxonomy of the Moraceae family. In : Phytochemistry. octobre 2010. Vol. 71, n° 14-15, p. 1708-1713. DOI 10.1016/j.phytochem.2010.06.020.

SCHWARTZ, Mathieu, PERROT, Thomas, AUBERT, Emmanuel, DUMARÇAY, Stéphane, FAVIER, Frédérique, GÉRARDIN, Philippe, MOREL-ROUHIER, Mélanie, MULLIERT, Guillermo, SAIAG, Fanny, DIDIERJEAN, Claude et GELHAYE, Eric, 2018. Molecular recognition of wood polyphenols by phase II detoxification enzymes of the white rot Trametes versicolor. In : Scientific Reports. 31 mai 2018. Vol. 8, n° 1, p. 8472. DOI 10.1038/s41598-018-26601-3.

TACHIBANA, Tsuyoshi, OKAZAKI, Shoko, MURAYAMA, Asako, NAGANUMA, Akira, NOMOTO, Akio et KUGE, Shusuke, 2009. A major peroxiredoxin-induced activation of Yap1 transcription factor is mediated by reduction-sensitive disulfide bonds and reveals a low level of transcriptional activation. In : The Journal of Biological Chemistry. 13 février 2009. Vol. 284, n° 7, p. 4464-4472. DOI 10.1074/jbc.M807583200.

THUILLIER, Anne, CHIBANI, Kamel, BELLI, Gemma, HERRERO, Enrique, DUMARÇAY, Stéphane, GÉRARDIN, Philippe, KOHLER, Annegret, DEROY, Aurélie, DHALLEINE, Tiphaine, BCHINI, Raphael, JACQUOT, Jean-Pierre, GELHAYE, Eric et MOREL-ROUHIER, Mélanie, 2014. Transcriptomic Responses of Phanerochaete chrysosporium to Oak Acetonic Extracts: Focus on a New Glutathione Transferase. In : Applied and Environmental Microbiology. octobre 2014. Vol. 80, n° 20, p. 6316-6327. DOI 10.1128/AEM.02103-14.

THUILLIER, Anne, NGADIN, Andrew A., THION, Cécile, BILLARD, Patrick, JACQUOT, Jean-Pierre, GELHAYE, Eric et MOREL, Mélanie, 2011. Functional diversification of fungal glutathione transferases from the ure2p class. In : International Journal of Evolutionary Biology. 2011. Vol. 2011, p. 938308. DOI 10.4061/2011/938308.

VALETTE, Nicolas, PERROT, Thomas, SORMANI, Rodnay, GELHAYE, Eric et MOREL-ROUHIER, Mélanie, 2017. Antifungal activities of wood extractives. In : Fungal Biology Reviews. 1 juin 2017. Vol. 31, n° 3, p. 113-123. DOI 10.1016/j.fbr.2017.01.002.

ZHANG, Bo, CAI, Jian, DUAN, Chang-Qing, REEVES, Malcolm J. et HE, Fei, 2015. A review of polyphenolics in oak woods. In : International Journal of Molecular Sciences. 27 mars 2015. Vol. 16, n° 4, p. 6978-7014. DOI 10.3390/ijms16046978.

Supporting Information

Supplemental tables:

Table S1: The most 200 abundant proteins detected in BRFM1218 exsudate produced on malt.

Table S2: All proteins detected in BRFM1218 exsudate produced on beech wood blocks.

Table S3: All proteins detected in BRFM1218 exsudate produced on beech wood blocks.

Table S4: Biochemical characterization (mass, oligomerization state, thiol titration andhydrodynamic diameter) of the three TvGSTOC.

Table S5: Denaturation temperatures of native and reduced TvGSTOC.

Supplemental figures:

Figure S1: Sequence alignment of Trametes versicolor GSTOs.

Figure S2: Chemical structures of the tested substrates.

Figure S3: Thermal effect of wood extracts from oak, beech, walnut tree and cherry-wood on the reduced form of TvGSTO1C (n=1).

Figure S4: Thermal effect of wood extracts from pine, spruce and cedar on the reduced form of TvGSTO1C (n=1).

Figure S5: Thermal effect of wood extracts from metasequoia, larch and sweet chestnut tree on the reduced form of TvGSTO1C (n=1).

Table S1: The most 200 abundant proteins detected in BRFM1218 exsudate produced on malt. Values correspond to the number of identified peptides corresponding to the protein. Prot ID and annotations are those retrieved from *Trametes versicolor* genome v1.0 at the JGI (Floudas et al., 2012). Fungal peroxidases, carbohydrate-active enzymes, enzymes involved in the antioxidant system (including glutathione reductase, peroxiredoxins, NADPH thioredoxin reductase, catalase and a manganese/iron superoxide dismutase) and glutathione transferases are represented in blue, red, green and orange respectively.

Prot ID	Malt	Prot ID	Malt	Prot ID	Malt	Prot ID	Malt
116268	23,00	175547	1,11	83701	0,71	19453	0,50
48870	15,65	145953	1,10	50621	0,70	27966	0,50
28335	13,00	140830	1,08	30524	0,70	40216	0,50
103761	9,00	111754	1,05	30435	0,69	74732	0,50
30879	6,00	127790	1,05	39965	0,67	72201	0,49
31823	6,00	28848	1,00	70662	0,67	171192	0,48
31361	4,67	138138	1,00	67924	0,67	151427	0,46
58033	3,74	66045	1,00	67879	0,67	140546	0,45
62730	3,50	75494	1,00	51457	0,67	159764	0,45
25402	3,17	61229	1,00	131341	0,67	161508	0,45
74079	2,75	131501	1,00	156677	0,67	154147	0,44
51375	2,71	56791	1,00	173910	0,67	175557	0,44
134721	2,60	30460	1,00	27785	0,67	48305	0,44
29347	2,20	60144	1,00	134738	0,67	110904	0,44
56391	2,16	131793	1,00	149895	0,67	175105	0,44
27040	2,14	175708	1,00	25580	0,67	27783	0,43
37024	2,12	48874	0,94	168632	0,63	155564	0,43
110860	2,08	174308	0,94	120979	0,62	55703	0,42
144610	2,06	138905	0,92	144865	0,60	112899	0,42
104903	2,00	37734	0,92	49760	0,60	110969	0,41
69085	2,00	51455	0,90	56726	0,60	25565	0,41
159574	1,90	161547	0.89	59914	0,59	143650	0,40
157325	1,90	127171	0,88	132011	0,59	127854	0,40
144893	1,79	54963	0,86	115397	0,59	48947	0,40
30997	1,75	129038	0,86	46261	0,58	42584	0,39
28124	1,75	138540	0,86	156571	0,58	39070	0,38
156281	1,71	172435	0,86	30712	0,58	72991	0,38
64339	1,67	157166	0,83	127754	0,57	121275	0,38
23498	1,67	117177	0,82	29244	0,57	57372	0,38
170938	1,67	73474	0,82	40820	0,56	69261	0,38
141481	1,55	48950	0,82	117926	0,56	175614	0,38
26239	1,50	33990	0,80	73456	0,56	27714	0,38
42128	1,50	35090	0,80	158002	0,55	68145	0,38
173225	1,50	28155	0,79	109956	0,55	22021	0,38
62807	1,50	53846	0,76	122574	0,54	109828	0,38
172472	1,47	36446	0,76	34882	0,54	26923	0,38
152398	1,45	75316	0,76	52212	0,53	66190	0,38
37357	1,43	68175	0,75	68834	0,53	26323	0,37
52130	1,40	37188	0,75	158425	0,53	41392	0,36
44897	1,36	171442	0,75	45289	0,53	130016	0,36
151588	1,29	115416	0,75	159926	0,50	60477	0,36
130108	1,29	68124	0,75	68341	0,50	134358	0,36
130496	1,27	167196	0,75	40812	0,50	142126	0,35
131080	1,27	34683	0,73	46654	0,50	116333	0,35
151784	1,19	126658	0,73	173513	0,50	147958	0,35
28580	1,18	112835	0,71	29538	0,50	26150	0,35
144202	1,18	111924	0,71	110183	0,50	172835	0,35
63826	1,17	158931	0,71	114667	0,50	32323	0,33
52976	1,17	115186	0,71	153771	0,50	58222	0,33
174166	1,12	145964	0,71	158451	0,50	33707	0,33
(1-5	50)	(51-1	(00)	(101-	150)	(151-2	200)

Table S2: All proteins detected in BRFM1218 exsudate produced on beech wood blocks. Values correspond to the number of identified peptides corresponding to the protein. Prot ID and annotations are those retrieved from *Trametes versicolor* genome v1.0 at the JGI (Floudas et al., 2012). Fungal peroxidases, carbohydrate-active enzymes, laccases and glutathione transferases are represented in blue, red, pink and orange respectively.

Prot ID	Oak	Prot ID	Oak	Prot ID	Oak	Prot ID	Oak	Prot ID	Oak
116268	7,00	75494	0,94	52130	0,40	50621	0,20	174721	0,08
28335	6,00	144893	0,93	147827	0,40	40812	0,20	36519	0,08
63826	5,67	112899	0,92	40820	0,39	134226	0,20	148659	0,08
110790	3,83	28580	0,91	39070	0,38	74031	0,20	118266	0,07
31361	3,67	118183	0,89	140830	0,38	42128	0,20	175022	0,07
143379	3,50	144202	0,88	133945	0,38	49760	0,20	47993	0,07
33056	3,25	69348	0,86	40186	0,38	40829	0,20	133552	0,06
124366	3,15	138138	0,82	111754	0,37	55174	0,20	55634	0,04
48870	3,05	147958	0,78	161547	0,37	51497	0,18	144610	0,03
134721	2,60	66045	0,78	54134	0,36	26555	0,18		
125941	2,53	120979	0,77	148125	0,36	48874	0,18		
168018	2,50	68175	0,75	69742	0,35	132011	0,18		
112163	2,36	27714	0,75	53846	0,35	159926	0,17		
30879	2,00	127754	0,71	43877	0,33	175557	0,17		
141077	2,00	110860	0,71	147020	0,33	57337	0,17		
150608	2,00	143650	0,70	151588	0,33	157166	0,17		
31823	2,00	173904	0,69	62247	0,33	45289	0,16		
103761	2,00	35444	0,68	68557	0,33	70471	0,15		
29435	2,00	23498	0.67	33707	0.33	134657	0,14		
166188	1,77	73474	0,64	48717	0.31	72294	0,14		
38102	1,70	175614	0,63	60477	0,29	113847	0,14		
58222	1,67	122574	0,62	129038	0,29	48030	0,14		
115295	1,60	72935	0.60	19288	0,29	67879	0,14		
37357	1,57	104903	0,60	153507	0,29	138540	0,14		
162601	1,57	37188	0.58	109109	0,28	44897	0,14		
39742	1,50	68023	0,57	176097	0,28	158931	0,14		
46975	1.43	141481	0.55	126658	0.27	119513	0,14		
141321	1,40	170938	0.52	158002	0,27	41392	0,14		
138261	1,33	26239	0,50	164045	0,27	24492	0,13		
172472	1,32	68341	0,50	55703	0,26	49304	0,13		
59914	1,29	114132	0,50	39965	0,25	47232	0,13		
66957	1,29	68145	0,50	51004	0,25	32193	0,13		
54963	1,29	162729	0,50	36998	0,25	68124	0,13		
37024	1,27	131501	0,47	40281	0,25	30460	0,13		
62730	1,25	146232	0,46	171442	0,25	160067	0,12		
161823	1,25	127171	0,46	74079	0,25	47314	0,12		
161949	1,25	69055	0,45	169734	0,25	73047	0,11		
45192	1,25	168624	0,44	30997	0,25	43576	0,11		
29347	1,20	174308	0,44	43289	0,25	74666	0,11		
70662	1,17	130597	0,43	91869	0,25	166451	0,11		
58033	1,15	27131	0,43	169073	0,25	154838	0,11		
159574	1,10	111924	0,43	56085	0,25	26323	0,11		
145953	1,10	115416	0,42	110969	0,24	70376	0,10		
30524	1,10	57902	0,42	61229	0,23	173225	0,10		
136431	1,00	174508	0,41	72567	0,23	34683	0,09		
25402	1,00	174166	0,41	151427	0,23	113984	0,09		
133420	1,00	43578	0,40	154147	0,22	130016	0,09		
151848	1,00	52416	0,40	121791	0,22	43477	0,08		
32323	1,00	144865	0,40	116129	0,21	47351	0,08		
69085	1,00	75316	0,40	35683	0,21	175476	0,08		
(1-5	0)	(51-10)0)	(101-15	5 <i>0</i>)	(151	-200)	(201-209))
Table S3: All proteins detected in BRFM1218 exsudate produced on beech wood blocks. Values correspond to the number of identified peptides corresponding to the protein. Prot ID and annotations are those retrieved from *Trametes versicolor* genome v1.0 at the JGI (Floudas et al., 2012). Fungal peroxidases, carbohydrate-active enzymes, and a catalase are represented in blue, red and green respectively.

Prot ID	Beech						
62539	7,00	36519	0,54	43477	0,17	176097	0,06
33056	3,75	52976	0,50	114132	0,17	55703	0,05
30879	3,00	159574	0,50	174721	0,16	46679	0,05
116268	3,00	26239	0,50	131501	0,16	39578	0,05
134721	2,80	67924	0,50	111754	0,16	133452	0,05
103761	2,50	112170	0,50	161547	0,16	61500	0,05
29435	2,50	173513	0,50	135882	0,15	110860	0,04
173904	2,15	37357	0,43	148659	0,15	58816	0,04
38102	2,10	69742	0,41	51497	0,15		
162601	1,86	125941	0,40	69348	0,14		
32323	1,67	151848	0,40	54963	0,14		
112163	1,64	104903	0,40	113847	0,14		
62730	1,50	109880	0,40	126828	0,14		
40186	1,38	159926	0,33	138540	0,14		
31361	1,33	168624	0,33	128133	0,14		
63826	1,25	66045	0,33	131096	0,14		
136117	1,25	23498	0,33	121678	0,14		
70662	1,17	58222	0,33	19288	0,14		
112899	1,17	175557	0,33	144865	0,13		
25402	1,17	62247	0,33	147020	0,13		
45192	1,13	159607	0,33	110730	0,13		
48870	1,10	172472	0,32	33948	0,13		
166188	1,08	48717	0,31	160067	0,12		
136431	1,00	144202	0,29	59914	0,12		
28848	1,00	134657	0,29	58033	0,11		
54134	1,00	60477	0,29	121791	0,11		
28335	1,00	48030	0,29	56391	0,11		
89076	1,00	129038	0,29	50621	0,10		
143379	1,00	127754	0,29	145953	0,10		
175614	1,00	138138	0,27	74031	0,10		
110790	0,96	161823	0,25	130496	0,09		
150608	0,75	39742	0,25	131080	0,09		
147958	0,74	168018	0,25	69055	0,09		
66957	0,71	173225	0,25	28580	0,09		
30524	0,70	144610	0,23	148125	0,09		
114944	0,67	133326	0,22	57215	0,09		
133731	0,67	141321	0,20	130597	0,09		
109109	0,67	72935	0,20	27783	0,09		
43877	0,67	118266	0,20	51457	0,08		
64339	0,67	27303	0,20	75316	0,08		
133420	0,67	175022	0,20	61229	0,08		
37024	0,65	40812	0,20	170635	0,08		
144893	0,64	52130	0,20	154838	0,07		
124366	0,62	152398	0,20	130750	0,07		
29347	0,60	140767	0,20	44897	0,07		
75025	0,60	117805	0,19	116129	0,07		
47480	0,60	141481	0,18	61724	0,07		
39965	0,58	174508	0,18	174308	0,06		
46975	0,57	26150	0,17	141168	0,06		
154147	0,56	52333	0,17	30435	0,06		
(1-5	50)	(51-1	100)	(101-	150)	(150-	158)

Table S4: Biochemical characterization of the three TvGSTOC. (A) Mass of native and reduced forms for the three TvGSTOC. The term « mass expected » corresponds to the theoretical mass given by the ExPASy ProtParam tool. (B) Mass of native and reduced forms of TvGSTOC after their size-exclusion chromatography. (C) Thiol titration results for TvGSTOC. The thiol titration has been done in a 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, SDS 1% buffer with 10 μ M of protein. (D) Determination of the hydrodynamic diameter of the three TvGSTOC. All of these measurements have been done in a 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 40 mM NaCl, 0.05% Tween20, 50 μ M EDTA, and 50 μ M EGTA (PE40 buffer) using 500 nM of protein. Data are represented as mean \pm S.D. (n = 4).

(A)

Protein	Mass expected (Da)	Mass of native proteins (Da)	Mass of reduced proteins (Da)	Difference of mass between native and reduced forms (Da)
TvGSTO1C	26503.07	26808.89	26503.35	305.54
TvGSTO2C	27254.98	27560.71	27255.62	305.09
TvGSTO3C	30127.09	30433.30	30127.09	306.21

(B)

Protein	Theoretical mass of the monomer (Da)	Mass of proteins after size exclusion chromatography (Da)
Native TvGSTO1C	26503.07	46874.86
Reduced TvGSTO1C	26503.07	48565.74
Native TvGSTO2C	27254.98	41816.72
Reduced TvGSTO2C	27254.98	42147.32
Native TvGSTO3C	30127.09	47806.84
Reduced TvGSTO3C	30127.09	47806.84

(C)

Protein	O.D (at	412 nm)	Concent TNI	tration of B (M)	Ratio/Nu free cy	mber of steine	Number of cysteine in the peptide sequence
Native TvGSTO1C	5.6 E-03	3.7 E-03	4.03 E-07	2.66 E-07	0.04	0.03	1
Reduced TvGSTO1C	0.09	0.10	6.38 E-06	7.09 E+06	0.64	0.71	1
Native TvGSTO2C	2.9 E-03	4.7 E-03	2.09 E-07	3.38 E-07	0.02	0.03	1
Reduced TvGSTO2C	0.10	0.11	6.96 E-06	7.84 E-06	0.70	0.78	1
Native TvGSTO3C	0.12	0.13	8.36 E-06	9.13 E-06	0.84	0.91	2
Reduced TvGSTO3C	0.20	0.21	1.45 E-05	1.50 E-05	1.45	1.50	2

(1)	
U	V)

Protein	DH (nm)
Native TvGSTO1C	4.43 ± 0.21
Reduced TvGSTO1C	4.83 ± 0.25
Native TvGSTO2C	5.88 ± 0.35
Reduced TvGSTO2C	6.10 ± 0.34
Native TvGSTO3C	5.50 ± 0.36
Reduced TvGSTO3C	5.45 ± 0.17

Table S5: Denaturation temperatures of native and reduced TvGSTOC. The thermal shifts assays have been done in a final volume of 25 μ L containing a 30 mM Tris-HCl pH 8.0 buffer, a concentration of protein of 20 μ M, 2 μ L of dimethyl sulfoxyde and 2 μ L of SYPRO Orange sixty-two diluted. Data are presented as mean ± S.D. (n=3).

Protein	Native	Reduced	Native	Reduced	Native	Reduced
state	TvGSTO1C	TvGSTO1C	TvGSTO2C	TvGSTO2C	TvGSTO3C	TvGSTO3C
T_d (°C)	69.90 ± 0.10	51.92 ± 0.24	70.46 ± 0.35	48.37 ± 0.18	71.63 ± 0.20	47.62 ± 0.15

Figure S1: Sequence alignment of *Trametes versicolor* GSTOs. The sixteen sequences have been obtained from the genome of *Trametes versicolor* (v1.0) available on the Joint Genome Institute website. The sequences were aligned with ClustalW Multiple alignment with 1000 repetitions. The sequence alignment was built on BioEdit sequence alignment software.

		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170
					1	1	···· [···· [··		···· [· · · ·] ·					1	1	· [· · · ·] · · · ·	. lll.	· · · I
jgi Trave1 73687	MSNDRDTG	RPYHLACT	GEALATVO	HISPEHITL	FGSCFCPFVC	SVWVTLEHLG1	IDYAFRQYYEV	DPYKKPAEL	LELSPKG			LVEALRIN	NFD	SPRALNE	STILLDELE	ELATSDTRRS.	SHTTESLFPAPSD	SYAR 135
jgi Trave1 60698 TvGSTO3C	MSNDGI	NYIHSHAT	GLAARTVE	HOAPODLVL	YAGWFCPYVC	SWISLEERGI	PYQYKEV	NPYKKEQHF	LDINPKG			LVEALEYK		GRAMYE	SLILCEPFE	DAFPEHTP	HLLTTD	FDR 116
jgi Trave1 157166 TvGSTOIC				MPERITL'	YTAKICPFAC	BAEIALAEARA	EFTPFQIDLS	NKPEWYA	PRVNPAS			KVEALAYG	GPEVPPDQ-	PSPESVKLAE	SLVLVEFVA	DLFPNSGI	LSSD	WTR 103
jgi Trave1 67635 TvGSTO2C				MPERITL	YTAKICPFAC	EVEIALHEAKA	HHNVEQFQIDLC	NKPEWYA	PKVNPAS			KVEALAYG	GPHVPPDQ-	PSPESIKLAS	SLILVEFVA	DLFPHSHL	LPHD	EVKR 105
jgi Trave1 75639 TvGST01S				MSESKRITL	YAAPESPYPH	VRLALEEAKA	NYDVIWIDLV	DKPEWYA	QKVNTEGG			KVEYLVYG	GPKLEPGDA	LSGDAVGIPS	SLVILEFIA	DIFPDAHL	LPAD	TLR 107
jgi Travel 56280 TvGSTO2S				MPCTEQITLY	YTTTFSPYGH	BAHIALEEAGA	EYTLCQINVH	RDKPEWY	KRVNPLG			RVEAITEG	GPQVPPDE-	PSPESEKLVE	SLALLEEVA	DVFPEAKL	LPAS	WOR 105
jgi Trave1 48691 TvGSTO3S				MSSTROITL	YTATESPYAH	EVRIALEEAGA	EYTTYDVDIL	RNMPDWF	PLVNPLK			RIFAMTEG	GPEVPPDQ-	PSPESAKIAE	SLAMLEFIA	DLFPDAKL	LPTD	EVLR 105
jgi Trave1 65402 TvGSTO48				MAPTEQLTF	YTAAYSPYSC	VHIALEEAGV	KYTHWEFETR	GPGSKPEWY	YQINPLG			KIRALTFG	GPEVPPDQ-	PSPESAKLAR	MAILERLA	DIFFDAPL	LPAD	ELLR 107
jgi Trave1 54358 TvGSTO58				MVQPGQITF	YTHVYSPYCH	WHIALEEAKA	EYTPCSVNLM	DRPPWYN	TKVNPAG			KINAITYG	GPKHAPED-	PSPEAAKINE	STVILEPLA	DIFPEARL	LPAD	EVOR 105
jgi Trave1 23671 TvGSTO65				MSAQKRITL	YMASASPFPH	WRLALEEAH A	TYEMIHISLV	DKODWYO	KKVYPDRA			QVEYLIYG	GPELHPDEA	PSPDAAKIPE	SLVILEFLA	DLFPAAHL	LPSD	VLR 107
jgi Trave1 71758				MPPVEQITL	YTSTYSPESC	WHIALEEAK	KYNVWEFETK	GPGSKPEWY	YQINTLA			KINAITVG	GPEVPPDQ-	PSPESAKLAE	SMVILEFLA	ELFPDAPL	LPAD	FLR 107
jgi Trave1 34389				MPCTQQITL	YTATFSAYAH	BAEIALEEAGA	QYTLYKIDLY	I-RDMPEWY	TRVNPLR			KVEAITFG	GPOVPPDE-	PSPGSQKLPS	SLALIEFVA	DTFPESKL	LPAD	FLR 106
jgi Trave1 60138		MPS	LTTPTPSTA	KPQHKQLTF:	YTSPYSPYCH	WHIALEEAKV	APSLVEIDLR	PGCKPANFT	SRVNPMG			TVEAFTYG	GAPAPPDQ-	PSPAALKLAS	SIVLIEFIA	DLHPEAAL	HPKD	ELL 119
jgi Trave1 32361				MVQTERITL	YASVDSPEPH	VRLALEEAKA	KYDIIWIDLI	A KPEWFE	KKVNKAGG			KVETLIYG	GGELHEDEE	PSPDAATLVE	SLVILEPLA	DTFPEAHL	LPAD	ELLR 107
jgi Trave1 41340			}	TTTPORIAL	YGSPHSPEVA	EVRLALEEAOA	DYHTVFFDLD	ERPOWFF	DNVNSAGKVS.	STPOFNLAP	PRPELTACSR	OVETIVYR	SSPDAPPER	PTPESAKIA	SLVLLEPVA	DLHPNANL	LPRD	EVLR 131
jgi Trave1 54345				MSEPKRITL	YAAVDSFYFH	VRLAIEEAK A	TYDTIVIDLL	DKPEWYA	QKV			FYLVYG	GSKLQPGGA	LSADAVGIPS	SLVILEFIA	DIFFNAHL	LPAD	STLR 100
		180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	
					1	1								I I	1	.1	.1	
jgi Trave1 73687	ALIRLOAD	SVNRSLIF	AFYRYLOAD	DEARQVEGAL	KGFVEALESI	VTLFRRAEREG	TOYELWHECGS	LEYADVMAA	WLFRATNVL	KH-YRGFVLF	EGEOFRAYVG	ML	GHPAVKRTC	STECLYLDSY	ERYAFNREN	TSOVANAINA	GTALP	286
jgi Trave1 60698 TvGSTO3C	MYVELWVD	HVSKQIVE	TFMRLVLAG	EPERQQEHL	ADFYKGLRTL	TDEVR	PYFLGAC	FELVDIALA	WVLRDYILA	EN-RGYEREA	AGSAWVAYAK	LE	TRESVLRTQ	SDKEHYAQIY	ARYLEN-EA	QSEAAKAIRA	GRPF	255
jgi Trave1 157166 TvGSTO1C	OTRFFIE	GVSSKLIP	AWYAYFI	RGASVDD	LYTAAEYV	QSLLP	AEE-FAVG-K	FRAADIAIA	FLARARVSL	NEIGKYPEG	DGKKVWAALT	GKFA	REGEVAEDL	FARESFSSTF	DEDYVTRAF	SAR-FADLES	K	236
jgi Trave1 67635 TvGSTO2C	ACARFFID	GVSTRFIF	AWHAFS	GKSSEED	FLTAVEHI	OALLP		YSIADVALT	FLGRARVTL	KEDLGGYPRG	EGPRVLAVLT	GTGRLA	REGEVAQDL	LARESFOATE	DEAYITERY	KAR-FADLRK		239
jgi Trave1 75639 TvGST018	GRARLFYS:	SLDAG-LS	KG-FVGFLE	MGMPLKD	LLAGLDDI	QGRLP	PTE-FAAG-E	WEIADAAAL	FTLLRLQLAL	KDGIGLCKPE	DLKEAYEVVF	SPKYA	RLRQYIDDN	VARENVARSW	DPAATKAKF	EQR-IKIFRA	MDPTATRIPAHIY	SQP 256
jgi Trave1 56280 TvGSTO2S	ARARAFIA.	IYONYLHE	QFRDAFE	RGEPVGP	FLQALETI	QSALP	PAE-FAVG-E	WELAEAAVA	FLARMMLYL	DAGLGKYSEA	DGETMRAALA	ERFA	RISQYVRDI	RARASFVKSW	GGDDVQLEA	AKA-IPMLRR	PA	239
jgi Trave1 48691 TvGSTO3S	ARARTEMA	LYENYVNG	QFRDVWB	LGTPADP	LLQALEMI	QGALP	PDEGFAAG-E	WEIADAAVI	FLARMFPYL	EAGLGLYSKE	DGVKMRKAMA	ERFA	RIROYVRDC	RARPSFANTW	AGDAEQVEA	AKT-VPMLRV	3E	240
jgi Trave1 65402 TvGSTO4S	AKARTFTE:	IFRNYVSE	EFRGAFE	LGKPVAG	VLOALERI	QAALP		WALAEAAVA	FITRLFLFV	RVGLGSYTEE	NWIMLRDALE	ERFA	RIRKYVQDI	HERPSFERTW	GDDARQVEL	WEN-HPGLER	RAEPIAOPPA	249
jgi Trave1 54358 TvGSTO58	ACARLVIA	TWEAKGFE	GFKDFFF	MYAQATSPEI	RTLLDGLDAF	OARLP		WENADSAVA	FLLRAELLL	KNDLGTYPVG	EGKKVYEVLO	PRFA	RLRKYLEDV	KEHPTIKTTW	D-EALQFGI	WSQ-NPMFKR	A	241
jgi Trave1 23671 TvGSTO6S	ARARLETT	AVETELLE	AQKAFFI	MGGPPDA	MLAALDAL	QARLP	PARGFAAGPO	NEIADAAVM	FILLRLRMSV	PLEVGFFAP-	GAAPVVRAAL	SPRFA	RLORYIADN	VARPSMAATW	DEAAVKAEF	VGR-FEKLRS	LKAAQ	246
jgi Trave1 71758	AKARTFVE:	IYRNYVSS	EYLGAFE	LGKPIEG	VLKALETI	QAALP	PDEGFAAG-E	WEIAEAAVA	FIARLFLFL	RVGLGSYTEE	QGQTLRDTLA	PRFA	RLTOWVKDV	HEPPSFORTW	VSDDRQVEL	WEN-HPGFRR	KVVEPTOPHA	250
jgi Trave1 34389	ARARTFIS	LYHSYIHE	OFMNVFE	RGVPVTDG-	FFQAFETI	QSALP	PTE-FAVG-E	WELAETAVG	FLARIMLYL	DAGFGWYSEA	DRETMRAEFA	ARFA	RLOOYIODI	RARPSFAKTW	GGDAVQVET	VRATLPKLRR	ERIA	244
jgi Trave1 60138	ARARLEIT	LSHDTLHH	AFRGFFE	RGERIES	ILPSLEAF	OALLA	PSE-YAVG-P	WEMADVVVA	MIVREMELA	SYEIGKYPMG	EGERLLKALG	PKFA	RFMOYYOSL	WERPSVKTTW	D-EHTNVKM	WRI-HPNVNR	STSAVGH	257
jgilTrave1 32361	RARTFYM	FIETRLIV	AFLGFIE	ATVSADD	MLALLETI	OGMLP	PTE-YVVG-E	WAIADAAFS	LLRWVHSL	ENGLAMFTPE	TVKOS-RDAFT	SPRFD	RLRKYLEDN	VARPSMSKTY	DREALERTM	VRR-LERFRK	TGVITSELEMPLP	252
jgi Trave1 41340	ARAFLETRI	KLDEKFOS	AFLALLE	PDKDGGAE	VLELLVEL	QNELP	PTE-YVVG-D	MAIADAAFV	MVAAVGIVA	TGRGYFRDW	DGGKLTQELA	PRFE	RLREYMRIN	KERPSFD	EFVAIRM	VKR-FAKPAD	KK	260
jgilTrave1 54345	RARLEYS	GLEAGPLG	KGSVLGFLE	OGTPLED		OSKLP		MALADAATL	VLLRLOLAL	EGLGLRRPE	DLKEAHAAIF	PESGPREA	RLROYIDDN	LARPSVARSW	DPAATKAKE	EOR-IKIVRA	KDPTATSMPH	248
	-					2 8 M M		-										

Figure S2: Chemical structures of the tested substrates.





Phenethyl isothiocyanate (PEITC)

.^N[≿]C_≈s

OH



Benzyl isothiocyanate (BEITC)







HO



Glutathionyl-phenylacetophenone (GS-PAP) Figure S3: Thermal effect of wood extracts from oak, beech, walnut tree and cherry-wood on the reduced form of TvGSTO1C (n=1).



Figure S4: Thermal effect of wood extracts from pine, spruce and cedar on the reduced form of TvGSTO1C (n=1).



Figure S5: Thermal effect of wood extracts from metasequoia, larch and sweet chestnut tree on the reduced form of TvGSTO1C (n=1).



<u>Résultats – Chapitre I – Article nº1</u>

Etude des GSTs de la classe Omega de Trametes versicolor ayant une sérine dans le site actif (TvGSTOS) - Recherche et découverte de ligands : les polyphénols.

Article n°2: Molecular recognition of wood polyphenols by phase II detoxification enzymes of the white rot *Trametes versicolor*

Mathieu SCHWARTZ[†], Thomas PERROT[†], Emmanuel AUBERT, Stéphane DUMARÇAY, Frédérique FAVIER, Philippe GÉRARDIN, Mélanie MOREL-ROUHIER, Guillermo MULLIERT, Fanny SAIAG, Claude DIDIERJEAN and Eric GELHAYE.

† Co-auteurs.

Publié dans Scientific Reports

Après avoir caractérisé biochimiquement les trois isoformes ayant une cystéine catalytique, les six isoformes qui possèdent une sérine dans le site actif ont été ensuite étudiées. Ce second article traite de la recherche de substrats et/ou de ligands potentiels des six TvGSTOS.

Une étude préliminaire basée sur l'étude de la thermostabilité des TvGSTOS vis-à-vis d'une banque de 27 molécules a montré qu'une classe chimique induisait des décalages thermiques importants : la classe des benzophénones. Le squelette moléculaire de base des benzophénones est composé de 2 cycles aromatiques reliés par une fonction cétone.

J'ai poursuivi les études d'interaction entre les TvGSTOS et les benzophénones en testant différents représentants de cette classe. Ces représentants diffèrent entre eux par le nombre et la position des groupements hydroxyles présents sur le squelette moléculaire des benzophénones. Dans un premier temps, les effets de 9 benzophénones sur la dénaturation thermique des six TvGSTOS ont été étudiés. En parallèle, des tests d'inhibition de l'activité de glutathionylation en présence des benzophénones ont permis d'estimer l'affinité entre la protéine et l'inhibiteur. Enfin, les molécules de benzophénones ayant donné les résultats les plus probants ont été utilisées dans des expériences de co-cristallisation afin d'identifier le site de fixation requis pour la reconnaissance de ces composés. Cette même combinaison d'approche biochimique et structurale a été de nouveau utilisée envers une autre classe de composés polyphénoliques : les flavonoïdes.

Par ailleurs, des résultats antérieurs obtenus par la doctorante Aurélie Deroy, ont suggéré que les TvGSTOS interagissaient avec des extraits de bois provenant d'essences forestières de climat tempéré (Deroy et al., 2015a). Parmi ces extraits, certains contiennent des flavonoïdes. La dernière partie de cet article est consacrée à l'identification d'un ligand naturel issu d'un extrait acétonique de bois de merisier. La combinaison d'analyse en spectrométrie de masse, en résonance magnétique nucléaire ainsi que la méthode de cristallographie d'affinité a permis finalement d'identifier le composé responsable de l'interaction : la dihydrowogonine (Figure n°49).



Figure n°49 : Stratégie utilisée pour identifier un ligand naturel issu d'un extrait acétonique de bois de merisier : la dihydrowogonine. Les abréviations « CL-SM », « RMN » et « CM » désignent respectivement la chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse, la résonance magnétique nucléaire et la cristallographie macromoléculaire (image réalisée par Mathieu Schwartz).

Molecular recognition of wood polyphenols by phase II detoxification enzymes of the white rot *Trametes versicolor*

Mathieu Schwartz^{1†}, Thomas Perrot^{2†}, Emmanuel Aubert¹, Stéphane Dumarçay³, Frédérique Favier¹, Philippe Gérardin³, Mélanie Morel-Rouhier², Guillermo Mulliert¹, Fanny Saiag², Claude Didierjean^{1*} and Eric Gelhaye^{2*}

¹Université de Lorraine, CNRS, CRM2, Nancy, France

²Université de Lorraine, INRA, IAM, Nancy, France.

³Université de Lorraine, LERMAB, Nancy, France

*Corresponding authors: claude.didierjean@univ-lorraine.fr; eric.gelhaye@univ-lorraine.fr

[†]These authors contributed equally to this work.

ABSTRACT

Wood decay fungi have complex detoxification systems that enable them to cope with secondary metabolites produced by plants. Although the number of genes encoding for glutathione transferases is especially expanded in lignolytic fungi, little is known about their target molecules. In this study, by combining biochemical, enzymatic and structural approaches, interactions between polyphenols and six glutathione transferases from the white-rot fungus *Trametes versicolor* have been demonstrated. Two isoforms, named TvGSTO3S and TvGSTO6S have been deeply studied at the structural level. Each isoform shows two distinct ligand-binding sites, a narrow L-site at the dimer interface and a peculiar deep hydrophobic H-site. In TvGSTO3S, the latter appears optimized for aromatic ligand binding such as hydroxybenzophenones. Affinity crystallography revealed that this H-site retains the flavonoid dihydrowogonin from a partially purified wild-cherry extract. Besides, TvGSTO6S binds two molecules of the flavonoid naringenin in the L-site. These data suggest that TvGSTO isoforms could interact with plant polyphenols released during wood degradation.

INTRODUCTION

The microbial degradation of wood has been extensively studied due to its importance in organic matter recycling and its potential valorisation in many industrial domains. This degradation is mainly mediated by fungi and in particular by white-rot fungi which are able to degrade and mineralize all the wood components. Indeed, as early as in the middle of last century, this functional trait has been correlated to the ability of these fungi to secrete extracellular enzymatic systems able to degrade wood polymers¹. Due to the recent release of more than fifty fungal genomes, comparative genomic approaches have confirmed this correlation ^{2,3}. Beyond these extracellular systems, recent studies have also confirmed the importance of intracellular detoxification systems in the fungal wood degradation process ⁴. These systems were thought to play essential roles in wood degradation. They allow fungi (i) to catabolize the oxidized compounds that result from lignin oxidation ⁵, and (ii) to cope with wood anti-microbial compounds, such as flavonoids, stilbenes or terpenes^{6,7}. The efficiency of these intracellular detoxification systems seems to be linked to the expansion of multigenic families involved in the oxidation phase such as cytochrome P450 mono-oxygenases and in the conjugation phase such as glutathione transferases (GSTs)^{6,8}. Similarly, such expansions are also found in herbivorous insects, where these multigenic families play key functions in the detoxification of plant defense chemicals and also in the evolution of metabolic resistance to chemical insecticides ⁹⁻¹¹.

Until now, in wood-decaying fungi, comparative genomic, biochemical, structural or physiological approaches gave only few insights concerning the function and specificity of these enzymes in the wood degradation process. This lack of knowledge is mainly due to the absence of specific substrates that would allow discriminating between the isoforms. The expansion of the GST family in these fungi mainly concerns three phylogenetic classes, named GSTFuA, Ure2p and GST Omega (GSTO)¹². We had suggested that the fungal-specific GSTFuA class could be involved in the catabolism of ligninderived molecules ¹³. A recent study confirmed that a GSTFuA isoform from *Dichomitus squalens* (Ds-GST1) selectively cleaves the β -O-4 aryl ether bond of a dimeric lignin model leading to a glutathione derivative ¹⁴. The Ure2p class can be divided into two subclasses with distinct structural and biochemical properties. Ure2pAs possess the classic GSH transferase activity while Ure2pBs display a deglutathionylation activity¹⁵. Interestingly, bacterial orthologs of Ure2pB (named GSTs Nu) act as glutathione lyases in breaking the β -aryl ether bond of lignin ¹⁶. GSTOs are involved in detoxification pathways via deglutathionylation reactions¹⁷ and two GSTO isoforms of *Phanerochaete* chrysosporium (PcGSTO3 and PcGSTO4) bind terpenes ¹⁸. In Trametes versicolor, some GSTO isoforms interact with different wood extractives and obviously the chemical composition of the extracts is important in this respect¹⁹.

To further explore this issue, we have conducted biochemical and crystallographic studies on the interactions of six GSTOs from *T. versicolor* with chemical libraries. We showed that these GSTOs exhibit distinct affinity patterns, particularly with benzophenones and flavonoids. An affinity crystallography approach allowed the isolation of a flavonoid from a partially-purified wild-cherry tree extract. This ligand specific to one GSTO isoform was characterized as dihydrowogonin using multiple approaches. All these results and the recent literature support the conclusion that GSTs of this class interact with wood polyphenolic compounds.

RESULTS AND DISCUSSION

TvGSTO3S interacts with hydroxybenzophenones

Thermal shift assay (TSA) is a high-throughput ligand-screening method based on the modification of protein thermal denaturation. Along a gradient of temperature, the denaturation is followed by monitoring fluorescence enhancement of a probe (SYPRO[®] Orange) that binds to protein hydrophobic patches upon denaturation process. TSA has been successfully used to detect interactions between proteins and libraries of molecules ²⁰. It allowed us to identify chemical families of compounds that interact with TvGSTOs and prompted us to investigate more deeply the case of TvGSTO3S with hydroxybenzophenones (HBPs), in particular by conducting a structural analysis of protein-ligand complexes.

First, the interactions between a chemical library of 27 compounds and six TvGSTOs were explored using TSA (Supplementary Figure S1). The tested compounds were chosen either for their presence in wood or their reactivity with GSTs¹⁹. The six TvGSTOs (named TvGSTO1S to TvGSTO6S) used in this study are representatives of the twelve TvGSTOs that have a catalytic serine, while four others have a cysteine instead. The obtained results show patterns of interaction that distinguish each isoform from the others. Indeed, a few compounds significantly increased the stability of TvGSTO1S, 3S and 6S, i.e. they show a variation of the denaturation temperature $\Delta Td > 5^{\circ}$ C. On the contrary, most chemical compounds induced a destabilizing effect on TvGSTO5S and 2S ($\Delta Td < 0^{\circ}$ C), whereas the chemical library had little impact on TvGSTO4S thermal stability. In the case of TvGSTO3S, the compounds that increased protein stability all belong to the same chemical family, namely hydroxybenzophenones (HBPs). Benzophenones are present in plant extracts²¹ and also in wood extractives, for example in oak heartwood²².

A set of commercially available HBPs with various numbers and positions of hydroxylation on their rings A and B (Table 1) was tested by using TSA with the six TvGSTOs. It confirmed that TvGSTO3S has a significant affinity for HBPs. For this isoform, a group of molecules (2,4-, 3,4-, 4,4'-, 2,3,4- and 2,4,4'- HBPs) corresponding to compounds with at least two hydroxyl groups on ring A and no more than one hydroxylation on ring B stand out for their causing large increases in the melting temperature of TvGSTO3S. Oppositely, 2,2'-, 4,4'-, 2,2',4,4'- HBPs and the unsubstituted benzophenone had little or no effect on the thermal stability of TvGSTO3S. The replacement of the 4-hydroxyl group of 2,4-HBP by a methoxy group nullified the observed thermal shift.

Molecules	Structures	Structures TvGSTO1S TvGSTO2S TvGSTO3S TvGST					TvGSTO6S
Benzophenone	B A	NS	NS	NS	NS	NS	NS
2,2'- Dihydroxy benzophenone	OH O OH	NS	NS	NS	NS	NS	NS
2,4- Dihydroxy benzophenone	O OH OH OH	2.05°C	2.56°C	5.69°C	NS	NS	1.63°C
3,4-Dihydroxy benzophenone	O HO HO	0.98°C	NS	4.36°C	2.77°C	NS	NS
4,4'-Dihydroxy benzophenone	но	NS	NS	1.67°C	NS	NS	NS
2,3,4-Trihydroxy benzophenone	O OH OH OH	1.13°C	2.92°C	4.96°C	1.76°C	-12.89°C	4.15°C
2,4,4'-Trihydroxy benzophenone	но он он	2.74°C	2.03°C	2.87°C	NS	NS	1.28°C
2,2',4,4'- Tetrahydroxy benzophenone	но он он	3.74°C	0.74°C	NS	NS	NS	3.40°C
2-Hydroxy-4- methoxy benzophenone	O OH OCH3	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Table 1. Summary of the results obtained for TvGSTOs with benzophenone compounds by thermal-shift assays. A Δ Td value is only given if the denaturation temperature is significantly modified in the presence of compounds, with respect to incubation with DMSO only. "NS" means that the denaturation temperature has not changed significantly.

For further insights into these findings, a structure/function relationship study focused on the analysis of TvGSTO3S-ligand interactions was initiated. The structure of apo TvGSTO3S was determined by X-ray crystallography at a resolution of 1.35 Å (Supplementary Table S1). It has a typical GST fold where the N-terminal thioredoxin domain of one monomer cross-interacts with the C-terminal allhelical domain of the second one, and vice-versa (Figure 1). TvGSTO3S shares the highest sequence identity with Omega GSTs, though its closest structural homologs identified by PDBeFold 23 are Tau GSTs. The resemblance between these two classes was already discussed for a wheat Tau GST²⁴. However, TvGSTO3S has unique features that distinguish it from previously described GSTs. They mainly include an elongation of the loop between β_3 and β_4 and an additional helix α_6 ' (Supplementary Figure S2).



Figure 1. Overall views of Trametes versicolor GSTO3S structure in complex with glutathione and 2,4 hydroxy benzophenone (left panels) and GSTO6S structure in complex with naringenin (right panels). In each case, structures are depicted in cartoon mode with ligands shown as spheres and sticks (glutathione in green, 2,4 HBP and naringenin in yellow). N-terminal domains are shown in light colors (white for GSTO3S, cyan for GSTO6S) and C-terminal domains are shown in deeper colors (grey for GSTO3S, blue for GSTO6S). Black arrows indicate positions of glutathione binding site (G-site), hydrophobic binding site (H-site) and ligandin site (L-site). In each case is represented one physiological dimer that typifies the structure of GSTs where the N-terminal domain (secondary structure $\beta_1\alpha_1\beta_2\alpha_2\beta_3\beta_4\alpha_3$) of one monomer cross-interacts with the C-terminal domain ($\alpha_4\alpha_5\alpha_6\alpha_6'\alpha_7\alpha_8\alpha_9$) of the second one, and vice-versa.

The N-terminal end of TvGSTO3S helix α_1 harbors a serine as the catalytic residue instead of the cysteine found in the other GSTOs structurally characterized so far ^{17,25}. It enables efficient GSH-transferase activity towards usual synthetic substrates and disables reductase activity (Supplementary Table S2). In order to get a detailed picture of the ligand binding sites of TvGSTO3S, we determined the structures of several complexes with free GSH, or two glutathionylated derivatives GS-R (glutathionyl-dinitrobenzene GS-DNB, glutathionyl-phenylacetophenone GS-PAP), or the HBPs identified by TSA (2,4-, 3,4-, 2,3,4-, 2,4,4'- HBPs) (Supplementary Table S1). TvGSTO3S harbors a canonical GSH binding site (G-site) made up of polar residues from the N-terminal domain which stabilizes the glutathionyl moiety (GS-) of the tested ligands (Figure 1, Supplementary Figures S3 and S4).

On the contrary, the hydrophobic binding site (H-site) which hosts the -R group of the GS-R ligand has a singular shape relative to most GSTs. While a large open valley is usually observed in a cleft between the two domains ²⁶, TvGSTO3S exhibits a well-delineated cavity deeply inserted between helices α_4 and α_6 of the C-terminal domain. The crystal structures of the different complexes show that this pocket is perfectly suited to accommodate polyaromatic ligands, due to its strong hydrophobic character, while two polar residues are found at the entrance close to the G-site (Supplementary Figure S3). The phenylacetophenone group of GS-PAP fully fills the cavity, contrary to the more polar -R group of GS-DNB that does not enter it and is only slightly stabilized at its entrance, at the interface with the G-site (Supplementary Figure S4).

The four HBPs (2,4-, 2,3,4-, 3,4- and 2,4,4'- HBPs) that were previously identified by TSA also bind to TvGSTO3S H-site (Figure 2 and Supplementary Figure S5). Overall, their phenyl ring B (Table 1) sits deep at the bottom of the pocket and interacts via π -stacking with aromatic amino acid side chains. Their di- or tri-hydroxylated phenyl ring A is closer to the entrance of the cavity and forms hydrogen bonds with polar side chains and water molecules. In more detail, two distinct HBP conformations are observed (i) for 2,4-, 2,3,4- and 3,4-HBPs, and (ii) for 2,4,4'- HBP, respectively (Figure 2). Both conformations are common for this family of molecules in the solid state ²⁷. In (i), the central ketone group of HBPs is stabilized via a well conserved water molecule present in all structures, while this interaction no longer exists in (ii). For the latter, a new hydrogen bond allows accommodation of the 4' hydroxyl group at the bottom of the cavity. The presence of this additional 4' hydroxyl group probably accounts for the distinct conformation (ii) observed in the H-site.

Finally, another attempt was made to get the structure of a complex between TvGSTO3S and the compound 2,2',4,4'-HBP, but no electron density was observed for this putative ligand. These results not only correlate with TSA, but also with the binding affinities of HBPs for TvGSTO3S which were assessed from their capacity to inhibit the GSH-transferase activity towards phenethyl isothiocyanate (PEITC). Indeed, the same four HBPs differentiate from the others in the sense that only their Ki values were measurable and found in the μ M range (Supplementary Table S3). Altogether, our crystallographic and enzymatic results suggest that the TvGSTO3S H-site is selective for HBPs whose ring B is totally hydrophobic and stabilized at the bottom of the pocket or bears one hydroxyl group in para position whereas ring A is di- or tri- hydroxylated and stabilized at the entrance of the H-site. As shown with TSA, other TvGSTO isoforms also interact with HBPs, each with its own selectivity. The discovery of HBPs as potential ligands for TvGSTOs echoes previous results concerning metabolization of these small molecules by the fungus. For instance, the sunscreen agent BP3 (2-hydroxy, 4-methoxy benzophenone) is metabolized by T. versicolor into various HBPs (2,4-, 4,4'- and 4- HBPs) by cytochrome P450 with no oxidation by extracellular laccases ²⁸ suggesting the importance of intracellular systems to detoxify benzophenones, including phase II enzyme GSTs.



Figure 2. Binding of 2,4- and 2,4,4'- hydroxy benzophenones in GSTO3S hydrophobic binding site. Stereoviews of sections of the GSTO3S complex structures with 2,4-HBP (top view) and 2,4,4'-HBP (bottom view) are shown. TvGSTO3S H-site is a well-delineated cavity deeply inserted in between helices $\alpha 4$ and $\alpha 6$ of the C-terminal domain. It is perfectly suited to accommodate polyaromatic ligands, due to its strong hydrophobic character given by the aromatic side chains of F123, W127, F128, F168, the aliphatic parts of R171 and Y175, completed with polar residues (Y17 and R124) at the cavity entrance close to the G-site. Polar intermolecular contacts are materialized as dashed lines. Surrounding side chains are represented in sticks. HBPs are shown as yellow sticks and spheres. 2mFo-DFc composite omit maps shown at 1.0 σ around HBPs were calculated by PHENIX.

TvGSTOs interact with flavonoids

In a recent paper, we suggested that GSTs from saprotrophs could interact with flavonoids, which are phenolic compounds as HBPs and present in wood extracts ¹⁹. In order to refine our results, TSA was used to test a set of commercial flavonoids for their interaction with TvGSTOs. Some of the putative complexes were further investigated by X-Ray crystallography. For the first time in GSTs, one structure revealed a symmetrical ligandin site (L-site) filled with a pair of interacting ligands.

As observed for HBPs, TSA shows that each TvGSTO has its own interaction profile with flavonoids and that these interactions are largely related to the number and positions of the hydroxyl groups on the aromatic rings (Supplementary Table S4). While TvGSTO4S and 5S show variable or weak responses to flavonoids, TvGSTO1S, 2S, 3S and 6S mainly show positive shifts of their denaturation temperature. For instance, all molecules but catechin affected TvGSTO6S. Interestingly, these flavonoids were recently detected by mass spectrometry in *T. versicolor* fructifications. Their presence might arise from trees or soils on which the fungi grow ²⁹.

The crystal structure of TvGSTO6S was solved at 1.45 Å resolution (Supplementary Table S1). As expected, it reveals the same overall fold than TvGSTO3S (rmsd 0.78 Å, 183 aligned Ca per monomer). While G-sites are made of similar polar residues, differences are observed at the H-site and at the interface between monomers (Figure 3). The lack of a structure with a ligand that binds in TvGSTO6S H-site precluded its detailed description. However, when compared with the equivalent region of TvGSTO3S, significant differences are readily apparent in TvGSTO6S. Most of the residues that line the benzophenone binding site of TvGSTO3S are different. In addition, the extension of the C-terminal α -helix by two extra turns leads to an open and shallow H-site, contrary to the buried H-site in TvGSTO3S covered and closed by the loop corresponding to the extra turns. There are also slight differences between the dimer-interfaces of both isoforms. Most residues at the interface are conserved, except for a few ones situated in helix $\alpha 4$ (Figure 3). The larger residues of TvGSTO6S (L112 and T115 instead of T110 and A113 in TvGSTO3S) and the loss of the inter-monomer interaction between Y118 (replaced by E120 in TvGSTO6S) and E80 present in TvGSTO3S probably account for a more open dimer in TvGSTO6S. Its interface residues form a pocket centered on the two-fold axis of the dimer (rectangular section of 8x6 Å2), larger than the equivalent region found in TvGSTO3S (rectangular section of 7x4 Å2, Supplementary Figure S6). This region hosts a third binding site named the ligandin site (L-site) in human GST Omega 1 (hGSTO1)³⁰.



Figure 3. Structural comparison of TvGSTO3S and -6S isoforms showing differences between H-sites and L-sites. The structures shown are TvGSTO3S in complex with 2,4-HBP (top left) and TvGSTO6S in complex with naringenin (top right). In both cases, helix α 9 and the C-terminal tail were removed from structures for clarity. Monomers A and B are colored white and grey, respectively. 2,4-HBP and naringenin molecules are represented as yellow sticks. H-site and L-sites residues are colored cyan and grey respectively in the structures (highlighted cyan and grey respectively on the structural alignment). G-site residues are highlighted green in the sequences and are not shown on structures for clarity. Catalytic serine is highlighted yellow in the sequences. Secondary structures elements (based on TvGSTO6S) are labelled and shown using arrows (β -strands) and squiggles (helices). Helix α 9 extra turns in TvGSTO6S are colored red on the sequence alignment.

In order to determine the structure of a complex between TvGSTO6S and a flavonoid, several candidate molecules were chosen for soaking experiments. Crystals of TvGSTO6S were unstable and brittle and required some tricks to prepare complexes. Among the trials performed, one was successful where the droplet that gave rise to TvGSTO6S crystals was deposited for a few hours on a surface previously coated with naringenin (chemical structure in Supplementary Table S4). The structure of the complex was solved at a resolution of 2.3 Å (Figures 1 and 4, Supplementary Table S1). Two naringenin molecules bind in the pocket described above, which constitutes the L-site of TvGSTO6S (Figures 1 and 4). Each naringenin aromatic ring stacks with its symmetrical equivalent in an energetically-favored association (-13.64 kcal/mol calculated by DFT). A pair of stacked flavonoids was already observed bound to dihydroflavonol 4-reductase, however in a head to tail arrangement in the active site of the enzyme, with no dimer symmetry ³¹.

In TvGSTO6S, the naringenin pair fits the apolar environment formed by the neighboring aliphatic part of the side chains of both monomers (L84, V85, R111, T115, E118 and T119) while a hydrogen bond with E88 stabilizes one of the flavonoid hydroxyl groups. L-sites at the dimer interface were previously described for hGSTO1 (pdb code 4is0)³⁰ and for Arabidopsis thaliana GST Phi 2 (AtGSTF2, pdb code 5a4v)³² however with one ligand only. In hGSTO1, the L-site is positioned at a location similar to TvGSTO6S and shows conserved patches of hydrophobic residues along helix α 3 (Supplementary Figure S2). Interestingly, E88 that stabilizes naringenin in TvGSTO6S is conserved in hGSTO1 (E91) where its side chain is found near the nitrophenacyl moiety of the glutathione adduct. The case of AtGSTF2 is quite different. A quercetin molecule sits at the opposite side of the dimer interface, near the C-terminal end of helix α 3 and the N-terminal end of helix α 4.



Figure 4. Binding of naringenin in GSTO6S non-catalytic ligandin site. Stereoview of a section of the GSTO6S complex structure with a pair of naringenin molecules is shown. GSTO6S ligandin site is an hydrophobic pocket inserted at the interface of the dimer, between helix $\alpha 3$ and $\alpha 4$ of both monomers around the dimer 2-fold axis. The apolar environment is formed by the aliphatic part of the side chains of both monomers (L84, V85, T115, E118) while a hydrogen bond with E88 stabilizes one of the flavonoid hydroxyl groups. Polar intermolecular contacts are materialized as dashed lines. Surrounding side chains are represented in sticks. Naringenin is shown as yellow sticks and spheres. 2mFo-DFc composite omit map shown at 1.0 σ around the ligand was calculated by PHENIX.

Structural comparisons suggest that Omega GSTs have two hydrophobic ligand-binding sites: an Hsite near $\alpha 4$ and $\alpha 6$ and an L-site at the dimer interface. In the case of TvGSTO6S, the L-site can accommodate flavonoids. The alignment of the solved structures with the sequences of TvGSTO1S, 2S, 4S and 5S shows variations at the putative H- and L-sites (Supplementary Figure S2), which could explain the isoform-specific TSA patterns.

Fishing of a flavonoid from a wild-cherry heartwood extract by affinity crystallography

One of the biggest challenges in GST characterization is the identification of natural ligands ³³. Affinity crystallography is a very new method that was recently conceived to select and identify new inhibitors from natural crude extracts as potent drug scaffolds for pharmaceutical targets ³⁴. We successfully applied this method on TvGSTO3S crystals to isolate the flavonoid dihydrowogonin from a partially purified wild-cherry extract.

Acetonic extracts of wild-cherry heartwood were fractioned by reverse chromatography. The potential inhibition of the various fractions on TvGSTO esterase activity was analyzed using both chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA) and methylumbelliferyl acetate (MUA) as substrates (Figure 5). In previous studies ^{13,19}, these substrates had increased fluorescence detection sensitivity and prevented quenching effects of wood extracts. The fractions that eluted after 46 and 47 min induced a strong inhibition of both measured activities. The pooled mixture was tested for its ability to interact with TvGSTO3S using TSA. A positive 4.8°C shift of the observed Δ Td confirmed the presence of potential TvGSTO3S ligands. Analysis of this solution by LC-MS revealed the presence of at least two compounds with molecular masses of 254 and 286 g.mol⁻¹ respectively (Figure 5). The 46-47 min eluate also analysed by H¹NMR (spectrum shown in Figure 5) exhibited characteristic signals of a flavanone skeleton with, in addition, typical methyloxy group singlets at 3.75 or 3.81 ppm. At this stage, several compounds already described in the extractives composition could correspond to such data (e.g. dihydrowogonin or sakuranetin)³⁵⁻³⁷ so that it was impossible to definitively assign the molecular structures, particularly concerning the MeO group position either on the ring A or B (Figure 5).

Affinity crystallography was then used to further elucidate the interactions between TvGSTO3S and compounds present in the 46-47 min eluate. This approach assumes that a complex can form when the protein is mixed with a partially purified mixture of molecules containing potential ligands. We resuspended the dried eluate with a minimal volume of DMSO to obtain a concentrated mixture (100 mg/mL) suitable for TvGTO3S crystallization. The addition of 2.5% of the concentrated solution in the mother liquor produced co-crystals as observed from the electron density peak in the H-site. High quality of the signal together with the NMR and MS data led to unambiguous identification of dihydrowogonin (Figure 5).



Figure 5. Combined approach including affinity crystallography revealed dihydrowogonin bound to TvGSTO3S hydrophobic site. A. Normalized inhibition of esterase activity with substrates CMFDA and MUA is shown. Fractions 46-47 min that inhibited both activities were selected for further analysis. B. MS analysis in positive (bottom panel) and negative (top panel) modes revealed two major compounds. C. ¹H-NMR spectrum showed the structural features of flavanones. Affinity crystallography allowed the elucidation of the flavanone dihydrowogonin. Its ¹H-NMR data ³⁷ are indeed found on the spectrum of the mixture : numbers in parenthesis are the typical chemical shifts for dihydrowogonin and numbers in blue correspond to the values obtained in the present study. Integration values of 2 methoxy groups allowed evaluation of maximum abundance of dihydrowogonin in the fractions (numbers in red). D. Electron density of dihydrowogonin in structure of TvGSTO3S crystallized in presence of 46-47 eluate. The map shown is a 2mFo-DFc composite omit map contoured at 1 σ . E. Chemical structure of dihydrowogonin.

This flavonoid was previously identified in Prunus avium heartwood and described as a flavanone ³⁵. Interestingly, its corresponding flavone (wogonin) was shown to strongly inhibit the GSH-transferase activity of TvGSTO3S towards PEITC ($K_I = 2.89 \pm 1.24 \mu M$, Supplementary Table S5), while no inhibition was detected for TvGSTO6S. Since in the latter a stabilizing effect is still observed by TSA, the ligand should not bind in its catalytic site (i.e. the H-site). In TvGSTO3S, the unsubstituted ring of dihydrowogonin sits in the bottom of the H-site like the ring B of HBPs (see above) (Supplementary Figure S7). The opposite ring points towards the entrance of the cavity the polar residues of which stabilize its methoxy and hydroxyl groups by direct or water-mediated hydrogen bonds.

The hydroxyl group situated at position 7 is only 2.6 Å from the glutathione sulfur atom. This short distance questions a possible catalysis with a related substrate. The combined use of X-ray diffraction, NMR and MS succeeded in identifying dihydrowogonin as a natural molecule that originates from wild-cherry heartwood and that tightly binds TvGSTO3S.

Conclusion

In this study, we demonstrated at the biochemical and structural level that T. versicolor GSTs that belong to the Omega class interact with polyphenolic compounds found in wood, and in particular with flavonoids such as dihydrowogonin and naringenin. Indeed, white-rot fungi such as T. versicolor have to cope with potentially toxic tree secondary-metabolites mainly constituted of polyphenolic compounds, which accumulate in different parts the of wood (heartwood, knots ...). The molecular interactions between TvGSTOs and polyphenols appear to be very diverse. They potentially involve two structural sites for each isoform. It is tempting to establish a correlation between the diversity of these interactions and the extension of the Omega class (at least 16 isoforms) in T. versicolor, which encounters a large diversity of polyphenols in its natural environment. However, the exact function of this GST network remains unclear since no catalytic activity against the tested polyphenols has been detected. The ability of TvGSTOs to bind polyphenols through different sites suggests that fungal GSTs could be involved in the transport of various polyphenols. In plants, GSTs were shown to facilitate the flavonoid transport from the cytoplasm into the vacuole ³⁸. These GSTs could act as flavonoid and glutathione carriers, providing ABC transporters with both molecules for their cotransport. This transport requires free glutathione but no glutathionylation activity ³⁹. Our study suggests that fungal GSTs as their plant homologues could be involved in the transport and sequestration of flavonoids.

METHODS

Reagents

All pure molecules together with the fluorescent marker SYPRO[®] Orange used in TSA were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), except for wogonin provided by Extrasynthese (Genay, France).

Production and purification of proteins

The production in *Escherichia coli* (Rosetta2 DE3 pLysS strain, Novagen) and purification of the six selected TvGSTOs (accession number in the JGI database: TvGSTO1S: Tv75639; TvGSTO2S: Tv56280; TvGSTO3S: Tv48691; TvGSTO4S: Tv65402; TvGSTO5S: Tv54358 and TvGSTO6S: Tv23671) were performed as explained previously ¹⁹.

Study of the thermostability of TvGSTOs

The experiments were performed in 96 well microplates (Harshell, Biorad) and the measurements carried out using a real time PCR detection system (CFX 96 touch, Biorad). The assays were performed as follows: 5 μ L of Tris-HCl (150 mM) pH 8 buffer, 2 μ L of pure molecules dissolved in DMSO (final concentration: 0.8 mg/mL for molecules of the chemical library; 100 μ M for benzophenones and flavonoids), 5 μ L of proteins (contained in Tris-HCl 150 mM, pH 8; final concentration: 40 μ M for the tests with the chemical library; 10 μ M for the other tests), 2 μ L of SYPRO[®] orange (previously diluted 80 fold in ultra-pure water) and 11 μ L of ultra-pure water for a total volume of 25 μ L per well. The plate was centrifuged 30 seconds at 4000g. Fluorescence was measured (excitation: 485 nm; emission: 530 nm) every minute starting from 3 minutes at 5°C while increasing temperature from 5 to 95°C with a step of 1°C per minute. The denaturation temperature (Td), which corresponds to the temperature where 50% of the total fluorescence is measured, was determined by using the non-linear regression Boltzmann sigmoidal model in GraphPad Prism 6 software for data obtained in presence of potential ligands, while the reference was considered for similar experiments conducted by adding DMSO only.

Enzymatic assays and inhibition kinetics

The ability of recombinant enzymes (TvGSTO3S and TvGSTO6S) to catalyze GSH transfer on phenethyl isothiocyanate (PEITC) and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) was estimated as described previously ¹³. Preparation and reduction of glutathionyl-phenylacetophenone (GS-PAP) were monitored as described previously ¹⁸. Competition tests between phenethyl isothiocyanate (PEITC) and benzophenones or flavonoids were performed in a final volume of 500 µL. Inhibition tests of the glutathionylation activity were assayed with various concentrations of PEITC (25 – 300 µM) and a fixed concentration of GSH (1mM) in presence or not of inhibitors. These experiments were carried out in 100 mM pH 6.4 phosphate buffer at 25°C by analyzing the glutathionylated product which absorbs at 274 nm.

Basal activity of samples containing GSH, PEITC and benzophenones was subtracted from the enzyme catalyzed rates. The inhibition constants (K_I) were calculated using the GraphPad software with the nonlinear regression based on the mixed model inhibition.

Inhibition tests of the esterase activity of TvGSTO3S with CMFDA or 4-MUA as substrates in presence of extract fractions were performed in 96-well microplates. The emission of fluorescence at 517 nm and 460 nm after an excitation at 492 nm and at 355 nm for CMFDA and 4-MUA respectively was followed using microplate reader (2030 Multilabel Reader Victor X5, PerkinElmer). Reactions were performed in 200 μ L of Tris-HCl pH 8 (30 mM), EDTA (1 mM) buffer, with 0.5 μ M of CMFDA, 5 μ M of 4-MUA and 1 mM of GSH. Using both fluorescent substrates, TvGSTO3S activity was measured in presence or in absence of 2 μ L of the tested fractions. The ratio between the two slopes (Δ RFU/min, Relative Fluorescence Unit) has been used to determine the potential inhibition.

Fractionation of wild-cherry hardwood acetonic extracts by HPLC

Wild-cherry hardwood acetonic extracts were fractioned by high-performance liquid chromatography. 100 μ L of extract at 10 mg/mL were fractioned by reverse chromatography using Kinetex biphenyl column (250 x 4,6 mm) previously equilibrated with H₂O/Formic acid 0.1% buffer. The molecules adsorbed to the column were eluted with the help of a gradient of methanol (from 0 to 100%). Collected fractions were evaporated using SpeedVacTM (UniEquip) and finally dissolved in DMSO.

NMR and MS analysis on eluate 46-47

¹H NMR spectra were recorded by 512 scans on a Bruker DRX 400 spectrometer with CD_3OD as solvent and processed with Topspin 3.5.

UHPLC-MS/MS analysis of extracts was carried out using an LC-MS-8030 Shimadzu apparatus equipped with a diode array detector SPDM20A. Separation was achieved in thermostat conditions at 40 °C with a reversed-phase column (Phenomenex® Luna 3u C18). Elution was carried out with binary solvent system consisting of water with 0.1% formic acid and acetonitrile with 0.1% formic acid, running at the flow rate 0.4 mL/min. The injection volume was fixed to 2.0 μL. Gradient composition started with 15% v/v of acetonitrile for 3 min, then increased to 85% in 6 minutes and returned to initial condition in 1 min. Detection was performed simultaneously with an UV detector recording the wavelengths between 190 and 800 nm and under total ion monitoring by positive and negative mode ESI-MS from 100 to 2000 m/z. The operating parameters for MS detection were as follows: nebulizing gas (N2), flow 3.0 L/min, drying gas flow15 L/min, interface voltage 4.5 kV, gas pressure 230 kPa, DL temperature: 250 °C, block heater temperature 400 °C.

Crystallogenesis experiments

Crystallization of TvGSTO3S was assayed by the microbatch under oil method at 278 K. TvGSTO3S (13 mg/mL) crystallized by mixing 1 μ L of protein with 3 μ L of commercial solution consisting in 30 % (w/v) PEG 400, 0.2 M calcium acetate in 0.1 M pH 4.5 acetate buffer (Wizard Classic Screen 1, Rigaku). Crystals of the complexes of TvGSTO3S with glutathione (TvGSTO3S - GSH), TvGSTO3S with glutathionyl-dinitrobenzene (TvGSTO3S - GS-DNB) and TvGSTO3S with glutathionyl-phenylacetophenone (TvGSTO3S - GS-PAP) were obtained by soaking apo TvGSTO3S crystals during one hour in the mother liquor containing 10 mM ligand (0.5 mM in the case of GS-PAP). Crystals of the complexes of TvGSTO3S with HBPs (2,3,4-trihydroxybenzophenone, 3,4-dihydroxybenzophenone, 2,4-dihydroxybenzophenone and 2,4,4'-trihydroxybenzophenone) were obtained by co-crystallizing the protein pre-incubated for 30 min with 10 mM ligand. Complex of TvGSTO3S with dihydrowogonin was obtained in a similar way by using 10 mg/mL of partially-purified wild-cherry hardwood extract.

First screening of the TvGSTO6S crystallization conditions was performed by using an Oryx 8 robot (Douglas Instruments) to implement sitting drops with commercial kits of various solutions. Crystals were then optimized by the hanging drop method. The droplet was prepared by mixing 1 μ L of TvGSTO6S (26 mg/mL) with 0.2 μ L of a crystal seed stock obtained by crushing the droplet content of the best hits of the screening step and with 1 μ L of a crystallization solution consisting in 25% (w/v) PEG 1500, 0.1 M pH 6.5 MMT buffer (containing DL-malic acid, MES and Tris base in the molar ratios 1:2:2, respectively). The reservoir contained 1 mL of the same crystallization condition. Attempts using classical co-crystallization or soaking experiments failed to prepare crystals of TvGSTO6S complexes with flavonoids. A new strategy was developed based on the dry co-crystallization method 40. In this original 'dry soaking' technique, 0.2 μ L of naringenin (100 mM) solubilized in DMSO was deposited on a cover slide and left to complete evaporation. Then, one TvGSTO6S crystal together with 1 μ L of its mother liquor was dispensed on the dried naringenin allowing partial ligand resolubilization. The cover slide was then reinstalled above the reservoir that initially allowed crystallization until crystal harvest (ca. 1 day).

Data collection, processing and refinement

TvGSTO3S and -6S crystals were flash-frozen after a quick soaking in their mother liquor complemented with 20 % (v/v) glycerol as cryoprotectant. Primary X-ray diffraction experiments were carried out in-house on a laboratory diffractometer (Agilent SuperNova with CCD detector). Data collection up to 2.5 Å resolution allowed preliminary analysis, especially for ligand screening in TvGSTO3S active site. High resolution diffraction experiments were carried out on the ESRF beamlines FIP BM30A and ID30B (Grenoble, France).

TvGSTO3S and -6S native crystals diffracted up to 1.35 Å and 1.48 Å, respectively. Data sets were indexed, integrated and scaled with XDS⁴¹. The structure of TvGSTO3S was solved by molecular replacement using MR BUMP automated pipeline from CCP4 suite ⁴² with the coordinates of poplar GST Lambda 3 (PDB code 4PQI) as the search model. The electron density of a small molecule that we failed to identify was observed in the H-site. It probably bound to the enzyme during the purification process and was not modelled in the electron density. Some of the structures of TvGSTO3S in complex with ligands displayed electron density corresponding to glutathione remaining from the purification process. When present, this residual GSH was modelled, sometimes with partial occupancy. The structure of TvGSTO6S was solved by molecular replacement using PHASER with the coordinates of TvGSTO3S. All structures were refined with PHENIX ⁴³ and built with COOT ⁴⁴. Restraint files for ligands were generated with phenix.elbow and the grade server (URL http://grade.globalphasing.org/cgi-bin/grade/server.cgi). In all of the concerned structures, the occupancies of the ligands added by co-crystallization or soaking techniques were set to 1 and the corresponding B factors were compatible with full presence of the molecules in their binding sites (except for 2,3,4-HPB where the occupancy is 0.8). Validation of all structures was performed with MolProbity⁴⁵ and the wwPDB validation service (http://validate.wwpdb.org). Coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank. Data-collection and refinement statistics of all structures are shown in Supplementary Table S1. Stereo images of a portion of 2mFo-DFc electron density maps are shown in Supplementary Table S6 to assess quality of the structural data. All figures were prepared by using Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC).

Density functional theory (DFT) calculation of naringenin dimer stabilization in TvGSTO6S (Gaussian09 software ⁴⁶)

The molecular structure of the dimer of naringenin molecules was extracted from the experimental X-ray structure of TvGSTO6S. Geometry optimization of the hydrogen atoms alone was then performed at the DFT level of theory in vacuum (i.e. no environment effect were taken into account), employing the B3LYP functional ⁴⁷ completed with Grimme's D3 dispersion correction ⁴⁸; the 6-111G(d,p) basis set was used, and basis set superposition errors were corrected by the counterpoise method of Bernardi ⁴⁹. The complexation energy at the converged geometrical structure was -13.64 kcal/mol, indicating a strong stabilization of the naringenin molecules within their dimer as found in TvGSTO6S.

Data Availability

The atomic coordinates of the crystal structures from this publication have been deposited to the Protein Data Bank (URL https://www.rcsb.org) and have been assigned the PDB codes 6F43, 6F4B, 6F4F, 6F4K, 6F51, 6F66, 6F67, 6F68, 6F69, 6F6A, 6F70 and 6F71.

Author Contributions Statement

FF, EG and CD developed the concept and supervised this study. EA, TP, MS, SD, MMR, FS, GM performed the experiments, and interpreted the data. All the authors participated in manuscript writing. EG, CD and PG acquired the funding. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank Solène Telliez, Tiphaine Dhalleine, Jean-Michel Girardet and Sandrine Mathiot for technical assistance. A sincere thank you to Pr. Jean-Pierre Jacquot for constructive criticism of the manuscript. This work was granted access to the HPC resources of CCRT/CINES/IDRIS under the allocation A0030807449 made by GENCI. The authors would like to thank ESRF for beamtime, and the staff of beamlines BM30A and ID30B for assistance with crystal testing and data collection. The authors appreciated the access to the 'Plateforme de mesures de diffraction X' of the Université de Lorraine.

Funding

This study was funded by the French National Research Agency (ANR-11-LAS-0002-01), the Centre National de la Recherche Scientifique, the University of Lorraine and the Région Grand Est (MS and TP Grants, PEPS-Mirabelle 2016, CPER 2014-2020, Program "Equipement mi-lourd 2016").

Additional information

Supplementary information accompanies this paper at https://www.nature.com/srep

Accession codes: Accession numbers of TvGSTOs in the JGI database are as follows: TvGSTO1S: Tv75639; TvGSTO2S: Tv56280; TvGSTO3S: Tv48691; TvGSTO4S: Tv65402; TvGSTO5S: Tv54358 and TvGSTO6S: Tv23671.

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

REFERENCES

- 1 Tien, M. & Kirk, T. K. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete-chrysosporium* burds. Science 221, 661-662, doi:10.1126/science.221.4611.661 (1983).
- 2 Floudas, D. et al. The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. Science 336, 1715-1719, doi:10.1126/science.1221748 (2012).
- 3 Eastwood, D. C. et al. The Plant Cell Wall-Decomposing Machinery Underlies the Functional Diversity of Forest Fungi. Science 333, 762-765, doi:10.1126/science.1205411 (2011).
- 4 Nagy, L. G. et al. Genetic Bases of Fungal White Rot Wood Decay Predicted by Phylogenomic Analysis of Correlated Gene-Phenotype Evolution. Molecular biology and evolution 34, 35-44, doi:10.1093/molbev/msw238 (2017).
- 5 Harms, H., Schlosser, D. & Wick, L. Y. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. Nature Reviews Microbiology 9, 177-192, doi:10.1038/nrmicro2519 (2011).
- 6 Morel, M. et al. Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi. Microbial biotechnology 6, 248-263, doi:10.1111/1751-7915.12015 (2013).
- 7 Valette, N., Perrot, T., Sormani, R., Gelhaye, E. & Morel-Rouhier, M. Antifungal activities of wood extractives. Fungal Biology Reviews 31, 113-123, doi:10.1016/j.fbr.2017.01.002 (2017).
- 8 Syed, K., Shale, K., Pagadala, N. S. & Tuszynski, J. Systematic Identification and Evolutionary Analysis of Catalytically Versatile Cytochrome P450 Monooxygenase Families Enriched in Model Basidiomycete Fungi. Plos One 9, doi:10.1371/journal.pone.0086683 (2014).
- 9 Enayati, A. A., Ranson, H. & Hemingway, J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. Insect molecular biology 14, 3-8, doi:10.1111/j.1365-2583.2004.00529.x (2005).
- 10 Schuler, M. A. & Berenbaum, M. R. Structure and Function of Cytochrome P450S in Insect Adaptation to Natural and Synthetic Toxins: Insights Gained from Molecular Modeling. Journal of Chemical Ecology 39, 1232-1245, doi:10.1007/s10886-013-0335-7 (2013).
- 11 Rane, R. V. et al. Are feeding preferences and insecticide resistance associated with the size of detoxifying enzyme families in insect herbivores? Current Opinion in Insect Science 13, 70-76, doi:10.1016/j.cois.2015.12.001 (2016).
- 12 Morel, M., Ngadin, A. A., Droux, M., Jacquot, J. P. & Gelhaye, E. The fungal glutathione Stransferase system. Evidence of new classes in the wood-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Cellular and molecular life sciences : CMLS 66, 3711-3725, doi:10.1007/s00018-009-0104-5 (2009).
- 13 Mathieu, Y. et al. Diversification of Fungal Specific Class A Glutathione Transferases in Saprotrophic Fungi. Plos One 8, doi:10.1371/journal.pone.0080298 (2013).
- 14 Marinović, M. et al. Selective Cleavage of Lignin β-O-4 Aryl Ether Bond by β-Etherase of the White-Rot Fungus *Dichomitus squalens*. ACS Sustainable Chemistry & Engineering 6, 2878-2882, doi:10.1021/acssuschemeng.7b03619 (2018).
- 15 Roret, T. et al. Evolutionary divergence of Ure2pA glutathione transferases in wood degrading fungi. Fungal genetics and biology : FG & B 83, 103-112, doi:10.1016/j.fgb.2015.09.002 (2015).

- 16 Kontur, W. S. et al. *Novosphingobium aromaticivorans* uses a Nu-class glutathione-Stransferase as a glutathione lyase in breaking the beta-aryl ether bond of lignin. The Journal of biological chemistry, doi:10.1074/jbc.RA117.001268 (2018).
- 17 Board, P. G. et al. Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. The Journal of biological chemistry 275, 24798-24806, doi:10.1074/jbc.M001706200 (2000).
- 18 Meux, E. et al. New substrates and activity of *Phanerochaete chrysosporium* Omega glutathione transferases. Biochimie 95, 336-346, doi:10.1016/j.biochi.2012.10.003 (2013).
- 19 Deroy, A. et al. The GSTome Reflects the Chemical Environment of White-Rot Fungi. PLoS One 10, e0137083, doi:10.1371/journal.pone.0137083 (2015).
- 20 Lo, M. C. et al. Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery. Anal Biochem 332, 153-159, doi:10.1016/j.ab.2004.04.031 (2004).
- 21 Wu, S. B., Long, C. L. & Kennell, E. J. Structural diversity and bioactivities of natural benzophenones. Natural product reports 31, 1158-1174, doi:10.1039/c4np00027g (2014).
- 22 Mosedale, J. R. & Puech, J. L. Wood maturation of distilled beverages. Trends in Food Science & Technology 9, 95-101, doi:10.1016/s0924-2244(98)00024-7 (1998).
- 23 Krissinel, E. & Henrick, K. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography 60, 2256-2268, doi:10.1107/s0907444904026460 (2004).
- 24 Thom, R. et al. Structure of a tau class glutathione S-transferase from wheat active in herbicide detoxification. Biochemistry 41, 7008-7020, doi:10.1021/bi015964x (2002).
- 25 Yamamoto, K., Suzuki, M., Higashiura, A. & Nakagawa, A. Three-dimensional structure of a *Bombyx mori* Omega-class glutathione transferase. Biochem Biophys Res Commun 438, 588-593, doi:10.1016/j.bbrc.2013.08.011 (2013).
- 26 Oakley, A. Glutathione transferases: a structural perspective. Drug Metab Rev 43, 138-151, doi:10.3109/03602532.2011.558093 (2011).
- 27 Cox, P. J., Kechagias, D. & Kelly, O. Conformations of substituted benzophenones. Acta crystallographica. Section B, Structural science 64, 206-216, doi:10.1107/S0108768108000232 (2008).
- 28 Badia-Fabregat, M. et al. Degradation of UV filters in sewage sludge and 4-MBC in liquid medium by the ligninolytic fungus *Trametes versicolor*. Journal of environmental management 104, 114-120, doi:10.1016/j.jenvman.2012.03.039 (2012).
- 29 Janjusevic, L. et al. The lignicolous fungus *Trametes versicolor* (L.) Lloyd (1920): a promising natural source of antiradical and AChE inhibitory agents. Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry 32, 355-362, doi:10.1080/14756366.2016.1252759 (2017).
- 30 Brock, J., G., B. P. & Oakley, A. J. Structural insights into omega-class glutathione transferases: a snapshot of enzyme reduction and identification of a non-catalytic ligandin site. Plos One 8, doi:10.1371/journal.pone.0060324.g001 (2013).
- 31 Trabelsi, N. et al. Structural evidence for the inhibition of grape dihydroflavonol 4-reductase by flavonols. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography D64, 883-891, doi:10.1107/S0907444908017769 (2008).

- 32 Ahmad, L., Rylott, E. L., Bruce, N. C., Edwards, R. & Grogan, G. Structural evidence for *Arabidopsis* glutathione transferase AtGSTF2 functioning as a transporter of small organic ligands. FEBS open bio 7, 122-132, doi:10.1002/2211-5463.12168 (2017).
- 33 Mashiyama, S. T. et al. Large-scale determination of sequence, structure, and function relationships in cytosolic glutathione transferases across the biosphere. PLoS biology 12, e1001843, doi:10.1371/journal.pbio.1001843 (2014).
- 34 Aguda, A. H. et al. Affinity Crystallography: A New Approach to Extracting High-Affinity Enzyme Inhibitors from Natural Extracts. Journal of natural products 79, 1962-1970, doi:10.1021/acs.jnatprod.6b00215 (2016).
- 35 McNulty, J. et al. Isolation of flavonoids from the heartwood and resin of *Prunus avium* and some preliminary biological investigations. Phytochemistry 70, 2040-2046, doi:10.1016/j.phytochem.2009.08.018 (2009).
- 36 Kebbi-Benkeder, Z., Colin, F., Dumarcay, S. & Gerardin, P. Quantification and characterization of knotwood extractives of 12 European softwood and hardwood species. Annals of Forest Science 72, 277-284, doi:10.1007/s13595-014-0428-7 (2015).
- 37 Vinciguerra, V., Luna, M., Bistoni, A. & Zollo, F. Variation in the composition of the heartwood flavonoids of *Prunus avium* by on-column capillary gas chromatography. Phytochemical Analysis 14, 371-377, doi:10.1002/pca.730 (2003).
- 38 Dixon, D. P. & Edwards, R. Roles for stress-inducible lambda glutathione transferases in flavonoid metabolism in plants as identified by ligand fishing. The Journal of biological chemistry 285, 36322-36329, doi:10.1074/jbc.M110.164806 (2010).
- 39 Zhao, J. Flavonoid transport mechanisms: how to go, and with whom. Trends in Plant Science 20, 576-585, doi:10.1016/j.tplants.2015.06.007 (2015).
- 40 Gelin, M. et al. Combining 'dry' co-crystallization and in situ diffraction to facilitate ligand screening by X-ray crystallography. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography 71, 1777-1787, doi:10.1107/S1399004715010342 (2015).
- 41 Kabsch, W. Xds. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography 66, 125-132, doi:10.1107/S0907444909047337 (2010).
- 42 Winn, M. D. et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography 67, 235-242, doi:10.1107/S0907444910045749 (2011).
- 43 Adams, P. D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography 66, 213-221, doi:10.1107/S0907444909052925 (2010).
- 44 Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography 60, 2126-2132, doi:10.1107/S0907444904019158 (2004).
- 45 Davis, I. W., Murray, L. W., Richardson, J. S. & Richardson, D. C. MOLPROBITY: structure validation and all-atom contact analysis for nucleic acids and their complexes. Nucleic Acids Res 32, W615-619, doi:10.1093/nar/gkh398 (2004).
- 46 Frisch, M. J. et al. (Wallingford CT, 2009).

- 47 Becke, A. D. Density- functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. The Journal of Chemical Physics 98, 5648-5652, doi:10.1063/1.464913 (1993).
- 48 Grimme, S., Antony, J., Ehrlich, S. & Krieg, H. A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu. The Journal of Chemical Physics 132, 154104, doi:10.1063/1.3382344 (2010).
- 49 Boys, S. F. & Bernardi, F. The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies. Some procedures with reduced errors. Molecular Physics 19, 553-566, doi:10.1080/00268977000101561 (1970).

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Table of content

Supplementary Figures

Figure S1. Effects of different compounds from the chemical library on the thermostability of six TvGSTOS isoforms
Figure S2. Multiple sequence and structure alignment of GSTs from T. versicolor, human GSTO1 and wheat GSTU
Figure S3. GSTO3S active site composed of the glutathione binding site (G-site) and the hydrophobic binding site (H-site)
Figure S4. Binding of glutathionyl-derivatives in the GSTO3S active site 182
Figure S5. Binding of 3,4- and 2,3,4-hydroxy benzophenones in the GSTO3S hydrophobic binding site (H-site)
Figure S6. Slice view of the L-sites of TvGSTO3S (left) and TvGSTO6S (right) located at the dimer interface
Figure S7. Binding of dihydrowogonin in the GSTO3S hydrophobic binding site (H-site) 184

Supplementary Tables

Table S1. Diffraction and refinement statistics 185
Table S2. Kinetic parameters of TvGSTO3S and TvGSTO6S toward CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene), PEITC (phenethyl isothiocyanate) and GS-PAP (glutathionylphenylacetophenone)
Table S3. Summary of the results obtained with thermal-shift assays and inhibition constants(Ki) obtained for TvGSTOSs with hydroxybenzophenones (HBPs)
Table S4. Effects of several flavonoids on the thermostability of TvGSTOSs
Table S5. Inhibition constants (K _I) of TvGSTO3S and TvGSTO6S by wogonin and naringenin
Table S6. Stereo images of 2mFo-DFc electron density maps for each of the eleven structures solved in this study 193

References






Figure S1. Effects of different compounds from the chemical library on the thermostability of six TvGSTOS isoforms

Red and blue lines correspond to the addition of the average with the positive and negative standard deviations respectively. Thermostability has been analysed by using 40 μ M of protein; the final concentration of molecules tested was of 0.8 mg/mL in each well.

	β1	α1	β2	$\alpha 2$	<i>β3</i>	β4	a3	a	1
	\rightarrow	uuuuuu	→	eeee	→	→	uuuuu	eeeee	eee
TVGSTO1S TVGSTO2S TVGSTO4S TVGSTO4S TVGSTO5S TVGSTO5S hsGSTO1-1EEM AtGSTU-1GWC	2 12	21 22 24 25 29 29 29 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20	11 14 14	 48 WYAQKVNTE- -EWYKRVNP- DWFPLVNP- -EWYYQINP- -WYNTKVNP- WYQKKVYPD- -EWFFKKNP- -ELLLKSNPV	57 67 67 67 67 67 67 67 67 67 67 67 67 67	76 AL SGDAVGIP P SPESEKVE: P SPESAKIAE: P SPESAKIAE: P SPEAAKINE: AP SPDAAKIPE: GQLIYE: GAPVCE	86 IVILEFIADI F LALLEFVADV F LALLEFVADV F MAILEFLADI F TVILEFLADI F IVILEFLADI F AITCEYLDEA Y MILLQYIDEV FAS	94 104 PDAHLLP ADPTIRA PDAKLLP ASPVQRA PDAKLLP ASPVQRA PDAKLLP ADPVLRA PDAHLLP SDPVLRA PAAHLLP SDPVLRA PGKKLLP DDPYEKA TGPSLLP ADPYERA	 RAR RAR KAR QAR RAR CQK IAR
	α4	a.5			a.6	a6'	α7	a8 a	z9
	uuuuuuuuu	uuuuuuu		uuuu	uuuuuu u	mmm	uuuuu	e eeeee e	ee
TvGST01S TvGST02S TvGST04S TvGST04S TvGST05S TvGST05S hsGST01-1EEM AtGSTU-1GWC	114 123 LFYISELIAGL SKEWGIEF MGM AFLATYONII -HOJEDAFT RGE TEMALYENYY -NGÇERDYME LGT TFTDEFRHYY -SKEPKAFF LGT LVIAGWEAKG -FEGERDFF MIQATS LFTTGAVETE LLFAGKAFFL MGG MILLEFSKVPSLVGSFIR SONKEDYAG FWVAYVDDKL -VAPWRQWLR GKTEEEKSE	II.AGLD IQGRI P UKDLIAGLDD IQGRI P VGFLQALET LQSAI P ADPLLQALEM LQGAI P UAGVLQALEK LQAAI P EXTLLDGLDA FQARI P DAMLAALDA LQARI L KEPFRKEFTK LEEVI G KKQAFAAVGV LEGAI	17 153 17 153 17 153 17 153 17 153 17 153 17 153 17 157 17 157	163 SIADAALPT SIADAALPT SIAEAAVAPF SIADAAVIPF SIADAAVAPF SIADAAVMPI SMDDYLIWPW GLVDVALGGV	173 182 LIRULALKD GIGLCKES LARMHIXL-D AGLGKYSE LARMFEXL-E AGLGLYSK ITRLFLFV-R VGLGSYTE LIRADIST LEVGFRP FERLEAMK- LSWMKVTE-	192 192 DL KEAYEVVEES AD GETMRAALAS ED GVKMRKAMAS EN WLMLRDALES GE GKKVYEVLQ GA APVVRALES INEC1 AL SGDKIFDJ	202 PKYARLRQYI DDN E ERFARLSQYV RDI E ERFARLRQYV RDI E ERFARLRKYV QDI F PRFARLRKYL DDV S PRFARLCRYI ADM V DHTPKLKLWM AAM A AKTPLLAAWV ERF	ARPNVA RSWDPAA ARASFV KSWGGDD ARPSFA NTWAGDA HERPSFK KTWGDDA KEHPTIK TTWDEAL VARPSMA ATWDEAA KEDPTVS ALLTSEK IELDAAK AALPDVG	 IKA VQL EQV RQV QFG VKA DWQ RLL
	a9								
	eeee								
TvGST01S TvGST02S TvGST03S TvGST04S TvGST04S TvGST05S TvGST06S hsGST01-1EEM	232 FEQRIKI-F RAMDPTATRI PAHIYSQP EAAKAIPMLRRP A EAAKVPMLR VGEHH H EAKVPMLR RRAEPIAQPP A IWSQNEMFKR A GFLELYLQNS PEACDYGL GPLMIDES								

Figure S2. Multiple sequence and structure alignment of GSTs from T. versicolor, human **GSTO1** and wheat **GSTU**

Sequences of TvGSTOs were retrieved from the Joint Genome Institute (URL https://jgi.doe.gov/) database (accession numbers: TvGSTO1S 75639, TvGSTO2S 56280, TvGSTO3S 48691, TvGSTO4S 65402, TvGSTO5S 54358 and TvGSTO6S 23671). Structures of TvGSTO3S and TvGSTO6S solved in this study and structures of human GSTO1 (PDB code 1eem) and wheat AtGSTU (PDB code 1gwc) were used as input structures in Promals3D¹. Catalytic motifs, conserved glutathione binding site residues and conserved hydrophobic binding site residues of TvGSTOS isoforms are highlighted in yellow, green and blue, respectively. Residues of the non-catalytic ligandin site of TvGSTO6S and corresponding positions in TvGSTOS isoforms are highlighted in grey. Secondary structures identified in TvGSTO3S structure are reported above the alignment. Residues are numbered according to the TvGSTO3S sequence.



Figure S3. GSTO3S active site composed of the glutathione binding site (G-site) and the hydrophobic binding site (H-site)

Section of the TvGSTO3S active site is shown. N-terminal domain bearing the G-site residues is displayed in white and C-terminal domain bearing the H-site residues is shown in black. Glutathione is represented as green sticks. Polar residues at the entrance of the H-site are colored in violet.



Figure S4. Binding of glutathionyl-derivatives in TvGSTO3S active site

Sections of TvGSTO3S complex structures with glutathionyl-derivatives are shown in the left column. The corresponding chemical structures of the glutathionyl-derivatives are shown in the right column. Surrounding side chains are represented by sticks. Glutathionyl-derivatives are shown as green sticks and spheres. 2mFo-DFc composite omit maps shown at 1.0 σ around glutathionyl-derivatives were calculated by PHENIX.



Figure S5. Binding of 3,4- and 2,3,4-hydroxy benzophenones in the GSTO3S hydrophobic binding site (H-site)

Stereoviews of sections of the TvGSTO3S complex structures with 3,4-HBP (top view) and 2,3,4-HBP (bottom view) are shown. Polar intermolecular contacts are materialized as dashed lines. Surrounding side chains are represented by sticks. HBPs are shown as yellow sticks and spheres. 2mFo-DFc composite omit maps shown at 1.0 σ around HBPs were calculated by PHENIX.



Figure S6. Slice view of the L-sites of TvGSTO3S (left) and TvGSTO6S (right) located at the dimer interface

The monomers A (cyan) and B (green) are related by a two-fold axis depicted as a black ellipsoid. Both L-sites exhibit a rectangular section with dimensions 7 Å by 4 Å for TvGSTO3S and 8 Å by 6 Å for TvGSTO6S. The protein surface is represented by a Connolly surface generated with PyMol.





Stereo view of the TvGSTO3S complex structure with dihydrowogonin is shown. Polar intermolecular contacts are materialized as dashed lines. Surrounding side chains are represented in sticks. Dihydrowogonin is shown as yellow sticks and spheres.

		TvGSTO3S apo	TvGSTO3S - GSH	TvGSTO3S - GS-DNB
Diffraction data				
	Diffraction source	FIP-BM30A, ESRF	FIP-BM30A, ESRF	FIP-BM30A, ESRF
	Detector	ADSC Q315r CCD	ADSC Q315r CCD	ADSC Q315r CCD
	Wavelength (Å)	0.97975	0.97973	0.97974
	Unit-cell parameters			
	a, b, c (Å)	50.5 104.5 107.7	50.5 104.2 107.9	50.4 103.7 107.3
	α, β, γ (°)	90	90	90
	Space group	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
	Resolution range (Å)	47.88 - 1.35 (1.39 -1.35)	47.92 - 1.55 (1.59 -1.55)	41.78 - 1.75 (1.80 - 1.75)
	Total No. of reflections	1,024,564 (58,855)	586,955 (30,824)	186,029 (13,780)
	No. of unique reflections	125,602 (9203)	82,933 (5,773)	56,918 (4,185)
	Average redundancy	8.2 (6.4)	7.1 (5.3)	3.3 (3.3)
	Mean I/ $\sigma(I)$	16.5 (1.7)	22.2 (1.9)	13.2 (1.5)
	Completeness (%)	100 (99.9)	99.5 (94.4)	98.8 (99.5)
	R _{merge}	0.071 (1.13)	0.062 (0.869)	0.081 (0.821)
	R _{meas}	0.076 (1.23)	0.067 (0.964)	0.097 (0.977)
	CC _{1/2}	0.99 (0.58)	1.00 (0.63)	0.97 (0.54)
Refinement				
	Resolution range (Å)	47.88 - 1.35 (1.36 - 1.35)	47.92 - 1.55 (1.57 - 1.55)	41.78 - 1.75 (1.78 - 1.75)
	R _{work} / R _{free}	0.13 / 0.17 (0.25 / 0.31)	0.16 / 0.18 (0.27 / 0.28)	0.16 / 0.21 (0.30 / 0.35)
	No. of protein atoms	7,566	7,566	7,597
	No. of waters	482	499	461
	Average B factor (Å ²)	20.3	20.3	22.2
Model quality				
	RMSZ bond lenghts	0.66	0.67	0.62
	RMSZ bond angles	0.78	0.75	0.74
	Ramachandran favoured (%)	98.3	98.5	97.9
	Ramachandran outliers (%)	0.0	0.2	0.4
	Molprobity rotamer outliers (%)	0.0	0.0	0.3
	Molprobity clashscore	0.39	1.03	1.93
	Molprobity score	0.64	0.80	0.98
PDB entry		6F43	6F4B	6F4F

Table S1. Diffraction and refinement statistics

$$\begin{split} \mathbf{R}_{\text{merge}} &= \sum_{hkl} \sum_{i} |I_{i}(hkl) - \langle I(hkl) \rangle | / \sum_{hkl} \sum_{i} I_{i}(hkl). \\ \mathbf{R}_{\text{meas}} &= \sum_{hkl} \{ N(hkl) / [N(hkl) - 1] \}^{1/2} \sum_{i} |I_{i}(hkl) - \langle I(hkl) \rangle | / \sum_{hkl} \sum_{i} I_{i}(hkl). \end{split}$$

 $CC_{1/2}$ is the correlation coefficient of the mean intensities between two random half-sets of data².

 $R_{\text{work}} = \sum_{hkl} ||F_{obs}| - |F_{calc}|| / \sum_{hkl} |F_{obs}|$. 5 % of reflections were selected for R_{free} calculation. R.m.s.z. : root mean square Z-score ³. The molprobity clashscore is the number of serious clashes per 1000 atoms ⁴. The molprobity score is a log-weighted combination of the clashscore, percentage Ramachandran not favoured and percentage bad side-chain rotamers ⁴. Values in parentheses are for highest resolution shell.

		TvGSTO3S - GS-PAP	TvGSTO3S - 2,4 HBP	TvGSTO3S - eluate 46-47
Diffraction data				
	Diffraction source	FIP-BM30A, ESRF	FIP-BM30A, ESRF	FIP-BM30A, ESRF
	Detector	ADSC Q315r CCD	ADSC Q315r CCD	ADSC Q315r CCD
	Wavelength (Å)	0.97973	0.98142	0.98140
	Unit-cell parameters			
	a, b, c (Å)	50.5 104.4 106.2	50.5 104.6 107.7	50.5 104.5 108.0
	α, β, γ (°)	90	90	90
	Space group	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	P212121
	Resolution range (Å)	46.84 - 1.92 (1.97 - 1.92)	47.89 - 1.75 (1.79 - 1.75)	47.97 - 1.70 (1.74 - 1.70)
	Total No. of reflections	303,701 (15,533)	242,605 (9,897)	461,368 (34,288)
	No. of unique reflections	43,310 (2,912)	57,643 (4,022)	63,676 (4,684)
	Average redundancy	7.0 (5.3)	4.2 (2.5)	7.2 (7.3)
	Mean I/ $\sigma(I)$	17.1 (1.8)	10.8 (1.4)	19.8 (2.4)
	Completeness (%)	99.2 (91.4)	98.6 (94.4)	100 (99.9)
	R _{merge}	0.093 (1.03)	0.090 (0.614)	0.074 (0.883)
	R _{meas}	0.100 (1.14)	0.103 (0.758)	0.080 (0.950)
	CC _{1/2}	1.00 (0.54)	1.00 (0.57)	1.00 (0.75)
Refinement				
	Resolution range (Å)	46.84 - 1.92 (1.97 - 1.92)	47.89 - 1.75 (1.78 - 1.75)	47.97 - 1.70 (1.73 - 1.70)
	R _{work} /R _{free}	0.17 / 0.22 (0.28 / 0.34)	0.19 / 0.22 (0.29 / 0.31)	0.16 / 0.19 (0.23 / 0.25)
	No. of protein atoms	7,522	7,545	7,565
	No. of waters	327	463	311
	Average B factor (Å ²)	28.2	20.5	21.5
Model quality				
	RMSZ bond lenghts	0.59	0.74	0.63
	RMSZ bond angles	0.68	0.76	0.71
	Ramachandran favoured (%)	98.5	98.5	98.8
	Ramachandran outliers (%)	0.0	0.0	0.2
	Molprobity rotamer outliers (%)	1.6	0.0	0.0
	Molprobity clashscore	1.56	2.20	1.93
	Molprobity score	1.05	1.00	0.96
PDB entry		6F51	6F66	6F6A

		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		
Diffraction data	L			
	Diffraction source	FIP-BM30A, ESRF	FIP-BM30A, ESRF	ID30B, ESRF
	Detector	ADSC Q315r CCD	ADSC Q315r CCD	PILATUS 6M-F
	Wavelength (Å)	0.97992	0.98142	0.97625
	Unit-cell parameters			
	a, b, c (Å)	50.6 105.7 105.4	50.7 104.8 108.3	50.4 104.2 107.1
	α, β, γ (°)	90	90	90
	Space group	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
	Resolution range (Å)	47.23 - 2.40 (2.46 - 2.40)	47.20 - 1.70 (1.74 - 1.70)	47.62 - 1.80 (1.85 - 1.80)
	Total No. of reflections	124,297 (7,915)	306,585 (20,269)	169,481 (10,890)
	No. of unique reflections	22,688 (1,536)	64,275 (4,473)	49,835 (3,534)
	Average redundancy	5.5 (5.2)	4.8 (4.5)	3.4 (3.1)
	Mean I/ $\sigma(I)$	12.4 (2.6)	19.3 (3.45)	8.0 (2.1)
	Completeness (%)	99.5 (94.3)	99.4 (95.0)	94.3 (91.9)
	R _{merge}	0.146 (0.740)	0.050 (0.413)	0.089 (0.387)
	R _{meas}	0.161 (0.822)	0.056 (0.467)	0.103 (0.458)
	CC _{1/2}	1.00 (0.76)	1.00 (0.89)	0.99 (0.62)
Refinement				
	Resolution range (Å)	47.23 - 2.40 (2.51 - 2.40)	47.20 - 1.70 (1.72 - 1.70)	47.62 - 1.80 (1.84 - 1.80)
	R _{work} / R _{free}	0.18 / 0.21 (0.22 / 0.28)	0.16 / 0.19 (0.20 / 0.26)	0.22 / 0.27 (0.28 / 0.32)
	No. of protein atoms	7,530	7,582	7,567
	No. of waters	161	350	182
	Average B factor (Å ²)	38.8	22.5	24.9
Model quality				
	RMSZ bond lenghts	0.71	0.59	0.69
	RMSZ bond angles	0.74	0.71	0.78
	Ramachandran favoured (%)	96.4	98.5	97.3
	Ramachandran outliers (%)	0.4	0.2	0.4
	Molprobity rotamer outliers (%)	1.8	0.3	1.0
	Molprobity clashscore	2.76	0.64	3.14
	Molprobity score	1.49	0.71	1.25
PDB entry		6F67	6F68	6F69

TvGSTO3S - 3,4 HBP TvGSTO3S - 2,4,4' HBP TvGSTO3S - 2,3,4 HBP

		TvGSTO6S apo	TvGSTO6S - naringenin
Diffraction data			
	Diffraction source	ID30B, ESRF	FIP-BM30A, ESRF
	Detector	PILATUS 6M-F	ADSC Q315r CCD
	Wavelength (Å)	0.97625	0.97994
	Unit-cell parameters		
	a, b, c (Å)	53.1 78.5 67.9	73.8 78.9 93.6
	α, β, γ (°)	90 106.6 90	90 101.5 90
	Space group	P2 ₁	P2 ₁
	Resolution range (Å)	42.69 - 1.48 (1.52 - 1.48)	49.35 - 2.30 (2.36 - 2.30)
	Total No. of reflections	226,748 (14,990)	171,767 (8,812)
	No. of unique reflections	85,232 (6,051)	46,447 (3,139)
	Average redundancy	2.7 (2.5)	3.7 (2.8)
	Mean I/ $\sigma(I)$	14.5 (2.6)	8.9 (1.8)
	Completeness (%)	96.0 (92.7)	99.0 (91.3)
	R _{merge}	0.039 (0.363)	0.135 (0.599)
	R _{meas}	0.047 (0.457)	0.158 (0.748)
	CC _{1/2}	1.00 (0.68)	0.99 (0.68)
Refinement			
	Resolution range (Å)	42.69 - 1.48 (1.50 - 1.48)	49.35 - 2.30 (2.35 - 2.30)
	R _{work} / R _{free}	0.15 / 0.18 (0.27 / 0.30)	0.17 / 0.23 (0.22 / 0.30)
	No. of protein atoms	7,609	7,484
	No. of waters	572	472
	Average B factor (Å ²)	22.7	33.0
Model quality			
	RMSZ bond lenghts	0.62	0.64
	RMSZ bond angles	0.76	0.72
	Ramachandran favoured (%)	99.0	97.7
	Ramachandran outliers (%)	0.0	0.2
	Molprobity rotamer outliers (%)	0.5	1.7
	Molprobity clashscore	1.43	2.71
	Molprobity score	0.88	1.30
PDB entry		6F70	6F71

Table S2. Kinetic parameters of TvGSTO3S and TvGSTO6S toward CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene), PEITC (phenethyl isothiocyanate) and GS-PAP (glutathionylphenylacetophenone)

The kinetic parameters were calculated using the GraphPad software with the nonlinear regression based on the Michaelis-Menten. "ND" means that no activity has been detected.

TvGSTO3S	CDNB	PEITC	GS-PAP
K _M (μM)	897.80 ± 85.20	12.20±1.44	ND
Kcat (s ⁻¹)	26.64 ± 0.95	3.09 ± 0.05	ND
kcat/K _M (M ⁻¹ .s ⁻¹)	(2.97 ± 0.11)E+04	(2.53 ± 0.04)E+05	ND
TvGSTO6S	CDNB	PEITC	GS-PAP
K _M (μM)	910.40 ± 86.77	24.51 ± 2.99	ND
Kcat (s ⁻¹)	4.94 ± 0.17	11.38±0.36	ND
kcat/K _M (M ⁻¹ .s ⁻¹)	(5.43 ± 0.18)E+03	(4.65 ± 0.15)E+05	ND

Table S3. Summary of the results obtained with thermal-shift assays and inhibition constants(Ki) obtained for TvGSTOSs with hydroxybenzophenones (HBPs)

"NS" means that temperature denaturation has not been significantly modified. " Δ Td" corresponds modification of the denaturation temperature which is significantly different when the protein is incubated with only DMSO. "NI" means that no inhibition was detected. Ki have been determined with GraphPad Prism software using the mixed model inhibition. For asymmetric molecules, the less substituted phenyl ring (*i.e.* the left one on the drawing) is named **B** and the more substituted one (right) is named **A**.

Molecules	Structures	Thermal shift (°C)	Inhibition constant (µM)
Benzophenone	BA	NS	NI
2.2'- Dihydroxybenzophenone	OH O OH	NS	NI
2.4- Dihydroxybenzophenone	о он	ΔTd = 5.69°C	2.00 ± 0.67
3.4-Dihydroxybenzophenone	ОННО	ΔTd = 4.36°C	0.81±0.29
4.4'-Dihydroxybenzophenone	ностори	ΔTd = 1.67°C	NI
2.3.4- Trihydroxybenzophenone	о он он он он	ΔTd = 4.96°C	0.58±0.18
2.4.4'- Trihydroxybenzophenone	о он	ΔTd = 2.87°C	14.51±7.05
2.2'.4.4'- Tetrahydroxybenzophenone	ОН О ОН	NS	NI
2-Hydroxy-4- methoxybenzophenone	O OH OCH3	NS	NI

Table S4. Effects of several flavonoids on the thermostability of TvGSTOSs

Thermostability was analysed by using 10 μ M of protein. The final concentration of the tested molecules was 100 μ M in each well. A Δ Td value is only given if the denaturation temperature is significantly modified in the presence of compounds, with respect to incubation with DMSO only. "NS" means that the denaturation temperature has not changed significantly.

Molecules	Structures	TvGSTO1S	TvGSTO2S	TvGSTO3S	TvGSTO4S	TvGSTO5S	TvGSTO6S
Wogonin	HO OH O HO OCH ₃ B	NS	4.44°C	4.40°C	NS	NS	2.78°C
Scutellarein	HO HO HO HO	3.85°C	NS	NS	NS	-11.49°C	2.51°C
Baicalein	HO HO HO	3.39°C	NS	1.81°C	1.31°C	-3.91°C	5.03°C
Chrysin	HO	2.10°C	3.45°C	2.41°C	NS	NS	5.85°C
Pinocembrin	HO	2.32°C	1.95°C	1.47°C	NS	NS	0.94°C
Quercetin	он о но от он он он он он	2.72°C	6.31°C	2.63°C	2.85°C	5.57°C	5.72°C
Catechin	HO HO HOH . HIO	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Naringenin	HO CO COH	NS	NS	NS	NS	NS	1.92°C

<u>Résultats – Chapitre I – Article n°2</u>

Table S5. Inhibition constants (Ki) of TvGSTO3S and TvGSTO6S by wogonin and naringenin

Ki have been determined with GraphPad Prism software using the mixed model inhibition. "NI" means that no inhibition was detected.

Molecules	Structures	TvGSTO3S Inhibition constant (μM)	TvGSTO6S Inhibition constant (μM)
Wogonin	HO OCH ₃ B	2.89±1.24	NI
Naringenin	НО ОН О	NI	NI

Table S6. Stereo images of 2mFo-DFc electron density maps for each of the eleven structures solved in this study

For each panel, stereo images of a portion of 2mFo-DFc electron density maps are shown to assess quality of the structural data (level at 1.0 σ). Residues from TvGSTO3S structures (F14, S15, P16, Y17, F128 and Y175) and TvGSTO6S structures (A14, S15, P16, F17, F219 and F232) are shown as green sticks.



TvGSTO3S - 2,4,4'-HBP (1.70 Å)



TvGSTO6S - naringenin (2.30 Å)



TvGSTO3S - GSH (1.55 Å)



TvGSTO3S - GS-PAP (1.92 Å)



TvGSTO3S - 2,3,4-HBP (1.80 Å)



TvGSTO3S - 2,4-HBP (1.75 Å)





TvGSTO3S - eluate 46-47 (1.70 Å)

References

- 1 Pei, J. M. & Grishin, N. V. in *Multiple Sequence Alignment Methods* Vol. 1079 *Methods in Molecular Biology* (ed D. J. Russell) 263-271 (2014).
- 2 Karplus, P. A. & Diederichs, K. Linking crystallographic model and data quality. *Science* **336**, 1030-1033, doi:10.1126/science.1218231 (2012).
- 3 Tickle, I. J. Experimental determination of optimal root-mean-square deviations of macromolecular bond lengths and angles from their restrained ideal values. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **63**, 1274-1281; author reply 1282-1273, doi:10.1107/S0907444907050196 (2007).
- 4 Davis, I. W., Murray, L. W., Richardson, J. S. & Richardson, D. C. MOLPROBITY: structure validation and all-atom contact analysis for nucleic acids and their complexes. *Nucleic Acids Res* **32**, W615-619, doi:10.1093/nar/gkh398 (2004).

Etude des GSTs de la classe Omega de Trametes versicolor ayant une sérine dans le site actif (*TvGSTOS*) - *Utilisation des TvGSTOS comme outils pour évaluer la composition chimique du bois.*

Article n°3: Fungal glutathione transferases as tools to explore the chemical diversity of Amazonian wood extractives

Thomas Perrot[†], Mathieu Schwartz[†], Fanny Saiag, Guillaume Salzet, Stéphane Dumarçay, Frédérique Favier, Philippe Gérardin, Jean-Michel Girardet, Rodnay Sormani, Mélanie Morel-Rouhier, Nadine Amusant, Claude Didierjean and Eric Gelhaye

† Co-auteurs

Cet article est en cours de révision dans ACS Sustainable Chemistry and Engineering.

Précédemment, nous avons montré, en utilisant une combinaison d'approches biochimiques et structurales appliquées à des molécules commerciales et pures, que les TvGSTOS interagissaient avec des composés appartenant à deux classes de polyphénols : les benzophénones et les flavonoïdes.

Dans ce troisième article, nous avons voulu appliquer cette combinaison sur des extraits de bois pour identifier de nouveaux ligands naturels pour ces enzymes. Pour cela, une collaboration avec le laboratoire Ecologie des Forêts de Guyane (EcoFoG) a permis d'obtenir les bois de différentes essences forestières retrouvées dans les forêts tropicales de Guyane Française. A l'aide d'une collaboration avec le laboratoire d'Etudes et de Recherche sur le Matériau Bois (LERMAB), les molécules de bois pour huit essences ont été extraites en utilisant un gradient de polarité à l'aide de quatre solvants : le dichlorométhane, l'acétone, un mélange toluène/éthanol et l'eau. Au total, 32 extraits ont été obtenus. Dans un premier temps, des expériences de thermostabilité entre les 32 extraits et les six TvGSTOS ont été effectuées. Puis, des propriétés biologiques de ces extraits comme la capacité à inhiber la croissance de bactéries (activité antibactérienne) et de champignons (activité antifongique) ont été évaluées. De plus, leurs propriétés antioxydantes ont également été estimées en mesurant la teneur en composés phénoliques et l'activité réductrice de ces extraits. L'ensemble des résultats obtenus ont été analysés par des tests statistiques.

De façon intéressante, une corrélation significative entre les propriétés antimicrobienne et antioxydante des ces extraits et les décalages thermiques induits sur la protéine TvGSTO2S a été obtenue. Parmi les extraits les plus réactifs, l'extrait acétonique de bois de *Bagassa guianensis* a été sélectionné dans la suite de cette étude. Par analyse en chromatographie gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse, la composition chimique de cet extrait a révélé la présence d'un composé majoritaire appartenant à la classe des stilbènes : l'oxyresvératrol. L'interaction entre le stilbène et TvGSTO2S a été analysée selon différentes méthodes : (i) par des mesures de dénaturation thermique, (ii) par des tests d'inhibition de l'activité de glutathionylation et (iii), par l'utilisation d'une technologie permettant de suivre en temps réel l'interaction entre la protéine et son ligand. Enfin, des complexes obtenus après trempage des cristaux de TvGSTO2S dans une solution d'oxyresvératrol a permis d'identifier les sites potentiels impliqués dans la reconnaissance du stilbène.

<u>Résultats – Chapitre I – Article n°3</u>

Fungal glutathione transferases as tools to explore the chemical diversity of Amazonian wood extractives

Thomas Perrot^{†∞}, Mathieu Schwartz^{‡∞}, Fanny Saiag[†], Guillaume Salzet[†], Stéphane Dumarçay[§], Frédérique Favier[‡], Philippe Gérardin[§], Jean-Michel Girardet[†], Rodnay Sormani[†], Mélanie Morel-Rouhier[†], Nadine Amusant[¤], Claude Didierjean[‡] and Eric Gelhaye^{†*}

[†]Université de Lorraine, INRA, IAM, F-54000 Nancy, France [‡]Université de Lorraine, CNRS, CRM2, F-54000 Nancy, France [§]Université de Lorraine, INRA, LERMAB, F-54000 Nancy, France [¤]CIRAD, UMR Ecofog, 97310 Kourou, cedex -France *Corresponding author: eric.gelhaye@univ-lorraine.fr

 $^{\infty}$ These authors contributed equally to this work.

Keywords

Trametes versicolor, Amazonian wood species, *Bagassa guianensis*, Glutathione transferase, Stilbene



Synopsis

A fungal glutathione transferase can be used as a tool to investigate the chemical reactivity of wood extracts.

ABSTRACT

The natural durability of wood is linked to its chemical composition and in particular the presence of metabolites called extractives that possess often chemical reactivity. To deal with these compounds, wood degraders have developed detoxification systems usually involving enzyme families. Among these enzymes, glutathione transferases (GSTs) are involved in the decrease of the reactivity of toxic compounds. In this study, the hypothesis that the detoxification systems of wood decaying fungi could be indicators of the chemical reactivity of wood extracts has been tested. This approach has been evaluated using thirty-two wood extracts coming from French Guiana species, testing their antimicrobial ability, their antioxidative properties and their reactivity against six GSTs from the white rot *Trametes versicolor*. From the obtained data, a significant correlation between the antimicrobial and antioxidative properties of the tested wood extracts and GSTs interaction was detected. In addition, the chemical analysis performed on one of the most reactive extract (*Bagassa guianensis*) has demonstrated the presence of a major compound. Taken together, the presented data support the hypothesis that detoxifying enzymes could be used to identify presence of molecules of industrial interest in wood extracts.

INTRODUCTION

Wood is a major renewable resource with many fields of application as energy, building or molecules production. Beyond the presence of structural polymers (cellulose, hemicellulose and lignin), wood also contains secondary metabolites, called extractives. Although the functions of these wood molecules often remain unclear, they usually possess properties of interest such as antimicrobial and anti-oxidative activities.(Anouhe et al., 2015; Rodrigues et al., 2010) Due to their properties, these compounds could be used for several industrial purposes in particular for wood preservation, crop protection, medicinal treatments or cosmetic.(Valette et al., 2017a) However, they could be also a problem for lignocellulosic biomass valorization limiting its enzymatic digestibility.(Frankó et al., 2018)

The diversity and the potential toxicity of these extractives suggest that wood degraders and in particular wood decaying fungi are adapted to the presence of these potential toxic molecules.(Morel et al., 2013b) Beyond their extracellular systems, which allow them to degrade lignocellulosic substrates (Riley et al., 2014b; Nagy et al., 2017a), wood-decaying fungi possess indeed extended detoxifying enzyme families, such as cytochrome P450 monooxygenases (P450s) and glutathione transferases (GSTs).(Morel et al., 2013b) Such extensions are also found in herbivorous insects, these multigenic families playing key functions in the detoxification of plant defence chemicals and also in the evolution of metabolic resistance to chemical insecticides.(Rane et al., 2016) Concerning GSTs, their activity or even their expression are widely used to evaluate physiological and environmental stress of diverse organisms, from mollusc to human. (Capolupo et al., 2016; Hollman et al., 2016; Mohanty, Samanta, 2016) In wood-decaying fungi, the extension of GST family concerns mainly specific phylogenetically based classes named Ure2p, GST Omega (GSTO) and GSTFuA.(Roret et al., 2015b; Meux et al., 2013b; Mathieu et al., 2013a) GSTFuA are able to cleave lignin β -O-4 aryl ether bond in the white-rot fungus Dichomitus squalens. (Marinović et al., 2018b) In addition, GSTOs from Trametes versicolor interact with wood extracts from temperate forest(Deroy et al., 2015a) and more particularly with polyphenols such as hydroxylbenzophenones and flavonoids. (Schwartz et al., 2018) In this context, we postulated that GSTs could be used as tools to identify wood extracts that possess interesting biological properties. To test this hypothesis, we investigated the biochemical interactions between six GSTOs from Trametes versicolor (Deroy et al., 2015a) and an environmental collection of wood extracts. Trametes versicolor is common and widespread in boreal and temperate northern hemisphere and also occur in tropical areas of both hemispheres.(Carlson et al., 2014b) The six studied GST isoforms, which contain a serinyl residue in their active site, belong to the fungal type-III Omega class. The tridimensional structures of two of them, TvGSTO3S and TvGSTO6S, have been recently solved.(Schwartz et al., 2018) The extracts came from French Guiana woody species, known to be naturally durable against fungi.(Anouhe et al., 2015; Rodrigues et al., 2010; Royer et al., 2012)

Using high-throughput biochemical methods, we show here that the biochemical interactions of one isoform with the tested wood extracts are highly correlated with the chemical property (antioxidative and antimicrobial properties) of these compounds. Additional biochemical and structural experiments demonstrated the interactions between TvGSTO2S and oxyresveratrol, a stilbene largely used by the cosmetic industry supporting the feasibility of our approach.

EXPERIMENTAL SECTION

Wood extracts

Heartwoods from *Peltogyne venosa*, *Dicorynia guianensis*, *Bagassa guianensis*, *Hymenaea courbaril*, *Tabebuia serratifolia*, *Sextonia rubra*, *Andira coriacea*, *Eperua falcata* were from commercial origin. All species are well known and used in the building industry because of their exceptional durability against wood-rotting fungi (i.e., with natural durability against fungi rated 1 to 3 on a scale of 5, class 1 being the most durable).

Each conditioned sample (12% relative humidity) was ground to fine sawdust with particle size between 0.2 to 0.4 mm before extraction. The obtained sawdust was Soxhlet-extracted successively during 24 h using the following solvents: dichloromethane, acetone, toluene/ethanol (2/1, v/v) and water. After each extraction, organic solvents were evaporated under vacuum using a rotary evaporator. Dried extractives were stored in a freezer (-18 °C) before analyses.

Fractionation of the Bagassa guianensis heartwood acetonic extract

Bagassa guianensis heartwood acetonic extract was fractioned by reverse chromatography (Shimadzu Prominence UPLC system) as previously described. (Schwartz et al., 2018)

Chemical characterization of the wood extracts

Gas chromatography coupled to mass spectrometer (GC-MS) allowed the identification and the relative quantification of the different substances present in the wood extracts. Samples were analyzed as trimethylsilyl derivatives using the following procedure. In a screw-capped vial, a sample of about 1 mg of dry extract was dissolved in 100 μ L of BSTFA/TMCS 1%. The solution was vortex-stirred for about 1 min and heated at 70 °C for 20 h. After evaporation of the silylating reagent, the residue was diluted in 1 ml of ethyl acetate. The GC–MS analysis was performed on a Clarus 600 GC gas chromatograph coupled to a SQ8 mass spectrometer (Perkin-Elmer). Separation was carried out on a 5% diphenyl/95% dimethyl polysiloxane fused-silica capillary column (J&W Scientific DB-5MS, 30 m × 0.25 µm). The injection was performed at 250 °C in the splitless mode with Helium as carrier gas, at a constant flow of 1 mL.min⁻¹. Chromatographic conditions were as follows: initial temperature 80 °C, 2 min isothermal conditions, 10 °C.min⁻¹ to 190 °C, 15 °C.min⁻¹ to 280 °C, 10 min isothermal conditions, 10 °C.min⁻¹ to 300 °C, 14 min isothermal conditions. The components ionization was performed by electron impact (70 eV ionization energy) to achieve their identification by mass spectra comparison with the NIST Library.

Samples relative composition in extractives was obtained by the area of each peak determined on the TIC (Total Ion Current) chromatogram divided by the sum of all the detected peaks areas.

Glutathione transferases

GSTs that belong to the omega class have been heterogeneously produced using synthetic genes as described in Deroy et al.(Deroy et al., 2015a) The synthetic genes have been designed from the sequenced genome and transcriptomic studies of the white-rot *Trametes versicolor* from the following genes: TvGSTO1S which the accession number in the JGI database is Tv75639; TvGSTO2S: Tv56280; TvGSTO3S: Tv48691; TvGSTO4S: Tv65402; TvGSTO5S: Tv54358; TvGSTO6S: Tv23671.(Schwartz et al., 2018)

Fluorescence-based thermal stability assay

This assay was performed as described in Deroy et al. (Deroy et al., 2015a) The denaturation temperature (T_d), which corresponds to the temperature where the protein is 50% unfolded, was determined using the first derivative of the obtained data in the presence or in the absence of potential ligands. As reference, experiments were conducted by adding DMSO only, allowing the determination of T_d ref. Then, the difference between the denaturation temperature of the protein incubated with wood extracts and with DMSO only (T_d ref) were calculated in order to obtain the thermal shift (ΔT_d). The sum of the absolute values of ΔT_d of the six TvGSTOS studied, $\Sigma \Delta T_d$, was determined for each wood extracts.

Inhibition Kinetics

Glutathione transferase activity of TvGSTO2S (10 nM) has been tested using phenethyl isothiocyanate (PEITC) (25–250 μ M) and reduced glutathione (GSH) (1 mM) in 100 mM phosphate buffer pH 6.4. The appearance of the glutathionylated product was followed measuring the absorbance at 274 nm in presence and in absence of oxyresveratrol. The catalytic constants (k_{cat}, K_M and K_I) were calculated using the GraphPad software with the nonlinear regression based on the Michaelis-Menten model and on the mixed model inhibition.

Real-time molecular interaction study

The binding of oxyresveratrol onto TvGSTO2S was investigated in real-time with an MPC-48-2-R1-S biochip placed in a biosensor analyzer switchSENSE[®] DRX (Dynamic Biosensors GmbH, Planegg, Germany) available at the ASIA platform (Université de Lorraine). The GST was solubilized at 200 nM in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 40 mM NaCl, 0.05% Tween20, 50 μ M EDTA, and 50 μ M EGTA (PE40 buffer). The chip is composed of four independent channels, each containing six electrodes (for more information, see Langer et al.).(Langer et al., 2014) Real-time measurements of kinetics responding to changes to the molecular environment upon analyte binding (oxyresveratrol) gave the association kinetics (k_{on}) of the interaction.

Oxyresveratrol at 100 μ M in PE40 buffer containing 2% DMSO was injected in the fluidic at 5 μ L.min⁻¹ for 5 min to a chosen channel of the chip (association kinetics) and then, PE40 buffer containing 2% DMSO was injected 50 μ L.min⁻¹ for 30 min (dissociation kinetics). The real-time measurements were determined at 25 °C. Slight release of the GST from the dsDNAs was observed when only buffer was injected in the fluidic and the corresponding signal was subtracted to normalize the signal of the interaction. All curves were analyzed by nonlinear fitting of single-exponential functions with the switchANALYSIS[®] software from Dynamic Biosensors.

Microbial growth

The growth of *Phanerochaete chrysosporium* RP78 has been followed by laser nephelometry.(Joubert et al., 2010) For inoculum preparation, spores were collected from 8-days-old solid cultures by adding broth followed by gentle scraping of the agar plates. The wells of the microplates were filled as previously.(Tien, Kirk, 1983) Growth was automatically recorded for ≥ 30 h at 37 °C using a nephelometric reader (NEPHELOstar Galaxy, BMG Labtech, Offenburg, Germany). The maximal growth rates (μ_{max}) were determined from the growth curves measuring the maximal slope as described by Joubert et al.(Joubert et al., 2010)

The bacterial strains, *Collimonas pratensis* Ter91 and *Burkholderia fungorum* LMG 16225 have been isolated from *Phanerochaete chrysosporium* mycosphere during a microcosm experiment on beech.(Hervé et al., 2014b; 2016b) Growth was automatically recorded for \geq 48 h at 25 °C using a nephelometric reader (NEPHELOstar Galaxy, BMG Labtech, Offenburg, Germany). The growth rates have been determined from the growth curves measuring the maximal slope during the exponential phase.

The growth of *Saccharomyces cerevisiae* (strain 23344C) was studied in presence of fractions from the acetonic extract of *Bagassa guianensis*. For each fraction, the growth tests have been performed in 198 μ L of culture of *S. cerevisiae* in liquid YPD medium (Yeast, Peptone and D-glucose). 2 μ L of fraction has been added in the culture and the growth has been analyzed by following the turbidimetry at 600 nm during 36 h (one read per 30 min). A control condition by testing the effect of the solvent (2 μ L of DMSO) has been also done.

The inhibition index (I) of the microbial growth was calculated using the following formula: $I = 1 - (\mu_{max}/\mu_{max}control)$, where μ_{max} and $\mu_{max}control$ correspond to the maximal growth rate obtained in presence and in absence of wood extracts respectively.

Antioxidative properties

Reducing power activity

To determine the reducing activity of each wood extract, the method of Yen and Chen (Yen, Chen, 1995) was used as described in Canabady-Rochelle et al. (Canabady-Rochelle et al., 2015).

Phenolic content

Total phenolic content of the tested wood extract was estimated using the Folin-Ciocalteu method adapted to a 96-well microplate. (Taga et al., 1984) The absorbance was measured at 735 nm by using a microplate reader (EnSightTM Multimode Plate Reader, PerkinElmer[®]).

Statistical analysis

All statistical analysis including Pearson correlations between variables and principal component analysis have been obtained from the XLSTAT software (XLSTAT 2017 Microsoft Excel, Addinsoft, France, 2017). To perform the Pearson correlations, the antimicrobial properties were represented by the inhibition index (I, as described above), the absolute values of thermal shifts ($|\Delta T_d|$) were required and the values of the phenolic content and the reductase activity were not modified (corresponding in equivalent of gallic acid and ascorbic acid in $\mu g.L^{-1}$, respectively). These data have been also used for the principal component analysis.

Crystallographic study

Crystallogenesis. A first screening of 288 crystallization conditions was carried out at the CRM² crystallogenesis platform (Université de Lorraine) by using the vapour diffusion method with an Oryx 8 crystallogenesis robot (Douglas Instrument). Crystals were optimized in Linbro plates using the hanging-drop method at 4 °C. The best crystals of TvGSTO2S were obtained by mixing 1 μ L of protein (18 g.L⁻¹) with 0.2 μ L of crystal seed stock (prepared by crushing small crystals obtained during the screening step) and 1 μ L of a solution containing 10.7% PEG 4000, 0.1 M HEPES-MES buffer at pH 7.0 (in the ratio 4:6, respectively), 0.05 M sodium acetate and 0.05 M magnesium chloride. The reservoir contained 1 mL of the same crystallization condition. Crystals of TvGSTO2S-oxyresveratrol complex were prepared by the 'dry soaking method' as explained previously.(Schwartz et al., 2018) Briefly, 0.1 μ L of commercial oxyresveratrol (100 mM in DMSO) was deposited on a cover slide and left to complete evaporation. Then, one TvGSTO2S crystal together with 1 μ L of its mother liquor was dispensed on the dried oxyresveratrol. After one-day incubation, the crystal did not show any damage and was flash frozen after a quick soaking in its mother liquor supplemented with 20% glycerol.

Data collection, processing and refinement. Preliminary X-ray diffraction experiments were carried out in-house on an Agilent SuperNova diffractometer (Oxford Diffraction) equipped with a CCD detector. Data collections were carried out at the ESRF, on beamline FIP BM30A (Grenoble, France). TvGSTO2S crystals diffracted up to 2.19 Å. Data sets were indexed and integrated with XDS,(Kabsch, 2010) and scaled and merged with Aimless from the CCP4 suite.(Winn et al., 2011) The structure of TvGSTO2S was solved by molecular replacement using MOLREP with the coordinates of *Trametes versicolor* GSTO3S (PDB code 6F43) as the search model.

File of restraints for oxyresveratrol was generated with the GRADE server (URL <u>http://grade.globalphasing.org/cgi-bin/grade/server.cgi</u>). Structures were refined with PHENIX(Adams et al., 2010) and manually improved with COOT.(Emsley, Cowtan, 2004) Validation of all structures was performed with MolProbity(Davis et al., 2004) and the PDB validation service (http://validate.wwpdb.org). Coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank under accession codes 6GIB and 6GIC.

RESULTS

Interactions between wood extracts and TvGSTOs

Heartwoods of *Peltogyne venosa*, *Dicorynia guianensis*, *Bagassa guianensis*, *Hymenaea courbaril*, *Tabeuia serratifolia*, *Sextonia rubra*, *Andira coriacea*, *Eperua falcata* and *Eperua grandiflora*, have been sequentially extracted using four solvents exhibiting different polarities (dichloromethane, acetone, toluene/ethanol and water).

The interactions between the thirty-two obtained wood extracts and the six GSTs from *Trametes versicolor* were studied using the thermal shift assay (TSA), a high-throughput ligand-screening method based on the modification of protein thermal denaturation. Along a gradient of temperature, the denaturation is followed by monitoring fluorescence enhancement of a probe (SYPRO[®] Orange) that binds to protein hydrophobic patches upon denaturation process. This TSA method has been successfully used to detect interactions between proteins and libraries of molecules.(Deroy et al., 2015a ; Schwartz et al., 2018) The shift of the thermal denaturation temperature (ΔT_d) induced by the tested wood extract dissolved in DMSO was measured in comparison to a control performed with pure DMSO.

Each enzyme displays a specific pattern of interactions with the tested extracts (Table S1). The interactions between each isoform and the tested extracts are not significantly related to the used extraction solvent (Tukey test, p > 0.05). Nevertheless, the global reactivity of the six isoforms, named $\Sigma |\Delta T_d|$, (corresponding to the sum of the absolute values of ΔT_d , which have been measured for all isoforms) was significantly correlated to the polarity of the used solvent. The dichloromethane extracts induced indeed a significantly higher $\Sigma |\Delta T_d|$ than the other extracts (Tukey Test, p=0.015), suggesting that the hydrophobic compounds extracted with this solvent have a significant effect on the thermal stability of the GSTs. As shown for *Eperua falcata* dichloromethane extract, these hydrophobic molecules could increase or decrease the thermal denaturation temperature depending on the considered proteins. This extract decreased indeed the thermal stability of TvGSTO3S ($\Delta T_d = -7.5$ °C) and TvGSTO6S ($\Delta T_d = -2.1$ °C), and had a positive effect on the thermal stability of TvGSTO1S ($\Delta T_d = +3.7$ °C) and TvGSTO6S ($\Delta T_d = +3.0$ °C). We chose not to consider these potential opposite effects and the following analysis was done using the absolute value of the detected ΔT_d ($|\Delta T_d|$).

Properties of wood extracts

The antimicrobial activity of the extracts was tested against a wood decaying basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* and two bacterial strains isolated from degraded wood, *Collimonas pratensis* Ter91 and *Burkholderia fungorum* LMG 16225.(Hervé et al., 2014b; 2016b) The three organisms were cultivated in the presence or in the absence of the tested wood extracts. The potential antimicrobial effect was calculated from maximal growth rates measured in the presence or in the absence of the tested extracts. A statistical analysis of the obtained data (Table S1) shows that these "antimicrobial" variables are significantly correlated (Table 1), with a Pearson correlation coefficient higher between both bacterial variables (r = 0.805, p = $1.7 \ 10^{-8}$). To investigate the antioxidant activity, two distinct methods were used: determination of phenolic content and reductive abilities. These "antioxidative variables" revealed to be strongly correlated (r = 0.953, p = 10^{-12}) (Table 1).

Variables	(I) <i>Bf</i>	(I) <i>Cp</i>	(I) <i>Pc</i>	$ \Delta T_d $ 1	$\left \Delta T_{d}\right 2$	$\left \Delta T_{d}\right 3$	$\left \Delta T_{d}\right $ 4	$\left \Delta T_{d}\right 5$	$\left \Delta T_{d}\right $ 6	A_P	A_R
(I) <i>Bf</i>	1	0.805	0.606	-0.199	0.606	-0.119	0.178	0.319	0.072	0.194	0.201
(I) <i>Cp</i>		1	0.486	-0.239	0.464	-0.067	0.303	0.248	-0.072	0.026	0.038
(I) <i>Pc</i>			1	-0.132	0.519	-0.029	0.167	0.225	0.041	0.034	0.005
$ \Delta T_d $ 1				1	0.181	0.730	0.091	0.309	0.418	-0.088	-0.073
$\left \Delta T_{d}\right $ 2					1	-0.002	0.052	0.529	0.213	0.347	0.375
$\left \Delta T_{d}\right $ 3						1	0.327	0.134	0.437	-0.313	-0.321
$\left \Delta T_{d}\right $ 4							1	0.083	0.176	-0.096	-0.072
$\left \Delta T_{d}\right $ 5								1	-0.139	-0.137	-0.035
$ \Delta T_d $ 6									1	0.265	0.195
A _P										1	0.953
A _R											1

Table 1: Pearson coefficients showing the correlation between variables.

Values in bold have p-values lower to the significant threshold (p < 0.05) and are significantly different. Symbol (I) corresponds to the inhibition index on the studied microorganisms: *Bf* for *Bacillus fungorum*, *Cp* for *Collimonas pratensis* and *Pc* for *Phanerochaete chrysosporium*. The absolute values of thermal shift ($|\Delta Td|$) for the six isoforms TvGSTO1S (1), TvGSTO2S (2), TvGSTO3S (3), TvGSTO4S (4), TvGSTO5S (5), TvGSTO6S (6) have been required for performing this Pearson correlation. For the phenolic content (A_P) and the reductase activity (A_R), the same values were used (equivalent of gallic acid and of ascorbic acid in $\mu g.L^{-1}$).

Relationship between thermal responses of TvGSTOs and the biological properties of wood extract

Potential correlations between "TvGSTOS" variables (defined as the absolute value of the detected ΔT_d for a specific isoform) and antioxidative and antimicrobial variables were investigated (Table 1). No significant correlation was detected with five isoforms (TvGSTO1S, 3S, 4S, 5S and 6S). In contrast, interactions between "TvGSTO2S" variable and the tested wood extracts are clearly related to the chemical properties of the latter (Table 1). "TvGSTO2S" variable is indeed correlated both to the "antioxidative variables" (phenolic content and reductase activity; r = 0.347, p = 0.048 and r = 0.375, p = 0.031, respectively) and to the "antimicrobial variables" (r = 0.519, p = 0.002; r = 0.606, p = 0.001 and r = 0.464, p = 0.007, for *P. chrysosporium*, *B. fungorum* and *C. pratensis*, respectively) (Table 1). A principal component (PC) analysis was also performed using all these data (Fig. 1).



Figure 1: Principal component (PC) analysis performed using " $|\Delta T_d|$ TvGSTO1-6S", "antimicrobial" and "antioxidative" variables (Table S1) obtained with the following wood extracts. For each wood extract, absolute values of thermal shifts for the six isoforms were required for this PC. According to the protein (TvGSTO1-6S), the variables are represented by " $|\Delta T_d|$ 1", " $|\Delta T_d|$ 2", " $|\Delta T_d|$ 3", " $|\Delta T_d|$ 4", " $|\Delta T_d|$ 5" and " $|\Delta T_d|$ 6". The inhibition indexes on the growth of the three microorganisms were used and the variables are represented in blue: (I) *Pc* for the inhibition on the growth of *P. chrysosporium*, (I) *Cp* for *C. pratensis* and (I) *Bf* for *B. fungorum*. Concerning both antioxidative variables, the phenolic content (A_P) and the reductase activity (A_R) are symbolized in black. Each number corresponds to a wood extract (see Table S1). According to the solvent, the colour is different: green for dichloromethane, orange for acetone, purple for the mix toluene/ethanol and blue for water. The number 0 corresponds to the control condition (for dimethyl sulfoxide).

Three PCs explained approximately 69.25% of the total variance among the 32 tested extracts. Of these, the first two PCs explained approximately 50.76% of the total variance. The overall distribution of the wood extracts on the graph does not show a clear clustering, although all the samples are clearly distinguishable of the control (DMSO). Briefly, the PC analysis showed that the coordinates of several wood extracts obtained with water, mix toluene/ethanol and acetone were near between them. In contrast, it appeared that the coordinates of wood extracts obtained with dichloromethane were different and were heterogeneously distributed. Interestingly the acetonic and the toluene/ethanolic extracts of *Bagassa guianensis* differ from the others (Fig.1 n° 9 and 11), displaying both antifungal and antibacterial properties and modifying the thermal stability of TvGSTO2S ($\Delta T_d = +5.25$ °C, $\Delta T_d = +2.00$ °C respectively).

Taken together, these data suggested that the detected interactions between wood extracts and TvGSTO2S could be used to detect molecules with biological properties. The acetonic extract of *Bagassa guianensis* was then chosen to focus this work on the potential interactions with TvGSTO2S.

Study of the chemical composition and properties of the acetonic extract of Bagassa guianensis

The chemical composition of the acetonic extract of *Bagassa guianensis* was first analyzed by GC-MS, showing the presence of oxyresveratrol as the main product (peak at 21.82 min; Fig. S1) in accordance with previous studies.(Royer et al., 2010) The other peaks (19.42, 20.81, 21.10, 22.46 and 25.72 min) revealed the presence of derivatives of oxyresveratrol: resveratrol and cyclisation forms of oxyresveratrol. After separation of the extract by reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC), the harvested fractions were dried, solubilized in DMSO and then tested for their antioxidative properties (phenolic content and reductive ability), their antimicrobial activity (in this case, inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth rate) and their interactions with TvGSTO2S (Table S2). As shown in Figure 2, a strong correlation between the antioxidative properties of the fractions with TvGSTO2S was observed (r = 0.957, p = 10^{-12}).

Interactions with TvGSTO2S revealed mainly the presence of two pools of fractions centered around fractions 22 and 41, respectively, that induced an increase of the thermal stability of the protein (Fig. 2). The GC-MS analysis revealed that the fraction 22 mainly contained oxyresveratrol and dihydromorin, and the fraction 41 contained 6-O-methyl-moracin N. All these compounds have been previously detected in *Bagassa guianensis* extract.(Royer et al., 2010) 6-O-methyl-moracin N has been shown to exhibit antimicrobial activity and dihydromorin a tyrosinase inhibitory effect.(Royer et al., 2012; Hu et al., 2015) Due to the major presence of oxyresveratrol in this extract, we choose to test the pure compound. For the next of this work, a biochemical and structural study has been conducted to study the interactions between TvGSTO2S and oxyresveratrol at the molecular level.



<u>Figure 2:</u> Thermal effects on TvGSTO2S and reductase activity of fractions from acetonic heartwood extract of *Bagassa guaianensis*. Blue bars represent the reductase activity (converted in equivalent of ascorbic acid in mg.L⁻¹) and orange line corresponds to the thermal shifts (ΔT_d , in °C) induced by each fraction.

Characterization of the interaction between TvGSTO2S and oxyresveratrol

To better understand the effect of oxyresveratrol on the denaturation temperature (ΔT_d) of TvGSTO2S, we tested several concentrations of the stilbene with the same method (Fig. 3). ΔT_d of TvGSTO2S is significantly modified with at least 8 μ M of oxyresveratrol ($\Delta T_d = +1.55$ °C). This approach did not allow an accurate determination of the apparent affinity of TvGSTO2S for oxyresveratrol.(Vivoli et al., 2014) Then an enzymatic approach has been performed using the ability of TvGSTO2S to transfer glutathione on PEITC. In absence of oxyresveratrol, the following parameters have been obtained: $K_M = 29.71 \pm 2.84 \ \mu$ M and $k_{cat} = 12.01 \pm 0.26 \ s^{-1}$, confirming the ability of TvGSTO2S to transfer efficiently glutathione on this substrate.(Deroy et al., 2015a) This activity is strongly inhibited in presence of oxyresveratrol (K_I of $3.79 \pm 1.51 \ \mu$ M), confirming that the stilbene is able to bind to the studied protein. Next in the study of interactions between TvGSTO2S and oxyresveratrol, an association constant k_{on} of $141 \pm 18 \ M^{-1}.s^{-1}$ was determined using the switchSENSE[®] technology (Fig. S2). However, the dissociation constant k_{off} was not determined as the oxyresveratrol and the protein formed a highly stable complex (no dissociation observed, Fig. S2). In addition, no modification of the stilbene is not a substrate for the protein.



<u>Figure 3:</u> Stabilizing effects of oxyresveratrol on TvGSTO2S. Thermal shifts (ΔT_d) are given in °C. For each tested concentration of oxyresveratrol, the final concentration of protein was 10 μ M.

The interactions between TvGSTO2S and oxyresveratrol were also studied at the atomic level. TvGSTO2S crystal structure was solved at 2.19 Å (Table S5). The protein adopts a dimeric arrangement with its monomers exhibiting the characteristic traits of the cytosolic GST fold (Fig. 4). Beside its conserved two-domain organization (N-terminal domain, $\beta 1\alpha 1\beta 2\alpha 2\beta 3\beta 4\alpha 3$, residues Cys3-Ala95; C-terminal domain, $\alpha 4\alpha 5\alpha 6\alpha 6' \alpha 7\alpha 8\alpha 9$, Lys96-Arg236) TvGSTO2S shows the specificities of the fungal type-III Omega class, an extended loop between strands β 3 and β 4, a potential catalytic serine at the N-terminus of helix $\alpha 1$, and an additional helix $\alpha 6$ '. (Schwartz et al., 2018) TvGSTO2S shares the same overall structure as its previously studied isoforms TvGSTO3S (rmsd of 1.366 Å for 416 aligned Cα, PDB code 6F43)(Schwartz et al., 2018) and TvGSTO6S (rmsd of 2.223 Å for 460 aligned Ca, PDB code 6F70).(Schwartz et al., 2018) The TvGSTO2S crystal soaked with oxyresveratrol resulted in a structure without major conformational changes with respect to the apo form. However, two main continuous regions were detected in the Fo-Fc electron density map, corresponding to two oxyresveratrol molecules. The first one binds in the hydrophobic site (H site) of monomer B of TvGSTO2S (Fig. 4). In this case, the ligand is in a native trans configuration and is stabilized in a slit formed by the hydrophobic side-chains of Phe123, Phe128 and Phe167. Oxyresveratrol molecule in trans configuration interacts by H-bond with Asp121 and Tyr174 from helix $\alpha 4$ and $\alpha 6$, respectively. The second molecule of oxyresveratrol binds in the site known as ligandin site (L site) at the TvGSTO2S dimer interface. Here it adopts a *cis* configuration according to the aromatic groups positioned on the same side of the central double bond (Fig. 4).

Stilbenes in the *cis* configuration, including *cis* oxyresveratrol, result from the photo-isomerization of the corresponding *trans* isomers upon light exposure.(Maafi, Al-Qarni, 2018a) This likely occurred in our experiment during the drying step before crystal dry-soaking. Oxyresveratrol molecule in *cis* configuration is well stabilized by four H-bonds established between the ligand hydroxy groups and the side chains of Glu86 (monomer A), Glu86 (B), Asn117 (A) and Asn117 (B) located at the dimer interface. These structural results support the strong interaction measured between TvGSTO2S and oxyresveratrol and suggest that this GST is able to interact with both *cis* and *trans* isomers at different sites.



Figure 4. Crystal structure of TvGSTO2S complexed with trans and cis oxyresveratrol. (A) Oxyresveratrol in *trans* configuration bound to TvGSTO2S hydrophobic site. (B) and (C) Overall views of TvGSTO2S structure complexed with *trans* and *cis* oxyresveratrol. Secondary structure elements are displayed on panel B. N-terminal domain is colored cyan and C-terminal domain is colored pale yellow. (D) Oxyresveratrol in *cis* configuration bound to TvGSTO2S ligandin site at the dimer interface. Topological structures of *trans* and *cis* oxyresveratrol are shown in corresponding panels. Ligands are represented as green sticks and spheres. Polar interactions are represented as dashed lines. 2mFo-DFc omit maps calculated by PHENIX are displayed at 1.0σ around ligands.

DISCUSSION

Forests, and in particular tropical forests, are reservoirs of amazing biodiversity, where trees play a major role in interacting with a large number of biological partners. These interactions are often due to the exchange of molecular signals. The molecular diversity of the involved compounds is linked to the extraordinary variability of secondary plant metabolism. For centuries, humans have used this diversity to obtain compounds or mixtures of compounds with antimicrobial and insecticidal activity. This is the case, for instance, of wood extractives. Depending on the considered species, these compounds may have functions in wood durability and may also exhibit antimicrobial and insecticidal activities. Numerous studies have indeed been devoted to the identification and characterization of these molecules.(Anouhe et al., 2015; Valette et al., 2017a; Bossu et al., 2016; Doussot et al., 2002b; Rodrigues et al., 2011) On another hand, the wood decayers, microorganisms and insects, have developed efficient detoxification systems to deal with these compounds and also to use wood as source of nutriments. From comparative genomic and previously from functional studies, it appeared that these systems are mainly constituted of multigenic families.(Morel et al., 2013b; Nagy et al., 2017a; Syed et al., 2014) The resulting proteins are involved either in oxidation of wood metabolites (e.g. cytochrome P450 monooxygenases), or in decrease of their chemical reactivity by addition of sugars or glutathione. These latest reactions are catalysed by glycosyl or glutathione transferases depending on the chemical nature of the considered adduct.

The relationship between both diversities, i.e. wood extractives and detoxification enzymes, seems obvious and suggests that the latter could be used to study the chemical diversity of wood extracts and then to identify molecules that possess interesting properties for industry such as antimicrobial or antioxidative properties. In the present study, we have validated this hypothesis studying interactions between six GSTs from the white-rot Trametes versicolor and a library of wood extracts. The thermal shift assay has been used, this method allowing a fast screening of hundreds of samples using few amounts (μ g) of extracts. The obtained results demonstrated that TvGSTOSs were more prone to interact with hydrophobic compounds since dichloromethane extracts induced the highest shifts of the thermal denaturation temperatures. Each TvGSTOs shows a specific pattern of interactions as previously shown with libraries of molecules. (Schwartz et al., 2018) Interestingly, the thermal stability of TvGSTO2S in presence of the extracts is significantly correlated to antimicrobial and antioxidative properties of the latter. The interaction could occur at different sites of the protein. A trans oxyresveratrol molecule occupies the active site (H-site) while a cis oxyresveratrol molecule occupies the dimer interface (L-site). These two sites were already described as binding sites for non-catalytic ligand in TvGSTOs.(Schwartz et al., 2018) These observations agree with the assumed ligandin function of GSTs that can facilitate the sequestration and the transport of hydrophobic molecules.(Cummins et al., 2011b; Zhao, 2015b)

This ligandin property could be due to particular sites found at the dimer interface as demonstrated here for TvGSTO2S.(Brock et al., 2013b; Ahmad et al., 2017a) The presence of this L-site increases by this way the number of potential interactions of GSTs with ligands. In accordance with the obtained biochemical data, binding of oxyresveratrol at the H-site could be responsible for the inhibition of TvGSTO2S glutathionylation activity. Nevertheless, further experiments are required to evaluate the affinity of the L-site for oxyresveratrol and the consequences of this binding on the activity of the enzyme.

As detoxification enzymes, we postulated that the substrates or ligands of GSTs could have interesting properties with potential industrial applications. It is the case of oxyresveratrol, which has been studied for its multiple properties such as anti-inflammatory activity(Chen et al., 2013), antioxidative activity(Lorenz et al., 2003) and antibacterial activity.(Joung et al., 2016) Through the example of TvGSTO2S and oxyresveratrol, the obtained data support the hypothesis that the detoxification systems of wood decayers, and in particular glutathione transferases could be used to identify and characterize wood molecules with potential interest. In the same time, *this approach* should give insights on the chemical environment encountered by the studied organisms and then increase our understanding of their adaptation to their trophic features.

Author Contributions Statement

EG, CD, FF and NA developed the concept and supervised this study. TP, MS, SD, MMR, FS, RS, GS performed the experiments, and interpreted the data. All the authors participated in manuscript writing. EG, CD, PG and NA acquired the funding. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank Solène Telliez, Tiphaine Dhalleine and Sandrine Mathiot for technical assistance. A sincere thank you to Pr. Jean-Pierre Jacquot for constructive criticism of the manuscript. The authors would like to thank ESRF for beamtime, and the staff of beamlines BM30A for data collections. The authors appreciated the access to the 'Plateforme de mesures de diffraction X' of the University of Lorraine with crystal testing.

Funding

This study was funded by the French National Research Agency (ANR-11-LAS-0002-01), the Centre National de la Recherche Scientifique, the University of Lorraine and the Région Grand Est (MS and TP Grants, PEPS-Mirabelle 2016, CPER 2014-2020, Program "Equipement mi-lourd 2016"). The authors acknowledge financial support from the "Impact Biomolecules" project of the "Lorraine Université d'Excellence" (Investissements d'avenir – ANR).

Supporting Information

A single file entitled "Supporting_Information" accompanies this paper and contains the supplementary Tables S1, S2, S3 and the supplementary Figures S1, S2.

REFERENCES

(1) Anouhe, J.-B. S.; Adima, A. A.; Niamké, F. B.; Stien, D.; Amian, B. K.; Blandinières, P.-A.; Virieux, D.; Pirat, J.-L.; Kati-Coulibaly, S.; Amusant, N. Dicorynamine and harmalan-n-oxide, two new β -carboline alkaloids from *Dicorynia guianensis* amsh heartwood. *Phytochem. Lett.* **2015**, *12*, 158–163.

(2) Rodrigues, A. M. S.; Theodoro, P. N. E. T.; Eparvier, V.; Basset, C.; Silva, M. R. R.; Beauchêne, J.; Espíndola, L. S.; Stien, D. Search for antifungal compounds from the wood of durable tropical trees. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73* (10), 1706–1707.

(3) Valette, N.; Perrot, T.; Sormani, R.; Gelhaye, E.; Morel-Rouhier, M. Antifungal activities of wood extractives. *Fungal Biol. Rev.* **2017**, *31* (3), 113–123.

(4) Frankó, B.; Carlqvist, K.; Galbe, M.; Lidén, G.; Wallberg, O. Removal of water-soluble extractives improves the enzymatic digestibility of steam-pretreated softwood barks. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2018**, *184* (2), 599–615.

(5) Morel, M.; Meux, E.; Mathieu, Y.; Thuillier, A.; Chibani, K.; Harvengt, L.; Jacquot, J.-P.; Gelhaye, E. Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi. *Microb. Biotechnol.* **2013**, *6* (3), 248–263.

(6) Riley, R.; Salamov, A. A.; Brown, D. W.; Nagy, L. G.; Floudas, D.; Held, B. W.; Levasseur, A.; Lombard, V.; Morin, E.; Otillar, R.; et al. Extensive sampling of Basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111* (27), 9923–9928.

(7) Nagy, L. G.; Riley, R.; Bergmann, P. J.; Krizsán, K.; Martin, F. M.; Grigoriev, I. V.; Cullen, D.; Hibbett, D. S. Genetic bases of fungal white rot wood decay predicted by phylogenomic analysis of correlated gene-phenotype evolution. *Mol. Biol. Evol.* **2017**, *34* (1), 35–44.

(8) Rane, R. V.; Walsh, T. K.; Pearce, S. L.; Jermiin, L. S.; Gordon, K. H.; Richards, S.; Oakeshott, J. G. Are feeding preferences and insecticide resistance associated with the size of detoxifying enzyme families in insect herbivores? *Curr. Opin. Insect Sci.* **2016**, *13*, 70–76.

(9) Capolupo, M.; Valbonesi, P.; Kiwan, A.; Buratti, S.; Franzellitti, S.; Fabbri, E. Use of an integrated biomarker-based strategy to evaluate physiological stress responses induced by environmental concentrations of caffeine in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Sci. Total Environ.* **2016**, *563–564*, 538–548.

(10) Hollman, A. L.; Tchounwou, P. B.; Huang, H.-C. The association between gene-environment interactions and diseases involving the human GST superfamily with snp variants. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* **2016**, *13* (4).

(11) Mohanty, D.; Samanta, L. Multivariate analysis of potential biomarkers of oxidative stress in *Notopterus notopterus* tissues from Mahanadi river as a function of concentration of heavy metals. *Chemosphere* **2016**, *155*, 28–38.

(12) Roret, T.; Thuillier, A.; Favier, F.; Gelhaye, E.; Didierjean, C.; Morel-Rouhier, M. Evolutionary divergence of Ure2pa glutathione transferases in wood degrading fungi. *Fungal Genet. Biol. FG B* **2015**, *83*, 103–112.

(13) Meux, E.; Morel, M.; Lamant, T.; Gérardin, P.; Jacquot, J.-P.; Dumarçay, S.; Gelhaye, E. New substrates and activity of *Phanerochaete chrysosporium* omega glutathione transferases. *Biochimie* **2013**, *95* (2), 336–346.

(14) Mathieu, Y.; Prosper, P.; Favier, F.; Harvengt, L.; Didierjean, C.; Jacquot, J.-P.; Morel-Rouhier, M.; Gelhaye, E. Diversification of fungal specific class a glutathione transferases in saprotrophic fungi. *PloS One* **2013**, *8* (11), e80298.

(15) Marinović, M.; Nousiainen, P.; Dilokpimol, A.; Kontro, J.; Moore, R.; Sipilä, J.; de Vries, R. P.; Mäkelä, M. R.; Hildén, K. Selective cleavage of lignin β -O-4 aryl ether bond by β -etherase of the white-rot fungus *Dichomitus squalens*. *ACS Sustain*. *Chem. Eng.* **2018**, *6* (3), 2878–2882.

(16) Deroy, A.; Saiag, F.; Kebbi-Benkeder, Z.; Touahri, N.; Hecker, A.; Morel-Rouhier, M.; Colin, F.; Dumarcay, S.; Gérardin, P.; Gelhaye, E. The GSTome reflects the chemical environment of white-rot fungi. *PloS One* **2015**, *10* (10), e0137083.

(17) Schwartz, M.; Perrot, T.; Aubert, E.; Dumarçay, S.; Favier, F.; Gérardin, P.; Morel-Rouhier, M.; Mulliert, G.; Saiag, F.; Didierjean, C.; Gelhaye, E. Molecular Recognition of Wood Polyphenols by Phase II Detoxification Enzymes of the White Rot Trametes Versicolor. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 8472.

(18) Carlson, A.; Justo, A.; Hibbett, D. S. Species Delimitation in Trametes: A comparison of ITS, RPB1, RPB2 and TEF1 gene phylogenies. *Mycologia* **2014**, *106* (4), 735–745.

(19) Royer, M.; Rodrigues, A. M. S.; Herbette, G.; Beauchêne, J.; Chevalier, M.; Hérault, B.; Thibaut, B.; Stien, D. Efficacy of *Bagassa guianensis* aubl. extract against wood decay and human pathogenic fungi. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2012**, *70*, 55–59.

(20) Langer, A.; Kaiser, W.; Svejda, M.; Schwertler, P.; Rant, U. Molecular dynamics of dna-protein conjugates on electrified surfaces: solutions to the drift-diffusion equation. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118* (2), 597–607.

(21) Joubert, A.; Calmes, B.; Berruyer, R.; Pihet, M.; Bouchara, J.-P.; Simoneau, P.; Guillemette, T. Laser nephelometry applied in an automated microplate system to study filamentous fungus growth. *BioTechniques* **2010**, *48* (5), 399–404.

(22) Tien, M.; Kirk, T. K. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds. *Science* **1983**, *221* (4611), 661–663.

(23) Hervé, V.; Le Roux, X.; Uroz, S.; Gelhaye, E.; Frey-Klett, P. Diversity and structure of bacterial communities associated with *Phanerochaete chrysosporium* during wood decay. *Environ. Microbiol.* **2014**, *16* (7), 2238–2252.

(24) Hervé, V.; Ketter, E.; Pierrat, J.-C.; Gelhaye, E.; Frey-Klett, P. Impact of *Phanerochaete chrysosporium* on the functional diversity of bacterial communities associated with decaying wood. *PLoS ONE* **2016**, *11* (1).

(25) Yen, G.-C.; Chen, H.-Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. J. Agric. Food Chem. **1995**, 43 (1), 27–32.

(26) Canabady-Rochelle, L. L. S.; Harscoat-Schiavo, C.; Kessler, V.; Aymes, A.; Fournier, F.; Girardet, J.-M. Determination of reducing power and metal chelating ability of antioxidant peptides: revisited methods. *Food Chem.* **2015**, *183*, 129–135.

(27) Taga, M. S.; Miller, E. E.; Pratt, D. E. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. J. Am. Oil Chem. Soc. **1984**, 61 (5), 928–931.

(28) Kabsch, W. XDS. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2010, 66 (Pt 2), 125–132.

(29) Winn, M. D.; Ballard, C. C.; Cowtan, K. D.; Dodson, E. J.; Emsley, P.; Evans, P. R.; Keegan, R. M.; Krissinel, E. B.; Leslie, A. G. W.; McCoy, A.; et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2011**, *67* (Pt 4), 235–242.

(30) Adams, P. D.; Afonine, P. V.; Bunkóczi, G.; Chen, V. B.; Davis, I. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Hung, L.-W.; Kapral, G. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; et al. PHENIX: a comprehensive python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66* (Pt 2), 213–221.

(31) Emsley, P.; Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2004**, *60* (Pt 12 Pt 1), 2126–2132.

(32) Davis, I. W.; Murray, L. W.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. MOLPROBITY: Structure validation and all-atom contact analysis for nucleic acids and their complexes. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32* (Web Server issue), W615-619.

(33) Royer, M.; Herbette, G.; Eparvier, V.; Beauchêne, J.; Thibaut, B.; Stien, D. Secondary metabolites of *Bagassa guianensis* aubl. Wood: a study of the chemotaxonomy of the *Moraceae* family. *Phytochemistry* **2010**, *71* (14–15), 1708–1713.

(34) Hu, S.; Zheng, Z.; Zhang, X.; Chen, F.; Wang, M. Oxyresveratrol and trans-dihydromorin from the twigs of *Cudrania tricuspidata* as hypopigmenting agents against melanogenesis. *J. Funct. Foods* **2015**, *13*, 375–383.

(35) Vivoli, M.; Novak, H. R.; Littlechild, J. A.; Harmer, N. J. Determination of protein-ligand interactions using differential scanning fluorimetry. *J. Vis. Exp. JoVE* **2014**, No. 91, 51809.

(36) Maafi, M.; Al-Qarni, M. A. Φ-order spectrophotokinetic characterisation and quantification of trans-cis oxyresveratrol reactivity, photodegradation and actinometry. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2018**, *188*, 64–71.

(37) Bossu, J.; Beauchêne, J.; Estevez, Y.; Duplais, C.; Clair, B. New insights on wood dimensional stability influenced by secondary metabolites: the case of a fast-growing tropical species *Bagassa guianensis* aubl. *PloS One* **2016**, *11* (3), e0150777.

(38) Doussot, F.; De Jéso, B.; Quideau, S.; Pardon, P. 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.* **2002**, *50* (21), 5955–5961.

(39) Rodrigues, A. M. S.; Amusant, N.; Beauchêne, J.; Eparvier, V.; Leménager, N.; Baudassé, C.; Espindola, L. S.; Stien, D. The termiticidal activity of sextonia rubra (mez) van der werff (lauraceae) extract and its active constituent rubrynolide. *Pest Manag. Sci.* **2011**, 67 (11), 1420–1423.

(40) Syed, K.; Shale, K.; Pagadala, N. S.; Tuszynski, J. Systematic identification and evolutionary analysis of catalytically versatile cytochrome p450 monooxygenase families enriched in model basidiomycete fungi. *PLOS ONE* **2014**, *9* (1), e86683.

(41) Cummins, I.; Dixon, D. P.; Freitag-Pohl, S.; Skipsey, M.; Edwards, R. Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. *Drug Metab. Rev.* **2011**, *43* (2), 266–280.
(42) Zhao, J. Flavonoid transport mechanisms: How to go, and with whom. *Trends Plant Sci.* **2015**, 20 (9), 576–585.

(43) Brock, J.; Board, P. G.; Oakley, A. J. Structural insights into Omega-class glutathione transferases: a snapshot of enzyme reduction and identification of a non-catalytic ligandin site. *PloS One* **2013**, *8* (4), e60324.

(44) Ahmad, L.; Rylott, E. L.; Bruce, N. C.; Edwards, R.; Grogan, G. Structural evidence for *Arabidopsis* glutathione transferase AtGSTF2 functioning as a transporter of small organic ligands. *FEBS Open Bio* **2017**, *7* (2), 122–132.

(45) Chen, Y.-C.; Tien, Y.-J.; Chen, C.-H.; Beltran, F. N.; Amor, E. C.; Wang, R.-J.; Wu, D.-J.; Mettling, C.; Lin, Y.-L.; Yang, W.-C. *Morus alba* and active compound oxyresveratrol exert antiinflammatory activity via inhibition of leukocyte migration involving mek/erk signaling. *BMC Complement. Altern. Med.* **2013**, *13*, 45.

(46) Lorenz, P.; Roychowdhury, S.; Engelmann, M.; Wolf, G.; Horn, T. F. W. Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells. *Nitric Oxide Biol. Chem.* **2003**, *9* (2), 64–76.

(47) Joung, D.-K.; Mun, S.-H.; Choi, S.-H.; Kang, O.-H.; Kim, S.-B.; Lee, Y.-S.; Zhou, T.; Kong, R.; Choi, J.-G.; Shin, D.-W.; et al. Antibacterial activity of oxyresveratrol against methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus* and its mechanism. *Exp. Ther. Med.* **2016**, *12* (3), 1579–1584.

Supporting Information

Supplementary Tables

Table S1: Glutathione transferases, antimicrobial and antioxidative variables obtained with wood extracts

Table S2: TvGSTO2S, antimicrobial and antioxidative variables obtained with fractionated *Bagassa guianensis (Bg)* acetonic extract

Table S3: Diffraction and refinement statistics

Supplementary Figures

Figure S1: GS-MS analysis of acetonic extract of Bagassa guianensis

Figure S2: Real-time molecular interaction between TvGSTO2S and oxyresveratrol determined by switchSENSE[®] analysis

<u>Résultats – Chapitre I – Article n°3</u>

<u>**Table S1 : Glutathione transferases, antimicrobial and antioxidative variables obtained with wood extracts.</u> Solvents are summarized as follows, DCM; dichloromethane, ACE; acetone, T/E; toluene/ethanol and WAT; water. Wood species names are summarized as follows, «***Pv* **» for** *Peltogyne venosa***, «***Dg* **» for** *Dicorynia guianensis, «Bg* **» for** *Bagassa guianensis, «Hc* **» for** *Hymenaea courbaril, «Ts* **» for** *Tabebuia serratifolia, «Sr* **» for** *Sextonia rubra, «Ac* **» for** *Andira coriacea, «Ef* **» for** *Eperua falcata***. The condition named « DMSO » corresponds to the control condition. For the first three columns, the values correspond to the inhibition index (I) described in the Material and Methods section. From the column «TvGSTO1S » to «TvGSTO6S » the data correspond to the thermal shifts (\Delta T_d). The values of phenolic content and the reductase activity are given in equivalent of gallic acid and of ascorbic acid (in µg.L⁻¹) respectively.</u>**

		-	Inhibition inde	x			ΔT_{d} (°C)				Phenolic content	Reductase activity
Extractives	Number	B. fingerinn	C. protensis	P. chrysosporium	TvGST01S	TvGST02S	TVGST03S	TVGST04S	TVGSTO5S	TvGST06S	LAT _d (*C)	(eq. in gallic acid in μ g.L ⁻¹)	(eq. in ascorbic acid in $\mu g.L^{\pm})$
DMSO	0	0.00	0.04	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	7.03	0.00
Pv ACE	1	0.27	0.37	0.26	0.25	1.00	0.25	-0.25	0.67	1.25	3.67	3250.80	8018.11
PVDCM	2	0.16	0.19	0.11	2.00	0.25	-1.00	-0.50	-0.59	0.50	4.84	1248.24	2627.05
Pv T/E	3	0.29	0.31	0.25	0.50	1.50	0.00	0.00	0.24	1.75	3.99	4071.97	10382.32
Pv WAT	ं4	0.13	0.14	0.21	0.25	0.75	0.00	-0.50	-0.08	1.25	2.83	2759.52	6779.27
DgACE	5	0.18	0.36	0.11	0.25	0.50	0.00	0.50	-0.29	1.00	2.54	1814.96	4931.14
DgDCM	6	0.21	0.21	0.36	0.50	-0.50	-1.00	-0.25	-2.49	0.25	4.99	673.72	1174.42
Dg T/E	7	0.14	0.09	0.91	0.75	0.75	0.50	0.50	1.01	1.75	5.26	2874.77	7743.69
Dg WAT	8	0.10	0.20	0.25	0.50	0.25	0.00	0.50	-1.65	1.25	4.15	1883.94	3245.43
BFACE	9	0.47	0.72	0.92	0.25	5.25	1.00	0.75	-0.67	1.50	9.42	4071.48	11167.99
BgDCM	10	0.32	0.51	0.97	0.75	1.75	-0.25	0.25	-1.51	1.50	6.01	1728.06	2647.27
Bg T/E	11	0.64	0.62	0.89	0.25	2.00	1.00	0.50	0.49	1.75	5.99	3147.94	7523.99
Bg WAT	12	0.24	0.44	0.33	0.50	2.25	0.00	0.00	0.78	1.50	5.03	1841.80	4314.29
H ACE	13	0.20	0.20	0.00	1.75	2.25	0.50	0.50	0.79	2.00	7.79	3695.20	10095.23
H-DCM	14	0.15	0.20	0.68	1.75	1.25	-1.50	0.00	-0.77	0.50	5.77	1354.79	3606.66
H: T/E	15	0.11	0.00	0.57	0.75	1.25	0.50	0.50	-0.58	2.00	5.58	3345.74	7551.98
H WAT	16	0.18	0.03	0.14	0.25	0.50	0.00	0.00	-0.78	1.50	3.03	2516.53	6500.58
75 ACE	17	0.17	0.22	0.43	0.25	0.75	0.00	0.25	-0.41	1.00	2.66	2258.94	7492.20
73 DCM	18	0.28	0.18	0.52	1.25	2.50	1.50	0.50	0.57	4.00	10.32	722.65	1495.72
73 T/E	19	0.29	0.28	0.52	0.50	0.75	0.00	0.50	-0.28	1.50	3.53	1882.93	6629.83
73 WAT	20	0.16	0.17	0.14	-0.50	0.25	0.00	-0.50	-2.40	0.50	4.15	2744.20	10243.87
.S-ACE	21	0.24	0.46	0.54	0.00	0.50	0.00	-0.50	-1.66	0.50	3.16	536.81	879.04
.S.DCM	22	0.34	0.53	0.63	-0.25	1.25	-1.00	-1.25	-2.07	0.50	6.32	110.70	0.00
.S> T/E	23	0.19	0.28	0.49	-0.25	1.00	0.00	-0.50	-1.59	0.50	3.84	1184.61	2648.66
.S-WAT	24	0.08	0.00	0.25	0.50	1.50	0.75	0.50	-0.05	1.50	4.80	3956.42	9293.62
ACACE	25	0.26	0.47	0.17	0.25	0.50	1.00	0.50	-1.70	1.75	5.70	2357.74	5907.61
ACDCM	26	0.46	0.44	0.74	-2.00	-6.50	0.50	-0.25	-8.28	1.00	18.53	2599.54	8607.19
Ac T/E	27	0.27	0.37	0.26	0.75	-0.25	1.00	0.50	-1.37	1.75	5.62	2259.03	5407.53
Ac WAT	28	0.11	0.13	0.26	0.25	0.25	-0.25	0.00	-0.71	0.50	1.96	1044.70	1999.97
FACE	29	0.00	0.27	0.17	0.75	0.75	0.25	0.50	-0.47	1.50	4.22	2678.17	8307.65
E DCM	30	0.02	0.12	0.14	3.75	0.50	-7.50	0.75	-2.08	3.00	17.58	162.33	0.00
<i>Ef</i> T/E	31	0.14	0.17	0.67	0.75	-2.00	0.50	0.25	0.58	1.50	5.58	2798.49	6239.21
Ef WAT	32	0.07	0.09	0.02	2.00	1.00	0.25	0.25	0.61	2.00	6.11	3707.96	9129.08

<u>Table S2</u>: TvGSTO2S, antimicrobial and antioxidative variables obtained with fractionated *Bagassa guianensis* (*Bg*) acetonic extract. The *Bg* acetonic extract was fractionated by reversedphase HPLC and each harvested fraction (1 mL) was analyzed as described in the Materials and Methods section.

		Reductase activity		Phenolic content
Fractions	$\Delta I_d IVGS102S($	(eq. in ascorbic acid in µg.L ⁻	(I) S.cerevisiae	(eq. in gallic acid in $\mu g.L^{-}$
	°C)	1)		
0	8.5	1091696.62	0.59	8599.51
1	7.0	1201733.29	0.56	9296.06
2	0.0	348171.80	0.53	133.29
12	1.0	496821.07	0.53	432.89
13	1.5	516598.95	0.39	478.20
17	3.0	687840.81	0.43	1726.34
18	3.5	721729.08	0.36	2387.13
19	4.0	832270.21	0.28	2211.36
20	5.0	1078902.05	0.20	7896.85
21	6.0	1323845.45	0.29	8108.74
22	9.0	2260937.25	0.00	13329.15
23	5.5	1178092.33	0.24	6224.87
24	3.0	756854.08	0.33	3874.90
25	3.5	925429.56	0.25	4955.32
26	3.0	824309.98	0.24	3372.01
27	2.5	739274.67	0.20	2671.77
28	2.0	666352.25	0.22	1704.17
29	1.0	635007.36	0.25	1535.30
30	1.0	610308.55	0.31	1921.17
31	1.0	659624.94	0.31	1351.16
32	1.5	696470.49	0.22	1760.18
33	1.0	610491.69	0.28	1145.47
34	1.0	568871.70	0.27	1198.26
35	1.0	561492.57	0.25	625.85
36	0.0	461916.40	0.36	476.95
37	0.5	516819.63	0.58	975.69
38	0.0	422270.92	0.44	374.54
39	0.0	404487.45	0.30	226.42
40	1.0	363146.77	0.23	124.57
41	1.0	921292.26	0.82	1231.63
42	0.0	429598.88	0.61	238.40
43	0.0	327514.90	0.31	124.04
44	0.0	293940.48	0.22	50.27
45	0.0	320253.36	0.26	34.42
46	0.0	296747.57	0.16	37.24
47	0.0	274838.32	0.19	38.72
48	0.0	318173.52	0.21	57.90
49	0.0	280902.09	0.21	35.15
50	0.0	284986.63	0.18	26.50
51	0.0	285778.25	0.25	6.35
52	0.0	262533.13	0.35	0.00
DMSO	0.0	259824.19	0.17	14.44

Table S3: Diffraction and refinement statistics

	GST	02S
	аро	oxyresveratrol
	Diffraction data	
Diffraction source	FIP-BM30A, ESRF	FIP-BM30A, ESRF
Detector	ADSC Q315r CCD	ADSC Q315r CCD
Wavelength (Å)	0.97975	0.97975
Unit-cell parameters		
a, b, c (Å)	59.0 93.0 96.0	58.6 93.9 95.8
α, β, γ (°)	90	90
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Resolution range (Å)	48.02 - 2.19 (2.33 - 2.19)	47.9 - 2.30 (2.44 - 2.30)
Total No. of reflections	198 770 (31 164)	174 134 (27 922)
No. of unique reflections	27 630 (4 309)	24 016 (3 819)
Average redundancy	7.2 (7.2)	7.2 (7.3)
Mean I/ $\sigma(I)$	16.5 (3.7)	13.8 (2.8)
Completeness (%)	99.7 (98.4)	99.9 (99.9)
R _{merge} (%)	10.4 (61.5)	13.7 (75.7)
R _{meas} (%)	11.2 (66.1)	14.7 (81.4)
$CC_{1/2}(\%)$	99.9 (92.0)	99.8 (85.7)
	Refinement	
Resolution range (Å)	48.02 - 2.19 (2.28 - 2.19)	47.91 - 2.30 (2.40 - 2.30)
R _{work} / R _{free}	0.20 / 0.26 (0.27 / 0.34)	0.19 / 0.25 (0.24 / 0.33)
No. of protein atoms	7 264	7 252
No. of waters	67	101
Average B factor (Å ²)		
All atoms	34.5	34.1
Ligands		45.7
	Model quality	
RMSZ bond lengths	0.56	0.56
RMSZ bond angles	0.63	0.63
Ramachandran favoured (%)	98.3	98.0
Ramachandran outliers (%)	0.2	0.2
Molprobity rotamer outliers (%)	1.3	1.4
Molprobity clashscore	4.13	3.28
Molprobity score	1.29	1.22



Figure S1 : GS-MS analysis of acetonic extract of Bagassa guianensis.

Figure S2: Real-time molecular interaction between TvGSTO2S and oxyresveratrol determined by switchSENSE[®] analysis. The His-tagged TvGSTO2S was immobilized on fluorescent dsDNA nanolevers and oxyresveratrol was injected into the fluidic at 100 μ M. (A) Association and (B) dissociation step.



Conclusion sur l'étude des GSTs de la classe Omega chez Trametes versicolor

L'ensemble des ces travaux a contribué à la compréhension des GSTs de la classe Omega chez *Trametes versicolor*. Tout d'abord, une première étude a montré la présence d'une TvGSTO1C dans une gouttelette colorée produite par le champignon (**Article n°1**). De plus, cette étude a aussi démontré la capacité de TvGSTO1C à catalyser des réactions de déglutathionylation (envers le GS-PAP) et de réduction (envers le 2-hydroxyéthyl disulfide, HED). Ces deux activités ont également été observées pour deux autres isoformes (TvGSTO2C et TvGSTO3C). D'autre part, afin de comprendre le rôle de TvGSTO1C, notamment dans l'exudat de *T. versicolor* produit sur du bois de chêne, une recherche de substrats et/ou de ligands potentiels a été menée. Cette recherche a mis en évidence l'effet stabilisateur induit par des extraits de bois de chêne sur la stabilité thermique de TvGSTO1C. Par ailleurs, une dizaine de flavonoïdes à l'état pur, ont aussi été testés sur la protéine et il s'est avéré que la quercétine induisait les plus forts effets stabilisateurs, suggérant une probable interaction entre la protéine et ce flavonoïde.

Dans ce premier article, la présence mutuelle d'enzymes appartenant au système oxydatif et au système de détoxication nous a conduit à mimer les conditions potentielles dans l'exudat. Pour cela, nous avons étudié le lien fonctionnel entre l'action d'une versatile peroxydase (TvVP2) et celle d'une GST de la classe Omega (TvGSTO1C) vis-à-vis de deux flavonoïdes : la quercétine et la catéchine. Le principe fut donc d'utiliser TvVP2 pour oxyder et rendre les flavonoïdes plus aptes à subir une attaque nucléophile du glutathion. C'est après la formation du composé glutathionylé que les GSTOs à cystéine catalytique (comme TvGSTO1C) seraient susceptibles d'interagir avec ce substrat. Précédemment, plusieurs études ont mis en évidence la capacité des enzymes de type oxydase comme les peroxydases, les tyrosinases et les cytochromes P450 monooxygénases à oxyder la catéchine (Oszmianski, Lee, 1990) et la quercétine (Kubo et al., 2004 ; Sokolová et al., 2012). Généralement, les premières formes oxydées de ces deux flavonoïdes se caractérisent sous la forme de semiquinones. Par la formation de cette forme, les étapes d'oxydation contribueraient, indirectement, à la glutathionylation des flavonoïdes oxydés (Moridani et al., 2001; Awad et al., 2000). En effet, les formes semiguinones sont aptes à être réduites par l'action du glutathion engendrant ainsi, la formation de flavonoïdes glutathionylées. Au regard de la littérature scientifique, différentes formes glutathionylées de la catéchine et de la quercétine après une succession de réactions d'oxydation peuvent être produites. Ces formes conjuguées diffèrent de par la position de l'adduit de glutathion sur le flavonoïde. Par exemple, dans le cas de la catéchine, une étude a montré que trois différentes formes glutathionylées étaient générées avec à l'intérieur, la présence d'un adduit de glutathion sur le cycle B aux positions 2', 6' et 5' (Figure n°50) (Moridani et al., 2001).



Figure n°50 : Structures chimiques des formes glutathionylées de la catéchine obtenues après une étape d'oxydation en présence d'une peroxydase de raifort et de peroxyde d'hydrogène (issue de Moridani et al., 2001).

En qui concerne la quercétine, le couplage entre les étapes d'oxydation et de glutathionylation a également été étudié. Par exemple, l'incubation de la quercétine en présence d'une peroxydase de raifort, de H₂O₂ et de glutathion a permis la formation de deux formes conjuguées détectées grâce à des analyses de résonance magnétique nucléaire (RMN) (Awad et al., 2000). Les deux formes diffèrent par la position du groupement glutathionylé pouvant être présent sur le cycle A soit à la position 6, soit à la position 8 (Figure n°51). Dixon et collaborateurs ont également mené des expériences d'oxydation de la quercétine avec la même peroxydase dans des conditions similaires. Cependant, les analyses en RMN couplées à de la spectrométrie de masse ont montré la présence d'un adduit de glutathion situé dans le cycle C du flavonoïde. Par la suite, des tests enzymatiques ont montré la capacité de certaines GSTs de plantes (de la classe Lambda) à déglutathionyler cette forme conjuguée (Dixon, Edwards, 2010 ; Lallement et al., 2014).



Figure n°51 : Structures chimiques des formes glutathionylées de la quercétine obtenues après une étape d'oxydation en présence d'une peroxydase de raifort, de peroxyde d'hydrogène et de glutathion (pour les positions 6 et 8 issue de Awad et al., 2000 et pour le cycle C issue de Dixon et Edwards, 2010)

Cependant, cette stratégie d'associer une étape d'oxydation à une glutathionylation, présente des inconvénients. D'abord, la formation de composés semiquinones lors de l'oxydation de molécules phénoliques montre une certaine instabilité. Dans certains cas, cette instabilité peut se traduire par une polymérisation des groupements quinones entre eux, formant ainsi des polymères complexes à la couleur parfois brunâtre (Oszmianski, Lee, 1990; Moridani et al., 2001). Dans les expériences réalisées précédemment (Article $n^{\circ}1$), cette polymérisation limite fortement la filtration et la séparation de la peroxydase du mélange réactionnel. De plus, malgré l'utilisation de techniques chromatographiques dédiées à la détection de molécules (chromatographie liquide à haute performance), l'autopolymérisation des semiquinones entre elles a pour conséquence la formation de molécules insolubles rendant difficile l'identification des produits d'oxydation. Par ailleurs, il n'est pas exclure que la peroxydase utilisée puisse, en présence de peroxyde d'hydrogène, oxyder directement le glutathion conduisant ainsi à la formation de deux molécules de glutathion reliées par un pont disulfure (glutathion oxydé, GSSG) (Galati et al., 1999). La présence de ce glutathion oxydée représente un problème dans l'analyse des résultats issus de l'étude de la dénaturation thermique de GSTs à cystéine. En effet, la cystéine libre de la protéine réduite est capable de cliver le pont disulfure de la molécule de GSSG, ce qui aurait pour conséquence la formation d'un adduit de glutathion lié à ce résidu. La présence de cet adduit stabiliserait significativement la protéine et dans ce cas, l'analyse des résultats pourrait s'avérer délicate.

Par la suite, six TvGSTOs possédant une sérine dans le site actif ont été étudiées afin d'identifier les substrats et/ou les ligands potentiels de ces enzymes. De nouveau, la méthode de l'étude de la dénaturation thermique des protéines a été utilisée. Des résultats préliminaires ont montré la capacité globale de ces protéines à intéragir avec des benzophénones. Afin de comprendre les interactions entre ces composés et les TvGSTOS, neuf benzophéones ont été testées. Une étude structure-fonction menée sur TvGSTO3S a montré une sélectivité de la protéine à fixer dans son site H, les benzophénones en fonction du nombre et de la position des groupes hydroxyles. Par ailleurs, cette même démache a été utilisée sur une dizaine de flavonoïdes. Malgré l'observation de profils d'interaction relativement communs entre les six TvGSTOS, une isoforme (TvGSTO6S) a montré une spécificité d'interaction avec un composé en particulier : la naringénine. Par des expériences de co-cristallisation, deux molécules de naringénine ont été identifiées dans le site L situé à l'interface de dimérisation. Cette observation est en accord avec l'absence d'inhibition de l'activité de glutathionylation par la naringénine, prouvant ainsi que le site H n'est pas impliqué dans l'interaction entre les deux partenaires. L'identification des cibles moléculaires des GSTs permettrait d'appréhender les fonctions potentielles de ces enzymes. Cependant, la recherche de substats et/ou de ligands potentiels représente un challenge majeur et requiert, généralement, l'utilisation de plusieurs méthodes complémentaires.

Dans le second article, une expérience de cristalographie d'affinité au cours de laquelle des cristaux de TvGSTO3S sont incubés en présence d'extraits acétoniques de bois de mersier a contribué à l'identification d'un ligand physiologique dans le site H de la protéine : la dihydrowogonine. Une molécule dont la structure est similaire à la dihydrowogonine (la wogonine) a été testée sur l'activité de glutathionylation de TvGSTO3S. Les résultats ont montré une forte inhibition de l'activité confirmant l'implication du site H dans la reconnaissance du flavonoïde (**Article n°2**).

Enfin, une troisième étude a confirmé la capacité ligandine d'une autre isoforme, TvGSTO2S, à interagir avec cette fois-ci, une nouvelle classe de polyphénols (celle des stilbènes) et notamment l'oxyresvératrol (**Article n°3**). Cette molécule a été identifiée dans un premier temps dans un extrait acétonique de bois de bagasse (*Bagassa guianensis*) qui présentait des réactivités biologiques importantes (activité antimicrobienne, antioxydante) et induisait un effet stabilisateur majeur sur la protéine TvGSTO2S. L'interaction entre TvGSTO2S et l'oxyresvératol a pu être confirmée par l'observation d'effets stabilisateurs, des inhibitions de l'activité de glutathionylation et un suivi en temps réel de l'interaction entre la protéine et son ligand. L'oxyresveratrol peut subir une photoisomérisation provoquant un changement de configuration passant de *trans* à *cis*. La caractérisation structurale a révélé la présence des deux configurations fixées dans deux sites distincts : la configuration *trans* dans le site H et la configuration *cis* dans le site L (à l'interface du dimère).

<u>Chapitre II : Etude d'une classe de GSTs conservée mais minoritaire chez *Trametes* <u>versicolor : la classe Xi</u></u>

Article n°4: *Trametes versicolor* Glutathione Transferase Xi 3, a dual Cys-GST with catalytic specificities of both Xi and Omega classes

Mathieu Schwartz[†], Thomas Perrot[†], Aurélie Deroy, Thomas Roret, Mélanie Morel-Rouhier, Guillermo Mulliert, Eric Gelhaye, Frédérique Favier and Claude Didierjean

† Co-auteurs

Cet article est en cours de révision dans FEBS Letter.

Parmi les 44 gènes codant des GSTs chez *Trametes versicolor*, 3 codent des GSTs de la classe Xi (TvGSTX1, TvGSTX2, TvGSTX3). Les GSTXs sont capables de déglutathionyler des dérivés d'hydroquinones. La ménadione glutathionylée (GS-MEN) est un exemple de substrat typique de ces enzymes. L'objectif de cet article fut de caractériser biochimiquement et structurellement deux isoformes de cette classe (TvGSTX1 et TvGSTX3). Pour cela, les TvGSTXs ont été étudiées sous forme recombinante après production et purification chez *Escherichia coli*.

Les résultats ont montré que les deux enzymes catalysent des réactions de déglutathionylation envers la GS-MEN. Cependant, l'une d'entre elles, TvGSTX3, catalyse aussi la réaction de déglutathionylation sur un substrat typique des GSTs de la classe Omega : le phénylacétophénone glutathionylé (GS-PAP ou PAP-SG). L'analyse des séquences peptidiques a indiqué la présence dans l'hélice α 9, d'une sérine (à la position 295) chez TvGSTX3 au lieu d'une histidine chez TvGSTX1. De plus, la caractérisation structurale a montré des différences dans le site H entre les deux protéines. En effet, la présence d'un résidu (en l'occurrence la sérine) dont l'encombrement stérique est relativement petit, permettrait à TvGSTX3 d'accepter des substrats autre que les hydroquinones. Cette hypothèse a été validée par des expériences de mutagénèse dirigée et par une approche de modélisation structurale.

<u>Résultats – Chapitre II – Article nº4</u>

Trametes versicolor Glutathione Transferase Xi 3, a dual Cys-GST with catalytic specificities of both Xi and Omega classes

Mathieu Schwartz^{1†}, Thomas Perrot^{2†}, Aurélie Deroy², Thomas Roret³, Mélanie Morel-Rouhier², Guillermo Mulliert¹, Eric Gelhaye², Frédérique Favier¹ and Claude Didierjean¹

¹ Université de Lorraine, CNRS, CRM2, Nancy, France.

² Université de Lorraine, INRA, IAM, Nancy, France.

³ Sorbonne Universités, CNRS, IBMM, Roscoff, France.

*Corresponding author: Claude.didierjean@univ-lorraine.fr.

[†] These authors contributed equally to this work.

ABSTRACT

Glutathione transferases (GSTs) from the Xi and Omega classes have a catalytic cysteine residue, which gives them reductase activities. Until now, they have been assigned distinct substrates. While Xi GSTs specifically reduce glutathionyl-(hydro)quinones, Omega GSTs are specialized in the reduction of glutathionyl-acetophenones. Here we present the biochemical and structural analysis of TvGSTX1 and TvGSTX3 isoforms from the wood-degrading fungus *Trametes versicolor*. TvGSTX1 reduces GS-menadione as expected while TvGSTX3 reduces both Xi and Omega substrates. An in-depth structural analysis indicates a broader active site for TvGSTX3 due to specific differences in the nature of the residues situated in the C-terminal helix α 9. This feature could explain the catalytic duality of TvGSTX3. Based on phylogenetic analysis we propose that this duality might exist in saprophytic fungi and ascomycetes.

KEYWORDS

Glutathione transferase Xi; Glutathionyl-hydroquinone reductase; Crystallography; Glutathionylacetophenone reductase; Dual enzyme activity

ABBREVIATIONS

GST, glutathione transferase; GSTX, Xi class GST; GSTO, Omega class GST; GHR, glutathionylhydroquinone reductase; GSH, glutathione; GS-PAP, glutathionyl-phenylacetophenone; GS-MEN, glutathionyl-menadione; CDNB, 1-Chloro 2,4-dinitrobenzene; rmsd, root mean square deviation; ESRF, European Synchrotron Radiation Facility; PDB, Protein Data Bank; CSD, Cambridge Structural Database; JGI, Joint Genome Institute.

INTRODUCTION

Glutathione transferases (GSTs) are widespread enzymes, which use glutathione (GSH) through several different types of reactions. Most GSTs that harbor a catalytic serine residue (SerGSTs) or a catalytic tyrosine residue (Tyr-GSTs) exhibit glutathione-transferase activity, and GSTs with a catalytic cysteine residue (Cys-GSTs) mainly possess glutathione-lyase activity (i.e. deglutathionylation)¹. Cys-GSTs biochemically characterized so far are subdivided into at least six classes, Beta², CLIC³, dehydroascorbate reductases⁴, Omega⁵, Lambda^{6,7}, and Xi⁸. GSTs adopt a conserved fold composed of two domains, namely an N-terminal thioredoxin-like domain, and a C-terminal α -helical domain. The active site, located in a cleft at the interface between domains, consists of a GSH-binding site (G site) and a hydrophobic-moiety binding site (H site). While Ser-GSTs and Tyr-GSTs are mainly dimeric, Cys-GSTs show more structural diversity. Indeed, GSTLs, DHARs and CLICs are monomeric, GSTBs and GSTOs assemble through the canonical dimer, and GSTXs form an atypical dimer.

GSTO isoforms from human (HsGSTO1) and from the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* (PcGSTO3 and PcGSTO4) have been shown to catalyze specific reduction of glutathionyl-acetophenones ⁸⁻¹⁰ (Figure 1). Board and coworkers proposed a reaction mechanism for human isoform HsGSTO1⁹. The catalytic thiolate is assumed to attack the thioether sulfur atom to give an acetophenone enolate and a mixed disulfide between glutathione and C32 of HsGSTO1. The enolate is readily protonated to produce the acetophenone. Then a molecule of glutathione reduces the active-site disulfide bond and achieves enzyme regeneration. The crystal structure of an enzyme-substrate complex provided no insight into the reaction mechanism. Indeed, the structure of the mutant HsGSTO1^{C32A} in complex with glutathionyl-nitroacetophenone (GS-NAP) revealed the substrate bound in a site too far from the active site to be of catalytic relevance¹¹.

GSTs of the Xi class constitute a distinct phylogenetic group¹² that has been characterized through multiple studies in bacteria (PcpF from *Sphingobium chlorophenolicum*¹³ and YqjG from *E. coli*¹⁴), fungi (ECM4 from *S. cerevisiae*^{15,16}, PcGSTX1 from *P. chrysosporium* previously named PcGHR¹⁸), and plants (PtGHR1 and PtGHR2 from poplar¹⁷). Contrary to GSTOs, GSTXs do not reduce glutathionyl-acetophenones but exhibit specific activity in reducing glutathionyl-(hydro)quinones^{18,19} (Figure 1). GSTXs have been initially named glutathionyl-hydroquinone reductases (GHRs) and such activity was not detected for GSTO isoforms^{18,20}. Green and coworkers¹⁴ proposed that three tyrosine residues and a cysteine within the active site contribute to the catalytic activity of Xi GSTs. First, the attack of the substrate by the catalytic thiolate together with an acid catalysis by the tyrosine cluster result in a mixed disulfide bond Cys-S-SG and a protonated hydroquinone. Then, the tyrosine triad acts as a base to activate a second glutathione molecule during the regenerative process.

<u>Résultats – Chapitre II – Article nº4</u>

Structural comparisons based on the crystal structure of *E. coli* YqjG isoform in complex with glutathionylmenadione enabled a description of the residues involved in the hydroquinone stabilization^{15,21}. The putative roles of five residues, F228, Y224, H345, H350 and W48 (ECM4 numbering) emerged from the active site analysis. The tyrosine and phenylalanine residues could stabilize the aromatic moiety of the substrate. The nitrogen atom of the W48 indole group and a water molecule coordinated by both histidine residues could interact with the carbonyl-quinone groups.

In this study, we present the biochemical and structural analysis of the GST isoforms X1 and X3 from the white rot *Trametes versicolor*. While both possess a GHR function as expected, TvGSTX3 has a surprising additional activity so far thought to be specific to GSTOs⁹. A crystallographic study helped in determining the molecular features that could explain this original profile. Then a phylogenetic analysis focused on fungal GSTXs investigated the possible distribution of this catalytic diversity.



Figure 1. Reactions catalyzed by GSTOs and GSTXs

GS-phenylacetophenone: glutathionyl-phenylacetophenone; GS-menadione: glutathionyl-menadione; GSH: glutathione ; GSSG : glutathione disulfide.

MATERIAL AND METHODS

Cloning, mutagenesis, expression and purification

Synthetic genes encoding TvGSTX1 (JGI accession number: Tv66368), TvGSTX3 (Tv73942), mutant TvGSTX3^{S295H} were purchased from GeneCust (Luxembourg). A site-directed mutagenesis experiment using two complementary mutagenic primers was performed for obtaining the catalytic mutant TvGSTX3^{C56S}. These genes were cloned into the recombinant plasmid pET26b in order to add a His-tag at the C-term for facilitating their purification (Table S1). Production step was made at 37°C by using a heterologous system with *Escherichia coli* Rosetta2TM (DE3) pLysS strain (Novagen) in a Luria Bertani Broth medium. The recombinant proteins were purified and eluted by using a column containing a Ni²⁺-nitriloacetate-agarose resin, as described previously ²². In addition, the expected molecular masses of the purified proteins were checked by mass spectrometry (electrospray ionization).

Enzymatic measurements

The reductase activity of the studied TvGSTXs was tested against glutathionyl-phenylacetophenone (GS-PAP) and glutathionyl-menadione (GS-MEN), the substrates being synthetized as described previously ²³. The appearance of the expected products (phenylacetophenone and menadione) was followed by reverse chromatography. The assays were carried out as developed previously⁷ and the concentration ranges were 5 - 200 μ M and 500 - 2500 μ M for GS-PAP and GS-MEN, respectively.

The glutathione transferase activity of the recombinant proteins towards 1-chloro 2,4dinitrobenzene (CDNB) was also investigated by using a spectrophotometric method described previously²⁴.

Crystallization, X-ray data collection, processing and refinement

Crystallization of TvGSTXs was conducted with the microbatch under oil method at 278 K. TvGSTX1 crystallized by mixing 1 μ L of protein (24 mg/mL) with 1 μ L of solution consisting in 16% (w/v) polyethylene glycol 4000, 0.1 M pH 8.5 Tris-HCl buffer and 0.2 M magnesium chloride. TvGSTX3 wildtype crystallized by mixing 2 μ L of protein (7.5 mg/mL) with 1 μ L of solution consisting in 20% (w/v) polyethylene glycol 8000, 0.1 M pH 6.5 sodium cacodylate buffer and 0.2 M magnesium acetate. TvGSTX3-GSH crystals were obtained by co-crystallization using the same conditions for the native protein and 10 mM glutathione. Monocrystals of TvGSTX3^{C56s} were obtained under the same conditions as those for the wild-type protein plus 0.2 μ L of 30% dextran sulfate sodium salt. All crystals were cryo-protected by a quick soaking in their mother liquor plus 20% glycerol. X-ray diffraction experiments were carried out on the ESRF beamline FIP BM30A (Grenoble, France). Data sets were indexed and integrated using XDS²⁵ and scaled with XSCALE or Aimless of the CCP4 suite²⁶. The structure of TvGSTX3 was solved by molecular replacement with MOLREP²⁷ using coordinates of PcGSTX1 (PDB code 3PPU)⁸ as the search model.

Structures were refined with PHENIX²⁸ and manually built with COOT²⁹. All structures were validated with MOLPROBITY³⁰. All figures were prepared by using Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC).

Docking study

Molecular docking calculations of GS-PAP in TvGSTX3 were performed by using GOLD software³¹. GSPAP binding site was defined by specifying the sulfur atom of catalytic cysteine C56 (TvGSTX3 numbering) as the center of the cavity. Distance constraints were applied in order to (i) maintain the glutathione moiety in its binding site (G site) and (ii) to keep plausible stereochemistry of the phenylacetophenone moiety, as defined from crystal structures of similar molecules from the Cambridge Structural Database (CSD)³². All other parameters were kept at their default values.

Phylogenetic analysis

GST Xi sequences were retrieved from the JGI database (https://jgi.doe.gov/) by the Protein Blast method using the sequences of TvGSTX1 and TvGSTX3 as templates. Putative GTSX sequences were curated manually. All sequences were aligned using the MAFFT multiple sequence alignment algorithm³³. Phylogenetic analysis was performed using the Neighbor-Joining method implemented in the MEGA7.0.21 software with 2000 bootstrap replicates ³⁴.

RESULTS AND DISCUSSION

1. TvGSTX1 reduces GS-MEN while TvGSTX3 reduces both GS-MEN and GS-PAP

Trametes versicolor possesses three GSTX-coding genes and the corresponding proteins are named TvGSTX1, TvGSTX2 and TvGSTX3. We purified recombinant TvGSTX1 and TvGSTX3, which shared 76% sequence identity (82% between TvGSTX1 and TvGSTX2, and 73% between TvGSTX2 and TvGSTX3). Mass-spectrometry experiments conducted with the two His-tagged proteins revealed masses of 37129 Da and 36982 Da (Table S2) respectively, consistent with native proteins in their reduced state (devoid of any covalent adduct, eg Cys-S-SG). TvGSTXs were both tested with different substrates to assess their reductase activity (classic GSTX substrate glutathionyl-menadione, GS-MEN; classic GSTO substrate glutathionyl-phenylacetophenone, GS-PAP) and GSH-transferase activity (classic GST substrate CDNB) (Table 1, Figure S1).

Expectedly, no GSH-transferase activity was detected for any isoform, which is a typical trait for most Cys-GSTs^{8,20}. TvGSTX1 and TvGSTX3 both have glutathionyl-hydroquinone reductase activity with the substrate GS-MEN (kcat/Km around 2200 mM⁻¹.min⁻¹) in accordance with data obtained on GSTXs from various organisms (PcGSTX1 from *P. chrysosporium*, 600 mM⁻¹.min⁻¹; PtGHR1 from poplar, 1000 mM⁻¹.min⁻¹; YqjG from *E. coli*, 1100 mM⁻¹.min⁻¹, Table 2). To complete the enzymatic profile of each isoform, the substrate GS-PAP (usually reduced by GSTOs but not GSTXs^{17,20}) was tested. While TvGSTX1 behaves like previously studied GSTXs and is inactive with GS-PAP, TvGSTX3 surprisingly reduces this substrate with a catalytic efficiency of 9152 mM⁻¹.min⁻¹, below but comparable to PcGSTOs (Table 2).

In order to further characterize the peculiar isoform TvGSTX3, we studied the mutant in which a serine residue replaced the catalytic cysteine C56 (TvGSTX3^{C56S}). As expected, TvGSTX3^{C56S} no longer reduced GS- derivatives consistently with data obtained with PcGSTX1^{C86S} in a previous study⁸. However, TvGSTX3^{C56S} acquired GSH-transferase activity with CDNB (Figure S1). The same property was observed for PcGSTO4^{C37S 20} but not for PcGSTX1^{C86S 8}. As a conclusion to these experiments, TvGSTX3 isoform has the singular catalytic property to behave both like a GHR and a GSTO. It prompted us to determine its crystal structure.

	GS-MEN	GS-PAP
	CH ₃ CH ₃ SG	SG SG
$K_m\left(\mu M ight)$		
TvGSTX1	921 ± 200	ND
TvGSTX3	2509 ± 257	207 ± 45
TvGSTX3 C56S	ND	ND
TvGSTX3 S295H	1055 ± 189	4861 ± 1576
k _{cat} (min-1)		
TvGSTX1	1966 ± 201	ND
TvGSTX3	5619 ± 361	1895 ± 257
TvGSTX3 C56S	ND	ND
TvGSTX3 S295H	205 ± 16	99 ± 26
$k_{cat}/K_m (mM^{-1}.min^{-1})$		
TvGSTX1	2196 ± 198	ND
TvGSTX3	2240 ± 143	9152 ± 1236
TvGSTX3 C56S	ND	ND
TvGSTX3 S295H	195 ± 15	15 ± 5

Table 1. Kinetic parameters of wild-type and mutant TvGSTXs

Data are represented as mean \pm S.D. (n = 3). ND: not detected. GS-MEN: glutathionylmenadione, GS-PAP: glutathionyl-phenylacetophenone.

Class	Organism	Enzyme	Catalytic efficiency	$(k_{cat}/K_m, mM^{-1}.min^{-1})$	References
			GS-hydroquinone	GS-acetophenone	
	Escherichia coli	EcYqjG	1100	ND	Xun, 2010; Green, 2012
	Saccharomyces cerevisiae	ScECM4	812	ND	Schwartz, 2016
CSTV	Phanerochaete chrysosporium	PcGSTX1	600	ND	Meux, 2011
651A		TvGSTX1	2196	ND	This study
	Trametes versicolor	TvGSTX3	2240	9152	This study
		TvGSTX3 ^{S295H}	195	15	This study
	Phananachasta ahmusaanarium	PcGSTO3	ND	2427	Meux, 2011
CSTO	F numerochaete chrysosporium	PcGSTO4	ND	52173	Meux, 2013
6310	Homo ganions	HsGSTO1-1	ND	780	Board, 2007; Xun, 2010
	nomo sapiens	HsGSTO2-2	ND	ND	Board, 2007; Xun, 2010

Table 2. Reductase activities of characterized GSTXs and GSTOs toward GS-hydroquinones or GS-acetophenones

ND means that reductase activity was not detected. For all GSTXs, Glutathionyl-hydroquinone reductase activity was assessed by using GS-MEN substrate. For all GSTOs, glutathionylacetophenone reductase activity was assessed by using GS-PAP substrate²⁰, except for HsGSTO isoforms for which GS-nitroacetophenone was used⁹.

2. TvGSTX1 and TvGSTX3 share similar structures with differences in the active site

A crystallographic study was undertaken on TvGSTX1 and TvGSTX3. We solved four structures: wild-type TvGSTX1^{WT}, wild-type TvGSTX3^{WT}, wild-type TvGSTX3^{GSH} co-crystallized with glutathione, and TvGSTX3^{C56S} mutant bound with dextran sulfate used as a crystallization additive (Table S3). The three structures that correspond to isoform TvGSTX3 are almost identical (largest root mean square deviation (rmsd) of 0.267 Å for 508 Ca aligned between TvGSTX3^{WT} and TvGSTX3^{C56S}). The only difference lies in the N-terminal end visible in electron density starting from Asp21 (monomer A) in TvGSTX3^{WT} and from Ala28 (monomers A) in TvGSTX3^{GSH} and TvGSTX3^{C56S}. This suggests some flexibility upon ligand binding. Superimposed structures of TvGSTX1^{WT} and TvGSTX3^{WT} indicate a high degree of likeness (rmsd of 0.569 Å for 488 Cα). Both isoforms display their highest structural homology with PcGSTX1 (rmsd of 0.546 Å for 563 Ca and sequence identity of 70% between TvGSTX1 and PcGSTX1) (Figure 2). In brief, TvGSTX monomers adopt the GST fold (N-terminal domain $\beta 1\alpha 1\beta 2\alpha 2\beta 3\beta 4\alpha 3$, and C-terminal domain $\alpha 4\alpha 5\alpha 6\alpha 7\alpha 8\alpha 9$) with the specific features of the Xi class, which include a long insertion loop between $\beta 2-\alpha 2$, extended N- and C-terminal coils, and an atypical dimerization mode by the helical domains⁸. In brief, TvGSTX monomers adopt the GST fold (N-terminal domain $\beta 1\alpha 1\beta 2\alpha 2\beta 3\beta 4\alpha 3$, and C-terminal domain $\alpha 4\alpha 5\alpha 6\alpha 7\alpha 8\alpha 9$) with the specific features of the Xi class, which include a long insertion loop between $\beta 2-\alpha 2$, extended N- and C-terminal coils, and an atypical dimerization mode by the helical domains⁸.

A detailed structural comparison of the active sites was done in an attempt to explain the catalytic profile of TvGSTX3 with respect to the X1 isoform. Both crystallographic structures indicate active sites that share many features in common. The determination of TvGSTX3^{GSH} structure enabled the identification of residues essential for glutathione recognition (G site) (Figure S2). GSH interacts mainly through polar contacts with the side chain or the main chain of the residues W89, R125, V128, E143 and S144. This binding site is strictly conserved in TvGSTX1, as in GSTX structures determined so far (Figure S3). The catalytic cysteine residue and the tyrosine triad are arranged in the same way in both isoforms. Significant differences are observed at the H site. On the one hand, the residues that line the putative quinone binding site (H site) of TvGSTX1 are identical to those suggested from the structures of PcGSTX1⁸, ScECM4¹⁵, and EcYqjG¹⁴. They include residues W58 from helix α 1, Y194 and F198 from $\alpha 4$, H296, and H301 from helix $\alpha 9$. On the other hand, both histidine residues are not conserved in TvGSTX3 and helix $\alpha 9$ is one residue shorter at its C-terminal end (Figure 2). Indeed, the ²⁹⁵SYYA-Q²⁹⁹ sequence in TvGSTX3 replaces the ²⁹⁶HYYWSH³⁰¹ sequence of TvGSTX1. These differences create an additional solvent accessible cleft in the active site of TvGSTX3, which is located between helix $\alpha 9$ and loop $\beta 2 - \alpha 2$. Its presence is mainly due to the replacement of the first histidine (H296 in TvGSTX1) by the smaller S295. The next section discusses the potential of this cleft as a binding site for the phenylacetophenone moiety of the TvGSTX3 substrate GS-PAP.



Figure 2. Crystal structures of TvGSTX1 and TvGSTX3

<u>Top panel</u>: Superimposition of TvGSTX1 dimer (white) and TvGSTX3 dimer (black) complexed with glutathione. Secondary structure elements are labeled and glutathione is represented as green sticks and spheres. <u>Bottom panels</u>: Active sites of TvGSTX1 (left) and TvGSTX3 (right). Differences present in TvGSTX3 helix α 9 create an accessible cleft (circled by a dotted line) near the catalytic cysteine C56. Molecular surfaces are represented in white transparency. Side-chains are displayed as red sticks and spheres.

In TvGSTX3^{C568} crystal structure, inspection of electron density maps revealed the presence of a crystallization additive bound to the active site (Figure S4). This ligand was identified as three units of dextran-sulfate (sulfated glycosidic polymer with α -1,6 bonds). Dextran-sulfate fully occupies both G and H sites. Sidechains of residues F197, S295 and N301 move to accommodate the ligand that is stabilized mainly by its sulfate groups. Five hydrogen bonds are established between the dextran and side chains from R112 (α 2), R125 (α 2- β 3, involved in glutathione binding), Y193 (α 4, which belongs to the tyrosine cluster), Q299 (α 9) and N301 (C-terminal tail). The presence of a polysaccharide in the active site may be of biological relevance. Indeed, it was shown that GSTX ScECM4 would be involved in the biosynthesis of the fungal cell wall³⁵, which is mainly constituted by carbohydrate polymers (chitin, β -1,3- and β -1,6- glucans)³⁶.

3. TvGSTX3 has a new cleft suited for GS-PAP binding

Enzymatic assays showed that TvGSTX1 and TvGSTX3 reduced GS-MEN as expected and unveiled an additional activity for TvGSTX3 in reducing GS-PAP. Crystallographic study revealed an additional accessible cleft in the active site of TvGSTX3 when compared to TvGSTX1 and known GSTX structures. A less bulky serine residue in helix α 9 of TvGSTX3 (S295) partly explains the presence of the new cleft. A histidine residue occupies this position in TvGSTX1 (H296). We generated the mutation S295H to evaluate the importance of this position in the catalytic diversity of TvGSTX3. The catalytic efficiency of TvGSTX3^{S295H} with GS-PAP dropped to 15 mM⁻¹.min⁻¹ (resulting in a 623-fold loss with respect to the wild-type protein) by decreasing both the apparent affinity for GS-PAP (K_m value multiplied by 24) and the turnover number (k_{cat} value divided by 19, Table 1). The GS-MEN activity did not show such a change. TvGSTX3^{S295H} was still active with GS-MEN though with a 10-fold drop in k_{cat}/K_m caused by a decrease of the catalytic rate only. This suggests that the histidine side-chain does not cause a decrease in the ability to bind GS-MEN, but that the conformation of the bound substrate is not ideal with respect to the catalytic mechanism. Our results show that a single mutation in TvGSTX3 helix α 9 leads to the near loss of the GSTO activity while retaining the GSTX activity.

We performed a molecular docking study to evaluate if the new cleft in the active site of TvGSTX3 and its activity against GS-PAP could be related. We assumed that the glutathionyl- moiety of GS-PAP would bind to the G site in a conformation similar to reduced glutathione in TvGSTX3^{GSH} and we applied atomic position constraints accordingly during molecular docking. Additionally, distance constraints based on small molecule crystal structures (CSD) were also applied to the phenylacetophenone group to maintain plausible stereochemistry. The constrained docking suggests three regions in the active site, which could be competent for phenylacetophenone-moiety binding (Figure 3). Indeed, we found a mean distance between the sulfur atom of the catalytic cysteine (C56) and the thioether sulfur atom of GS-PAP near 4 Å. The first region corresponds to the new cleft described in the previous section, between helix $\alpha 9$ and the adjacent loop $\beta 2$ - $\alpha 2$. The sidechains of Phe84, Tyr193, Ser295, Ala298 and Gln299 ensure a hydrophobic environment and a snug fit for the phenylacetophenone-moiety. These residues interact with the ligand dextran-sulfate in the TvGSTX3^{C56S} crystal structure (see above). The second region is located along helices α 4 and α 9 with Phe197 and Gln299 as the residues potentially engaged in stabilization of the glutathione adduct. The last region is perpendicular to the helix $\alpha 4$ with the side-chains of Trp58, Asn190 and Tyr193 as the closest neighbors of the phenylacetophenone-moiety. This third region corresponds to the menadionemoiety binding site in the crystal structure of EcYqjG in complex with GS-MEN¹⁴. Taken together, the mutagenesis study and the docking simulation support the reduction of GS-PAP with its phenylacetophenone-moiety bound in the cleft present in TvGSTX3 but not in TvGSTX1. In the next section, we investigate the differences between these two isoforms from a phylogenetic point of view.



Figure 3. Docking poses of GS-PAP in TvGSTX3 active site

Representative binding poses (n°1 in yellow, n°2 in cyan and n°3 in salmon) of GS-PAP were predicted by GOLD in TvGSTX3 active site. Region of pose n°1 is located in the cleft between $\beta 2$ - $\alpha 2$ and helix $\alpha 9$.

4. Helix α9 is prone to mutations in the active site of fungal GSTXs

Putative GSTX sequences were retrieved from the 49 fungal genomes that were used in two previous evolutionary studies^{37,38}. TvGSTX1 and TvGSTX3 were used as the queries for Protein BLAST searches. This set of sequences was aligned and used to perform a phylogenetic study (Figure S5). The results suggest the presence of at least one GSTX isoform in each organism. Larger numbers of GSTX isoforms (up to five in *Oidiodendron maius*) are found in two groups of organisms: ascomycetes and saprotrophic basidiomycetes (three isoforms in *T. versicolor*). Extensions of the GST classes Ure2p and GSTFuAs have been previously reported in wood-decayers, with more than 10 isoforms for some of them^{39,40}. In these classes, the sequences cluster in an organism-specific manner, which could reflect a recent diversification^{40,41}. We observed a similar trend for GSTXs.

The aligned sequences reveal the invariance of the catalytic cysteine as well as of the three tyrosine residues that form the catalytic triad (Figure S3). Most residues that constitute the substrate-binding sites (G and H sites) are also well conserved. Interestingly, variations are found at C-terminal helix α 9, which is a part of the H site bottom (Figure 4). Position 296 (TvGSTX1 numbering) is occupied by a His residue in 61% of the sequences or by a smaller residue in 28% (a Gly residue in most cases, S295 in TvGSTX3). This residue is critical in providing a large cleft in TvGSTX3 potentially related to its catalytic diversity.

An additional difference is found at position 301 with a histidine residue in 55% of the sequences (H301 in TvGSTX1 and Q299 in TvGSTX3). The sequences show that residues at positions 296 and 301 (TvGSTX1 numbering) tend to co-evolve. Indeed, when the first position is occupied by a non-His residue, so does the second one (81% of the cases). Thus, the helix α 9 region is probably prone to mutations as previously reported for solvent-exposed helices^{42,43}. This variable region could promote catalytic diversity in the GSTX family, as shown for TvGSTX3 isoform.



Figure 4. Neighbor-joining analysis of fungal GSTX revealed variations at helix a9

GS-MEN in TvGSTX1 active site (model based on the superimposition with YqjG complexed with GSMEN) is shown in left panel. The histidine pair (side-chains in green sticks) that coordinates a water molecule in the vicinity of GS-MEN (yellow sticks) is labeled. Neighbor-Joining analysis of representative GSTX sequences is displayed in the middle panel. Sequences for which the histidine pair is absent are in bold and original residues are indicated. Bootstrap values are indicated at nodes. Trave: *Trametes versicolor*, Phchr : *Phanerochaete chrysosporium*, Picst : *Pichia stipitis*, Sacce : *Saccharomyces cerevisiae*. GSTX important residues are indicated in the right panel: catalytic residues are colored red, putative (hydro)quinone binding site residues are colored gray. Numbering is based on TvGSTX1 sequence.

CONCLUSION

In this study we show that GSTX1 and GSTX3 from *T. versicolor* have the usual GS-(hydro)quinone reductase activity while TvGSTX3 has an additional glutathionyl-acetophenone reductase activity, a feature of GSTOs. Both have the GSTX fold and exhibit structural differences in the active site located at the C-terminal end of helix α 9. In TvGSTX3, the presence of smaller residues creates a new cleft that could offer favorable environment for GS-PAP and could explain the substrate diversity observed for this isoform, in accordance with mutagenesis and docking experiments. This peculiar H site makes TvGSTX3 a dual Cys-GST, which shares the substrate specificities of Xi and Omega classes. An examination of fungal GSTX sequences shows that the case of TvGSTX3 should not be unique. This suggests additional functions of GSTXs with respect to their initially assigned GHR activity. Further studies are necessary to clarify whether isoforms from different organisms also exhibit substrate diversity.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank ESRF for beamtime, and the staff of beamlines BM30A for data collections. The authors appreciated the access to the 'Plateforme de mesures de diffraction X' of the University of Lorraine with crystal testing.

FUNDING

This work has been funded by the Laboratory of Excellence Advanced Research on the Biology of Tree and Forest Ecosystems (ARBRE grant ANR 11 LABX 0002 01). The authors acknowledge financial support from the "Impact Biomolecules" project of the "Lorraine Université d'Excellence" (Investissements d'avenir – ANR).

AUTHOR CONTRIBUTIONS STATEMENT

CD, FF, EG, and MMR conceived and supervised the study. CD, EG, MS, and TP designed experiments. MS, TP, AD, GM, and CD performed experiments. MS, TR, TP, CD, GM, EG, and MMR analyzed data. MS, FF and CD wrote the manuscript. All authors made manuscript revisions.

DATA ACCESSIBILITY

Coordinates and structures factors of TvGSTX1^{WT}, TvGSTX3^{WT}, TvGSTX3^{GSH} and TvGSTX3^{C56S} have been deposited in the Protein Data Bank under accession codes 6GC9, 6GCA, 6GCB and, 6GCC, respectively.

REFERENCES

- 1 Lallement, P. A., Brouwer, B., Keech, O., Hecker, A. & Rouhier, N. The still mysterious roles of cysteine-containing glutathione transferases in plants. Front Pharmacol 5, 192, doi:10.3389/fphar.2014.00192 (2014).
- 2 Rossjohn, J. et al. A mixed disulfide bond in bacterial glutathione transferase: functional and evolutionary implications. Structure 6, 721-734, doi:https://doi.org/10.1016/S09692126(98)00074-4 (1998).
- 3 Cromer, B. A., Morton, C. J., Board, P. G. & Parker, M. W. From glutathione transferase to pore in a CLIC. European biophysics journal : EBJ 31, 356-364, doi:10.1007/s00249-0020219-1 (2002).
- 4 Lallement, P. A. et al. Insights into ascorbate regeneration in plants: investigating the redox and structural properties of dehydroascorbate reductases from Populus trichocarpa. The Biochemical journal 473, 717-731, doi:10.1042/BJ20151147 (2016).
- 5 Board, P. G. et al. Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. The Journal of biological chemistry 275, 24798-24806, doi:10.1074/jbc.M001706200 (2000).
- 6 Dixon, D. P. & Edwards, R. Roles for stress-inducible lambda glutathione transferases in flavonoid metabolism in plants as identified by ligand fishing. The Journal of biological chemistry 285, 36322-36329, doi:10.1074/jbc.M110.164806 (2010).

- 7 Lallement, P. A. et al. Structural and enzymatic insights into Lambda glutathione transferases from Populus trichocarpa, monomeric enzymes constituting an early divergent class specific to terrestrial plants. The Biochemical journal 462, 39-52, doi:10.1042/BJ20140390 (2014).
- 8 Meux, E. et al. Glutathione transferases of Phanerochaete chrysosporium: S-glutathionylphydroquinone reductase belongs to a new structural class. The Journal of biological chemistry 286, 9162-9173, doi:10.1074/jbc.M110.194548 (2011).
- 9 Board, P. G. & Anders, M. W. Glutathione transferase omega 1 catalyzes the reduction of S(phenacyl)glutathiones to acetophenones. Chem Res Toxicol 20, 149-154, doi:10.1021/tx600305y (2007).
- 10 Morel, M. et al. Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi. Microbial biotechnology 6, 248-263, doi:10.1111/1751-7915.12015 (2013).
- 11 Brock, J., G., B. P. & Oakley, A. J. Structural insights into omega-class glutathione transferases: a snapshot of enzyme reduction and identification of a non-catalytic ligandin site. Plos One 8, doi:10.1371/journal.pone.0060324.g001 (2013).
- 12 Mashiyama, S. T. et al. Large-scale determination of sequence, structure, and function relationships in cytosolic glutathione transferases across the biosphere. PLoS biology 12, e1001843, doi:10.1371/journal.pbio.1001843 (2014).
- Huang, Y., Xun, R., Chen, G. & Xun, L. Maintenance role of a glutathionyl-hydroquinone lyase (PcpF) in pentachlorophenol degradation by Sphingobium chlorophenolicum ATCC 39723. J Bacteriol 190, 7595-7600, doi:10.1128/JB.00489-08 (2008).
- 14 Green, A. R., Hayes, R. P., Xun, L. & Kang, C. Structural understanding of the glutathionedependent reduction mechanism of glutathionyl-hydroquinone reductases. The Journal of biological chemistry 287, 35838-35848, doi:10.1074/jbc.M112.395541 (2012).
- 15 Schwartz, M. et al. Crystal Structure of Saccharomyces cerevisiae ECM4, a Xi-Class Glutathione Transferase that Reacts with Glutathionyl-(hydro)quinones. PLoS One 11, e0164678, doi:10.1371/journal.pone.0164678 (2016).
- 16 Garcera, A., Barreto, L., Piedrafita, L., Tamarit, J. & Herrero, E. Saccharomyces cerevisiae cells have three Omega class glutathione S-transferases acting as 1-Cys thiol transferases. The Biochemical journal 398, 187-196, doi:10.1042/BJ20060034 (2006).
- 17 Lallement, P. A. et al. Glutathionyl-hydroquinone reductases from poplar are plastidial proteins that deglutathionylate both reduced and oxidized glutathionylated quinones. FEBS Lett 589, 37-44, doi:10.1016/j.febslet.2014.11.021 (2015).
- 18 Xun, L. et al. S-Glutathionyl-(chloro)hydroquinone reductases: a novel class of glutathione transferases. The Biochemical journal 428, 419-427, doi:10.1042/BJ20091863 (2010).
- 19 Lam, L. K., Zhang, Z., Board, P. G. & Xun, L. Reduction of benzoquinones to hydroquinones via spontaneous reaction with glutathione and enzymatic reaction by Sglutathionylhydroquinone reductases. Biochemistry 51, 5014-5021, doi:10.1021/bi300477z (2012).
- 20 Meux, E. et al. New substrates and activity of Phanerochaete chrysosporium Omega glutathione transferases. Biochimie 95, 336-346, doi:10.1016/j.biochi.2012.10.003 (2013).

- 21 Belchik, S. M. & Xun, L. S-glutathionyl-(chloro)hydroquinone reductases: a new class of glutathione transferases functioning as oxidoreductases. Drug Metab Rev 43, 307-316, doi:10.3109/03602532.2011.552909 (2011).
- 22 Deroy, A. et al. The GSTome Reflects the Chemical Environment of White-Rot Fungi. PLoS One 10, e0137083, doi:10.1371/journal.pone.0137083 (2015).
- 23 Nickerson, W. J., Falcone, G. & Strauss, G. Studies on Quinone-Thioethers. I. Mechanism of Formation and Properties of Thiodione*. Biochemistry 2, 537-543, doi:10.1021/bi00903a025 (1963).
- 24 Pegeot, H. et al. The poplar Phi class glutathione transferase: expression, activity and structure of GSTF1. Frontiers in plant science 5, 712, doi:10.3389/fpls.2014.00712 (2014).
- 25 Kabsch, W. Xds. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography 66, 125-132, doi:10.1107/S0907444909047337 (2010).
- 26 Winn, M. D. et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography 67, 235-242, doi:10.1107/S0907444910045749 (2011).
- 27 Vagin, A. & Teplyakov, A. Molecular replacement with MOLREP. Acta Crystallographica Section D 66, 22-25, doi:doi:10.1107/S0907444909042589 (2010).
- Adams, P. D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography 66, 213221, doi:10.1107/S0907444909052925 (2010).
- 29 Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography 60, 2126-2132, doi:10.1107/S0907444904019158 (2004).
- 30 Davis, I. W., Murray, L. W., Richardson, J. S. & Richardson, D. C. MOLPROBITY: structure validation and all-atom contact analysis for nucleic acids and their complexes. Nucleic Acids Res 32, W615-619, doi:10.1093/nar/gkh398 (2004).
- 31 L., V. M., C., C. J., J., H. M., W., M. C. & D., T. R. Improved protein-ligand docking using GOLD. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics 52, 609-623, doi:doi:10.1002/prot.10465 (2003).
- 32 Groom, C. R., Bruno, I. J., Lightfoot, M. P. & Ward, S. C. The Cambridge Structural Database. Acta crystallographica Section B, Structural science, crystal engineering and materials 72, 171-179, doi:10.1107/s2052520616003954 (2016).
- 33 Katoh, K. & Standley, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. Molecular biology and evolution 30, 772-780, doi:10.1093/molbev/mst010 (2013).
- 34 Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular biology and evolution 30, 2725-2729, doi:10.1093/molbev/mst197 (2013).
- 35 Lussier, M. et al. Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 147, 435-450 (1997).
- 36 Osumi, M. The ultrastructure of yeast: Cell wall structure and formation. Micron 29, 207233, doi:https://doi.org/10.1016/S0968-4328(97)00072-3 (1998).

- Floudas, D. et al. The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. Science 336, 1715-1719, doi:10.1126/science.1221748 (2012).
- 38 Kohler, A. et al. Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. Nat Genet 47, 410-415, doi:10.1038/ng.3223 (2015).
- 39 Morel, M., Ngadin, A. A., Droux, M., Jacquot, J. P. & Gelhaye, E. The fungal glutathione Stransferase system. Evidence of new classes in the wood-degrading basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. Cellular and molecular life sciences : CMLS 66, 3711-3725, doi:10.1007/s00018-009-0104-5 (2009).
- 40 Mathieu, Y. et al. Diversification of Fungal Specific Class A Glutathione Transferases in Saprotrophic Fungi. Plos One 8, doi:10.1371/journal.pone.0080298 (2013).
- 41 Roret, T. et al. Evolutionary divergence of Ure2pA glutathione transferases in wood degrading fungi. Fungal genetics and biology : FG & B 83, 103-112, doi:10.1016/j.fgb.2015.09.002 (2015).
- 42 Goldman, N., Thorne, J. L. & Jones, D. T. Assessing the Impact of Secondary Structure and Solvent Accessibility on Protein Evolution. Genetics 149, 445-458 (1998).
- 43 Abrusan, G. & Marsh, J. A. Alpha Helices Are More Robust to Mutations than Beta Strands. PLoS Comput Biol 12, e1005242, doi:10.1371/journal.pcbi.1005242 (2016).

Supplementary Material

Protein	Sequence
TvGSTX1 ^{WT}	CATATGAGCTCTACTACGCGCGACGTCTCGCACTTGTCCGACATCTCCAAGAGCATCTCT
	GAGCCAGACGGCTCGTTCAACCGCAAGCCCTCCGTGTTCAGGAACTTCGTGGAAAAGG
	GCGGCGCGTTCGCGCCCGAGAAGGGCCGGTACCACCTCTATGTGTCCTACGCATGCCCC
	TGGGCGACGCGCACGCTCATCGTGCGCAAGATCAAGGGCCTCGAGGAGTTCATAGACG
	TTAGCGTCGTCTCGCCGCGCATGGGCGCGCACGGCTGGCCGTTTGCGAACGTCGACGCG
	TTCCCCGGCGCCGACGCGGACCCCCTCTTCGGCGCGGAGCACGTCAAAGATTTGTACAT
	GCGCGTGAACCCCGACTACGAGGGCCGCTTCACGGTTCCTATCCTCTGGGACAAGAAG
	ACCTCGGCGATCGTGAACAACGAGAGCTCGGAGATCATCCGGATGTTCAACACCGCGT
	TCAATGACCAGCTCCCCTCGGACAAGGCCGCGATCGACCTCTACCCGGAGGCGCTCCGC
	GGGGAGATCGACGGGATTAACGAGTGGGTGTACGACACCGTCAACAACGGCGTGTAC
	AAGTCCGGCTTCGCGACATCACAGAAGGCATACGAGGCCGCGGTCGTCCCCCTGTTCG
	AGTCGCTCGACCGGCTCGAGAAGATCCTCACTGGCAAGGACTACCTCGTCGGCGACCA
	GCTCACAGAGGCAGATATTCGCCTCTTTGTGACCATCGTGCGCTTCGACCCCGTCTACGT
	CGGCCACTTCAAGTGCAACATCCGCACCATCCGCGATGGCTACCCTGCGATTGACCTGT
	GGATGCGGAAGCTGTACTGGAACAACTCCGCGTTCTCGTCGACGTGCAACTTTGAGCAC
	ATCAAGACGCATTACTACTGGTCGCATCCCCAGATTAACCCGCACCGCGTCGTGCCCGT
	GGGCCCGATCCCGAACATTCTTCCTCTGCACCATCACCATCACCATTAAGCGGCCGC
TvGSTX3 ^{WT}	CATATGGCAGCCACACGCGACGTCACCCACCTCACCGACATCAGCAAGGGCCTCGCGG
	AGGCGGACGGCTCGTTCAAGCGCAAAGCGTCGACCTTCCGCAGGTTCATCGAGAAGGG
	CGGCGAGTTCGAGCCTGAGAAAGGCCGGTACCATCTCTACGTCGCGTATTCCTGCCCGT
	GGGCGACGCGAACTCTGATCGTGCGGAAGATTAAGGGCCTCGAAGAGATCGTAGGGG
	TCACCATCGTGTCTCCGCTGTTCAGCGCGCATGGGTGGCCGTTCGGGGACGTCTCGCCCT
	TCCCTGGTGCCGAAGCCGACCCCTTCTACAACGCCCAGTACGTCAGGGATCTGTATCTC
	CGCGCGGACCCCAAATACGAGGGCCGCTTCACCGTCCCCGTGCTCTGGGATAAGAAGA
	CGGAGACGGTGGTGAACAACGAGAGCTCGGAGATCATCCGCATCTTCAACACCGCCTT
	CAACGAGTTCCTGCCCGCAGACAAAGCTGCGATCCACCTCTACCCGGAGGCTCTCAAG
	AGTGAGATCGACGAGATTAACGAGTGGGTGTACGATACCGTGAACAATGGTGTATACA
	AGGCCGGGTTTGCGACGACTCAGCAGGCGTACGAAGCGGCGGTCATCCCGCTCTTCGA
	GTCGCTCGACCGCCTCGAGAAGATTCTCACTGGCAAGGATTACCTGGTCGGAGATCAGC
	TTACCGAGGCAGACGTCCGGCTCTTCGTGACGATCATACGCTTCGATCCGGCGTACGTC
	GGACACTTCAAGTGCAACCTTCGCACTATCCGCGACGGGTACCCTGCGATCCACCTATG
	GCTCCGCAAGCTGTACTGGAACAACTCGGCATTCTCGGAGACGTGCAAGTTTGACCATA
	TCAAGGCGAGCTATTACGCGCAGAAGAATGTCAACCCTACCCTGGTTGTCCCTTTGGGT
	CCCATCCCGAACATCTTGCCTTTGCACCATCACCATCACCATTGAGCGGCCGC

Protein	Sequence
TvGSTX3 ^{C565}	CATATGGCAGCCACGCGACGTCACCCACCTCACCGACATCAGCAAGGGCCTCGCGG
	AGGCGGACGGCTCGTTCAAGCGCAAAGCGTCGACCTTCCGCAGGTTCATCGAGAAGGG
	CGGCGAGTTCGAGCCTGAGAAAGGCCGGTACCATCTCTACGTCCGCTATTCCTCCCCGT
	GGGCGACGCGAACTCTGATCGTGCGGAAGATTAAGGGCCTCGAAGAGATCGTAGGGG
	TCACCATCGTGTCTCCGCTGTTCAGCGCGCATGGGTGGCCGTTCGGGGACGTCTCGCCCT
	TCCCTGGTGCCGAAGCCGACCCCTTCTACAACGCCCAGTACGTCAGGGATCTGTATCTC
	CGCGCGGACCCCAAATACGAGGGCCGCTTCACCGTCCCCGTGCTCTGGGATAAGAAGA
	CGGAGACGGTGGTGAACAACGAGAGCTCGGAGATCATCCGCATCTTCAACACCGCCTT
	CAACGAGTTCCTGCCCGCAGACAAAGCTGCGATCCACCTCTACCCGGAGGCTCTCAAG
	AGTGAGATCGACGAGATTAACGAGTGGGTGTACGATACCGTGAACAATGGTGTATACA
	AGGCCGGGTTTGCGACGACTCAGCAGGCGTACGAAGCGGCGGTCATCCCGCTCTTCGA
	GTCGCTCGACCGCCTCGAGAAGATTCTCACTGGCAAGGATTACCTGGTCGGAGATCAG
	CTTACCGAGGCAGACGTCCGGCTCTTCGTGACGATCATACGCTTCGATCCGGCGTACGT
	CGGACACTTCAAGTGCAACCTTCGCACTATCCGCGACGGGTACCCTGCGATCCACCTAT
	GGCTCCGCAAGCTGTACTGGAACAACTCGGCATTCTCGGAGACGTGCAAGTTTGACCAT
	ATCAAGGCGAGCTATTACGCGCAGAAGAATGTCAACCCTACCCTGGTTGTCCCTTTGGG
	TCCCATCCCGAACATCTTGCCTTTGCACCATCACCATCACCATTGAGCGGCG
TvGSTX3 ^{5295H}	CATATGGCAGCCACGCGACGTCACCCACCTCACCGACATCAGCAAGGGCCTCGCGG
	AGGCGGACGGCTCGTTCAAGCGCAAAGCGTCGACCTTCCGCAGGTTCATCGAGAAGGG
	CGGCGAGTTCGAGCCTGAGAAAGGCCGGTACCATCTCTACGTCGCGTATTCCTGCCCGT
	GGGCGACGCGAACTCTGATCGTGCGGAAGATTAAGGGCCTCGAAGAGATCGTAGGGG
	TCACCATCGTGTCTCCGCTGTTCAGCGCGCATGGGTGGCCGTTCGGGGACGTCTCGCCCT
	TCCCTGGTGCCGAAGCCGACCCCTTCTACAACGCCCAGTACGTCAGGGATCTGTATCTC
	CGCGCGGACCCCAAATACGAGGGCCGCTTCACCGTCCCCGTGCTCTGGGATAAGAAGA
	CGGAGACGGTGGTGAACAACGAGAGCTCGGAGATCATCCGCATCTTCAACACCGCCTT
	CAACGAGTTCCTGCCCGCAGACAAAGCTGCGATCCACCTCTACCCGGAGGCTCTCAAG
	AGTGAGATCGACGAGATTAACGAGTGGGTGTACGATACCGTGAACAATGGTGTATACA
	AGGCCGGGTTTGCGACGACTCAGCAGGCGTACGAAGCGGCGGTCATCCCGCTCTTCGA
	GTCGCTCGACCGCCTCGAGAAGATTCTCACTGGCAAGGATTACCTGGTCGGAGATCAG
	CTTACCGAGGCAGACGTCCGGCTCTTCGTGACGATCATACGCTTCGATCCGGCGTACGT
	CGGACACTTCAAGTGCAACCTTCGCACTATCCGCGACGGGTACCCTGCGATCCACCTAT
	GGCTCCGCAAGCTGTACTGGAACAACTCGGCATTCTCGGAGACGTGCAAGTTTGACCAT
	ATCAAGGCGCACTATTACGCGCAGAAGAATGTCAACCCTACCCTGGTTGTCCCTTTGGG
	TCCCATCCCGAACATCTTGCCTTTGCACCATCACCATCACCATTGAGCGGCCGC

Table S1. Nucleotide sequences of TvGSTX1^{WT} and TvGSTX3^{WT}, ^{C56S} and ^{S295H} designed to contain a His-tag at the end of the C-terminal part.

Sequences coding for TvGSTX1^{WT}, TvGSTX3^{WT} and TvGSTX3^{S295H} have been obtained from gene synthesis whereas TvGSTX3^{C56S} has been generated by a site-directed mutagenesis experiment.

	Mass expected (Da)	Mass measured (Da)
TvGSTX1	37,129	37,129
TvGSTX3	36,982	36,982
TvGSTX3 C56S	36,966	36,966
TvGSTX3 S295H	37,032	37,032

Table S2. Mass spectrometry analysis of recombinant TvGSTXs

Molecular masses of mutant and wild type TvGSTXs were analyzed after purification. Mass-expected values correspond to proteins devoided of the first Met residue and bearing an hexa-histidine tag. Mass spectrometry analysis have been done by using a Bruker microTOF-Q spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with an Apollo II electrospray ionization source with an ion funnel and operated in the negative ion mode. A concentrated sample (around 100 μ L at 100 μ M) in formic acid has been injected. The potential between the spray needle and the orifice was set to 4.5 kV. Before each run, the instrument was calibrated externally with the TunemixTM mixture (Agilent Technologies) in quadratic regression mode. Data were analyzed with DataAnalysis software (Bruker).

	TvGSTX3 ^{WT}	TvGSIX3 ^{GSH}	Tr GSTX3 ^{C568}	Tv GSTX1 ^{WT}
	apo form	co-crystallized with GSH	co-crystallized with dextran-sulfate	apo form
Diffraction data				
Diffraction source	FIP-BMB0A. ESRF	FIP-BNB0A ESRF	FIP-BM30A. ESRF	FIP-BM30A ESRF
Detector	ADSC Q315r CCD	ADSC Q315r CCD	ADSC Q315r CCD	ADSC Q315r CCD
W ave length (Å)	0.97974	0.97972	0.97977	0.97973
Unit-cell parameters				
a. b. c (Å)	146.4 57.5 94.6	72.4 72.4 316.7	72.3 72.3 317.6	65.0 65.0 316.4
α. β. γ (°)	90 107.3 90	06	06	60
S pace group	8	P43212	P43212	P43212
Resolution range (Å)	48.68 - 2.28 (2.34 - 2.28)	48.69 - 1.80 (1.84 - 1.80)	46.01 - 1.90 (1.94 - 1.90)	45.45 - 3.20 (3.42 - 3.20)
Total No. of reflections	125,406 (8,906)	650,332 (12,729)	242,903 (9,766)	165,198 (30,309)
No. of unique reflections	33,851 (2,465)	78,924 (4,842)	65,928 (3,578)	12,131 (2,132)
Average redundancy	3.7 (3.6)	8.2 (2.6)	3.7 (2.7)	13.6 (9.7)
Mean I/o(I)	14.0 (2.0)	13.7 (1.8)	15.5 (3.4)	11.0 (4.2)
C ompleteness (%)	98.1 (97.8)	98.6 (83.7)	97.6 (85.0)	100 (100)
Rmarge	0.10 (0.69)	0.11 (0.39)	0.06 (0.25)	0.25 (0.78)
R _{meas}	0.12 (0.81)	0.11 (0.48)	0.07 (0.31)	0.26 (0.81)
$\mathbb{R}_{\mathrm{pim}}$	0.06 (0.37)	0.05 (0.29)	0.03 (0.16)	0.07 (0.21)
CC1/2	1.00 (0.76)	1.00 (0.76)	1.00 (0.93)	1.00 (0.96)
R efinement				
Resolution range (Å)	48.68 - 2.28 (2.35 - 2.28)	48.69 - 1.80 (1.82 - 1.80)	46.01 - 1.90 (1.93 - 1.90)	45.45 - 3.20 (3.52 - 3.20)
$\mathbf{R}_{\mathrm{mork}}$ / $\mathbf{R}_{\mathrm{free}}$	0.16 / 0.23 (0.25 / 0.36)	0.16 / 0.19 (0.25 / 0.26)	0.16 / 0.19 (0.40 / 0.38)	0.22 / 0.25 (0.26 / 0.33)
No. of protein a toms	9,583	9,455	9,489	4,787
No. of waters	358	492	740	8
Average B factor (Å?)	26.4	14.8	22.6	56.5
M odel quality			6 6	
KUNISZ DONG JENGUIS	/ C-0	0.40	(C.)	05.0
RMSZ b ond angles	0.65	0.60	0.63	0.45
Ramachandran favoured (%)	97.1	98.8	98.4	94.4
Ramachandran outliers (%)	0.0	0.0	0.0	1.2
Motprobity rotamer outliers (%)	0.6	0.2	0.0	0.0
Molprobity clashscore	1.77	0.63	0.94	10.28
Molprobity score	1.09	0.71	0.78	1.91
PDB code	6GCA	6GCB	6GCC	6GC9

<u>Résultats – Chapitre II – Article nº4</u>

Table S3. Diffraction and refinement statistics

$$\begin{split} &\operatorname{Rmerge} = \sum h \, kl \, \sum i |Ii(h \, kl) - \langle I(h \, kl) \rangle | / \, \sum h \, kl \, \sum i \, Ii(h \, kl). \\ &\operatorname{Rmeas} = \sum h \, kl \{ N(h \, kl) / [N(h \, kl) - 1] \} \, 1/2 \, \sum i |Ii(h \, kl) - \langle I(h \, kl) \rangle | / \, \sum h \, kl \, \sum i \, Ii(h \, kl). \\ &\operatorname{Rpim} = \sum h \, kl \{ 1 / [N(h \, kl) - 1] \} \, 1/2 \, \sum i |Ii(h \, kl) - \langle I(h \, kl) \rangle | / \, \sum h \, kl \, \sum i \, Ii(h \, kl). \\ &\operatorname{Rwork} = \sum h \, kl ||Fobs| - |Fcalc|| / \, \sum h \, kl |Fobs|. \end{split}$$

CC1/2 is the correlation coefficient of the mean intensities between two random half-sets of data¹. 5% of reflections were selected for Rfree calculation. RMSZ: root mean square Z-score². The Molprobity clashscore is the number of serious clashes per 1000 atoms³. The Molprobity score is a log-weighted combination of the clashscore, percentage Ramachandran not favored and percentage bad side-chain rotamers³. Values in parentheses are for highest resolution shell.



Figure S1. Glutathione transferase activity towards CDNB for the mutant TvGSTX3^{C56S} Glutathione transferase activity was assessed by using 1-chloro 2,4-dinitrobenzene (CDNB) and glutathione (GSH) in a 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA buffer at room temperature. Enzymatic reaction was triggered by adding 5 μ M of TvGSTX3^{C56S} to the mixture (black arrow). Absorbance of



Figure S2. Glutathione bound to TvGSTX3 G site

the product was monitored at 340 nm.

2Fo-Fc electron density omit map around glutathione is shown at 1.0σ . Glutathione binding site residues are displayed as sticks and polar contacts are represented as dashed lines.

						M	S
Cto 2m Concol 404E						M	5 C
Gto3p Sacce1 4945						M	S
GSTX1 Trave1 66368	M					S	S
GSTX2 Trave1 50990						М	s
CCmx21mmorre1172042						W	7
GSINS ILAVEL / 5942						M	A
GSTX1 Phchr2 2982482	MSFT	TGST	LQHQ	EA	QLQGAKDETV	TQLEQRA	A
GSTX2 Phchr2 2624184	MTSLSASGSA	IHITFLTNGL	LDTL	TRRFTSTPLR	LLRPASYVQA	PYISLRKANM	ST
Agabi varbisH97 21137	М					A	A
hgabi_vaibibibi;_2,157							
Amamui /8/66						M	S
Amath1 62909							M
Aspnid1 4489						М	A
Acomid1 17997						M	F
						M	E
Aspnid1 8922							
Aurde3 1 115815							
Aurde3 111240856							
Deth -1/110200							
BOTDO1 118302							
Conpu1 60697							
Conpu1 82579						М	A
Compi1117111							M
Coperi 1/111							M
Crypa2 254574						М	К
Dacsp1 67545						М	S
Fomme11130383						м	D
Fommer 190905						14	A .
Fomme1 130388						М	S
Fomme1 143667	M					S	T
Fompi311022961	MTT.V	TRLL	TASR	TBTS	RUSATREPSS	T.H-T.HTTSRT	м
Fompi31127425							M
romp13 12/425							M
Galma1 62390						М	S
Glotr1 1 112236							
Glotr1 11120329						·	S
G10CT1_1120320						- M	5
Glotr1_1 137290							
Glotr1 1 37102							М
Complet1126122							M
Gymrui 36123							M
Hebcy2 440337						М	S
Hetan2 39076							
Hetan2 442680	м					A	Δ
necanz 442000	14					л 	-
Hydp12 96315						M	T
Hypsu1 37440						М	S
Hvpsu1 40330						М	s
Taga 11140100							-
Jaaari 142100							
Jaaar1 63226						М	P
Lacbi2 648000							
Mellp1135938						м	D
Meripi (55950						14	л Ъ
Oidma1 124122						М	R
Oidma1 165197						М	S
0idma11192545						М	_
							E
010111120460							E
Oidma1 39468						М	E AP
Oidma1 39468 Oidma1 46504						М М	E AP T
Oidma1 39468 Oidma1 46504 Paxin1 138020						М М	E AP T
Oidma1 132345 Oidma1 39468 Oidma1 46504 Paxin1 138020						M M	E AP T
Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxinl 138020 Paxrul 825741	 MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	 RPLIAPS	SLPKHSHSLV	M M ERSSFRT	E AP T S
Oidmal 182345 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxinl 138020 Paxrul 825741 Phybl2 126467	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	M M ERSSFRT M	E AP T S S
Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxin1 138020 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	M M ERSSFRT M	E AP T S S
Oidmal 182345 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxinl 138020 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilor1 4571	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	M M ERSSFRT M	E AP T S S S
Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxin1 138020 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcr1 4571	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	M M ERSSFRT M	E AP T S S S
Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxin1 138020 Paxru1 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcr1 4571 Pilcr1 827566	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	M M ERSSFRT M M	E AP S S S A
Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxinl 138020 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcrl 4571 Pilcrl 827566 Pirinl 77935	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	M M ERSSFRT M M M	E AP S S S S
Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxin1 138020 Paxru1 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcr1 4571 Pilcr1 827566 Pirin1 77935 Pisti1 121423	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	IAPS	SLPKHSHSLV	M M ERSSFRT M M M M	E AP S S S S A S A
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxinl 138020 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcr1 4571 Pilcr1 827566 Pirinl 77935 Pistil 121423 PlacePCI5 2/48940	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	M M ERSSFRT M M M M	EAP TS SS SS AA SS
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcr1 4571 Pilcr1 827566 Pirini 77935 Pisti1 121423 PleosPC15_2 48940	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	M M ERSSFRT M M M M	E AP S S S S A S A
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxin1 138020 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcr1 4571 Pilcr1 827566 Pirin1 77935 Pistil 121423 PleosEC15_2 48940 Plicr1 42268	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	IAPS	SLPKHSHSLV	M ERSSFRT M M M M M M M	EAP AP SS SS AA AS SS
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxinl 138020 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcrl 4571 Pilcrl 827566 Pirinl 77935 Pistil 121423 PleosPC15_2 48940 Plicrl 42268 Plicrl 43753	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL		IAPSIAPSIAPS	SLPKHSHSLV	M M ERSSFRT M M M M M M	EAP TS SS SS AA AS SS SS AS
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcr1 4571 Pilcr1 827566 Pirin1 77935 Pisti 121423 PleosPC15_2 48940 Plicr1 42758	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	IAPS	SLPKHSHSLV	M M ERSSFRT M M M M M 	EAP AP S S S S A S S S A
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxinl 38020 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcrl 4571 Pilcrl 827566 Pirinl 77935 Pistil 121423 PleosPC15_2 48940 Plicrl 42268 Plicrl 43753 Plicrl 43758 Punst1 118707	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	M ERSSFRT M M M M M 	EAP SS SS SS AA AS SS AS AS AS
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcr1 4571 Pilcr1 827566 Pirini 77935 Pisti1 121423 PleosPC15_2 48940 Plicr1 4268 Plicr1 43753 Plicr1 43758 Punst1 118707	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	M M ERSSFRT M M M M M 	EAP TS SS SS AA AS SS SS AS
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxin1 138020 Paxru1 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcr1 4571 Pilcr1 827566 Pirin1 77935 Pisti1 121423 PleosPC15_2 48940 Plicr1 42268 Plicr1 43753 Plicr1 43758 Punst1 118707 Punst1 52675	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	I IRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	M M ERSSFRT M M M M M TA TA M M M	EAP AP SS SS AA AS SS AS AA AA AA
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxinl 38020 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcrl 4571 Pilcrl 827566 Pirinl 77935 Pistil 121423 PleosPC15_2 48940 Plicrl 42268 Plicrl 43753 Plicrl 43758 Punstl 118707 Punstl 52675 Punstl 55793	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	M M ERSSFRT M M M M M M M M M M M	EAP APS SS SS AA AS SS AS AS AS AA AA AA AA
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcr1 4571 Pilcr1 827566 Pirin1 77935 Pisti1 121423 PleosPC15_2 48940 Plicr1 42753 Plicr1 43753 Plicr1 43758 Punst1 118707 Punst1 52675 Punst1 52793 Punst1 62356	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	M M ERSSFRT M M M M TA TA TA M M M M	EAP AP SS SS A AS SS AS
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxin1 38020 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcrl 4571 Pilcrl 827566 Pirin1 77935 Pistil 121423 PleosEC15_2 48940 Plicrl 42268 Plicrl 43753 Plicrl 43758 Punstl 18707 Punstl 52675 Punstl 55793 Punstl 5256	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	M M ERSSFRT M M M M M M M M M M M	EAP AP SS SS AA AS AS AS AA AS AS AS AS AS
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcr1 4571 Pilcr1 827566 Pirini 77935 Pisti1 121423 PleosPC15_2 48940 Plicr1 42268 Plicr1 43753 Plicr1 43758 Punst1 118707 Punst1 52675 Punst1 52793 Punst1 62356 Schco3 2086920	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	M M ERSSFRT M 	EAP APS SS SS AA AS SA AS AA AS AA AS AA AS
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxin1 138020 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcrl 4571 Pilcrl 827566 Pirin1 77935 Pistil 121423 PleosPC15_2 48940 Plicrl 42268 Plicrl 42753 Plicrl 43758 Punst1 118707 Punst1 52675 Punst1 52793 Punst1 52356 Schco3 2086920 Schco3 2516063	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	MM	EAP AP SS SS AA SS SS AA AA AA AA AA AA AA SA AA AA SA SA AA SA SA SA SA AA SA SA SA SA AA AA AA SA SA AAA SAAA
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxinl 38020 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcrl 4571 Pilcrl 827566 Pirinl 77935 Pistil 121423 PleosPC15_2 48940 Plicrl 42268 Plicrl 43753 Plicrl 43758 Punstl 18707 Punstl 52675 Punstl 55793 Punstl 52575 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	I IRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	MMMMM	EAP SS SS AS AS AS AS AS AS AS AS AS AS S
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcrl 4571 Pilcrl 827566 Pirin1 77935 Pistil 121423 PleosPC15_2 48940 Plicrl 42268 Plicrl 43753 Plicrl 43753 Plicrl 18707 Punst1 152675 Punst1 152793 Punst1 52356 Schco3 2086920 Schco3 2615640 Schco3 2615640	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	MMMMM	EAP AP SS SS A A S S S A S A A A A A A A A A A A S A A S A S S A S S A S S A S S S A S S A S A S S A S A S A S A S A S A S A S A S A S A S A S A S A S A S
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxin1 38020 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcrl 4571 Pilcrl 827566 Pirin1 77935 Pistil 121423 PleosEC15_2 48940 Plicrl 42268 Plicrl 43753 Plicrl 43758 Punstl 18707 Punstl 12758 Punstl 15793 Punstl 55793 Punstl 55793 Punstl 52675 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclcil 100395	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	I IRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV SLPKHSHSLV IIIGTRA	M M ERSSFRT M M M M M M M M M M M M M	EAP AP SS SS A AS AS AS AS AS AS AS AS AS AS SS SS SS SS
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcr1 4571 Pilcr1 827566 Pirini 77935 Pisti1 121423 PleosPC15_2 48940 Plicr1 42268 Plicr1 43753 Plicr1 43758 Punst1 118707 Punst1 52675 Punst1 52575 Punst1 52573 Punst1 5256 Schco3 2086920 Schco3 2615640 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebvel 329667	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	MM ERSSFRTMMMM	EAP SS SS AA AA SA A A A A A A A A A A A S A S A S A S A S A S A S A S A S A S A S A S A S A S A S
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxin1 138020 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcr1 4571 Pilcr1 827566 Pirin1 77935 Pisti1 121423 PleosPC15_2 48940 Plicr1 42268 Plicr1 43753 Plicr1 43753 Plicr1 43758 Punst1 118707 Punst1 52675 Punst1 52675 Punst1 52576 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 10395 Sebvel 329667 SerlaS7_9_2	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	MMMMM	EAP SS SS AA AS SS AS AA AA AA AS SS SS SS TS TS T
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxin1 38020 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcrl 4571 Pilcrl 827566 Pirin1 77935 Pistil 121423 PleosPC15_2 48940 Plicrl 42268 Plicrl 43753 Plicrl 43758 Punstl 18707 Punstl 52675 Punstl 55793 Punstl 55793 Punstl 52575 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclcil 100395 Sebvel 329667 SerlaS7_9_2 Sohstl 178948	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	MMMMM	EAPSSSSS
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcr1 4571 Pilcr1 827566 Pirin1 77935 Pisti1 121423 PleosPC15_2 48940 Plicr1 42268 Plicr1 43753 Plicr1 43753 Plicr1 43758 Punst1 118707 Punst1 52675 Punst1 52675 Punst1 525793 Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebvel 329667 SerlaS7_9_2 Sphst1 178948 Srbst1 178948	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	MMMMM	EAP AP SS SS A A SS AS AS AS AS AS TS SS T T
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxin1 138020 Paxru1 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcr1 4571 Pilcr1 827566 Pirin1 77935 Pisti1 121423 PleosPC15_2 48940 Plicr1 42268 Plicr1 43753 Plicr1 43758 Punst1 13777 Punst1 52675 Punst1 18777 Punst1 5275 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebvel 329667 Serlas7_9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178963	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	I IRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	MMMMM	EAP SS SS AA AS AS SS AA AA AA SA SA SA SA SA SA SA TS TS TS TS TS TS TS TS TS TS TS TSS TS TSS SS SS T S T S T T T T T T T T T T T T T T T T T T T
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxinl 138020 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcr1 4571 Pilcr1 827566 Pirinl 77935 Pisti1 121423 PleosPC15_2 48940 Plicr1 42268 Plicr1 43753 Plicr1 43753 Plicr1 43758 Punst1 118707 Punst1 52675 Punst1 55793 Punst1 5256 Schco3 2086920 Schco3 2615640 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebvel 329667 SerlaS7_9 2 Sphst1 178948 Sphst1 178963 Sphst1 178963	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	MM ERSSFRTMMMMM	EAP SS SS AA AS AS AS AS AS AS AS TS S TS S TS TS TS TS TS TS TS TS TS TS TS SS TS SS SS SS SS SS SS T S T S T
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxin1 138020 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcrl 4571 Pilcrl 827566 Pirin1 77935 Pisti1 121423 PleosPC15_2 48940 Plicrl 42268 Plicrl 43753 Plicrl 43753 Plicrl 43758 Punst1 12675 Punst1 52675 Punst1 52675 Punst1 5256 Schco3 2086920 Schco3 2615640 Sclco3 2615640 Sclco3 2615640 Sclco3 209667 SerlaS7_9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178948 Sphst1 193280 Sphst1 232298	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	MMMMM	EAP SS SS AA AS AS SS AA AA AA SS SS SS SS TS TS TS TS TS TS TS TS
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcrl 4571 Pilcrl 827566 Pirini 77935 Pisti1 121423 PleosPC15_2 48940 Plicrl 4268 Plicrl 43753 Plicrl 43758 Punst1 52675 Punst1 55793 Punst1 5275 Schco3 2086920 Schco3 2615640 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebvel 329667 SerlaS7_9_2 Sphst1 78948 Sphst1 178963 Sphst1 193280 Sphst1 232298	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	MM ERSSFRTMMMM	EAP SS SS AS AA SS AS AS AS AS AS TS SS TS S TS TS TS TS TS TS TS TS TS TS TS TS TS TS TS TS TS TS T T TS T TS TS TS T T T T T T T T T T
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxin1 138020 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcr1 4571 Pilcr1 827566 Pirin1 77935 Pisti1 121423 PleosPC15_2 48940 Plicr1 42268 Plicr1 43753 Plicr1 43753 Plicr1 43758 Punst1 18707 Punst1 52675 Punst1 52675 Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebvel 329667 SerlaS7_9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178948 Sphst1 178963 Sphst1 232298 Stano2 8800	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	MMMMM	EAP AP SS SS A A A S S A S A A A A A A A A S A A A A S A A S A A S A A S T
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxin1 138020 Paxru1 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcr1 4571 Pilcr1 827566 Pirin1 77935 Pisti1 121423 PleosPC15_2 48940 Plicr1 42268 Plicr1 43753 Plicr1 43758 Punst1 18707 Punst1 52675 Punst1 15793 Punst1 5256 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebvel 329667 Serlas7_9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178963 Sphst1 232298 Stano2 8800 Suilu1 799805	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	MMMMM	EAP SS SS AA AS AS AS AA AA AA AA SS SS TS T T T T T T T T
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxinl 138020 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcr1 4571 Pilcr1 827566 Pirinl 77935 Pistil 121423 PleosPC15_2 48940 Plicr1 42268 Plicr1 43753 Plicr1 43753 Plicr1 43753 Punst1 52675 Punst1 55793 Punst1 52675 Schco3 2086920 Schco3 2615640 Schco3 2615640 Schco3 2615640 Sclcil 100395 Sebvel 329667 SerlaS7_9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178948 Sphst1 193280 Sphst1 132298 Stano2 8800 Suilul 799805 Treme1 57346	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	MMMMM	EAP SS SS SS AS AS AS AS AS TS TS TS TS TS TS TS TS TS TS SS TS TS TS S S
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxin1 138020 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcrl 4571 Pilcrl 827566 Pirin1 77935 Pisti1 121423 PleosPC15_2 48940 Plicrl 42268 Plicrl 42753 Plicrl 43753 Plicrl 43758 Punst1 12675 Punst1 52675 Punst1 52675 Punst1 5256 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebvel 329667 SerlaS7_9_2 Sphst1 78948 Sphst1 78948 Sphst1 178963 Sphst1 13280 Sphst1 232298 Stano2 8800 Sulul 799805 Tremel 57346	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV SLPKHSHSLV IIIGTRA VVSSSPRSSL	MMMMM	E
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcr1 4571 Pilcr1 827566 Pirini 77935 Pisti1 121423 PleosPC15_2 48940 Plicr1 4268 Plicr1 43753 Plicr1 43758 Punst1 15773 Punst1 55793 Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebvel 329667 SerlaS7_9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178948 Sphst1 178963 Sphst1 13280 Sphst1 139280 Stano2 8800 Suilul 799805 Tremel 57346 Trire2 112633	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV SLPKHSHSLV IIIGTRA VVSSSPRSSL	MMMMM	EAP APS SSS AA AS SS AS A A AS AS TS TS T
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxin1 138020 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcrl 4571 Pilcrl 827566 Pirin1 77935 Pisti1 121423 PleosPC15_2 48940 Plicrl 42268 Plicrl 43753 Plicrl 43753 Plicrl 43758 Punst1 118707 Punst1 52675 Punst1 52793 Punst1 62356 Schco3 20186920 Schco3 2615640 Sclcil 100395 Sebvel 329667 SerlaS7_9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178948 Sphst1 193280 Sphst1 232298 Stano2 8800 Sulul 799805 Tremel 57346 Trire2 112633 Trire2 56819	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	MMMMM	E
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxin1 138020 Paxru1 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcr1 4571 Pilcr1 827566 Pirin1 77935 Pisti1 121423 PleosPC15_2 48940 Plicr1 42268 Plicr1 43753 Plicr1 43758 Punst1 18707 Punst1 52675 Punst1 15793 Punst1 5256 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebvel 329667 Serlas7_9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178963 Sphst1 193280 Sphst1 232298 Stano2 8800 Suilu1 799805 Tremel 57346 Trire2 12633 Trire2 56819 Tubmel 220	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	MMMMM	E AP
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxin1 38020 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcr1 4571 Pilcr1 827566 Pirin1 77935 Pisti1 121423 PleosPC15_2 48940 Plicr1 42268 Plicr1 43753 Plicr1 43753 Plicr1 43753 Punst1 52675 Punst1 52675 Punst1 52576 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebvel 329667 SerlaS7_9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178948 Sphst1 178963 Sphst1 1789805 Tremel 57346 Trire2 112633 Trire2 5619 Tubmel 220 Tubmel 6088	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	MM ERSSFRTMMMMM	EAP AP SS SS AS AS AS AS AS AS TS TS TS T T T T T T T F T S I F RQ T F A
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxin1 138020 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcrl 4571 Pilcrl 827566 Pirin1 77935 Pisti1 121423 PleosPC15_2 48940 Plicrl 42268 Plicrl 43753 Plicrl 43753 Plicrl 43758 Punst1 12675 Punst1 52675 Punst1 52675 Punst1 5256 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebvel 329667 SerlaS7_9_2 Sphst1 78948 Sphst1 78948 Sphst1 78948 Sphst1 78920 Stano2 8800 Sulul 799805 Tremel 57346 Trire2 12633 Trire2 56819 Tubmel 220 Tubmel 6088	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	MMMMM	E
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxinl 138020 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcr1 4571 Pilcr1 827566 Pirini 77935 Pisti1 121423 PleosPC15_2 48940 Plicr1 42268 Plicr1 43753 Plicr1 43758 Punst1 12675 Punst1 55793 Punst1 55793 Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2615640 Schco3 2615640 Schco3 2615640 Schco3 2615640 Schco3 29667 SerlaS7_9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178948 Sphst1 178948 Sphst1 178963 Sphst1 193280 Sphst1 1799805 Treme1 57346 Trire2 12633 Trire2 5619 Tubme1 220 Tubme1 6088 Tulca1 76207	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	MMMMM	E
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxin1 38020 Paxrul 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcr1 4571 Pilcr1 827566 Pirin1 77935 Pisti1 121423 PleosPC15_2 48940 Plicr1 42268 Plicr1 43753 Plicr1 43753 Plicr1 43758 Punst1 118707 Punst1 52675 Punst1 52675 Schco3 2086920 Schco3 2615640 Schco3 2615640 Schco3 2615640 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebvel 329667 SerlaS7_9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178948 Sphst1 193280 Syhst1 232298 Stanc2 8800 Sulul 799805 Tremel 57346 Trire2 112633 Trire2 56819 Tubmel 220 Tubmel 6088 Tulca1 76222	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	MMMMM	E
Oidmal 39468 Oidmal 39468 Oidmal 46504 Paxin1 138020 Paxru1 825741 Phybl2 126467 Picst3 43969 Pilcr1 4571 Pilcr1 827566 Pirin1 77935 Pisti1 121423 PleosPC15_2 48940 Plicr1 42268 Plicr1 43753 Plicr1 43758 Punst1 118707 Punst1 52675 Punst1 152675 Punst1 52675 Punst1 5256 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebvel 329667 Serla57 9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178963 Sphst1 178963 Sphst1 13280 Sphst1 13280 Sphst1 13980 Stano2 8800 Suilu1 / 799805 Treme1 57346 Trire2 12633 Trire2 56819 Tubme1 6088 Tulca1 76207 Tulca1 76222 Ustmal 1515	MSADEQVKFL	PGMATPIRQL	IIRGCSLASQ	RPLIAPS	SLPKHSHSLV	MMMMM	E AP

Gto2p(ECM4) Sacce1 39					KQWA-SG	TNGAFK	R-QVSSFR
Gto3p Sacce1 4945					EKSA-SN	NKAEFK	R-QSSPFR
GSTX1 Trave1 66368			TT	RDVSHLSDI-	SKSI-SE	PDGSFN	R-KPSVFR
GSTX2 Trave1 50990			ST	RDVSHLTDI-	TKRP-LE	PDGTFK	R-RPTSFR
GSTX3 Trave1 73942			AT	RDVTHLTDI-	SKGL-AE	ADGSFK	R-KASTFR
GSTX1 Phchr2 2982482			GG	ASHELQSDI-	SKMK-TE	DDGSFK	R-KAASFR
GSTX2 Phchr2 2624184	G	STLPHQHTAL	QQANEQRLPA	RD-PGQSDV-	SKMK-MQ	ADGSFD	R-KPSTFR
Agabi_varbisH97_2 137			МТ	REVSSQSDI-	GKMK-TE	PNGAYK	R-LEASFR
Amamu1 78766			ST	KDISQFTDI-	GKMK-TE	PDGTFK	R-QVSQFR
Amath1 62909			ST	RDVTDQSDI-	TKMK-VE	ADGSFK	R-LDASFR
Aspnid1 4489				ENET-	YKHAD	KDGHFR	R-KDSVFR
Aspnid1 7897		LVLRR-	AN	QLTDISKKI-	TDWVNPGD	KSGEFK	R-QASVFR
Aspnid1 8922				MPH-	HEPST	AD	GWH
Aurde3_1 115815			MS	RDVSSQVDI-	SKGKFHG	ADGSFQ	R-APSSFR
Aurde3_1 1240856			MS	RDTSSQSDI-	TKLP-TA	ADGSFQ	R-APSSFR
Botbo1 118302				MSQSDI-	TKWHS	DDGHFR	R-QQSTFR
Conpu1 60697					MA-TE	KDGSFK	R-ADAAFR
Conpu1 82579				SKNADH-	RIVP-TD	KDGSFK	R-PDSAFR
Copci1 17111			TS	NDSSSQADV-	YKAP-RN	EDGSIK	F-HTTSFR
Crypa2 254574				-QSTSPFKV-	TNWVDPKD	KSGEFK	R-QVSSFR
Dacsp1 67545				AEKKDI-	TSWAA	KDGQFK	R-QASTFR
Fomme1 130383			SD	AGTGDQTDL-	TKLE-RE	KDGSFK	R-QASSFR
Fomme1 130388			SA	PGTGDQTDLR	NNLS-RD	KDGSFK	R-QVSTFR
Fomme1 143667			AT	RDVSHQSDI-	SKMK-AE	GDGEFK	R-KPSTFR
Fompi3 1022961			GT	RDVTHVSDI-	tkrvq-ta	ADGSFL	R-PASQFR
Fompi3 127425			ST	RDVTHLTDI-	NKMA-PE	QDGSFN	R-RPSQFR
Ga1ma1 62390			TT	KDTTLQSDI-	TKFK-TE	SDGSFK	R-ADASFR
Glotr1_1 112236			MS	RNAEEQSDI-	TRLK-FE	ADGSFK	R-LDSSFR
Giotr1_1/120328				SAATNI-	HELGT	AD	GWH
Glotr1_1 137290			MS	RDTRSQSDV-	SKQL-IE	KDGSFK	R-PDSVFR
Glotr1_1 37102			SG	GDCQSQADV-	SQQP-IG	KDGSFK	R-PDSVFR
Gymlu1 36123			ST	RDVSHQSDI-	AKMK-TE	PDGTFK	R-LDSIFR
Hebcy2 440337			TT	KDTTLQSDI-	GKMK-TE	PDGSFK	R-LDASFR
Hetan2 39076			MS	TTAVSQANP-	AEKK-GE	PDGSFK	R-PASSFR
Hetan2 442680			AA	RDVSHQSNI-	AKMR-TD	GDGSFK	R-LPSTFR
Hydpi2 96315			SA	RDSSHQSDI-	GKMK-LE	ADGSFK	R-AASAFR
Hypsu1 37440			TA	KDATLQSDI-	TKMK-RQ	PDGSFN	R-APSSFR
Hypsu1 40330			TP	KDSVSQSDV-	GLMK-RE	PDGSFK	R-PDSSFR
Jaaar1 142100			MS	KDVSLQADI-	SKMG-SQ	PDGSFK	R-APASFR
Jaaar1 63226			AS	KDVSLQADI-	SKMG-SQ	PDGSFK	R-APASFR
Lacb12 648000					MK-TE	PDGSFK	R-LDASFR
Mellp1 35938			NSNSKLDH	SIQSSRKEI-	TTWAS	EDGHFR	R-QASSFR
Oidma1 124122		GQLL	EL	TSHSQATKI-	TDWVAPND	KSGEFK	R-GQSQFR
Oidma1 165197			ET	KKTAAAESI-	NSVV-DA	ATGEFK	R-PAAQFR
01dma1 182545			S	KTEAESKDV-	TEVVERA-AE	SIGHIQ	R-KASQFR
Oidma1 39468			ST	ADNPEDKDV-	YKFN-FE	KNGTFK	R-QVSSFR
01dma1 46504				IKNDP-	GSEAD	DDGHFR	R-PEAKIR
Paxini 138020			M	TSTSNQADI-	GKMK-LE	SDGSFK	R-AASAFR
Paxru1 825/41			SM	TSTSNQADI-	GRMK-LE	SDGSFK	R-AASAFR
Phyd12 126467				TKPAI-	LNWAS	KDGEFK	R-QQSVFR
Picst3 43969				*DAGLOGDT	LKFAA	NDGAFH	R-RPSLFR
Pilcri 45/1			TK	KDASLQSDI-	TKER-HE	PDGSFR	R-APSVFR
Pilcri 82/500			TK	RDTSLQSDF-	AKLK-IE	PDGSIK	R-IPSAFR
Pirini 77955			ENNSNIGA	RDVSNMSDI-	SKSK-ME	NDCSEK	R-RPSSER
PISCII 121425			5v	RDIILQSDI-	GAMK-DE	ADCSEK	R-ADAGER
Plicen1142269					MK-FE	ADGSFK	N-NUCOFR
Plior1142200			mo		TKKE-IN	PDGSFK	R-NVSIER
Plice1143758			IQ	RDIILQSDI-	JKMK-TE	PDGSFK	R-ARSOFR
Punst1 118707							I. I.DAVIK
Punst1 52675				STURFUP-	AKEK-T.O	ADGST.K	R-POSAFP
			λ Ψ	RDVSKOSDT-	AKFK-LQ	ADGSLK	R-PQSAFR
Punst1 55793			AT	ATOAD	AKFK-LQ TKMT-TD	ADGSLK PDGSFK DHKDFV	R-PQSAFR R-KASTFR P-PDGSWH
Punst1 55793 Punst1 62356			AT 	STDLTDP- RDVSKQSDI- ATQAD LSRHL-	AKFK-LQ TKMT-TD GS RGFCSPRS	ADGSLK PDGSFK DHKDFV ASGSAKTGDT	R-PQSAFR R-KASTFR P-PDGSWH LLR-KVAVFT
Punst1 55793 Punst1 62356 Schco3 2086920			AT AT 	ATQAD LSRHL-	AKFK-LQ TKMT-TD GS RGFCSPRS T-NA	ADGSLK PDGSFK DHKDFV ASGSAKTGDT PDGSYO	R-PQSAFR R-KASTFR P-PDGSWH LLR-KVAVFT R-PPSOFR
Punst1 55793 Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063			AT 	STDLTDP- RDVSKQSDI- ATQAD LSRHL-	AKFK-LQ TKMT-TD GS RGFCSPRS T-NA N-EK	ADGSLK PDGSFK DHKDFV ASGSAKTGDT PDGSYQ SDGSFK	R-PQSAFR R-KASTFR P-PDGSWH LLR-KVAVFT R-PPSQFR R-ODSSFR
Punst1 55793 Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640		PSLRYOPSK-	AT 	RDVSKQSDI- ATQAD LSRHL- RTMTTOLDIG	AKFK-LQ TKMT-TD GS RGFCSPRS T-NA N-EK TRV0-TD	ADGSLK PDGSFK DHKDFV ASGSAKTGDT PDGSYQ SDGSFK KDGSFV	R-PQSAFR R-KASTFR P-PDGSWH LLR-KVAVFT R-PPSQFR R-QDSSFR R-PASSFR
Punst1 [55793 Punst1 [62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395	-RLACPSHPQ	PSLRYQPSK-	AT 	RDVSKQSDI- ATQAD- LSRHL- RTMTTQLDIG KDHTLOSDI-	AKFK-LQ TKMT-TD GS RGFCSPRS T-NA N-EK TRVQ-TD GKMT-LE	ADGSLK PDGSFK ASGSAKTGDT PDGSYQ SDGSFK KDGSFV ADGSFK	R-PQSAFR R-KASTFR P-PDGSWH LLR-KVAVFT R-PPSQFR R-QDSSFR R-PASSFR R-AASSFR
Punst1 55793 Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebvel 329667		PSLRYQPSK-	AT	RDVSKQSDI- ATQAD- LSRHL- RTMTTQLDIG KDHTLQSDI- MSDI-	AKFK-LQ TKMT-TD GS RGFCSPRS T-NA N-EK TRVQ-TD GKMT-LE SKSK-ME	ADGSLK PDGSFK ASGSAKTGDT PDGSYQ SDGSFK KDGSFV ADGSFK ODGSFN	R-PQSAFR R-KASTFR P-PDGSWH LLR-KVAVFT R-PPSQFR R-QDSSFR R-PASSFR R-AASSFR R-KPSTFR
Punst1 55793 Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebve1 329667 SerlaS7 9 2	-RLACPSHPQ	PSLRYQPSK-	AT 	STDLIDP RDVSKQSDI- LSRHL- LSRHL- RTMTTQLDIG KDHTLQSDI- RDTSHOSDI-	AKFK-LQ TKMT-TD G RGFCSPRS T-NA N-EK TRVQ-TD GKMT-LE SKSK-ME AKLK-TE	ADGSLK PDGSFK DHKDFV ASGSAKTGDT PDGSYQ SDGSFK ADGSFK QDGSFN ADGSFK	R-PQSAFR R-KASTFR P-PDGSWH LLR-KVAVFT R-PPSQFR R-QDSSFR R-PASSFR R-AASSFR R-AASSFR R-AASVFR
Punst1 55793 Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebve1 329667 SerlaS7 9 2 Sphst1 178948	-RLACPSHPQ	PSLRYQPSK-	AT	STDLIDP RDVSKQSDI- ATQAD LSRHL- 	AKFK-LQ TKMT-TD GS RGFCSPRS T-NA N-EK TRVQ-TD GKMT-LE SKSK-ME AKLK-TE TKSNPID	ADGSLK PDGSSFK DHKDFV ASGSAKTGDT PDGSYQ SDGSFK KDGSFK KDGSFK KDGSFK	R-PQSAFR P-PDGSWH LLR-KVAVFT R-PPSQFR R-QDSSFR R-PASSFR R-AASSFR R-AASSFR R-AASSFR
Punst1 55793 Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebve1 329667 SerlaS7 9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178963		PSLRYQPSK-	AT	RDVSKQSDI- ATQAD- LSRHL- 	AKFK-LQ TKMT-TD GS RGFCSPRS T-NA N-EK TRVQ-TD GKMT-LE SKSK-ME AKLK-TE TKSNPID T-AN	ADGSSLK PDGSFK ASGSAKTGDT PDGSYQ SDGSFK QDGSFK QDGSFK KDGSFK KDGSFK	R-PQSAFR R-PDGSWH LLR-KVAVFT R-PPSQFR R-PASSFR R-PASSFR R-AASFR R-AASFR R-PSSSFR
Punst1 55793 Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebvel 329667 SerlaS7_9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178963 Sphst1 193280		PSLRYQPSK-	AT 	STDLIDD RDVSKQSDI- ATQAD- LSRHL- RTMTQLDIG KDHTLQSDI- MSQI RDTSHQSDI- MSQSDI- NHTSNQSVV- NDTSNQSVV-	AKFK-LQ TKMT-TD GKMT-RA T-NA N-EK TRVQ-TD GKMT-LE SKSK-ME AKLK-TE TKSNPID T-AN	ADGSLK PDGSFK ASGSAKTGDT PDGSYQ SDGSFK KDGSFK QDGSFK ADGSFK KDGSFK KQGAFV KQGAFV	R-PQSAFR R-PDGSWH LLR-KVAVFT R-PDSQFR R-QDSSFR R-PASSFR R-AASSFR R-AASVFR R-AASVFR R-PSSSFR R-PSSSFR
Punst1 55793 Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebve1 329667 SerlaS7_9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178963 Sphst1 193280 Sphst1 232298	RLACPSHPQ	PSLRYQPSK-	AT	STDLIDDP RDVSKQSDI- ATQAD- LSRHL- RSQLDI RDTTQLDIG KDHTLQSDI- MSQLDI- RDTSHQSDI- NHTSNQSVV- NDTSNQSVV- KDTSTPNPP-	AKFK-LQ TKMT-TD GKMT-TA GS RGFC-SPRS T-NA N-EK TRVQ-TD GKMT-LE SKSK-ME AKLK-TE TKSNPID T-AN TA	ADGSLK PDGSFK DHKDFV ASGSAKTGDT PDGSYQ SDGSFK QDGSFK QDGSFK ADGSFK KDGSFK KQGAFV KQGAFV	R-PQSAFR R-PASSWH LLR-KVAVFT R-PPSQFR R-QDSSFR R-PASSFR R-AASSFR R-AASVFR R-AASFR R-PSSSFR R-PSSSFR R-TASSFR
Punst1 55793 Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebvel 329667 SerlaS7 9 2 Sphst1 178948 Sphst1 178963 Sphst1 232298 Stano2 8800	-RLACPSHPQ	PSLRYQPSK-	AT LK LK AS AK MS MS MS	STDLIDF RDVSKQSDI- ATQAD- LSRHL- 	AKFK-LQ TKMT-TD GKMT-NA N-EK TRVQ-TD GKMT-LE SKSK-ME AKLK-TE TKSNPID T-AN T-AN HKYGT	ADGSLK PDGSFK DHKDFV ASGSAKTGDT PDGSYQ SDGSFK ADGSFK QDGSFN KDGSFK KDGSFK KQGAFV KQGAFV DD	R-PQSAFR R-KASTFR P-PDGSWH LLR-KVAVFT R-PPSQFR R-QDSSFR R-AASSFR R-AASSFR R-AASVFR R-AASVFR R-PSSSFR R-PSSSFR R-PSSSFR R-PSSSFR
Punst1 55793 Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebve1 329667 SerlaS7 9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178963 Sphst1 232298 Stano2 8800 Suilu1 799805	-RLACPSHPQ	PSLRYQPSK-	AT LK LK AS AK MS MS MS MS	STDLIDF RDVSKQSDI- ATQAD- LSRHL- 	AKFK-LQ TKMT-TD GS RGFC-SPRS N-EK TRVQ-TD GKMT-LE SKSK-ME AKLK-TE TKSNPID T-AN T-AN HKYGT GKMR-TE	ADGSLK PDGSFK ASGSAKTGDT PDGSYQ SDGSFK ADGSFK ADGSFK KQGAFV KQGAFV KQGAFV DD ADGSFK	R-PQSAFR P-PDGSWH LLR-KVAVFT R-PPSQFR R-PASSFR R-PASSFR R-AASFR R-AASFR R-AASFR R-ASSFR R-TASSFR R-AASFR R-AASFR
Punst1 55793 Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebve1 329667 SerlaS7 9 2 Sphst1 178948 Sphst1 178963 Sphst1 232298 Stano2 8800 Suilu1 799805 Treme1 57346	-RLACPSHPQ	PSLRYQPSK-	AT LK 	STDLIDE RDVSKQSDI- ATQAD- LSRHL- RTMTTQLDIG KDHTLQSDI- MSDI- RDTSHQSDI- MSQSDI- NHTSNQSVV- NDTSNQSVV- KDTSTPNPP- TEI- KDVSSQSDI- TVTQKI	AKFK-LQ TKMT-TD GRGFCSPRS T-NA N-EK TRVQ-TD GKMT-LE SKSK-ME AKLK-TE TKSNPID T-AN TAN TAN TN HKYGT GKMR-TE TDWA-DK	ADGSSLK PDGSFK ASGSAKTGDT PDGSYQ SDGSFK QDGSFK QDGSFK KQGAFV KQGAFV KQGAFV ADGSFK ADGSFK	R-PQSAFR R-PDGSWH LLR-KVAVFT R-PDSQFR R-QDSSFR R-QDSSFR R-AASSFR R-AASSFR R-AASVFR R-PSSSFR R-PSSSFR R-PSSSFR R-AASSFR R-AASSFR R-AASSFR R-AASSFR R-AASSFR
Punst1 55793 Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebve1 329667 SerlaS7_9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178963 Sphst1 232298 Stano2 8800 Suilul 799805 Treme1 57346 Trire2 112633	RLACPSHPQ	PSIRYQPSK-	AT 	STDLIDF RDVSKQSDI- ATQAD- LSRHL- 	AKFK-LQ TKMT-TD GS RGFCSPRS T-NA N-EK TRVQ-TD GKMT-LE SKSK-ME AKLK-TE TKSNPID T-AN T-AN TAN 	ADGSLK PDGSFK ASGSAKTGDT PDGSYQ SDGSFK QDGSFK QDGSFK KQGAFV KQGAFV KQGAFV KQGAFV KDGSFK DD KDGSFK KGGSFK KGGSFK KGGFK	R-PQSAFR R-PASSTFR R-PDSQFR R-QDSSFR R-QDSSFR R-AASSFR R-AASSFR R-AASVFR R-AASSFR R-PSSSFR R-PSSSFR R-TASSFR R-AASSFR R-AASSFR R-AASSFR R-AASSFR R-AASSFR R-AASSFR R-AASSFR R-AASSFR R-AASSFR
Punst1 55793 Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebvel 329667 SerlaS7 9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178963 Sphst1 232298 Stano2 8800 Suilu1 799805 Treme1 57346 Trire2 51633 Trire2 56819	RLACPSHPQ	PSLRYQPSK-	AT 	STDLIDF RDVSKQSDI- ATQAD- LSRHL- 	AKFK-LQ TKMT-TD GS RGFCSPRS T-NA N-EK TRVQ-TD GKMT-LE SKSK-ME AKLK-TE TKSNPID T-AN TA HKYGT GKMR-TE TDWA-DK VQQT-YH TDWVKPGD	ADGSLK PDGSFK ASGSAKTGDT PDGSYQ SDGSFK QDGSFN QDGSFK RDGSFK KQGAFV KQGAFV DD ADGSFK KDGSFK KDGSFK KGGFFK	R-PQSAFR R-PASSFR R-PDGSWH LLR-KVAVFT R-PDSQFR R-QDSSFR R-AASSFR R-AASSFR R-AASVFR R-AASVFR R-PSSSFR R-PSSSFR R-PSSSFR R-AASSFR R-QTSTFR R-QVSSFR
Punst1 55793 Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebvel 329667 SerlaS7_9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178963 Sphst1 232298 Stano2 8800 Suilu1 799805 Treme1 57346 Trire2 112633 Trire2 56819 Tubme1 220	-RLACPSHPQ	PSLRYQPSK-	AT 	STDLIDF RDVSKQSDI- ATQAD- LSRHL- 	AKFK-LQ TKMT-TD SRGFCSPRS T-NA N-EK TRVQ-TD GKMT-LE SKSK-ME AKLK-TE TKSNPID T-AN T-AN HKYGT GKMR-TE TDWA-DK VQQT-YH TDWVKPGD TDWCTPDS	ADGSLK PDGSFK ASGSAKTGDT PDGSYQ SDGSFK ADGSFK ADGSFK KQGAFV KQGAFV DD ADGSFK KDGSFK KDGSFK KTGEFK KTGEFK	R-PQSAFR R-PDGSWH LLR-KVAVFT R-PDSSFR R-QDSSFR R-AASSFR R-AASSFR R-AASSFR R-AASSFR R-ASSFR R-ASSFR R-TASSFR R-ASSFR R-QTSTFR R-QTSTFR R-QVSSFR R-QVSSFR R-QVSSFR
Punst1 55793 Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebvel 329667 SerlaS7_9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178963 Sphst1 232298 Stano2 8800 Suilu1 799805 Treme1 57346 Trire2 12633 Trire2 56819 Tubme1 220 Tubme1 6088	-RLACPSHPQ	PSLRYQPSK-	AT 	STDLIDD RDVSKQSDI- ATQAD- LSRHL- 	AKFK-LQ TKMT-TD GRMT-NA N-EK TRVQ-TD GKMT-LE SKSK-ME AKLK-TE TKSNPID T-AN TAN TAN TAN CKMR-TE TDWADK VQQT-YH TDWVKPGD TDWCTPDS TEWVAVDS	ADGSSLK PDGSFK ASGSAKTGDT PDGSYQ SDGSFK QDGSFK QDGSFK KQGAFV KQGAFV KQGAFV KQGAFV KDGSFK KDGSFK KTGEFK KTGEFQ	R-PQSAFR P-PDGSWH LLR-KVAVFT R-PDSSFR R-QDSSFR R-AASSFR R-AASSFR R-AASSFR R-PSSSFR R-PSSSFR R-PSSSFR R-TASSFR R-QSSFR R-SSFR R-SSFR R-QSSFR R-SSFR R-SSFR R-SSFR R-SSFR R-SSFR R-SSFR R-QSSFR R-SSFR
Punst1 55793 Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebvel 329667 SerlaS7_9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178963 Sphst1 232298 Stano2 8800 Suilul 799805 Treme1 57346 Trire2 112633 Trire2 56819 Tubme1 220 Tubme1 220 Tubme1 6088	-RLACPSHPQ	PSLRYQPSK-	AT 	STDLIDE RDVSKQSDI- ATQAD- LSRHL- RTMTTQLDIG KDHTLQSDI- MSQSDI- MSQSDI- MSQSVV- NDTSNQSVV- NDTSNQSVV- KDTSTPNPP- TEI- KDVSSQSDI- TVTQKI- QSSNQESKI- AMSTSGQKI- AMSTSQQKHS-	AKFK-LQ TKMT-TD GS RGFCSPRS T-NA N-EK TRVQ-TD GKMT-LE SKSK-ME AKLK-TE TKSNPID T-AN TAN 	ADGSSLK PDGSFK ASGSAKTGDT PDGSYQ SDGSFK QDGSFK QDGSFK QDGSFK KQGAFV KQGAFV KQGAFV ADGSFK DD ADGSFK KTGEFK KTGEFQ AKGAWK	R-PQSAFR R-PDGSWH LLR-KVAVFT R-PDSQFR R-QDSSFR R-QDSSFR R-AASSFR R-AASVFR R-AASVFR R-PSSSFR R-PSSSFR R-PSSSFR R-QTSTFR R-QTSTFR R-QVSSFR R-PSSFR R-PSSFR R-PSSFR R-PSSFR R-PSSFR R-PSSFR R-PSSFR R-PSSFR R-PSSFR R-PSSFR R-PSSFR R-PSSFR R-PSSFR R-PSSFR
Punst1 55793 Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebve1 329667 SerlaS7_9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178963 Sphst1 232298 Stano2 8800 Suilul 799805 Treme1 57346 Trire2 12633 Trire2 56819 Tubme1 220 Tubme1 6088 Tulca1 76222	-RLACPSHPQ	PSLRYQPSK-	AT 	STDLIDF RDVSKQSDI- ATQAD- LSRHL- 	AKFK-LQ TKMT-TD GS RGFCSPRS T-NA N-EK TRVQ-TD GKMT-LE SKSK-ME AKLK-TE TKSNPID T-AN T-AN T-AN T-AN TAN 	ADGSSLK PDGSFK ASGSAKTGDT PDGSYQ SDGSFK QDGSFK QDGSFK ADGSFK KQGAFV KQGAFV KQGAFV CGSFK DD DDGSFK KTGEFK KTGEFQ KTGEFQ NDGAFR	R-PQSAFR R-PASSTFR R-PDSQFR R-QDSSFR R-QDSSFR R-AASSFR R-AASSFR R-AASVFR R-AASSFR R-PSSSFR R-PSSSFR R-QTSTFR R-QTSTFR R-QTSTFR R-QTSFR R-PSSFR R-PSSFR R-PSSFR R-PSSFR R-PSSFR R-PSSFR R-PSSFR R-PSSFR R-PQSFR R-PQSFR

β1 α1

*β*2

				uuuu	uuuu	>	
Gto2p(ECM4) Sacce1 39	ETISKQ-H	PIYKPAKGRY	WLYVSLA <mark>C</mark> P <mark>W</mark>	AHRTLITRAL	KGLTSVIGCS	VVHWH	ldekg <mark>w</mark> rfld
Gto3p Sacce1 4945	EIISAD-H	PIYKPAKGRY	WLYVALP <mark>C</mark> PW	AQRTLITRAL	KGLAPIIGCS	VAHWH	LDDKG <mark>W</mark> RFLE
GSTX1 Trave1 66368	NFVEKG-G	-AFAPEKGRY	HLYVSYACPW	ATRTLIVRKI	KGLEEFIDVS	VVSPR	MGAHGWPFAN
GSTX2 Trave1 50990 GSTX3 Trave1 73942	DFIQKG-G	-KFEPEKGRY	HLYVAYSCPW	ATRALIVERL ATRTITURET	KGLEDFIGVS	TVSPL	MGAKGWPFAS
GSTX1 Phchr2 2982482	NWIQPN-G	-DFTPEKGRY	HLYVSYACPW	ATRTLIVRKL	KGLEDFIGVT	VVSPR	MGSNGWPFAN
GSTX2 Phchr2 2624184	HWISQD-G	-PFKPEKGRY	HLYVSYG <mark>C</mark> PW	ATRTLIVRQL	KGLEDVISVS	VVSPR	MDANG <mark>W</mark> PFAN
Agabi_varbisH97_2 137	DVIAAG-S	-KFEPEADRY	HLYICYA <mark>C</mark> P <mark>W</mark>	ATRTLIMRKL	KGLESIISVT	VVSPR	MGSDG <mark>W</mark> AFAN
Amamu1 78766	NFIEKG-G	-RFEPEKDRY	HLYVSYACPW	ATRTLIMRKL	KGLEDIIPVS	VVSPH	MGANGWPFAN
Amath1 62909	NWIEKD-G	-KFKPEKDRY	HLYVSLACPW	ATRTLIVRKL	KGLEDIIPVT	VVSPR	MGTQGWPFAN
Aspnidi 17897	NITSKEAG-A	-EFPPEKDRY	HLYVSYACPW	AHRTI.TVRKI.	KGLEDIIQLV	SVHWH	LGEKGWRFAT
Aspnid1 8922	GSIPD-S	FPAEPDRY	HLYIGLFCPF	AHRVNFVRHL	KGLTELIDLS	VVMPYPKGDS	KGWPGWRFPA
Aurde3_1 115815	NTLTPE	QAQSGRY	hlyvsya <mark>c</mark> p <mark>w</mark>	ATRALIVRKL	KGLDAHIGVT	VVSPR	MGEHG <mark>W</mark> PLGD
Aurde3_1 1240856	NTIAPA	DAQSGRY	HLYVSLG <mark>C</mark> P <mark>W</mark>	ATRTLIVRKL	KGLEAHVGVT	FVSPR	MTADG <mark>W</mark> AFGD
Botbo1 118302	DFITKD-G	-EFAPEKGRY	HLYVSYACPW	AHRTLIFREL	KGLQDLIDVS	VVSPH	LGQDGWPFAS
Conpul 60697	NWIEKG-G	-KFEPKKGRY	HLYVSYACPW	ATRTLITRKL	KGLEDFIGVD	VVSPH	MGSDGWPFAN
Conci1/17111	DTIERG-G	-KFEPECDRY	HLYASYACPW	ATRILIVERL ATRTI.IVERL	KGLEDFISVD	-LSPB	LGANGWPFAS
Crypa2 254574	EWISSEPG-A	-KFPPEKGRY	HLYISYACPW	ATRVIIARKL	KGLEDFITVS	AVHWS	LGEKGWRFPT
Dacsp1 67545	DEIKKG-G	-QFEPEKGRY	HLYVSYA <mark>C</mark> PW	AHRTLIVRAL	KGLEDILPVS	VVSPH	MGQDG <mark>W</mark> PFAS
Fomme1 130383	DTIVKG-G	-KFGPESGRY	HIYASFG <mark>C</mark> P <mark>W</mark>	AHRTLIVRQV	KGLGDIISVS	IVSPR	MDKDG <mark>W</mark> KFAN
Fomme1 130388	DTIVKG-G	-KFEPEPGRY	HLYAALI <mark>C</mark> PW	AHRTLIVRKI	KGLEDIISVT	ITAPR	MDKDG <mark>W</mark> PFAN
Fomme1 143667	NGIEKG-G	-RFEPERDRY	HLYVSYACPW	ACRTLITRKL	KGLEEIIPFS	VVSPR	MGEHGWPFAN
Fomp13 1022961	DSIEKG-G	-KFEPEKGRY	HLYVSYACPW	ATRALIMRKL	KGLEDFIDVS	VVSPH	MAAHGWPFAN
Calma1162390	NTVEKG-G	-KFEPEONRY		ATRILIVRUL ATRTI.TVRKI.	KGLEDIIPVI	VVSPR	MCPHCWPFAN
Glotr1 1/112236	NOIOKG-G	-KFEPEKDRY	HLYVSYACPW	ATRALIVRKL	KGLENLIGVT	VVSPR	MGEHGWPFAN
Glotr1 1/120328	GVISPD-G	-PFPPETGRY	HLYIGLFCPF	AHRANLVRHI	KGLTDFIDVS	IVKPYPKGDE	KGWPGWRFPG
Glotr1_1 137290	NWVEKG-G	-KFAPEAGRY	HLYVAYV <mark>C</mark> P <mark>W</mark>	ATRTLIVRKL	KGLHNIVSVT	VASSR	MDEHG <mark>W</mark> PFAN
Glotr1_1 37102	NWIEKG-G	-KFAPEADRY	HLYVVYG <mark>C</mark> P <mark>W</mark>	ATRTLIVRKL	KGLEDIIPVT	AASPR	ADEHG <mark>W</mark> PFAK
Gymlu1 36123	NFIEKG-G	-QFEPEKNRY	HLYVSLACPW	ATRTLIVRKL	KGLEDLISVT	VVSPR	MGTNGWPFAS
Hebcy2 440337	NTIEKG-G	-KFEPATDRY	HLYVSYACPW	ATRTLIVRKL	KGLEPFIPVT	AVSPR	MGANGWPFAN
Hetan2 39076	SEVEKG-G	-QFPPENNRI	HLIVAIGCPH	ASRTLIVERL	KGLEDIISVT	VCSPR	MCELCHDEAS
Hydpi2196315	NWTOKD-G	-EFTAEKDRY	HLYVSYACPW	ATRALITRKI.	KGLEDIVEVI	VVSPH	MGDNGWPFAS
Hypsu1 37440	NTIEQG-G	-KFAPETDRY	HLYVSLACPW	ATRTLIVRKL	KGLDSLIPVT	VVSPH	MGAQGWPFAS
Hypsu1 40330	DVIEKG-G	-RFTPEEGRY	HLYVAFS <mark>C</mark> PW	ATRTLIVRKL	KGLDSIIPVT	IVSPR	IGPNG <mark>W</mark> AFGS
Jaaar1 142100	NTIEKG-G	-KFEPEGDRY	HLYVAYA <mark>C</mark> P <mark>W</mark>	ATRTLIVRKL	KGLEALISVS	VVSPH	MGSNG <mark>W</mark> PFAS
Jaaar1 63226	NTIEKG-G	-KFEPEGDRY	HLYVSYA <mark>C</mark> PW	ATRTLIVWKL	KGLEALISMS	VVSPH	MGSSGWPFAS
Lacbi2 648000	NTIERG-G	-RFEPERDRY	YLYVSYACPW	ATRTLIVRKL	KRLDEFIPVT	VVSPR	MGTHGWPFAN
Meiipi 55958 Oidma1 124122	NEIKKG-G	-OFPPEKDRY	HIYVSYACPW	AHRVLIFLQL AHRTI.TVRRI.	KGLEDITET	SVHWH	MOTLOWSWNA
Oidma11165197	NHISSKPG-S	-PFPPESGRY	HLYVSYACPW	AHRTLIMRNL	KGLOSIIDFT	SVHWYMD	LGGIGWRFAK
Oidma1 182545	NWVSADPE-A	-EFPAESGRY	VLYLNLG <mark>C</mark> PW	AHRTNIVHKL	KGLEDVIQVV	VMGYV	LTPEG <mark>W</mark> IYDG
Oidma1 39468	SWVSTEPG-A	-RFPAEKDRY	VLYMNRG <mark>C</mark> P <mark>W</mark>	ASRANLVRTL	KGLEDVIQMV	VLDWE	lfpeg <mark>w</mark> sftg
Oidma1 46504	NFVSADPD-S	-EFPAEANRY	VLYVHYA <mark>C</mark> P <mark>W</mark>	AHRILIVRVL	KALEDIIEVV	ELD-K	ADEIG <mark>W</mark> AFSG
Paxin1 138020	NSIQKD-G	-EFTAEKDRY	HLYVSYSCPW	ATRTLITRKL	KGLEDIIPVT	AVSPH	MGENGWPFAS
Paxrul 825/41	NWIQKD-G	-EFAAEKDRY	HLIVSIACPW	ATRTLITRKL	KGLEDIIPVT	VVSPH	MGENGWPFAS
Picst3 43969	DFISNKPG-S	-KFLAEANRY	HLYVSFACPW	AHRTLITRVL	KGLSSVISVS	VVHWH	MDDKGWRFIN
Pilcr1 4571	SFIEKG-G	-QFEAEKDRY	HLFVSYACPW	ATRTLIVRKL	KGLEDLIPVT	IVSPH	MGTEGWPFAN
Pilcr1 827566	SFIEKE-G	-QFEAERDRY	HLYVSYA <mark>C</mark> P <mark>W</mark>	ATRTLIVRKL	KGLEDLIPVT	IVSPH	MGTEG <mark>W</mark> PFAN
Pirin1 77935	NWIEKG-G	-KYEPEAGRY	HLIVSYA <mark>C</mark> P <mark>W</mark>	AHRTLITRKL	KGLEDIVSLS	VVSPH	MGSNG <mark>W</mark> PFKN
Pisti1 121423	NWIHP-KD-T	-QFPAERDRY	HLYVSYA <mark>C</mark> PW	ATRTLITRKL	KGLEDIIPVT	VVSPH	MGENGWPFAS
PleosPC15_2 48940	NVIEKG-G	-RFEPEKDRY	HLYVSYACPW	ATRTLIVRKL	KGLEDFIPVT	VVSPR	MGSQGWPFAN
Plicr1 42208	DELEKG-G	-QFEPERGRI		ATRILIAREL	KGLEDIIPIT	TUSPR	MCSLCWAFAN
Plicr1 43758	DFIAKG-N	-KFEPEKERY	HLYVSYACPW	ATRTLVVRKL	KGLEDIIPVT	VVSPR	MGSLGWPFAN
Punst1 118707	DWIVPGSG	-KFEPEKGRY	HLYVSLACPW	AHRTLIVRKL	KGLEEIIPIH	VVSPH	lgehg <mark>w</mark> pfas
Punst1 52675	DFIEKG-G	-KFEPEKGRY	hlyvsya <mark>c</mark> p <mark>w</mark>	ATRTIIVRKL	KGLEDFIPVH	VVSPR	MGEHG <mark>W</mark> PFAN
Punst1 55793	SIIAPD-S	-EFPPEAGRY	HLYIGLF <mark>C</mark> P <mark>F</mark>	AHRANLVRHL	KGLTSLIDVS	VVKPYPKGDE	KGWPG <mark>W</mark> CFPK
Punst1 62356	ARLPRIQG-P	-HSSFVAGRY	ILYVSYGCPW	ASRTLIVRKL	KGLEDVIDLA	VVYYH	LGENGWEFRP
Schco3 2086920	SIIEKG-G	-QFPPERDRY	HLYVSYSCPW	ATRTLIVRKL	KGLEDIISFT	PVVPR	LGKQGWPFYN
Schco312615640	NFIEKG-G	-KFAPERDRY	HLYVSYACPW	ATRALIMAN	KGLEDITFFS	AVSPR	MGKDGWPFRR
Sclci1 100395	NWIQS-KD-G	-QFPAEKDRY	HLYVSYACPW	ATRTLITRKL	KGLEDIIPVT	IVSPR	MGENGWPFAS
Sebve1 329667	DVIEKG-G	-RYEPEKGRY	HLYVSYA <mark>C</mark> PW	AHRTLITRKI	KGLEDYVDVT	VVSPH	MGNHG <mark>W</mark> PFAK
SerlaS7_9_2	HFIEKG-G	-KFEAERDRY	hlyvsys <mark>c</mark> p <mark>w</mark>	ATRTLIVRKL	KGLEDIIPVT	VVSPH	MGKDG <mark>W</mark> PFAS
Sphst1 178948	NHVTKD-G	-EFPAEAGRY	HLYVSLA <mark>C</mark> PW	AHRTLILRKL	KGLEDILPVS	VVSPR	MAENG <mark>W</mark> PFAN
Sphst1 178963	NFIEKG-E	-EFEPEAGRY	HLYVSVACPW	AHRALILRKL	KGLEDIVCQS		
Sphst1 193280	NETEKG-G	-EFEPEAGRY	HIVSVACPW	AHKALILRKL	KGLEDIVSLS	TAAPK	MHAKGWAFSN
Stano218800	GVIKEC-C	-EFPPEKDPV	HLYTCLECPE	AHRPNI.VRHI	KHI TSTS	VVRPYP	KGEPGWRFD-
Suilu1 799805	NFIEND-G	-KFTPEKGRY	HLYVSYACPW	ATRTLIARKL	KGLEDFLAVS	TVSPH	MGAQGWPFKN
Treme1 57346	DVIGPD-S	-HFLPEKGRY	hlyvsya <mark>c</mark> p <mark>w</mark>	AHRTLIVRAL	KGLEEYIDVS	VVHPH	MLEGG <mark>W</mark> HFVK
Trire2 112633	NFISKDPE-S	-QFPAERGRY	ALYLSPG <mark>C</mark> P <mark>W</mark>	AHRTMIVRLL	KGLDSIIDLY	QVHFH	MGSEG <mark>W</mark> YFSG
Trire2 56819	NWISRESG-A	-QFPPEAGRY	HLYVSYACP <mark>W</mark>	AHRTLITRKL	KGLDDIISFS	VVHWH	LGEKGWRFAT
Tubmel 220	DLVSREPN-A	-KFPPERGRY	HLYVSYACPW	AHRTLITREL	KGLQDIIGVS	VVHWH	LGENGWRFGT
Tubmel 0088 Tul cal 76207	SETEKC-C	-QFPPEKGRY	HLYVERCON	ARKTQLIREL	VGTADITZTZ	vvHWH	MTELOWAEK
Tulca1 76222	NFIEKG-G	-EFPPEKGRY	HLYISHACPW	ANRTAIVRRM	KGLESFIDVT	VVSPY	MGGLGWPFKK
Ustma1 1515	NTISKD-G	-PHPPEKGRY	ILYCALI <mark>C</mark> PW	ASRTLHTRAL	KQLEDIIDVA	IVHYS	LTPNG <mark>W</mark> SFSV
Gto2p(ECM4) Sacce1 39	MEKQLEDSED	FLEHWHDVAG	GIRTAKEDSS	KSFAEIKNDS	QR	-FMVDATNE-	РН-ҮGҮК
--	--	------------	------------	--	--	--	---
Gto3p Sacce1 4945	EGDGKT	NERHWFDIAG	GISSVNLNTS	TPVANIPNNA	HR	-LLVDGTDE-	PH-YGYK
GSTX1 Trave1 66368	v			D-	AF	PGADAD-	PL-FGAE
GSTX2 Trave1 50990	A			D-	AY	PGADLD-	PL-YDVK
GSTX3 Trave1 73942	v			s-	PF	PGAEAD-	PF-YNAO
GSTX1 Phchr2 2982482	v			D-	PF	PAADSD-	PL-NNAO
GSTX2 Phchr2 2624184	v			D-	PF	PGADED-	PL-HGAR
Agabi varbisH97 2 137	A			D-	DY	PGAEVD-	PI-HNVK
Amamu1 78766	v			D-	PF	PSADVD-	PL-YGSE
Amath1 62909	I			D-	NF	PGAQVD-	PV-RGAN
Aspnid1 4489	s			G-	RN	GSAKKD-	PL-YGFT
Aspnid1 7897	P			D-	EDI	-PGANTTPD-	PVHSSYS
Aspnid1 8922	SN			D-	EY	PGATVD-	RL-FGED
Aurde3 11115815	A			D-	PF	PGADRD-	PH-EGAO
Aurde3 111240856	v			D-	VF	PGAETD-	PN-EGAR
Botbo1 118302	A			D-	EY	PGAGTD-	PL-YDSK
Conpu1 60697	A			D-	EY	PGATKD-	SL-HGNE-VR
Conpu1 82579	v			н-	DF	PGATRD-	SI-HGDE-VT
Copci1 17111	v			D-	EF	PGAETD-	PL-YNSO
Crypa2 254574	A			E-	DK-DI	-EGENVIPD-	PLHEDFT
Dacsp1 67545	A			D-	AF	PGADSD-	PN-ENAK
Fomme1 130383	I			D-	PF	PGTDVD-	TL-NHAD
Fomme1 130388	I			D-	PF	PGAEVD-	DL-NHAD
Fomme1 143667	I			D-	PF	PAAGVD-	PV-NHAQ
Fompi3 1022961	v			D-	AF	PGADAD-	PL-YGAE
Fompi3 127425	I			D-	PF	PGADKD-	PL-YGAD
Galma1 62390	v			D-	PF	PAAGED-	PI-YKSE
Glotr1 1 112236	A			н-	кғ	PDADVD-	PL-YNSD
Glotr1 1 120328	SA			D-	ЕУ	PRATVD-	KL-FGSE
Glotr1 1 137290	v			D-	к	PGAEED-	PF-YGSE
Glotr1 1 37102	v			D-	RF	PDVEDD-	PL-YGSE
Gymlu1 36123	v			D-	PF	PGAEAD-	PL-YNSQ
Hebcv2 440337	v			D-	PY	PAADED-	OL-NHSE
Hetan2 39076	v			Е-	PF	PGAEVD-	PL-YDSK
Hetan2 442680	v			D-	NF	PGADVD-	PL-YNAQ
Hydpi2 96315	A			D-	PY	PGADVD-	PL-YNSQ
Hypsu1 37440	v			D-	КF	SGADED-	PL-YGSA
Hypsu1 40330	v			D-	RF	EGAEED-	PL-YQSA
Jaaar1 142100	v			D-	QF	PCADID-	PL-YNSQ
Jaaar1 63226	v			D-	QF	PCADID-	PL-YNSQ
Lacbi2 648000	A			D-	PF	PGADSD-	PL-YQSE
Mellp1 35938	P			S-	EFN	PSMTGVIKD-	TL-YASE
Oidma1 124122	P			E-	DR-DV	-PGENVEKD-	PL-KGHEKFT
Oidma1 165197	A			D-	EKL	-SGENVTPD-	PV-NGVE
Oidma1 182545	s			E-		GSEPCD-	PL-YGFT
Oidma1 39468	R			D-		GSDEID-	PL-YGFK
Oidma1 46504	т					TGPDKD-	PR-YGFT
Paxin1 138020	v			D-	PY	PGADVD-	PL-FNSQ
Paxru1 825741	v			D-	PY	PGADVD-	PL-FNSQ
Phyb12 126467	A			E-	EC	PGAIPD-	TV-NNAQ
Picst3 43969	D			E-	ELKTIDPK	TDVSLGTVD-	HL-YNFK
Pilcr1 4571	v			D-	EF	PGAEVD-	PL-YSSE
Pilcr1 827566	v			D-	EF	PGAEVD-	PL-YGSE
Pirin1 77935	A			D-	EF	PGATDDG	GI-MGAQ
Pisti1 121423	v			D-	PF	PGADVD-	PL-YNSK
PleosPC15 2 48940	v			D-	NF	EASDED-	PL-YKSE
Plicr1 42268	A			D-	EDSPF	PGAEDD-	PL-YGSK
Plicr1 43753	v			D-	EF	PGAEVD-	PL-YSSE
Plicr1 43758	v			D-	EF	PGANVD-	DI _VNCF
Punst1 118707	A						FT-INSF
Punst1 52675				D-	PY	PGADVD-	PL-FDAK
Punst1 55793	v			D-	РҮ АҮ	PGADVD- PAADVD-	PL-FDAK PL-FNAE
	V SE			D- D-	PY AY EY	PGADVD- PAADVD- PGATPD-	PL-FDAK PL-FNAE KL-FGSE
Punst1 62356	V SE E			D- D- D-	PY AY EY V	PGADVD- PAADVD- PGATPD- EGCTPD-	PL-FDAK PL-FNAE KL-FGSE PV-YGAK
Punst1 62356 Schco3 2086920	V SE E EA			D- D- D- D-	PY AY EY EY	PGADVD- PGATPD- EGCTPD- TTHPGAEPD-	PL-FDAK PL-FNAE KL-FGSE PV-YGAK PL-YGSS
Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063	V SE E EA N			D- D- D- D- D-	PY AY EY EY NE-ESIF	PGADVD- PGATPD- EGCTPD- TTHPGAEPD- PAADPD-	PL-INSE PL-FDAK PL-FNAE KL-FGSE PV-YGAK PL-YGSS PL-HHSA
Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640	V SE EA N E			D- D- D- D- D- D-	PY AY EY EY NE-ESIF DE-ESIF	PGADVD- PGATPD- EGCTPD- TTHPGAEPD- PAADPD- PAADPD-	PL-INAK PL-FDAE KL-FGSE PV-YGAK PL-YGSS PL-HHSA PL-YQSA
Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395	V SE EA N E A			D- D- D- D- D- D- D-	PY AY EY EY NE-ESIF DE-ESIF PF	PGADVD- PGATPD- EGCTPD- TTHPGAEPD- PAADPD- PAADPD- PGANVD-	PL-IN3E PL-FDAK PL-FGSE KL-FGSE PV-YGAK PL-YGSS PL-HHSA PL-YQSA PL-YNSQ
Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebve1 329667	V SE EA N E A			D- D- D- D- D- D- D-	PY AY EY EY NE-ESIF DE-ESIF PF AF	PGADVD- PGATPD- PGATPD- TTHPGAEPD- TTHPGAEPD- PAADPD- PGADPD- PGAGDD-	PL-FNAK PL-FNAK KL-FGSE PV-YGAK PL-YGSS PL-HHSA PL-YQSA PL-YNSQ PV-IGAE
Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebve1 329667 SerlaS7_9_2	V SE EA EA E A V			D- D- D- D- D- D- D- D-	PY AY EY EY NE-ESIF DE-ESIF PF AF AY	PGADVD- PAADVD- PGATPD- THPGAEPD- PAADPD- PAADPD- PGADVD- PGADVD-	PL-FNAK PL-FNAE KL-FGSE PV-YGAK PL-YGSS PL-HHSA PL-YQSA PL-YNSA PV-IGAE PL-YNAS
Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebvel 329667 SerlaS7_9_2 Sphst1 178948	V SE EA N E A V V			D- D- D- D- D- D- D- D- D-	PY AY EY NE-ESIF DE-ESIF PF AF EY	PGADVD- PAADVD- EGCTPD- TTHPGAEPD- PAADPD- PGANVD- PGADVD- PGADVD- PGATTD-	FL-INAK PL-FNAK PL-FNAK PL-YGAK PL-YGSK PL-YQSA PL-YNSQ PV-IGAE PL-YNSS PV-YOSK
<pre>Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebve1 329667 SerlaS7_9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178963</pre>	V SE EA N A A V V			D D D D D 	PY AY EY NE-ESIF DE-ESIF PF AF AY EF	PGADVD- PGATPD- EGCTPD- TTHPGAEPD- PAADPD- PGADPD- PGANVD- PGADVD- PGADVD- PGATTD-	PL-FNAK PL-FNAK PL-FNAK PL-YGAK PL-YGSK PL-YQSA PL-YNSQ PV-IGAS PV-NDSK
<pre>Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebve1 329667 SerlaS7_9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178963 Sphst1 193280</pre>	V SE EA A A V V V			D- D- D- D- D- D- D- D- D- D-	PY AY EY ME-ESIF DE-ESIF PF AY EF NF NF	PGADVD- PGATDD- EGCTPD- TTHPGAEPD- PAADPD- PGADVD- PGAGDD- PGADVD- PGATTD- PGATID-	PL-FNAK PL-FNAE KL-FGSE PV-YGAK PL-YGSS PL-HHSA PL-YQSA PL-YQSA PL-YNSQ PV-IGAE PL-YNSS PV-NDSK HV-NNSE
<pre>Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebve1 329667 SerlaS7_9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178963 Sphst1 193280 Sphst1 232298</pre>	V SE EA N E A V V V V V			D- D- D- D- D- D- D- D- D- D- D- 	PY AY EY NE-ESIF DE-ESIF PF AF AF NF DF	PGADVD- PGATDD- EGCTPD- TTHPGAEPD- PAADPD- PAADPD- PGAGDD- PGAGDD- PGADVD- PGATTD- PGATTD-	PL-FINAK PL-FDAK PL-FNAE KL-FGSE PV-YGSK PL-HHSA PL-YQSA PL-YNSQ PV-IGAE PL-YNSS PV-IGSE HV-NNSE HV-NNSE
<pre>Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebve1 329667 SerlaS7_9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178963 Sphst1 232298 Stano2 8800</pre>	V EE EA A A V V V V V			D- D- D- D- D- D- D- D- D- D- D- 	PY AY PF AF AF AF NF TY	PGADVD- PGATDD- EGCTPD- TTHPGAEPD- PAADPD- PGADVD- PGAGDD- PGADVD- PGATTD- PGATTD- PGATID- PGATID-	FL-INAK PL-FDAK PL-FNAE KL-FGSE PV-YGSX PL-YQSA PL-YNSQ PV-IGAE PL-YNSX PV-NDSK SE HV-NNSE HL-FNSR
<pre>Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebve1 329667 SerlaS7_9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178963 Sphst1 232298 Stano2 8800 Suilu1 799805</pre>	V SE EA A A V V V G			D D D D D 	PY AY DE-ESIF DE-ESIF PF AY EY EF NF TY PSW	PGADVD- PAADVD- EGCTPD- TTHPGAEPD- PAADPD- PGANVD- PGADVD- PGADVD- PGATTD- PGATTD- PGATID- PGATID- PGATID- PGATDD-	FL-INAK PL-FNAK PL-FNAK PL-YGAK PL-YGSE PL-YGAK PL-YQSA PL-YNSQ PV-IGAS PV-NDSK
<pre>Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebve1 329667 SerlaS7_9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178948 Sphst1 178963 Sphst1 193280 Sphst1 232298 Stano2 8800 Suilu1 799805 Treme1 57346</pre>	V SE EA A A V V V G PSDFTSNPAP			D D D D D 	PY AY EY EY DE-ESIF PF AF AY EF NF NF TY SF	PGADVD- PAADVD- PGATPD- TTHPGAEPD- PAADPD- PGANVD- PGADVD- PGATVD- PGATTD- PGATTD- PGATTD- PGATTD- PGATDD- PGATSD-	FL-INAK PL-FDAK PL-FNAE KL-FGSE PV-YGAK PL-YGSA PL-YQSA PL-YNSQ PV-NDSK
<pre>Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebve1 329667 SerlaS7_9_2 Sphst1 378948 Sphst1 178963 Sphst1 193280 Sphst1 232298 Stano2 8800 Suilu1 799805 Treme1 57346 Trire2 112633</pre>	V SE EA A A V V G E			D- D- D- D- D- D- D- D- D- 	PY AY EY EY DE-ESIF DE-ESIF AF AF AF NF DF PSW SF	PGADVD- PGATPD- EGCTPD- TTHPGAEPD- PAADPD- PGAGDD- PGAGDD- PGADVD- PGATTD- PGATID- PGATID- PGATID- PGATSD- PGATSD- PGATSD-	PL-FNAK PL-FNAK PL-FNAK PL-FNAE KL-FGSE PV-YGAK PL-YGSA PL-YQSA PL-YNSQ PV-IGAE PL-YNSS PV-NDSK HV-NNSE HV-NNSE HL-FNSR TE-HP-N-FQ QL-NGFH PL-HGFK
<pre>Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebve1 329667 SerlaS7_9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178963 Sphst1 193280 Sphst1 232298 Stano2 8800 Suilu1 799805 Treme1 57346 Trire2 112633 Trire2 56819</pre>	V SE EA A A V V V G FSDFTSNPAP E K			D- D- D- D- D- D- D- D- D- D- D- D- D- D- 	PY AY EY NE-ESIF DE-ESIF PF AF AF NF DF DF PSY PSY SF DK-D-V	PGADVD- PGATPD- EGCTPD- TTHPGAEPD- PAADPD- PAADPD- PGADVD- PGADVD- PGATUD- PGATID- PGATID- PGATID- PGATSD- GATSD- GSLPED- GSLPED-	FL-INAK PL-FNAK PL-FNAE KL-FGSE PV-YGAK PL-YQSA PL-YNSQ PV-IGAE PV-NDSK SE HV-NNSE HU-FNSR TE-HP-N-FQ QL-NGFH PL-HGFK PLHEGFT
<pre>Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2615640 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebve1 329667 SerlaS7_9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178963 Sphst1 193280 Sphst1 232298 Stano2 8800 Suilu1 799805 Treme1 57346 Trire2 56819 Tubme1 220</pre>	V SE EA A A V V V SDFTSNPAP E K T			D D D D D D D D D D 	PY AY PF AF AF PF AF P	PGADVD- PGATPD- THPGAEPD- PGATPD- PGADVD- PGAGDD- PGADVD- PGATUD- PGATID- PGATID- PGATID- PGATID- PGATDD- PGATED- PGATED- PGATED- PGATED-	PL-FNAK PL-FNAE KL-FGSE PV-YGAK PL-YGSA PL-YQSA PL-YNSQ PV-IGAE PL-YNSQ PV-NDSK
<pre>Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebve1 329667 SerlaS7_9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178948 Sphst1 178948 Stano2 8800 Suilu1 799805 Treme1 57346 Trire2 112633 Trire2 56819 Tubme1 6088</pre>	V SE EA A V V V G FSDFTSNPAP E K E			D D D D D 	PY AY PY DE-ESIF PF AY EF NF TY PSW SF SF DF DF DF DF DF DF DF DF DF DF DF DF DF DF DF DF DF DF PSW PSW PSW PSW PS	PGADVD- PGATPD- THPGAEPD- PGADPD- PGADVD- PGADVD- PGADVD- PGATUD- PGATID- PGATID- PGATID- PGATSD- PGATSD- GSLPED- GSLPED- PGENVIPD-	FL-INAK PL-FNAK PL-FNAK PL-YGAK PL-YGSE PL-YGSA PL-YQSA PL-YNSQ PV-IGAS PV-NDSK
Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebve1 329667 SerlaS7_9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178963 Sphst1 193280 Sphst1 232298 Stano2 8800 Suilu1799805 Treme1 57346 Trire2 112633 Trire2 56819 Tubme1 220 Tubme1 6088 Tulca1 76207	V SE EA A V V V G FSDFTSNPAP E K K K E A			D- D- D- D- 	PY AY EY DE-ESIF PF AY EF NF NF NF DF SF SF DK-DV EAGE-Y EVAE-S EVAE-S	PGADVD- PGATVD- TTHPGAEPD- TTHPGAEPD- PGADVD- PGAGDD- PGAGDD- PGATVD- PGATVD- PGATTD- PGATID- PGATID- PGATSD GSLPED- PENAVGPE- -PEWAVGPE- -PEWTAAPE- 	PL-FNAK PL-FNAK PL-FNAK PL-YGAK PL-YGAK PL-YQSA PL-YQSA PL-YNSQ PV-IGAE PV-NNSE HV-NNSE HV-NNSE HV-NNSE HU-FNSR TE-HP-N-FQ QL-NGFH PL-HGFK PLHEGFK PL-HGAS PV-NGAT PL-YGSS
Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebve1 329667 SerlaS7_9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178963 Sphst1 193280 Sphst1 232298 Stano2 8800 Suilu1 799805 Treme1 57346 Trire2 112633 Trire2 56819 Tubme1 220 Tubme1 6088 Tulca1 76207 Tulca1 76222	V SE EA A V V V G G K E A A			D- D- D- D- D- D- D- D- 	PY AY EY DE-ESIF DE-ESIF AF AF AF DF DF PSW SSF DK-D-V EAGE-Y EVAE-S ER-H-I DH-S-I	PGADVD- PGATPD- EGCTPD- TTHPGAEPD- PAADPD- PGAGDD- PGAGDD- PGATVD- PGATVD- PGATID- PGATID- PGATID- PGATSD- GSLPED- GSLPED- -PGENVIPD- -PEMTAAPE- DGVEED- EGAEDD-	PL-FNAK PL-FNAK PL-FNAK PL-YGSE PV-YGAK PL-YQSA PL-YQSA PL-YNSQ PV-IGAE PL-YNSE HV-NNSE HV-NNSE HV-NNSE HU-FNSR TE-HP-N-FQ QL-NGFH PL-HGFK PL-HGFK PL-HGSS PV-NGAT PL-YGSS PL-YGSS
<pre>Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2516063 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebve1 329667 SerlaS7_9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178963 Sphst1 193280 Sphst1 232298 Stano2 8800 Suilu1/799805 Treme1 57346 Trire2 112633 Trire2 56819 Tubme1 220 Tubme1 220 Tubme1 6088 Tulca1 76207 Tulca1 76222 Ustma1 1515</pre>	V SE EA A V V V G PSDFTSNPAP E K E A A T			D- D- D- D- D- D- D- 	PY AY EY NE-ESIF DE-ESIF AF AF AF DF DF PSW SF DK-D-V EAGEY EVAE-SS DH-S-I SV		PL-FNAK PL-FNAK PL-FNAK PL-FNAK PL-YGAK PL-YGSE PL-YQSA PL-YNSQ PV-IGAE PV-NDSK SR HV-NNSE HU-FNSR TE-HP-N-FQ QL-NGFH PL-HEGFT AN-TGAS PV-NGAT PL-YGSS PL-YGSS PL-YGSS
<pre>Punst1 62356 Schco3 2086920 Schco3 2615640 Sclci1 100395 Sebve1 329667 SerlaS7_9_2 Sphst1 178948 Sphst1 178948 Sphst1 193280 Sphst1 232298 Stano2 8800 Sulu1 799805 Treme1 57346 Trire2 112633 Trire2 56819 Tubme1 220 Tubme1 6088 Tulca1 76222 Ustma1 1515</pre>	V SE EA A A V V V V G G PSDFTSNPAP E K E A A A A	VSAHNF			PY AY PF AF AF PF AF DF TY PSW SF DK-D-V EAGE-Y ER-HI DH-S-I SV	PGADVD- PGATPD- PGATPD- PGATPD- PAADPD- PGADVD- PGADVD- PGATUD- PGATID- PGATID- PGATID- PGATSD- PGATSD- GSLPED- -PGENVIPD- -PGENVIPD- -PGENVAGPE- -PEVAVGPED- EGAEDD- ETGD-	PL-FNAK PL-FNAK PL-FNAK PL-FGSK PL-YGSA PL-YGSA PL-YQSA PL-YQSA PL-YNSQ PV-IGAE PL-YNSQ PV-NDSK

eee	eeee			eeeeee	ee		ee
Gto2p(ECM4) Sacce1 39	RISDLYYKSD	POYSARFTVP	VLWDLETOTI	VNN <mark>ES</mark> SEIIR	ILNSSAFDEF	VDDDH-KK	TDLVP
Gto3p Sacce1 4945	RLSDFYFKTK	PDYKG <mark>R</mark> FT <mark>V</mark> P	VLWDLETCTI	VNN <mark>ES</mark> SDIIR	IMNSAAFDEF	VGEEY-RQ	VRLVP
GSTX1 Trave1 66368	HVKDLYMRVN	PDYEG <mark>R</mark> FT <mark>V</mark> P	ILWDKKTSAI	VNN <mark>ES</mark> SEIIR	MFNT-AFNDQ	LPSDK-AA	IDLYP
GSTX2 Trave1 50990	HVSDLYLRAK	PDYDGRVP	LLWDKKTATI	MNNESSEIIR	MFNS-AFDDQ	LPADK-AA	VDLYP
GSTX3 Travel 73942	YVRDLYLRAD	PKYEGRFTVP	VLWDKKTETV	VNNESSEIIR	IFNT-AFNEF	LPADK-AA	IHLYP
GSTX2 Phchr2 2624184	HLKDLYLRVE	PEHAGRETVP	LLWDKOODTI	VNNESSEIIR	MFNT-AFNGI	LPODK-AA	LDLYP
Agabi varbisH97 2 137	HIKEIYLKIS	PEYSGRFTVP	LLYDKKLDTI	VNNESSEIIR	MFNS-AFNHL	LPADK-AA	LDFYP
Amamu1 78766	HIKDLYLRAD	PNYEA <mark>R</mark> FT <mark>V</mark> P	VLWDKKTHTL	VNN <mark>ES</mark> SEIIR	IFNS-AFNDL	LPKEK-AA	LDFYP
Amath1 62909	HIKDLYLSVD	PHYSG <mark>R</mark> FT <mark>V</mark> P	VLWDKKLNTI	VNT <mark>ES</mark> SEIIR	MFNT-AFNDL	LPKDK-AA	LHYYP
Aspnid1 4489	TISQLYFKAD	PEYKGRYTIP	VLWDKKKETI	VNNESSEIIR	MFYT-EFDHL	LPEER-RE	VNQPGGGLYP
Aspnidi /89/	HTKDIJLEANE	SCYKCPYSVP	VLYDKKTKRI	VSNESSELLR	MFYY-EFDDL WI.DN-AFNDF	LPAQY-QK	
Aurde3 1/115815	HIKDLYLKAA	PDYSGRFTVP	VLWDTODRTI	VNNESSEIIR	ILNT-AFNAL	LPPAH-AA	LDLYP
Aurde3_1 1240856	YLKEIYFTAA	PDYTG <mark>R</mark> FT <mark>V</mark> P	VLWDKEKRTI	VNN <mark>ES</mark> SEIIR	IFDT-AFNAL	LPPDR-AA	LTLYP
Botbo1 118302	HVKDLYLRVS	PNYTG <mark>R</mark> FT <mark>V</mark> P	VLWDKKTQTI	VNN <mark>ES</mark> SEIIR	IFNT-AFNDL	IPADK-QK	LDYYP
Conpu1 60697	HVKDLYFKVK	PNYEG <mark>R</mark> FT <mark>V</mark> P	VLWDKELHTI	VSN <mark>ES</mark> SEIIR	MLNS-EFNEL	LPKDK-AA	VDLYP
Conpu1 82579	HLRQLYFKAD	PNYAGRYTVP	TLWDKELETI	VSNESADIIR	MLNT-AFNDQ	LPADK-AA	IDIYP
Crypa21254574	HLSEVYFESD	PNYCCRFTVP	TTADKKOKII	VNNESALIIR	MEGT-VEDDO	LSEDK-AK	LDLIP
Dacsp1167545	HVKDLYFVAO	PDYNMRFTVP	VLWDKKLRTV	VNNESSEIIR	NFNT-AFNEF	LPKEK-AE	LDYYP
Fomme1 130383	HIKDIYLKAD	PEYNA <mark>R</mark> YT <mark>V</mark> P	ILWDKKLQTI	VNN <mark>ES</mark> SEIIR	ILNA-SFNDL	LPPEK-SS	IDLYP
Fomme1 130388	HVRDLYFKAQ	PDFKD <mark>R</mark> FT <mark>V</mark> P	VLWDKKLQTI	VNN <mark>ES</mark> SEIIR	ILNS-SFNEL	LPPEK-AA	IDLYP
Fomme1 143667	HIKDLYLKAD	PNYNG <mark>R</mark> FT <mark>V</mark> P	VLWDKKHQTI	VNN <mark>ES</mark> SEIIR	IFNT-AFNEL	VDAEK-AK	VDIYP
Fompi3 1022961	HIKDLYLRAA	PNYEGRESVP	VLWDKKTHTV	VNNESAEIIR	MFNS-AFNHL	LPADK-AK	LDYYP
Fomp13 12/425 Galma1162390	HUKDLYTKAD	PDYEGRETVP	LLFDKKTSSV	VNNESSDIIR	IFNS-SFNHL	LPPEK-AK	LDLYP
Glotr1 1/112236	HVKDLYFRAE	PEYGGRETVP	VLWDKKHETI	VNNESSEIIR	IFNT-AFNEF	LPADK-AA	IDIYP
Glotr1 1 120328	YLHEVYFRAD	KEYKG <mark>R</mark> YS <mark>V</mark> P	LLWDKKTGTI	VNNESAELLR	WLPT-AFNSL	LDEEH-AK	IDLYP
Glotr1_1 137290	HIKDLYLRVD	PDYTG <mark>R</mark> FT <mark>V</mark> P	ILWDKKLETI	VNN <mark>ES</mark> SEIIR	ILNN-AFNDL	LPADK-AA	LDLYP
Glotr1_1 37102	HIKDLYLKAD	PDYSG <mark>R</mark> FT <mark>V</mark> P	VLWDKKLETV	VNN <mark>ES</mark> SEIIR	IFNS-AFNEI	LPPDLEK-TK	LDLHP
Gymlu1 36123	HIKDLYLSVN	PDYSGRFTVP	VLWDKKGKTI	VNNESSEIIR	ILNS-AFNHL	LPEEY-AK	VDLYP
Hebcy2 440337	HVKDLYLKVD	PDYAGRETVP	ILWDKKHNTI	VNNESSEIIR	IFNT-AFNEF	LPADK-AA	LDYYP
Hetan21442680	HVKDLYLRAN	PEYSGRETVP	VIWDKKOHTI	VNNESSETTR	TENS-AFNDT	TSKEK-AE	LDFYP
Hydpi2 96315	HVRDLYYKAD	PNYGGRFTVP	VLWDKKKHTI	VNNESSEIIR	IFNS-AFNDM	LPPEK-AS	VDIYP
Hypsu1 37440	YVKDLYFKAD	PDYGG <mark>R</mark> FT <mark>V</mark> P	VLWDKKLHTI	VNN <mark>ES</mark> SEIIR	IFNT-AFNEF	IPKEK-AA	LNYYP
Hypsu1 40330	HIKDLYFRAD	PNYSG <mark>R</mark> FT <mark>V</mark> P	VLWDKKLHTI	VNN <mark>ES</mark> SEIIR	IFNT-AFNEF	LPKEK-AA	LNYYP
Jaaar1 142100	HVKDLYLRCE	PNYNGRFTVP	VLWDKKHETI	VNNESSEIIR	IFNS-AFNHL	IPKEK-AE	VDIYP
Lachi21648000	HVKDLYLKAE	ONYGGRETVP	VLWDKKLOTT	VNNESSETTR	MENV-AFDEF	IPREK-VE	IDFYP
Mellp1 35938	KIKEIYFKAN	HOYOGRETVP	VLWDKKEETI	VNNESSEIIR	MLNC-CFNEL	IEEQY-QK	IDLYP
Oidma1 124122	HLRDIYFSAD	PDYTG <mark>R</mark> FT <mark>V</mark> P	TLYDTKTGQI	VSN <mark>ES</mark> SEIIR	MFYS-EFDDL	LPEKY-KN	VDLFP
Oidma1 165197	TIRDLYLLAE	PNYTG <mark>R</mark> FS <mark>V</mark> P	VLWDKKTKTI	VSN <mark>ES</mark> SEIIR	MFAT-EFNDL	LDEDH-RS	INIIP
Oidma1 182545	KHSQLYHKAD	PTYAGRFTVP	ALWDRKRETI	VNNESSEIIR	MFYT-AFDAF	IDPSL-RE	ISKPLLP
Oldmal 39468	RLSELYFKAE	PSFSGRYTVP	VLWDKVHETI	VSNESSEIIR	MLYS-AFDAF	LPASL-QE	KNKPDGGLLP
Paxin1 138020	HVKDLYYKAD	PNYAGRETVP	VLWDKKKNTV	VNNESSEIIR	MFNT-AFNDI	LPPEK-AS	IDIYP
Paxru1 825741	HVKDLYYTAD	PNYAG <mark>R</mark> FT <mark>V</mark> P	VLWDKKKNTV	VNNESSEIIR	IFNT-AFNDI	LPPGK-AS	IDIYP
Phyb12 126467	FIREIYFKAN	PDYEG <mark>R</mark> FT <mark>V</mark> P	VLWDKKHNTI	VNN <mark>ES</mark> SEIIR	MFNT-AFNHF	LPAEK-AK	LNYYP
Picst3 43969	RIRELYFKAE	PDYVG <mark>R</mark> FT <mark>V</mark> P	VLWDKKLETI	VNN <mark>ES</mark> SEIIR	MLNL-EFNEL	ATKEG-AA	IDIYP
Pilcr1 4571	HIKDLYFKAD	PNYSGRESVP	VLWDKKNHTI	VNNESSEIIR	MENT-AFNDL	IPKDK-AA	VDIYP
Pirin1177935	HVKDIYLKVO	PEYDGKFTVP	VLFDTKSOSI	VNNESSEIIR	MFNT-AFNDL	IAPEO-AS	LDLYP
Pisti1 121423	HVKDLYFKAD	PNYGGRFTVP	VLWDKKQNTV	VNNESSEIIR	MLNS-AFNDM	LPPEK-AT	VDIYP
PleosPC15_2 48940	HVKDLYLKAD	PDYGG <mark>R</mark> FT <mark>V</mark> P	VLWDKKNHTI	VNN <mark>ES</mark> SEIIR	IFNH-AFDEF	IPKDK-AE	IDYYP
Plicr1 42268	YLRDLYLKAN	PDYSGRPTIP	VLWDKETHTI	VNN <mark>DS</mark> AEIVR	IFNS-AFNDA	VAPEA-AE	LDLYP
Plicr1 43753	HVRDLYFKAD	PDYGGRFTVP	VLWDKKNHTI	VNNESSEIIR	MLND-GFNDD	ISAEH-AA	LDLYP
PilCri 43/58 Punst1 118707	HWKDLIFKAD	POYOARCSVP	MLWDTKLSTI	VNNESSEIIR	MLNH-GFNEF	LPESV-AS	LDFIP
Punst1 52675	HVKDIYLRVD	PNYDGRFTVP	ILFDTKHSTI	VNNESSEIIR	MFYT-AFDHL	LPPEY-AN	LDLYP
Punst1 55793	YLHEVYFRSN	EQYKG <mark>R</mark> YS <mark>V</mark> P	VLWDTKKGVI	VNN <mark>ES</mark> PEILR	FLQT-AFDNL	LPEPY-RS	VSFYP
Punst1 62356	TIKEIYLRAD	PEYAL <mark>R</mark> LT <mark>V</mark> P	VLFDKTLGTI	VNN <mark>ES</mark> SEIIR	MLNT-DLDEF	VTDEH-KG	VTYYP
Schco3 2086920	HVKDLYFRAQ	PDYNGRESVP	ILWDKKQHTI	VNNESSEIIR	IFNT-AFNEL	LAPEY-TS	VDLYP
Schco3 2516063	HVKDLYFRAD	PEYSGRETVP	VLWDKKLHTI	VNNESSEIIR	IFNE-GFNEL	LPKEK-AG	LDFYP
Sclci11100395	HLKELYFKAD	PDYSGRETVP	VLWDKKOHTT	VNNESSETTR	TENS-SENDL	LPSAN-AA	VDTYP
Sebve1 329667	HIKDLYLKVQ	PDYDGKFTVP	LLFDKKLNKA	VNNESSEILR	IFNT-AFNHL	IPEDK-AA	IDLYP
SerlaS7_9_2	HVKDLYFKAD	PDYTG <mark>R</mark> FT <mark>V</mark> P	VLWDKKNHTI	VNN <mark>ES</mark> SEIIR	VFNT-AFNDI	IPADK-AA	IDIYP
Sphst1 178948	HVRDLYFKAD	PNYGG <mark>R</mark> FT <mark>V</mark> P	VLWDKKKNTV	VNN <mark>ES</mark> SEIIR	IFNS-EFNHI	LPSDK-AQ	IDLYP
Sphst1 178963	VIDENCE 2	PVFR-KFTVP	VLWDKKKETI	VNNESSEIIR	IFNS-GFNDI	LPTEK-AA	LNFYP
Spiis (1 193280 Sphst1 232298	I IREVIERAE	PNYSCPETUP	A TMDVVVVELI	VINNESSELLR	TENS-GENDI	LPIE-K-AA	MDF.T.5
Stano2 8800	FMHQLYFRDD	PAYTGRYSVP	LLWDKKTNRI	VNNESAEMLK	WLPH-AFDST	IEDQKIRE	IDFYP
Suilu1 799805	HLKELYLLAD	PNYGG <mark>R</mark> FT <mark>V</mark> P	VLWDKKLATI	VSN <mark>ES</mark> SEIIR	MFNT-AFNHL	LPADK-AA	IDIYP
Treme1 57346	YLSEIYYVAS	PEYKA <mark>R</mark> FT <mark>V</mark> P	VVWDTKEKTI	VNN <mark>ES</mark> SEVIR	FFNT-GFNQS	LSGKE-KE	LDLYP
Trire2 112633	KLKDLYLKAD	PNYTG <mark>R</mark> YT <mark>V</mark> P	VLWDKKADVL	VNNESSEIIR	MLYS-EFDEF	LPENL-RE	DNRPGKGLYP
TT1TE2 56819 Tubme1 220	HLKDVYFESD	PDYDCPYTUD	VLIDKKTRKI	VSNESSEIIR	MLGT-EFDDL	VEEKY-RS	VVLYP
Tubme1 6088	TUDIALKY	POYCCRYTVP	ITMDKKASA1	VNNESSETTP	LLYT-EFDDL	ADERE-BC	NLFYP
Tulca1 76207	HLRELYFKAN	PSYEGRETVP	ALWDKKTETI	VNNESSEIIR	IFNN-AFNDL	LPEDK-AT	LDLYP
Tulca1 76222	HIRELYFKAN	PEYSG <mark>R</mark> FT <mark>V</mark> P	MLWDKKAETI	VNN <mark>ES</mark> AEIIR	MFNT-AFNDQ	LPADK-AA	VDIYP
Ustma1 1515	NTKQLYLKAD	PSYTA <mark>R</mark> YT <mark>V</mark> P	ILWDKKLGTI	VNN <mark>ES</mark> SEIIR	ILYT-AFDDL	LPDDSPA-KG	КТҮҮР
	a	1		<i>a</i> 5			
	C,	т		U.J			

Gto2p(ECM4) Sacce1 3	9 A-	QLKTQI	DDFNSWVYDS	INNGV <mark>Y</mark> KTG <mark>F</mark>	AEKAEVYESE	VNNVFEHLDK	VEKILS-DKY	SKLKAK
Gto3p Sacce1 4945	R	SLEAQI	TEFNSWVYDK	INNGVYKAGE	AECAEVYERE	VTSLFQYLDK	LENLLDK	KYTDLEAE
GSTX2 Trave1 50990	E-	ALRGEI	DEINEWVIDI	VNNGVIKSGE	ATSOTAYEAA	VVPLFESLDR	LEKILTE	K
GSTX3 Trave1 73942	E	ALKSEI	DEINEWVYDT	VNNGV <mark>Y</mark> KAG	ATTQQAYEAA	VIPLFESLDR	LEKILTG	K
GSTX1 Phchr2 2982482	E	SLRAKI	DEVNDWVYDT	VNNGV <mark>Y</mark> KSG <mark>F</mark>	ASTQKAYEAA	VIPLFESLDR	LEKMLEG	Q
GSTX2 Phchr2 2624184	E- 7 E-	SLRAKI	DSLNDWVYNT	VNNGVYKAGE	AQSQKAYEDA	VIPLFESLDR	LEKILTG	K
Amamu1 78766	, E- E-	HFRAEI	DGLNAWIYDS	INNGVINAGE	AOKOEAYEKA	VIELFRALDR	VEKLLTG	K
Amath1 62909	E-	ELRKEI	DGLNEWIYDG	INNGV <mark>Y</mark> KAG	ATTQEAYEKA	VVRVFEALDK	VEKLLVG	к
Aspnid1 4489	P	HLRGEI	EAMNEWVYDR	INNGV <mark>Y</mark> KTG <mark>F</mark>	AATQEAYEAS	LHPLFEALDR	IEGHLAQ	P-G
Aspnid1 7897	P-	HLREQI	DATNDWVYND	VNNGVYKSGE	ATTQEAYERN	VTTLFASLDR	IEKHLAD	s
Aspnidi 8922 Aurde3 1 115815	E- E-	HLRTVI	DALNEWVYSD	VNNGVYRAGE	ASDQDQINKN	VIPVFGALNK VTKLFAALDR	LEKIVEA	N
Aurde3 1 1240856		ELRAQI	DGLNEWVYTD	VNNGVYRAGE	AKTQGAYEEA	VLKLFAALDR	LEGLVKG	ĸ
Botbo1 118302	E	DLRKEI	DELNSWVYDA	VNNGV <mark>Y</mark> KSG <mark>F</mark>	ASTQEAYEAA	VKPLFEALDK	LESILTG	к
Conpu1 60697	E-	AHRKEI	DEINSWVYDT	VNNGV <mark>Y</mark> KSG <mark>F</mark>	AATQEAYEKA	VLPLFESLDR	LEKMLEG	к
Conpu1 82579	E-	VYRNEI	DEINSWVYDT	VNNGVYRSGE	ATTQKAYEDA	VVPLFKSLDR	LEKILEG	K
Crypa21254574	<u>ъ</u> -	ALRTOT	DEAGEWHYDK		ATTOEAYDKN	VTALFEALDR	AEAHLAA	<u>G</u>
Dacsp1 67545	Q-	ELRKEI	DELNDWVYNT	VNNGVYKCG	ATTPEAYESN	VGPLFQSLDR	LEGILEKS-G	s
Fomme1 130383	E	KHRIEI	DSLNEWVYDG	INNGV <mark>Y</mark> KAG <mark>F</mark>	AGTQEAYEKA	VTQVFASLDR	VEPLFEG	к
Fomme1 130388	E-	RYRSEI	DSLNEWVYDG	LNNGV <mark>Y</mark> KSG <mark>F</mark>	AGTQEVYEKA	VTQVFASLDR	IEPLLKG	к
Fomme1 143667	E-	KWRKEI	DEVNEWVYDT	VNNGVYKSGE	AMTQAAYEKS	VIAVFESLDR	IEKMLEG	К-К
Fompi3 127425	E- E-	PLEREI	DEVNDWVIDT	VNNGVIKTGE	ATTOSATERA	VYPLFESLDR	LEKTLDG	K
Galma1 62390	E-	NLRPEI	DALNEWIYPN	INNGVYRSG	ATTQEAYQKA	VVEVFDALDK	VEKILTG	ĸ
Glotr1_1 112236	E	KLRLQI	DEVNAWVYDT	VNNGV <mark>Y</mark> KTG <mark>F</mark>	ARTQEAYEKA	LFPLFESLDR	LEKMLEG	к
Glotr1_1 120328	E	ALRAQI	DSISDWMQRD	LNTGV <mark>Y</mark> KAG <mark>F</mark>	ANSQQEYDKN	VIAPFAALNK	VEELIAS	N
Glotr1_1 137290	A-	NLRPEI	DEVNDWVYHT	VNNGV <mark>Y</mark> KAGE	AKTQDAYEAA	VKPLFASLDR	LEKMLDG	K
Glotr1_1 37102	A- 5	TLREEI	DELNDWVYHT		AKTQAAYEAA	VKPLFGSLDR	LEKIVDA	R
Hebcv2 440337	E-	KLRSOI	DELNEWIYPS	INNGVIRIGE	ATTOEAYOKA	VVELFDALDK	VEKILDG	0
Hetan2 39076	P	ELRAEI	DTVNEFIYDG	INDGVYKAG	AKTSEAFNPA	VIHLFETLDR	VEALLAG	ĸ
Hetan2 442680	Q-	HLRKEI	DEVNEWVYDS	INNGV <mark>Y</mark> KSG <mark>F</mark>	ATTFDAYRAA	VVPLFESLDR	VEVMLKD	к
Hydpi2 96315	E-	AHRQEI	DSINEWVYDT	VNNGV <mark>Y</mark> KAG <mark>F</mark>	AVSQEAYEKA	VYPLFESLDR	LEKMLTG	к
Hypsu1 37440	E-	EHRAEI	DALNDLIYPN	INNGVYRSGE	ASTQEAYELA	VADVFSALDK	VEKVLEG	K
Jaaar1 142100	E-	KLRGET	DGVNEWVYDT	VNNGVYKSGE	AVAQEPIERA	VVPLENSLOR	LEKMLEG	K
Jaaar1 63226	E	RLRAEI	DGVNEWVYDT	VNNGVYKSG	ATTQQAYESN	VVPLFDSLDR	LEKMLEG	ĸ
Lacbi2 648000	ĸ	ELRTEI	DAVNEWIYPN	INNGV <mark>Y</mark> RSG <mark>F</mark>	ATTQAAYEKA	VTELFDALDK	VEKILTG	к
Mellp1 35938	Q	NLQQEI	DTMNEWIYDQ	VNNGV <mark>Y</mark> KSG <mark>F</mark>	ATTQSAYESE	VKPLFEALDR	LEKVLD-G-G	Q
Oidma1 124122	A-	DLRKEI	EETNEWTYSD	INNGVYRSGE	ATSQEAYEKA	VVQLFKSLDR	VEKHLSE	v-к
Oidma1 165197	N- T-	SLIASI	ETMNEWVYDT	VNNGVYKCGI	AKSQAAYEKN	TYRLFESLDR	VESLLAN	S
Oidma1 39468	P-	HLLSEI	DDMNSWVYDT	INNGVIRCO	AANOSAHEEA	VRAIFKSLDR	VEDILAK	S
Oidma1 46504	P	TLKNKL	DTFRNFVYHN	INDGV <mark>Y</mark> KVG <mark>F</mark>	ASTQKAYEYS	LFPLFEALDK	VEEQLAD	P-A
Paxin1 138020	E	AHRQDI	DSINEWVYDT	VNNGV <mark>Y</mark> KAG <mark>F</mark>	AGSQDAYEKA	VYPLFDSLDR	LEKLLTG	к
Paxru1 825741	E-	AYRQDI	DSINAWVYDT	VNNGVYKAGE	AGSQDAYEKA	VYPLFDSLDR	LEKLLTG	R
Phyd12 126467	E- K-	ELQSDI	DSTNEWVIDT	VNNGVYKSGE	ATTOTALENH	VEPLEKSLDR	VEETLKE	NHAA
Pilcr1 4571	A-	AHRAEI	DSLNEWVYDT	VNNGVYKAG	SIKQQAYEAA	VVPLFQSLDR	LEKILTG	K
Pilcr1 827566	A	AHHAEI	DSINEWIYDT	VSNGV <mark>Y</mark> RAG <mark>F</mark>	SIKQQAYEAA	VVPLFRSLDR	LEKILTG	к
Pirin1 77935	E-	NLRDEI	EKSHEWVYPT	INNGV <mark>Y</mark> RSG <mark>F</mark>	ATSQSAYEDA	VTKLFDSLDR	VEKIFES	QKSQ
Pisti1 121423	E-	ELQKQI	DEVNSWVYDT	VNNGVYKAGE	AGTQEAYEAA	VYPLFESLDR	LEKMLTG	K
PleosPCI5_2 48940	T- C.	ELRNEI	DELNSWIYPN	VNNGVYRSGE	ATTQESISKA	VKEVFEALDK	LETILDG	KDE7
Plicr1 43753	E-	ALRPEI	DSLNEWVYDA	VNNGVYKCG	ATSAVAYETN	VAKVFDALDR	LEKILQG	K
Plicr1 43758	E	ALRPEI	DSINEWVYDS	VNNGV <mark>Y</mark> KSG	ATSAAAYETN	VAKVFDALDR	LEKILQG	к
Punst1 118707	E	AHRKEI	DDMNEWVYDT	VNNGV <mark>Y</mark> KAG <mark>F</mark>	AGTQKAYEDA	VLPLFASLDK	LEQTLEG	к
Punst1 52675	E-	PLRKEI	DEQNEWVYDT	VNNGVYKSG	ATTSKAYEAA	VYPLFESLDK	LEKILEG	K
Punst1 55793	E- F-	HLRSAI	DEISTWMQRD	LNTGVYKAGE	ATTOFAYDEN	VVPVFEALNK	VEKVLEE	N
Schco3 2086920	S-	ELRPKI	DELNEWGYPQ	INNGVIRIG	ATSQEAYEKA	VLGLFDGWDK	VERVILST	N
Schco3 2516063	E	ELRKGI	DEVNEWVYSQ	INNGV <mark>Y</mark> RTG <mark>F</mark>	ATTQEAYEKA	VNEVFDGLDK	VEKILEK	s
Schco3 2615640	Т	ELRSKI	DEVNEWVYHQ	INNGV <mark>Y</mark> RTG <mark>F</mark>	ATTQSAYEKA	VNEVFDGLDK	VEKILSK	s
Sclci1 100395	E-	ELRKEI	DEVNSWVYDT	VNNGVYKAGE	AVSQEAYEKA	VYSVFESLDR	LEEMLTG	K
SerlaS7 9 2	E- E-	ALRGEI	DSINEWVYDT	VNNGVYKSGE	ATSQGATETA	VKALFDSLDR VVPLFNSLDR	IEKMFES	QKK
Sphst1 178948	E-	DLRKDI	DELNAWVYDT	VNNGVYKSG	AQTQEAYEAA	VKPLFASLDR	LEKILGG	ĸ
Sphst1 178963	ĸ	ELQKEI	DELNEWVYET	VNNGV <mark>Y</mark> KTG <mark>F</mark>	AKTQEAYESA	IRPLFDSLDR	LEKILYG	к
Sphst1 193280	K-	ELQKEI	DELNEWVYET	VNNGV <mark>Y</mark> KTG <mark>F</mark>	AKTQEAYESA	IRPLFDSLDR	LEKILYG	к
Sphst1 232298	K-	ELQKDI	DELNEWVYET	VNNGVYKAGE	AKTQEAYDSG	IRPLFDSLDR	LEKILHG	K
Suilu1 799805	-02 -ਸ	AHRORT	DSINEWVYDT	TCSGA IKAGE	AOSOAAVENA	VYPLFKSI.DP	LEEMI.KC	K
Treme1 57346	E	ELRGEI	DELNEWVYND	VNNGVYKCG	AATQEAYEKA	LVPLRDALER	LDKLFS-D-G	R
Trire2 112633	P	HLRAEI	DAMNEWVYDT	VNNGV <mark>Y</mark> KVG <mark>F</mark>	SKSQESYDEN	IRPLFASLDR	LEEHLGH	
Trire2 56819	E	NLRSQI	DETNEWTYNL	INNGV <mark>Y</mark> KSG <mark>F</mark>	ATTSAAYEKA	VVALFEALDR	AEEHLAS	VAD
Tubme1 220	E-	DLRKEI	DELNEWIYAT	VNNGVYKAGE	ATKQEAYEVA	VTKLFESLDR	IEKILKD	
Tubmer 0008 Tulca1 76207	-ਮ -ਸ	DARGAV	DGUNEWVEST	INNGVIKSGI	ATAQGATEDA STGOLGVERA	V TALFASLOR	VEGLLKS LEGI.I.KD	S
Tulca1 76222	ĸ	DLQAEI	DSTNEWVYDT	VNNGVYKSGE	ATTQSAYEAA	VKPLFASLDR	LEGMLNG	ĸ
Ustma1 1515	TI	DNVEAIQKI	DELNEWIYSD	INNGV <mark>Y</mark> KTG <mark>F</mark>	ATAQEVYDKE	VDNLFLALDR	LEKLLS-D-G	R
	<i>a</i> 5	a5'		n	6	<i>a</i> 6'	a7	
	0.0	0.5		U.	v	w.u	w/	

α5 α5'

253

eee	e eeeeeee		eeeeeee	eeeeeee	eeeeeee	ee	eeeeee
Gto2p(ECM4) Sacce1 39	VGEEDBOKTI.	GEFFTVG	DOLTEADTRI.	YTTVTR	FDPVYVOHFK	CNETSTRACY	PETHLWVRNI.
Gto3p Sacce1 4945	YGKNNKDKIL	DRYFAIG	DTLTEADVRL	YPTIVR	FDVVYHOHFK	CNLATIRDDY	SRIHTWLKNI
GSTX1 Trave1 66368		DYLVG	DQLTEADIRL	FVTIVR	FDPVYVGHFK	CNIRTIRDGY	PAIDLWMRKL
GSTX2 Trave1 50990		DYLVG	DRLTEADIRL	FVTIVR	fdpv <mark>y</mark> vghfk	GNIRTIRDGY	PAIHLWLRKL
GSTX3 Trave1 73942		DYLVG	DQLTEADVRL	FVTIIR	FDPA <mark>Y</mark> VGHFK	CNLRTIRDGY	PAIHLWLRKL
GSTX1 Phchr2 2982482		DYLIG	GQLTEADIRL	FVTIVR	FDPV <mark>Y</mark> VTHFK	CNLRTIRDGY	PNLHRWMRKL
GSTX2 Phchr2 2624184		DYLVG	DQLTEADVRL	FVTIVR	FDVG <mark>Y</mark> HTAFK	CNIRSIRADY	PALHRWLRRL
Agabi_varbisH97_2 137		DYLVG	NQLTEADVRL	WVTTVR	FDPVYVGHFK	CNISTIRGGY	PNINRWMRKL
Amamu1 78766		EYLVG	NQLTEADIRL	WVTIVR	FDPVYVGHFK	CNIRDIRHGY	PAIHKWLRQL
Amathi 62909		HODYLEC	DRLTEADIRL	WVIIIR	FDPVIVGHER	CNERTIRDGI	PAIHKWMQKL
Aspnid1 7897		KSAYFFG	DDTTEADTRI.	FTTTVR	FDPVYVOHFK	CNIRDIRSGY	PATHAWIRRI
Aspnid1 8922		GGPFILG	YOMTEVDVTV	YATLVR	FDTVYVOHFK	CNLGTVRHDY	PVLNNWLKAM
Aurde3 1 115815		KYLVG	DLLTEADVRL	FVTLIR	FDPV <mark>Y</mark> VGHFK	CNLRTIRDGY	PELNRWMKTL
Aurde3_1 1240856		DFLVG	DQLTEADVRL	FVTLIR	FDPA <mark>Y</mark> VGQFK	CNLRTIRGGY	PELNRYMKNL
Botbo1 118302		EYLIG	NRLTEADVRL	YTTIVR	FDPV <mark>Y</mark> HGHFK	CNLGSIRHDY	PAINKWLKNL
Conpu1 60697		DYLVG	NQLSEADVRL	WVTIIR	FDPV <mark>Y</mark> FAHFK	CNIRDIRHGY	PNLNRWMKNL
Conpu1 82579		DYLVG	DRLTEADIRL	WVTIIR	FDPVYFSHFK	CNIRDIRHDY	PNLNRWLKNL
Copci1 17111		DYLVG	DRLTEADIRL	WVTIIR	FDPVYVGQFK	CNIRTIRDGY	PAIHSWLRKL
Crypa2 254574		EGPIILG	NELTEVDIRL	FVTIIR	FDPVYVQHFK	CNIKDIRSGY	PHIHKWMKNL
Ecompe1 130383		DILIG	NOLTEADURI	YTTLVR	FDVAVHGTEK	CNIGITRENT	PHENRWMINIE DNTHDWI.DOI.
Fomme1 130388		DFLTG	DOLTEADVRL	YVTTVR	FDVATHGIFK	CNLRTTRSGY	PNTHRWIRQL
Fomme1 143667		EYLVG	DQLTEADIRL	FVTIIR	FDPVYVGHFK	CNFRTIRSGY	PNIHNWLRKL
Fompi3 1022961		EYLIG	DRLTEADIRL	FVTIIR	FDPV <mark>Y</mark> VGHFK	CNIRTIRDGY	PAIHLWLRKL
Fompi3 127425		DYLIG	SQLTEADVRL	FVTIIR	FDVA <mark>Y</mark> HGNFK	CNIRNIRNGY	PSIHLWLRKL
Galma1 62390		DYLVG	EKLTEADIRL	WVTIIR	FDPV <mark>Y</mark> VGHFK	CNIRTIRDGY	PAIHKWMQKL
Glotr1_1 112236		QYLIG	DVLTEADIRL	FVTIIR	FDPV <mark>Y</mark> VGHFK	CNIRTIRGGY	PAINKWMKNL
Glotr1_1 120328		SGPYVLG	KTLTELDIRL	YATVVR	FDTV <mark>Y</mark> VQHFK	CNIGTIRHNY	PVINNWLKNL
Glotr1_1 137290		DYLIG	GQLTEADVRL	FVTIIR	FDVAYFGVFK	CNVRSIRHDY	PALHKWVRKL
Glotr1_1 3/102		DYLIG	GQLTEADVRL	FVTIVR	FDIGYYGAFK	CNIRTIRDGY	PALNRWFKKL
Gym1u1 36123		RIIVG	DOTTECDART	WVTIIR	FDPVIVGHEK	CNVRDIRGGI	PNINKWMKNL
Hetan2139076		TYLVG	ERLTEADVRL	FVTILIR	FDTAYUCHEK	CNLRTIRDGI	PITHRWMQRL PNTHLWLBRL
Hetan21442680		TYFIG	DRUTEADIRI	FVTLTR	FDPVYVGHFK	CNLRTTRHGY	PNTHLWLRKI.
Hydpi2 96315		DYLVG	NTLTEADIRL	FVTIVR	FDPVYVGHFK	CNLRTIRNGY	PAIHTWLKKL
Hypsu1 37440		DYLVG	NTLTEADIRL	WVTTIR	FDPV <mark>Y</mark> VGHFK	CNFRTIRDGY	PAIHRWMQKL
Hypsu1 40330		DYLVG	NTLTEADIRL	WVTIIR	FDPV <mark>Y</mark> HGLFK	CNFRTIRSGY	PAIHSWLHKL
Jaaar1 142100		EFLVG	DQLTEADVRL	WVTIIR	FDPV <mark>Y</mark> VGHFK	CNIRTIRGGY	PAINKWMKKL
Jaaar1 63226		STSLA	TNSPKLM	FDFGLPSFIR	FDPV <mark>Y</mark> VGHFK	CNIRTIRGRY	AAINKWMKKL
Lacbi2 648000		DFLVG	DRLTEADIRL	WVTIIR	FDPVYVGHFK	CNIRTIRDGY	PAIHKWMQKL
Mellp1 35938		KYLMG	DQLTEVDVRL	FTTLIR	FDVVYVTHFK	CNLKTIRGGY	PNLNHWLKCL
Oidma1 124122		DGPYYFG	RNITEADVRL	YTTIVR	FDVVYVQHFK	TNVRDIRSGY	PRIHKWLRNL
Oidma1 182545		TGPILG	NELTEVOLKL	IPTIVR	FDVVIVILEK	CNLKMTRYDY	PAIHKWLRHL DRIHGWIDNI
Oidma1 39468		TGPYLFG	SHVTEADIRI.	YPTTAR	FDVATILER	CNLKMIRIDI	PETOKWELRI
Oidma1 46504		HOPYLFG	KNITDADIRL	FSTLIR	FDVSYFSSFK	CNLKMIRYEY	PRLHLWLRTL
Paxin1 138020		DYLVG	DKLTEADIRL	FVTLIR	FDPVYVGHFK	CNLRTIRNGY	PALHLWMRKL
Paxru1 825741		DYLVG	DKLTEADIRL	FVTIIR	FDPV <mark>Y</mark> VGHFK	CNLRTIRNGY	PALHLWMRKL
Phyb12 126467		KFLVK	NTFTEADIRL	WTTIIR	FDPV <mark>Y</mark> HGHFK	CNIKSIQHDY	PHILAWARRI
Picst3 43969		DKPYLLG	NTLTEADVRL	FTTIIR	FDPV <mark>Y</mark> VQHFK	CNIGMIRHDY	PHIHQWVREL
Pilcr1 4571		DYLVG	DVLTEADIRL	WVTIIR	FDPV <mark>Y</mark> VGHFK	CNLRTIRNGY	PAIHSWMRKL
Pilcr1 827566		DYLVG	DVLTEADVRL	WVTIIR	FDPVYVSHFK	CNLRTIRKGY	PAIHSWMKKL
Pirini //935	NANSK	GETFLIS	DRLTESDIRL	YTTIVR	FDPVIHGHEK	CONTRIENDED	PLIHKWLQNL
P1SC11 121423 P1scsPC15 2 48940		DILVG	NRLTEADIRL	WVIVVR	FDPVIFSHEK	CNIRTIRGY	PAINKWMKNL DNINTWIKKI
Plicr1 42268	80	CBRAING	DSLTEADIKI.	WVTLIR	FDPAYVCOFK	CNIRTIRDGY	PALNSWMKAL
Plicr1 43753		DYLVG	GTLTEADVRL	WVSIIR	FDVVYVGHFK	CNIRTIRHGY	PAIHSWLKKL
Plicr1 43758		DYLVG	GTLTEADIRL	WVTIIR	FDPV <mark>Y</mark> VGHFK	CNIRTIRHGY	PAIHSWMKKL
Punst1 118707		DYLVG	DRLTEADIRL	YPTIIR	fdvv <mark>y</mark> athfk	CNIRTIRSGY	PNLHRWLRKL
Punst1 52675		DYLVG	DQLTEADIRL	FPTIIR	FDPV <mark>Y</mark> VRHFK	CNIRDIRSGY	PNLHRWMKNL
Punst1 55793		GGPYVLG	KELTEVDLRL	YPTLIR	FDTV <mark>Y</mark> VQHFK	CNLGTIRHNY	PVLNNWMKNL
Punst1 62356		EFLVGPGK	GTLTEADIRL	YTTIIR	FDVG <mark>Y</mark> HGAFK	CNLKTIRHDY	PNLHRWVRNL
Schco3 2086920		EYLLG	DRLTEADVRL	WVTAIR	FDPAYYGHFK	CNIRSIRHGY	PAINRWLKKL
Schco3 2516063		EYLVG	DKLTEADLRL	WVTIVR	FDPVYVGHFK	CNFRTIRAGY	PAINEWLKKL
Selei11100395		EILVG	DRUTEADIRL	WVIIIR	FDPVIVGHEK	CNTRDTRHCY	PAINEWHARL
Sebve11329667	NDT	DEVELTG	NOLTESDIRL	YTTTVR	FDPVYHGHFK	CNYRTIRDGY	PLMHRWLONI.
SerlaS7 9 2		DYLVG	NTLTEADVRL	FVTIIR	FDPVYVGHFK	CNIRTIRHGY	PAIHSWMKKL
Sphst1 178948		QYLFG	DRLTEADVRL	YTTIVR	FDPVYHGHFK	CNFSTIRGGY	PNLNRWLKNL
Sphst1 178963		EYLVG	DRLTEADVRL	YTTIIR	FDTA <mark>Y</mark> HGIFK	CNLRTIRDGY	PNINKWLKNL
Sphst1 193280		EYLVG	DRLTEADVRL	YTTIIR	FDTA <mark>Y</mark> HGIFK	CNLRTIRDGY	PNINKWLKNL
Sphst1 232298		EYLVG	DRLTEADVRL	YTTIIR	FDTA <mark>Y</mark> HGIFK	CNLRTIRDGY	PNINKWLKNL
Stano2 8800		GGPYILG	EKMTELDLLA	YPTIVR	FDTV <mark>Y</mark> VQHFK	TNLGMVRHDY	PVLNNWLKNL
Suilu1 799805		DYLVG	NTLTEADIRL	FVTTIR	FDPV <mark>Y</mark> VGHFK	CNLRDIRHGY	PNIYLWTRKL
Treme1 5/346		EFLIG	GRETEADVRL	ITTIVR	IDEVINGHEK	CNWGSIRHDY	PHINRWLKNL
Trire2 56819		OGPYYEG	GSLTEADVRL	YVTTLAR	FDPVYVOHFY	CNIEDIEGO	PRIHRWMPNT
Tubme1 220		DGPYLIG	KVLTEADIRI.	YPTTAR	FDPVYVOHFK	CNLRMTRHDY	PAIEKWMKHT.
Tubme1 6088		AGPYLLG	GKITEADVCL	YPTIVR	FDPVYVOHFK	CNIGMIRHDY	PAIHKWLRHT.
Tulca1 76207		EYLVG	GRLTEADVRL	FTTLVR	FDPVYHGHFK	CNIGSIRHNY	PNLNEWMKRL
Tulca1 76222		DYLLG	DRLTEADVRL	FTTIVR	FDPV <mark>Y</mark> HGHFK	CNIGSIRHNY	PNINRWMKQL
Ustma1 1515		EYLVPE	VGLSDADIRL	YPTLAR	fdta <mark>y</mark> hnlfr	CNVGMIRHDY	PHIHRYLRRL

α7 α8

α9

254

ee	e eee	e eeee	eeeeee	ee				
Gto2p(ECM4) Sacce1 39	YWNYD	AFRYTT	DFDHIKL	IYT RS	HTRI	NPLGITPLGP	KPDIR	
Gto3p Sacce1 4945	YWRHE	AFQRTT	DFTHIKL	YT RS	QPRV	NPIGITPLGP	KPDIR	
GSTX1 Trave1 66368	YWNNS	AFSSTC	NFEHIKT	<mark>iy</mark> y ws	HPQI	NPHRVVPVGP	IPNIL	
GSTX2 Trave1 50990	YWNNS	AFSSTC	DFDHIKT	IYY WS	HPSI	NPHRIIPVGP	IPNIL	
GSTX3 Trave1 73942	YWNNS	AFSETC	KFDHIKA	YY A-	QKNV	NPTLVVPLGP	IPNIL	
GSTX1 Phchr2 2982482	YWTTP	AFKDTC	NFOHIKU	VF -C		NPERIVPIGP	IPDIL	
Aqabi varbisH97 2 137	YWNND	AFQSST	NFDHIKT	IYY WS	HAHI	NPTRIVPEGP	VPVIE	
Amamu1 78766	YWNHE	AFKSST	NFEHIKV	<mark>iy</mark> y ws	QSNV	NPTRIVAVGP	IPNIE	
Amath1 62909	YWNND	AFKSCT	DFLHIKT	<mark>iy</mark> y ws	HGSI	NGTRVVPLGP	VPHVL	
Aspnid1 4489	YYDESEKTR-	GGAFGKTT	FLGLYKF	YL AA		SSQLIVPAGP	KPDIL	
Aspnid1 8922	YWDVP	AFRETT	DEBHIKE	IT KS	HYDT	NPKATTPLGP	WPDVEEGV	ERDWTKLTVG
Aurde3 1 115815	YWTED	AFRSTA	NFAHIKT	IYY WS	HPHI	NPTRVVPVGP	VPDIQ	
Aurde3_1 1240856	YWNYD	AFKSST	NFDHIKS	YY YS	QVNV	NPTRIVPVGP	VPHIE	
Botbo1 118302	YWKNA	AFKDTT	NFDHIKT	IYY WS	HTQI	NPKRIVPLGP	KIDIE	
Conpul 60697	YYHNA	AFKDST	NFDHIKT FDFHIKA	IYY WS		NPTRIVPVGP	SEDIE	
Copci1 17111	YWNIP	AFKDST	DFDHIKT	YY WS	HASS	SPLDVPSKSS	TLHPOLEOKY	N
Crypa2 254574	YWNVP	AFKETT	NFLHIKN	I <mark>Y</mark> T KS	HTQI	NPYSITPRGP	LPDIL	
Dacsp1 67545	YWKND	AFKGTT	NFEHIKT	IYY WS	HTQI	NPTRIVPVGP	KPNIE	
Fomme1 130383	YWKNP	AFNSTT	NFDHIKT	YH -S	IRTI	NPNLIVPIGP	IPSIE	
Fomme1 130388	YWTNP	AFNSTT	NFDHIKT	VY WS	HDHT	NPTQIVPVGP	VLSIE	
Fompi3 1022961	YWKIP	AFKDTC	NFEHIKT	IYY WS	HTTI	NPHRIVPVGP	IPNIL	
Fompi3 127425	YWNVP	AFRDTC	YFDHIKA	<mark>y</mark> y wa	KAY	NPHQIIPAGP	VPHIL	
Galma1 62390	YWNSS	AFKDST	NFEHIKT	<mark>iy</mark> y ws	HISI	NPTRIVPVGP	IPNIL	
Glotr1_1 112236	YWNHP	EFKDTT	NFNHIKT	IYY WS	HPII	NPTRIVPVGP	IPDID	
$Glotr1_1 1137290$	YWNHD	AFRDTT	NEDHIKE	$\frac{1}{2}$ $\frac{1}$	NKGV	NPARTPMGP	EPDVEEGV	EEDFNKLKPG
Glotr1 1 37102	YWTNP	AFKSST	NLDHIKT	YY W-	ITAV	S		
Gymlu1 36123	YWNNS	AFKDCT	SFEHIKT	<mark>iy</mark> y ws	HPSI	NPTRIVPVGP	IPMIQ	
Hebcy2 440337	YWNSA	AFKDST	DFDHIKT	<mark>iy</mark> y ws	HAI	NPTRIVPVGP	IPNIL	
Hetan2 39076	YWRND	AFQSTT	DFDHIKT	YF WG	QPAI	NPTRIVPIGP	VPHIE	
Hetan2 442680 Hydni 2 96315	YWNND	AFQSTT	NFEHIKU	III WS		NPHRIVPIGP	TPHIE	
Hypsu1 37440	YWNIS	AFKDST	DFDHIKV	IYY WS	HQTI	NPTRIVPVGP	VPNIL	
Hypsu1 40330	YWNNS	SFKEST	NFEHIKV	YY WP	oss	NPTRIVPVGP	IPSIL	
Jaaar1 142100	YWTNH	AFKDST	NFDHIKT	<mark>iy</mark> y ws	HPQV	NPTRIVPVGP	IPNVE	
Jaaar1 63226	YWTNP	AFKDST	DFDHIKT	YY WS	HPSV	NPTHIIPVGP	IPNIE	
Mellp1/35938	YWKNP	AFESSI	NFEHIKI	III WS	HPOT	NPTRIVEVGP	LPETE	
Oidma1 124122	YWNVP	AFKETT	EFTHIKN	IYT KS	HTQI	NKFSITPVGP	EPPIL	
Oidma1 165197	YWDLP	AFGQTT	NFEHIKR	<mark>iy</mark> f SS	ITTL	NPEGIVPLGP	RPEIL	
Oidma1 182545	YWDTSEATN-	GGAFHSTT	HFTPIKA	YT YT	LKQT	VVPAGP	QIEIL	
Oidma1 39468	YWDESGETR-	-GAFKAST	FFDAIKK	YA QT	v amv	SDWADKCD	DPDVL	
Paxin1 138020	YWNND	AFKSAT	NFOHIKV	IYY WS	OTKV	NPTRVVAVGP	TPDIE	
Paxru1 825741	YWNND	AFKSTT	NFQHIKV	<mark>iy</mark> y ws	QTKV	NPTRVVAVGP	TPDIE	
Phyb12 126467	Y-QME	GVSDTV	NMVHIKR	iyy ms	HLQI	NPTGIVPVGN	GPDLT	IV
Picst3 43969	YWKVP	GFKETT	DFDHIKY	YT KS	HIAI	NPHSITPAGP	IPNIL	
Pilcr1 827566	YWNSS	AFKDSI	NFEHIKT	III WS	LYTI	NPTRVIPIGP	IPHVE	
Pirin1 77935	YWNYP	AFKDTT	DFEHIKT	IYY WS	HPHI	NPTRVIPLGP	IPNIR	
Pisti1 121423	YWTNE	AFRSST	NFQHIKV	<mark>iy</mark> y ws	QTKV	NPTRVVSVGP	VPDIE	
PleosPC15_2 48940	YWNNE	AFKVST	NFNHIKT	IYY WS	HTTI	NPTRIVPVGP	FPDIE	
Plicr1 42268	YWTVP	AFKEST	DFCHIKT	YY WS		NPHRIVPVGP	LPPIE	
Plicr1 43758	YWNVP	AFREST	DFDHIKT	IYY WS	HPNI	NPTRIVPVGP	IPNIE	
Punst1 118707	YWTVP	AFGETT	NFDHIKV	<mark>iy</mark> f WS	HPMI	NPHRIVPVGP	LPHIL	
Punst1 52675	YWKNP	AFKDTT	NFDHIKT	<mark>iy</mark> f WS	HPSV	NPHRIVPVGP	IPHIL	
Punst1 55793	YWNVR	GFKETT	DFKHIKE	YT KS	HYDI	NPKAITPMGP	IPDIEEGY	EANWSKITPG
Schco312086920	YWTND	AFRSST	RFDHIKT	YY SO		NPSGIVPLGP	VPDIE	
Schco3 2516063	YWTND	AFKSST	RFDHIKT	IYY WS	HPHI	NPTRIVPLGP	IPDIE	
Schco3 2615640	YWNNN	AFKSST	RFDHIKT	<mark>iy</mark> y ws	HPHV	NPTRIVPLGP	VPDIE	
Sclci1 100395	YWTNP	AFQSTT	NFQHIKV	IYY WS	QTKI	NPTRVVAVGP	NPDIE	
Sebvel 329667	YWKHP	EFKDTT	DFDHIKT	YY WS		NPTRVIPLGP	IPNIR	
Sphst1 178948	YWNSD	AFKSTT	DFDHIKT	YY WS		NPTRVVPLGP	IPVIE	
Sphst1 178963	YWNND	AFKSTT	DFDHIKT	VYA F-	MAHI	NPTQVVPLGP	IPNIE	
Sphst1 193280	YWNND	AFKSTT	DFDHIKT	I <mark>Y</mark> A F-	MAHI	NPTQVVPLGP	IPNIE	
Sphst1 232298	YWNNY	AFNSTT	DFDHIKT	YA F-	MIHV	NPTQVVPLGP	IPNIQ	
Stano2 8800 Suilu1 799805	YWNVE	GFKEST	UFKHIKE KFDHTKT	YY WC		NPHAITPLGP	IPDVEEDY	ESDWSKLKPG
Treme1 57346	YWNYP	AFKDTT	DFDHIKE	IYY YS	HAHI	NPTRIVPLGP	RVDIE	
Trire2 112633	YWDQDEEGPL	RAAFYRTTAP	NIGRYAL	YA DS	RWRIVQEG	QGPLIVPAGP	LVLME	
Trire2 56819	YWRHA	AFRETT	QFEHIKW	I <mark>Y</mark> T RS	HTQI	NPLSITPVGP	LPHIL	
Tubmel 220	YYDIP	GFKETT	NFEHIKK	IYT KS	HSQI	NPKGITPLGP	APDIM	
Tulca1 76207	YWONP	AFAQTT	DEHHER	YY CO	KVCS	NETGITPLGP	IPSTE	
Tulca1 76222	YWNNS	AFKDST	NFEHIKH	IYY WS	HRQI	NPTGIVPVGP	IPLIE	
Ustma1 1515	YWNEK	AFRDYT	NFDHIKK	<mark>y</mark> s sv	<mark>G</mark>	GNKGIEPRGP	LPHML	

Gto2p (E	ECM4) Sacce1 39	PL		
Gto3p 8	Sacce1 4945	PP		
GSTX1 1	[rave1 66368	PL		
GSTX2 1	[rave1 50990	PL		
GSTX3 1	[rave1 73942	PL		
GSTX1 I	Phchr2 2982482	PLDA		
GSTX211	Phchr2 2624184	PL		
Agabi v	varbisH97 21137	PL		
Amamu1	78766	PT		
Amath1	62909			
Aconidi	14489			
Aspiriu		FKDA		
Asphia		PRDREV	NAVKH	
Aspnia	1 1 1 1 2 2 2	GVSHPAVLEF	EKELNEE	
Aurde3	_1 115815	PL		
Aurde3	1 1240856	PL		
Botbo1	118302	PLN		
Conpu1	60697	PL		
Conpu1	82579	PL		
Copci1	17111	ANPVIDT-		
Crypa2	254574	PLDKEV	PAVEAAKA	GKV
Dacsp1	67545	PL		
Fomme1	130383	PL		
Fomme1	130388	PL		
Fomme1	143667	PLH		
Fompi3	1022961	PFDD		
Fompi3	127425	PLDA		
Galmal	62390	PL		
Glotr1	11112236	PT		
Glotr1	1 120328	GVKI.PAVT.DV		
Glot-1	11137290	DT		
Glot-1	1137102			
GIOUTI	_1 3/102	ILLR		
Gymrui	36123	AL		
нерсу2	440337	br		
Hetan2	39076	AL		
Hetan2	442680	PL		
Hydpi2	96315	PL		
Hypsul	37440	PLKE		
Hypsul	40330	PLSL		
Jaaar1	142100	PL		
Jaaar1	63226	PL		
Lacbi2	648000	PL		
Mellpl	35938	ALDEDK		
Mellpl Oidmal	35938 124122	ALDEDK REDEEV	PAVAYALALR	 HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal	35938 124122 165197	ALDEDK REDEEV GKQIEA	PAVAYALALR VK	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal	35938 124122 165197 182545	ALDEDK REDEEV GKQIEA PLN	PAVAYALALR VK	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal	35938 124122 165197 182545 39468	ALDEDK REDEEV GKQIEA PLN PVAS	PAVAYALALR VK	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal	35938 124122 165197 182545 39468 46504	ALDEDK REDEEV GKQIEA PLN PVAS PL	PAVAYALALR VK 	HSNTRRP
Mellp1 Oidma1 Oidma1 Oidma1 Oidma1 Oidma1 Paxin1	35938 124122 165197 182545 39468 46504 138020	ALDEDK REDEEV GKQIEA PLN PVAS PL	PAVAYALALR VK	HSNTRRP
Mellp1 Oidma1 Oidma1 Oidma1 Oidma1 Oidma1 Paxin1 Paxru1	35938 124122 165197 182545 39468 46504 138020 825741	ALDEDK GKQIEA PLN PVAS PL PL	PAVAYALALR VK	 HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxin1 Paxrul Phybl2	35938 124122 165197 182545 39468 46504 138020 825741 126467	ALDEDK REDEEV GKQIEA PLN PVAS PL PL PL	PAVAYALALR VK	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxin1 Paxru1 Phyb12 Picst3	35938 124122 165197 182545 39468 46504 138020 825741 126467 43969	ALDEDK REDEEV GKQIEA PVAS PVAS PL PL PS		HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxin1 Paxru1 Phyb12 Picst3	35938 124122 165197 182545 39468 46504 138020 825741 126467 43969 4551	ALDEDK REDEEV GKQIEA PVAS PL PL PL PS PL	PAVAYALALR VK 	 HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxinl Paxrul Phybl2 Picst3 Pilcrl	35938 124122 165197 182545 39468 46504 138020 825741 126467 43969 4571 9227566	ALDEDK REDEEV GKQIEA PLN PVAS PL PL PL PL 	PAVAYALALR VK	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxin1 Paxru1 Phyb12 Picst3 Pilcr1 Pilcr1	35938 124122 165197 182545 39468 46504 138020 825741 126467 43969 4571 827566 77035	ALDEDK REDEEV GKQIEA PLN PL PL PL 		HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxin1 Paxru1 Phyb12 Picst3 Pilcr1 Pilcr1 Pilcr1 Pilcr1	35938 124122 165197 182545 39468 46504 138020 825741 126467 43969 4571 827566 77935 121423	ALDEDK REDEEV 	PAVAYALALR VK 	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxinl Phybl2 Picst3 Pilcr1 Pilcr1 Pirin1 Pisti1	35938 124122 165197 182545 39468 46504 138020 825741 126467 43969 4571 827566 177935 121423	ALDEDK REDEEV GKQIEA PLN PL PL PL PL PLDS PLDS PL	PAVAYALALR VK 	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxinl Paxinl Phybl2 Picst3 Pilcr1 Pilcr1 Pisti1 Pisti1	35938 124122 165197 182545 39468 46504 138020 825741 126467 43969 4571 827566 77935 121423 15_2 48940 42920	ALDEDK REDEEV GKQIEA PLN PL 	PAVAYALALR VK	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxrul Phybl2 Picst3 Pilcr1 Pirin1 Pisti1 Pisti1 PleosPC	35938 124122 165197 182545 39468 46504 138020 825741 126467 43969 4571 827566 777935 121423 C15_2 48940 42268	ALDEDK REDEEV PL	PAVAYALALR VK	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxinl Paxrul Physt2 Picst3 Pilcr1 Pilcr1 Pisti1 PleosPC Plicr1 Plicr1	35938 124122 165197 182545 39468 46504 138020 825741 126467 43969 4571 827566 77935 121423 15_2 48940 42268 43753	ALDEDK REDEEV 	PAVAYALALR VK	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxinl Paxinl Phybl2 Picst3 Pilcr1 Picr11 Picr11 Plicst1 Plicr1 Plicr1 Plicr1	35938 124122 165197 182545 39468 46504 1380200 825741 126467 43969 4571 827566 177935 121423 C15_2 48940 42268 43753 143758	ALDEDK REDEEV GKQIEA PLN PL PL PL PL PLDS PL PL PL PL PL	PAVAYALALR VK	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxinl Paxrul Picst3 Pilcr1 Pilcr1 Pilcr1 Picst1 Pilcr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1	35938 124122 165197 182545 39468 46504 138020 825741 126467 43969 4571 827566 77935 121423 15_2 48940 42268 43753 43758 118707	ALDEDK REDEEV GKQIEA PLN PL PL 	PAVAYALALR VK	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxrul Phybl2 Picst3 Pilcr1 Pirin1 Pisti1 Pisti1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1	35938 124122 165197 182545 39468 46504 138020 825741 126467 43969 4571 827566 77935 121423 215_2 48940 42268 43753 43758 118707 52675	ALDEDKREDEEVGKQIEAPLNPLPLPL	PAVAYALALR VK	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxinl Paxrul Picst3 Pilcr1 Pilcr1 Pilcr1 PleosPC PleosPC Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plost1 Punst1	35938 124122 165197 182545 39468 46504 138020 825741 126467 43969 4571 827566 77935 121423 155_2 48940 42268 43753 43758 118707 52675 155793	ALDEDK REDEEV 	PAVAYALALR VK	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxinl Paxinl Picst3 Pilcr1 Picst1 Picst1 Picst1 Plicr1	35938 124122 165197 182545 39468 46504 1380200 825741 126467 43969 4571 827566 177935 121423 215_2 48940 42268 43753 143758 118707 152675 55793 62356	ALDEDK REDEEV GKQIEA PLN PL PL 	PAVAYALALR VK	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxinl Paxrul Phybl2 Picst3 Pilcr1 Pilcr1 Pilcr1 Picst1 Picst1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Schco3	35938 124122 165197 182545 39468 46504 1380200 825741 126467 43969 4571 827566 77935 121423 15_2 48940 42268 43758 118707 52675 155793 62356 2086920	ALDEDK REDEEV PL	PAVAYALALR VK	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxrul Phybl2 Picst3 Pilcr1 Pirin1 Pisti1 Pisti1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Pust1 Pust1 Punst1 Punst1 Schco3 Schco3	35938 124122 165197 182545 39468 46504 138020 825741 126467 43969 4571 827566 77935 121423 215_2 48940 42268 43753 43758 118707 52675 55793 62356 2086920 2516063	ALDEDK REDEEV PL	PAVAYALALR VK	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxinl Paxinl Picst3 Picst3 Picst1 Pilcr1 Picr1 Picr1 PlosP1 PlosP1 Plicr1 Plos1 Plos1 Plos1 Punst1 Punst1 Punst1 Schco3 Schco3	35938 124122 165197 182545 39468 46504 138020 825741 126467 43969 4571 827566 177935 121423 15_2 48940 42268 43753 43758 118707 52675 55793 62356 2086920 22516063 2615640	ALDEDK REDEEV 	PAVAYALALR VK 	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxinl Paxinl Phybl2 Picst3 Pilcr1 Picst1 Picr1 Picr1 Picr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Schco3 Schco3 Schco3	35938 124122 165197 182545 39468 46504 1380200 825741 126467 43969 4571 827566 177935 121423 15_2 48940 42268 43753 138758 118707 152675 155793 162356 2086920 2516063 2615640 100395	ALDEDK REDEEV GKQIEA PLN PL PL 	PAVAYALALR VK	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxnul Phybl2 Picst3 Pilcr1 Pilcr1 Pilcr1 Pilcr1 Pilcr1 Pilcr1 Picst1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Schc03 Schc03 Schc03 Schc03	35938 124122 165197 182545 39468 46504 138020 825741 126467 43969 4571 827566 77935 121423 15_2 48940 42268 43758 118707 52675 155793 62356 2086920 2516063 2615640 100395 329667	ALDEDK REDEEV PL	PAVAYALALR VK	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxrul Phybl2 Picst3 Pilcr1 Pirin1 Pisti1 Picr1 Pirin1 Pirin1 Picr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Schco3 Schco3 Schco3 Schco3 Sclc1 Sebvel SevelaS	35938 124122 165197 182545 39468 46504 138020 825741 126467 43969 4571 127666 77935 121423 15_2 48940 42268 43758 118707 52675 155793 162356 2086920 2516063 2615640 100395 329667 7_9_2	ALDEDK REDEEV PL	PAVAYALALR VK	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxinl Paxinl Picst3 Picst3 Pilcr1 Pilcr1 Pilcr1 Pist1 Picr1 Picr1 PlosPl PlosPl PlosT1 Punst1 Punst1 Punst1 Punst1 Punst1 Schco3 Schco3 Schco3 Schco3 Schco3 Schco3 Schco3	35938 124122 165197 182545 39468 46504 138020 825741 126467 43969 4571 827566 77935 121423 15_2 48940 42268 43753 43758 118707 52675 155793 62356 2086920 2516063 2615640 100395 1329667 79_2 178948	ALDEDK REDEEV PL	PAVAYALALR VK	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxinl Paxinl Picst3 Pilcr1 Picst3 Pilcr1 Picr1 Picr1 Picr1 Picr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Schc3	35938 124122 165197 182545 39468 46504 1380200 825741 126467 43969 4571 827566 177935 121423 15_2 48940 42268 43753 143758 118707 152675 155793 162356 2086920 2516063 2615640 100395 1329667 7_9_2 178948 178963	ALDEDK REDEEV PL	PAVAYALALR VK	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxnul Phybl2 Picst3 Pilcr1 Pilcr1 Pilcr1 Pilcr1 Pilcr1 Pilcr1 Pilcr1 Picr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Schc03 Sch	35938 124122 165197 182545 39468 46504 138020 825741 126467 43969 4571 827566 77935 121423 15_2 48940 42268 43753 43758 118707 52675 55793 62356 2086920 2516063 2615640 100395 329667 7_92 178948 178963 193280	ALDEDK REDEEV PL	PAVAYALALR VK	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxinl Paxrul Phybl2 Picst3 Pilcst1 Pilcst1 Pilcst1 PleosPC Plicr1 PleosPC Plicr1 Punst1 Punst1 Punst1 Punst1 Schco3 Schco3 Schco3 Schco3 Schco3 Schst1 Sphst1	35938 124122 165197 182545 39468 46504 138020 825741 126467 43969 4571 827566 77935 121423 155_2 48940 42268 43753 43758 118707 52675 55793 62356 2086920 2516063 2615640 100395 329667 79_2 178948 178963 193280 232298	ALDEDK REDEEV PL	PAVAYALALR VK	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxinl Paxinl Picst3 Picst3 Pilcst1 Pilcst1 Pilcst1 Picst1 PlosPU PlosPU Plicr1 Plost1 Punst1 Punst1 Punst1 Punst1 Punst1 Schco3 Schco3 Schco3 Schcs4 Sphst1 Sphst1 Sphst1 Stano2	35938 124122 165197 182545 39468 46504 1380200 825741 126467 43969 4571 827566 177935 121423 15_2 48940 42268 43753 43758 118707 52675 155793 62356 2086920 22516063 2615640 100395 1329667 79_2 178948 178963 193280 232298 8800	ALDEDK REDEEV 	PAVAYALALR VK	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxinl Paxinl Picst3 Pilcr1 Picst3 Pilcr1 Picst1 Picr1 Picst1 Picr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Schc3 Schc	35938 124122 165197 182545 39468 46504 1380200 825741 126467 43969 4571 827566 177935 121423 15_2 48940 42268 43753 138758 118707 152675 155793 162356 2086920 2516063 2615640 100395 1329667 7_9_2 178948 178963 193280 223298 18800 799805	ALDEDK REDEEV PL	PAVAYALALR VK	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxnul Phybl2 Picst3 Pilcr1 Pilcr1 Pilcr1 Pilcr1 Pilcr1 Pilcr1 Pilcr1 Picr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Schc03 Sch	35938 124122 165197 182545 39468 46504 138020 825741 126467 43969 4571 827566 77935 121423 15_2 48940 42268 43753 43758 118707 52675 55793 62356 2086920 2516063 2615640 100395 329667 7_9_2 178948 178963 193280 232298 8800 799805 57346	ALDEDK REDEEV PL	PAVAYALALR VK	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxinl Paxrul Phybl2 Picst3 Pilcst1 Pilcr1 Pilcr1 Pilcr1 PleosPC Plicr1 PleosPC Plicr1 Pleost1 Punst1 Punst1 Punst1 Schco3 Schco3 Schco3 Schco3 Schco3 Schco3 Schst1 Sphst1 Sphst1 Stano2 Sulu1 Treme1	35938 124122 165197 182545 39468 46504 138020 825741 126467 43969 4571 827566 77935 121423 155_2148940 42268 43753 121423 155_2148940 42268 43753 1118707 552675 55793 62356 2086920 2516063 2615640 100395 329667 79_2 778948 178963 193280 232298 8800 799805 57346 112633	ALDEDK REDEEV PL	PAVAYALALR VK	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxinl Paxinl Picst3 Picst3 Pilcst1 Pilcst1 Pilcst1 Pilcst1 PlosPU PlosPU Plicst1 PlosT1 Punst1 Punst1 Punst1 Punst1 Punst1 Schco3 Schco3 Schco3 Schcs3 Schcs4 Sphst1 Sphst1 Sphst1 Stano2 Stano3 Stan	35938 124122 165197 182545 39468 46504 1380200 825741 126467 43969 4571 827566 177935 121423 15_2 48940 42268 43753 43758 118707 52675 155793 62356 2086920 22516063 2615640 100395 1329667 79_2 178948 178963 193280 232298 8800 1799805 57346 112633 56819	ALDEDK REDEEV GKQIEA PLN PL PL PL PL PL PL PL PL GVHLAA PL GVHLAA PL GVHLAA PL PL PL PL PL 	PAVAYALALR VK	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxinl Paxinl Picst3 Pilcr1 Picst3 Pilcr1 Picst1 Picr1 Picst1 Picr1 Picr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Schc3 Schc	35938 124122 165197 182545 39468 46504 1380200 825741 126467 43969 4571 827566 177935 121423 15_2 48940 42268 43753 143758 118707 152675 155793 162356 2086920 2516063 2615640 100395 1329667 7_9_2 178948 178963 193280 232298 19300 1799805 17346 112633 156819 2200	ALDEDK REDEEV PL	PAVAYALALR VK	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxinl Paxinl Phybl2 Picst3 Pilcr1 Pilcr1 Pilcr1 Pilcr1 Pilcr1 Pilcr1 Picr1 Picr1 Picr1 Picr1 Picr1 Picr1 Picr1 Picr1 Picr1 Schc3 Schc4 Schc3 Sch	35938 124122 165197 182545 39468 46504 138020 825741 126467 43969 4571 827566 77935 121423 827566 77935 121423 827566 77935 121423 827566 77935 121423 827566 77935 121423 827566 128940 42268 43758 118707 52675 55793 62356 2086920 2516063 2615640 100395 329667 792 178948 178963 193280 232298 8800 779386 1799805 557346 112633 56819 220	ALDEDK REDEEV PL	PAVAYALALR VK	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxinl Paxrul Phybl2 Picst3 Pilcr1 Pilcr1 Pilcr1 Pilcr1 Plos7 Plos7 Plos7 Plos7 Plos7 Plos7 Spls1 Schc03 Sc	35938 124122 165197 182545 39468 46504 138020 825741 126467 43969 4571 827566 77935 121423 155_2148940 42268 43753 43758 118707 52675 155793 62356 2086920 2516063 2615640 100395 329667 79_2 178948 178963 193280 232298 8800 799805 57346 112633 56819 220 6088 76207	ALDEDK REDEEV PL	PAVAYALALR VK	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxinl Paxinl Picst3 Pilcst1 Pilcst1 Pilcst1 Pilcst1 PleosP0 Plicst1 Plos11 Plos11 Punst1 Punst1 Punst1 Punst1 Schco3 Schco3 Schco3 Schco3 Schcst1 Sphst1 Sphst1 Sphst1 Sphst1 Stano2 Sulu1 Trire2 Tulce1 Tulce1	35938 124122 165197 182545 39468 46504 1380200 825741 126467 43969 4571 827566 177935 121423 15_2 48940 42268 43753 43758 118707 52675 55793 162356 2086920 2516063 2615640 100395 329667 79_2 178948 178963 193280 232298 8800 1799805 57346 112633 56819 220 16088 176222	ALDEDK REDEEV PL	PAVAYALALR VK	HSNTRRP
Mellpl Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Oidmal Paxinl Phybl2 Picst3 Pilcr1 Picst3 Pilcr1 Picst1 Picst1 Picst1 Picst1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Plicr1 Schc3 S	35938 124122 165197 182545 39468 46504 1380200 825741 126467 43969 4571 827566 177935 121423 15_2 48940 42268 43753 138758 118707 152675 155793 162356 2086920 2516063 2615640 100395 329667 7_9_2 178948 178963 193280 232298 8800 799805 17346 112633 156819 220 16088 76207 76222 1555	ALDEDK REDEEV PL	PAVAYALALR VK	HSNTRRP

Figure S3. Multiple sequence alignment of putative fungal GSTX

All sequences were retrieved from MycoCosm on the JGI website. Sequences were aligned using MAFFT and manually annotated in order to highlight the secondary structure elements of *S. cerevisiae* ECM4 structure and specific residues (catalytic residues in yellow, G-site residues in blue, H-site residues in green). Motif that exhibits variations in helix $\alpha 9$ is underlined.





A. 2Fo-Fc omit map is shown at 1.0σ around dextran-sulfate (yellow sticks and spheres). Side-chains in the vicinity of the ligand are labeled and displayed as sticks and polar contacts are represented as dashed lines. B. Chemical structure of the ligand is shown (three units of the polymer).





Sequences associated with existing solved structures are marked with a white circle (previous work) or a black circle (this study). The tree was condensed based on bootstrap values >50% (indicated below corresponding nodes). Abbreviations of organisms and protein accession numbers are provided on the JGI website (https://genome.jgi.doe.gov/fungi). Clustering of sequences in an organism-specific manner suggests recent diversification among the Xi class.

Conclusion sur l'étude des GSTs de la classe Xi chez Trametes versicolor

En conclusion, cette étude a montré que les deux enzymes (TvGSTX1 et TvGSTX3) de *T. versicolor* ont une activité typique de déglutathionylation envers les hydroquinones glutathionylées. De façon intéressante, il a également été montré que TvGSTX3 possède une activité supplémentaire contre la phénylacétophénone glutathionylée. Cette activité est typique des GSTs de la classe Omega. Les deux GSTX présentent des différences structurales dans le site actif, notamment dans le domaine N-terminal à la fin de l'hélix α 9. Dans la structure de TvGSTX3, la présence de résidus dont l'encombrement stérique est relativement petit, pourrait conférer un site plus ouvert permettant la reconnaissance du GS-PAP et pourrait ainsi expliquer une diversité de substrats pour cette isoforme. La prédiction du site de fixation couplée à des expériences de mutagénèse dirigée ont confirmé cette diversité.

Ainsi, cette étude a montré l'existence d'une redondance fonctionnelle entre les deux isoformes et l'existence d'une fonction spécifique pour TvGSTX3.

Discussion et Perspectives

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ce projet de thèse s'inscrit dans une des thématiques de recherche du laboratoire Interactions Arbres Microorganismes dédiée à l'étude du système de détoxication chez les champignons décomposeurs de bois. Au sein de ce système, plusieurs familles multigéniques d'enzymes interviennent. L'une d'entre elles, les glutathion transférases (GSTs) furent étudiées en se focalisant notamment sur deux classes de GSTs issues du champignon décomposeur *Trametes versicolor*, la classe Omega (qui est majoritairement représentée) et la classe Xi (qui est relativement plus réduite en nombre d'isoformes). Le principal objectif de cette thèse était de comprendre les fonctions des enzymes appartenant à ces deux classes. Pour répondre à cet objectif, une combinaison d'approches biochimique et structurale a permis d'appréhender les fonctions potentielles de ces enzymes. Les résultats obtenus ont permis de mesurer les capacités réactionnelles de ces enzymes et de mettre en évidence l'existence d'une fonction ligandine pour certaines isoformes de la classe Omega. De plus, la caractérisation structurale menée en collaboration avec le laboratoire CRM² a démontré l'implication de différents sites de fixation pour permettre l'interaction avec les ligands identifiés. Dans la suite de ce manuscrit, l'ensemble des résultats obtenus seront discutés et des perspectives de recherche seront proposéess.

Chapitre I : Extension de la classe Omega chez Trametes versicolor

1. Etude génomique de la classe Omega dans le règne fongique

Bien avant le début de ce projet doctoral, une première étude phylogénétique de la classe Omega a montré que celle-ci est divisée en deux types nommés type II et type III (Morel et al., 2013). Cette même étude a constaté que les GSTs de la classe Omega sont majoritairement retrouvées dans les génomes de champignons saprophytes et symbiotiques appartenant à l'ordre des Basidiomycètes (Morel et al., 2013). Afin de rechercher des cas d'extension de la classe Omega dans d'autres génomes fongiques, les séquences de GSTOs provenant de tous les génomes disponibles sur le site du Joint Genome Institute (JGI, près de 1000 génomes à la date du 16 octobre 2017) ont été récupérées. Parmi tous ces génomes analysés, seulement 27 d'entre eux contiennent une classe Omega étendue (Figure n°52). L'extension de la classe Omega est majoritairement retrouvée chez les champignons de pourriture blanche appartenant à l'ordre des Polyporales et notamment à la famille des Polyporaceae (21). Dans une moindre mesure, quelques espèces issues de deux autres familles (Phanerochaetaceae et Gelatoporiaceae) possèdent aussi un grand nombre d'isoformes appartenant à la classe Omega. Le caractère étendu de la classe Omega ne se restreint pas à l'ordre des Polyporales, ni aux champignons décomposeurs de bois, car il peut également être observé chez certaines espèces appartenant à l'ordre des Agaricales comme Cortinarius glaucopus, ainsi qu'à l'ordre des Boletales comme Suillus pictus et Suillus decipiens. Ces trois organismes sont considérés comme des champignons ectomycorhiziens. Jusqu'à présent, chez les champignons symbiotiques, la famille des GSTs n'a jamais été étudiée.

Dans les génomes de champignons de pourriture blanche présentant une extension de la classe Omega, d'autres classes étendues de GSTs peuvent également être présentes. Par exemple, chez *Trametes versicolor*, la classe Ure2p est fortement représentée avec 11 isoformes. Comme il a été rappelé dans l'introduction, les champigons décomposeurs de bois possèdent un nombre plus important de gènes codant des GSTs. De façon intéressante, d'autres organismes comme par exemple, certains insectes, contiennent aussi un nombre important de gènes codant ces enzymes, cette extension pourrait avoir une importance biologique notamment dans la détoxication de composés exogènes. En effet, chez les insectes, plusieurs études suggèrent que la présence en plus grand nombre de gènes qui codent pour des GSTs conférait à ces organismes une plus forte résistance à des composés xénobiotiques comme par exemple les insecticides (Rane et al., 2016). Dans le cas des champignons décomposeurs de bois, la possession d'un patrimoine génétique plus important en GSTs permettrait une plus forte capacité à detoxiquer des molécules toxiques présentes dans le bois.



Figure n°52 : Extension de la classe Omega dans le règne fongique et répartition des gènes codant pour les GSTOs de type II et de type III. L'identification des GSTOs en fonction du type et du résidu présent dans le site actif, a été effectuée après alignement des séquences à l'aide du logiciel MEGA (version 6). L'extension de la classe Omega se retrouve très majoritairement dans le génome de certaines pourritures blanches (encadrés en violet) et dans une moindre mesure dans certains champignons ectomycorhiziens (encadrés en marron jaunâtre). Les champignons appartenant à la famille des Polyporaceae, des Phanerochaetaceae, des Gelatoporiaceae, des Cortinariaceae et des Suillaceae sont respectivement représentés par les symboles x, •, \blacktriangle , \equiv et ϕ . Les couleurs de ces symboles renvoient à l'ordre auquel appartient le champignon ; rouge pour l'ordre des Polypores, bleu pour celui des Agaricales et enfin vert pour celui des Boletales. A la suite du nom de chaque espèce, un nombre écrit entre parenthèses indique le nombre de gènes annotés/prédits pour coder une GST.

2. <u>Etude phylogénétique des GSTOs : émergence des GSTs possédant une sérine</u>

L'analyse des séquences peptidiques des GSTOs issues des 27 champignons indique que les deux types (II et III) de GSTOs sont présents, mais ils ne sont pas répartis de façon homogène. En effet, les GSTOs de type II sont conservées avec un nombre de représentants qui fluctue faiblement (entre 1 et 5). En revanche, le nombre de GSTOs de type III varie de façon plus importante en fonction du résidu présent dans le site actif (cystéine ou sérine). Alors que le nombre de GSTOs de type III avec une cystéine (GSTOC) n'excède pas plus de 3, celui des GSTOs ayant une sérine à la place (GSTOS) est beaucoup plus important : de 5 jusqu'à 12 gènes. Il est à noter que quelques GSTOs de type III peuvent posséder une thréonine dans le site actif. La structure de cet acide aminé est proche de celle de la sérine car elle possède également un groupement hydroxyle. Ce groupement pourrait être impliqué dans l'abaissement du pKa de la cystéine du glutathion permettant d'initier l'activité de glutathionylation. Malgré le faible nombre d'études portant sur les GSTs ayant une thréonine dans leur site actif, il a été montré que cet acide aminé pouvait établir une liaison hydrogène entre son groupement hydroxyle et le cycle aromatique d'une tyrosine impliquée dans la reconnaissance du glutathion. Cette liaison hydrogène favoriserait le groupement hydroxyle de la tyrosine à stabiliser le groupement thiolate du glutathion (Liu et al., 1993).

Ainsi, l'extension de la classe Omega se caractérise par une plus forte proportion de GSTOs de type III possèdant une sérine dans le site actif. Cette sérine conférait une activité de glutathionylation à ces enzymes. A titre de comparaison, l'extension de classes de GSTs avec une sérine a aussi été observée dans d'autres règnes du vivant. Par exemple, dans le règne végétal, deux classes sont majoritairement présentes : la classe Tau et la classe Phi (Dixon, Edwards, 2010). L'origine de ces extensions de classe pourrait s'expliquer par plusieurs successions de duplication de génomes qui ont eu lieu au cours de l'évolution (Lan et al., 2009). La plupart des études ont montré que ces deux classes sont, généralement, impliquées dans la détoxication de composés exogènes (en glutathionylant des herbicides par exemple) (Cummins et al., 2011); mais aussi dans les voies de biosynthèse de certains métabolites secondaires (Dixon et al., 2010). D'autre part, chez les insectes, deux classes sont également étendues ; les classes Delta et Epsilon (Enayati et al., 2005). L'extension de ces deux classes serait potentiellement due à des phénomènes localisés de duplications de gènes, et à des processus de divergences évolutives (Enayati et al., 2005). Les premières fonctions biochimiques découvertes pour ces deux classes de GSTs résideraient dans leur capacité à glutathionyler des composés d'origine exogène tels que le dichlorodiphényltrichloroéthane (un insecticide) (Enayati et al., 2005).

3. <u>Propriétés biochimiques des GSTs des classes Omega et Xi de Trametes versicolor</u>

La caractérisation biochimique sur de certaines isoformes de la classe Omega chez *T. versicolor*, a démontré la capacité de ces enzymes à catalyser des réactions de déglutathionylation (par les TvGSTOC) et de glutathionylation (par les TvGSTOS) (Article n°1). Il est à noter, sur la base des substrats utilisés, qu'il y a bien une redondance fonctionnelle entre les six TvGSTOS pour l'activité de conjugaison et entre les trois TvGSTOC (quel que soit le type, II et III) pour l'activité de déglutathionylation.

Cette double capacité réactionnelle a aussi été observée chez la classe Omega issue d'un autre agent de pourriture blanche, P. chrysosporium (Meux et al., 2013). Au cours de cette étude, l'activité de déglutathionylation a pu être vérifiée en utilisant un substrat classique des GSTs de la classe Omega (GSTOs) : le phénylacétophénone glutathionylé (GS-PAP). Toutefois, d'autres études ont montré que ce composé représentait aussi un substrat pour d'autres classes de GSTs comme par exemple la classe Lambda chez les plantes (Lallement et al., 2014). Pour ce qui concerne l'activité de glutathionylation, les résultats ont montré que les six isoformes arborant une sérine dans leur site actif présentaient les meilleures efficacités catalytiques avec les composés isothiocyanates (le phénéthyl isothiocyanate, PEITC et le benzyl isothiocyanate, BEITC, Articles n°1, 2, 3). L'un de ces composés (le PEITC) a été utilisé lors de tests d'inhibition enzymatique afin de prédire le site de fixation d'inhibiteurs potentiels (Articles n°2 et 3). Dans la littérature, d'autres classes de GSTs sont aussi capables de catalyser des réactions de glutathionylation sur des composés isothiocyanates, c'est le cas par exemple de la classe Phi (Pégeot et al., 2017) et de la classe GSTFuA (Mathieu et al., 2013). A terme, l'utilisation de mutants catalytiques dans lesquels la sérine serait substituée par d'autres acides aminés (par exemple une alanine) pourrait démontrer ou non, l'importance de cet acide aminé dans les réactions de glutathionylation. Ainsi, la caractérisation biochimique basée sur l'utilisation de substrats synthétiques n'a pas permis de montrer des spécifictés réactionnelles mais à l'inverse une redondance fonctionelle entre les enzymes.

Dans le chapitre II des résultats, une seconde classe de GSTs de *T. versicolor*, la classe Xi (TvGSTXs) a été étudiée (Article n°4). Au regard de la littérature, les GSTXs sont surtout reconnues pour catalyser, de manière spécifique, des réactions de déglutathionylation sur des formes glutathionylées d'hydroquinones (Lam et al., 2012). Cette aptitude a été confirmée pour les deux TvGSTXs étudiées (TvGSTX1 et TvGSTX3). Cependant, l'isoforme TvGSTX3 présente une néofonctionalisation qui se caractérise par la présence de résidus favorisant la reconnaissance d'un substrat supplémentaire. L'analyse phylogénétique a montré l'existence d'une autre séquence de GSTXs provenant d'un champignon de pourriture brune, *Jaapia argillacea* (dont l'identifiant protéique disponible sur le JGI est 63226) qui possède aussi des résidus qui seraient propices pour permettre l'interaction avec d'autres composés.

Afin de confirmer la néofonctionnalisation découverte chez TvGSTX3, la capacité à déglutathionyler des substrats autres que les hydroquinones pourrait être évaluée pour la protéine JaGSTX63226. Ainsi, l'utilisation de substrats synthétiques a permis de montrer l'existence d'une redondance et d'une spécificté fonctionelle entre deux isoformes de la classe Xi chez *T. versicolor*.

4. <u>Evolution des classes Xi et Omega dans le règne fongique</u>

A partir des propriétés biochimiques qui ont été déterminées pour les deux classes étudiées, un modèle évolutif dédié aux GSTXs et aux GSTOs pourrait être proposé (Figure n°53). Dans ce modèle, il serait suggéré que les GSTXs seraient apparues avant les GSTOs car elles présentent une spécificité réactionnelle envers les composés de type hydroquinones. Cette spécificité suppose que cette classe serait plus ancienne et qu'elle aurait peu évoluée. Cependant, les résultats obtenus dans l'article n°4 suggèrent l'appartion d' évenements évolutifs ayant entrainé des mutations d'acides aminés au sein du domaine C-terminal. C'est le cas de la protéine TvGSTX3 qui peut accepter d'autres substrats comme le phénylacétophénone glutathionylé. Ensuite, la classe Omega capable de déglutathionyler des composés de type phénylacétophénones, serait alors apparue. En lien avec le modèle de Frova (2006), une substitution de la cystéine en une sérine aurait permis l'acquisition de la capacité à glutathionyler des substrats, notamment les composés isothiocyanates (PEITC et BEITC) et les composés halogènes (CDNB). L'analyse des séquences peptidiques des isoformes présentes dans des classes Omega étendues, a révélé l'existence de quelques-unes possédant une thréonine dans le site actif. L'apparition de ces protéines soulève des interrogations notamment sur l'identité du résidu qui aurait été remplacé par la thréonine. Sachant que l'existence de GSTOs arborant une tyrosine n'a jusqu'à ce jour jamais été démontré, le remplacement par une thréonine aurait pu se produire aux dépens d'une cystéine ou d'une sérine.



Dimérisation

Figure n°53 : Proposition de modèle évolutif pour les classes Xi et Omega chez les champignons décomposeurs de bois.

5. <u>Découverte d'une fonction ligandine redondante et spécifique chez les TvGSTOS</u>

Une démarche de recherche de substrat et /ou de ligands a été effectuée lors de ce projet de thèse en utilisant une méthode de screening à haut débit. Les interactions entre les TvGSTOS et chacune des classes de ligands découvertes seront dans un premier temps rappelées. A titre de comparaison, des cas d'interactions similaires faisant intervenir d'autres GSTs seront également décrits.

Tout d'abord, les résultats de l'article n°2 ont mis en évidence la capacité des TvGSTOS à interagir avec des benzophénones. Malgré l'existence d'une redondance fonctionelle entre ces enzymes, une étude structure-fonction a montré que la protéine TvGSTO3S présente une sélectivité d'interaction dépendante de la présence et de la position des groupements hydroxyles envers une dizaine de benzophénones. Dans la littérature, des cas d'interactions entre des GSTs retrouvées chez l'Homme (provenant des classes Pi, Mu et Alpha) et certaines benzophénones ont déjà été observées au niveau du site H (Georgakis et al., 2017). Outre dans la compositionchimique du bois, les benzophénones sont considérés comme des polluants qui peuvent représenter un risque pour l'environnement. Dans un contexte de bioremédiation, les champignons de pourriture blanche représentent une stratégie intéressante pour envisager une stratégie de dépollution des sols contaminés. A cet égard, la capacité du champignon T. versicolor à dégrader une sonde isotopique (BP3) dont la structure est caractéristique des benzophénones, a été évaluée. Il est apparu que le champignon était capable de minéraliser le composé marqué. De plus, l'analyse de la biomasse fongique a révélé que celle-ci était enrichie en carbone 13 (¹³C), indiquant que T. versicolor assimile le composé exogène. L'enrichissement en ¹³C fut aussi retouvé dans la structure des acides aminés présents dans la cellule du champignon, ce qui suggère que T. versicolor utilise la sonde BP3 comme une source de carbone. Une analyse métabolomique a par la suite montré que les premiers produits de dégradation de BP3 résultant d'une probable réaction d'oxydation assurée par les cytochromes P450 monooxygénases, sont le 4-hydroxybenophénone, la 2,4-dihydroxybenzophénone (2,4-DHB) et la 4,4'dihydroxybenzophénone (Badia-Fabregat et al., 2014). C'est justement la benzophénone 2,4-DHB qui a été identifiée comme étant un des ligands de TvGSTO3S. Dès lors, la fonction ligandine des TvGSTOS pourrait être impliquée dans les voies d'assimilation de composés xénobiotiques.

De plus, les travaux menés dans l'article n°2 ont également montré que les TvGSTOS interagissent avec les flavonoïdes. Des études préliminaires ont montré que des extraits de bois de merisier induisaient des effets stabilisateurs sur l'isoforme TvGSTO3S. L'utilisation de la cristallographie d'affinité couplée à des techniques d'analyse de spectrométrie de masse et de résonance magnétique nucléaire a permis d'identifier un ligand naturel appartenant à la classe des flavonoïdes : la dihydrowogonine. Par ailleurs, malgré la présence de patrons d'interaction communs entre la plupart des six TvGSTOS étudiées envers des flavonoïdes testés, une spécificité d'interaction entre la protéine TvGSTO6S et la naringénine a pu être observée. Chez les plantes, il existe aussi des GSTs qui interagissent avec les flavonoïdes.

Par exemple, des tests de titration calorimétrique isotherme ont montré qu'une GST de la classe Phi chez la plante modèle, Arabidopsis thaliana (AtGSTF2), pouvait lier une forme glycosylée de la quercétine (Dixon et al., 2011). Par ailleurs, la capacité de la protéine AtGSTF2 à glutathionyler des flavonoïdes tels que la quercétine et le kaempférol a aussi été testée. Cependant, aucune forme conjuguée pour ces deux composés n'a été observée (Smith et al., 2003). Récemment, une molécule de quercétine a pu être identifiée dans l'interface du dimère (site L) en un seul exemplaire (Ahmad et al., 2017). Par ailleurs, des études ont montré que d'autres GSTs sont impliquées dans le transport des anthocyanines, c'est le cas notamment d'une GSTs de la classe Phi, AtGSTF12 (anciennement nommée TT19), qui est requise pour permettre l'accumulation de ces métabolites dans la vacuole (Kitamura et al., 2004). Chez d'autres espèces végétales telles que le maïs et le pétunia, des expériences de génétique inverse ont aussi confirmé l'implication de certains gènes codant des GSTs (respectivement les gènes bz2 et an9) dans le transport des anthocyanines afin de les stocker dans la vacuole (Alfenito et al., 1998; Mueller et al., 2000). L'absence de flavonoïdes sous forme glutathionylée indique que la fonction ligandine de certaines GSTs de plantes serait requise pour permettre le transport de ces molécules dans le cytosol. En effet, ces composés sont initialement présents dans le réticulum endoplasmique et doivent être acheminés à destination du tonoplaste. Ensuite, des transporteurs ancrés dans la membrane de la vacuole comme par exemple les MRP (« Multidrug resistance-associated protein ») et les MATE (« Multidrug and toxic compound extrusion ») assuraient la phase de séquestration dans la vacuole (Gomez et al., 2011 ; Zhao, 2015).

Sachant que les flavonoïdes sont présents dans les extractibles de bois et qu'ils ne sont pas synthétiser dans la cellule fongique (Gil-Ramírez et al., 2016), la fonction ligandine des TvGSTOS pourrait avoir un rôle dans le transport de ces composés afin de les séquestrer et contribuerait ainsi à la défense du champignon.

Une troisième étude a montré la capacité de la protéine TvGSTO2S à interagir avec un stilbène provenant de bois de bagasse (*Bagassa guianensis*, Article n°3). Plus précisément, la caractérisation structurale a montré au sein de la structure de TvGSTO2S, la présence de deux configurations (*trans*- et *cis*-) d'oxyresvératrol. L'origine du changement de configuration pourrait s'expliquer par une réaction de photoisomérisation qui aurait eu lieu lorsque les complexes TvGSTO2S-oxyresvératrol ont été laissés exposés à la lumière. Cette réaction de photoisomérisation est considérée comme une étape de dégradation des stilbènes (Maafi, Al-Qarni, 2018). Jusqu'à présent, il existe très peu d'études qui ont pu démontrer que les GSTs interagissent avec les stilbènes. Néanmoins, il a été découvert récemment chez la vigne, qu'une GST de la classe Tau (GSTU-2) est impliquée dans le transport du *trans*-resvératrol afin de permettre par la suite, son excrétion en dehors de la cellule. Chez *Vitis vinifera*, le resvératrol agit comme une phytoalexine, ce qui correspond à une molécule de défense dont la synthèse est induite en cas de stress.

Ainsi, la fonction de transport de GSTU-2 vis-à-vis du resvératrol contribuerait à la défense de la vigne, notamment face à des attaques de champignons phytopathogènes (Martínez-Márquez et al., 2017). Dans la littérature, des études ont montré que l'oxyresvératrol possède différentes propriétés comme par exemple l'activité antifongique (Basset et al., 2012). Au regard de la capacité de GSTU-2 issue de la vigne à transporter un dérivé de l'oxyresvératrol (le *trans*-resvératrol), la fonction ligandine de TvGSTO2S pourrait jouer le rôle de transporteur de ce composé toxique et constituerait une stratégie de détoxication pour *T. versicolor*.

Ainsi, la présence de deux sites de fixation dans la structure des TvGSTOS (le site H et le site L) permet à ces enzymes de se lier à une grande diversité de ligands. L'existence de ces deux sites pourrait expliquer le fait que cette fonction ligandine est partagée entre les différentes isoformes. Par comparaison avec la fonction ligandine des GSTs décrites ci-dessus, celle des TvGSTOS aurait très probablement un rôle à jouer dans le transport d'extractibles polyphénoliques libérés lors de la dégradation du bois. Chez les champignons xylophages, la capacité des GSTs à lier des molécules de bois ne se restreint pas uniquement à celle des isoformes de la classe Omega. En effet, il a été montré qu'une isoforme de la classe GSTFuA chez *P. chrysosporium* est capable de fixer des extractibles tels que la vanilline et le coniféraldéhyde (Mathieu et al., 2012).

6. Spécificités d'interactions entre les TvGSTOS

Au cours de ce projet de thèse, plusieurs approches ont montré une redondance fonctionelle entre les TvGSTOs que ce soit vis-à-vis de substrats synthétiques ou d'une banque de composés pures (flavonoïdes, benzophénones). En revanche, il est apparu que quelques cas d'interactions spécifiques existaient comme par exemple, entre la protéine TvGSTO6S et la naringénine et aussi entre la protéine TvGSTO2S et l'oxyresvératrol. Afin d'appréhender plus en détails la spécificité fonctionnelle entre les TvGSTOS, une méthode de screening à haut débit menée sur ces enzymes en utilisant une banque d'extraits de bois d'essences forestières provenant de Guyane française a été utilisée. Cette stratégie méthodologique a été réalisée par le stagiaire Guillaume Salzet. Les résultats préliminaires représentés sous la forme d'une carte thermique (ou « heat map ») (Figure n°54) montre des patrons d'interactions différents d'une protéine à l'autre. Dès lors, l'utilisation d'une banque composée de mélanges complexes de molécules naturelles a permis de mettre en évidence des spécifictés d'interaction entre les TvGSTOS. A terme, la sélection des extraits spécifiques pour chacune des enzymes permettra d'identifier la (ou les) molécule(s) reconnue(s) par ces protéines.



Figure n°54 : "Heat-map" récapitulant les décalages thermiques (ΔT_d) induits par une banque d'extraits de bois tropicaux sur six TvGSTOS. Les ΔT_d sont représentés par un code de couleur qui est le suivant : en vert sont représentés les ΔT_d les plus importants, en rouge les ΔT_d les plus faibles et en noir les ΔT_d proches de la valeur moyenne de l'ensemble des ΔT_d obtenus. Les noms des essences forestières, suivis de la zone du tronc étudiée (DU pour duramen et AU pour aubier) et du solvant utilisé (ACE : acétone, DCM: dichlorométhane, TE : mélange toluène-éthanol et WAT : eau) figurent à droite.

Chapitre II : Vers la recherche de nouveaux substrats

Afin de mettre en évidence des spécificités d'interaction entre les isoformes de la classe Omega qui partagent entre elles des pourcentages d'identité élevés, des perspectives de recherches peuvent être envisagées. Par exemple, l'étude de l'implication des GSTs dans le métabolisme secondaire chez *Trametes versicolor* ainsi que la prise en compte de la phase d'activation (du système de détoxication) représentent deux stratégies intéressantes.

1. <u>Recherche de substrats et/ou de ligands à partir d'extraits de carpophores de Trametes versicolor</u>

Au cours de ce projet de thèse, je me suis principalement intéressé à la découverte de substrats et/ou de ligands d'origine exogène (à partir d'extraits de bois). Cependant, lors de ma dernière année, j'ai initié une nouvelle démarche pour tenter d'identifier de nouveaux substrats pour les TvGSTOs à partir d'extraits de *T. versicolor*. Cette méthodologie pourrait également s'appliquer aux TvGSTXs. Pour cela, une collecte de dix sept échantillons de carpophores de *Trametes versiolor* (identifiés par le mycologue Jean-Paul Maurice) a été effectuée dans une forêt de la commune de Champenoux (54).

Des études récentes se sont portées sur la composition chimique de carpophores de T. versicolor collectés en milieu naturel. L'une d'entre elles a montré que des triterpénoïdes et des stérols sont retrouvés et possèdent une activité anti-inflammatoire (Jin et al., 2018). De plus, l'analyse des propriétés biologiques d'extraits majoritairement glucidiques issus de fructifications de T. versicolor, a indiqué que ces extraits derniers possèdent des activités antiradicalaire et antioxydante (Kozarski et al., 2012). Par l'utilisation de différents solvants (eau, éthanol, méthanol), une multitude de composés polyphénoliques tels que les flavonoïdes sous forme glycone et aglycone ont pu être détectées. Ces mêmes extraits possèdent des activités antioxydantes (Janjušević et al., 2017; Pop et al., 2018). Nénamoins, l'origine de la présence des flavonoïdes dans ces extraits représente un sujet à controverses dans la mesure où certaines études affirment que les champignons ne peuvent pas synthétiser ces composés. Alors qu'une analyse génomique chez les champignons indique la présence d'au moins un gène codant pour la phénylalanine ammonia-lyase, aucun gène codant pour la chalcone synthétase et la chalcone isomérase n'a été identifié (Gil-Ramírez et al., 2016). Ainsi, les champignons sont capables de synthétiser des composés phénoliques, mais ils ne seraient pas capables de produire des flavonoïdes. Face à ce constat, l'origine des flavonoïdes dans les carpophores de T. versicolor serait probablement due à l'absorption de ces composés à partir du substrat (c'est-à-dire le bois) auquel le champignon est attaché.

La méthodologie utilisée dans cette perspective de recherche est d'extraire une large gamme de métabolites à partir de fructifications de *T. versicolor* en utilisant différents solvants (par exemple l'eau, l'acétone et l'éthanol). Après l'évaporation du solvant, des tests d'interactions entre les GSTs étudiées et les molécules contenues dans les extraits pourraient être effectués en utilisant une combinaison de trois techniques biochimiques (Figure n°55).

En effet, l'étude de dénaturation thermique ainsi que des tests d'inhibition enzymatique à l'aide d'une sonde fluorescente pourraient être effectués. Sachant que les protéines étudiées pendant ce projet de thèse, possèdent une étiquette hexahistidine à l'extrémité de leur domaine C-terminal, celles-ci pourraient être immobilisées dans une colonne chargée en ions nickel (Ni²⁺). Les extraits obtenus seraient ensuite déposés dans la colonne : si des molécules sont potentiellement reconnues par les GSTs fixées, alors celles-ci seraient retenues dans la colonne. Puis, une étape d'élution permettrait de décrocher les protéines contenant de potentiels ligands.

Ensuite, une étape de précipitation permettrait alors de séparer les ligands et les protéines. Cesderniers pourront être finalement analysés par des méthodes de spectrométrie de masse afin de les identifier. Des expériences dédiées aux effets induits par les extraits sur la stabilité thermique des TvGSTOs sont en cours de réalisation par l'ingénieur d'études Muriel Barbier.



Figure n°55 : Démarche de recherche de substrats/ligands. La combinaison de ces trois méthodes permettra de sélectionner l'extrait contenant les molécules pouvant être reconnues par les GSTs étudiées. Par la suite, des expériences de co-cristallisations menées entre la protéine et l'extrait sélectionné contribueront à identifier la molécule et le site de fixation impliqué lors de l'interaction.

2. <u>Etude du lien fonctionnel entre les phases d'activation et de conjugaison du système de</u> <u>détoxication</u>

Au cours de ce projet de thèse, aucun substrat n'a pu être identifié pour les TvGSTOs. Dans le cadre du système de détoxication, les GSTs interviennent au sein de la phase II de conjugaison. La première phase dite d'activation permet d'exposer un groupement électrophile sur le composé toxique. Le composé électrophile sera alors plus apte à subir une attaque nucléophile de la part d'une molécule de glutathion, assurée ou non par l'action d'une GST. Dans le but de rechercher de nouveaux substrats pour les TvGSTOs et les TvGSTXs, il serait intéressant de prendre en compte la phase I d'activation dans nos expérimentations. Une première tentative a été effectuée à la fin de l'article n°1, afin de tenter d'expliquer le rôle de TvGSTO1C dans des exudats (Article n°1). Dans cet article, une peroxydase extracellulaire (TvVP2) avait été utilisée pour assurer la phase d'activation. Outre les systèmes oxydatifs extracellulaires, d'autres familles d'enzymes de type oxydases interviennent à l'intérieur de la cellule fongique, c'est le cas notamment des cytochromes P450 monooxygénases, des époxyde hydrolases et des dioxygénases. A cet égard, des études transcriptomiques ont mis en évidence la co-expression des gènes codant pour des CYP450s, des dioxygénases et des GSTs lorsque P. chrysosporium se développe en présence de bois (Thuillier et al., 2014 ; Korripally et al., 2015 ; Kameshwar, Qin, 2017). Dès lors, dans la suite de ces travaux, il serait intéressant d'inclure ces enzymes pour permettre la phase d'activation lors de ces expériences (Figure n°56). Mise à part l'oxydation de molécules pures, cette méthodologie pourrait également s'appliquer à des extraits de bois afin de caractériser des substrats naturels pour les TvGSTOs et les TvGSTXs. A titre d'exemple, dans le cas de TvGSTO1C, les extraits de bois de chêne induisant des effets stabilisateurs pourraient être utilisés dans cette stratégie. A cet égard, des expériences d'oxydation d'une banque d'extraits provenant de bois d'essences tropicales ont été initiées par l'ingénieur d'études Fanny Saïag, et sont actuellement en cours au laboratoire.



Figure n°56 : Stratégie de recherche de substrats pour les TvGSTOs en prenant compte la phase I d'activation du système de détoxication (H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène, GSH : glutathion, CYP450s : cytochromes P450 monooxygénases, DiOxs : dioxygénases, EHs : époxyde hydrolases).

<u>Chapitre III : Similarités fonctionnelles entre les glutathion transférases (GSTs) et les glycosyltransférases (GTs)</u>

Au cours de ce projet de thèse, mes principaux résultats ont mis en évidence la fonction ligandine des TvGSTOs envers des composés provenant de différentes classes de polyphénols. De façon intéressante, aucun substrat naturel conjugué avec une molécule de glutathion n'a pu être observé au cours de ces expériences. Au regard de la littérature, l'absence de molécules glutathionylées a pu être observée que ce soit dans des tissus fongiques ou végétaux (Ververidis et al., 2007). En revanche, les ligands identifiés pendant cette thèse : les benzophénones, les flavonoïdes et les stilbènes sont des molécules sujettes à être conjuguées par d'autres enzymes nommées les glycosyltransférases (GTs).

Les GTs font partie des CAZymes et sont divisées en une centaine de sous-familles (GT1 à GT105, http://www.cazy.org/GlycosylTransferases.html.). Au même titre que les GSTs, les GTs sont des enzymes impliquées dans la phase II de conjugaison du système de détoxication (notamment les sous-familles GT1, GT2, GT4, GT8, GT20, GT35, GT39 et GT48). Ces enzymes peuvent également intervenir lors des processus enzymatiques de dégradation de la biomasse lignocellulosique (Kameshwar, Qin, 2017).

Dans le cadre du système de détoxication, les glycosyltransférases sont capables de catalyser des réactions de glycosylation correspondant à l'ajout d'un groupement glycosidique sur des composés toxiques (Kameshwar, Qin, 2017). Par exemple, les GTs de la sous-famille GT1 utilisent un ose préalablement et généralement activé par une molécule d'uridine diphosphate formant ainsi un ose donneur d'électron. Ce-dernier va être ensuite greffé à des molécules receveuses d'électrons telles que des flavonoïdes ou des alcaloïdes par exemple (Figure n°57A) (Hyung Ko et al., 2006).

De façon intéressante, les GSTs et les GTs partagent des cibles moléculaires communes. Par exemple, la ménadione est une molécule pouvant être spontanément glutathionylée par une molécule de glutathion pour ensuite, être reconnue par des GSTs à cystéine. A l'inverse, certaines GTs chez l'humain, notamment les UDP-glucuronosyltransférases, sont capables de catalyser l'ajout d'un glucuronide dans la structure de la ménadione (Nishiyama et al., 2008). D'autre part, chez les plantes, au même titre que les GSTs, les GTs sont également impliquées dans les voies de biosynthèse des flavonoïdes, en contribuant notamment à leur transport : du cytosol à destination des transporteurs présents dans le tonoplaste afin de permettre leur séquestration dans la vacuole (Zhao, 2015). Par ailleurs, chez la vigne (*Vitis vinifera*), il a été montré que l'une de ses glycosyltransférases est capable de glycosyler les configurations *trans*- et *cis*- du resvératrol (Hall, De Luca, 2007). Par ailleurs, il a été observé chez le manguier, qu'une glycosyltransférase (MiCGT) catalyse l'ajout d'une molécule de glucose sur une benzophénone : la maclurine afin de produire la mangiférine (Chen et al., 2015).

Chez le champignon *T. versicolor*, l'analyse de génomes a indiqué la présence de 19 gènes codant pour des GT1. Comparés à d'autres types trophiques, il apparaît que les gènes codant pour cette sous-famille sont majoritairement retrouvées chez les champignons de pourriture blanche même si quelques exceptions sont possibles (*Hebeloma cylindrosporum* et *Postia placenta*) (Figure n°57B).



Figure n°57 : (A) Schéma de réaction de la glucuronidation (adapté de Ritter et al., 2000). (B) Répartition du nombre de gènes codant des UDP-glucuronosyltransférases (GT1) chez différents champignons sélectionnés. Les nombres de gènes codant des GT1 ont été récupérés à partir des génomes disponibles sur le site du Joint Genome Institute.

Dès lors, l'étude d'une seconde famille multigénique telle que les glycosyltransférases pourraient apporter des informations complémentaires pour déterminer les fonctions physiologiques des GSTs. De plus, la similarité des cibles entre ces deux familles d'enzymes laisse à supposer l'existence d'un processus de régulation entre elles, dans le traitement de composés toxiques que se soit sous forme conjuguée (substrats des GTs) ou non (ligands des GSTs), lors de la phase II du système de détoxication.

Ainsi, le travail mené lors de cette thèse a visé à étudier une famille multigénique d'enzymes, les GSTs, chez un champignon décomposeur de bois. Le caractère étendu des familles multigéniques souligne les processus adaptatifs mis en place par ces organismes pour survivre dans leur environnement. Dans la continuité de ces travaux, l'étude de ces familles permettra de mieux comprendre les pressions de sélection qui s'exercent sur ces organismes et leur adaptation à leur environnement notamment chimique.

Références bibliographiques

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

A

ABBAS, Ahmed, KOC, Hasan, LIU, Feng et TIEN, Ming, 2005. Fungal degradation of wood: initial proteomic analysis of extracellular proteins of Phanerochaete chrysosporium grown on oak substrate. In : *Current Genetics*. janvier 2005. Vol. 47, n° 1, p. 49-56. DOI 10.1007/s00294-004-0550-4.

ADRIAN, Marielle et JEANDET, Philippe, 2012. Effects of resveratrol on the ultrastructure of Botrytis cinerea conidia and biological significance in plant/pathogen interactions. In : *Fitoterapia*. décembre 2012. Vol. 83, n° 8, p. 1345-1350. DOI 10.1016/j.fitote.2012.04.004.

AGGER, Jane W., ISAKSEN, Trine, VÁRNAI, Anikó, VIDAL-MELGOSA, Silvia, WILLATS, William G. T., LUDWIG, Roland, HORN, Svein J., EIJSINK, Vincent G. H. et WESTERENG, Bjørge, 2014. Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 29 avril 2014. Vol. 111, n° 17, p. 6287-6292. DOI 10.1073/pnas.1323629111.

AHMAD, Laziana, RYLOTT, Elizabeth L., BRUCE, Neil C., EDWARDS, Robert et GROGAN, Gideon, 2017. Structural evidence for Arabidopsis glutathione transferase AtGSTF2 functioning as a transporter of small organic ligands. In : *FEBS open bio*. février 2017. Vol. 7, n° 2, p. 122-132. DOI 10.1002/2211-5463.12168.

ALFENITO, M. R., SOUER, E., GOODMAN, C. D., BUELL, R., MOL, J., KOES, R. et WALBOT, V., 1998. Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases. In : *The Plant Cell*. juillet 1998. Vol. 10, n° 7, p. 1135-1149.

ALMÉRAS, Tancrède, GHISLAIN, Barbara, CLAIR, Bruno, SECEROVIC, Amra, PILATE, Gilles et FOURNIER, Meriem, 2018. Quantifying the motor power of trees. In : *Trees*. 1 juin 2018. Vol. 32, n° 3, p. 689-702. DOI 10.1007/s00468-018-1662-7.

ANOUHE, Jean-Baptiste Say, NIAMKÉ, Florence Bobelé, FAUSTIN, Milcard, VIRIEUX, David, PIRAT, Jean-Luc, ADIMA, Augustin Amissa, KATI-COULIBALY, Seraphin et AMUSANT, Nadine, 2018. The role of extractives in the natural durability of the heartwood of Dicorynia guianensis Amsh: new insights in antioxydant and antifungal properties. In : *Annals of Forest Science*. 1 mars 2018. Vol. 75, n° 1, p. 15. DOI 10.1007/s13595-018-0691-0.

ARANTES, Valdeir, MILAGRES, Adriane M. F., FILLEY, Timothy R. et GOODELL, Barry, 2011. Lignocellulosic polysaccharides and lignin degradation by wood decay fungi: the relevance of nonenzymatic Fenton-based reactions. In : *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. avril 2011. Vol. 38, n° 4, p. 541-555. DOI 10.1007/s10295-010-0798-2.

ARMSTRONG, R. N., 1997. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. In: *Chemical Research in Toxicology*. janvier 1997. Vol. 10, n° 1, p. 2-18. DOI 10.1021/tx960072x.

AWAD, H. M., BOERSMA, M. G., VERVOORT, J. et RIETJENS, I. M., 2000. Peroxidase-catalyzed formation of quercetin quinone methide-glutathione adducts. In : *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 15 juin 2000. Vol. 378, n° 2, p. 224-233. DOI 10.1006/abbi.2000.1832.

AYUSO-FERNÁNDEZ, Iván, MARTÍNEZ, Angel T. et RUIZ-DUEÑAS, Francisco J., 2017. Experimental recreation of the evolution of lignin-degrading enzymes from the Jurassic to date. In : *Biotechnology for Biofuels*. 16 mars 2017. Vol. 10, p. 67. DOI 10.1186/s13068-017-0744-x.

AYUSO-FERNÁNDEZ, Iván, RUIZ-DUEÑAS, Francisco J. et MARTÍNEZ, Angel T., 2018. Evolutionary convergence in lignin-degrading enzymes. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 31 mai 2018. p. 201802555. DOI 10.1073/pnas.1802555115.

B

BADIA-FABREGAT, Marina, ROSELL, Mònica, CAMINAL, Glòria, VICENT, Teresa et MARCO-URREA, Ernest, 2014. Use of stable isotope probing to assess the fate of emerging contaminants degraded by white-rot fungus. In: *Chemosphere*. mai 2014. Vol. 103, p. 336-342. DOI 10.1016/j.chemosphere.2013.12.029.

BALDRIAN, Petr et VALÁSKOVÁ, Vendula, 2008. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. In : *FEMS microbiology reviews*. mai 2008. Vol. 32, n° 3, p. 501-521. DOI 10.1111/j.1574-6976.2008.00106.x.

BASSET, Charlie, RODRIGUES, Alice M. S., EPARVIER, Véronique, SILVA, Maria R. R., LOPES, Norberto P., SABATIER, Daniel, FONTY, Emile, ESPINDOLA, Laila S. et STIEN, Didier, 2012. Secondary metabolites from Spirotropis longifolia (DC) Baill and their antifungal activity against human pathogenic fungi. In: *Phytochemistry*. février 2012. Vol. 74, p. 166-172. DOI 10.1016/j.phytochem.2011.10.011.

BEERHUES, Ludger et LIU, Benye, 2009. Biosynthesis of biphenyls and benzophenones--evolution of benzoic acid-specific type III polyketide synthases in plants. In : *Phytochemistry*. novembre 2009. Vol. 70, n° 15-16, p. 1719-1727. DOI 10.1016/j.phytochem.2009.06.017.

BELCHIK, Sara M. et XUN, Luying, 2011. S-glutathionyl-(chloro)hydroquinone reductases: a new class of glutathione transferases functioning as oxidoreductases. In : *Drug Metabolism Reviews*. mai 2011. Vol. 43, n° 2, p. 307-316. DOI 10.3109/03602532.2011.552909.

BLANCHETTE, Robert A, 2000. A review of microbial deterioration found in archaeological wood from different environments. In : *International Biodeterioration & Biodegradation*. 1 octobre 2000. Vol. 46, n° 3, p. 189-204. DOI 10.1016/S0964-8305(00)00077-9.

BLANCHETTE, Robert A., HELD, Benjamin W., JURGENS, Joel A., MCNEW, Douglas L., HARRINGTON, Thomas C., DUNCAN, Shona M. et FARRELL, Roberta L., 2004. Wood-Destroying Soft Rot Fungi in the Historic Expedition Huts of Antarctica. In: *Applied and Environmental Microbiology*. 3 janvier 2004. Vol. 70, n° 3, p. 1328-1335. DOI 10.1128/AEM.70.3.1328-1335.2004.

BLOCK, Helena, MAERTENS, Barbara, SPRIESTERSBACH, Anne, BRINKER, Nicole, KUBICEK, Jan, FABIS, Roland, LABAHN, Jörg et SCHÄFER, Frank, 2009. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. In: *Methods in Enzymology*. 2009. Vol. 463, p. 439-473. DOI 10.1016/S0076-6879(09)63027-5.

BOARD, P. G., COGGAN, M., CHELVANAYAGAM, G., EASTEAL, S., JERMIIN, L. S., SCHULTE, G. K., DANLEY, D. E., HOTH, L. R., GRIFFOR, M. C., KAMATH, A. V., ROSNER, M. H., CHRUNYK, B. A., PERREGAUX, D. E., GABEL, C. A., GEOGHEGAN, K. F. et PANDIT, J., 2000. Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. In : *The Journal of Biological Chemistry*. 11 août 2000. Vol. 275, n° 32, p. 24798-24806. DOI 10.1074/jbc.M001706200.

BOARD, Philip G., 2011. The omega-class glutathione transferases: structure, function, and genetics. In: *Drug Metabolism Reviews*. mai 2011. Vol. 43, n° 2, p. 226-235. DOI 10.3109/03602532.2011.561353.

BOARD, Philip G. et ANDERS, M. W., 2007. Glutathione transferase omega 1 catalyzes the reduction of S-(phenacyl)glutathiones to acetophenones. In : *Chemical Research in Toxicology*. janvier 2007. Vol. 20, n° 1, p. 149-154. DOI 10.1021/tx600305y.

BOARD, Philip G., COGGAN, Marjorie, CAPPELLO, Jean, ZHOU, Huina, OAKLEY, Aaron J. et ANDERS, M. W., 2008. S-(4-Nitrophenacyl)glutathione is a specific substrate for glutathione transferase omega 1-1. In: *Analytical Biochemistry*. 1 mars 2008. Vol. 374, n° 1, p. 25-30. DOI 10.1016/j.ab.2007.09.029.

BOARD, Philip G. et MENON, Deepthi, 2013. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. In : *Biochimica Et Biophysica Acta*. mai 2013. Vol. 1830, n° 5, p. 3267-3288. DOI 10.1016/j.bbagen.2012.11.019.

BOARD, Philip G, TAYLOR, Matthew C, COGGAN, Marjorie, PARKER, Michael W, LANTUM, Hoffman B et ANDERS, M W, 2003. Clarification of the role of key active site residues of glutathione transferase zeta/maleylacetoacetate isomerase by a new spectrophotometric technique. In : *Biochemical Journal*. 15 septembre 2003. Vol. 374, n° Pt 3, p. 731-737. DOI 10.1042/BJ20030625.

BOCEDI, Alessio, FABRINI, Raffaele, FARROTTI, Andrea, STELLA, Lorenzo, KETTERMAN, Albert J., PEDERSEN, Jens Z., ALLOCATI, Nerino, LAU, Peter C. K., GROSSE, Stephan, ELTIS, Lindsay D., RUZZINI, Antonio, EDWARDS, Thomas E., MORICI, Laura, DEL GROSSO, Erica, GUIDONI, Leonardo, BOVI, Daniele, LO BELLO, Mario, FEDERICI, Giorgio, PARKER, Michael W., BOARD, Philip G. et RICCI, Giorgio, 2013. The impact of nitric oxide toxicity on the evolution of the glutathione transferase superfamily: a proposal for an evolutionary driving force. In : *The Journal of Biological Chemistry*. 23 août 2013. Vol. 288, n° 34, p. 24936-24947. DOI 10.1074/jbc.M113.476135.

BOERJAN, Wout, RALPH, John et BAUCHER, Marie, 2003. Lignin biosynthesis. In: *Annual Review of Plant Biology*. 2003. Vol. 54, p. 519-546. DOI 10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938.

BOIVIN, Stephane, KOZAK, Sandra et MEIJERS, Rob, 2013. Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens. In : *Protein Expression and Purification*. octobre 2013. Vol. 91, n° 2, p. 192-206. DOI 10.1016/j.pep.2013.08.002.

BOOTH, J., BOYLAND, E. et SIMS, P., 1961. An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. In : *Biochemical Journal*. juin 1961. Vol. 79, n° 3, p. 516-524.

BOURBONNAIS, R., PAICE, M. G., REID, I. D., LANTHIER, P. et YAGUCHI, M., 1995. Lignin oxidation by laccase isozymes from Trametes versicolor and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. In : *Applied and Environmental Microbiology*. mai 1995. Vol. 61, n° 5, p. 1876-1880.

BOUWS, Henning, WATTENBERG, Andreas et ZORN, Holger, 2008. Fungal secretomes--nature's toolbox for white biotechnology. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*. septembre 2008. Vol. 80, n° 3, p. 381-388. DOI 10.1007/s00253-008-1572-5.

BRESELL, Anders, WEINANDER, Rolf, LUNDQVIST, Gerd, RAZA, Haider, SHIMOJI, Miyuki, SUN, Tie-Hua, BALK, Lennart, WIKLUND, Ronney, ERIKSSON, Jan, JANSSON, Christer, PERSSON, Bengt, JAKOBSSON, Per-Johan et MORGENSTERN, Ralf, 2005. Bioinformatic and enzymatic characterization of the MAPEG superfamily. In : *The FEBS journal*. avril 2005. Vol. 272, n° 7, p. 1688-1703. DOI 10.1111/j.1742-4658.2005.04596.x.

BROCK, Joseph, BOARD, Philip G. et OAKLEY, Aaron J., 2013. Structural insights into omegaclass glutathione transferases: a snapshot of enzyme reduction and identification of a non-catalytic ligandin site. In : *PloS One*. 2013. Vol. 8, n° 4, p. e60324. DOI 10.1371/journal.pone.0060324.

С

CALMES, Benoit, MOREL-ROUHIER, Mélanie, BATAILLÉ-SIMONEAU, Nelly, GELHAYE, Eric, GUILLEMETTE, Thomas et SIMONEAU, Philippe, 2015. Characterization of glutathione transferases involved in the pathogenicity of Alternaria brassicicola. In : *BMC microbiology*. 18 juin 2015. Vol. 15, p. 123. DOI 10.1186/s12866-015-0462-0.

CAMARERO, S., SARKAR, S., RUIZ-DUEÑAS, F. J., MARTÍNEZ, M. J. et MARTÍNEZ, A. T., 1999. Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. In : *The Journal of Biological Chemistry*. 9 avril 1999. Vol. 274, n° 15, p. 10324-10330.

CAMERON, M. D., TIMOFEEVSKI, S. et AUST, S. D., 2000. Enzymology of Phanerochaete chrysosporium with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. In : *Applied Microbiology and Biotechnology*. décembre 2000. Vol. 54, n° 6, p. 751-758.

CANAM, Thomas, DUMONCEAUX, Tim, RECORD, Eric et LI, Yebo, 2013. White-rot fungi: The key to sustainable biofuel production? In: *Biofuels*. 1 mai 2013. Vol. 4, p. 247-250. DOI 10.4155/bfs.13.6.

CARLSON, Alexis, JUSTO, Alfredo et HIBBETT, David S., 2014. Species delimitation in Trametes: a comparison of ITS, RPB1, RPB2 and TEF1 gene phylogenies. In : *Mycologia*. août 2014. Vol. 106, n° 4, p. 735-745. DOI 10.3852/13-275.

CASTRO, F. a. V., HERDEIRO, R. S., PANEK, A. D., ELEUTHERIO, E. C. A. et PEREIRA, M. D., 2007. Menadione stress in Saccharomyces cerevisiae strains deficient in the glutathione transferases. In: *Biochimica Et Biophysica Acta*. février 2007. Vol. 1770, n° 2, p. 213-220. DOI 10.1016/j.bbagen.2006.10.013.

CHABASSE, Dominique, PIHET, Marc et BOUCHARA, Jean-Philippe, 2009. Émergence de nouveaux champignons pathogènes en médecine: revue générale. In : *Revue Francophone des Laboratoires*. 1 novembre 2009. Vol. 2009, n° 416, p. 71-86. DOI 10.1016/S1773-035X(09)70253-9.

CHEN, Bao-Yu, MA, Xiao-Xiao, GUO, Peng-Chao, TAN, Xiang, LI, Wei-Fang, YANG, Jie-Pin, ZHANG, Nan-Nan, CHEN, Yuxing, XIA, Qingyou et ZHOU, Cong-Zhao, 2011. Structure-guided activity restoration of the silkworm glutathione transferase Omega GSTO3-3. In: *Journal of Molecular Biology*. 16 septembre 2011. Vol. 412, n° 2, p. 204-211. DOI 10.1016/j.jmb.2011.07.019.

CHEN, Dawei, CHEN, Ridao, WANG, Ruishan, LI, Jianhua, XIE, Kebo, BIAN, Chuancai, SUN, Lili, ZHANG, Xiaolin, LIU, Jimei, YANG, Lin, YE, Fei, YU, Xiaoming et DAI, Jungui, 2015. Probing the Catalytic Promiscuity of a Regio- and Stereospecific C-Glycosyltransferase from Mangifera indica. In: *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*. 19 octobre 2015. Vol. 54, n° 43, p. 12678-12682. DOI 10.1002/anie.201506505.

CHEN, Shilin, XU, Jiang, LIU, Chang, ZHU, Yingjie, NELSON, David R., ZHOU, Shiguo, LI, Chunfang, WANG, Lizhi, GUO, Xu, SUN, Yongzhen, LUO, Hongmei, LI, Ying, SONG, Jingyuan, HENRISSAT, Bernard, LEVASSEUR, Anthony, QIAN, Jun, LI, Jianqin, LUO, Xiang, SHI, Linchun, HE, Liu, XIANG, Li, XU, Xiaolan, NIU, Yunyun, LI, Qiushi, HAN, Mira V., YAN, Haixia, ZHANG, Jin, CHEN, Haimei, LV, Aiping, WANG, Zhen, LIU, Mingzhu, SCHWARTZ, David C. et SUN, Chao, 2012. Genome sequence of the model medicinal mushroom Ganoderma lucidum. In : *Nature Communications*. 26 juin 2012. Vol. 3, p. 913. DOI 10.1038/ncomms1923.

CHO, Hyun-Young et KONG, Kwang-Hoon, 2007. Study on the biochemical characterization of herbicide detoxification enzyme, glutathione S-transferase. In : *BioFactors (Oxford, England)*. 2007. Vol. 30, n° 4, p. 281-287.

CHOI, J. H., LOU, W. et VANCURA, A., 1998. A novel membrane-bound glutathione S-transferase functions in the stationary phase of the yeast Saccharomyces cerevisiae. In : *The Journal of Biological Chemistry*. 6 novembre 1998. Vol. 273, n° 45, p. 29915-29922.

CHONG, Khim, ROSSALL, Stephen et ATONG, Markus, 2009. In Vitro Antimicrobial Activity and Fungitoxicity of Syringic Acid, Caffeic Acid and 4-hydroxybenzoic Acid against Ganoderma Boninense. In : *Journal of Agricultural Science*. 17 novembre 2009. Vol. 1. DOI 10.5539/jas.v1n2p15.

CIMMPERMAN, Piotras et MATULIS, Daumantas, 2011. Chapter 8:Protein Thermal Denaturation Measurements via a Fluorescent Dye. In : *Biophysical Approaches Determining Ligand Binding to Biomolecular Targets* [en ligne]. S.l. : s.n. p. 247-274. [Consulté le 4 juillet 2018]. Disponible à l'adresse : http://pubs.rsc.org/en/content/chapter/bk9781849730099-00247/978-1-84973-009-9.

COLPA, Dana I., FRAAIJE, Marco W. et VAN BLOOIS, Edwin, 2014. DyP-type peroxidases: a promising and versatile class of enzymes. In : *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. janvier 2014. Vol. 41, n° 1, p. 1-7. DOI 10.1007/s10295-013-1371-6.

COWLING, Ellis Brevier, 1961. Comparative biochemistry of the decay of sweetgum sapwood by white-rot and brown-rot fungi. S.l. : s.n. 1258.

CUMMINS, Ian, DIXON, David P., FREITAG-POHL, Stefanie, SKIPSEY, Mark et EDWARDS, Robert, 2011. Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. In : *Drug Metabolism Reviews*. mai 2011. Vol. 43, n° 2, p. 266-280. DOI 10.3109/03602532.2011.552910.

D

DANIEL, Geoffrey, 1994. Use of electron microscopy for aiding our understanding of wood biodegradation. In: *FEMS Microbiology Reviews*. 1 mars 1994. Vol. 13, n° 2-3, p. 199-233. DOI 10.1111/j.1574-6976.1994.tb00043.x.

DASHTBAN, Mehdi, SCHRAFT, Heidi, SYED, Tarannum A. et QIN, Wensheng, 2010. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. In : *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 23 mai 2010. Vol. 1, n° 1, p. 36-50.

DAVIN, Laurence B. et LEWIS, Norman G., 2003. An historical perspective on lignan biosynthesis: Monolignol, allylphenol and hydroxycinnamic acid coupling and downstream metabolism. In : *Phytochemistry Reviews*. 1 octobre 2003. Vol. 2, n° 3, p. 257. DOI 10.1023/B:PHYT.0000046175.83729.b5.

DAVIS, Carol, CARBERRY, Stephen, SCHRETTL, Markus, SINGH, Ishwar, STEPHENS, John C., BARRY, Sarah M., KAVANAGH, Kevin, CHALLIS, Gregory L., BROUGHAM, Dermot et DOYLE, Sean, 2011. The role of glutathione S-transferase GliG in gliotoxin biosynthesis in Aspergillus fumigatus. In: *Chemistry & Biology*. 22 avril 2011. Vol. 18, n° 4, p. 542-552. DOI 10.1016/j.chembiol.2010.12.022.

DEPONTE, Marcel, 2013. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathionedependent enzymes. In : *Biochimica Et Biophysica Acta*. mai 2013. Vol. 1830, n° 5, p. 3217-3266. DOI 10.1016/j.bbagen.2012.09.018.

DERBSCH, Helmut et SCHMITT, J. A., 1987. *Atlas der Pilze des Saarlandes. Teil 2, Nachweise, Ökologie, Vorkommen und Beschreibungen.* Saarbrücken, Allemagne : Delattinia Fachrichtung Biogeographie Universität des Saarlandes].

DEROY, Aurélie, SAIAG, Fanny, KEBBI-BENKEDER, Zineb, TOUAHRI, Nassim, HECKER, Arnaud, MOREL-ROUHIER, Mélanie, COLIN, Francis, DUMARCAY, Stephane, GÉRARDIN, Philippe et GELHAYE, Eric, 2015. The GSTome Reflects the Chemical Environment of White-Rot Fungi. In : *PloS One*. 2015. Vol. 10, n° 10, p. e0137083. DOI 10.1371/journal.pone.0137083.

DIXON, David P. et EDWARDS, Robert, 2010a. Glutathione Transferases. In : *The Arabidopsis Book* / *American Society of Plant Biologists* [en ligne]. 8 mai 2010. Vol. 8. [Consulté le 27 mai 2018]. DOI 10.1199/tab.0131. Disponible à l'adresse : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3244946/.

DIXON, David P. et EDWARDS, Robert, 2010b. Roles for Stress-inducible Lambda Glutathione Transferases in Flavonoid Metabolism in Plants as Identified by Ligand Fishing. In : *The Journal of Biological Chemistry*. 19 novembre 2010. Vol. 285, n° 47, p. 36322-36329. DOI 10.1074/jbc.M110.164806.

DIXON, David P., LAPTHORN, Adrian et EDWARDS, Robert, 2002. Plant glutathione transferases. In : *Genome Biology*. 2002. Vol. 3, n° 3, p. REVIEWS3004.

DIXON, David P., SELLARS, Jonathan D. et EDWARDS, Robert, 2011. The Arabidopsis phi class glutathione transferase AtGSTF2: binding and regulation by biologically active heterocyclic ligands. In : *The Biochemical Journal*. 15 août 2011. Vol. 438, n° 1, p. 63-70. DOI 10.1042/BJ20101884.

DIXON, David P., SKIPSEY, Mark et EDWARDS, Robert, 2010. Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. In: *Phytochemistry*. mars 2010. Vol. 71, n° 4, p. 338-350. DOI 10.1016/j.phytochem.2009.12.012.

DOWD, C. A., BUCKLEY, C. M. et SHEEHAN, D., 1997. Glutathione S-transferases from the whiterot fungus, Phanerochaete chrysosporium. In : *The Biochemical Journal*. 15 mai 1997. Vol. 324 (Pt 1), p. 243-248.

DUBROVINA, A. S. et KISELEV, K. V., 2017. Regulation of stilbene biosynthesis in plants. In : *Planta*. octobre 2017. Vol. 246, n° 4, p. 597-623. DOI 10.1007/s00425-017-2730-8.
DUCROS, V., BRZOZOWSKI, A. M., WILSON, K. S., BROWN, S. H., OSTERGAARD, P., SCHNEIDER, P., YAVER, D. S., PEDERSEN, A. H. et DAVIES, G. J., 1998. Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from Coprinus cinereus at 2.2 A resolution. In : *Nature Structural Biology*. avril 1998. Vol. 5, n° 4, p. 310-316.

DUPONNOIS, Robin, HAFIDI, Mohamed, NDOYE, Ibrahima, RAMANANKIERANA, Heriniaina et BÂ, Amadou, 2013. Généralités sur la symbiose mycorhizienne : introduction. In : . 1 janvier 2013.

E

EASTWOOD, Daniel C., FLOUDAS, Dimitrios, BINDER, Manfred, MAJCHERCZYK, Andrzej, SCHNEIDER, Patrick, AERTS, Andrea, ASIEGBU, Fred O., BAKER, Scott E., BARRY, Kerrie, BENDIKSBY, Mika, BLUMENTRITT, Melanie, COUTINHO, Pedro M., CULLEN, Dan, DE VRIES, Ronald P., GATHMAN, Allen, GOODELL, Barry, HENRISSAT, Bernard, IHRMARK, Katarina, KAUSERUD, Hävard, KOHLER, Annegret, LABUTTI, Kurt, LAPIDUS, Alla, LAVIN, José L., LEE, Yong-Hwan, LINDQUIST, Erika, LILLY, Walt, LUCAS, Susan, MORIN, Emmanuelle, MURAT, Claude, OGUIZA, José A., PARK, Jongsun, PISABARRO, Antonio G., RILEY, Robert, ROSLING, Anna, SALAMOV, Asaf, SCHMIDT, Olaf, SCHMUTZ, Jeremy, SKREDE, Inger, STENLID, Jan, WIEBENGA, Ad, XIE, Xinfeng, KÜES, Ursula, HIBBETT, David S., HOFFMEISTER, Dirk, HÖGBERG, Nils, MARTIN, Francis, GRIGORIEV, Igor V. et WATKINSON, Sarah C., 2011. The plant cell wall-decomposing machinery underlies the functional diversity of forest fungi. In : *Science (New York, N.Y.)*. 5 août 2011. Vol. 333, n° 6043, p. 762-765. DOI 10.1126/science.1205411.

ENAYATI, A. A., RANSON, H. et HEMINGWAY, J., 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. In: *Insect Molecular Biology*. janvier 2005. Vol. 14, n° 1, p. 3-8. DOI 10.1111/j.1365-2583.2004.00529.x.

ESPEJO, E. et AGOSIN, E., 1991. Production and degradation of oxalic Acid by brown rot fungi. In : *Applied and Environmental Microbiology*. juillet 1991. Vol. 57, n° 7, p. 1980-1986.

F

FALCONE FERREYRA, María L., RIUS, Sebastián P. et CASATI, Paula, 2012. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. In : *Frontiers in Plant Science* [en ligne]. 28 septembre 2012. Vol. 3. [Consulté le 10 mai 2018]. DOI 10.3389/fpls.2012.00222. Disponible à l'adresse : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3460232/.

FERNÁNDEZ-FUEYO, Elena, LINDE, Dolores, ALMENDRAL, David, LÓPEZ-LUCENDO, María F., RUIZ-DUEÑAS, Francisco J. et MARTÍNEZ, Angel T., 2015. Description of the first fungal dyedecolorizing peroxidase oxidizing manganese(II). In: *Applied Microbiology and Biotechnology*. novembre 2015. Vol. 99, n° 21, p. 8927-8942. DOI 10.1007/s00253-015-6665-3. FERNANDEZ-FUEYO, Elena, RUIZ-DUEÑAS, Francisco J., FERREIRA, Patricia, FLOUDAS, Dimitrios, HIBBETT, David S., CANESSA, Paulo, LARRONDO, Luis F., JAMES, Tim Y., SEELENFREUND, Daniela, LOBOS, Sergio, POLANCO, Rubén, TELLO, Mario, HONDA, Yoichi, WATANABE, Takahito, WATANABE, Takashi, RYU, Jae San, SAN, Ryu Jae, KUBICEK, Christian P., SCHMOLL, Monika, GASKELL, Jill, HAMMEL, Kenneth E., ST JOHN, Franz J., VANDEN WYMELENBERG, Amber, SABAT, Grzegorz, SPLINTER BONDURANT, Sandra, SYED, Khajamohiddin, YADAV, Jagjit S., DODDAPANENI, Harshavardhan, SUBRAMANIAN, Venkataramanan, LAVÍN, José L., OGUIZA, José A., PEREZ, Gumer, PISABARRO, Antonio G., RAMIREZ, Lucia, SANTOYO, Francisco, MASTER, Emma, COUTINHO, Pedro M., HENRISSAT, Bernard, LOMBARD, Vincent, MAGNUSON, Jon Karl, KÜES, Ursula, HORI, Chiaki, IGARASHI, Kiyohiko, SAMEJIMA, Masahiro, HELD, Benjamin W., BARRY, Kerrie W., LABUTTI, Kurt M., LAPIDUS, Alla, LINDOUIST, Erika A., LUCAS, Susan M., RILEY, Robert, SALAMOV, Asaf A., HOFFMEISTER, Dirk, SCHWENK, Daniel, HADAR, Yitzhak, YARDEN, Oded, DE VRIES, Ronald P., WIEBENGA, Ad, STENLID, Jan, EASTWOOD, Daniel, GRIGORIEV, Igor V., BERKA, Randy M., BLANCHETTE, Robert A., KERSTEN, Phil, MARTINEZ, Angel T., VICUNA, Rafael et CULLEN, Dan, 2012. Comparative genomics of Ceriporiopsis subvermispora and Phanerochaete chrysosporium provide insight into selective ligninolysis. In : Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 3 avril 2012. Vol. 109, nº 14, p. 5458-5463. DOI 10.1073/pnas.1119912109.

FLOUDAS, Dimitrios, BINDER, Manfred, RILEY, Robert, BARRY, Kerrie, BLANCHETTE, Robert A., HENRISSAT, Bernard, MARTÍNEZ, Angel T., OTILLAR, Robert, SPATAFORA, Joseph W., YADAV, Jagjit S., AERTS, Andrea, BENOIT, Isabelle, BOYD, Alex, CARLSON, Alexis, COPELAND, Alex, COUTINHO, Pedro M., DE VRIES, Ronald P., FERREIRA, Patricia, FINDLEY, Keisha, FOSTER, Brian, GASKELL, Jill, GLOTZER, Dylan, GÓRECKI, Paweł, HEITMAN, Joseph, HESSE, Cedar, HORI, Chiaki, IGARASHI, Kiyohiko, JURGENS, Joel A., KALLEN, Nathan, KERSTEN, Phil, KOHLER, Annegret, KÜES, Ursula, KUMAR, T. K. Arun, KUO, Alan, LABUTTI, Kurt, LARRONDO, Luis F., LINDQUIST, Erika, LING, Albee, LOMBARD, Vincent, LUCAS, Susan, LUNDELL, Taina, MARTIN, Rachael, MCLAUGHLIN, David J., MORGENSTERN, Ingo. MORIN, Emanuelle, MURAT, Claude, NAGY, Laszlo G., NOLAN, Matt, OHM, Robin A., PATYSHAKULIYEVA, Aleksandrina, ROKAS, Antonis, RUIZ-DUEÑAS, Francisco J., SABAT, Grzegorz, SALAMOV, Asaf, SAMEJIMA, Masahiro, SCHMUTZ, Jeremy, SLOT, Jason C., ST JOHN, Franz, STENLID, Jan, SUN, Hui, SUN, Sheng, SYED, Khajamohiddin, TSANG, Adrian, WIEBENGA, Ad, YOUNG, Darcy, PISABARRO, Antonio, EASTWOOD, Daniel C., MARTIN, Francis, CULLEN, Dan, GRIGORIEV, Igor V. et HIBBETT, David S., 2012. The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. In : Science (New York, N.Y.). 29 juin 2012. Vol. 336, n° 6089, p. 1715-1719. DOI 10.1126/science.1221748.

FOX, Ellen M. et HOWLETT, Barbara J., 2008. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. In: *Current Opinion in Microbiology*. décembre 2008. Vol. 11, n° 6, p. 481-487. DOI 10.1016/j.mib.2008.10.007.

FROVA, Carla, 2006. Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. In : *Biomolecular Engineering*. septembre 2006. Vol. 23, n° 4, p. 149-169. DOI 10.1016/j.bioeng.2006.05.020.

FYFE, Paul K., WESTROP, Gareth D., SILVA, Ana Marta, COOMBS, Graham H. et HUNTER, William N., 2012. Leishmania TDR1 structure, a unique trimeric glutathione transferase capable of deglutathionylation and antimonial prodrug activation. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 17 juillet 2012. Vol. 109, n° 29, p. 11693-11698. DOI 10.1073/pnas.1202593109.

G

GABASTON, Julien, RICHARD, Tristan, BIAIS, Benoit, WAFFO-TEGUO, Pierre, PEDROT, Eric, JOURDES, Michaël, CORIO-COSTET, Marie-France et MÉRILLON, Jean-Michel, 2017. Stilbenes from common spruce (Picea abies) bark as natural antifungal agent against downy mildew (Plasmopara viticola). In : *Industrial Crops and Products*. 1 septembre 2017. Vol. 103, p. 267-273. DOI 10.1016/j.indcrop.2017.04.009.

GABRIEL, Jiří et ŠVEC, Karel, 2017. Occurrence of indoor wood decay basidiomycetes in Europe. In: *Fungal Biology Reviews*. 1 septembre 2017. Vol. 31, n° 4, p. 212-217. DOI 10.1016/j.fbr.2017.05.002.

GALATI, G., CHAN, T., WU, B. et O'BRIEN, P. J., 1999. Glutathione-dependent generation of reactive oxygen species by the peroxidase-catalyzed redox cycling of flavonoids. In : *Chemical Research in Toxicology*. juin 1999. Vol. 12, n° 6, p. 521-525. DOI 10.1021/tx980271b.

GARCERÁ, Ana, BARRETO, Lina, PIEDRAFITA, Lidia, TAMARIT, Jordi et HERRERO, Enrique, 2006. Saccharomyces cerevisiae cells have three Omega class glutathione S-transferases acting as 1-Cys thiol transferases. In : *The Biochemical Journal*. 1 septembre 2006. Vol. 398, n° 2, p. 187-196. DOI 10.1042/BJ20060034.

GEORGAKIS, Nikolaos D., KARAGIANNOPOULOS, Dionisis A., THIREOU, Trias N., ELIOPOULOS, Elias E., LABROU, Nikolaos E., TSOUNGAS, Petros G., KOUTSILIERIS, Michael N. et CLONIS, Yannis D., 2017. Concluding the trilogy: The interaction of 2,2'-dihydroxybenzophenones and their carbonyl N-analogues with human glutathione transferase M1-1 face to face with the P1-1 and A1-1 isoenzymes involved in MDR. In : *Chemical Biology & Drug Design*. novembre 2017. Vol. 90, n° 5, p. 900-908. DOI 10.1111/cbdd.13011.

GERSHENZON, Jonathan et DUDAREVA, Natalia, 2007. The function of terpene natural products in the natural world. In: *Nature Chemical Biology*. juillet 2007. Vol. 3, n° 7, p. 408-414. DOI 10.1038/nchembio.2007.5.

GEU-FLORES, Fernando, MØLDRUP, Morten Emil, BÖTTCHER, Christoph, OLSEN, Carl Erik, SCHEEL, Dierk et HALKIER, Barbara Ann, 2011. Cytosolic γ -glutamyl peptidases process glutathione conjugates in the biosynthesis of glucosinolates and camalexin in Arabidopsis. In : *The Plant Cell.* juin 2011. Vol. 23, n° 6, p. 2456-2469. DOI 10.1105/tpc.111.083998.

GILBERTSON, Robert, 1980. Wood-Rotting Fungi of North America. In : *Mycologia*. 1 janvier 1980. Vol. 72. DOI 10.2307/3759417.

GIL-RAMÍREZ, Alicia, PAVO-CABALLERO, Cristina, BAEZA, Esther, BAENAS, Nieves, GARCIA-VIGUERA, Cristina, MARÍN, Francisco R. et SOLER-RIVAS, Cristina, 2016. Mushrooms do not contain flavonoids. In : *Journal of Functional Foods*. 1 août 2016. Vol. 25, p. 1-13. DOI 10.1016/j.jff.2016.05.005.

GLENN, J. K., MORGAN, M. A., MAYFIELD, M. B., KUWAHARA, M. et GOLD, M. H., 1983. An extracellular H2O2-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. In : *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 12 août 1983. Vol. 114, n° 3, p. 1077-1083.

GOMEZ, Camila, CONEJERO, Geneviève, TORREGROSA, Laurent, CHEYNIER, Véronique, TERRIER, Nancy et AGEORGES, Agnès, 2011. In vivo grapevine anthocyanin transport involves vesicle-mediated trafficking and the contribution of anthoMATE transporters and GST. In : *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. septembre 2011. Vol. 67, n° 6, p. 960-970. DOI 10.1111/j.1365-313X.2011.04648.x.

GREEN, Abigail R., HAYES, Robert P., XUN, Luying et KANG, ChulHee, 2012. Structural understanding of the glutathione-dependent reduction mechanism of glutathionyl-hydroquinone reductases. In: *The Journal of Biological Chemistry*. 19 octobre 2012. Vol. 287, n° 43, p. 35838-35848. DOI 10.1074/jbc.M112.395541.

GREEN, Frederick, A KUSTER, Thomas et L HIGHLEY, Terry, 1996. Pectin degradation during colonization of wood by brown-rot fungi. In : *Recent Research Developments in Plant Pathology*. 1 janvier 1996. Vol. 1.

GRKOVIC, Steve, BROWN, Melissa H. et SKURRAY, Ronald A., 2002. Regulation of bacterial drug export systems. In : *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*. décembre 2002. Vol. 66, n° 4, p. 671-701.

GULSHAN, Kailash et MOYE-ROWLEY, W. Scott, 2007. Multidrug Resistance in Fungi. In : *Eukaryotic Cell*. 11 janvier 2007. Vol. 6, n° 11, p. 1933-1942. DOI 10.1128/EC.00254-07.

Η

HALL, Dawn et DE LUCA, Vincenzo, 2007. Mesocarp localization of a bi-functional resveratrol/hydroxycinnamic acid glucosyltransferase of Concord grape (Vitis labrusca). In : *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. février 2007. Vol. 49, n° 4, p. 579-591. DOI 10.1111/j.1365-313X.2006.02987.x.

HAMMEL, K E, 1995. Mechanisms for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by ligninolytic fungi. In : *Environmental Health Perspectives*. juin 1995. Vol. 103, n° Suppl 5, p. 41-43.

HAMMEL, Kenneth E. et CULLEN, Dan, 2008. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. In: *Current Opinion in Plant Biology*. juin 2008. Vol. 11, n° 3, p. 349-355. DOI 10.1016/j.pbi.2008.02.003.

HAMMEL, Kenneth, KAPICH, Alexander, A. JENSEN, Kenneth et RYAN, Zachary, 2002. Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. In : *Enzyme and Microbial Technology*. 1 avril 2002. Vol. 30, p. 445-453. DOI 10.1016/S0141-0229(02)00011-X.

HARMS, Hauke, SCHLOSSER, Dietmar et WICK, Lukas Y., 2011. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. In : *Nature Reviews. Microbiology.* mars 2011. Vol. 9, n° 3, p. 177-192. DOI 10.1038/nrmicro2519.

HATAKKA, Annele et HAMMEL, Kenneth E., 2011. Fungal Biodegradation of Lignocelluloses. In : *Industrial Applications* [en ligne]. S.I.: Springer, Berlin, Heidelberg. The Mycota. p. 319-340. [Consulté le 15 mai 2018]. ISBN 978-3-642-11457-1. Disponible à l'adresse : https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-11458-8_15.

HAYES, John D., FLANAGAN, Jack U. et JOWSEY, Ian R., 2005. Glutathione transferases. In: *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2005. Vol. 45, p. 51-88. DOI 10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857.

HEMSWORTH, Glyn R., JOHNSTON, Esther M., DAVIES, Gideon J. et WALTON, Paul H., 2015. Lytic Polysaccharide Monooxygenases in Biomass Conversion. In : *Trends in Biotechnology*. décembre 2015. Vol. 33, n° 12, p. 747-761. DOI 10.1016/j.tibtech.2015.09.006.

HINER, Alexander N. P., HERNÁNDEZ-RUIZ, Josefa, RODRÍGUEZ-LÓPEZ, José Neptuno, GARCÍA-CÁNOVAS, Francisco, BRISSET, Nigel C., SMITH, Andrew T., ARNAO, Marino B. et ACOSTA, Manuel, 2002. Reactions of the class II peroxidases, lignin peroxidase and Arthromyces ramosus peroxidase, with hydrogen peroxide. Catalase-like activity, compound III formation, and enzyme inactivation. In: *The Journal of Biological Chemistry*. 26 juillet 2002. Vol. 277, n° 30, p. 26879-26885. DOI 10.1074/jbc.M200002200.

HIROSUE, Shinji, TAZAKI, Masahiro, HIRATSUKA, Nobuhiro, YANAI, Satoshi, KABUMOTO, Hiroki, SHINKYO, Raku, ARISAWA, Akira, SAKAKI, Toshiyuki, TSUNEKAWA, Hiroshi, JOHDO, Osamu, ICHINOSE, Hirofumi et WARIISHI, Hiroyuki, 2011. Insight into functional diversity of cytochrome P450 in the white-rot basidiomycete Phanerochaete chrysosporium: involvement of versatile monooxygenase. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1 avril 2011. Vol. 407, n° 1, p. 118-123. DOI 10.1016/j.bbrc.2011.02.121.

HOFRICHTER, Martin, 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). In: *Enzyme and Microbial Technology*. 16 avril 2002. Vol. 30, n° 4, p. 454-466. DOI 10.1016/S0141-0229(01)00528-2.

HOFRICHTER, Martin, ULLRICH, René, PECYNA, Marek J., LIERS, Christiane et LUNDELL, Taina, 2010. New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. In : *Applied Microbiology and Biotechnology*. juillet 2010. Vol. 87, n° 3, p. 871-897. DOI 10.1007/s00253-010-2633-0.

HUANG, Yan, XUN, Randy, CHEN, Guanjun et XUN, Luying, 2008. Maintenance role of a glutathionyl-hydroquinone lyase (PcpF) in pentachlorophenol degradation by Sphingobium chlorophenolicum ATCC 39723. In: *Journal of Bacteriology*. décembre 2008. Vol. 190, n° 23, p. 7595-7600. DOI 10.1128/JB.00489-08.

HUSARCÍKOVÁ, Jana, VOB, Hauke, DOMÍNGUEZ DE MARÍA, Pablo et SCHALLMEY, Anett, 2018. Microbial β -etherases and glutathione lyases for lignin valorisation in biorefineries: current state and future perspectives. In : *Applied Microbiology and Biotechnology*. 4 mai 2018. DOI 10.1007/s00253-018-9040-3.

HYUNG KO, Jae, GYU KIM, Bong et JOONG-HOON, Ahn, 2006. Glycosylation of flavonoids with a glycosyltransferase from Bacillus cereus. In : *FEMS microbiology letters*. mai 2006. Vol. 258, n° 2, p. 263-268. DOI 10.1111/j.1574-6968.2006.00226.x.

Ι

ICHINOSE, Hirofumi, 2013. Cytochrome P450 of wood-rotting basidiomycetes and biotechnological applications. In : *Biotechnology and Applied Biochemistry*. février 2013. Vol. 60, n° 1, p. 71-81. DOI 10.1002/bab.1061.

IDE, Masamichi, ICHINOSE, Hirofumi et WARIISHI, Hiroyuki, 2012. Molecular identification and functional characterization of cytochrome P450 monooxygenases from the brown-rot basidiomycete Postia placenta. In: *Archives of Microbiology*. avril 2012. Vol. 194, n° 4, p. 243-253. DOI 10.1007/s00203-011-0753-2.

J

JANCOVA, Petra, ANZENBACHER, Pavel et ANZENBACHEROVA, Eva, 2010. Phase II drug metabolizing enzymes. S.l.: s.n.

JANJUŠEVIĆ, Ljiljana, KARAMAN, Maja, ŠIBUL, Filip, TOMMONARO, Giuseppina, IODICE, Carmine, JAKOVLJEVIĆ, Dragica et PEJIN, Boris, 2017. The lignicolous fungus Trametes versicolor (L.) Lloyd (1920): a promising natural source of antiradical and AChE inhibitory agents. In : *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. décembre 2017. Vol. 32, n° 1, p. 355-362. DOI 10.1080/14756366.2016.1252759.

JANTAN, Ibrahim et SAPUTRI, Fadlina Chany, 2012. Benzophenones and xanthones from Garcinia cantleyana var. cantleyana and their inhibitory activities on human low-density lipoprotein oxidation and platelet aggregation. In: *Phytochemistry*. août 2012. Vol. 80, p. 58-63. DOI 10.1016/j.phytochem.2012.05.003.

JENSEN, K. A., HOUTMAN, C. J., RYAN, Z. C. et HAMMEL, K. E., 2001. Pathways for extracellular Fenton chemistry in the brown rot basidiomycete Gloeophyllum trabeum. In : *Applied and Environmental Microbiology*. juin 2001. Vol. 67, n° 6, p. 2705-2711. DOI 10.1128/AEM.67.6.2705-2711.2001.

JEPPESEN, Mads Gravers, ORTIZ, Pedro, SHEPARD, William, KINZY, Terri Goss, NYBORG, Jens et ANDERSEN, Gregers Rom, 2003. The crystal structure of the glutathione S-transferase-like domain of elongation factor 1Bgamma from Saccharomyces cerevisiae. In : *The Journal of Biological Chemistry*. 21 novembre 2003. Vol. 278, n° 47, p. 47190-47198. DOI 10.1074/jbc.M306630200.

JIN, Mei, ZHOU, Wei, JIN, Chunshi, JIANG, Zhe, DIAO, Shengbao, JIN, Zhehu et LI, Gao, 2018. Anti-inflammatory activities of the chemical constituents isolated from Trametes versicolor. In : *Natural Product Research*. 9 mars 2018. p. 1-4. DOI 10.1080/14786419.2018.1446011.

JONES, Melanie D et SMITH, Sally E, 2004. Exploring functional definitions of mycorrhizas: Are mycorrhizas always mutualisms? In : *Canadian Journal of Botany*. 2004. Vol. 82, n° 8, p. 1089-1109. DOI 10.1139/b04-110.

JUSTO, Alfredo et HIBBETT, David, 2011. Phylogenetic classification of Trametes (Basidiomycota, Polyporales) based on a five-marker dataset. In : *Taxon*. 1 décembre 2011. Vol. 60, p. 1567-1583.

Κ

KAMESHWAR, Ayyappa Kumar Sista et QIN, Wensheng, 2017. Gene expression metadata analysis reveals molecular mechanisms employed by Phanerochaete chrysosporium during lignin degradation and detoxification of plant extractives. In : *Current Genetics*. octobre 2017. Vol. 63, n° 5, p. 877-894. DOI 10.1007/s00294-017-0686-7.

KARAGIANNI, Eleni P., KONTOMINA, Evanthia, DAVIS, Britton, KOTSELI, Barbara, TSIRKA, Theodora, GAREFALAKI, Vasiliki, SIM, Edith, GLENN, Anthony E. et BOUKOUVALA, Sotiria, 2015. Homologues of xenobiotic metabolizing N-acetyltransferases in plant-associated fungi: Novel functions for an old enzyme family. In: *Scientific Reports* [en ligne]. 6 août 2015. Vol. 5. [Consulté le 4 juin 2018]. DOI 10.1038/srep12900. Disponible à l'adresse : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4542470/.

KASAI, Noriyuki, IKUSHIRO, Shinichi, HIROSUE, Shinji, ARISAWA, Akira, ICHINOSE, Hirofumi, UCHIDA, Yujirou, WARIISHI, Hiroyuki, OHTA, Miho et SAKAKI, Toshiyuki, 2010. Atypical kinetics of cytochromes P450 catalysing 3'-hydroxylation of flavone from the white-rot fungus Phanerochaete chrysosporium. In: *Journal of Biochemistry*. janvier 2010. Vol. 147, n° 1, p. 117-125. DOI 10.1093/jb/mvp155.

KEBBI-BENKEDER, Zineb, COLIN, Francis, DUMARÇAY, Stéphane et GÉRARDIN, Philippe, 2015. Quantification and characterization of knotwood extractives of 12 European softwood and hardwood species. In: *Annals of Forest Science*. 1 mars 2015. Vol. 72, n° 2, p. 277-284. DOI 10.1007/s13595-014-0428-7.

KEPPLER, D., 1999. Export pumps for glutathione S-conjugates. In: *Free Radical Biology & Medicine*. novembre 1999. Vol. 27, n° 9-10, p. 985-991.

KHANBABAEE, K. et VAN REE, T., 2001. Tannins: classification and definition. In : *Natural Product Reports*. décembre 2001. Vol. 18, n° 6, p. 641-649.

KIM, Jaekwang, SUH, Hyunsuk, KIM, Songhee, KIM, Kiyoung, AHN, Chiyoung et YIM, Jeongbin, 2006. Identification and characteristics of the structural gene for the Drosophila eye colour mutant sepia, encoding PDA synthase, a member of the Omega class glutathione S-transferases. In : *Biochemical Journal*. 15 septembre 2006. Vol. 398, n° Pt 3, p. 451-460. DOI 10.1042/BJ20060424.

KIM, S. J. et SHODA, M., 1999. Purification and characterization of a novel peroxidase from Geotrichum candidum dec 1 involved in decolorization of dyes. In : *Applied and Environmental Microbiology*. mars 1999. Vol. 65, n° 3, p. 1029-1035.

KIRKER, G. T., BLODGETT, A. B., ARANGO, R. A., LEBOW, P. K. et CLAUSEN, C. A., 2013. The role of extractives in naturally durable wood species. In : *International Biodeterioration & Biodegradation*. 1 août 2013. Vol. 82, p. 53-58. DOI 10.1016/j.ibiod.2013.03.007.

KITAMURA, Satoshi, SHIKAZONO, Naoya et TANAKA, Atsushi, 2004. TRANSPARENT TESTA 19 is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in Arabidopsis. In : *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. janvier 2004. Vol. 37, n° 1, p. 104-114.

KOBAYASHI, S., KIDOU, S. et EJIRI, S., 2001. Detection and Characterization of Glutathione S-Transferase Activity in Rice EF-1 $\beta\beta'\gamma$ and EF-1 γ Expressed in Escherichia coli. In : *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2 novembre 2001. Vol. 288, n° 3, p. 509-514. DOI 10.1006/bbrc.2001.5799.

KONTUR, Wayne S., BINGMAN, Craig A., OLMSTED, Charles N., WASSARMAN, Douglas R., ULBRICH, Arne, GALL, Daniel L., SMITH, Robert W., YUSKO, Larissa M., FOX, Brian G., NOGUERA, Daniel R., COON, Joshua J. et DONOHUE, Timothy J., 2018. Novosphingobium aromaticivorans uses a Nu-class glutathione S-transferase as a glutathione lyase in breaking the β -aryl ether bond of lignin. In : *The Journal of Biological Chemistry*. 6 avril 2018. Vol. 293, n° 14, p. 4955-4968. DOI 10.1074/jbc.RA117.001268.

KORRIPALLY, Premsagar, HUNT, Chris, J HOUTMAN, Carl, C JONES, Don, KITIN, Peter, CULLEN, Dan et E HAMMEL, Kenneth, 2015. Regulation of Gene Expression during the Onset of Ligninolytic Oxidation by Phanerochaete chrysosporium on Spruce Wood. In: *Applied and environmental microbiology*. 5 septembre 2015. Vol. 81. DOI 10.1128/AEM.02064-15.

KOZARSKI, Maja, KLAUS, Anita, NIKŠIĆ, Miomir, VRVIĆ, Miroslav M., TODOROVIĆ, Nina, JAKOVLJEVIĆ, Dragica et VAN GRIENSVEN, Leo J. L. D., 2012. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms Ganoderma applanatum, Ganoderma lucidum, Lentinus edodes and Trametes versicolor. In : *Journal of Food Composition and Analysis*. 1 mai 2012. Vol. 26, n° 1, p. 144-153. DOI 10.1016/j.jfca.2012.02.004.

KRIEGELSTEINER, J. German, 2000. Die Großpilze Baden-Württembergs Band 1. S.l.: s.n.

KUBO, Isao, NIHEI, Ken-ichi et SHIMIZU, Kuniyoshi, 2004. Oxidation products of quercetin catalyzed by mushroom tyrosinase. In : *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 15 octobre 2004. Vol. 12, n° 20, p. 5343-5347. DOI 10.1016/j.bmc.2004.07.050.

KUYPER, Arnolds, 1995. *Overzicht van de paddestoelen in Nederland* [en ligne]. S.l.: s.n. [Consulté le 14 mai 2018]. Disponible à l'adresse : http://www.mycologen.nl/Boeken/Overzicht.html.

L

LALLEMENT, Pierre-Alexandre, BROUWER, Bastiaan, KEECH, Olivier, HECKER, Arnaud et ROUHIER, Nicolas, 2014. The still mysterious roles of cysteine-containing glutathione transferases in plants. In : *Frontiers in Pharmacology* [en ligne]. 20 août 2014. Vol. 5. [Consulté le 27 mai 2018]. DOI 10.3389/fphar.2014.00192. Disponible à l'adresse : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4138524/.

LALLEMENT, Pierre-Alexandre, MEUX, Edgar, GUALBERTO, José M., DUMARCAY, Stéphane, FAVIER, Frédérique, DIDIERJEAN, Claude, SAUL, Frederick, HAOUZ, Ahmed, MOREL-ROUHIER, Mélanie, GELHAYE, Eric, ROUHIER, Nicolas et HECKER, Arnaud, 2015. Glutathionyl-hydroquinone reductases from poplar are plastidial proteins that deglutathionylate both reduced and oxidized glutathionylated quinones. In : *FEBS letters*. 2 janvier 2015. Vol. 589, n° 1, p. 37-44. DOI 10.1016/j.febslet.2014.11.021.

LALLEMENT, Pierre-Alexandre, MEUX, Edgar, GUALBERTO, José M., PROSPER, Pascalita, DIDIERJEAN, Claude, SAUL, Frederick, HAOUZ, Ahmed, ROUHIER, Nicolas et HECKER, Arnaud, 2014. Structural and enzymatic insights into Lambda glutathione transferases from Populus trichocarpa, monomeric enzymes constituting an early divergent class specific to terrestrial plants. In : *The Biochemical Journal*. 15 août 2014. Vol. 462, n° 1, p. 39-52. DOI 10.1042/BJ20140390.

LAM, L. K. Metthew, ZHANG, Zhicheng, BOARD, Philip G. et XUN, Luying, 2012. Reduction of benzoquinones to hydroquinones via spontaneous reaction with glutathione and enzymatic reaction by S-glutathionyl-hydroquinone reductases. In : *Biochemistry*. 26 juin 2012. Vol. 51, n° 25, p. 5014-5021. DOI 10.1021/bi300477z.

LAMBLIN, Frédéric, HANO, Christophe, FLINIAUX, Ophélie, MESNARD, François, FLINIAUX, Marc-André et LAINÉ, Éric, 2008. Intérêt des lignanes dans la prévention et le traitement de cancers. In : *médecine/sciences*. mai 2008. Vol. 24, n° 5, p. 511-520. DOI 10.1051/medsci/2008245511.

LAMPING, Erwin, BARET, Philippe V., HOLMES, Ann R., MONK, Brian C., GOFFEAU, Andre et CANNON, Richard D., 2010. Fungal PDR transporters: Phylogeny, topology, motifs and function. In : *Fungal genetics and biology: FG & B.* février 2010. Vol. 47, n° 2, p. 127-142. DOI 10.1016/j.fgb.2009.10.007.

LAN, Ting, YANG, Zhi-Ling, YANG, Xue, LIU, Yan-Jing, WANG, Xiao-Ru et ZENG, Qing-Yin, 2009. Extensive functional diversification of the Populus glutathione S-transferase supergene family. In : *The Plant Cell*. décembre 2009. Vol. 21, n° 12, p. 3749-3766. DOI 10.1105/tpc.109.070219.

LAYTON, Curtis J. et HELLINGA, Homme W., 2011. Quantitation of protein-protein interactions by thermal stability shift analysis. In : *Protein Science: A Publication of the Protein Society*. août 2011. Vol. 20, n° 8, p. 1439-1450. DOI 10.1002/pro.674.

LEA, Wendy A. et SIMEONOV, Anton, 2012. Differential scanning fluorometry signatures as indicators of enzyme inhibitor mode of action: case study of glutathione S-transferase. In : *PloS One*. 2012. Vol. 7, n° 4, p. e36219. DOI 10.1371/journal.pone.0036219.

LEROUX, Pierre et WALKER, Anne-Sophie, 2011. Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of Mycosphaerella graminicola. In : *Pest Management Science*. 1 janvier 2011. Vol. 67, n° 1, p. 44-59. DOI 10.1002/ps.2028.

LIERS, Christiane, BOBETH, Caroline, PECYNA, Marek, ULLRICH, René et HOFRICHTER, Martin, 2010. DyP-like peroxidases of the jelly fungus Auricularia auricula-judae oxidize nonphenolic lignin model compounds and high-redox potential dyes. In : *Applied Microbiology and Biotechnology*. février 2010. Vol. 85, n° 6, p. 1869-1879. DOI 10.1007/s00253-009-2173-7.

LIERS, Christiane, PECYNA, Marek J., KELLNER, Harald, WORRICH, Anja, ZORN, Holger, STEFFEN, Kari T., HOFRICHTER, Martin et ULLRICH, René, 2013. Substrate oxidation by dye-decolorizing peroxidases (DyPs) from wood- and litter-degrading agaricomycetes compared to other fungal and plant heme-peroxidases. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*. juillet 2013. Vol. 97, n° 13, p. 5839-5849. DOI 10.1007/s00253-012-4521-2.

LISTER, Ryan, CARRIE, Chris, DUNCAN, Owen, HO, Lois H. M., HOWELL, Katharine A., MURCHA, Monika W. et WHELAN, James, 2007. Functional definition of outer membrane proteins involved in preprotein import into mitochondria. In : *The Plant Cell*. novembre 2007. Vol. 19, n° 11, p. 3739-3759. DOI 10.1105/tpc.107.050534.

LIU, Suxing, JI, Xinhua, GILLILAND, Gary L., STEVENS, Walter J. et ARMSTRONG, Richard N., 1993. Second-sphere electrostatic effects in the active site of glutathione S-transferase. Observation of an on-face hydrogen bond between the side chain of threonine 13 and the .pi.-cloud of tyrosine 6 and its influence on catalysis. In : *Journal of the American Chemical Society*. 1993. Vol. 115, n° 17, p. 7910-7911. DOI 10.1021/ja00070a060.

LO PRESTI, Libera, LANVER, Daniel, SCHWEIZER, Gabriel, TANAKA, Shigeyuki, LIANG, Liang, TOLLOT, Marie, ZUCCARO, Alga, REISSMANN, Stefanie et KAHMANN, Regine, 2015. Fungal Effectors and Plant Susceptibility. In : *Annual review of plant biology*. 29 avril 2015. Vol. 66, p. 513-45. DOI 10.1146/annurev-arplant-043014-114623.

LUO, Feng, ZHONG, Zixuan, LIU, Li, IGARASHI, Yasuo, XIE, Deti et LI, Nannan, 2017. Metabolomic differential analysis of interspecific interactions among white rot fungi Trametes versicolor, Dichomitus squalens and Pleurotus ostreatus. In : *Scientific Reports*. 13 juillet 2017. Vol. 7, n° 1, p. 5265. DOI 10.1038/s41598-017-05669-3.

Μ

MA, Xiao-Xiao, JIANG, Yong-Liang, HE, Yong-Xing, BAO, Rui, CHEN, Yuxing et ZHOU, Cong-Zhao, 2009. Structures of yeast glutathione-S-transferase Gtt2 reveal a new catalytic type of GST family. In : *EMBO Reports*. 2009. Vol. 10, n° 12, p. 1320-1326. DOI 10.1038/embor.2009.216.

MAAFI, Mounir et AL-QARNI, Mohammed Ahmed, 2018. Φ-order spectrophotokinetic characterisation and quantification of trans-cis oxyresveratrol reactivity, photodegradation and actinometry. In : *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 5 janvier 2018. Vol. 188, p. 64-71. DOI 10.1016/j.saa.2017.06.067.

MACDONALD, Jacqueline, DOERING, Matt, CANAM, Thomas, GONG, Yunchen, GUTTMAN, David S., CAMPBELL, Malcolm M. et MASTER, Emma R., 2011. Transcriptomic Responses of the Softwood-Degrading White-Rot Fungus Phanerochaete carnosa during Growth on Coniferous and Deciduous Wood. In: *Applied and Environmental Microbiology*. 15 mai 2011. Vol. 77, n° 10, p. 3211-3218. DOI 10.1128/AEM.02490-10.

MACRAE, W. Donald et TOWERS, G. H. Neil, 1984. Biological activities of lignans. In : *Phytochemistry*. 14 mai 1984. Vol. 23, n° 6, p. 1207-1220. DOI 10.1016/S0031-9422(00)80428-8.

MAGADULA, Joseph J., KAPINGU, Modest C., BEZABIH, Merhatibeb et ABEGAZ, Berhanu M., 2008. Polyisoprenylated benzophenones from Garcinia semseii (Clusiaceae). In : *Phytochemistry Letters*. 12 décembre 2008. Vol. 1, n° 4, p. 215-218. DOI 10.1016/j.phytol.2008.10.001.

MANAVALAN, Arulmani, ADAV, Sunil S. et SZE, Siu Kwan, 2011. iTRAQ-based quantitative secretome analysis of Phanerochaete chrysosporium. In : *Journal of Proteomics*. 21 décembre 2011. Vol. 75, n° 2, p. 642-654. DOI 10.1016/j.jprot.2011.09.001.

MANNERVIK, B, AWASTHI, Yogesh, G BOARD, P, HAYES, John, DI ILIO, C, KETTERER, B, LISTOWSKY, Irving, MORGENSTERN, Ralf, MURAMATSU, M et PEARSON, William, 1992. Nomenclature for human glutathione S-transferases. In : *The Biochemical journal*. 1 mars 1992. Vol. 282 (Pt 1), p. 305-6. DOI 10.1042/bj2820305.

MANNERVIK, B. et DANIELSON, U. H., 1988. Glutathione transferases--structure and catalytic activity. In : *CRC critical reviews in biochemistry*. 1988. Vol. 23, n° 3, p. 283-337.

MANNERVIK, Bengt, BOARD, Philip G., HAYES, John D., LISTOWSKY, Irving et PEARSON, William R., 2005. Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases. In : *Methods in Enzymology*. 2005. Vol. 401, p. 1-8. DOI 10.1016/S0076-6879(05)01001-3.

MARIANI, Diana, MATHIAS, Cristiane J., DA SILVA, Carmelita G., HERDEIRO, Ricardo da Silva, PEREIRA, Ricardo, PANEK, Anita D., ELEUTHERIO, Elis C. A. et PEREIRA, Marcos Dias, 2008. Involvement of glutathione transferases, Gtt1and Gtt2, with oxidative stress response generated by H2O2 during growth of Saccharomyces cerevisiae. In : *Redox Report: Communications in Free Radical Research*. 2008. Vol. 13, n° 6, p. 246-254. DOI 10.1179/135100008X309028.

MARINOVIĆ, Mila, NOUSIAINEN, Paula, DILOKPIMOL, Adiphol, KONTRO, Jussi, MOORE, Robin, SIPILÄ, Jussi, DE VRIES, Ronald P., MÄKELÄ, Miia R. et HILDÉN, Kristiina, 2018. Selective Cleavage of Lignin β -O-4 Aryl Ether Bond by β -Etherase of the White-Rot Fungus Dichomitus squalens. In : ACS Sustainable Chemistry & Engineering. 5 mars 2018. Vol. 6, n° 3, p. 2878-2882. DOI 10.1021/acssuschemeng.7b03619.

MARSH, May, SHOEMARK, Deborah K., JACOB, Alyssa, ROBINSON, Charles, CAHILL, Brent, ZHOU, Ning-Yi, WILLIAMS, Peter A. et HADFIELD, Andrea T., 2008. Structure of bacterial glutathione-S-transferase maleyl pyruvate isomerase and implications for mechanism of isomerisation. In: *Journal of Molecular Biology*. 5 décembre 2008. Vol. 384, n° 1, p. 165-177. DOI 10.1016/j.jmb.2008.09.028.

MARTINEZ, Diego, CHALLACOMBE, Jean, MORGENSTERN, Ingo, HIBBETT, David, SCHMOLL, Monika, KUBICEK, Christian P., FERREIRA, Patricia, RUIZ-DUENAS, Francisco J., MARTINEZ, Angel T., KERSTEN, Phil, HAMMEL, Kenneth E., VANDEN WYMELENBERG, Amber, GASKELL, Jill, LINDQUIST, Erika, SABAT, Grzegorz, BONDURANT, Sandra Splinter, LARRONDO, Luis F., CANESSA, Paulo, VICUNA, Rafael, YADAV, Jagjit, DODDAPANENI, Harshavardhan, SUBRAMANIAN, Venkataramanan, PISABARRO, Antonio G., LAVÍN, José L., OGUIZA, José A., MASTER, Emma, HENRISSAT, Bernard, COUTINHO, Pedro M., HARRIS, Paul, MAGNUSON, Jon Karl, BAKER, Scott E., BRUNO, Kenneth, KENEALY, William, HOEGGER, Patrik J., KÜES, Ursula, RAMAIYA, Preethi, LUCAS, Susan, SALAMOV, Asaf, SHAPIRO, Harris, TU, Hank, CHEE, Christine L., MISRA, Monica, XIE, Gary, TETER, Sarah, YAVER, Debbie, JAMES, Tim, MOKREJS, Martin, POSPISEK, Martin, GRIGORIEV, Igor V., BRETTIN, Thomas, ROKHSAR, Dan, BERKA, Randy et CULLEN, Dan, 2009. Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus Postia placenta supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. In : Proceedings of the National Academy of Sciences of the States America. 10 février 2009. Vol. 106, n° 6. p. 1954-1959. United of DOI 10.1073/pnas.0809575106.

MARTINEZ, Diego, LARRONDO, Luis F., PUTNAM, Nik, GELPKE, Maarten D. Sollewijn, HUANG, Katherine, CHAPMAN, Jarrod, HELFENBEIN, Kevin G., RAMAIYA, Preethi, DETTER, J. Chris, LARIMER, Frank, COUTINHO, Pedro M., HENRISSAT, Bernard, BERKA, Randy, CULLEN, Dan et ROKHSAR, Daniel, 2004. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus Phanerochaete chrysosporium strain RP78. In : *Nature Biotechnology*. juin 2004. Vol. 22, n° 6, p. 695-700. DOI 10.1038/nbt967.

MARTÍNEZ-MÁRQUEZ, Ascensión, MARTÍNEZ-ESTESO, María J., VILELLA-ANTÓN, María T., SELLÉS-MARCHART, Susana, MORANTE-CARRIEL, Jaime A., HURTADO, Elias, PALAZON, Javier et BRU-MARTÍNEZ, Roque, 2017. A Tau Class Glutathione-S-Transferase is Involved in Trans-Resveratrol Transport Out of Grapevine Cells. In : *Frontiers in Plant Science*. 2017. Vol. 8, p. 1457. DOI 10.3389/fpls.2017.01457.

MARTÍNKOVÁ, L., KOTIK, M., MARKOVÁ, E. et HOMOLKA, L., 2016. Biodegradation of phenolic compounds by Basidiomycota and its phenol oxidases: A review. In : *Chemosphere*. avril 2016. Vol. 149, p. 373-382. DOI 10.1016/j.chemosphere.2016.01.022.

MASAI, Eiji, ICHIMURA, Atsushi, SATO, Yusuke, MIYAUCHI, Keisuke, KATAYAMA, Yoshihiro et FUKUDA, Masao, 2003. Roles of the enantioselective glutathione S-transferases in cleavage of beta-aryl ether. In : *Journal of Bacteriology*. mars 2003. Vol. 185, n° 6, p. 1768-1775.

MATE, Diana M. et ALCALDE, Miguel, 2017. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. In: *Microbial Biotechnology*. novembre 2017. Vol. 10, n° 6, p. 1457-1467. DOI 10.1111/1751-7915.12422.

MATHIEU, Yann, PROSPER, Pascalita, BUÉE, Marc, DUMARÇAY, Stéphane, FAVIER, Frédérique, GELHAYE, Eric, GÉRARDIN, Philippe, HARVENGT, Luc, JACQUOT, Jean-Pierre, LAMANT, Tiphaine, MEUX, Edgar, MATHIOT, Sandrine, DIDIERJEAN, Claude et MOREL, Mélanie, 2012. Characterization of a Phanerochaete chrysosporium glutathione transferase reveals a novel structural and functional class with ligandin properties. In : *The Journal of Biological Chemistry*. 9 novembre 2012. Vol. 287, n° 46, p. 39001-39011. DOI 10.1074/jbc.M112.402776.

MATHIEU, Yann, PROSPER, Pascalita, FAVIER, Frédérique, HARVENGT, Luc, DIDIERJEAN, Claude, JACQUOT, Jean-Pierre, MOREL-ROUHIER, Mélanie et GELHAYE, Eric, 2013. Diversification of fungal specific class a glutathione transferases in saprotrophic fungi. In : *PloS One*. 2013. Vol. 8, n° 11, p. e80298. DOI 10.1371/journal.pone.0080298.

MAUZEROLL, Janine et BARD, Allen J., 2004. Scanning electrochemical microscopy of menadioneglutathione conjugate export from yeast cells. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 25 mai 2004. Vol. 101, n° 21, p. 7862-7867. DOI 10.1073/pnas.0402556101.

MBAKIDI-NGOUABY, Henri, PINAULT, Emilie, GLOAGUEN, Vincent, COSTA, Guy, SOL, Vincent, MILLOT, Marion et MAMBU, Lengo, 2018. Profiling and seasonal variation of chemical constituents from Pseudotsuga menziesii wood. In : *Industrial Crops and Products*. 1 juillet 2018. Vol. 117, p. 34-49. DOI 10.1016/j.indcrop.2018.02.069.

MCCARTHY, D. L., NAVARRETE, S., WILLETT, W. S., BABBITT, P. C. et COPLEY, S. D., 1996. Exploration of the relationship between tetrachlorohydroquinone dehalogenase and the glutathione S-transferase superfamily. In : *Biochemistry*. 19 novembre 1996. Vol. 35, n° 46, p. 14634-14642. DOI 10.1021/bi961730f.

MCCARTHY, Darla L., LOUIE, Donna F. et COPLEY, Shelley D., 1997. Identification of a Covalent Intermediate between Glutathione and Cysteine13 Formed during Catalysis by Tetrachlorohydroquinone Dehalogenase. In : *Journal of the American Chemical Society*. 1 novembre 1997. Vol. 119, n° 46, p. 11337-11338. DOI 10.1021/ja9726365.

MCGOLDRICK, Shane, O'SULLIVAN, Siobhàn M. et SHEEHAN, David, 2005. Glutathione transferase-like proteins encoded in genomes of yeasts and fungi: insights into evolution of a multifunctional protein superfamily. In : *FEMS Microbiology Letters*. 1 janvier 2005. Vol. 242, n° 1, p. 1-12. DOI 10.1016/j.femsle.2004.10.033.

MCTIGUE, M. A., WILLIAMS, D. R. et TAINER, J. A., 1995. Crystal structures of a schistosomal drug and vaccine target: glutathione S-transferase from Schistosoma japonica and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel. In : *Journal of Molecular Biology*. 10 février 1995. Vol. 246, n° 1, p. 21-27.

MENG, Fei, ZHANG, Yuanying, LIU, Feng, GUO, Xingqi et XU, Baohua, 2014. Characterization and mutational analysis of omega-class GST (GSTO1) from Apis cerana cerana, a gene involved in response to oxidative stress. In: *PloS One.* 2014. Vol. 9, n° 3, p. e93100. DOI 10.1371/journal.pone.0093100.

MESTER, T. et FIELD, J. A., 1998. Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by Bjerkandera species strain BOS55 in the absence of manganese. In : *The Journal of Biological Chemistry*. 19 juin 1998. Vol. 273, n° 25, p. 15412-15417.

MEUX, Edgar, MOREL, Mélanie, LAMANT, Tiphaine, GÉRARDIN, Philippe, JACQUOT, Jean-Pierre, DUMARÇAY, Stéphane et GELHAYE, Eric, 2013. New substrates and activity of Phanerochaete chrysosporium Omega glutathione transferases. In : *Biochimie*. février 2013. Vol. 95, n° 2, p. 336-346. DOI 10.1016/j.biochi.2012.10.003.

MEUX, Edgar, PROSPER, Pascalita, MASAI, Eiji, MULLIERT, Guillermo, DUMARÇAY, Stéphane, MOREL, Mélanie, DIDIERJEAN, Claude, GELHAYE, Eric et FAVIER, Frédérique, 2012. Sphingobium sp. SYK-6 LigG involved in lignin degradation is structurally and biochemically related to the glutathione transferase ω class. In : *FEBS letters*. 16 novembre 2012. Vol. 586, n° 22, p. 3944-3950. DOI 10.1016/j.febslet.2012.09.036.

MEUX, Edgar, PROSPER, Pascalita, NGADIN, Andrew, DIDIERJEAN, Claude, MOREL-ROUHIER, Mélanie, DUMARÇAY, Stéphane, LAMANT, Tiphaine, JACQUOT, Jean-Pierre, FAVIER, Frédérique et GELHAYE, Eric, 2010. Glutathione transferases of Phanerochaete chrysosporium: S-glutathionyl-p-hydroquinone reductase belongs to a new structural class. In : *The Journal of biological chemistry*. 1 décembre 2010. Vol. 286, p. 9162-73. DOI 10.1074/jbc.M110.194548.

MIHARA, Rie, BARRY, Karen M., MOHAMMED, Caroline L. et MITSUNAGA, Tohru, 2005. Comparison of antifungal and antioxidant activities of Acacia mangium and A. auriculiformis heartwood extracts. In : *Journal of Chemical Ecology*. avril 2005. Vol. 31, n° 4, p. 789-804.

MOREL, Mélanie, MEUX, Edgar, MATHIEU, Yann, THUILLIER, Anne, CHIBANI, Kamel, HARVENGT, Luc, JACQUOT, Jean-Pierre et GELHAYE, Eric, 2013. Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi. In : *Microbial biotechnology*. mai 2013. Vol. 6, n° 3, p. 248-263. DOI 10.1111/1751-7915.12015.

MOREL, Mélanie, NGADIN, Andrew A., DROUX, Michel, JACQUOT, Jean-Pierre et GELHAYE, Eric, 2009. The fungal glutathione S-transferase system. Evidence of new classes in the wood-degrading basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. In : *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. décembre 2009. Vol. 66, n° 23, p. 3711-3725. DOI 10.1007/s00018-009-0104-5.

MORIDANI, M. Y., SCOBIE, H., SALEHI, P. et O'BRIEN, P. J., 2001. Catechin metabolism: glutathione conjugate formation catalyzed by tyrosinase, peroxidase, and cytochrome p450. In : *Chemical Research in Toxicology*. juillet 2001. Vol. 14, n° 7, p. 841-848.

MORSCHHÄUSER, Joachim, 2010. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. In : *Fungal genetics and biology: FG & B.* février 2010. Vol. 47, n° 2, p. 94-106. DOI 10.1016/j.fgb.2009.08.002.

MOSEDALE, J.R., FEUILLAT, F., BAUMES, R., DUPOUEY, J-L. et PUECH, J-L., [sans date]. Variability of wood extractives among Quercus robur and Quercus petraea trees from mixed stands and their relation to wood anatomy and leaf morphology. In : *Canadian Journal of Forest Research* [en ligne]. [Consulté le 9 mai 2018]. Disponible à l'adresse : http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/x98-066#citart1.

MUELLER, L. A., GOODMAN, C. D., SILADY, R. A. et WALBOT, V., 2000. AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. In : *Plant Physiology*. août 2000. Vol. 123, n° 4, p. 1561-1570.

MULAT, Daniel Girma, LATVA-MÄENPÄÄ, Harri, KOSKELA, Harri, SARANPÄÄ, Pekka et WÄHÄLÄ, Kristiina, 2014. Rapid chemical characterisation of stilbenes in the root bark of Norway spruce by off-line HPLC/DAD-NMR. In : *Phytochemical analysis: PCA*. décembre 2014. Vol. 25, n° 6, p. 529-536. DOI 10.1002/pca.2523.

MUNYAMPUNDU, Jean-Pierre, XU, You-Ping et CAI, Xin-Zhong, 2016. Phi Class of Glutathione S-transferase Gene Superfamily Widely Exists in Nonplant Taxonomic Groups. In : *Evolutionary Bioinformatics Online*. 10 février 2016. Vol. 12, p. 59-71. DOI 10.4137/EBO.S35909.

Ν

NAGY, László G., RILEY, Robert, BERGMANN, Philip J., KRIZSÁN, Krisztina, MARTIN, Francis M., GRIGORIEV, Igor V., CULLEN, Dan et HIBBETT, David S., 2017. Genetic Bases of Fungal White Rot Wood Decay Predicted by Phylogenomic Analysis of Correlated Gene-Phenotype Evolution. In: *Molecular Biology and Evolution*. janvier 2017. Vol. 34, n° 1, p. 35-44. DOI 10.1093/molbev/msw238.

NAKAMURA, Tomofumi, ICHINOSE, Hirofumi et WARIISHI, Hiroyuki, 2012. Flavin-containing monooxygenases from Phanerochaete chrysosporium responsible for fungal metabolism of phenolic compounds. In : *Biodegradation*. juin 2012. Vol. 23, n° 3, p. 343-350. DOI 10.1007/s10532-011-9521-x.

NEACSU, M., EKLUND, P. C., SJÖHOLM, R. E., PIETARINEN, S. P., AHOTUPA, M. O., HOLMBOM, B. R. et WILLFÖR, S. M., 2007. Antioxidant flavonoids from knotwood of Jack pine and European aspen. In: *Holz als Roh- und Werkstoff.* 1 février 2007. Vol. 65, n° 1, p. 1-6. DOI 10.1007/s00107-006-0121-0.

NIGG, M. et BERNIER, L., 2017. Large-scale genomic analyses of invitro yeast-mycelium dimorphism in human, insect and plant pathogenic fungi: From ESTs to RNAseq experiments. In : *Fungal Biology Reviews*. 1 juin 2017. Vol. 31, n° 3, p. 131-142. DOI 10.1016/j.fbr.2017.04.001.

NISHIYAMA, Takahito, OHNUMA, Tomokazu, INOUE, Yuu, KISHI, Takehiko, OGURA, Kenichiro et HIRATSUKA, Akira, 2008. UDP-glucuronosyltransferases 1A6 and 1A10 catalyze reduced menadione glucuronidation. In : *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 27 juin 2008. Vol. 371, n° 2, p. 247-250. DOI 10.1016/j.bbrc.2008.04.040.

0

OAKLEY, A. J., LO BELLO, M., NUCCETELLI, M., MAZZETTI, A. P. et PARKER, M. W., 1999. The ligandin (non-substrate) binding site of human Pi class glutathione transferase is located in the electrophile binding site (H-site). In : *Journal of Molecular Biology*. 27 août 1999. Vol. 291, n° 4, p. 913-926. DOI 10.1006/jmbi.1999.3029.

OAKLEY, Aaron, 2011. Glutathione transferases: a structural perspective. In : *Drug Metabolism Reviews*. mai 2011. Vol. 43, n° 2, p. 138-151. DOI 10.3109/03602532.2011.558093.

OFFEN, Wendy, MARTINEZ-FLEITES, Carlos, YANG, Min, KIAT-LIM, Eng, DAVIS, Benjamin G, TARLING, Chris A, FORD, Christopher M, BOWLES, Dianna J et DAVIES, Gideon J, 2006. Structure of a flavonoid glucosyltransferase reveals the basis for plant natural product modification. In : *The EMBO Journal*. 22 mars 2006. Vol. 25, n° 6, p. 1396-1405. DOI 10.1038/sj.emboj.7600970.

OHM, Robin A., RILEY, Robert, SALAMOV, Asaf, MIN, Byoungnam, CHOI, In-Geol et GRIGORIEV, Igor V., 2014. Genomics of wood-degrading fungi. In : *Fungal genetics and biology: FG & B*. novembre 2014. Vol. 72, p. 82-90. DOI 10.1016/j.fgb.2014.05.001.

OHTA, Yukari, NISHI, Shinro, HASEGAWA, Ryoichi et HATADA, Yuji, 2015. Combination of six enzymes of a marine Novosphingobium converts the stereoisomers of β -O-4 lignin model dimers into the respective monomers. In : *Scientific Reports*. 19 octobre 2015. Vol. 5, p. 15105. DOI 10.1038/srep15105.

O'KEEFFE, Grainne, JÖCHL, Christoph, KAVANAGH, Kevin et DOYLE, Sean, 2013. Extensive proteomic remodeling is induced by eukaryotic translation elongation factor $1B\gamma$ deletion in Aspergillus fumigatus. In : *Protein Science: A Publication of the Protein Society*. novembre 2013. Vol. 22, n° 11, p. 1612-1622. DOI 10.1002/pro.2367.

OSMAN, Wan Hasnidah Wan, LIN, Meng-I., KONDO, Keiko, NAGATA, Takashi et KATAHIRA, Masato, 2018. Characterization of the glutathione S-transferases that belong to the GSTFuA class in Ceriporiopsis subvermispora: Implications in intracellular detoxification and metabolism of wood-derived compounds. In : *International Journal of Biological Macromolecules*. 1 juillet 2018. Vol. 113, p. 1158-1166. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.029.

OSZMIANSKI, Jan et LEE, Chang Y., 1990. Enzymic oxidative reaction of catechin and chlorogenic acid in a model system. In : *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1 mai 1990. Vol. 38, n° 5, p. 1202-1204. DOI 10.1021/jf00095a009.

OTTERBEIN, L., RECORD, E., LONGHI, S., ASTHER, M. et MOUKHA, S., 2000. Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from Pycnoporus cinnabarinus I-937 and expression in Pichia pastoris. In : *European Journal of Biochemistry*. mars 2000. Vol. 267, n° 6, p. 1619-1625.

P

PASTORE, Anna, FEDERICI, Giorgio, BERTINI, Enrico et PIEMONTE, Fiorella, 2003. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. In : *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. 1 juillet 2003. Vol. 333, n° 1, p. 19-39.

PAYNE, Christina M., KNOTT, Brandon C., MAYES, Heather B., HANSSON, Henrik, HIMMEL, Michael E., SANDGREN, Mats, STÅHLBERG, Jerry et BECKHAM, Gregg T., 2015. Fungal cellulases. In: *Chemical Reviews*. 11 février 2015. Vol. 115, n° 3, p. 1308-1448. DOI 10.1021/cr500351c.

PÉGEOT, Henri, KOH, Cha San, PETRE, Benjamin, MATHIOT, Sandrine, DUPLESSIS, Sébastien, HECKER, Arnaud, DIDIERJEAN, Claude et ROUHIER, Nicolas, 2014. The poplar Phi class glutathione transferase: expression, activity and structure of GSTF1. In : *Frontiers in Plant Science* [en ligne]. 23 décembre 2014. Vol. 5. [Consulté le 25 mai 2018]. DOI 10.3389/fpls.2014.00712. Disponible à l'adresse : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4274894/.

PÉGEOT, Henri, MATHIOT, Sandrine, PERROT, Thomas, GENSE, Frédéric, HECKER, Arnaud, DIDIERJEAN, Claude et ROUHIER, Nicolas, 2017. Structural plasticity among glutathione transferase Phi members: natural combination of catalytic residues confers dual biochemical activities. In : *The FEBS journal*. 2017. Vol. 284, n° 15, p. 2442-2463. DOI 10.1111/febs.14138.

PÉREZ, J., MUÑOZ-DORADO, J., DE LA RUBIA, T. et MARTÍNEZ, J., 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. In: *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*. juin 2002. Vol. 5, n° 2, p. 53-63. DOI 10.1007/s10123-002-0062-3.

PETTERSEN, Roger, 1984. The Chemical Composition of Wood. In : *The Chemistry of Solid Wood* [en ligne]. S.l.: American Chemical Society. Advances in Chemistry, 207. p. 57-126. [Consulté le 3 juin 2018]. ISBN 978-0-8412-0796-7. Disponible à l'adresse : https://doi.org/10.1021/ba-1984-0207.ch002.

PIETARINEN, Suvi P., WILLFÖR, Stefan M., VIKSTRÖM, Frank A. et HOLMBOM, Bjarne R., 2006. Aspen Knots, a Rich Source of Flavonoids. In : *Journal of Wood Chemistry and Technology*. 2006. Vol. 26, n° 3, p. 245-258. DOI 10.1080/02773810601023487.

PIONTEK, K., GLUMOFF, T. et WINTERHALTER, K., 1993. Low pH crystal structure of glycosylated lignin peroxidase from Phanerochaete chrysosporium at 2.5 A resolution. In: *FEBS letters*. 4 janvier 1993. Vol. 315, n° 2, p. 119-124.

PÓCSI, István, PRADE, Rolf A. et PENNINCKX, Michel J., 2004. Glutathione, altruistic metabolite in fungi. In: *Advances in Microbial Physiology*. 2004. Vol. 49, p. 1-76. DOI 10.1016/S0065-2911(04)49001-8.

POINTING, S. B., 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. In : *Applied Microbiology* and *Biotechnology*. octobre 2001. Vol. 57, n° 1-2, p. 20-33.

POLLEGIONI, Loredano, TONIN, Fabio et ROSINI, Elena, 2015. Lignin-degrading enzymes. In : *The FEBS journal*. avril 2015. Vol. 282, n° 7, p. 1190-1213. DOI 10.1111/febs.13224.

POP, Raluca M., PUIA, Ion Cosmin, PUIA, Aida, CHEDEA, Veronica S., LEOPOLD, Nicolae, BOCSAN, Ioana C. et BUZOIANU, Anca D., 2018. Characterization of Trametes versicolor: Medicinal Mushroom with Important Health Benefits. In : *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 16 mars 2018. Vol. 46, n° 2, p. 343-349. DOI 10.15835/nbha46211132.

PÜHSE, Matthias, SZWEDA, Renate T., MA, Yingying, JEWORREK, Christoph, WINTER, Roland et ZORN, Holger, 2009. Marasmius scorodonius extracellular dimeric peroxidase - exploring its temperature and pressure stability. In : *Biochimica Et Biophysica Acta*. juillet 2009. Vol. 1794, n° 7, p. 1091-1098. DOI 10.1016/j.bbapap.2009.03.015.

R

RABINOVICH, Mikhail, BOLOBOVA, AV et G. VASIL'CHENKO, L, 2004. Fungal Decomposition of Natural Aromatic Structures and Xenobiotics: A Review. In: *Applied Biochemistry and Microbiology*. 1 janvier 2004. Vol. 40, p. 1-17. DOI 10.1023/B:ABIM.0000010343.73266.08.

RAI, Rajendra, TATE, Jennifer J. et COOPER, Terrance G., 2003. Ure2, a Prion Precursor with Homology to Glutathione S-Transferase, Protects Saccharomyces cerevisiae Cells from Heavy Metal Ion and Oxidant Toxicity. In : *The Journal of biological chemistry*. 11 avril 2003. Vol. 278, n° 15, p. 12826-12833. DOI 10.1074/jbc.M212186200.

RANE, Rahul V., WALSH, Tom K., PEARCE, Stephen L., JERMIIN, Lars S., GORDON, Karl Hj, RICHARDS, Stephen et OAKESHOTT, John G., 2016. Are feeding preferences and insecticide resistance associated with the size of detoxifying enzyme families in insect herbivores? In: *Current Opinion in Insect Science*. février 2016. Vol. 13, p. 70-76. DOI 10.1016/j.cois.2015.12.001.

REDDY, G. V. et GOLD, M. H., 1999. A two-component tetrachlorohydroquinone reductive dehalogenase system from the lignin-degrading basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. In : *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 21 avril 1999. Vol. 257, n° 3, p. 901-905. DOI 10.1006/bbrc.1999.0561.

REDDY, G. Vijay Bhasker et GOLD, Michael H., 2000. Degradation of pentachlorophenol by Phanerochaete chrysosporium: intermediates and reactions involved. In : *Microbiology*. 2000. Vol. 146, n° 2, p. 405-413. DOI 10.1099/00221287-146-2-405.

RILEY, Robert, SALAMOV, Asaf A., BROWN, Daren W., NAGY, Laszlo G., FLOUDAS, Dimitrios, HELD, Benjamin W., LEVASSEUR, Anthony, LOMBARD, Vincent, MORIN, Emmanuelle, OTILLAR, Robert, LINDQUIST, Erika A., SUN, Hui, LABUTTI, Kurt M., SCHMUTZ, Jeremy, JABBOUR, Dina, LUO, Hong, BAKER, Scott E., PISABARRO, Antonio G., WALTON, Jonathan D., BLANCHETTE, Robert A., HENRISSAT, Bernard, MARTIN, Francis, CULLEN, Dan, HIBBETT, David S. et GRIGORIEV, Igor V., 2014. Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 8 juillet 2014. Vol. 111, n° 27, p. 9923-9928. DOI 10.1073/pnas.1400592111.

ROAT, Chetana et SARAF, Meenu, 2015. Stilbenes: Chemistry and Pharmacological properties. In : *Journal of Applied Pharmaceutical Research* [en ligne]. 2015. Vol. 3. [Consulté le 9 mai 2018]. Disponible à l'adresse : https://japtronline.com/index.php/JOAPR/article/view/60.

RORET, Thomas, THUILLIER, Anne, FAVIER, Frédérique, GELHAYE, Eric, DIDIERJEAN, Claude et MOREL-ROUHIER, Mélanie, 2015. Evolutionary divergence of Ure2pA glutathione transferases in wood degrading fungi. In : *Fungal genetics and biology: FG & B*. octobre 2015. Vol. 83, p. 103-112. DOI 10.1016/j.fgb.2015.09.002.

RUBIO, Marcelo Ventura, ZUBIETA, Mariane Paludetti, FRANCO CAIRO, João Paulo Lourenço, CALZADO, Felipe, PAES LEME, Adriana Franco, SQUINA, Fabio Marcio, PRADE, Rolf Alexander et DE LIMA DAMÁSIO, André Ricardo, 2016. Mapping N-linked glycosylation of carbohydrate-active enzymes in the secretome of Aspergillus nidulans grown on lignocellulose. In : *Biotechnology for Biofuels*. 8 août 2016. Vol. 9, p. 168. DOI 10.1186/s13068-016-0580-4.

RUIZ-DUEÑAS, Francisco J., MORALES, María, GARCÍA, Eva, MIKI, Yuta, MARTÍNEZ, María Jesús et MARTÍNEZ, Angel T., 2009. Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. In : *Journal of Experimental Botany*. 2009. Vol. 60, n° 2, p. 441-452. DOI 10.1093/jxb/ern261.

RYAN, Daniel, LEUKES, Winton et BURTON, Stephanie, 2007. Improving the bioremediation of phenolic wastewaters by Trametes versicolor. In : *Bioresource Technology*. février 2007. Vol. 98, n° 3, p. 579-587. DOI 10.1016/j.biortech.2006.02.001.

RYTIOJA, Johanna, HILDÉN, Kristiina, YUZON, Jennifer, HATAKKA, Annele, DE VRIES, Ronald P. et MÄKELÄ, Miia R., 2014. Plant-polysaccharide-degrading enzymes from Basidiomycetes. In : *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*. décembre 2014. Vol. 78, n° 4, p. 614-649. DOI 10.1128/MMBR.00035-14.

S

SALVACHÚA, Davinia, PRIETO, Alicia, MARTÍNEZ, Ángel T. et MARTÍNEZ, María Jesús, 2013. Characterization of a novel dye-decolorizing peroxidase (DyP)-type enzyme from Irpex lacteus and its application in enzymatic hydrolysis of wheat straw. In : *Applied and Environmental Microbiology*. juillet 2013. Vol. 79, n° 14, p. 4316-4324. DOI 10.1128/AEM.00699-13.

SAMARDŽIĆ, Stevan, ARSENIJEVIĆ, Jelena, BOŽIĆ, Dragana, MILENKOVIĆ, Marina, TEŠEVIĆ, Vele et MAKSIMOVIĆ, Zoran, 2018. Antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotective activity of Filipendula ulmaria (L.) Maxim. and Filipendula vulgaris Moench. In : *Journal of Ethnopharmacology*. 1 mars 2018. Vol. 213, p. 132-137. DOI 10.1016/j.jep.2017.11.013.

SATO, Yusuke, MORIUCHI, Hideki, HISHIYAMA, Shojiro, OTSUKA, Yuichiro, OSHIMA, Kenji, KASAI, Daisuke, NAKAMURA, Masaya, OHARA, Seiji, KATAYAMA, Yoshihiro, FUKUDA, Masao et MASAI, Eiji, 2009. Identification of three alcohol dehydrogenase genes involved in the stereospecific catabolism of arylglycerol-beta-aryl ether by Sphingobium sp. strain SYK-6. In : *Applied and Environmental Microbiology*. août 2009. Vol. 75, n° 16, p. 5195-5201. DOI 10.1128/AEM.00880-09.

SCHEIBNER, Manuela, HÜLSDAU, Bärbel, ZELENA, Kateryna, NIMTZ, Manfred, DE BOER, Lex, BERGER, Ralf G. et ZORN, Holger, 2008. Novel peroxidases of Marasmius scorodonius degrade beta-carotene. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*. janvier 2008. Vol. 77, n° 6, p. 1241-1250. DOI 10.1007/s00253-007-1261-9.

SCHULTZ, T. P. et NICHOLAS, D. D., 2000. Naturally durable heartwood: evidence for a proposed dual defensive function of the extractives. In : *Phytochemistry*. mai 2000. Vol. 54, n° 1, p. 47-52.

SCHWARTZ, Mathieu, DIDIERJEAN, Claude, HECKER, Arnaud, GIRARDET, Jean-Michel, MOREL-ROUHIER, Mélanie, GELHAYE, Eric et FAVIER, Frédérique, 2016. Crystal Structure of Saccharomyces cerevisiae ECM4, a Xi-Class Glutathione Transferase that Reacts with Glutathionyl-(hydro)quinones. In: *PLOS ONE*. 13 octobre 2016. Vol. 11, n° 10, p. e0164678. DOI 10.1371/journal.pone.0164678.

SCHWARZE, Francis, 2007. Wood decay under the microscope. In : *Fungal Biology Reviews*. 1 novembre 2007. Vol. 21. DOI 10.1016/j.fbr.2007.09.001.

SCHWENK, Daniel, NETT, Markus, DAHSE, Hans-Martin, HORN, Uwe, BLANCHETTE, Robert A. et HOFFMEISTER, Dirk, 2014. Injury-induced biosynthesis of methyl-branched polyene pigments in a white-rotting basidiomycete. In : *Journal of Natural Products*. 26 décembre 2014. Vol. 77, n° 12, p. 2658-2663. DOI 10.1021/np500552a.

SHALLOM, Dalia et SHOHAM, Yuval, 2003. Microbial hemicellulases. In : *Current Opinion in Microbiology*. juin 2003. Vol. 6, n° 3, p. 219-228.

SHEEHAN, D., MEADE, G., FOLEY, V. M. et DOWD, C. A., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. In : *The Biochemical Journal*. 15 novembre 2001. Vol. 360, n° Pt 1, p. 1-16.

SHERMAN, M., BASS, N. M., CAMPBELL, J. A. et KIRSCH, R. E., 1983. Radioimmunoassay of human ligandin. In : *Hepatology (Baltimore, Md.)*. avril 1983. Vol. 3, n° 2, p. 162-169.

SHIBUTANI, Sakae, SAMEJIMA, Masahiro et DOI, Shuichi, 2004. Effects of stilbenes from bark of Emphasis, Picea glehnii (Sieb. et Zucc) and their related compounds against feeding behaviour of Reticulitermes speratus (Kolbe). In : *Journal of Wood Science*. 1 octobre 2004. Vol. 50, n° 5, p. 439-444. DOI 10.1007/s10086-003-0583-1.

SHIMABUKURO, R. H., FREAR, D. S., SWANSON, H. R. et WALSH, W. C., 1971. Glutathione conjugation. An enzymatic basis for atrazine resistance in corn. In : *Plant Physiology*. janvier 1971. Vol. 47, n° 1, p. 10-14.

SHINTANI, Noboru, SUGANO, Yasushi et SHODA, Makoto, 2002. Decolorization of kraft pulp bleaching effluent by a newly isolated fungus, Geotrichum candidum Dec 1. In : *Journal of Wood Science*. 1 octobre 2002. Vol. 48, n° 5, p. 402-408. DOI 10.1007/BF00770700.

SILAR, Philippe, DAIROU, Julien, COCAIGN, Angélique, BUSI, Florent, RODRIGUES-LIMA, Fernando et DUPRET, Jean-Marie, 2011. Fungi as a promising tool for bioremediation of soils contaminated with aromatic amines, a major class of pollutants. In : *Nature Reviews Microbiology*. juin 2011. Vol. 9, n° 6, p. 477. DOI 10.1038/nrmicro2519-c1.

SINGH, Rahul et ELTIS, Lindsay D., 2015. The multihued palette of dye-decolorizing peroxidases. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 15 mai 2015. Vol. 574, p. 56-65. DOI 10.1016/j.abb.2015.01.014.

SINGH, S V, LEAL, T, ANSARI, G A et AWASTHI, Y C, 1987. Purification and characterization of glutathione S-transferases of human kidney. In : *Biochemical Journal*. 15 août 1987. Vol. 246, n° 1, p. 179-186.

SIPOS, György, PRASANNA, Arun N., WALTER, Mathias C., O'CONNOR, Eoin, BÁLINT, Balázs, KRIZSÁN, Krisztina, KISS, Brigitta, HESS, Jaqueline, VARGA, Torda, SLOT, Jason, RILEY, Robert, BÓKA, Bettina, RIGLING, Daniel, BARRY, Kerrie, LEE, Juna, MIHALTCHEVA, Sirma, LABUTTI, Kurt, LIPZEN, Anna, WALDRON, Rose, MOLONEY, Nicola M., SPERISEN, Christoph, KREDICS, László, VÁGVÖLGYI, Csaba, PATRIGNANI, Andrea, FITZPATRICK, David, NAGY, István, DOYLE, Sean, ANDERSON, James B., GRIGORIEV, Igor V., GÜLDENER, Ulrich, MÜNSTERKÖTTER, Martin et NAGY, László G., 2017. Genome expansion and lineage-specific genetic innovations in the forest pathogenic fungi Armillaria. In : *Nature Ecology & Evolution*. décembre 2017. Vol. 1, n° 12, p. 1931-1941. DOI 10.1038/s41559-017-0347-8.

SMITH, Aaron P., NOURIZADEH, Saeid D., PEER, Wendy A., XU, Jinghuai, BANDYOPADHYAY, Anindita, MURPHY, Angus S. et GOLDSBROUGH, Peter B., 2003. Arabidopsis AtGSTF2 is regulated by ethylene and auxin, and encodes a glutathione S-transferase that interacts with flavonoids. In : *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. novembre 2003. Vol. 36, n° 4, p. 433-442.

SOKOLOVÁ, Romana, RAMEŠOVÁ, Šárka, DEGANO, Ilaria, HROMADOVÁ, Magdaléna, GÁL, Miroslav et ŽABKA, Ján, 2012. The oxidation of natural flavonoid quercetin. In: *Chemical Communications (Cambridge, England)*. 7 avril 2012. Vol. 48, n° 28, p. 3433-3435. DOI 10.1039/c2cc18018a.

STOURMAN, Nina V., BRANCH, Megan C., SCHAAB, Matthew R., HARP, Joel M., LADNER, Jane E. et ARMSTRONG, Richard N., 2011. Structure and function of YghU, a nu-class glutathione transferase related to YfcG from Escherichia coli. In : *Biochemistry*. 22 février 2011. Vol. 50, n° 7, p. 1274-1281. DOI 10.1021/bi101861a.

SUGANO, Y., 2009. DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family. In : *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. avril 2009. Vol. 66, n° 8, p. 1387-1403. DOI 10.1007/s00018-008-8651-8.

SUZUKI, Melissa R., HUNT, Christopher G., HOUTMAN, Carl J., DALEBROUX, Zachary D. et HAMMEL, Kenneth E., 2006. Fungal hydroquinones contribute to brown rot of wood. In : *Environmental Microbiology*. décembre 2006. Vol. 8, n° 12, p. 2214-2223. DOI 10.1111/j.1462-2920.2006.01160.x.

Т

TAGUCHI, Goro, UBUKATA, Takahisa, NOZUE, Hatsumi, KOBAYASHI, Yuki, TAKAHI, Maki, YAMAMOTO, Hirobumi et HAYASHIDA, Nobuaki, 2010. Malonylation is a key reaction in the metabolism of xenobiotic phenolic glucosides in Arabidopsis and tobacco. In : *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. septembre 2010. Vol. 63, n° 6, p. 1031-1041. DOI 10.1111/j.1365-313X.2010.04298.x.

TAN, Tien-Chye, KRACHER, Daniel, GANDINI, Rosaria, SYGMUND, Christoph, KITTL, Roman, HALTRICH, Dietmar, HÄLLBERG, B. Martin, LUDWIG, Roland et DIVNE, Christina, 2015. Structural basis for cellobiose dehydrogenase action during oxidative cellulose degradation. In : *Nature Communications*. 7 juillet 2015. Vol. 6, p. 7542. DOI 10.1038/ncomms8542.

TANAKA, H, ITAKURA, S et ENOKE, A, 1999. Hydroxyl Radical Generation by an Extracellular Low-Molecular-Weight Substance and Phenol Oxidase Activity During Wood Degradation by the White-Rot Basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. In : *Holzforschung*. 1 janvier 1999. Vol. 53, p. 21-28. DOI 10.1515/HF.1999.004.

TAYLOR, Adam M., GARTNER, Barbara L. et MORRELL, Jeffrey J., 2002. Heartwood Formation and Natural Durability—A Review. In : *Wood and Fiber Science*. 2002. Vol. 34, n° 4, p. 587-611.

THAKUR, Vijay Kumar, THAKUR, M et GUPTA, Raju, 2014. Review: Raw Natural Fiber–Based Polymer Composites. In : *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*. 28 mars 2014. Vol. 19. DOI 10.1080/1023666X.2014.880016.

THOLL, Dorothea, 2006. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. In : *Current Opinion in Plant Biology*. juin 2006. Vol. 9, n° 3, p. 297-304. DOI 10.1016/j.pbi.2006.03.014.

THUILLIER, Anne, CHIBANI, Kamel, BELLI, Gemma, HERRERO, Enrique, DUMARÇAY, Stéphane, GÉRARDIN, Philippe, KOHLER, Annegret, DEROY, Aurélie, DHALLEINE, Tiphaine, BCHINI, Raphael, JACQUOT, Jean-Pierre, GELHAYE, Eric et MOREL-ROUHIER, Mélanie, 2014. Transcriptomic responses of Phanerochaete chrysosporium to oak acetonic extracts: focus on a new glutathione transferase. In : *Applied and Environmental Microbiology*. octobre 2014. Vol. 80, n° 20, p. 6316-6327. DOI 10.1128/AEM.02103-14.

THUILLIER, Anne, NGADIN, Andrew A., THION, Cécile, BILLARD, Patrick, JACQUOT, Jean-Pierre, GELHAYE, Eric et MOREL, Mélanie, 2011. Functional diversification of fungal glutathione transferases from the ure2p class. In : *International Journal of Evolutionary Biology*. 2011. Vol. 2011, p. 938308. DOI 10.4061/2011/938308.

THUILLIER, Anne, RORET, Thomas, FAVIER, Frédérique, GELHAYE, Eric, JACQUOT, Jean-Pierre, DIDIERJEAN, Claude et MOREL-ROUHIER, Mélanie, 2013. Atypical features of a Ure2p glutathione transferase from Phanerochaete chrysosporium. In : *FEBS letters*. 11 juillet 2013. Vol. 587, n° 14, p. 2125-2130. DOI 10.1016/j.febslet.2013.05.031.

TIEN, M. et KIRK, T. K., 1983. Lignin-Degrading Enzyme from the Hymenomycete Phanerochaete chrysosporium Burds. In : *Science (New York, N.Y.).* 12 août 1983. Vol. 221, n° 4611, p. 661-663. DOI 10.1126/science.221.4611.661.

TIEN, M. et KIRK, T. K., 1984. Lignin-degrading enzyme from Phanerochaete chrysosporium: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H(2)O(2)-requiring oxygenase. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. avril 1984. Vol. 81, n° 8, p. 2280-2284.

V

VALETTE, Nicolas, PERROT, Thomas, SORMANI, Rodnay, GELHAYE, Eric et MOREL-ROUHIER, Mélanie, 2017. Antifungal activities of wood extractives. In : *Fungal Biology Reviews*. 1 juin 2017. Vol. 31, n° 3, p. 113-123. DOI 10.1016/j.fbr.2017.01.002.

VAN DYK, Tina K., TEMPLETON, Lori J., CANTERA, Keith A., SHARPE, Pamela L. et SARIASLANI, F. Sima, 2004. Characterization of the Escherichia coli AaeAB efflux pump: a metabolic relief valve? In : *Journal of Bacteriology*. novembre 2004. Vol. 186, n° 21, p. 7196-7204. DOI 10.1128/JB.186.21.7196-7204.2004.

VANHOLME, Ruben, DEMEDTS, Brecht, MORREEL, Kris, RALPH, John et BOERJAN, Wout, 2010. Lignin Biosynthesis and Structure1. In: *Plant Physiology*. juillet 2010. Vol. 153, n° 3, p. 895-905. DOI 10.1104/pp.110.155119.

VEK, Viljem, OVEN, Primož et POLJANŠEK, Ida, 2016. Review on Lipophilic and Hydrophilic Extractives in Tissues of Common Beech. In : *Wood Industry / Drvna Industrija*. 2016. Vol. 67, p. 85-96.

VENEAULT-FOURREY, Claire et MARTIN, Francis, 2011. Mutualistic interactions on a knife-edge between saprotrophy and pathogenesis. In : *Current Opinion in Plant Biology*. août 2011. Vol. 14, n° 4, p. 444-450. DOI 10.1016/j.pbi.2011.03.022.

VERVERIDIS, Filippos, TRANTAS, Emmanouil, DOUGLAS, Carl, VOLLMER, Guenter, KRETZSCHMAR, Georg et PANOPOULOS, Nickolas, 2007. Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. In: *Biotechnology Journal*. octobre 2007. Vol. 2, n° 10, p. 1214-1234. DOI 10.1002/biot.200700084.

VILLARES, Ana, MOREAU, Céline, BENNATI-GRANIER, Chloé, GARAJOVA, Sona, FOUCAT, Loïc, FALOURD, Xavier, SAAKE, Bodo, BERRIN, Jean-Guy et CATHALA, Bernard, 2017. Lytic polysaccharide monooxygenases disrupt the cellulose fibers structure. In : *Scientific Reports*. 10 janvier 2017. Vol. 7, p. 40262. DOI 10.1038/srep40262.

W

WALLE, Thomas, 2004. Absorption and metabolism of flavonoids. In: *Free Radical Biology & Medicine*. 1 avril 2004. Vol. 36, n° 7, p. 829-837. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.002.

WALTERS, Kathryn B., GRANT, Paaqua et JOHNSON, Diana L. E., 2009. Evolution of the GST omega gene family in 12 Drosophila species. In : *The Journal of Heredity*. décembre 2009. Vol. 100, n° 6, p. 742-753. DOI 10.1093/jhered/esp043.

WALTON, Paul H et DAVIES, Gideon J, 2016. On the catalytic mechanisms of lytic polysaccharide monooxygenases. In: *Current Opinion in Chemical Biology*. 1 avril 2016. Vol. 31, p. 195-207. DOI 10.1016/j.cbpa.2016.04.001.

WANG, Chengshu et WANG, Sibao, 2017. Insect Pathogenic Fungi: Genomics, Molecular Interactions, and Genetic Improvements. In : *Annual Review of Entomology*. 31 janvier 2017. Vol. 62, p. 73-90. DOI 10.1146/annurev-ento-031616-035509.

WASSER, S. P. et WEIS, A. L., 1999. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. In : *Critical Reviews in Immunology*. 1999. Vol. 19, n° 1, p. 65-96.

WENG, Jing-Ke et CHAPPLE, Clint, 2010. The origin and evolution of lignin biosynthesis. In : *The New Phytologist*. juillet 2010. Vol. 187, n° 2, p. 273-285. DOI 10.1111/j.1469-8137.2010.03327.x.

WHITTAKER, M. M., KERSTEN, P. J., CULLEN, D. et WHITTAKER, J. W., 1999. Identification of catalytic residues in glyoxal oxidase by targeted mutagenesis. In : *The Journal of Biological Chemistry*. 17 décembre 1999. Vol. 274, n° 51, p. 36226-36232.

WICKNER, R. B., 1994. [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in Saccharomyces cerevisiae. In: *Science (New York, N.Y.).* 22 avril 1994. Vol. 264, n° 5158, p. 566-569.

WILLFÖR, Stefan M., AHOTUPA, Markku O., HEMMING, Jarl E., REUNANEN, Markku H. T., EKLUND, Patrik C., SJÖHOLM, Rainer E., ECKERMAN, Christer S. E., POHJAMO, Suvi P. et HOLMBOM, Bjarne R., 2003. Antioxidant activity of knotwood extractives and phenolic compounds of selected tree species. In : *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 17 décembre 2003. Vol. 51, n° 26, p. 7600-7606. DOI 10.1021/jf030445h.

WU, Shi-Biao, LONG, Chunlin et KENNELLY, Edward J., 2014. Structural diversity and bioactivities of natural benzophenones. In : *Natural Product Reports*. septembre 2014. Vol. 31, n° 9, p. 1158-1174. DOI 10.1039/c4np00027g.

Х

XUN, Luying, BELCHIK, Sara M., XUN, Randy, HUANG, Yan, ZHOU, Huina, SANCHEZ, Emiliano, KANG, ChulHee et BOARD, Philip G., 2010. S-Glutathionyl-(chloro)hydroquinone reductases: a novel class of glutathione transferases. In : *The Biochemical journal*. 27 mai 2010. Vol. 428, n° 3, p. 419-427. DOI 10.1042/BJ20091863.

Y

YAMAMOTO, Kohji, NAGAOKA, Sumiharu, BANNO, Yutaka et ASO, Yoichi, 2009. Biochemical properties of an omega-class glutathione S-transferase of the silkmoth, Bombyx mori. In : *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP*. mai 2009. Vol. 149, n° 4, p. 461-467. DOI 10.1016/j.cbpc.2008.10.108.

YAMAMOTO, Tsuyoshi, TSUNEMATSU, Yuta, HARA, Kodai, SUZUKI, Tomohiro, KISHIMOTO, Shinji, KAWAGISHI, Hirokazu, NOGUCHI, Hiroshi, HASHIMOTO, Hiroshi, TANG, Yi, HOTTA, Kinya et WATANABE, Kenji, 2016. Oxidative trans to cis Isomerization of Olefins in Polyketide Biosynthesis. In : *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*. 17 mai 2016. Vol. 55, n° 21, p. 6207-6210. DOI 10.1002/anie.201600940.

YAO, Lu, ZHU, Li-Ping, XU, Xiao-Yan, TAN, Ling-Ling, SADILEK, Martin, FAN, Huan, HU, Bo, SHEN, Xiao-Ting, YANG, Jie, QIAO, Bin et YANG, Song, 2016. Discovery of novel xylosides in coculture of basidiomycetes Trametes versicolor and Ganoderma applanatum by integrated metabolomics and bioinformatics. In: *Scientific Reports.* 12 2016. Vol. 6, p. 33237. DOI 10.1038/srep33237.

\mathbf{Z}

ZÁMOCKÝ, Marcel, HOFBAUER, Stefan, SCHAFFNER, Irene, GASSELHUBER, Bernhard, NICOLUSSI, Andrea, SOUDI, Monika, PIRKER, Katharina F., FURTMÜLLER, Paul G. et OBINGER, Christian, 2015. Independent evolution of four heme peroxidase superfamilies. In : *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 15 mai 2015. Vol. 574, p. 108-119. DOI 10.1016/j.abb.2014.12.025.

ZHANG, Hongqiao et FORMAN, Henry Jay, 2012. Glutathione synthesis and its role in redox signaling. In : *Seminars in Cell & Developmental Biology*. septembre 2012. Vol. 23, n° 7, p. 722-728. DOI 10.1016/j.semcdb.2012.03.017.

ZHANG, Zhilin, YANG, Ting, MI, Na, WANG, Yong, LI, Guoyuan, WANG, Lihua et XIE, Yongjian, 2016. Antifungal activity of monoterpenes against wood white-rot fungi. In : *International Biodeterioration & Biodegradation*. 1 janvier 2016. Vol. 106, p. 157-160. DOI 10.1016/j.ibiod.2015.10.018.

ZHAO, Jian, 2015. Flavonoid transport mechanisms: how to go, and with whom. In : *Trends in Plant Science*. septembre 2015. Vol. 20, n° 9, p. 576-585. DOI 10.1016/j.tplants.2015.06.007.

<u>Annexe</u>

ANNEXE

<u>Annexe</u>

Caractérisation biochimique de deux peroxydases sécrétées par Trametes versicolor

Article n°5: Enzyme activities of two recombinant heme-including peroxidases TvDyP1 and TvVP2 identified from the secretome of *Trametes versicolor*

Sawsan AMARA, Thomas PERROT, David NAVARRO, Aurélie DEROY, Amine BENKHELFALLAH, Amani CHALAK, Marianne DAOU, Didier CHEVRET, Craig B. FAULDS, Jean Guy BERRIN, Mélanie MOREL-ROUHIER, Eric GELHAYE and Eric RECORD.

Applied and Environmental Microbiology. 2018, 84, 8.

Cet article fut le fuit d'une collaboration entre l'UMR 1136 IAM et l'UMR Biodiversité et Biotechnologie Fongiques (BBF) de Marseille. Avant mon arrivée au laboratoire IAM, la doctorante précédente, Aurélie Deroy, avait réalisé des expériences sur différentes souches de *Trametes versicolor* cultivées en présence de bois de chêne. En collaboration avec le laboratoire BBF, les sécrétomes des différentes souches de *T. versicolor* ont été analysés par une approche de protéomique. L'analyse du sécrétome de la souche BRFM 1218 a révélé la présence de plusieurs peroxydases. Parmi elles, une peroxydase décolorante de pigments (dye-decolorizing peroxidase, *Tv*DyP1) et une versatile peroxydase (*Tv*VP2) furent identifiées. Cet article relate les différentes étapes de clonage, de purification de ces deux protéines ainsi que, leurs caractérisations fonctionnelles par des dosages d'activités enzymatiques envers des substrats classiques. L'ensemble de ces travaux s'inscrivaient dans le cadre du contrat postdoctoral de la chercheuse Sawsan Amara.

Au cours de ma thèse, j'ai également participé à la caractérisation biochimique de ces enzymes en étudiant leur capacité à oxyder deux flavonoïdes (la catéchine et la quercétine), ces deux molécules étant retrouvées naturellement parmi les extractibles de bois de chêne.

<u>Annexe – Article n•5</u>

Enzyme Activities of Two Recombinant Heme-Containing Peroxidases, *Tv*DyP1 and *Tv*VP2, Identified from the Secretome of *Trametes versicolor*

Sawsan Amara,^a Thomas Perrot,^b David Navarro,^{a,c} Aurélie Deroy,^b Amine Benkhelfallah,^a Amani Chalak,^a Marianne Daou,^a Didier Chevret,^d Craig B. Faulds,^a Jean Guy Berrin,^a Mélanie Morel-Rouhier,^bEric Gelhaye,^bEric Record^a

^aINRA, Aix-Marseille Université, UMR1163, Biodiversité et Biotechnologie Fongiques, Marseille, France

^bINRA, UMR 1136, Interactions Arbres/Micro-Organismes, Champenoux, France

^cCentre International de Ressources Microbiennes-Champignons Filamenteux, UMR1163 BBF, Marseille, France

^dPAPPSO, Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France

ABSTRACT

Trametes versicolor is a wood-inhabiting agaricomycete known for its ability to cause strong white-rot decay on hardwood and for its high tolerance of phenolic compounds. The goal of the present work was to gain insights into the molecular biology and biochemistry of the heme-including class II and dye-decolorizing peroxidases secreted by this fungus. Proteomic analysis of the secretome of T. versicolor BRFM 1218 grown on oak wood revealed a set of 200 secreted proteins, among which were the dye-decolorizing peroxidase TvDyP1 and the versatile peroxidase TvVP2. Both peroxidases were heterologously produced in Escherichia coli, biochemically characterized, and tested for the ability to oxidize complex substrates. Both peroxidases were found to be active against several substrates under acidic conditions, and TvDyP1 was very stable over a relatively large pH range of 2.0 to 6.0, while TvVP2 was more stable at pH 5.0 to 6.0 only. The thermostability of both enzymes was also tested, and TvDyP1 was globally found to be more stable than TvVP2. After 180 min of incubation at temperatures ranging from 30 to 50°C, the activity of TvVP2 drastically decreased, retaining 10 to 30% of the its initial activity. Under the same conditions, TvDyP1 retained 20 to 80% of its enzyme activity. The two proteins were catalytically characterized, and TvVP2 was shown to accept a wider range of reducing substrates than TvDyP1. Furthermore, both enzymes were found to be active against two flavonoids, quercetin and catechin, found in oak wood, with TvVP2 displaying more rapid oxidation of the two compounds. They were tested for the ability to decolorize five industrial dyes, and TvVP2 presented a greater ability to oxidize and decolorize the dye substrates than TvDyP1.

KEYWORDS

Trametes versicolor, white-rot fungus, dye-decolorizing peroxidase, versatile peroxidase, class II heme peroxidase, fungal secretome

<u>Annexe – Article n°5</u>

IMPORTANCE

Trametes versicolor is a wood-inhabiting agaricomycete known for its ability to cause strong white-rot decay on hardwood and for its high tolerance of phenolic compounds. Among white-rot fungi, the basidiomycete *T. versicolor* has been extensively studied for its ability to degrade wood, specifically lignin, thanks to an extracellular oxidative enzymatic system. The corresponding oxidative system was previously studied in several works for classical lignin and manganese peroxidases, and in this study, two new components of the oxidative system of *T. versicolor*, one dye-decolorizing peroxidase and one versatile peroxidase, were biochemically characterized in depth and compare to other fungal peroxidases.

INTRODUCTION

Basidiomycetous white-rot fungi are unique in the ability to degrade all polymeric components of wood and other lignocellulosic substrates. Interest in this group of fungi and their lignocellulolytic system has increased because of their biotechnological potential for the biodegradation of various recalcitrant and environmental pollutants, including toxic chemicals (1). Thanks to the recent release of more than 60 Basidiomycota genomes (2, 3), extensions of gene families encoding plant cell wall-degrading enzymes have been proposed to be characteristic of wood-decaying Agaricomycetes species (2).

Among white-rot fungi, the basidiomycete *Trametes versicolor* has often been studied as an efficient degrader of wood and possesses a nonspecific extracellular oxidative enzymatic system capable of degrading complex polymeric and phenolic materials (4–8). The *T. versicolor* genome was sequenced and revealed a large number of class II peroxidases and laccases, with 26 and 10 putative representatives, respectively (3, 9). The laccases (EC 1.10.3.2) are among the most common extracellular oxidoreductases secreted by *T. versicolor* (10). In addition, various heme-including peroxidases, mainly manganese peroxidases (MnPs, EC 1.11.1.13) and lignin peroxidases (LiPs, EC1.11.1.14), have been reported to be secreted by this fungus (11, 12). A third type of lignin-modifying peroxidase named versatile peroxidase (VP, EC 1.11.1.16) has been described in fungi of the genera *Pleurotus* and *Bjerkandera* (13–15). VP is a lignin-modifying peroxidase that has some of the catalytic properties of MnP and LiP (16, 17) and is thus capable of oxidizing the typical substrates of both MnP (Mn²) and LiP (veratryl alcohol [VA]).

Recently, the secretome of *T. versicolor* BAFC 2234 grown on tomato juice medium supplemented with copper and manganese was analyzed and the secreted lignin-modifying enzymes (a laccase, three MnP isoforms, and one VP isoform) were partially purified (18). However, no biochemical characterization of the purified peroxidases was carried out.

The heme-including peroxidases were traditionally classified on the basis of their sequence similarities and structural properties into classes I (prokaryotic and eukaryotic organelle), II (fungus secreted), and III (plant secreted) (19). This classification included most of the known heme peroxidases until the discovery of new heme-including peroxidase types in the last decades. This resulted in two novel superfamilies of fungus-secreted heme-including peroxidases: heme-thiolate peroxidases (HTPs, UPOs) (20) and dye-decolorizing peroxidases (DyPs) (20, 21). DyPs constitute a divergent protein superfamily distantly related to the catalase-peroxidase superfamily comprising the class I, II, and III peroxidases (20).

A high number of putative DyP sequences are available in protein databases (233 DyP sequences from fungal, bacterial, and archaeal genomes [http://peroxibase.toulouse.inra .fr]), and fungal DyPs from *Bjerkandera adusta* (22), *Termitomyces albuminosus* (23), *Marasmius scorodonius* (24), *Auricularia auricula-judae* (25), *Irpex lacteus* (26), *Exidia glandulosa*, and *Mycena epipterygia* (27) have been purified and enzymatically characterized. Some DyPs present interesting characteristics such as resistance to high temperatures (28, 29) and pressures (24) and stability under acidic conditions (25, 28, 29). Moreover, the catalytic mechanisms of a number of representatives have been described and their protein structures have been elucidated (27, 30–32).

In this work, we studied two peroxidases identified in the secretome of *T. versicolor* BRFM 1218 grown on wood-containing medium. These two enzymes were characterized in regard to their capacity to oxidize complex substrates and tested for the capacity to decolorize industrial dyes.

RESULTS

Peroxidase selection. The secretome of *T. versicolor* BRFM 1218 grown on malt agar wood was analyzed by using proteomics (Table 1). Among the 200 proteins identified in the secretomes, 21 peroxidases were identified in the secretome and are listed in the order of relative abundance in Table 1. *Tv*DyP1 and *Tv*VP2 were selected to study the oxidative system of *T. versicolor* because (i) they represent new peroxidase models, as LiPs and MnPs from *T. versicolor* were extensively studied in previous works; (ii) they are cosecreted with other class II peroxidases, which suggests a physiological function important to the fungus; and (iii) of the DyP and VP representatives identified in the secretome, they were by far the most abundant.

JGI Prot Id (genome of <i>Trametes versicolor</i>)	Functional annotation	Protein abundance index (PAI)
jgi Trave1 43578	LiP2	5.40
jgi Trave1 112835	MnP2	3.14
jgi Trave1 114944	LiP12	2.67
jgi Trave1 133731	LiP8	2.67
jgi Trave1 43477	MnP5s	2.42
jgi Trave1 52333	LiP6	2.33
jgi Trave1 48870	DyP1 Dyp-type peroxidase	1.85
jgi Trave1 130496	MnP4	1.27
jgi Trave1 131080	MnP3	1.27
jgi Trave1 133918	LiP3	1.14
jgi Trave1 51455	MnP6	1.00
jgi Trave1 51457	MnP9	0.92
jgi Trave1 133326	LiP4	0.89
jgi Trave1 26239	VP2	0.75
jgi Trave1 51442	MnP13	0.63
jgi Trave1 134657	LiP10	0.57
jgi Trave1 134226	LiP9	0.50
jgi Trave1 51375	MnP1	0.43
jgi Trave1 48874	Dyp-type peroxidase	0.29
jgi Trave1 43576	LiP1	0.22
jgi Trave1 51451	MnP7	0.22
jgi Trave1 44897	MnP10	nd
jgi Trave1 74595	MnP11s	nd
jgi Trave1 43289	VP1	nd
jgi Trave1 74179	MnP8s	nd
jgi Trave1 28895	VP3at	nd

Nd : not detected. Selected enzymes for the present studied are written in red.

Table 1: Abundance of peroxidases enzymes in secretomes during growth on malt agar wood ^{*a*}. ^{*a*} Peptide abundance is indicated by green and yellow shading. Protein models were taken from the JGI MycoCosm *T. versicolor* genome site. nd, not detected. Enzymes selected for the present study are in red.

Enzyme production and purification.

(i) *Tv*DyP1 production in a soluble and active form. For heterologous expression of *Tv*DyP1, a 5liter culture of *E. coli* transformants was prepared, resulting in *Tv*DyP1 production as an active protein. After a lysis step, the enzyme was purified in two different chromatographic steps. As shown by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) monitoring of the purification process (Fig. 1A), the soluble fraction (lane 1) from the *E. coli* cultures was considerably enriched in the *Tv*DyP1 (52 kDa) band after the first Mono Q chromatography step. However, several other proteins were still present. These contaminating proteins were removed by the second Q-Sepharose chromatography step. Homogeneous *Tv*DyP1 was obtained (lane 3) with a purification yield of 5 mg of protein/5-liter *E. coli* culture and a Reinheitzahl (Rz) A_{405}/A_{280} ratio of 2.

(ii) TvVP2 production as inclusion bodies and *in vitro* folding and activation. For heterologous expression of TvVP2, a 5-liter culture of *E. coli* transformants was grown and after lysis, a large quantity of protein (about 120 mg.liter¹) was found accumulated in insoluble inclusion bodies (Fig. 1B, lane 1). *In vitro* activation of *E. coli*-expressed TvVP2 was carried out under conditions previously optimized for other peroxidases (33), i.e., folding in 50 mM Tris-HCl (pH 9.5) containing 20 M hemin, 0.16 M urea, 5 mM Ca², 0.5 mM oxidized glutathione, 0.1 mM dithiothreitol (DTT), and 0.1 mg.ml¹ protein for 20 h at room temperature. The mixture was then concentrated, dialyzed, and centrifuged, allowing the elimination of folding additives and unfolded protein. *TvVP2* was purified by a single anion-exchange chromatographic step with a Mono Q column. SDS-PAGE analysis of purified *TvVP2* shows a single band of protein (lane 2) with a molecular mass of ~ 37 kDa. A purification yield of 30 mg of purified and active protein/5-liter E. coli culture with an Rz A405/A280



Figure 1: SDS-PAGE illustrating the production and different purification steps for *T. versicolor* peroxidases produced in *E. coli*. (A) Two-step purification of TvDyP1. Lanes: 1, *E. coli* soluble fraction containing TvDyP1; 2, first purification step on a Mono Q column; 3, pure DyP obtained after Q-Sepharose chromatography; M, protein molecular mass markers. (B) One-step purification of TvVP2. Lanes: 1, renatured inclusion bodies; 2, pure TvVP2 obtained after Mono Q column chromatography; M, protein molecular mass markers. In panels A and B, the different lanes are from different gels that were run for the same period of time.

N-terminal sequence and MS analyses. The N-terminal amino acid sequences were analyzed by sequential Edman degradation and confirmed the first five residues predicted from the protein sequence (Table 2), except for the first amino acid (methionine) of TvDyP1, which was missing. Mass spectrometry (MS) analysis (Table 2) showed two major peaks of TvDyP1 at 52,008 and 52,724 Da, in agreement with the molecular mass calculated from the amino acid sequence (52,171 Da). A minor peak (10%) was recorded at 49,118 Da, which might correspond to the partial degradation of TvDyP1 during the purification procedure, although a protease inhibitor was added to the lysis buffer. Mass spectrometric analysis of TvVP2 (Table 2) showed a major peak corresponding a molecular mass of 36,375 Da, which is slightly lower than that of wild-type TvVP2 purified from fungal cultures (44.6 kDa) (18), probably because of the lack of glycosylation machinery in *E. coli*, but in agreement with that calculated from the amino acid sequence (36.25 kDa).

Characteristic	TvDyP1	TvVP2	
Molecular mass (kDa)			
Theoretical	52.17	36.25	
Determined	52.036, 52.714	36.375	
N-terminal sequence			
Theoretical	MSSTVP	MVPSA	
Determined	SSTVP	MVPSA	

Table 2: N-terminal sequences and molecular masses of *Tv*DyP1 and *Tv*VP2 from *T. versicolor* produced in *E. coli*

Enzyme characterization.

(i) Temperature stability of *Tv*DyP1 and *Tv*VP2.

The thermostability of TvDyP1 and TvVP2 was examined by measuring the oxidation of 2,2-azinobis (3-ethylbenzthiazolinesulfonic acid) (ABTS) after heat treatment of the enzymes at different temperatures. Both were found to be sensitive to high temperatures (60 to 70°C), with 80% of their activity lost after 30 min of incubation at 60°C, while no activity was measured for the same incubation time at 70°C (Fig. 2A and B).

Similar patterns were observed with both enzymes at temperatures ranging from 30 to 50°C after 30 min of incubation, with 100 and 80% residual activity of TvDyP1 (Fig. 2A) and TvVP2 (Fig. 2B) measured, respectively. Beyond 30 min of incubation, activity decreased drastically, with the greater effect on TvVP2 with only 10 to 30% residual activity measured after 180 min of incubation at temperatures ranging from 30 to 50°C (Fig. 2B).

Under the same conditions, TvDyP1 retained 20 to 80% of its initial activity (Fig. 2A). The thermal inactivation profiles of both enzymes (data not shown) showed that they were rather stable, with half-inactivation temperatures (60 min) of 51.7 and 52.2°C estimated for TvDyP1 and TvVP2, respectively.

(ii) Effect of pH on TvDyP1 and TvVP2 activity and stability.

The effect of pH on TvDyP1 and TvVP2 activities was initially examined with different substrates at pHs ranging from 2.0 to 7.5. As shown in Fig. 2C and D, both peroxidases were active at acidic pHs ranging from 2.0 to 5.0, although there were some exceptions; i.e., no TvDyP1 activity was recorded on VA, Reactive Black 5 (RB5), or Mn2 at any pH tested (Fig. 2C), while maximum TvVP2 activity on Mn2 was obtained at pH 7.0 (Fig. 2D). On the other hand, the specific activities and optimum pHs of both enzymes differed, depending on the substrates tested. TvVP2 presents a broader substrate specificity than TvDyP1, and both enzymes were more active on ABTS than on any other substrate (9,892 and 2,074 nkat \cdot mg1 for TvDyP1 and TvVP2, respectively). Oxidation of this substrate occurred at similar pHs with both enzymes (3.5 and 3.0 for TvDyP1 for TvVP2, respectively), and activities decreased drastically at pHs beyond 4.5.

Similar pH profiles of TvVP2 oxidation of VA and 2,6-dimethoxyphenol (DMP) were obtained, with an optimal pH of 2 to 2.5 and a 40% reduction of activity at pH 3.0. The optimum pH for RB5 oxidation was also pH 2.5, but in this case, the enzyme lost 75% of its activity at pH 3.0. DMP oxidation by TvDyP1 was, however, obtained at an optimal pH of 3.0. Reactive Blue 19 (RB19) decolorization by TvVP2 was optimal at pH 3.5. In contrast, the highest optimal pH of 7.0 was observed for Mn2 oxidation.

The pH stability of TvDyP1 was studied by incubating the enzyme at pHs 2 to 6 at 4°C. As the protein was very stable in relation to pH, only results for 24 and 48 h of incubation are shown (Fig. 2E). The enzyme was found to be very stable at all of the pHs studied, since it retained 90% of its initial activity even after 48 h of incubation. For TvVP2 stability, shorter incubation times (30, 60, 120, and 180 min) were tested since the enzyme was more sensitive to pH (Fig. 2F). At acidic pHs (2 to 2.5), the enzyme was totally inactivated after the first 30 min of incubation at pH 2.0 and after 2 h of incubation at pH 2.5. At pHs ranging from 3.0 to 4.5, TvVP2 retained 50 to 70% of its initial activity after 3 h of incubation at 4°C. A more stable profile pattern of TvVP2 was observed at pHs 5.0 to 6.0, with 80% residual activity remaining after 3 h of incubation.



Figure 2: Physicochemical characterization of recombinant enzymes. The thermal stability of TvDyP1 (A) and TvVP2 (B) from *T. versicolor* produced in *E. coli* was determined Residual activities were estimated after 30, 60, 120, and 180 min of incubation at temperatures ranging from 30 to 70°C and referred to the activity measured immediately after addition of the enzyme. The optimal pHs for the oxidation of ABTS (5 mM), DMP (20 mM), RB5 (30 M), RB19 (200 M), VA (20 mM), and Mn² (10 mM) in 0.1 M tartrate buffer by TvDyP1 (C) and TvVP2 (D) from *T. versicolor* produced in *E. coli* were determined. The pH stability of TvDyP1 (E) and TvVP2 (F) from *T. versicolor* produced in *E. coli* was determined. Residual activities were calculated after 24 or 48 h of incubation for TvDyP1 or after 30, 60, 120, and 180 min for TvVP2 at pH 2 to 6 in 0.1 M tartrate and referred to the activity measured immediately after addition of the enzyme. Each data point (mean standard deviation) is the result of triplicate experiments.
(iii) Catalytic properties.

*Tv*DyP1 and *Tv*VP2 were tested on six representative substrates, and the kinetic constants obtained are shown in Table 3. Significant differences between the two peroxidases were observed. Of the six substrates tested, *Tv*DyP1 exhibited an affinity for only three, ABTS, DMP, and RB19 (K_m , 37.8 to 292.6 M), while no activity was detected on RB5, VA, or Mn². As observed for other fungal DyPs, the highest turnover value of *Tv*DyP1 from *T. versicolor* was found for ABTS (k_{cat} , 581.1 s¹), followed by DMP (k_{cat} , 87.4 s¹) and the anthraquinone dye RB19 (k_{cat} , 23.8 s¹) (28). *Tv*VP2 was found to possess an affinity for the six substrates, with the highest for RB5 and RB19. The oxidation of the low-redoxpotential dye ABTS by *Tv*VP2 was found to be lower (k_{cat} , 79.2 s¹) than that by *Tv*DyP1 (Table 4). Moreover, *Tv*DyP1 presented a slightly higher apparent affinity for ABTS than *Tv*VP2 (K_m , 292.2 and 415 M, respectively), with an even better k_{cat} (582 and 79.2 s¹, respectively); consequently, *Tv*DyP1 was 10-fold more efficient than *Tv*VP2 on this substrate (k_{cat}/K_m , 1,989.4 and 190.8 s¹ mM¹, respectively).

Substrate and parameter	TvDyP1	TvVP2
ABTS		
K_m	292.6 ± 50.24	415 ± 42
kcat	582.1 ± 0.05	79.2 ± 2
$k_{\rm cat}/K_m$	1,989.4	190.8
рН	3.5	3.0
RB5		
K_m	0	10.2 ± 0.9
kcat	0	26.8 ± 0.86
$k_{ m cat}/K_m$	0	2,640
pH	2.0-5.0	2.5
DMP		
K	1.026 + 78.52	2.597 + 196
m kcat	87.4 ± 0.08	13.8 ± 0.24
$k_{\rm cat}/K_m$	85.2	5.3
pH	3.0	2.5
1		
RB19		
K_m	37.8 ± 3.34	31.2 ± 3.13
kcat	23.8 ± 0.62	19.2 ± 0.63
k_{cat}/K_m	629.6	615.4
pH	4.0	3.5
X 7.4		
VA K	0	9.995 ± 1.279
K _m V _{opt}	0	31.2 ± 1.5
kont/K	0	31
nH	2.0-5.0	2.0
P	210 010	2.0
Mn^{2+}		
K_m	0	958.5 ± 66
kcat	0	22.6 ± 0.33
$k_{\rm cat}/K_m$	0	23.6
pH	4.0-7.0	7.0

Table 3: Kinetic constants^a of oxidation of different aromatic and nonaromatic dyes by *Tv*DyP1 and *Tv*VP2 from *T. versicolor* produced in *E. coli*. ^aKm, μM; kcat, s-1; kcat/Km, s-1. mM-1.

Dye	TvDyP1	TvVP2
AB	++	++
BB	-	+
RB5	-	+
DB	-	-
VG	-	-

Table 4: Decolorization of industrial dyes by TvDyP1 and TvVP2^a

^aDecolorization was determined after 1 h of incubation at pHs 2.5, 3, and 3.5 at 37°C. Symbols: -, no decolorization, +, 30% of minimum decolorization; ++, 75% of minimum decolorization.

(iv) Effect of H₂O₂.

Peroxidases tend to lose activity in the presence of H_2O_2 through a mechanism-based process known as suicide inactivation (34). The optimum H_2O_2 concentration for TvDyP1 and TvVP2 depended on the substrate used (Fig. 3). Optimal H_2O_2 concentrations of 0.25 and 0.5 mM were obtained with ABTS as a substrate for TvVP2 and TvDyP1, respectively. Then the activity decreased gradually to 30% residual activity for both enzymes at 5.0 mM H_2O_2 . Interestingly, TvVP2 displayed significant activity in the absence of H_2O_2 at 7.5% of its maximal activity.



Figure 3: Effect of H2O2 on the activities of recombinant TvDyP1 (A) and TvVP2 (B). Activities were determined under standard assay conditions at the optimal pH for each enzyme (3.0 for TvVP2 and 3.5 for TvDyP1) in the presence of H2O2 (0 to 5 mM). Each data point (mean standard deviation) is the result of triplicate experiments.

(v) Oxidation of flavonoids by peroxidases.

The capacity of both peroxidases to oxidize catechin (CAT) and quercetin (QUE), which are extractable from oak wood (35), was investigated. TvVP2, in the presence of hydrogen peroxide (0.1 mM), altered the 250- to 600-nm absorbance spectra of CAT recorded every 60 s over a 4-min period, while the modification of absorbance by TvDyP1 was weaker in the 400-nm region of the spectrum (Fig. 4A and B; Fig. S1 and S2A and B). A major increase in optical density at around 400 nm was observed, suggesting the formation of quinones (36). The same approach was used with QUE (Fig. S3). In this case, incubation of the flavonoid with both peroxidases in the presence of hydrogen peroxide led to strong modification of the observed spectra, in particular, a decrease of the 370 nm peak (Fig. 4C and D; Fig; S4A and B). As observed for CAT (Fig.S2C and D), the observed modification induced by TvVP2 seemed to be greater than that induced by TvDyP1 (Fig. S4C and D). Interestingly, the UV spectrum of QUE oxidation by TvVP2 showed a small increase in absorption at around 290 nm, which was not detected after oxidation by TvDyP1.



Figure 4: Changes in absorbance over 30 min during the oxidation of CAT (10 M) and QUE (10 M) by peroxidases. (A) Oxidation of CAT (10 M) by TvDyP1 alone (0.2 M), purple; oxidation of CAT (10 M) by TvDyP1 (0.2 M) with H_2O_2 (1 mM), blue. (B) Oxidation of CAT (10 M) by TvVP2 alone (0.2 M), purple; oxidation of CAT (10 M) by TvVP2 (0.2 M) with H_2O_2 (1 mM), blue. The curve for CAT oxidized by TvDyP1 alone has been rearranged to begin at the same point as the other curves. (C) Oxidation of QUE (10 M) by TvDyP1 alone (0.2 M), purple; oxidation of QUE (10 M) by TvDyP1 alone (0.2 M), purple; oxidation of QUE (10 M), blue (D); oxidation of QUE (10 M) by TvVP2 alone (0.2 M), purple; oxidation of QUE (10 M) by TvVP2 (0.2 M) with H_2O_2 (1 mM), blue (D); oxidation of QUE (10 M), bue. O.D., optical density.

This absorption band could match the production of 3,4-dihydroxybenzoic acid (37). Using reverse chromatography to analyze the reactional mixtures, we noticed that the CAT signal was dramatically decreased or lost after oxidation by TvDyP1 and TvVP2, respectively (data not shown). Nevertheless, no additional peaks were observed in chromatograms, suggesting that the quinones polymerized, and their detection was not possible by this method. The production of insoluble brown compounds was indeed observed, preventing any further characterization by chromatographic steps.

(vi) Decolorization of industrial dyes.

To study the abilities of TvDyP1 and TvVP2 to oxidize complex substrates, five industrial dyes were selected from different usages and chemical structures (acidic, basic, reactive, vat, and disperse dyes). As shown in Table 4, both peroxidases were active on Acid Black 172 (AB) dye, with a slightly higher decolorization percentage for TvVP2 than for TvDyP1. Regarding the other dyes, TvVP2 presented a wider range of action since it was also active on Basic Blue 41 (BB) and Reactive Black (RB).

DISCUSSION

In the present study, *T. versicolor* was selected among diverse wood-inhabiting Agaricomycetes because of its ability to cause a strong white rot on hardwood and the strain BRFM 1218 was cultivated in the presence of oak sapwood. Several peroxidases were identified by proteomic analysis, and two peroxidases, *Tv*DyP1 and *Tv*VP2, were selected for functional characterization, including biochemical characterization, and testing for decolorization of industrial dyes. In this context, we report the production and purification of *Tv*DyP1 from *T. versicolor*. We used a previously described approach consisting of DyP production in a soluble and active form (28). Similar protein production yields were reached with the two *Pleurotus ostreatus* DyP isoforms *Po*DyP1 and *Po*DyP4 (6.3 and 11.7 mg/9 liters of *E. coli* culture, respectively). *Po*DyP4, sharing 52% amino acid sequence identity with *T. versicolor Tv*DyP1, presents the highest-identity sequence. DyP from *Bjerkandera adusta*, incorrectly named *Thanatephorus cucumeris* (38), was the first DyP heterologously expressed as an active and soluble enzyme in both *Aspergillus oryzae* (39) and *E. coli* (40) after laborious purification steps, giving a limited biochemical characterization of two isoforms, named DyP2 and DyP3 (41).

To produce TvVP2 from *T. versicolor*, we used the same expression protocol as for TvDyP1. However, attempts to get the TvVP2 peroxidase as a soluble and active enzyme failed even after optimization assays (data not shown). Therefore, the protein was first produced as inclusion bodies and then the enzyme was recovered and activated *in vitro* in accordance with the previously optimized protocol for other VPs (28, 33, 42). Although native TvVP2 was previously purified from the secretome of *T. versicolor* grown on tomato juice medium, a very low yield of protein was obtained and no biochemical characterization was performed (18). In agreement with their different phylogenetic origins, *T. versicolor Tv*DyP1 and *Tv*VP2 differed significantly in kinetics and stability. Compared to other DyPs, *T. versicolor Tv*DyP1, together with *B. adusta* native DyP (40) and *Po*DyP4, was more thermostable than the previously described fungal DyPs, as well as *Tv*VP2. *Tv*DyP1 was, however, less thermostable than *B. adusta* DyP, which retains 92% of its initial activity after incubation at 60°C for 60 min (40).

*Tv*DyP1 was found to be stable over a large range of pHs, with an optimal activity at acidic pH. This stability pattern was similar to that observed in other fungal DyPs, being 80% stable after 24 h at pH 2 (28, 29). However, *Tv*VP2 was more sensitive to acidic pH and was more stable at pH 5 to 6. In comparison, VP from *Pleurotus eryngii* has a rather close behavior, (43), and this relatively low observed pH stability of fungal peroxidases is a drawback in their industrial application (33). Therefore, the pH stability of *Po*VP was improved by direct mutagenesis (43).

The pH optima of TvDyP1 and TvVP2 were found to be similar to those previously described for PoDyP1 and PoDyP4, with an optimum at pH 3 to 4 for the phenolic and dye substrates and a higher optimum pH of 4.5 for Mn², suggesting the involvement of deprotonated acidic residues in the latter activity (28).

Related to the substrate specificity of fungal class II peroxidases such as DyPs and VPs, acidic conditions are required for the optimum oxidative activity of the enzyme, with an even more acidic optimum pH of 3 in the case of nonphenolic aromatic substrates such as VA. In the same way, the optimum pH for VA oxidation by TvVP2 was found to be 2, while TvDyP1 was unable to oxidize this substrate. This substrate is either not (29) or poorly (26) oxidized by other fungal DyPs. A similar pattern was previously reported for *B. adusta* DyP, with an acidic optimum pH of 3.2 obtained with all of the substrates tested, as well as an absence of activity on VA (41, 43).

The specificity of the two recombinant enzymes was discriminated on five substrates, including dyes, aromatics, and nonaromatics (Table 4). Under our conditions, TvVP2 was demonstrated to be more versatile than TvDyP1. Considering the kinetic properties, TvVP2 displayed a low affinity for VA (K_m , 9,995 M). This low affinity was similar to that reported for PoVP isoenzyme 2 (33) but lower than those reported for well-characterized lignin-modifying class II peroxidases, being 2- to 6-fold lower than that of PoVP isoenzymes 1 and 3 (33); VP, LiP1, and LiP2 from *Ceriporiopsis subvermispora* (44); and VPs from *P. eryngii* (45). The low-redox-potential substrate ABTS is also oxidized with high efficiency by TvDyP1 and in general by DyPs and to a lesser extent by TvVP2; however, Mn^2 was only oxidized by TvVP2 at a very low efficiency compared to that of previously characterized VPs (17, 28, 33, 43). Mn^2 is generally not oxidized by DyPs, although it has been reported that two DyPs from *P. ostreatus* exhibited Mn^2 -oxidizing activity, which was especially significant for PoDyP4 (near 200 s¹ mM¹ (28). The catalytic efficiency of TvVP2 for Mn^2 oxidation was dramatically lower than that of fungal lignin-modifying peroxidases, including VPs and MnPs from *P. ostreatus* (28, 44) and VPs from *C. subvermispora* (44) and *P. eryngii* (45).

The high-redoxpotential dye RB5, which is a typical VP substrate, was found to be not or poorly oxidized by *Tv*DyP1and DyPs from other fungi, with the exception of the two DyPs from *A. auricula-judae* and *P. ostreatus* (26, 28, 29). Unlike *Tv*DyP1 but similar to what has been previously reported for VPs from *P. ostreatus* (33) and *P. eryngii* (45), RB5 was very efficiently oxidized by *Tv*VP2 (k_{cat}/K_m , 2,640 s¹ mM¹). In fact, *Tv*VP2 presented the greatest apparent affinity for both high-redoxpotential dye substrates RB5 and RB19 (K_m , 10.2 and 31.2 M, respectively). *Tv*DyP1 was also able to oxidize RB19 (K_m , 37.8 M), a typical DyP substrate, very similarly to *Tv*VP2 (K_m , 31.2 M). Both enzymes presented similar catalytic efficiencies (k_{cat}/K_m , 629.6 and 615.4 s¹ mM¹) on this substrate that are slightly higher than those previously reported for *P. ostreatus* peroxidases *Po*DyP1 and *Po*VP2 (k_{cat}/K_m , 113 and 495 s¹ mM¹, respectively [28]) but 3- to 10-fold lower than those obtained with *P. ostreatus* peroxidases *Po*DyP4 and *Po*VP1 (k_{cat}/K_m , 1,860 and 3,220 s¹ mM¹, respectively [28]) and wild type and *E. coli*-expressed *A. auricula-judae* DyP (k_{cat}/K_m , 3,600 and 2,400 s¹ mM¹, respectively [29]).

Regarding DMP oxidation, TvDyP1 was 16-fold more efficient than TvVP2 because of its 2.5-fold lower K_m and 6-fold higher k_{cat} . However, both peroxidases presented lower activity on this phenolic substrate than other well-characterized peroxidases, including LiPs and MnPs (28, 44).

Oxidation of this particular substrate by *A. auricula-judae* DyP (29) and *Po*VPs (33) previously showed biphasic (sigmoidal) kinetics, enabling the calculation of two sets of kinetic constants. This behavior, as well as other substrate specificities, was explained by computational spectroscopic and site-directed mutagenesis studies of *A. auricula-judae* DyP that revealed the existence of more than one oxidation site with different turnover values and substrate affinities (30). In the present study, similar patterns were not obtained with any substrate tested with both enzymes.

During wood degradation, *T. versicolor* has to cope with many compounds, including terpenes and flavonoids. We observed that both of the peroxidases investigated in this study can oxidize flavonoids such as CAT and QUE, compounds known to be oxidized by various oxidases and peroxidases (36, 46–48). Under the conditions used in our experiments, *Tv*VP2 was more active than *Tv*DyP1 on both of these flavonoids. Both peroxidases induced a large modification of the CAT absorbance spectrum, in particular an increase in absorbance at 400 nm. This spectrum modification could correspond to the formation of two quinone groups on the B ring (46). In addition, this oxidation could lead to polymers that are not detectable by high-performance liquid chromatography (HPLC). Concerning QUE, *Tv*VP2 induced both the appearance of an absorbance peak at 290 nm and a decrease in absorbance at 370 nm. In contrast the increase in absorbance at 290 nm was not detected in the case of oxidation by *Tv*DyP1, suggesting another mechanism of oxidation. For instance, QUE has been shown to be a substrate of several peroxidases/oxidases, with the formation of quinones on different sites (47, 48).

Considering potential applications for these two peroxidases, the ability to decolorize representatives of the main dye families used in industry was tested, revealing that, globally, TvVP2 presented a wider range of action than TvDyP1 and potential for this application.

The two *T. versicolor* enzymes showed diverse properties, confirming the contribution of biodiversity screening to the discovery of new biocatalysts. To go further in this research, future directed-mutagenesis experiments and crystallographic studies using the TvDyP1 and TvVP2 heterologous expression system developed here will be set up to explain enzyme substrate specificities and develop more robust enzymes for biotechnological applications.

MATERIALS AND METHODS

Materials. DTT, lysozyme, glutathione, hemin, DMP, VA, RB19, CAT hydrate (98% pure; molecular weight [MW], 290.27), QUE (95% pure; MW, 302.24), hydrogen peroxide solution (50% [wt/wt] in water, stabilized), reduced L-glutathione (98% pure; MW, 307.32), and dibasic sodium phosphate (99% pure; BioReagents) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany); isopropyl--D-thiogalactopyranoside (IPTG) was from Calbiochem (Meudon, France); ABTS was from Boehringer Mannheim (Saint-Quentin Fallavier, France); and sodium phosphate monobasic dehydrate was obtained from Euromedex (Souffelweyersheim, France). The industrial dyes AB, RB5, Disperse Blue 79 (DB), BB, and Vat Green 1 (VG) were supplied by the SETAS Company (Tekirdag[×], Turkey).

Strain and growth medium. The dikaryon *T. versicolor* was deposited in the CIRM-CF collection under no. BRFM 1218. *T. versicolor* BRFM 1218 was collected on oak (*Quercus pubescens*) in Goult (Vaucluse, France). To confirm the morphological identification, molecular identification by internal transcribed spacer (ITS; ITS1, ITS2, and 5,8S rRNA) sequencing was performed. The sequence was compared by similarity analysis (blastn) to those in GenBank and FunGene-DB (49), and it corresponded unequivocally to the species *T. versicolor*. The fungus was grown on 4% malt extract agar medium, and three oak sapwood wood blocks (25 by15 by 5 mm) were then placed on the grown mycelium after 2 weeks of incubation. The blocks were dried for 48 h at 103°C before use. Incubation was carried out at 25°C in the dark. Oak blocks colonized for 1 month were removed carefully from the agar plates, and the mycelium surrounding the blocks was excised. The secretome was extracted by soaking the wood chips in potassium acetate buffer (100 mM, pH 4.5) for 120 min at room temperature. The secretome obtained was stored at 20°C before further analysis. The total amount of proteins was assessed with the Bradford assay (Protein Assay Dye Reagent Concentrate; Bio-Rad, Ivry, France) with bovine serum albumin standard concentrations that ranged from 0.2 to 1 mg \cdot ml¹.

Proteomic analysis of the secretome. Short SDS-PAGE runs (precast 4 to 12% Bis-Tris minigels; Invitrogen, France) were performed, allowing proteins diafiltered from the secretome (15 g) to migrate on a 0.5-cm length, and gels were stained with Coomassie blue (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Each gel electrophoresis lane was cut into two slices (2 mm wide), and protein identification was performed by the PAPPSO (Plate-forme d'Analyze Protéomique de Paris Sud-Ouest) platform facilities. In-gel digestion was carried out in accordance with a standard trypsinolysis protocol.

Gel pieces were washed twice with 50% (vol/vol) acetonitrile (ACN)–25 mM NH₄CO₃ and incubated in the presence of 10 mM DTT for 1 h at 56°C. After cooling, the supernatant was removed and the samples were incubated with 55 mM iodoacetamide at room temperature in the dark. Gel plugs were washed with ACN and then dried in a vacuum concentrator (Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France). Digestion was performed for 8 h at 37°C with 200 ng of modified trypsin (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) dissolved in 25 mM NH₄CO₃. Tryptic peptides were extracted first with 50% (vol/vol) ACN–0.5% (vol/vol) trifluoroacetic acid (TFA) and then with pure ACN.

Peptide extracts were dried in a vacuum speed concentrator (Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France) and suspended in 25 l of 2% (vol/vol) ACN-0.05% (vol/vol) TFA-0.08% (vol/vol) formic acid. HPLC was performed on a NanoLC-Ultra system (Eksigent, Les Ulis, France). Tryptic digestion products were first concentrated and desalted on a precolumn cartridge (PepMap 100 C₁₈, 0.3 by 5 mm, Dionex; Thermo Fisher Scientific) with 0.1% formic acid at 7.5 1 min¹ for 3 min. The precolumn cartridge was connected to the separating column (C18, 0.075 by 15 cm; Biosphere Nanoseparations, Nieuwkoop, The Netherlands), and the peptides were eluted with a linear gradient of 5 to 35% ACN in 0.1% formic acid for 40 min at 300 nl \cdot min¹. On-line analysis of peptides was performed with a Q-exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, United States) with a nanoelectrospray ion source. Ionization (1.8-kV ionization potential) was performed with a stainlesssteel emitter (30-m inner diameter; Thermo Electron, Villebon sur Yvette, France). Peptide ions were analyzed with Xcalibur 2.1 software (Thermo Scientific, Villebon sur Yvette, France) with the following data-dependent acquisition steps: step 1, full MS scan (mass-to-charge ratio [m/z] 400 to 1,400; resolution, 70,000); step 2, tandem MS (MS/MS; normalized collision energy, 30%; resolution, 17,500). Step 2 was repeated for the eight major ions detected in step 1. Dynamic exclusion was set to 40 s. The raw mass data were first converted to mzXML format with the ReAdW software (SPC Proteomics Tools, Seattle, WA). Protein identification was performed by querying the MS/MS data against databases, together with an in-house contaminant database, with the X!Tandem software (X!Tandem Cyclone, Jouy en Josas, France) and the following parameters: one trypsin missed, cleavage allowed, alkylation of cysteine, conditional oxidation of methionine, and precursor and fragment ion set at 2 ppm and 0.005 Da, respectively. A refined search with similar parameters was added, except that semitryptic peptides, possible N-term acetylation, and histidine mono- and dimethylations were also searched. All peptides matched with an E value of 0.05 were parsed with X!Tandem pipeline software. Proteins identified with at least two unique peptides and a log E value of 2.6 were validated.

Gene synthesis. The mature protein-coding sequences of a DyP and a VP (GenBank accession numbers 19415892 and 19412643 encoding the proteins with Joint Genome Institute [JGI] protein ID no. 48870 and 26239 from *T. versicolor* (FP-101664 SS1, corresponding to *Tv*DyP1 and *Tv*VP2, respectively) were synthesized by GeneArt Gene Synthesis (Life Technologies, Germany) after codon optimization for *E. coli* expression.

*Tv*DyP1 production in *E. coli*. The *Tv*DyP1 coding sequence was cloned into the pET23b(+) vector (Novagen, Darmstadt, Germany), and the resulting plasmid (pET23b-*Tv*DyP1) was used for expression in *E. coli* BL21(DE3) (Invitrogen, GeneArt, Regensburg, Germany). Cells were grown for 3 h at 37°C in terrific broth (TB) containing 100 g \cdot ml¹ ampicillin, induced with 1 mM IPTG, and grown further for 48 h at 16°C in the presence of 20 M hemin. Cells were harvested by centrifugation at 8,000 rpm for 10 min at 4°C.

The bacterial pellet was resuspended in 100 ml of lysis buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8.0] containing 1 mM EDTA and 5 mM DTT) supplemented with lysozyme (Sigma-Aldrich) at 2 mg \cdot ml¹, DNase I, and a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). After 1 h of incubation, cells were sonicated and then centrifuged at 12,000 rpm for 30 min to remove cell debris. The resulting supernatant was dialyzed first against 20 mM acetate, pH 4.3, and then further dialyzed against 20 mM Tris, pH 7.5. Insoluble material was removed after each dialysis step (12,000 rpm for 10 min). *Tv*DyP1 was purified with an ÄKTA Express purification system (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) in two consecutive steps. First, the *Tv*DyP1 solution was loaded onto a 1-ml Mono Q 5/50 GL column (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) in 20 mM Tris (pH 7.5) buffer at a flow rate of 1 ml \cdot min¹. After column washing with the buffer described above, two successive linear NaCl concentration gradients (0 to 0.15 and 0.15 to 0.5 M NaCl) were applied for 20 and 10 min, respectively.

Peroxidase activity was monitored by measuring ABTS oxidation in the presence of H_2O_2 as described below. The active fractions were pooled, dialyzed against 20 mM Tris (pH 7.5), and loaded into a 20ml Q-Sepharose column (GE Healthcare Bio-Sciences AB) in the same buffer at a flow rate of 1 ml · min¹. Proteins were then eluted with a 0 to 0.5 M NaCl gradient for 20 min. *Tv*DyP1 purification was checked by SDS-PAGE in a 12% gel stained with Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma). The electronic absorption spectrum of the purified enzyme was recorded with an Agilent 8453 diode array UV-visible spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

*Tv*VP2 production in *E. coli*. The *Tv*VP2 coding sequence was cloned into the pET23b(+) vector (Novagen), and the resulting plasmid (pET23b-*Tv*VP2) was used for expression in *E. coli* BL21(DE3) (Invitrogen). Cells were grown for 3 h at 37°C in TB containing 100 g \cdot ml¹ ampicillin, induced with 1 mM IPTG, and grown for 4 h. *Tv*VP2 accumulated in inclusion bodies, as observed by SDS-PAGE, and was solubilized with 8 M urea.

In vitro refolding was performed in 0.16 M urea–5 mM Ca^2 –20 M hemin–0.5 mM oxidized glutathione–0.1 mM dithiothreitol, –0.1 mg.ml¹ protein at pH 9.5 as previously described (28).

TvVP2 was purified by a one-step chromatographic procedure with an ÄKTA Express purification system (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) and a Mono Q 5/50 GL column (GE Healthcare Bio-Sciences AB) with a 0 to 0.5 M NaCl gradient (1 ml \cdot min¹, 40 min) in 10 mM tartrate (pH 5.5) containing 1 mM CaCl₂.

N-terminal sequencing and MS. To determine the N-terminal sequence of the purified peroxidases and those of the fragments generated by partial proteolysis, the protein material was subjected to protein sequence analysis on an Applied Biosystems 476A sequencer by the proteomic platform of the Institut de Microbiologie de la Méditerrranée, CNRS, Aix-Marseille Université. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight MS of samples was carried out on a Microflex II time of flight mass spectrometer (Bruker Daltonik, Germany).

Optimum pH determination. The optimal pH for substrate oxidation by each of the two *T. versicolor* peroxidases was determined by measuring the enzymatic activity with saturating concentrations of RB5 (30 M), RB19 (200 M), ABTS (5 mM), DMP (20 and 60 mM for TvVP2 and TvDyP1, respectively), VA (20 mM), and Mn² (10 mM) in 0.1 M tartrate buffer as described below.

Peroxidase kinetic studies. The kinetic constants of *T. versicolor Tv*DyP1 and *Tv*VP2 were estimated from the absorbance changes observed during substrate oxidation at the optimal pH at 30°C in a Uvikon XS spectrophotometer (BioTek Instruments, Colmar, France) (29). Depending on the substrate, different concentrations of H₂O₂ were added to initiate the reaction. Oxidation of ABTS was determined by measuring the generation of its cation radical ($\varepsilon_{436} = 29,300 \text{ M}^1.\text{cm}^1$). RB5 and RB19 oxidation was monitored for colorant disappearance ($\varepsilon_{598} = 30 \text{ mM}^1.\text{cm}^1$ and $\varepsilon_{595} = 10 \text{ mM}^1.\text{cm}^1$, respectively). Oxidation of Mn² was determined by monitoring Mn³-tartrate complex ($\varepsilon_{238} = 6.5 \text{ mM}^1.\text{cm}^1$) formation. VA oxidation was determined for veratraldehyde ($\varepsilon_{310} = 9.3 \text{ mM}^1.\text{cm}^1$) formation. DMP oxidation was monitored for dimeric coerulignone ($\varepsilon_{469} = 55 \text{ mM}^1.\text{cm}^1$). All enzymatic activities were measured as initial velocities taking linear increments (decreases for RB5 and RB19). Mean apparent affinity constant (Michaelis constant, K_m) and enzyme turnover (catalytic constant, k_{cat}) values and standard errors were obtained by nonlinear least-squares fitting to the Michaelis-Menten model. Fitting of these constants to the normalized Michaelis-Menten equation (k_{cat}/K_m)[S]/(1[S]/ K_m) yielded enzyme efficiency values (k_{cat}/K_m) with their standard errors.

pH stability studies. To study the effect of pH on *T. versicolor* peroxidase stability, the enzymes were incubated in 0.1 M tartrate buffer at pH 2 to 6 and kept at room temperature for different time periods. Residual activities were measured after 1 min of incubation (to evaluate the initial survival of the enzyme at each pH) and 30, 60, 120, and 180 min of incubation for TvVP2 and 24 and 48 h for TvDyP1.

The activity obtained with the sample incubated for 1 min at pH 5 was taken as a reference (maximum activity). Activity was determined by oxidation of a saturating concentration of ABTS in 0.1 M tartrate at the optimal pH of each enzyme (3.0 for TvVP2 and 3.5 for TvDyP1) under the conditions described above.

Thermal stability studies. To study the thermal stability of *T. versicolor* peroxidases, the enzymes were incubated in 0.1 M tartrate buffer (pH 5.0) over a range of 25 to 70° C. Residual activity was determined after 1, 30, 60, 120, and 180 min after a cooling step on ice.

The activity of the enzyme incubated at 4°C was taken as a reference (maximum activity) to calculate the percentage of residual activity at any time.

Effect of hydrogen peroxide. The effects of different H_2O_2 concentrations on peroxidase activity were determined under standard assay conditions at the optimal pH for each enzyme (3.0 for *Tv*VP2 and 3.5 for *Tv*DyP1).

Natural plant molecule (CAT and QUE) oxidation by peroxidases. Oxidation of CAT hydrate and QUE was determined at room temperature by analyzing the spectra of both flavonoids between 250 and 600 nm. Additional kinetic experiments were conducted by determining the absorbance at 400 and 370 nm, corresponding to the characteristic peaks of CAT hydrate and QUE, respectively. These experiments were carried out with a Cary 50 spectrophotometer (Agilent Technologies). CAT and QUE were used at 20 and 10 M, respectively. For both compounds, reactions were carried out in 100 mM phosphate buffer (pH 5.8). For some conditions, CAT and QUE were incubated in the presence of 1 mM H_2O_2 . For these assays, the concentration of the peroxidases tested was 0.2 M.

Industrial dye decolorization by peroxidases. To test the abilities of peroxidases to decolorize industrial dyes, five dyes, AB, RB5, DB, BB, and VG, were selected. Dyes were kindly provided by the SETAS Company (Çerkezköy, Turkey). They were prepared from either powder dyes, i.e., AB (0.005% [vol/vol]), RB (0.005% [vol/vol]), and DB (0.01% [vol/vol]), prepared in 0.1 M sodium tartrate buffer (pHs 2.5, 3.0, and 3.5) or liquid dyes, i.e., BB (0.002% [vol/vol]) and VG (0.01% [vol/vol]), in each buffer (pHs 2.5, 3.0, and 3.5). Enzymatic dye decolorization capacity was assayed in 96-well microplates by adding 2 1 of H₂O₂ and 0.4 g of enzyme to 200 1 of dye solution in sodium tartrate buffer at pHs 2.5, 3, and 3.5. Two controls were performed under the same conditions without H₂O₂ or without enzyme. The decolorization of AB, RB5, DB, BB, and VG was measured at 37°C at wavelengths of 560, 610, 530, 610, and 640 nm, respectively. Percent decolorization was calculated with the following formula: % decolorization [(Abs t_0 - Abs t)/Abs t_0] x 100.

Accession number(s). The ITS sequence obtained in this study was deposited in GenBank under accession number MG554226.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the European Commission for funding this work within the INDOX project (KBBE-2013-7-613549). This study was also funded by a grant from the French National Research Agency (ANR) as part of the Investissements d'Avenir program (ANR-11-LABX-0002-01, Lab of Excellence ARBRE). We thank the SETAS Company for kindly providing the industrial dyes and Régine Lebrun and Pascal Mansuelle of the proteomics platform of the Institut de Microbiologie de la Méditerranée, CNRS-AMU, Marseille, France, for protein identification by MS. We thank Bernard Rivoire for collecting, identifying, and isolating *T. versicolor* BRFM 1218).

REFERENCES

- Gao D, Du L, Yang J, Wu WM, Liang H. 2010. A critical review of theapplication of white rot fungus to environmental pollution control. Crit Rev Biotechnol 30:70–77. https://doi.org/10.3109/07388550903427272.
- Nagy LG, Riley R, Bergmann PJ, Krizsan K, Martin FM, Grigoriev IV, CullenD, Hibbett DS. 2017. Genetic bases of fungal white rot wood decay predicted by phylogenomic analysis of correlated genephenotype evolution. Mol Biol Evol 34:35–44. https://doi.org/10.1093/molbev/msw238.
- ^{3.} Floudas D, Binder M, Riley R, Barry K, Blanchette RA, Henrissat B, MartínezAT, Otillar R, Spatafora JW, Yadav JS, Aerts A, Benoit I, Boyd A, Carlson A, Copeland A, Coutinho PM, de Vries RP, Ferreira P, Findley K, Foster B, Gaskell J, Glotzer D, Gorecki P, Heitman J, Hesse C, Hori C, Igarashi K, Jurgens JA, Kallen N, Kersten P, Kohler A, Kues U, Kumar TK, Kuo A, LaButti K, Larrondo LF, Lindquist E, Ling A, Lombard V, Lucas S, Lundell T, Martin R, McLaughlin DJ, Morgenstern I, Morin E, Murat C, Nagy LG, Nolan M, Ohm RA, Patyshakuliyeva A, Rokas A, Ruiz-Dueñas FJ, Sabat G, Salamov A, Samejima M, Schmutz J, Slot JC, St John F, Stenlid J, Sun H, Sun S, Syed K, Tsang A, Wiebenga A, Young D, Pisabarro A, Eastwood DC, Martin F, Cullen D, Grigoriev IV, Hibbett DS. 2012. The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. Science 336:1715–1719. https://doi.org/10.1126/science.1221748.
- Grey R, Hofer C, Schlosser D. 1998. Degradation of 2-chlorophenol andformation of 2-chloro-1,4benzoquinone by mycelia and cell-free crude culture liquids of *Trametes versicolor* in relation to extracellular laccase activity. J Basic Microbiol 38:371–382. https://doi.org/10.1002/(SICI)1521 -4028(199811)38:5/6371::AID-JOBM3713.0.CO;2-V.
- Yemendzhiev H, Gerginova M, Krastanov A, Stoilova I, Alexieva Z. 2008. Growth of *Trametes versicolor* on phenol. J Ind Microbiol Biotechnol 35:1309–1312. https://doi.org/10.1007/s10295-008-0412-z.
- Asgher M, Bhatti HN, Ashraf M, Legge RL. 2008. Recent developments inbiodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. Biodegradation 19:771–783. https://doi.org/10.1007/ s10532-008-9185-3.

- Carabajal M, Ullrich R, Levin L, Kluge M, Hofrichter M. 2012. Degradation phenol and *p*nitrophenol by the white-rot polypore *Trametes versicolor*, p 69–72. 5th International Symposium on Biosorption and Bioremediation, 24 to 28 June 2012, Prague, Czech Republic.
- Chakroun H, Bouaziz M, Dhouib A, Sayadi S. 2012. Enzymatic oxidativetransformation of phenols by *Trametes* trogii laccases. Environ Technol 33:1977–1985. https://doi.org/10.1080/09593330.2012.655317.
- Ruiz-Dueñas FJ, Lundell T, Floudas D, Nagy LG, Barrasa JM, Hibbett DS, Martínez AT. 2013. Lignin-degrading peroxidases in Polyporales: an evolutionary survey based on 10 sequenced genomes. Mycologia 105: 1428–1444. https://doi.org/10.3852/13-059.
- Jönsson LJ, Saloheimo M, Penttila M. 1997. Laccase from the white-rotfungus *Trametes versicolor*: cDNA cloning of lcc1 and expression in *Pichia pastoris*. Curr Genet 32:425–430. https://doi.org/10.1007/s002940050298.
- Johansson T, Nyman PO. 1993. Isozymes of lignin peroxidase and manganese(II) peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. I. Isolation of enzyme forms and characterization of physical and catalytic properties. Arch Biochem Biophys 300:49–56.
- 12. Johansson T, Welinder KG, Nyman PO. 1993. Isozymes of lignin peroxidase and manganese(II) peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. II. Partial sequences, peptide maps, and amino acid and carbohydrate compositions. Arch Biochem Biophys 300:57–62.
- Camarero S, Sarkar S, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Martínez AT. 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. https://doi .org/10.1074/jbc.274.15.10324.
- 14. Ruiz-Dueñas FJ, Camarero S, Perez-Boada M, Martínez MJ, Martínez AT.2001. A new versatile peroxidase from *Pleurotus*. Biochem Soc Trans 29:116–122. https://doi.org/10.1042/bst0290116.
- Ruiz-Dueñas FJ, Morales M, Garcia E, Miki Y, Martínez MJ, Martínez AT.2009. Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. J Exp Bot 60:441–452. https://doi.org/10.1093/jxb/ ern261.
- Martínez MJ, Ruiz-Dueñas FJ, Guillen F, Martínez AT. 1996. Purificationand catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. Eur J Biochem 237:424–432. https://doi.org/10.1111/j .1432-1033.1996.0424k.x.

- Heinfling A, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Bergbauer M, Szewzyk U, Martínez AT. 1998. A study on reducing substrates of manganeseoxidizing peroxidases from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta*. FEBS Lett 428:141–146. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00512-2. 18. Carabajal M, Kellner H, Levin L, Jehmlich N, Hofrichter M, Ullrich R. 2013. The secretome of *Trametes versicolor* grown on tomato juice medium and purification of the secreted oxidoreductases including a versatile peroxidase. J Biotechnol 168:15–23. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec .2013.08.007.
- Welinder KG, Mauro JM, Norskov-Lauritsen L. 1992. Structure of plantand fungal peroxidases. Biochem Soc Trans 20:337–340. https://doi.org/ 10.1042/bst0200337.
- Hofrichter M, Ullrich R, Pecyna MJ, Liers C, Lundell T. 2010. New andclassic families of secreted fungal heme peroxidases. Appl Microbiol Biotechnol 87:871–897. https://doi.org/10.1007/s00253-010-2633-0.
- Sugano Y. 2009. DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family. Cell Mol Life Sci 66:1387–1403. https://doi.org/10.1007/ s00018-008-8651-8.
- 22. Kim SJ, Ishikawa K, Hirai M, Shoda M. 1995. Characteristics of a newlyisolated fungus, *Geotrichum candidum* Dec 1, which decolorizes various dyes. J Ferment Bioeng 79:601–607. https://doi.org/10.1016/0922 -338X(95)94755-G.
- 23. Johjima T, Ohkuma M, Kudo T. 2003. Isolation and cDNA cloning of novelhydrogen peroxidedependent phenol oxidase from the basidiomycete *Termitomyces albuminosus*. Appl Microbiol Biotechnol 61:220–225. https://doi.org/10.1007/s00253-003-1236-4.
- 24. Pühse M, Szweda RT, Ma Y, Jeworrek C, Winter R, Zorn H. 2009. *Marasmius scorodonius* extracellular dimeric peroxidase—exploring its temperature and pressure stability. Biochim Biophys Acta 1794:1091–1098. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.03.015.
- 25. Liers C, Bobeth C, Pecyna M, Ullrich R, Hofrichter M. 2010. DyP-likeperoxidases of the jelly fungus *Auricularia auricula-judae* oxidize nonphenolic lignin model compounds and high-redox potential dyes. Appl Microbiol Biotechnol 85:1869–1879. https://doi.org/10.1007/s00253-009 -2173-7.
- 26. Salvachúa D, Prieto A, Martínez AT, Martínez MJ. 2013. Characterizationof a novel dye-decolorizing peroxidase (DyP)-type enzyme from *Irpex lacteus* and its application in enzymatic hydrolysis of wheat straw. Appl Environ Microbiol 79:4316–4324. https://doi.org/10.1128/AEM.00699-13.
- 27. Liers C, Pecyna MJ, Kellner H, Worrich A, Zorn H, Steffen KT, 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. https://doi.org/10.1007/s00253-012-4521-2.

- 28. Fernández-Fueyo E, Linde D, Almendral D, Lopez-Lucendo MF, RuizDueñas FJ, Martínez AT. 2015. Description of the first fungal dyedecolorizing peroxidase oxidizing manganese(II). Appl Microbiol Biotechnol 99:8927–8942. https://doi.org/10.1007/s00253-015-6665-3.
- 29. Linde D, Coscolin C, Liers C, Hofrichter M, Martínez AT, Ruiz-Dueñas FJ.2014. Heterologous expression and physicochemical characterization of a fungal dye-decolorizing peroxidase from *Auricularia auricula-judae*. Protein Expr Purif 103:28–37. https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.08.007.
- 30. Linde D, Pogni R, Canellas M, Lucas F, Guallar V, Baratto MC, Sinicropi A,Sáez-Jiménez V, Coscolin C, Romero A, Medrano FJ, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez AT. 2015. Catalytic surface radical in dye-decolorizing peroxidase: a computational, spectroscopic and site-directed mutagenesis study. Biochem J 466:253–262. https://doi.org/10.1042/BJ20141211.
- 31. Roberts JN, Singh R, Grigg JC, Murphy ME, Bugg TD, Eltis LD. 2011. Characterization of dyedecolorizing peroxidases from *Rhodococcus jostii* RHA1. Biochemistry 50:5108–5119. https://doi.org/10.1021/bi200427h.
- 32. Strittmatter E, Liers C, Ullrich R, Wachter S, Hofrichter M, Plattner DA,Piontek K. 2013. First crystal structure of a fungal high-redox potential dye-decolorizing peroxidase: substrate interaction sites and long-range electron transfer. J Biol Chem 288:4095–4102. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.400176.
- 33. Fernández-Fueyo E, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Romero A, Hammel KE, Medrano FJ, Martínez AT. 2014. Ligninolytic peroxidase genes in the oyster mushroom genome: heterologous expression, molecular structure, catalytic and stability properties, and lignin-degrading ability. Biotechnol Biofuels 7:2. https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-2.
- 34. Valderrama B, Ayala M, Vazquez-Duhalt R. 2002. Suicide inactivation ofperoxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. Chem Biol 9:555–565. https://doi.org/10.1016/S1074-5521(02)00149-7.
- Zhang B, Cai J, Duan CQ, Reeves MJ, He F. 2015. A review of polyphenolics in oak woods. Int J Mol Sci 16:6978–7014. https://doi.org/10.3390/ ijms16046978.
- Oszmianski J, Lee CY. 1990. Enzymic oxidative reaction of catechin andchlorogenic acid in a model system. J Agric Food Chem 38:1202–1204. https://doi.org/10.1021/jf00095a009.
- 37. Sokolová R, Ramešová Š, Degano I, Hromadová M, Gál M, Žabka J. 2012. The oxidation of natural flavonoid quercetin. Chem Commun (Camb) 48:3433–3435. https://doi.org/10.1039/c2cc18018a.
- 38. Gomi N, Yoshida S, Matsumoto K, Okudomi M, Konno H, Hisabori T,Sugano Y. 2011. Degradation of the synthetic dye amaranth by the fungus *Bjerkandera adusta* Dec 1: inference of the degradation pathway from an analysis of decolorized products. Biodegradation 22:1239–1245. https://doi.org/10.1007/s10532-011-9478-9.

- 39. Sugano Y, Matsuo C, Shoda M. 2001. Efficient production of a heterologous peroxidase, DyP from *Geotrichum candidum* Dec 1, on solid-state culture of *Aspergillus oryzae* RD005. J Biosci Bioeng 92:594–597. https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80323-6.
- 40. Sugano Y, Ishii Y, Shoda M. 2004. Role of H164 in a unique dyedecolorizing heme peroxidase DyP.Biochem Biophys Res Commun

322:126-132. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.090.

- 41. Shimokawa T, Shoda M, Sugano Y. 2009. Purification and characterization of two DyP isozymes from *Thanatephorus cucumeris* Dec 1 specifically expressed in an air-membrane surface bioreactor. J Biosci Bioeng 107:113–115. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2008.09.013.
- 42. Pérez-Boada M, Doyle WA, Ruiz-Dueñas FJ, Martînez MJ, Martînez AT, Smith AT. 2002. Expression of *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase in *Escherichia coli* and optimisation of *in vitro* folding. Enzyme Microb Technol 30:518–524. https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00008-X.
- 43. Sáez-Jiménez V, Fernández-Fueyo E, Medrano FJ, Romero A, MartínezAT, Ruiz-Dueñas FJ. 2015. Improving the pH-stability of versatile peroxidase by comparative structural analysis with a naturallystable manganese peroxidase. PLoS One 10:e0140984. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140984.
- 44. Fernández-Fueyo E, Ruiz-Dueñas FJ, Miki Y, Martínez MJ, Hammel KE, Martínez AT. 2012. Lignindegrading peroxidases from genome of selective ligninolytic fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. J Biol Chem 287: 16903–16916. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.356378.
- 45. Bao X, Liu A, Lu X, Li JJ. 2012. Direct over-expression, characterizationand H₂O₂ stability study of active *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase in *Escherichia coli*. Biotechnol Lett 34:1537–1543. https://doi.org/10.1007/ s10529-012-0940-5.
- 46. Moridani MY, Scobie H, Salehi P, O'Brien PJ. 2001. Catechin metabolism: glutathione conjugate formation catalyzed by tyrosinase, peroxidase, and cytochrome p450. Chem Res Toxicol 14:841–848. https://doi.org/10.1021/tx0002350.
- 47. Kubo I, Nihei K, Shimizu K. 2004. Oxidation products of quercetin catalyzed by mushroom tyrosinase. Bioorg Med Chem 12:5343–5347. https:// doi.org/10.1016/j.bmc.2004.07.050.
- 48. Awad HM, Boersma MG, Vervoort J, Rietjens IM. 2000. Peroxidasecatalyzed formation of quercetin quinone methide-glutathione adducts. Arch Biochem Biophys 378:224–233. https://doi.org/10.1006/abbi.2000 .1832.
- 49. Navarro D, Favel A, Chabrol O, Pontarotti P, Haon M, Lesage-Meessen L.2012. FunGene-DB: a webbased tool for Polyporales strains authentication. J Biotechnol 161:383–386. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012 .06.023.





Figure S2



<u>Annexe – Article n•5</u>



Figure S4



Communications orales

Présentation orale au « LabEx ARBRE PhD & Postdoc Day », le 17 octobre 2016, Champenoux (54)

Présentation orale au « MPIterMic - ARBRE inter-departmental workshop on plant-fungus interactions », le 27 octobre 2016, Marburg (Allemagne)

Présentation orale au « Doc & Postdoc Day UMR IAM », le 14 juin 2017, Champenoux (54)

Présentation orale au 12^{ème} Rencontres de Phytopathologie-Mycologie de la Société Française de Phytopathologie » du 15 au 19 janvier 2018, Aussois (73)

Posters

Présentation d'un poster au « 11^{ème} Rencontres de Phytopathologie-Mycologie de la Société Française de Phytopathologie » du 25 au 29 janvier 2016, Aussois (73)

Présentation d'un poster au « 13th European Conference on Fungal Genetics », du 3 au 6 avril 2016, Paris (75)

Présentation d'un poster à « Exploring lignocellulosic biomass ! », les 23 et 24 juin 2016, Reims (51)

Présentation d'un poster au « Séminaire annuel de l'école doctorale RP2E », du 2 février 2017, Vandoeuvre-lès-Nancy (54)

Présentation d'un poster au « 14th European Conference on Fungal Genetics », du 25 au 28 février 2018, Haïfa, Israël

Résumé : Les champignons décomposeurs du bois jouent un rôle important dans le cycle du carbone en participant notamment au recyclage de la matière organique. Outre leur aptitude à minéraliser la biomasse lignocellulosique, ces organismes ont la capacité de dégrader des molécules potentiellement toxiques libérées lors de ce processus. Leur système de détoxication comprend différentes familles multigéniques dont les glutathion transférases. Ces enzymes ubiquitaires, sont regroupées en différentes classes dans le règne fongique, certaines d'entre elles étant étendues chez ces champignons. Dans ce contexte, l'objectif principal de cette thèse consistait à appréhender les fonctions des glutathion transférases de la classe Omega (GSTOs) étendue chez Trametes versicolor, un champignon de pourriture blanche. Une approche biochimique et structurale a été menée sur neuf protéines produites de façon recombinante. Dans un premier temps, une caractérisation enzymatique de ces isoformes a été réalisée à l'aide de substrats synthétiques montrant une similarité des propriétés catalytiques. Puis, à partir d'une banque de molécules pures et de mélanges complexes issus de différentes essences forestières, une méthode de screening à haut débit a permis d'identifier des ligands potentiels de ces enzymes. La résolution de la structure tridimensionnelle de trois isoformes a démontré l'état homodimérique de ces protéines et l'implication de deux sites de fixation dans la reconnaissance de ces ligands : le site H (présent dans chaque monomère) et le site L (à l'interface du dimère). Par exemple, l'isoforme TvGSTO3S est capable de fixer dans son site H plusieurs hydroxybenzophénones, mais également un flavonoïde, la dihydrowogonine. Dans ce dernier cas, cette interaction avec un ligand naturel issu d'extraits de bois de merisier a été démontré par une approche de cristallographie d'affinité. D'autre part, des expériences de co-cristallisation ont permis de détecter deux molécules d'un autre flavonoïde, la naringénine, dans le site L de l'isoforme TvGSTO6S. Enfin, une interaction spécifique impliquant les sites H et L de l'isoforme TvGSTO2S a été démontrée avec l'oxyresvératrol. L'analyse structurale a révélé que les deux configurations du stilbène étaient liées à la protéine : la configuration trans dans le site H et la configuration cis dans le site L. Ainsi, malgré une redondance fonctionnelle partielle, ces recherches ont démontré l'existence d'un spectre d'interactions spécifiques pour chaque isoforme testée. Le caractère étendu de la classe Omega indiquerait que ces enzymes seraient impliquées dans l'adaptation du champignon à son environnement. En effet, les ligands identifiés au cours de ces travaux suggèrent que les propriétés « ligandines » des TvGSTOs joueraient un rôle dans la détoxication des produits issus de dégradation du bois.

Mots clés : glutathion transférases, Trametes versicolor, recherche de substrats/ligands, métabolites secondaires

Abstract: Wood decaying fungi play an important role in the carbon cycle by participating in the recycling of organic matter. In addition to their ability to mineralize lignocellulosic biomass, these organisms have the ability to degrade potentially toxic molecules released during this process. Their detoxification system involves several multigenic families including glutathione transferases. These ubiquitous enzymes are grouped into several classes in the fungal kingdom, some of them are widespread in these fungi. In this context, the main objective of this thesis was to understand the functions of glutathione transferases of the Omega class (GSTOs) extended in Trametes versicolor, a white rot fungus. A biochemical and structural approach was led using nine recombinant proteins. Firstly, enzymatic characterization of these isoforms was performed using synthetic substrates, the obtained results demonstrating a similarity of catalytic properties. Then, using a library of pure molecules and another one of complex mixtures from different forest species, a high throughput screening method was applied to identify potential ligands for these enzymes. The resolution of the three-dimensional structure of three isoforms demonstrated the homodimeric state of these proteins and the involvement of two binding sites in the recognition of these ligands: the H site (present in each monomer) and the L site (at the dimer interface). For example, the isoform TvGSTO3S is able to bind several hydroxybenzophenones in its H site, but also a flavonoid, dihydrowogonin. In this case, this interaction with a natural ligand derived from wild-cherry tree extract was demonstrated by an affinity crystallography approach. On the other hand, co-crystallization experiments detected two molecules of another flavonoid, naringenin, in the L site of the isoform TvGSTO6S. Finally, a specific interaction involving the H and L sites of the isoform TvGSTO2S was demonstrated with oxyresveratrol. Structural analysis revealed that the presence of both configurations of the stilbene in the protein: the trans configuration in the H site and the cis configuration in the L site. Thus, despite partial functional redundancy, this research demonstrated the existence of a specific pattern of interactions for each tested isoform. The expansion of the Omega class could indicate that these enzymes are involved in the adaptation of the fungus in its environment. Indeed, the ligands identified during this work suggest that the "ligandin" properties of TvGSTOs play a role in detoxifying wood degradation products.

Keywords: glutathione transferases, *Trametes versicolor*, research of substrates and ligands, secondary metabolites