Recherche d'enzymes ligninolytiques dans la biodiversité, mise en évidence d'enzymes de type oxydoréductase provenant de l'ascomycète Scedosporium apiospermum

Rémi Chausse

▶ **To cite this version:**

Rémi Chausse. Recherche d'enzymes ligninolytiques dans la biodiversité, mise en évidence d'enzymes de type oxydoréductase provenant de l'ascomycète Scedosporium apiospermum. Biotechnologies. Université de Lille; Université de Liège, 2022. Français. NNT : 2022ULILR077 . tel-04357164

HAL Id: tel-04357164

https://theses.hal.science/tel-04357164

Submitted on 21 Dec 2023

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.

Ecole Doctorale Sciences de la Matière, du rayonnement et de l'environnement

Université de Lille (Faculté des Sciences et Technologies)

Université de Liège – Gembloux Agro-Bio Tech

Dans le cadre de l'Unité Mixte de Recherche Transfrontalière BioEcoAgro

Thèse

Préparée et soutenue publiquement par **Rémi CHAUSSE**

le 20/12/2022,

pour obtenir le grade de Docteur en Biotechnologies agroalimentaires sciences de l'aliment physiologie

---

RECHERCHE D'ENZYMES LIGNINOLYTIQUES DANS LA BIODIVERSITÉ, MISE EN ÉVIDENCE D'ENZYMES DE TYPE OXYDORÉDUCTASE PROVENANT DE L'ASCOMYCÈTE *SCEDOSPORIUM APIOSPERMUM*

Composition du jury :

Directeurs : Pr Vincent PHALIP, Université de Lille, France

Pr Patrick FICKERS, Université de Liège, Belgique

Président : Pr Rénato FROIDEVAUX, Université de Lille, France

Rapportrices : Mc Harivony RAKOTOARIVONINA (HDR), Université de Reims Champagne Ardennes, France

Mc Florence HUSSON (HDR), Institut Agro Dijon / Université de Bourgogne, France

Examinatrice : Mc Malgorzata KUS- LISKIEWICZ (HDR), Université de Rzeszów, Pologne

Ecole Doctorale - 104
Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement
EDSMRE Université Lille Nord de France

« Je suis de ceux qui pensent que la science est d'une grande beauté. Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien : il est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées. »

Marie Curie

Résumé

L'objectif de cette thèse était de rechercher de nouvelles enzymes de dégradation de la lignine à partir de souches de champignons issus de milieux naturels. Des prélèvements ont été effectués sur du bois dans trois écosystèmes différents : une forêt de feuillus (hêtre, boulot) et résineux (cyprès Lambert), un cep de chardonnay attaqué par la maladie du bois de la vigne et enfin une souche en décomposition sur un parking d'une zone urbaine. 71 souches de champignons ont été isolées à partir de ces prélèvements. Pour connaître les souches produisant des enzymes d'intérêt, un criblage d'activité ligninolytique a été effectué. Afin de rendre ce criblage le plus exhaustif possible, différentes conditions de culture ont été mises en place. Trois milieux de cultures avec des éléments inducteurs spécifiques ont été testés afin de stimuler la production d'enzymes ligninolytiques par les champignons. Les trois milieux de culture utilisés pour le criblage furent donc un milieu riche sans induction, un milieu avec de la paille de blé et un autre avec du gaïacol. De même, pour prendre en compte l'aspect cinétique de production des enzymes par les champignons, deux temps de mesure à 7 et 14 jours ont été observés. Ce criblage a permis de sélectionner 15 champignons présentant au moins une activité enzymatique d'intérêt. Sur ces 15 champignons, deux souches ont produit leurs activités ligninolytiques seulement sur les milieux contenant un inducteur. Parmi ces 15 champignons, deux basidiomycètes ainsi que 13 ascomycètes appartenant à 6 genres différents ont été identifiés. 12 ascomycètes étaient déjà décrits dans la littérature pour produire des enzymes de type laccase, Lip et Mnp. Les deux basidiomycètes, *Peniophora versicolor* et *Piptoporus betulinus* n'étaient pas connus pour cette activité ligninolytique. En outre, l'ascomycète *Scedosporium apiospermum* a montré une activité de type laccase lors du criblage. Des expérimentations de dégradation de la lignine ont pu déterminer que les enzymes présentes dans le surnageant de culture de ce champignon, possèdent une activité de modification du polymère de lignine. *S. apiospermum* a donc été sélectionné afin de caractériser ses enzymes de type laccase, détectées lors du criblage. Grâce à un criblage in silico dans le génome de *S. apiospermum*, neuf gènes putatifs de

laccase ont été détectés. Après avoir généré une librairie d'ADNc, cinq gènes putatifs de laccase ont été amplifiés puis clonés avec succès dans la levure *Yarrowia lipolytica*. Dans les conditions de l'étude, deux gènes Lac2 et ITMO2 permirent d'obtenir des enzymes recombinantes actives.

Dans leur structure primaire, les enzymes Lac2 et ITMO2 présentent chacune les sites de coordination du cuivre, spécifiques des oxydases à cuivre. Lac2 et ITMO2 possèdent un pH optimum de 3 et 5 respectivement. Les deux enzymes ont démontré qu'elles possèdent une activité d'oxydation sur des substrats phénoliques comme le 2.6 dimétoxyphénol, le pyrogallol et la dopamine, mais aussi sur des substrats non phénoliques comme le 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) et l'o-Dianisidine.

Mots clés : Lignine, enzymes ligninolytiques, criblage, biodiversité, *Scedosporium apiospermum*

Abstract

The goal of this thesis was to search for new fungal ligninolytic enzymes from the environment. Samples of woody biomass were collected in three different ecosystems: a forest composed of deciduous trees (beech, birch) and gymnosperm (*Cupressus macrocarpa*), a cep of chardonnay infected with grapevine trunk disease and finally a decaying tree stump in a parking lot of an urban area. 71 strains were isolated from these environments. To select the fungal strain able to produce enzymes of interest a screening for laccase, Lip and Mnp was carried out. In order to maximize the completeness of this screening different culture conditions were used. To trigger the production of ligninolytic enzymes by the fungi Three culture media supplemented or not with inductors were used for the screening. The first medium tested was a rich medium without induction. The two other media contained respectively wheat straw and guaiacol as inductors. Besides, sampling was performed after 7 and 14 days as the kinetics of enzyme production could vary for a given fungal strain and culture conditions. 71 strains were tested for ligninolytic activities and 15 of them presented at least one enzymatic activity. Two of them showed their ligninolytique activities only on the media with inductors. Among the 15 fungi with enzymatic activities of interest, two basidiomycetes and 13 ascomycetes belonging to 6 different genera were identified. 12 ascomycetes were already described in the literature with laccase, Lip or Mnp activity. To our knowledge, the two basidiomycetes *Peniophora versicolor* and *Piptoporus betulinus* were not described for producing ligninolytic activities. Besides *Scedosporium apiospermum* showed laccase activity during the screening. Experiments of lignin degradation were carried out with the culture supernatant of this fungus. The results showed that the enzymes contained in *S. apiospermum* were able to modify the lignin polymer. This fungus was thus selected to further characterize its laccase like enzymes detected by the screening. Thanks to an *in-silico* screening in the genome of *S. apiospermum* 9 putative laccase genes were detected. Five putative laccase genes were then amplified with success from a cDNA library obtained from the mRNA of the fungus. Those five genes were cloned in the yeast *Yarrowia lipolytica*.

In the conditions of the study, two genes called Lac2 and ITMO2 allowed the production of two active enzymes. In their primary structure, the two enzymes present the characteristic sites of copper coordination of multicopper oxidases. Lac2 and ITMO2 present an optimum pH of 3 and 5 respectively. Those two enzymes show an oxidative activity on various phenolic substrates such as 2.6 dimetoxyphenol, pyrogallol and dopamine but also on non-phenolic substrates including 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) and *o*-Dianisidine

Key words: Lignin, ligninolytic enzymes, screening, biodiversity, *Scedosporium apiospermum*

Remerciements

Je tiens à remercier mes directeurs de thèse, Vincent Phalip et Patrick Fickers. Merci de m'avoir accompagné pendant ces trois années de thèse. Merci de m'avoir partagé vos précieuses connaissances ainsi que votre expérience scientifique.

Je remercie les membres de mon jury, Malgorzata Kus Liskewicz, Florence Husson, Harivony Rakotoarivonina et Rénato Froideveaux, d'avoir accepté d'évaluer mon travail de recherche.

Je souhaite témoigner ma reconnaissance à l'Université de Lille et au laboratoire Microbial processes and interactions (MiPI) de l'Université de Liège Gembloux agrobiotech, d'avoir financé intégralement mes travaux.

Je tiens également à remercier les membres de l'Institut Charles Viollette qui m'ont soutenu et apporté de précieux conseils. Je pense notamment à Roxanne pour son aide en microbiologie, à Matthieu pour ses conseils en biologie moléculaire et enfin à Barbara pour ses précieux services en chromatographie et en analyse de protéines. Je remercie tout spécialement mes collègues de bureau ou de paillasse avec qui j'ai passé tant de moments de qualité, d'entraide et d'échange. Je pense à Eléonore, Maxime, Angeline, Adrien, Théo, Ali, Justine, Stéphanie mais aussi à Kévin, Laurie -Anne ou encore Alexandre.

Un grand merci aux membres de l'équipe du MiPI pour le formidable accueil qu'ils m'ont réservé ainsi que pour toute l'aide qu'ils m'ont apportée. Un grand merci à Sébastien, Olivia, Anthony, Papa et Imen. Je voudrais remercier aussi les doctorants qui rendent l'ambiance du MiPI si chaleureuse, notamment, Cristina, Luca, Adrien, Augustin ou encore Guillaume.

Je souhaite exprimer ma gratitude à Betty Goblet une enseignante de seconde qui a su me donner le goût d'apprendre.

Je tiens aussi à remercier ma famille, surtout mes parents qui m'ont toujours poussé à cultiver ma curiosité et à aller au bout de mes idées.

Je remercie tout particulièrement ma formidable femme qui a su si bien encourager son thésard de mari. Elle, qui a supporté les longues séparations lorsque j'étais en Belgique, mais aussi mes horaires interminables. Merci du fond du cœur.

Table des matières

Résumé I
Abstract III
Remerciements V
Abréviations IX
Introduction générale 1
Chapitre 1 : Revue bibliographique 4
Introduction 5
1) La lignine 6
2) Les enzymes ligninolytiques 11
3) Les microorganismes producteurs d'enzymes ligninolytiques 18
4) Régulation et expression des laccases, Lip et Mnp fongiques 21
5) Production hétérologue des enzymes ligninolytiques de champignons 27
6) Valorisation et applications des enzymes ligninolytiques 30
7) Objectifs de la thèse 36
Chapitre 2 : Criblage de la biodiversité pour la recherche de nouvelles enzymes ligninolytique 37
Introduction du chapitre 2 38
Publication: Presentation of an extensive workflow for the detection of novel ligninolytic enzymes in the biodiversity that enable the detection and heterologous synthesis of two multicopper oxidases with laccase like activity in the ascomycete *Scedosporium apiospermum* 40
Introduction 42
1) Materials and methods 44
2) Results 53
3) Discussion 68
4) Détermination du pH optimum de Lac 2 et ITMO2 74
5) Analyse bio-informatique des laccases putatives de *Scedosporium apiospermum* 78

Chapitre 3 : Étude de l'influence des séquences signal sur la production de l'enzyme recombinante Lac2 84
Introduction 85
1) Matériel et méthodes 87
2) Résultats 88
3) Discussion 89
Chapitre 4 : détermination de la capacité des enzymes présentent dans le surnageant de *S. apiospermum* à modifier la lignine 92
Introduction 93
1) Matériel et méthode 94
2) Résultats et discussion 95
Conclusion générale et perspectives 101
Perspectives de ce travail de thèse 104
Références bibliographiques 106
Table des tableaux 128
Table des figures 130

Abréviations

- **ABTS** : 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt
- **BCCM/MUCL** : Belgian Coodinated Collection of Microoganisms Agro-food & Environmental Fungal Collection
- **cDNA ou ADNc** : ADN complémentaire
- **DMP** : 2,6-diméthoxyphénol
- **DNA ou ADN** : Acide désoxyribonucléique
- **FET3** : Iron transport multicopper oxidase
- **HBT** : 1-hydroxybenzotriazole
- **LC-ESI-MS/MS** : Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry
- **Lip** : Lignine peroxydase
- **LMS** : Système Laccase Médiateur
- **MBTH** : 3-Methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride
- **Mnp** : Manganèse peroxydase
- **MRE** : Metal Responsiv Element
- **mRNA** : Acide Ribonucléique Messager
- **PCR** : réaction de polymérisation en chaîne
- **PDA** : Potato Dextrose Agar
- **PES** : polyéthersulfone
- **qPCR** : PCR quantitative
- **RT-PCR** : Reverse Transcription PCR
- **SDS PAGE** : électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécysulfate de sodium
- **SF** : Fermentation submergée
- **SM1** : Screening Medium 1
- **SM2** : Screening Medium 2
- **SM3** : Screening Medium 3
- **SP3** : Peptide Signal 3
- **SP7** : Peptide Signal 7
- **SP7** : Peptide Signal 10
- **SPN** : Peptide Signal Natif
- **SSF** : Solid state fermentation
- **TEMPO** : 2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinyloxy, free radical, 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine 1-oxyl
- **XRE** : Xénobiotic responsive element
- **YPD** : Yeast Peptone Dextrose

Introduction générale

La lignine est le deuxième composé le plus abondant dans la nature après la cellulose (Sjostrom, 1993). Cette molécule représente la principale source renouvelable de polymères aromatiques de la planète (Gibson et al., 2015). La production mondiale de lignine est estimée à environ 70 millions de tonnes (Mandlekar et al., 2018). Il s'agit majoritairement de coproduits issus de l'industrie papetière ou du process de production du bioéthanol. La lignine issue de ces industries est utilisée depuis des décennies pour des applications de faible valeur ajoutée comme additif dans le béton ou encore comme carburant, par exemple pour générer la chaleur nécessaire au processus de fabrication du papier (Plank, 2004). Pourtant, la dégradation de la lignine permettrait de générer des oligomères susceptibles de remplacer les molécules plateformes pétrosourcées utilisées par les industries de la chimie fine, cosmétique et pharmaceutique. Des projections ont estimé que le maché potentiel de valorisation de la lignine pourrait s'élever autour de 6 milliards de dollars en 2022 (Insights, 2015). Ce marché sera majoritairement porté par des applications à forte valeur ajoutée comme la production de molécules plateformes ou la synthèse de matériaux à hautes performances comme des fibres de carbone (Agustin et al., 2021).

Cependant, la lignine est récalcitrante à la dégradation, rendant sa valorisation difficile. Cette difficulté est liée à la complexité de sa structure. Il s'agit en effet d'un hétéropolymère très complexe dont la dégradation nécessite plusieurs processus biologiques et chimiques qui ne sont pas encore complètement élucidés. Dans le contexte de la raréfaction des ressources en pétrole et de la demande sociétale pour des matériaux et des processus industriels plus respectueux de l'environnement (biosourcés plutôt que pétrosourcés), la lignine représente une réelle opportunité. La compréhension et la maîtrise de la dépolymérisation de cette biomolécule est donc la clé pour trouver des applications à plus hautes valeurs ajoutées.

Les enzymes représentent une des solutions les plus prometteuses pour dépolymériser efficacement la lignine. Leur capacité à opérer dans des conditions réactionnelles douces en termes de températures, de pH, sans l'utilisation de solvants toxiques les rendent attractives pour les scientifiques et

les industriels. Dans la nature, plusieurs microorganismes comme les champignons et les bactéries, sont connus pour sécréter des enzymes modifiant la lignine. Les champignons, principaux producteurs d'enzymes ligninolytiques (Wong, 2009) utilisent majoritairement trois grands types d'enzymes à cette fin : les laccases, les lignine peroxydases (Lip) et les manganèse peroxydases (Mnp) (Janusz et al., 2013). Ces enzymes ont la particularité de présenter une activité d'oxydoréduction vis-à-vis d'un large panel de composés organiques phénoliques et non phénoliques comme les constituants de la lignine, mais également une large gamme de composés xénobiotiques et de colorants de synthèse (Dao et al., 2019b) (Merino-Restrepo et al., 2020). Ainsi l'intérêt pour ces enzymes est lié à la dégradation de la lignine mais aussi comme agents dans le traitement d'effluents industriels ou la bioremédiation de sols contaminés.

De nos jours, la recherche se concentre principalement sur les enzymes produites par les basidiomycètes du groupe des pourritures blanches. Ces champignons ont été les premiers décrits comme catalyseurs de la dépolymérisation de la lignine (Pollegioni et al., 2015). La dégradation enzymatique opérée par les ascomycètes est également étudiée mais pas autant que celles des pourritures blanches(Janusz et al., 2017). De nos jours, peu d'enzymes sont disponibles sur le marché. Ils viennent principalement de quatre genres de basidiomycètes : *Trametes*, *Pleurotus*, *Phanerochaete* et *Agaricus*. Malgré les recherches des 20 dernières années, aucun processus enzymatique capable de dégrader quantitativement / ou complètement la lignine n'a encore été mis au point. Cela peut être expliqué par le manque de diversité d'enzymes disponibles sur le marché impliquant le besoin d'isoler et de caractériser de nouvelles sources d'enzymes ligninolytiques.

Les travaux de cette thèse s'inscrivent donc dans cette recherche de nouvelles enzymes de type laccases, Lip et Mnp dans la biodiversité. Pour cela, nous avons suivi une démarche qui nous a permis d'isoler des microorganismes d'intérêts provenant de différents écosystèmes. Nous avons ensuite mené des travaux de criblages d'activités enzymatiques afin de révéler les champignons capables de produire des enzymes ligninolytiques. Une souche de *Scedosporium apiospermum* s'est révélée particulièrement intéressante à étudier. Son génome révèle neuf gènes codant des laccases putatives. Nous avons produit deux oxydoréductases présentant effectivement une activité de type laccase.

Ce projet de thèse a été mené en cotutelle entre l'Université de Lille et l'Université de Liège Gembloux-AgroBiotech. Cette collaboration s'est effectuée dans le cadre de la création de l'Unité de Mixte de Recherche transfrontalière (UMRt) BioEcoAgro regroupant l'Université de Lille, de Liège ainsi que l'Université de Picardie Jules Verne et l'INRAE.

Les travaux de cette thèse sont présentés dans ce manuscrit comprenant 4 chapitres. Le premier a pour but de présenter le contexte scientifique du projet par une étude bibliographique. Le deuxième chapitre décrira une démarche partant de la sélection d'écosystèmes à la caractérisation d'enzymes d'intérêts après leur production par voie hétérologue. Le chapitre trois présentera une expérience portant sur l'étude de l'influence des séquences signal sur la production des enzymes recombinantes obtenues lors du chapitre 2. Le quatrième chapitre portera sur des essais de dépolymérisation d'une lignine organosolv. Ces travaux nous ont permis d'évaluer la capacité du champignon *Scedosporium apiospermum* à modifier la lignine. Ce manuscrit s'achèvera par une conclusion donnant des perspectives qui se sont ouvertes grâce à ces travaux de recherche.

Chapitre 1 : Revue bibliographique

Introduction

Les champignons sont les principaux organismes capables de dégrader le polymère de lignine dans le milieu naturel. Pour cela, ils utilisent principalement trois types d'enzymes : les laccases, les manganèses peroxydases (Mnp) et les lignines peroxydases (Lip).

Ce projet de thèse a pour but de rechercher dans la biodiversité de nouvelles enzymes ligninolytiques. Les caractéristiques de la lignine, les enzymes capables de la dégrader ainsi que les voies de valorisation de la lignine ont fait l'objet de nombreux travaux.

La structure polymérique complexe de la lignine sera décrite ainsi que les principaux moyens d'extractions de cette molécule de la biomasse lignocellulosique.

Les caractéristiques des laccases, des Lip et des Mnp seront présentées et leurs cycles catalytiques seront explicités. Les tests enzymatiques utilisés pour détecter ou quantifier l'activité de ces enzymes seront par la suite présenté. Les principaux champignons connus pour produire ces trois enzymes seront également présentés.

La recherche sur l'induction de l'expression des gènes codant les enzymes ligninolytiques est également utile pour révéler ou augmenter la production de ces enzymes par les champignons. Les moyens permettant d'induire la production de ces enzymes seront donc également décrits.

Afin de caractériser une nouvelle enzyme, il est important de pouvoir identifier le gène codant pour cette protéine mais également de pouvoir la produire de manière simple et répétable. C'est pourquoi une partie sera consacrée à la présentation de la production hétérologue des enzymes ligninolytiques fongiques.

Enfin différentes applications industrielles des laccases Lip et Mnp seront détaillées.

1) La lignine

1.1) Rôle de la lignine

La lignine est un hétéropolymère complexe et un des principaux composants du bois avec la cellulose et les hémicelluloses (Sluiter et al., 2010). Cette molécule joue un rôle fondamental dans la biologie des plantes car elle est responsable de la rigidité de la structure des tissus végétaux en assurant la cohésion des fibres de cellulose et d'hémicellulose qui s'y trouvent (Jones et al., 2001). La lignine joue également un rôle crucial dans la transmission de l'eau et des sèves au sein de la plante. C'est en effet, un polymère insoluble qui permet de rendre imperméable les canaux du système vasculaire des plantes et ainsi rendre possible la circulation de la sève brute et élaborée. Enfin, c'est un polymère extrêmement solide et récalcitrant à la dégradation qui joue le rôle de barrière contre les différents pathogènes des plantes (M. Xie et al., 2018) (Bi et al., 2011).

1.2) Structure et composition

Le polymère de lignine est formé par un mécanisme de polycondensation aléatoire de trois sous unités appelées monolignols, à savoir : l'alcool paracoumarylique (unité H), l'alcool conifé rylique (unité G) et l'alcool sinapylique (unité S). Comme le montre la Figure *2*, la différence entre ces trois sous-unités se trouve dans la nature et le nombre de substitutions sur leur noyau aromatique.

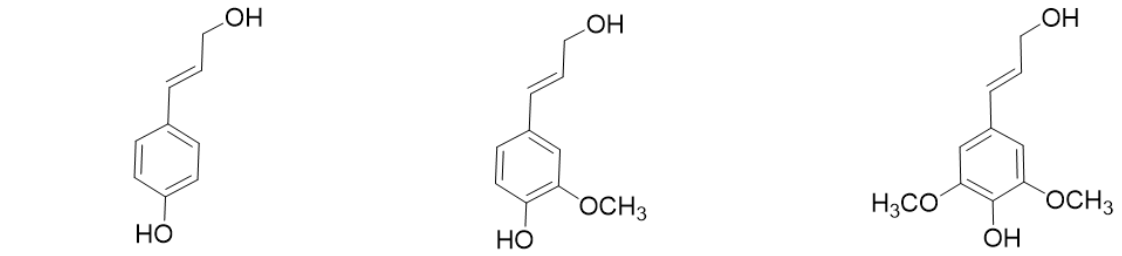

Figure 1 Représentation des trois monolignols constituant le polymère de lignine

Au sein du règne végétal, la proportion de chaque monolignol dans le polymère de lignine diffère très fortement selon l'espèce, la localisation dans la plante et la nature du tissu (Agarwal & Atalla, 1986).

Les gymnospermes (pin, cyprès, cèdre) contiennent quasiment exclusivement des unités G. Les feuillus qui sont des angiospermes dicotylédones, présentent des unités G et H. Les monocotylédones possèdent les trois sous-unités G, S et H. De la lignine fut également trouvée en dehors du règne végétal, dans l'algue rouge *Calliarthron cheilosporioides* qui contient également les trois sous-unités (Martone et al., 2009).

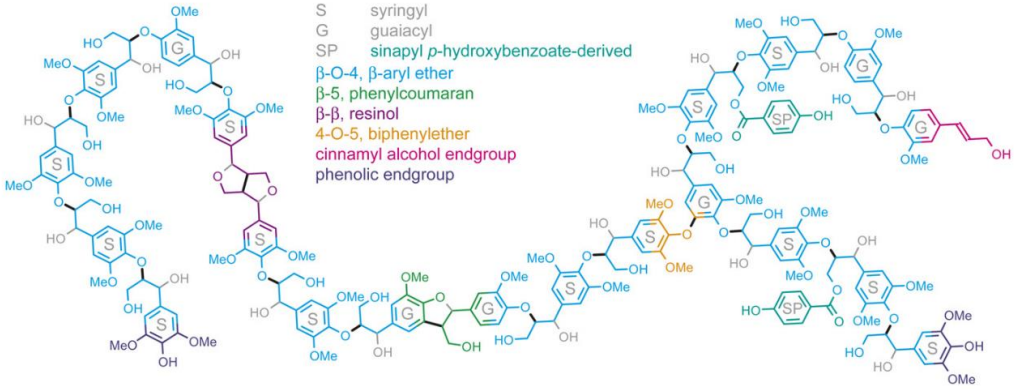

Figure 2 Représentation d'une lignine de peuplier. La structure a été prédite à partir d'analyse RMN. Figure extraite de (Vanholme et al., 2010)

Pour former une molécule de lignine, les monolignols sont associés entre eux par deux grands types de liaisons. Tout d'abord, il y a les liaisons oxygène-carbone comme les liaisons éther β-O-4, α-O-4 ainsi que les liaisons diary-ether 4-O-5 (Takahashi & Koshijima, 1988). Il y a également des liaisons carbone-carbone comme les liaisons β-β, 5-5 and β-1(Freudenberg & Neish, 1968). Les différents types de liaisons sont résumés par la Figure 2. Cette variété de types de liaisons et leur répartition aléatoire au sein du polymère fait de la lignine une molécule extrêmement stable et récalcitrante au processus de dégradation.

1.3) La lignine comme coproduit industriel

Différentes industries comme la fabrication de papier ou la production de bioéthanol utilisent la biomasse lignocellulosique comme matière première mais s'intéresse principalement à la cellulose et aux hémicelluloses. Pour ces industries, la lignine constitue un composé qu'il faut éliminer pour avoir un meilleur accès aux fibres cellulosiques. Plusieurs procédés ont ainsi été mis en place pour extraire la lignine en la modifiant et ainsi générer plusieurs coproduits appelés lignines techniques. Trois processus industriels sont utilisés, le procédé Kraft, organosolv et le procédé aux sulfites. Ces processus donnent des produits très différents en termes de structure et de pureté, dont les potentiels de valorisation sont variables.

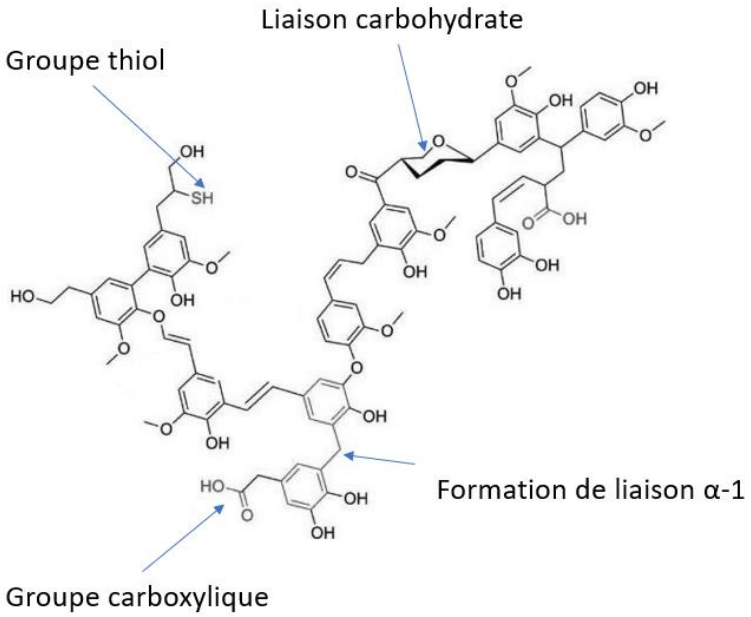

Figure 3: Représentation d'une lignine Kraft tirée de (Cesari, 2017) et modifiée

Le procédé Kraft est le plus couramment utilisé pour séparer la lignine de la cellulose et des hémicelluloses. Ce procédé utilise un traitement à haute température (entre 150 et 180 °C) associé à l'ajout d'une solution de soude et de sulfure de sodium (Dahl, 1884) (Knapp & Wethern, 1958).

La présence de ces ions dénature les liaisons entre le polymère de lignine et les fibres de cellulose et dénature les liaisons β-O-4 au sein de la lignine. Cela génère une liqueur noire dont la lignine est extraite par une précipitation acide utilisant de l'acide sulfurique.

Ce procédé modifie fortement la structure native du polymère de lignine avec la suppression des liaisons β-O-4 entre les monolignols et introduit des liaisons carbohydrates et des groupes thiol comme le montre la Figure 3

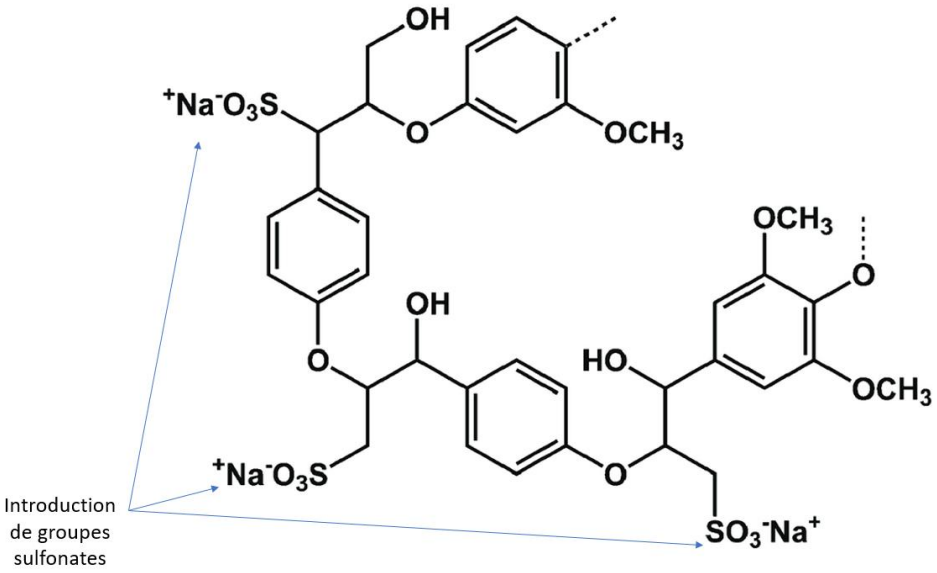

Figure 4 Représentation d'une lignine issue du procédé aux sulfites tirée de (Ghafarnejad Parto et al., 2018)

Le procédé aux sulfites consiste en un traitement de la biomasse lignocellulosique avec une solution contenant des ions sulfites et disulfites capables de dégrader les liaisons entre la lignine et la cellulose. Cette méthode produit une liqueur rouge qui contient de la lignine fortement modifiée appelée lignosulfonate. Comme le montre la Figure 4, ce type de lignine technique présente un haut niveau de modifications (sulfonation 4 à 8%) qui lui confèrent des propriétés assez différentes de la lignine native. Les lignosulfonates sont en effet facilement solubles dans l'eau contrairement à la lignine native. Ce procédé est utilisé à grande échelle partout dans le monde et génère des déchets dangereux et polluants qui doivent être traités. De plus, les lignines techniques obtenues par ce procédé, présentent de nombreuses impuretés comme des sucres et des composés minéraux issues du bois, ce qui constitue une difficulté supplémentaire pour des valorisations à haute valeur ajoutée.

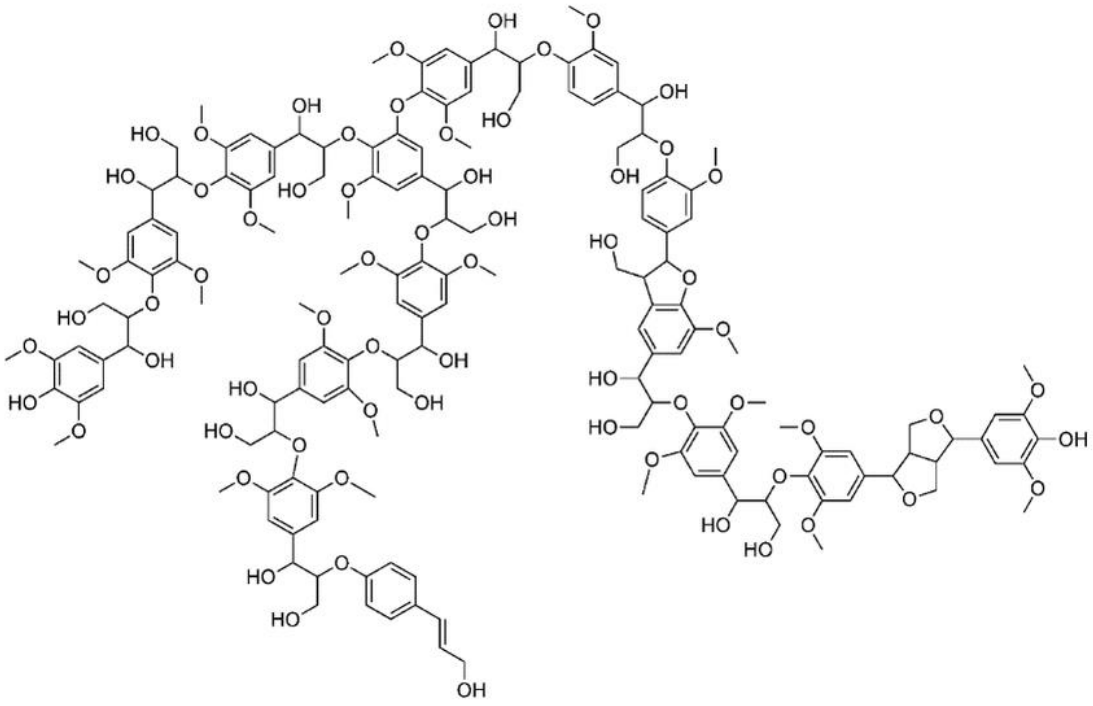

Figure 5 Représentation d'une lignine organosolv tirée de (Cesari, 2017)

Le procédé organosolv est une méthode assez différente des procédés Kraft et aux sulfites. Il est d'ailleurs considéré comme plus écologique. Ce procédé utilise de manière séquentielle, plusieurs solvants organiques comme l'éthanol, le méthanol et l'éthylène glycol en combinaison avec de la soude et plusieurs acides organiques (Kleinert, 1971). Les différents solvants peuvent être récupérés et réutilisés, ce qui limite l'impact environnemental de ce procédé. C'est une des lignines techniques dont la structure est la plus proche de la structure native comme le montre la Figure 5.

De plus, les lignines organosolv ont l'intérêt d'être plus pures que les lignines Kraft et lignosulfonates (Werpy & Petersen, 2004). C'est une des lignines techniques qui a le plus de potentiel en termes de valorisation sous forme de molécules plateformes.

Ces trois types de lignines techniques sont produites à très grande échelle partout dans le monde et sont malheureusement la plupart du temps considérées comme des déchets ou sont sous valorisées. En effet, de nos jours, la production mondiale de lignine se situe autour de 70 millions de tonnes (Mandlekar et al., 2018). Cependant cette production risque d'augmenter drastiquement avec le développement de la production de bioéthanol.

Par exemple aux États-Unis, certaines études estiment qu'à l'horizon 2030 la production nationale de lignine atteindra les 225 millions de tonnes (Holladay et al., 2007). Trouver un moyen de modifier ces polymères, permettrait de les valoriser. Cela permettrait également de limiter d'impact environnemental de ces molécules qui lorsqu'elles ne sont pas traitées constitue une menace pour l'environnement.

2) Les enzymes ligninolytiques

Les organismes capables de dégrader la lignine comme les champignons, utilisent plusieurs enzymes différentes qui peuvent être divisées en deux grandes classes, les laccases et les peroxydases. Il existe deux grands types de peroxydases capables de dégrader la lignine, les lignines peroxydases et les manganèses peroxydases.

2.1) Les laccases

Les laccases (EC 1.10.3.2 benzenediol : oxygène oxydoréductase) sont des phénols oxydases appartenant au groupe des oxydases à cuivres. La première laccase connue fut isolée de l'arbre japonais *Rhus vernicifera* (Reinhammar, 1970) et depuis, ce type d'enzymes a été trouvé chez presque tous les êtres vivants, surtout chez les champignons (Thurston, 1994), les bactéries (Mliki & Zimmermann, 1992) et les insectes (Suderman et al., 2006).

Si les laccases provenant des plantes sont directement impliquées dans le processus de synthèse de la lignine et sont produites pour opérer dans le milieu intracellulaire, les laccases d'origine fongique peuvent avoir des rôles plus variés. Certaines sont également destinées au milieu intracellulaire et peuvent jouer un rôle dans la pigmentation ou la sporulation du champignon (Nagai et al., 2003). Les laccases utilisées pour la dégradation de la lignine sont, quant à elles, sécrétées pour aller au contact du polymère. Ces enzymes peuvent présenter une structure monomérique, dimérique voire trimérique (Ng & Wang, 2004) en fonction de leur rôle et de leur localisation cellulaire. Les laccases sont également glycosylées (Perry et al., 1993), et leur degré de glycosylation varie en fonction de l'organisme qui les produit. Ces glycosylations jouent un rôle majeur dans leur activité (Maestre-Reyna et al., 2015). Ces enzymes présentent majoritairement une masse comprise entre 50 et 110 kDa (Wong, 2009).

Les laccases sont des oxydases à cuivres, leurs sites actifs ont la particularité de contenir quatre atomes de cuivre répartis en trois types de sites différents : type 1 (T1 un atome de cuivre), type 2 (T2 un atome de cuivre) et type 3 (T3 deux atomes de cuivre) (Figure 6)

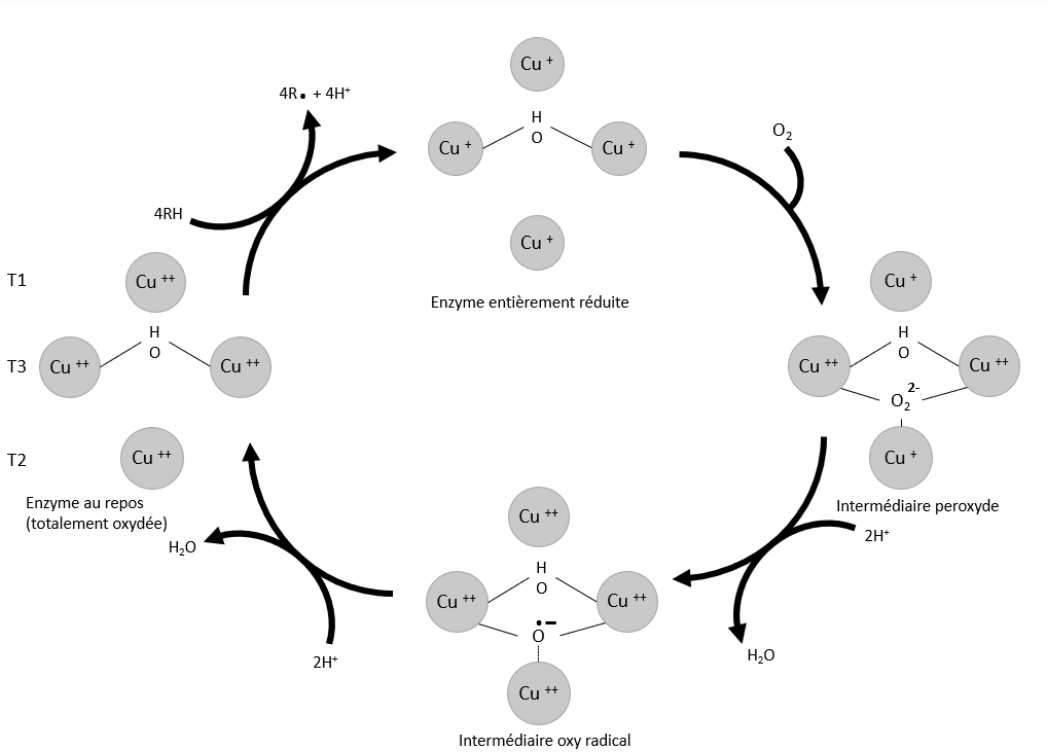

Figure 6 Mode d'action et mécanisme d'oxydoréduction des laccases

Le mécanisme d'oxydoréduction des laccases débute par la capture d'un électron, provenant d'un substrat réducteur, par l'atome de cuivre T1 (Figure 6). Cet électron est transféré vers un groupe trinucléaire formé par T2 et T3. Quatre réactions de réduction successives sont effectuées avant l'obtention de la forme entièrement réduite de la protéine. Une molécule de dioxygène est ensuite piégée par le cluster T2/T3 pour que l'enzyme forme un intermédiaire peroxyde. Une réduction de la molécule de dioxygène est ensuite accomplie pour que l'enzyme retrouve sa forme initiale en passant par une forme intermédiaire oxy-radical.

Les laccases sont capables d'oxyder une grande variété de substrats organiques, qu'ils soient phénoliques ou non-phénoliques (Wong, 2009).

Les laccases sont donc capables de dégrader la lignine mais également un grand panel de molécules organiques comme des colorants industriels ou des xénobiotiques (D'Souza et al., 2006)(Dao et al., 2019b).

Cependant, le potentiel redox des laccases fongiques est relativement faible (autour de 0,8 V) (Wong, 2009) ce qui peut limiter leur capacité à dégrader des molécules aussi complexes que la lignine. Il se peut également que le substrat à dégrader soit d'une taille trop importante pour être reconnu par le site actif de l'enzyme. Les laccases ont donc recours à ce que l'on appelle un médiateur pour former un système Laccase-médiateur (LMS). Les médiateurs sont des molécules organiques de petites tailles permettant de faire le lien entre une laccase et son substrat. Comme le montre la Figure *7*, le médiateur est en fait oxydé par la laccase puis entre en contact avec le substrat pour l'oxyder à son tour. Le médiateur ayant retrouvé sa forme réduite pourra à nouveau être utilisé par l'enzyme (Mani et al., 2018).

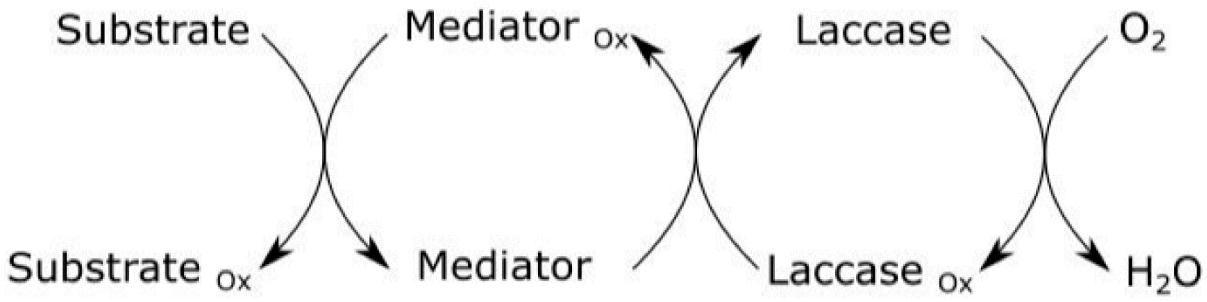

Figure 7 Fonctionnement du système laccase-médiateur (LMS) permettant l'oxydation indirect d'un substrat complexe par une laccase (Mani et al., 2018)

Dans la nature, les médiateurs peuvent provenir de l'organisme producteur de laccases qui assure ainsi leur bon fonctionnement (Eggert et al., 1996b). Il peut également s'agir de monomères de lignine provenant d'un début de dégradation du polymère par d'autre microorganismes ou d'autres enzymes (Gutiérrez et al., 2007). En laboratoire, de nombreux médiateurs d'origine synthétique ont été utilisés avec succès. Les plus connus sont l'ABTS (2,2'-Azinobis-(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonic Acid)), HBT (1-hydroxybenztrialzole), acide violurique et le TEMPO (2,2,6,6-tetra-methyl-1-piperidinyloxy).

La capacité qu'ont les laccases d'oxyder un si grand panel de composés différents, confère à ces enzymes énormément d'applications biotechnologiques. C'est pour cela que ces enzymes font toujours l'objet d'intenses recherches fondamentales et appliquées.

2.2) Les lignine peroxydases (Lip)

Les lignines peroxydases (EC 1.11.11.4) appartiennent à la famille des peroxydases à hème. Elles sont capables d'oxyder une très grande variété de composés aromatiques comme la lignine mais également des colorants de synthèse et d'autres polluants (Tien & Kirk, 1988) (Valli et al., 1990) en présence de peroxyde d'hydrogène. La première Lip fut découverte chez le basidiomycète *Phanerochaete chrysosporium* (Tien & Kirk, 1988). Ces enzymes se trouvent majoritairement chez les champignons même si certaines études rapportent la présence de Lip chez certaines bactéries comme *Enterobacter hormaechei, Bacillus licheniformis* et *Streptomyces viridosporus* (H. Zhou et al., 2017) (Z. Wang et al., 1990). Les Lip sont des enzymes monomériques et glycosylées qui présentent une structure globulaire composée de 8 hélices α réparties en deux domaines (Wong, 2009). Le poids moléculaire d'une Lip varie entre 38 et 50 kDa.

Les lignines peroxydases ont la particularité d'être actives à pH relativement acide. La plupart d'entre elles montrent, en effet, un pH optimal autour de 3. Ces enzymes possèdent un potentiel redox relativement haut (jusqu'à 1,4V) mais nécessitent la présence de peroxyde d'hydrogène pour initier leur cycle catalytique.

Leur cycle catalytique est relativement similaire à celui d'autres peroxydases à hème comme la peroxydase du raifort.

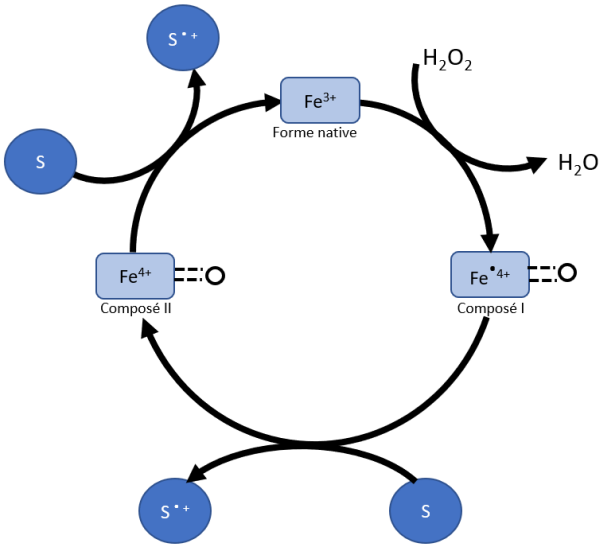

Figure 8: Représentation du cycle catalytique d'une Lip

Comme le montre la Figure 8, la première étape du cycle catalytique d'une Lip, consiste en la réduction d'une molécule de peroxyde d'hydrogène, ce qui produit un intermédiaire oxydé de l'enzyme (composé I) ainsi qu'une molécule d'eau. L'étape suivante consiste en l'oxydation d'un substrat réducteur (noté S) par un transfert d'électron opéré par le composé I. Cette réaction produit un radicale libre (noté $S^{\cdot -}$) ainsi qu'un second intermédiaire de l'enzyme appelé composé II. Enfin l'enzyme récupère sa forme initiale en oxydant une autre molécule de substrat en produisant un autre radical libre.

2.3) Les manganèses peroxydases (Mnp)

Les manganèses peroxydases (EC 1.11.1.13) sont également des peroxydases à hème. Elles ont été détectées dans la plupart des champignons ligninolytiques connus, surtout chez les basidiomycètes responsables du phénomène de pourriture blanche.

Le fonctionnement des Mnp est très proche de celui des Lip. Le cycle catalytique des Mnp commence par l'oxydation du peroxyde d'hydrogène et l'enzyme passe par deux états avant de retrouver sa forme initiale (Figure 9). La différence principale entre les deux familles d'enzymes tient au fait que les Mnp n'agissent pas directement sur la molécule de lignine. Leur substrat est le manganèse qui une fois oxydé en Mn^{3+}, diffuse à l'intérieur de la matrice lignocellulosique et peut ainsi oxyder la lignine. Le manganèse est alors réduit et pourra à nouveau être utilisé par l'enzyme pour un nouveau cycle catalytique.

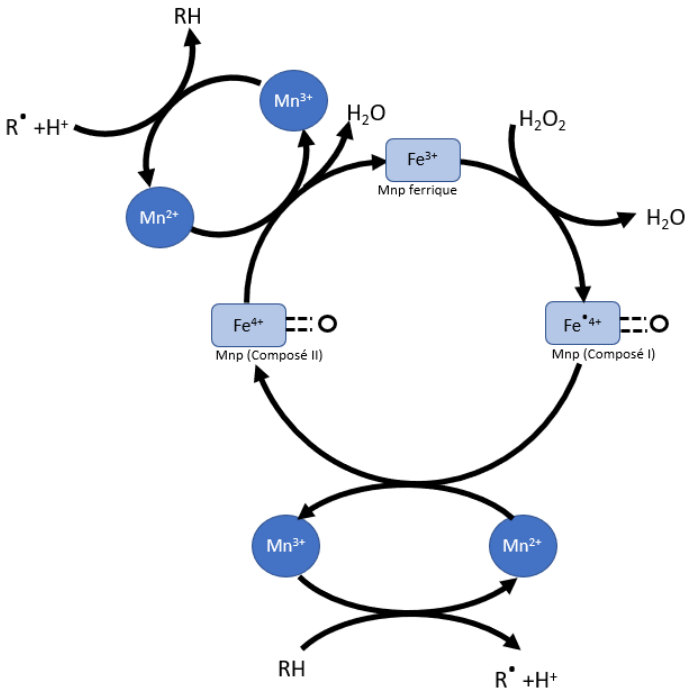

Figure 9 Cycle catalytique des manganèses peroxydases

2.4) Mise en évidence et quantification de l'activité des enzymes ligninolytiques

Pour détecter les activités laccase, Lip ou Mnp, plusieurs méthodes sont possibles. Elles reposent sur le suivi de l'oxydation d'un substrat phénolique ou non phénolique (Table 1). A des fins de criblage, les tests les plus simples sont les tests en milieux solide sur boites de Petri. Un substrat comme l'ABTS ou le gaïacol est intégré au milieu de cultures choisies pour cultiver une souche d'intérêt. Si au cours de la croissance du microorganisme, des halos colorés apparaissent dans la gélose cela signifie que des enzymes ayant une activité rédox ont été sécrétées (Cruz Ramírez et al., 2012). Cependant, ces tests sont peu spécifiques car ils ne donnent pas d'informations précises sur le type des enzymes sécrétées (laccase, Lip et /ou Mnp). Ils sont également peu sensibles et ne permettent pas de déterminer quantitativement une activité enzymatique.

Dans la littérature, des méthodes de quantification en milieu liquide ont également été développées. Elles reposent sur le suivi de l'oxydation d'un substrat par spectrophotométrie.

L'activité laccase est souvent déterminée par le suivi de l'oxydation de l'ABTS ou de la syringaldazine à pH 5 comme le montre le tableau 1.

Tableau 1 Exemple de substrats utilisés pour la détection ou la caractérisation de laccases, Lip et Mnp.

Enzyme	Substrat	pH	Longueur d'onde (nm)	Référence
Laccase	ABTS	5	450	(Zheng et al., 2017)
	2.6 dimetoxyphenol	6	468	(Unuofin et al., 2019b)
	Gaïacol	6	470	(Unuofin et al., 2019b)
	Syringaldazine	5	525	(Mikiashvili et al., 2006)
	Pyrogallol	5	450	(Bach et al., 2013)
	Catechol	4,5	390	(Ezike et al., 2021)
Lip	Alcool de vératryle	3	310	(Tien & Kirk, 1988)
	Rouge de phénol	4,5	610	(Mikiashvili et al., 2006)
	ABTS	3	410	(Ander & Messner, 1998)
Mnp	Mn^{2+}	3	210	(Fujian et al., 2001)
	Vanillylacetone	4,5	336	(Galliano et al., 1991)
	Rouge de phénol	4,5	610	(Mikiashvili et al., 2006)
	2,6 dimétoxyphénol	5	469	(S. Zhou et al., 2015)
	ABTS	4,5	420	(Mester & Field, 1998)

Les lignines peroxydases sont couramment détectées par le suivi de l'oxydation de l'alcool de vératryle ou d'autres substrats comme le rouge de phénol et l'ABTS en présence de peroxyde d'hydrogène. Dans le cas d'une solution enzymatique non purifiée, une condition sans peroxyde d'hydrogène est réalisée afin de déduire l'action d'autres enzymes sur le substrat (Mikiashvili et al., 2006). La présence de Mnp est en général déterminée par le suivi de l'oxydation du Mn^{2+} en Mn^{3+} en présence de peroxyde d'hydrogène. Cependant, d'autres substrats peuvent être utilisés comme le rouge de phénol l'ABTS ou le 2,6 dimétoxyphénol en présence de Mn2+ et de peroxyde d'hydrogène. Lorsque l'on teste un surnageant de culture non purifié, une condition sans Mn^{2+} doit être implémentée pour soustraire l'action d'autres enzymes sur le substrat (Zhou et al., 2015). Ces tests ont l'avantage de différencier les trois activités lac, lip et Mnp mais aussi de quantifier l'activité enzymatique.

3) Les microorganismes producteurs d'enzymes ligninolytiques

La dégradation naturelle de la lignine implique l'action de plusieurs types de microorganismes. Le processus de dégradation de ce polymère n'est pas encore vraiment élucidé à cause de la complexité de la molécule. De nombreuses études ont tout de même montré que les microorganismes ligninolytiques sont majoritairement des champignons ou des bactéries (Andlar et al., 2018) (M. E. Brown & Chang, 2014). Le rôle des champignons semble, toutefois, prédominant par rapport à celui des bactéries.

Parmi les champignons, la recherche s'est historiquement concentrée sur les basidiomycètes. En fonction de leur biologie et des enzymes qu'ils produisent, les basidiomycètes ont été classés en trois grands groupes avec des capacités ligninolytiques plus ou moins importantes. On retrouve en premier le groupe des pourritures blanches, puis les pourritures brunes et les décomposeurs de litière. Depuis, la recherche s'est également intéressée au potentiel ligninolytique des ascomycètes qui participent également à la dégradation de la lignine.

3.1) Les pourritures blanches

Les champignons du groupe des pourritures blanches sont capables de dégrader la lignine du bois et provoque un blanchiment caractéristique des fibres du bois. Ces champignons sont souvent saprophytes comme *Trametes versicolor* mais certains sont également parasites des arbres comme *Heterobasidion annosum* qui est un parasite des résineux.

Ces champignons ont été les premiers caractérisés comme possédant des enzymes ligninolytiques et sont d'ailleurs les plus étudiés sur ce sujet. La majorité des champignons de ce groupe a la capacité de produire les trois grands types d'enzymes ligninolytiques que sont les laccases, les Lip et les Mnp. Ils attaquent préférentiellement la lignine et peuvent l'utiliser comme source de carbone (del Cerro et al., 2021). Cette caractéristique permet de les utiliser en fermentation solide, pour réaliser des prétraitements de la biomasse lignocellulosique dans le but de faciliter l'accès aux celluloses et hémicelluloses. Ils sont donc parfois utilisés dans l'industrie du papier et du bioéthanol (Robert A, 1984) (Salvachúa et al., 2011).

3.2) Les pourritures brunes

Les champignons faisant partie du groupe des pourritures brunes sont également des basidiomycètes. A l'instar des pourritures blanches, certains champignons des pourritures brunes sont des parasites des arbres qu'ils colonisent et d'autres des saprophytes. Ils sont responsables d'un phénomène de brunissement caractéristique du bois provoquant sa fracturation en morceaux cubiques. Ces champignons semblent se limiter à modifier la lignine sans la dégrader complètement pour avoir accès à la cellulose et aux hémicelluloses (Howell et al., 2009). Ainsi les pourritures brunes sont capables d'opérer une déméthylation de composés phénoliques et non phénoliques mais aussi de cliver certains noyaux aromatiques du polymère de lignine (Kirk & Adler, 1970). Des laccases ont été trouvées chez plusieurs de ces champignons et notamment chez *Fomitopsis pinicola* (Csarman et al., 2021) ainsi que des lignines peroxydases comme chez *Polyporus ostreiformis* (Dey et al., 1994). Ils sont donc capables de réaliser une dégradation partielle de la lignine d'une intensité bien moins importante que les pourritures blanches.

3.3) Les basidiomycètes décomposeurs de litière

Ces basidiomycètes poussent essentiellement dans la litière forestière qui est composée de divers débris ligneux comme des feuilles ou des branchages. Ils sont également au contact de matières organiques en décomposition qui contiennent encore des résidus de lignine en cours de dégradation (Wang et al., 2021). Ces champignons possèdent un arsenal enzymatique capable de modifier et de dégrader la lignine. *Agaricus arvensis et Clitopilus passeckerianus* ont, par exemple, montré une activité laccase mais également manganèse peroxydase (Eichlerová & Baldrian, 2020). *Coprinus cinereus* possède également des laccases dont certaines sont bien caractérisées (Yaver et al., 1999).

3.4) La dégradation de la lignine par les ascomycètes

Après s'être concentrée principalement sur les basidiomycètes, la recherche se concentre désormais au potentiel ligninolytique des ascomycètes.

Ces champignons sont presque ubiquitaires et représentent la majorité des espèces fongiques dans le sol et la biomasse lignocellulosique en décomposition (Egidi et al., 2019).

De plus, ils semblent être tout particulièrement adaptés à des biotopes moins favorables aux basidiomycètes comme les environnements secs (Abe, 1989), mais aussi les environnements marins comme les mangroves (Arfi et al., 2013). Les composts sont aussi favorables au développement des ascomycètes présentant des activités ligninolytiques(Tuomela et al., 2000).

Des études ont en effet montré que des ascomycètes appartenant à plusieurs classes telle les *Dothideomycetes, Eurotiomycetes, Sordariomycetes* sont capables de croitre dans des milieux avec de la lignine comme seule source de carbone (Bi et al., 2012) (Bi et al., 2016). De plus, les trois principales enzymes ligninolytiques ont été retrouvées dans les ascomycètes. Par exemple, une souche d'*Aspergillus oryzae* a montré la capacité de sécréter des enzymes de type Lip et Mnp (Guo et al., 2014). Plusieurs espèces du genre *Fusarium* ont également montré leur capacité de dégrader de la lignine comme *Fusarium proliferatum* ou *Fusarium solani* (Lozovaya et al., 2006) (Anderson et al., 2005). Les champignons du genre *Fusarium* présentent, de plus, des enzymes de type laccase notamment *Fusarium oxysporum* (Cañero & Roncero, 2008) mais également des Mnp et Lip comme *Fusarium solani* (Obruca et al., 2012). En outre, plusieurs espèces au sein du genre *Trichoderma* ont montré une capacité de sécréter des laccases (Umar, 2021).

3.5) dégradation de la lignine par les bactéries

Les bactéries jouent également un rôle dans la dégradation de la lignine. Certaines bactéries sont en effet capables de produire des enzymes ligninolytiques comme des laccases ou des peroxydases (M. E. Brown & Chang, 2014).

Ces bactéries proviennent majoritairement du sol ou de matières lignocellulosiques en putréfaction. Parmi elles, les bactéries du genre *Streptomyces* sont reconnues pour leur capacité à dégrader la lignine dans les sols et les débris végétaux. *Streptomyces viridosporus* est notamment connu pour produire une lignine peroxydase capable de dégrader des matériaux lignocellulosiques (Z. Wang et al., 1990). Les *Streptomyces* sont également capables de sécréter des laccases plus petites que celles trouvées chez les champignons (Majumdar et al., 2014). *Streptomyces coelicolor, Streptomyces lividans* et *S. viridosporus* produisent chacun des laccases qui peuvent dépolymériser des polymères de lignine (Majumdar et al., 2014).

Les bactéries du genre *Rhodococcus* comme Rhodococcus *opacus* sont également connues pour leur capacité à dégrader la lignine en la métabolisant principalement en lipides (Jiang et al., 2022).

Les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* produisent aussi des laccases comme *Pseudomonas putida* qui possède une laccase capable de dégrader différents xénobiotiques (Kuddus et al., 2013).Des espèces du genre *Bacillus* produisent également des laccases capables de dégrader la lignine comme *Bacillus sp* ou *Bacillus halodurans*.

Si la majorité des bactéries capables de dégrader la lignine se trouvent dans le sol, certaines peuvent également peupler le microbiote d'organismes herbivore ou xylophage comme les termites ou encore le panda. En effet *Bacillus sp.* CF96, présent au sein du microbiote des termites, possède une laccase capable de dégrader de nombreuses molécules aromatiques proches de la lignine (Javadzadeh & Asoodeh, 2020). De même *P. putida* provenant du tractus digestif du panda géant présente des multicopper oxydases montrant une activité ligninolytique.

4) Régulation et expression des laccases, Lip et Mnp fongiques

Dans la nature, les microorganismes comme les champignons, adaptent leur métabolisme en réponse aux conditions environnementales. La production des enzymes ligninolytiques par les champignons peut en effet être dépendante de *stimuli* spécifiques. Par mimétisme, la connaissance des mécanismes de régulations de l'expression des gènes codant ces enzymes, permet d'envisager de mettre en place les conditions nécessaires à la production de ces enzymes in vitro et ainsi pouvoir les détecter. Dans la littérature, plusieurs moyens d'induire la production des laccases, Lip et Mnp ont été décrits.

Ces enzymes peuvent en effet être produites en réponse à la présence dans le milieu de culture de métaux, de composés organiques ou de biomasse lignocellulosique.

L'apport en carbone et en azote ainsi que la température jouent également un rôle dans la régulation de l'expression des gènes correspondants.

4.1) Induction par des ions métalliques

La régulation des enzymes ligninolytiques par des ions métalliques est assez répandue chez tous les champignons. La présence d'ions Cu^{2+} notamment permet d'augmenter sensiblement la production de laccases. La présence de 400 µM de Cu^{2+} dans le milieu de culture de *Trametes versicolor* permet de multiplier la production de laccase d'un facteur 18 (Collins & Dobson, 1997). Un effet similaire a été observé chez d'autres champignons tels que *Trametes pubescens* (Galhaup & Haltrich, 2001) ,*Pleurotus ostreatus* (Tinoco et al., 2011), *Lentinus sajor-caju* (Soden & Dobson, 2001) et *Coriolopsis rigida* (Saparrat et al., 2010).

La présence d'ion Mn^{2+} et Zn^{2+} favorisent aussi la production d'enzymes ligninolytiques chez certains champignons. Mn^{2+} induit la production de laccases par *L. sajor-caju* (Soden & Dobson, 2001) mais également de Mnp par *Ceriporiopsis subvermispora* (Ruttimann et al., 1992). La présence de Zn^{2+} permet aussi une plus grande production de laccases par *Cerrena sp* (Yang et al., 2016).

Cependant il a été démontré que Mn^{2+} peut également avoir un effet répresseur pour la production de laccases par *C. subvermispora* (Manubens et al., 2007).

La présence d'ions métalliques comme Cu^{2+}, Zn^{2+} et Mn^{2+} agit directement sur le niveau d'expression des gènes codants pour les enzymes (Yang et al., 2016) (Saparrat et al., 2010). Cela est permis par la présence de régions MRE (Metal Responsive Element) au sein des promoteurs des gènes codants pour les enzymes. La présence de ces régions au motif très conservé a été démontrée en amont de gènes de laccases de *P. ostreatus* (Giardina et al., 1999), de *T. pubescens* (Galhaup, Goller, et al., 2002a). Des régions MRE ont aussi été caractérisées au niveau des promoteurs de gènes codants pour des Mnp de *P. chrysosporium* qui ont été induits par des ions Mn^{2+} (Mayfield et al., 1994) (Gold & Alic, 1993).

4.2) Inductions par des composés aromatiques

Des composés phénoliques et non phénoliques originaires de la lignine ou d'autres origines comme des polluants ont la capacité d'augmenter la production de laccases, de Mnp mais aussi de Lip (Tinoco et al., 2011) (Zhuo et al., 2017) (Bankole et al., 2021).

La production de laccases de *Pleurotus pulmonarius* a été augmentée par l'ajout d'acide p-coumarique (x8), de gaïacol (x5), d'acide férulique(x17) et de vanilline (x20) (Giatti Marques De Souza et al., 2004). De même l'acide vanillique et le gaïacol permettent une production accrue de laccases par *Rigidoporus lignosus* (Cambria et al., 2011). La présence d'alcool de vératryle permet une augmentation de la production de laccases mais aussi de Mnp par *Clitocybula dusenii* (Scheel et al., 2000).

L'ajout de polluants organiques dans le milieu de culture de certains champignons peut également induire la production d'enzymes ligninolytiques. Par exemple, la présence de 2,5-xydiline active la transcription et la production de laccases par *T. versicolor* et *Trametes villosa* (Collins & Dobson, 1997) (Yaver et al., 1996). De même l'ajout de fluorène permet l'induction de la production de Laccases, Lip et MnP par l'ascomycète *Mucor irregularis* (Bankole et al., 2021).

En outre, le basidiomycète *Trametes sp.* AH28-2 présente trois laccases LacA, LacB et LacC dont la production est induite sélectivement par différents composés organiques. La molécule d'o-toluidine induit spécifiquement l'expression de lacA tandis que le 5,5-dihydroxytoluène induit principalement la transcription de LacB (Xiao et al., 2006). Cela s'explique par la présence, dans les promoteurs de ces gènes, de régions spécifiques à l'induction par des molécules aromatiques. En effet, des motifs conservés de régions XRE (Xenobiotic Responsive Element) ont été détectés dans la séquence de lacA, lacB, LacC de *Trametes Sp* (Xiao et al., 2006). Les régions XRE jouent un rôle clé dans le phénomène d'induction par les molécules aromatiques. Ces régions sont très conservées et se trouvent dans le promoteur de nombreux gènes de laccases mais aussi de Mnp. Par exemple, une région XRE a été détectée dans le promoteur du gène de CS-mnp1 de *Ceriporiopsis subvermispora* (Tello et al., 2000) mais également poxc de *P. ostreatus* (Faraco et al., 2003) .

Ce phénomène d'induction par ces différents composés organiques, peut avoir deux intérêts pour les champignons. Premièrement, dans la nature, des oligomères de lignine peuvent être générés par une dégradation partielle causée par des composés issus de la réaction de Fenton (Arantes & Milagres, 2006) (Arantes et al., 2011). Au contact des champignons, ces oligomères induiront la production d'enzymes ligninolytiques pour intensifier la dégradation de la lignine. Ce phénomène d'induction pourrait également être dû à un mécanisme de défense de certains champignons qui cherchent à détoxifier leur milieu en dégradant ou modifiant ces composés aromatiques potentiellement toxiques (Janusz et al., 2020) (Bankole et al., 2021).

4.3) Régulation des gènes codant les enzymes ligninolytiques par les sources de carbone et d'azote

De nombreuses études ont démontré que la production d'enzymes ligninolytiques était dépendante de la nature des sources de carbone et d'azote et de leur concentration. Cependant ces régulations semblent être espèce-spécifique. Par exemple, des augmentations de production de Lip et Mnp par certains champignons ont été démontrées dans des conditions limitantes en azote mais aussi en conditions non limitantes pour d'autres champignons. Pour *P. chrysosporium*, les plus hauts niveaux de Lip et Mnp sont obtenus dans des conditions limitantes en azote. Une répression catabolique de la production de ces deux types enzymes a été démontrée lorsque ce champignon est confronté à de fortes concentrations d'azote organique (Gold & Alic, 1993) (W et al., 1981).

Cependant, contrairement à *P. chrysosporium*, *Trametes trogii* et *Lentinus crinitus* montrent leur plus haut niveau de production d'enzymes ligninolytiques et notamment de laccases lorsqu'ils sont confrontés à de fortes concentrations en azote organique (Colao et al., 2003) (Valle et al., 2014). Au sein d'un même champignon l'azote organique peut induire différemment l'expression des gènes de laccase. Pour *P. sajor-caju* une forte concentration d'azote induit l'expression de Lac2 et Lac4 tandis qu'aucun effet n'est décelable sur Lac1 et Lac3 (Soden & Dobson, 2001).

Le même constat peut être fait pour la source de carbone. Par exemple, La présence de glucose provoque une forte production d'enzymes ligninolytiques chez certains champignons mais peut également inhiber la production de ces enzymes chez d'autres champignons (Ronne, 1995). Pour *P. ostreatus*, la présence de 20 $g.l^{-1}$ de glucose a permis l'augmentation de la production de laccases d'un facteur 5 (Periasamy & Palvannan, 2010). La présence de glucose permet également une expression plus importante des gènes de Mnp, Pr-mnp2 et Pr-mnp3 de *Phlebia radiata* (Hildén et al., 2005). Cependant, la présence de glucose réprime la production de laccases par *T. pubescens* (Galhaup, Goller, et al., 2002b).

4.4) Induction par choc thermique

Le promoteur de gènes codants pour des enzymes ligninolytiques peuvent présenter des motifs HSE (Heat Shock responsive Element). Ces régions sont impliquées dans la régulation de l'expression des gènes lorsqu'un microorganisme est confronté à un changement brutal de température. Des régions HSE ont, effectivement, été trouvées dans le promoteur du gène lemnp1 de *L. edodes* (Nagai et al., 2007) mais aussi du gène de laccase lap2 de *T. pubescens* (Galhaup, Goller, et al., 2002b). *T. versicolor* montre une expression et une production accrue de la laccase codée par le gène Lcc lorsqu'il est soumis à des chocs thermique à 45°C pendant au moins 30 minutes.

Des régions HSE ont également été trouvées dans les promoteurs des gènes Pc-mnp1, Pc-mnp2 et Pc-mnp3 de *P. chrysosporium* (Gold & Alic, 1993) (Godfrey et al., 1990) (Alic et al., 1997).

Une étude a démontré (J. A. Brown et al., 1993) que lorsque *P. chrysosporium* était incubé plus de 15 minutes à 45 °C, l'expression des gènes de Mnp est augmentée de manière significative.

4.5) Optimisation de la production d'enzymes ligninolytiques avec de la biomasse lignocellulosique

La production d'enzymes ligninolytiques peut être optimisée en utilisant la biomasse lignocellulosique comme source de carbone. Cette structure complexe permet de reproduire certains *stimuli* que les champignons rencontrent dans le milieu naturel. La biomasse lignocellulosique peut être utilisée de deux manières différentes, en fermentation submergée (SF) et également en fermentation solide (SSF). La production d'enzymes ligninolytiques par les champignons est dépendante de la nature de la biomasse utilisée mais également du mode de culture (SF ou SSF). Stajić et collaborateurs, ont comparé la production de laccase et de peroxydase de culture de trois espèces de pleurote en conditions de SF et de SSF avec deux biomasses différentes (Sciure de bois de vigne et pelures de mandarine). (Stajić et al., 2006). Pour *P. eryngii,* la plus forte production de laccase a été obtenue avec les pelures de mandarine en fermentation submergée tandis que pour *P. ostreatus* la plus haute production a été obtenue en milieu solide avec la sciure de bois de vigne. Dans la même étude, la plus forte production de peroxydase a été obtenue en condition de SSF utilisant de la sciure de bois de vigne avec *P. pulmonarius* et *P. ostreatus*. En condition de SF avec la même biomasse, aucune activité peroxydase n'a été détectée (Stajić et al., 2006).

T. versicolor montre une production de laccase plus importante lorsque que son milieu de culture (SF) est supplémenté avec de la poudre de paille de blé ou de fanes de maïs broyées (Raulo et al., 2021). D'autres coproduits issus de l'industrie agroalimentaire ont également été utilisés pour optimiser la production de laccase fungique. *Aspergillus sp.* notamment, a montré une plus grande production de laccase lorsque son milieu de culture était supplémenté de poudre de coquilles de noix (Omeje et al., 2020).

L'emploi de biomasse lignocellulosique issue de coproduits de l'industrie agroalimentaire comme des pelures de mandarines ou des coquilles de noix est donc un bon moyen d'optimiser la production d'enzymes ligninolytiques en termes de production. Cette stratégie est peu coûteuse et génère également un débouché intéressant à des coproduits.

5) Production hétérologue des enzymes ligninolytiques de champignons

La production par la voie hétérologue d'enzymes ligninolytiques peut être un moyen d'isoler et de caractériser une enzyme d'intérêt. Cela permet en effet de disposer d'un moyen de produire une enzyme donnée de manière répétable dans un hôte d'expression. Cela permet de s'affranchir de la régulation de l'expression du gène d'intérêt dans l'organisme natif ainsi que d'augmenter la productivité par l'utilisation de promoteurs forts.

De plus, la production de protéines natives est souvent incompatible avec des applications industrielles. En effet, la culture de certains organismes est difficilement transposable à l'échelle industrielle (rentabilité et faisabilité). De plus, certaines enzymes d'intérêt proviennent d'organismes pathogènes ou producteurs de toxines ce qui empêche toutes applications industrielles. Par exemple, *M. mycetomatis* qui est un pathogène de l'épiderme produit une laccase d'intérêt biotechnologique (Tülek et al., 2021a). L'utilisation d'un hôte hétérologue GRAS (Generally Recognized As Safe) permet de s'affranchir de la pathogénicité de l'organisme d'origine.

Les hôtes d'expression utilisés ont l'intérêt de pouvoir être cultivés dans des conditions standardisées ce qui réduit les coûts de production. De plus, la production d'enzyme d'intérêt peut être améliorée en optimisant le choix de la séquence signal et du promoteur pour l'élaboration des vecteurs d'expression (Ferrer-Miralles et al., 2009).

L'expression hétérologue d'enzymes ligninolytiques fongiques comporte des spécificités. Premièrement, les champignons sont des eucaryotes, leurs gènes sont susceptibles de contenir des introns comme c'est le cas pour les gènes de laccases, de Mnp mais aussi de Lip (Tableau *2*).

Tableau 2 Exemple de présence d'introns dans des gènes de laccase, Mnp et Lip

Enzyme	Organisme	Gène	Nombre introns	N° accession	Référence
Laccase	*F. oxysporum*	Lcc1	3	EF990894	(Cañero & Roncero, 2008)
Laccase	*P. radiata*	Pr-lac2	12	AJ884685	(Mäkelä et al., 2006)
Laccase	*B. aclada*	BaLac	3	JN559771	(Kittl, Mueangtoom, et al., 2012a)
Mnp	*P. chrysosporium*	Mnp2	7	L29039	(Mayfield et al., 1994)
Mnp	*C. subvermispora*	Mnp3	7	AF161585	(Tello et al., 2000)
Lip	*T. versicolor*	LPG1	6	M64993	(Jönsson & Nyman, 1992)

Les laccases, les Lip et les Mnp fongiques sont toutes des protéines glycosylées (Wong, 2009). Il est préférable de choisir un hôte d'expression eucaryote. Comme le montre Tableau *3*, des champignons comme *Aspergillus niger*, *Trichoderma reseei* et *Aspergillus oryzae* peuvent être utilisés comme hôte d'expression. Cependant, la majorité des hôtes d'expression utilisés pour ces enzymes dans la littérature, sont des levures comme *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae, Y. lipolytica* ou *Kluyveromyces lactis* (Tableau *3*)

Les levures ont l'avantage d'avoir une croissance rapide, d'avoir des processus de transformation maitrisés et d'être capables de réaliser les modifications post traductionnelle spécifiques aux eucaryotes. Elles se développent dans des milieux de culture simples et peu couteux (Gellissen & Hollenberg, 1997). Historiquement, les premières levures utilisées pour la production d'enzymes ligninolytiques étaient *S. cerevisiae* et *Pichia pastoris.* Cependant, les phénomènes d'hyper-glycosylation ont été remarqués notamment avec *S. cerevisiae*, pouvant modifier les propriétés des enzymes produites.

L'utilisation des levures comme *Kluyveromyces lactis* et *Y. lipolytica* permet de limiter le phénomène d'hyper-glycosylation tout en obtenant des niveaux de production supérieur à *S. cerevisiae* et similaire à *P. pastoris* (Piscitelli et al., 2005) (Madzak et al., 2005).

Y. lipolytica a été utilisé deux fois pour l'expression d'une laccase de *T. versicolor* (Theerachat et al., 2012) (Kalyani et al., 2015) mais également de *P. cinnabarinus* (Madzak et al., 2005). *Y. lipolytica* possède un système de sécrétion très proche des champignons filamenteux. Il est possible d'utiliser des promoteurs constitutifs qui permettent de hauts niveaux d'expression. Cette levure a également l'avantage de pouvoir se développer sur des milieux complexes contenant de la biomasse ou des coproduits de l'industrie agroalimentaire (Darvishi et al., 2017).

Tableau 3 Exemple d'expressions recombinantes de laccases, Lip et Mnp dans plusieurs hôtes d'expression de type levure ou champignon filamenteux.

Hôte d'expression	Organisme d'origine	Enzyme	Référence
P. pastoris	*P. chrysosporium*	Mnp	(Gu et al., 2003)
Pichia methanolica	P. *chrysosporium*	Lip	(H. Wang et al., 2004)
P. pastoris	*B. aclada*	Laccase	(Kittl, Mueangtoom, et al., 2012a)
P. pastoris	*Trametes sp.*	Laccase	(Hong et al., 2006)
S. cerevisiae	*Cryphonectria parasitica*	Laccase	(Kim et al., 2010)
K. lactis	*P. ostreatus*	Laccase	(Piscitelli et al., 2005)
Y. lipolytica	*T. versicolor*	Laccase	(Theerachat et al., 2012)
Y. lipolytica	*Pycnoporus cinnabarinus*	Laccase	(Madzak et al., 2005)
A. niger	*Pycnoporus cinnabarinus*	Laccase	(Record et al., 2002)
A. niger	P. *chrysosporium*	Mnp	(Cortés-Espinosa et al., 2011)
T. reesei	*Melanocarpus albomyces*	Laccase	(Andberg et al., 2009)

Des plantes ont également été utilisées comme hôtes d'expression de certaines laccases. C'est le cas du tabac notamment utilisé pour produire lcc1 de *L. edodes* (Sakamoto et al., 2008), du riz pour la laccase Ma1L de *M. albomyces* (de Wilde et al., 2008).

6) Valorisation et applications des enzymes ligninolytiques

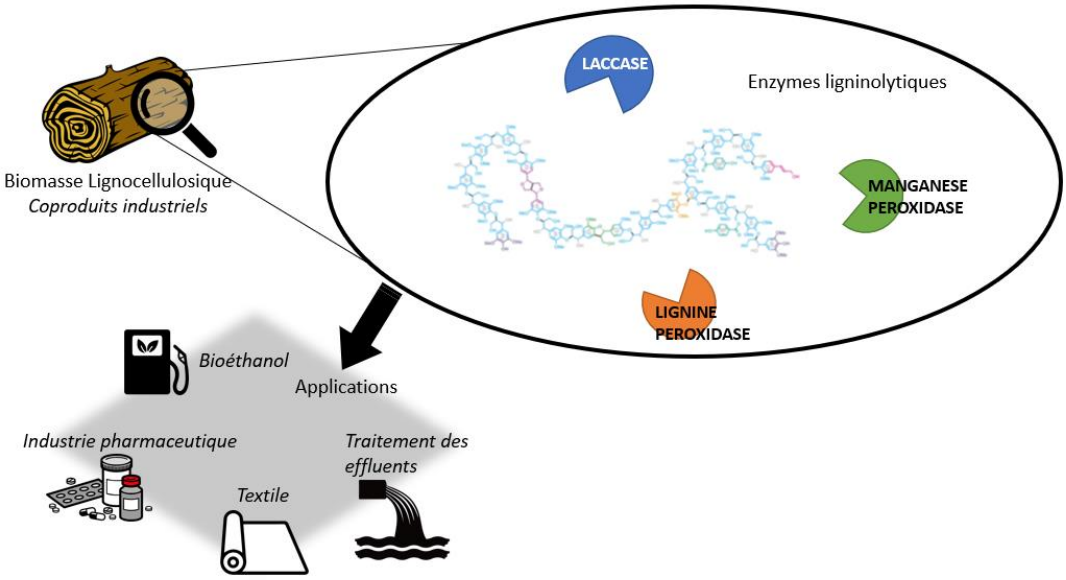

Figure 10 Exemples d'applications des enzymes ligninolytique

Les enzymes ligninolytiques sont utilisées pour des applications relativement variées. Ces enzymes peuvent en effet être utilisées pour réaliser des prétraitements de la biomasse lignocellulosique ce qui constitue un marché à faible valeur ajoutée. D'autres applications sont destinées à des marchés à valeur ajoutée intermédiaire comme le traitement d'eaux usées polluées ou la fabrication de biopolymères. Enfin ces enzymes peuvent être employées pour effectuer des synthèses de composés à haute valeur ajoutée à destination de l'industrie pharmaceutique ou cosmétique (Figure 10).

6.1) Traitement de la biomasse lignocellulosique

Les enzymes ligninolytiques peuvent être utilisées afin de réaliser des prétraitements de la biomasse lignocellulosique. Cela permet de rendre la cellulose et les hémicelluloses plus disponibles pour des processus industriels comme la fabrication de papier ou de bioéthanol de deuxième génération.

Par exemple, un système laccase/médiateur utilisé pour délignifier du bois d'*Eucalyptus globulus* a permis de réduire de 10°C la température de fabrication du papier tout en diminuant de 26% la durée du process (Loaiza et al., 2019).

Une souche recombinante de *P. chrysosporium* surexprimant trois peroxydases et une laccase, a été utilisée pour prétraiter des bagasses de canne à sucre. Cela a permis de multiplier par six le rendement d'extraction de sucres avant fermentation pour la production de bioéthanol (Coconi Linares et al., 2018).

Il s'agit ici d'application à faible valeur ajoutée, cependant d'autres débouchés plus hauts dans la chaine de valeur existent.

6.2) Fonctionnalisation de la lignine

Les enzymes ligninolytiques, comme les laccases sont utilisées pour fonctionnaliser la lignine afin de créer des matériaux ou des résines biosourcées.

Les laccases sont notamment utilisées dans les composites à base de fibres de bois. Elles opèrent des modifications physiques et chimiques de la lignine des fibres. Les laccases permettent de promouvoir des réactions de polymérisation de la lignine présente dans les fibres ce qui provoque une adhésion entre les fibres du bois. Cela permet de créer des polymères à base de fibre de bois en utilisant moins de résine (Thielemans et al., 2002) (Moilanen et al., 2011).

6.3) Dégradation de polluants organiques

Certaines activités humaines, génèrent des effluents polluants contenant des molécules organiques toxiques appelées xénobiotiques. Ces composés ont comme caractéristiques d'être persistants et nocifs pour l'environnement et la santé humaine. Très souvent, les effluents contiennent plusieurs xénobiotiques différents, comme les effluents industriels et les eaux usées d'hôpitaux qui contiennent des mélanges de résidus de médicaments (antibiotiques, antiinflammatoires) (Unuofin et al., 2019a).

Pour traiter ces effluents par voie enzymatique, il faut des enzymes capables de dégrader un large panel de molécules organiques différentes. Les laccases, les Lip et les Mnp sont capables de dégrader une très grande variété de molécules organiques. De nombreuses études ont testé avec succès la capacité de ces enzymes à dégrader divers polluants organiques (Tableau *4*).

La laccase commerciale de *T. versicolor* permet, notamment, de dégrader entièrement le Bisphénol A (Zdarta et al., 2018). Une Mnp de *P. chrysosporium* permet de dégrader complètement un échantillon contenant du vert de malachite (Saravanakumar et al., 2013). Une Lip de ce même champignon permet également de dégrader trois molécules de médicaments anti-inflammatoires.

Tableau 4 Exemples de dégradation de xénobiotiques par des laccases, Lip et Mnp

Type d'enzyme	**Organisme**	**Polluant**	**Taux de dégradation (%)**	**Références**
Laccase	*Trametes versicolor*	Acetaminophène Acide méfénamique Carbamazépine	 95	(Ba et al., 2014)
		Bisphenol A Bisphenol F Bisphenol S	100 100 40	(Zdarta et al., 2018)
	Myceliophthora thermophila	Estrone 17β-estradiol (E2) 17α-éthinylestradiol (EE2)	83,6 94 93,6	(Lloret et al., 2013)
	Madurella mycetomatis	Amido Black Remazol Brillant yellow Rhodamine	62 58 43	(Tülek et al., 2021a)
	Pleurotus ostreatus	Bisphenol A Carbamazépine	90 40	(Ji et al., 2017)
	Cerrena unicolor	Bisphenol A Nonylphénol Triclosan	80 40 60	(Songulashvili et al., 2012)
	Pycnoporus sanguineus CS43	Bisphenol A 4-nonylphénol 17α-ethinylestradiol Triclosan	89 93 100 90	(Garcia-Morales et al., 2015)
Mnp	*P. chrysosporium*	Phenanthrene	95	(Cortés-Espinosa et al., 2011)
		malachite green	100	(Saravanakumar et al., 2013)
	Trametes hirsuta	Navy EC-R Ruby S3B Super Black G	 95	(Thampraphaphon et al., 2022)
Lip	*P. Chrysosporium*	Diclofenac Paracetamol Carbamazepine	100 50 100	(Pylypchuk et al., 2020)

6.4) Synthèse de composés à haute valeur ajoutée

La capacité des enzymes ligninolytiques à oxyder une grande variété de substrats les rend également intéressantes pour la synthèse de composés destinés à l'industrie pharmaceutique ou cosmétique. Le Tableau *5* montre des exemples de composés bioactifs obtenus grâce à l'action d'une laccase.

Les laccases notamment permettent de réaliser des modifications de certaines molécules pour améliorer leur capacité antioxydante. Ces enzymes peuvent, en effet, catalyser la polymérisation de composés, ce qui peut optimiser leur effet biologique. Par exemple une laccase de *T. versicolor* permet d'oxyder la molécule de 8-hydroxyquinoline. Les produits issus de l'oxydation se combinent pour générer un polymère qui présente une activité antioxydante plus importante que la molécule de 8-hydroxyquinoline (Ncanana & Burton, 2007a).

Des essais similaires ont été réalisés avec les laccases de *Pycnoporus coccineus, Pycnoporus sanguineus* et *Myceliophtora thermophyla* pour générer des polymères de rutine. Les poly-rutines ont montrés une activité antioxydante et anti-inflammatoire plus importante que le monomère de rutine (Kurisawa et al., 2003a) (Uzan et al., 2011a).

Tableau 5 Exemples de synthèse de composés destinés à des applications en industrie pharmaceutique ou cosmétique

Organisme	Substrat	Produit	Référence
Trametes versicolor	Acide caféique + Chitosane	Polymère acide caféique-chitosane	(Božič et al., 2012b)
Trametes versicolor	Acide gallique + Chitosane	Polymère acide gallique-chitosane	(Božič et al., 2012b)
Trametes versicolor	Quercétine + Chitosane	Polymère Quercétine-chitosane	(Božič et al., 2012a)
Trametes versicolor	Acide tannique + Chitosane	Polymère acide tannique-chitosane	(Božič et al., 2012a)
Trametes versicolor	Amidon + Lignosulfonate de sodium	Copolymère d'amidon et de lignosulfonate de sodium	(Shogren & Biswas, 2013)
Trametes pubescens	2,6 Dimethoxyphenol	3,3,5,5-Tetramethoxybiphenyl-4,4-diol	(Adelakun, Kudanga, Green, et al., 2012)
Trametes pubescens	Acide férulique	Dimères d'acide férulique (5-β,β-β)	(Adelakun, Kudanga, Parker, et al., 2012)
Trametes pubescens	8-Hydroxyquinoline	Poly 8-hydroxyquinoline	(Ncanana & Burton, 2007b)
Trametes pubescens	Resveratrol	Resveratrol transdehydrodimer	(Nicotra et al., 2004)
Myceliophtora thermophyla	Resveratrol	Resveratrol transdehydrodimer	(Nicotra et al., 2004)
Myceliophtora thermophyla	Ethyl ferulate + chitosane	Polymère d'Ethyl-ferulate-chitosane	(Aljawish et al., 2012)
Myceliophtora thermophyla	Acide ferulique + chitosane	Polymère d'acide férulique-chitosane	(Aljawish et al., 2012)
Myceliophtora thermophyla	(+) - Catéchine	Poly-catéchines	(Kurisawa et al., 2003b)

Organisme	Substrat	Produit	Référence
Myceliophtora thermophyla	Rutine	Poly-rutine	(Kurisawa et al., 2003c)
Pycnoporus coccineus	Rutine	Oligorutine	(Uzan et al., 2011b)
Pycnoporus sanguineus	Rutine	Oligorutine	(Uzan et al., 2011b)

7) Objectifs de la thèse

Trois grandes familles d'enzymes sont capables de dégrader la lignine, les laccases, les Lip et les Mnp. Ces enzymes sont principalement produites par des champignons basidiomycètes ou ascomycètes. La production de ces enzymes est particulièrement influencée par les conditions de culture. De nombreux moyens d'induire la production de ces enzymes ont été décrits. Les enzymes ligninolytiques d'origine fongique présentent un réel intérêt biotechnologique. Elles peuvent être utilisées pour des applications très diverses comme la dépollution d'eaux usées ou la génération de composés à haute valeur ajoutée. Cependant, on remarque dans la bibliographie que la diversité des enzymes utilisées et des organismes producteurs est assez restreinte. En effet, en termes de débouchés, la recherche se limite souvent aux enzymes des basidiomycètes appartenant aux pourritures blanches comme *T. versicolor*, *P. chrysosporium* ou *P. cinnabarinus.* Il y a donc un besoin de trouver de nouvelles enzymes ligninolytiques. Pour cela il faut aller chercher dans le milieu naturel de nouvelles sources d'enzymes. Un axe de recherche à privilégier est donc d'aller explorer plusieurs niches écologiques afin de trouver de nouvelles souches ou de nouvelles espèces de microorganismes qui ne sont pas encore connues pour dégrader la lignine.

L'objectif de cette thèse est donc de chercher dans le milieu naturel, de nouvelles enzymes de type laccases, Lip ou Mnp. Les travaux de cette thèse porteront sur la sélection rationnelle de différentes niches écologiques pour isoler des souches de champignon qui en sont issus. Un criblage d'activité pourra ensuite être réalisé pour détecter des souches capables de produire des Laccases, des Lip et des Mnp. Les aspects liés à l'induction de ces enzymes seront pris en compte pour le criblage. Des champignons d'intérêt pourront ensuite être identifiés afin de caractériser leurs enzymes. Pour cela la bio-informatique et la biologie moléculaire seront utilisées. Les enzymes produites pourront enfin être testées sur différents substrats.

Chapitre 2 : Criblage de la biodiversité pour la recherche de nouvelles enzymes ligninolytique

Introduction du chapitre 2

L'objectif de ce cette thèse est de rechercher dans la biodiversité de nouvelles enzymes présentant des activités de dégradation de la lignine. Dans un premier temps, cela implique un travail d'isolement de champignons, microorganismes plus susceptibles produire ces enzymes, puis de criblage afin de sélectionner des souches ayant des capacités ligninolytiques intéressantes.

Dans le but de révéler d'éventuelles nouvelles enzymes, l'enjeu est de détecter des activités ligninolytiques chez des champignons qui n'étaient pas encore identifiés avec de telles activités. Plusieurs moyens peuvent être mis en œuvre pour atteindre cet objectif.

Le choix des écosystèmes pour réaliser les isolements des champignons est d'importance primordiale. En effet, chaque écosystème exerce une pression de sélection spécifique sur les organismes qu'il contient. Le choix d'une niche écologique influence la nature et les potentialités des champignons qui en seront isolés. Il faut donc sélectionner des environnements où les microorganismes sont en contact avec de la lignine mais qui comportent toutefois des spécificités par rapport à ceux qui ont déjà été exploités dans la littérature.

Deuxièmement, il faut définir une méthode de criblage simple et efficace permettant de mettre en évidence les activités enzymatiques de type ligninolytique des champignons isolés dans les différentes niches écologiques. En effet, tous les microorganismes ne produisent pas leurs enzymes dans les mêmes conditions et au même moment. Dans la nature, les champignons sont soumis à des *stimuli* qui induisent la production d'enzymes en réponse aux conditions environnementales. Pour détecter ces enzymes, il faut essayer de reproduire, en conditions expérimentales, ces *stimuli* par différentes méthodes d'inductions. Générer des conditions d'induction lors d'un criblage d'activité, est donc un moyen d'augmenter la probabilité de détecter de nouvelles souches d'intérêt.

Après l'identification de souches possédant des activités ligninolytiques, il faut identifier les enzymes potentiellement responsables des activités détectées lors du criblage. Pour cela, une approche combinant la bio-informatique et la biologie moléculaire a été employée. Le génome des champignons d'intérêts a été analysé pour identifier les gènes–potentiellement responsables des activités observées. Les gènes ainsi mis en évidence ont été clonés pour produire les enzymes de façon hétérologue et ainsi pouvoir les caractériser.

Comme cas d'étude, trois écosystèmes ont été sélectionnés et 71 souches de champignons isolées. 15 champignons ont montré des activités ligninolytiques à la suite de l'étape de criblage. Un isolat identifié comme appartenant à l'espèce *Scedosporium apiospermum* a été ensuite sélectionné. Son génome présente neuf gènes pouvant codés des laccases. Deux de ces gènes ont été cloné et ont permis la production d'enzymes recombinantes possédant une activité de type laccase capable d'oxyder des substrats phénoliques et non phénoliques. Des expériences complémentaires ont également été effectués afin de caractériser plus précisément ces deux enzymes.

Publication: Presentation of an extensive workflow for the detection of novel ligninolytic enzymes in the biodiversity that enable the detection and heterologous synthesis of two multicopper oxidases with laccase like activity in the ascomycete *Scedosporium apiospermum*

R. Chausse[a,b], S. Steel[b], O. Denies[b] R. Froideveaux[a] P. Fickers[b], V. Phalip[a]

[a]UMRT BioEcoAgro University of Lille

[b]UMRT BioEcoAgro Université of Liège

Abstract

Herein, a multistep methodology to isolate fungi with ligninolytic activities including laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase is presented. The first step aims to isolate and characterize fungal strains from specific environments. Those isolates were then screened for their aptitude to secrete enzymes of interest upon cultures in specific media known to trigger the production of such enzymes. The genome sequence of selected isolates showing the enzymatic activity of interest were screened *in silico* using gene sequences of model enzymes namely laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase. In a final step, putative corresponding identified genes were cloned and expressed in the yeast *Yarrowia lipolytica* with the aim to partially characterized enzymatically the heterologous produced enzymes, more specifically their aptitude to degrade relevant phenolic and non-phenolic substrates. As a case study, we report on the isolation and characterization of laccase like enzyme from the filamentous fungi *Scedosporium apiospermum.*

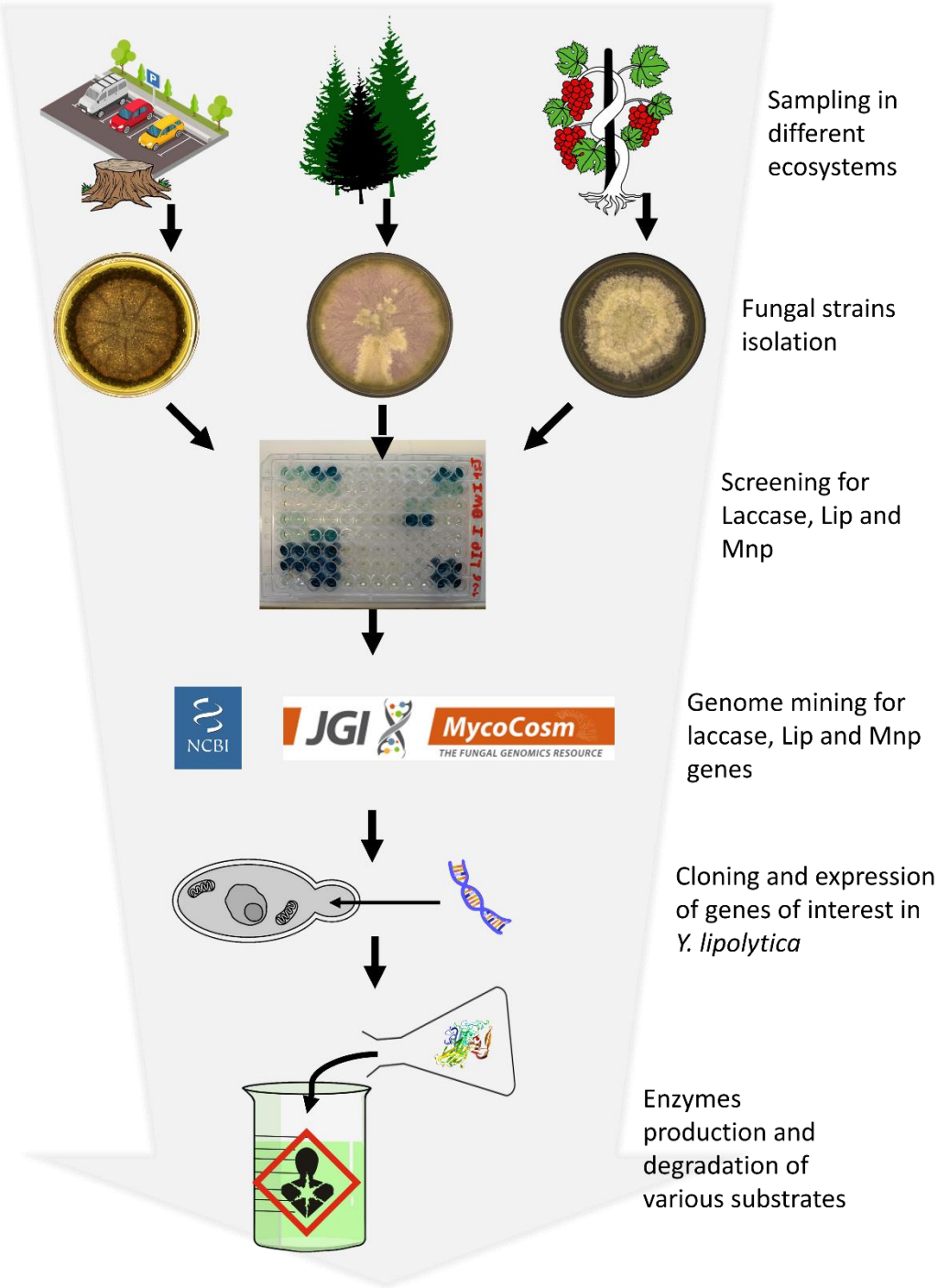

Figure 11 Graphical abstract of the workflow

Introduction

The conjunction between the petroleum rarefaction and the societal demand for cleaner and renewable processes and molecules has brought to light the tremendous potential of the green exploitation of coproducts from the industry of lignocellulosic biomasses. The ecological awakening has also drawn attention upon the bioremediation of industrial pollutants such as xenobiotics or textile dyes. Research is still struggling with the recalcitrance of lignin-based compounds and the persistence of several xenobiotics contained in industrial effluents. As a matter of fact, this represents a real bottleneck to find efficient depolymerization or degradation processes. Several research lines have been explored on the degradation of these compounds. For instance, chemicals and physicochemical methods have been employed but also enzymatic degradation (Sethupathy et al., 2022).The latter is one of the most promising fields of investigation as enzymes can operate in relatively mild temperature and pH without the use of toxic solvents (Wong, 2009). Those properties represent a major asset in the design of greener and safer industrial processes. Ligninolytic enzymes have therefore gathered a lot of attention during the past two decades, since they can degrade a wide panel of phenolic and non-phenolic compounds such as xenobiotic, dyes and other pollutants (Dao et al. 2019) (Merino-Restrepo et al. 2020). In nature, the degradation of lignin is operated by several ligninolytic enzymes such as laccase (EC 1.10.3.2), lignin peroxidase (EC 1.11.1.14) (Lip) and manganese peroxidase EC 1.11.1.13 (Mnp). Laccases are glycoproteins with a molecular weight ranging between 50 and 110 kDa belonging to the phenol oxidase family and more precisely to the multicopper oxidase group (Wong, 2009). They can oxidize a large variety of organic and inorganic substrates, including phenolic and non-phenolic ones that can be found in lignin (Eggert et al., 1996a) but also a broad variety of organic compounds such as dyes and xenobiotics (D'Souza et al., 2006) (Dao et al., 2019a). Most fungal laccases present an optimal pH around 5. (Peláez et al., 1995). Lignin peroxidases belong to the heme-peroxydases family. They can oxidize a variety of aromatic molecules, especially lignin and related compounds but also dyes and other pollutants in presence of hydrogen peroxide. (Wang et al., 1990). Lignin peroxidases are glycoprotein with a globular structure composed of height α

helix organized in two domains. These enzymes have a molecular weight ranging from 38 to 46 kDa and have an optimal pH around 3 (Wong, 2009). Manganese peroxidases are heme glycoproteins that can degrade lignin but also some xenobiotics in the presence of Mn^{2+} and H_2O_2 (Wong, 2009). Their molecular weight is similar to lignin peroxidases and they are found mostly in fungi and their optimal pH is generally found around 5 (Peláez et al., 1995). Ligninolytic enzymes are secreted by many microorganisms including fungi and bacteria (Grandes-Blanco et al., 2013) (Z. Wang et al., 1990) but most of those characterized so far are from basidiomycetes, more specifically from White rot fungi. As the demand for this kind of enzymes has increased over the years, the quest for laccase, Lip and Mnp has been intensified (Unuofin et al., 2019a).

This study aims to present a general workflow designed to isolate ligninolytic enzymes starting from the fungi isolation from environment samples to the heterologous synthesis of enzymes of interests enabling the partial characterization of their catalytic properties on different substrates of interest. This workflow starts with the selection of specific rationally selected ecosystems and the isolation of fungal strains. In a second steps, culture supernatant of the isolated fungal strains grown on specific medium are screened qualitatively for laccase, Lip and Mnp activities. Fungal isolates that yielded to positive enzymatic activity are then selected and corresponding available genome screened *in silico* for the identification of putative gene encoding enzymatic activity of interest. Finally, the identified genes are cloned from cDNA libraries and produce as secretory heterologous protein in the yeast *Y. lipolytica* to further investigate their ability to oxidize phenolic and non-phenolic compound of interest. Herein, samples from three ecosystems allowed to select 71 fungi among whom 15 showed interesting catalytic activities. In the present case study, *Scedosporium apiospermum* was selected to characterize nine putative laccases genes with two of them successively expressed in the yeast *Y. lipolytica.* The resulting recombinant proteins were then partially characterized for ability to oxidized various substrate of interest.

1) Materials and methods

1.1) Fungal isolation

Wood fragments were placed in 1.5 ml Eppendorf tubes containing 1 ml of sterile isotonic saline water before being vigorously shaken by vortexing for 1 min. One hundred µl of the resulting suspensions were then 1000-folds diluted or not and spread on solid media, namely PDA (Potato Dextrose Agar, Sigma Aldrich) containing ampicillin 100 µg.ml^{-1} and Sabouraud media supplemented with chloramphenicol (50 µ.ml^{-1},Sigma Aldrich). Fragments of each sample were also directly placed at the surface of the same media. All the samples were incubated for 48 h at 25°C and pure colonies were obtained from different subculture in the same medium. When possible, spores were collected and stored in a 60% glycerol solution at -80°C. No sporulating fungi were maintained on PDA medium and stored at 4°C until further use.

1.2) Screening procedure

Isolated fungi were grown in 2 mL MASTERBLOCK® 96 wells, containing 1.5 ml of culture medium. Three different media were used, namely SM1, SM2 and SM3 SM1 is a modified version of the Kirk medium (Tien & Kirk, 1988). SM2 medium was as SM1 with supplementation of grinded wheat straw 0,1% volume (Munoz et al 1997) while SM3 contained gaiacol 1mM (Piscitelli et al., 2011). All media were inoculated at 5.10^5 conidia per ml or with 50 µl of a suspension of mycelium in the case of non-sporulating stains. Cultures were performed at 25°C under agitation in a rotary incubator (InforsHT Multitron®) at 250 rpm. After seven days and 14 days of growth, supernatants were collected and tested for enzymes activity, namely Laccase, Lip and Mnp, see below. The white rot fungi *Trametes versicolor* (strain MUCL 1011) known as a laccase, Lip and Mnp producer (Johansson & Nyman, 1993) (Bohlin et al., 2006) was used as positive control for enzyme production. Cultures were performed in duplicates.

1.3) Enzymatic assays

Laccase activity was assessed according to the method of Zheng et al., 2017 using ABTS as a substrate. The reaction mixture consisted of 200 µl of 200 mM sodium tartrate buffer (pH 5), 0.45 mM ABTS and 50 µl of culture supernatant. Lignin peroxidase was assayed using also ABTS as a substrate (Ander & Messner, 1998) in a 200 mM tartrate buffer pH3 in the presence or not of 1 Mm of H_2O_2. The Lip activity was detected by the difference of absorbance between the condition with or without H_2O_2 after two hours of incubation. Manganese dependent peroxidase activity was detected following a similar protocol but operated in a 200 mM sodium tartrate pH 4.5 in presence of one mM of H_2O_2 with or without 0.1 mM of $MnSO_4^{2-}$. The difference in absorbance at 420 nm between these two assay conditions revealed the presence of Mnp activity (Mester & Field, 1998).

For further characterization of laccase enzymatic activity, two non-phenolic compounds namely, ABTS (0,45mM) and O-dianisidine (0,7 mM) (Patel et al., 2014), and three phenolic substrate, namely 2,6-dimethoxyphenol (DMP) (Martini et al., 2021), pyrogallol (2,5 mM)(Martini et al., 2021) and dopamine (2 mM)+ 3-Methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride (MBTH) (4mM) (Zeyer et al., 2018) have been tested. Assays were performed in a 100 mM tartrate buffer pH 5. The apparition of the oxidized form of each substrate was monitored at 420 nm (ε420 nm = 36,000 M^{-1} cm^{-1}) for ABTS, 460 nm (ε460 nm 11,300 M−1 cm−1) for O-dianisidine, 469 nm (ε469 nm = 27,500 M−1 cm−1) for DMP, 450 nm (ε450 nm = 4,200 M−1 cm−1) for pyrogallol and 505 nm (ε505 nm = 29,000 l mol−1.cm−1) for dopamine+ MBTH. One unit (U) of enzymatic activity was defined as the formation of 1 µmol of the oxidized form of the tested substrate per minute at 30 °C and pH 5 . Enzymatic activity was expressed in U per liter ($U.l^{-1}$). Heat denatured supernatants and supernatants from the parental strain RIY145 were used as negative controls.

1.4) In silico screening for putative laccase gene sequences in the genome of strains of interest

Protein sequences of characterized laccase, Lip and Mnp listed in table 1 were used as a query to screen using Blastp algorithm the genome sequence of strain selected during the enzymatic screening step (Altschul et al 1990). Identified genes with amino acid sequence of more than 25 % were selected for further characterization.

Table 1 Proteins used as queries for the screening in silico

Division	Species	Enzyme	NCBI Accession	References
Basidiomycete	*Trametes versicolor*	Laccase	Q12718	(Ong et al., 1997)
Basidiomycete	*Agaricus bisporus*	Laccase	Q12541	(Perry et al., 1993)
Basidiomycete	*Lentinula edodes*	Laccase	BAB83131	(Sakamoto et al., 2008)
Ascomycete	*Melanocarpus albomyces*	Laccase	Q70KY3	(Kiiskinen et al., 2002)
Basidiomycete	*Phanerochaete chrysosporium*	Lip	P49012	(Jr et al., n.d.)
Basidiomycete	*Trametes versicolor*	Lip	P20013	(Jönsson & Nyman, 1992)
Basidiomycete	*Pleurotus ostreatus*	Mnp	BAA33449	(Irie et al., 2000)
Basidiomycete	*Phanerochaete chrysosporium*	Mnp	Q02567	(Godfrey et al., 1990)

1.5) Molecular biology

General techniques

Standard media and techniques were used for *Escherichia coli* (Sambrook et al., 1989), and those used for *Y. lipolytica* have been described elsewhere (Barth and Gaillardin, 1996). Fungal genomic DNA was extracted using the NucleoSpin Soil® Kit (Macherey-Nagel) following the manufacturer instructions except the use of 1–3 mm corundum beads (Macherey-Nagel) to improve the cell lysis.

Total mRNA were extracted using the NucleoSpin RNA, Mini kit for RNA Plant and Fungi (Macherey-Nagel) with an extra step consisting of a treatment with DNase (1 U/ µg mRNA) for 15 minutes at 37 °C (Thermo Fischer) to remove any leftover of genomic DNA. PCR products were purified using the NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel) prior sequencing and DNA fragments were gel purified prior ligation in replicative vector with the same kit. Plasmids were extracted from *E. coli* with NucleoSpin Plasmid EasyPure mini-Kit (Macherey-Nagel). Yeast colony PCRs were performed using the Phire Plant Direct PCR Master Mix kit (Thermo Fisher).

Molecular identification of fungal strains

Total genomic DNA was extracted from 48 hours mycelium suspension. Internal transcribed spacer (ITS) DNA fragment were amplified by PCR using primers ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3' and ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White et al., 1990) and Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Biolabs New England). The resulting sequences were then used for identification by comparison to the GenBank database using BlastN.

Supplementary analyses were performed with the sequencing of ITS, β-Tubulin and Calmodulin regions (Stielow et al., 2015). The analyses were carried out by the BCCM/MUCL Agro-food and Environmental Fungi Collection of Louvain-la-Neuve.

Cloning the gene of interest

mRNA from cells grown seven days in SM2 medium were extracted and purified before being converted in cDNA using the LunaScript RTS Supermix kit (New England Biolabs). cDNA corresponding to genes of interest were amplified by PCR using primers listed in Table 2 before being cloned into pGEM®-T Easy (Promega) or PCR Zero Blunt™ TOPO™ vector (Promega). Specific *Bsa*I recognition sequences were added at the 5' and 3' end of the forward and the reverse primers (Table 2).

Table 2 Primers sequences and restriction site for the amplification and the construction of expression vector for of the expression of the putative enzymes from cDNA of *S.apiospermum*

Gene	Primers	Sequences (5'-3')
Lac1	F	GTAGGTCTCTTGCCATGCCACCTCTTCCATTTC
	R	CACGGTCTCATAGATCAGTTCGCCGAGCAAAACC
Lac 2	F	GTAGGTCTCTTGCCATGATTGCCTCTCTCTTTTCAG
	R	CACGGTCTCATAGACTATAGACCCGAGTCCTCCTG
CDS9845	F	GTAGGTCTCTTGCCATGATTGCCTCTCTCTTTTCAG
	R	CACGGTCTCATAGACTATAGACCCGAGTCCTCCTG
CDS 0469	F	GTAGGTCTCTTGCCATGTTCAAGTCATTGACGCTTC
	R	CACGGTCTCATAGACTACTCCGAGTCAACGATTACATC
CDS 8589	F	GTAGGTCTCTTGCCATGACGGACAAAGGATGTTACC
	R	CACGGTCTCATAGATCACCCACCCCCCTC
CDS 2597	F	GTAGGTCTCTTGCCATGCATACCCGGAGCCTC
	R	CACGGTCTCATAGATTACCACACCCACCGCC
ITMO1	F	GTAGGTCTCTTGCCATGGCCTCCTTGCGAGGG
	R	CACGGTCTCATAGATTACCTCCCGGAATCTCTTTCAC
ITMO2	F	GTAGGTCTCTTGCCATGAGAGGGCCGGCC
	R	CACGGTCTCATAGACTACAAGAGCCTTCCGATAC
ITMO3	F	GTAGGTCTCTTGCCATGGCCACCAACACCCG
	R	CACGGTCTCATAGATCAATCCTTTCGCTCCTTCTTC

Table 3 Primers designed for BsaI sites removal of Lac2, CDS 9845, ITMO2

Mutation Site	Primers	Sequences (5'-3')
Lac2 Mut1	F	GATATTACCGAAACCACGGCCTCC
	R	GGAGGCCGTGGTTTCGGTAATATC
Lac 2 Mut2	F	CATTGTTATCGAAACCGCTCTGGC
	R	GCCAGAGCGGTTTCGATAACAATG
Lac 2 Mut3	F	CTCTCGCTTTCGAAACCGATAACC
	R	GGTTATCGGTTTCGAAAGCGAGAG
ITMO2Mut 1	F	GATGTTTGGCGACCTTTCGATGACG
	R	CGTCATCGAAAGGTCGCCAAACATC
ITMO2Mut 2	F	CAATACCAACGAGACTGTATATGGTG
	R	CACCATATACAGTCTCGTTGGTATTG
CDS9845Mut1	F	GCCGGCCAGGGCCTCAGCCTT
	R	AAGGCTGAGGCCCTGGCCGGC

Correctness of the cloned gene sequences and the absence of internal *Bsa*I recognition sequences was verified by DNA sequencing. Internal *Bsa*1 recognition sequences were removed by site-directed mutagenesis using PCR overlap with primer listed in Table 3 (Cherry et al., 2008). The expression vectors were constructed by Golden Gate Assembly as described previously (Celińska et al., 2018) (Larroude et al., 2019), using the biobricks listed in Table *4* and Table 5. *Y. lipolytica* strain RIY145 was transformed with 500 ng of the ligation mixture after *Not*I restriction.

Table 4 List of the bio bricks used to perform the construction of the expression vectors for the heterologous expression of Lac2, ITMO1, ITMO2, ITMO3 and CDS9845

Bio bricks	Name	Plasmid reference
Backbone vector	pSB1A3-GB3	GGE114
Promotor	P1-pTEF	GGE085
Signal sequence	spLip2pre 3xXA	GGE0070
Gene	Gene of interest	See table 4
Terminator	Tlip2	GGE020

Table 5 List of the *E. coli* strains containing the replicative vector which contains the gene used for the construction of the expression vector

Gene reference	*E coli* strain reference	Génotype
Lac2	RIE358	TOPO vector-Lac2
ITMO1	RIE347	TOPO vecto-ITMO1
ITMO2	RIE357	TOPO vector-ITMO2
ITMO3	RIE389	TOPO vector -ITMO3
CDS9845	RIE346	PGEMT-easy-CDS9845

Verification of the expression of the genes of interest by qPCR

The expression of each gene of interest was assessed by qPCR. Briefly, overnight liquid culture of positive transformants were used for RNA extraction. qPCR was performed using the Luna® universal one-step RT-qPCR kit (New England Biolabs). Specific primers listed in supplementary materials (Table 6), were generated using Primer3web (version 4.1.0). The expression of each gene of interest was compared to the expression of actin gene as housekeeping gene with the primers used by (Carly et al., 2017).

Table 6 List of the primers designed specifically to control the expression of each enzyme gene cloned in Y. lipolytica by qPCR

Gene	Primers	Sequences (5'-3')
Lac1	F	GTAGGTCTCTTGCCATGCCACCTCTTCCATTTC
	R	CACGGTCTCATAGATCAGTTCGCCGAGCAAAACC
Lac 2	F	GTAGGTCTCTTGCCATGATTGCCTCTCTCTTTTCAG
	R	CACGGTCTCATAGACTATAGACCCGAGTCCTCCTG
CDS9845	F	GTAGGTCTCTTGCCATGATTGCCTCTCTCTTTTCAG
	R	CACGGTCTCATAGACTATAGACCCGAGTCCTCCTG
CDS 0469	F	GTAGGTCTCTTGCCATGTTCAAGTCATTGACGCTTC
	R	CACGGTCTCATAGACTACTCCGAGTCAACGATTACATC
CDS 8589	F	GTAGGTCTCTTGCCATGACGGACAAAGGATGTTACC
	R	CACGGTCTCATAGATCACCCACCCCCCTC
CDS 2597	F	GTAGGTCTCTTGCCATGCATACCCGGAGCCTC
	R	CACGGTCTCATAGATTACCACACCCACCGCC
ITMO1	F	GTAGGTCTCTTGCCATGGCCTCCTTGCGAGGG
	R	CACGGTCTCATAGATTACCTCCCGGAATCTCTTTCAC
ITMO2	F	GTAGGTCTCTTGCCATGAGAGGGCCGGCC
	R	CACGGTCTCATAGACTACAAGAGCCTTCCGATAC
ITMO3	F	GTAGGTCTCTTGCCATGGCCACCAACACCCG
	R	CACGGTCTCATAGATCAATCCTTTCGCTCCTTCTTC
Actin	F	GCCAGCCATATCGAGTCGCA
	R	TCCAGGCCGTCCTCTCCC

1.6) Culture conditions and kinetics of production of the transformants

For heterologous protein production, *Y. lipolytica* strains were grown in 25 ml of YPD medium supplemented with $CuSO_4$ 0.1 mM in 250 ml shake-flasks. Cultures were seeded at an OD_{600} of 0.5 and incubated at 30 °C for 72 hours. Sampling was performed every 24 hours and sample were centrifugated at 11 000 g at 4°C for 5 minutes and then filtrated using 0,2 µm PES filters.

1.7) Enzymes characterization

Prior electrophoresis, proteins from 200 µl of culture supernatant were extracted by methanol/chloroform precipitation. SDS-PAGE were performed using Novex™ WedgeWell™ 12% (Thermofisher) gel and Novex™ Tris-Glycine SDS Running Buffer during 45 min at 225-volt. The gel was stained with Imperial™ Protein Stain (Thermofisher) during 1 h and then washed during 1h in ultrapure water. Pierce™ Unstained Protein MW Marker (Thermofisher) was used as a molecular weight marker. For deglycosylation test, endo-glycosidase H (EndoH) was used according to the manufacturer recommendation (New England Biolabs). Protein extract from the supernatant of a culture of the parental strain RIY 145 without transformation was used as negative control.

Recombinant proteins were excised form the gel, digested by trypsin before being analyzed by LC-ESI-MS/MS at GIGA proteomic facility (ULiege, Belgium). Spectra were treated using Proteome Discoverer 2.1 (Thermo Scientific). The peptides were identified by alignment with the theorical amino acids sequence of the recombinant proteins.

Compute pI/Mw available on Expasy webserver was used to calculate the theorical isoelectric point and the molecular weight of active recombinant proteins (Gasteiger et al., 2005).

The amino acids sequences of recombinant proteins were used for multiple alignment with well described laccases from *Trametes versicolor* Q12718 and *Lentinula edodes* BAB83131.The multiple alignment was performed using Multaligne online webserver (Corpet, 1988) and then edited using ESPrit 3.0 online webserver (Robert & Gouet, 2014). The conserved blocks were annotated in boxes and the amino acids involved in the copper binding were also indicated.

2) Results

2.1) Sampling and isolation

With the aim to isolate fungi with ligninolytic activity, three different ecosystems have been selected. From the forest environment, two samples of rotting log of Birch and Beech trees as well as two pieces of a pile of decomposing *Cupressus macrocarpa* woodchips were collected. From the tree stump from the parking lot, three samples showing advanced state of decomposition were taken and two samples of sound wood were also collected. It was also decided to carry out a sampling in a vineyard presenting grapevine trunk disease. Three fragments of ESCA infected chardonnay trunk were collected. Those specific environments were considered based on their potential to contain microorganisms producing the enzymes of interest, namely laccase, lignin peroxidase or manganese peroxidase. In total, 15 samples were collected and 71 fungal strains were obtained as shown in Table 7. More than half of strains were isolated on PDA medium.

Table 7: Summary of the results of the isolation work

Environment	Sample nature	Number of samples	Media	Number of isolated strains
Forest	Beech	2	PDA+Ampicilline	5
			Saboureau+ Chloramphenicol	2
	Birch	2	PDA+Ampicilline	5
			Saboureau+ Chloramphenicol	3
	Fragments *Cupressus macrocarpa*	2	PDA+Ampicilline	6
			Saboureau+ Chloramphenicol	5
Urban environment (Parking lot)	Sound wood	2	PDA+Ampicilline	8
			Saboureau+ Chloramphenicol	4
	Decaying wood	3	PDA+Ampicilline	10
			Saboureau+ Chloremphenicol	6
Vineyard Infected Chardonnay (ESCA)	Log of infected cep	1	PDA+Ampicilline	4
			Saboureau+ Chloramphenicol	3
	Infected fragments	3	PDA+Ampicilline	6
			Saboureau+ Chloramphenicol	4
Total				**71**

2.2) Screening of enzymatic activities

Table 8: Laccase, Mnp and Lip activity detected in the supernatant of the isolated fungi during the screening revealed by the oxidation of ABTS measured at 420 nm . (+) means the detection of an increase of the absorbance (420nm) after 2 hours of incubation

Laccase						
	SM1		**SM2**		**SM3**	
	D 7	D 14	D 7	D 14	D 7	D 14
Trametes versicolor	+	+	+	+	-	+
VI14	-	+	+	+	-	-
BRMO5	+	-	+	-	+	-
BRMO9	+	-	+	-	+	-
BRMO12	+	+	-	+	-	+
BRMO13	+	-	-	-	+	-
BRMO14	-	+	+	+	-	+
BRCR7	-	+	-	+	-	+
BRMO10	+	+	+	+	-	+
ERSC18	-	-	-	+	-	-
ERSC29	+	+	+	+	-	+
VI12	+	+	+	+	-	-
ERSC21	-	+	-	-	-	+
ERSC11	-	-	-	+	-	+
VI6	-	+	-	-	-	-
BRCR15	-	-	+	-	-	-
Manganese peroxydase						
	SM1		**SM2**		**SM3**	
	D 7	D 14	D 7	D 14	D 7	D 14
Trametes versicolor	-	-	-	+	-	+
VI14	-	+	-	+	-	-
BRCR7	-	-	-	+	-	-
ERSC29	+	-	+	-	-	-
VI12	-	+	-	-	-	+
ERSC11	-	-	-	-	-	+
VI6	-	+	-	-	+	-

Lignin peroxydase						
	SM1		**SM2**		**SM3**	
	D 7	D 14	D 7	D 14	D 7	D 14
Trametes versicolor	-	-	+	-	-	-
VI14	+	-	-	-	-	-
BRMO5	-	-	-	-	+	-
ERSC29	-	-	-	-	+	-
VI12	-	-	-	-	-	+
VI6	-	+	-	-	-	-
BRCR15	+	-	-	+	+	+

Isolated strains were grown on three different liquid media namely, SM1, SM2 and SM3 known for their ability to trigger the synthesis of laccase, lignin peroxidase or manganese peroxidase. SM1 was used as a basal medium (Peláez et al., 1995) while SM2 and SM3 were supplemented with inductors of ligninolytic enzymes synthesis, namely grinded wheat straw and guaiacol, respectively (Piscitelli et al., 2011).

For *Trametes versicolor*, used herein as positive control, laccase activity in the culture supernatant was detected after seven days of culture in SM1 and SM2 medium and after 14 days in SM2 and SM3. Mnp activity was detected as well after 14 days in SM2 and SM3 media and the presence of Lip was detected after seven days in SM2 medium (Table 8).

Among the 71 isolates tested, 15 showed at least one ligninolytic activity. All of them were able to oxidize ABTS at pH 5 suggesting a laccase activity, while four of which showing also Mnp and Lip (VI14, ERSC29, VI12 and VI6), and two strains showed laccase and Mnp activities (BRM05 and BRCR15).

2.3) Molecular identification and characterization of isolates with extracellular ligninolytic activity

The 15 isolates showing ligninolytic-like activity were identified by ITS sequencing and BLAST analysis. As shown in Table 9, the isolates belong to seven genera from either Basidiomycota or Ascomycota phylum. Two *Fusarium oxysporum* strains VI 14 and Brcr7 that originate from different ecosystems (Vineyard and Forest, respectively) showed laccase activity. More specifically, strain VI14 showed a laccase activity after seven and 14 days of cultivation in the medium supplemented with wheat straw but only after 14 days on basal medium; no activity could be detected on SM3 medium. By contrast, strain Brcr7 showed a laccase like activity on the three media but only after 14 days of cultivation. Strain VI 14 also displayed Mnp and Lip activities while strain BRCR7 only showed a Mnp activity SM2 medium after 14 days of cultivation

Four distinct isolates from the genus *Trichoderma*, namely ERSC11 ERSC18, ERSC21 and ERSC29, also presented ligninolytic activities. All of them harbor a laccase like activity. Moreover, strain ERSC11 showed Mnp type peroxidase activity while strain ERSC29 showed both Mnp and peroxidase activities. Two isolates, namely BRMO5 and BRMO9, have been identified as belonging to the *Aspergillus* genus (BRMO5 and BRMO9). They showed laccase activities on the three tested media after seven days of cultures; however, no enzymatic activity can be detected after 14 days of incubation. Strain BRMO9 differed from strain BRMO5 by presenting a manganese peroxidase activity after 14 days of cultivation whereas strain BRMO5 showed a Lip activity after seven days of incubation on SM3 medium. Strain VI12 which belong to the genus *Alternaria* was also characterized with ligninolytic activities. It showed a laccase like activity in SM1 and SM2 media after 7 and 14 days of growth. Although SM3 medium did not trigger laccase production, Mnp peroxidase activities Mnp and Lip were detected after 14 days of culture for strain VI12.

One isolate was identified as *Piptoporus betulinus.* It presented a laccase activity after 7 days of growth in the SM2 medium and a Lip activity on the three media at day 7 for SM1 medium after 14 days for SM2 and for both time of sampling for SM3. The three ligninolytic activities were also detected in the supernatant of isolate VI6 identified as *Peniophora versicolor*. Vi6 showed laccase, Mnp and

Lip activity after 14 days of growth in the SM1 medium but also Mnp activity in SM3 at day 7. Isolates belonging to the complex species *Pseudallescheria boydii / Scedosporium apiospermum* also showed laccase activities. Isolate BRMO10 showed activity at both sampling times in SM1 and SM2 media and after 14 days in SM3 medium. Isolate BRMO12 followed the same trend except for the first time of sampling in the straw medium where no activity was detected. BRMO14, also identified as belonging to the complex species *Pseudallescheria boydii / Scedosporium apiospermum,* showed similar ability to secret laccase like enzymes such as BRMO10 and BRMO12. BRMO10 was formally identified as *Scedosporium apiospermum* by further DNA sequence comparison of gene encoding β-tubulin and calmodulin regions. This was performed by the BCCM/MUCL Agro-food and Environmental Fungi Collection of Louvain-la-Neuve, Belgium. The strain was also deposit at BCCM/MUCL under the following number MUCL 58306. As few information on the ligninolytic enzymes of this fungus have been reported so far, it was selected for further characterization.

Table 9 : Identification of the 15 fungi of interest revealed by the screening of activity. The identification is based on the sequencing of the ITS region. The % of identity describe how similar the query (the sequence obtained by PCR) is to the sequences from the GenBank database. The higher the % of identity is the more relevant is the match.

Strain number	**Origin**	**Division**	**Putative GenBank ID ITS sequencing**	**% Identity**
VI 6	Vineyard	Basidiomycota	*Peniophora versicolor*	99.66%
VI 14	Vineyard	Ascomycota	*Fusarium oxysporum*	99.80%
VI 12	Vineyard	Ascomycota	*Alternaria sp.*	99.78%
BRMO5	Cupressus Macrocarpa	Ascomycota	*Aspergillus spinulosporus*	98.97%
BRMO9	Cupressus Macrocarpa	Ascomycota	*Aspergillus spinulosporus*	99.26%
BRMO10	Cupressus Macrocarpa	Ascomycota	*Scedosporium apiospermum*	99.47%
BRMO12	Cupressus Macrocarpa	Ascomycota	*Pseudallescheria boydii*	99.65%
BRM013	Cupressus Macrocarpa	Ascomycota	*Penicillium sp.*	99.61%
BRM014	Cupressus Macrocarpa	Ascomycota	*Pseudallescheria boydii*	99.82%
ERSC11	stump parking lot	Ascomycota	*Trichoderma erinaceum*	93,1 %
ERSC18	Stump Parking lot	Ascomycota	*Trichoderma sp.*	99,29%
ERSC21	Stump parking lot	Ascomycota	*Trichoderma sp.*	96,69%
ERSC29	Stump parking lot	Ascomycota	*Trichoderma erinaceum*	97.46%
BRCR7	Birch	Ascomycota	*Fusarium oxysporum*	100.00%
BRCR15	Birch	Basidiomycota	*Piptoporus betulinus*	99,67%

2.4) Identification of putative ligninolytic enzymes genes of *Scedosporium apiospermum*

Table 10: Putative laccase genes found in the genome of Scedosporium apiospermum.

Name	**Accession NCBI (Gene)**	**Identity with** Q12718 *Trametes versicolor (%)*	**Length of theorical genomic DNA sequences (pb)**	**Length of the obtained sequence from cDNA (pb)**	**Effective expression**	**Production of active proteins**
Lac1	XP_016638801.1	35.84	2568	2181	/	/
Lac2	XP_016641767.1	30.39	1905	1707	yes	yes
ITMO1	XP_016646333.1	30.24	2056	1872	yes	no
ITMO2	XP_016646326.1	38.13	2035	1701	yes	yes
ITMO3	XP_016640517.1	35.36	1982	1776	yes	no
CDS 9845	XP_016638987.1	28.10	2223	1794	yes	No
CDS 0469	XP_016646440.1	33.14	2470	/	/	/
CDS 8589	XP_016640458.1	26.97	1196	/	/	/
CDS 2597	XP_016644951.1	31.52	2761	/	/	/

Only one genome sequence of *Scedosporium apiospermum* (strain IHEM14462, clinical isolate) has been published to date (Vandeputte et al., 2014). It was used as a reference to screen for putative laccase, Lip and Mnp encoding gene by BLASTP analysis using characterized genes as queries (Table 1). Nine putative laccase encoding genes showed at least 25 % of amino acid sequence identities with laccase encoding gene from T. versicolor (Table 10). No sequence of Lip neither Mnp were found.

2.5) Amplification and analysis of laccases genes sequences

The gene encoding those putative laccases were cloned and expressed in the yeast *Y. lipolytica*. As the DNA sequence of the identified genes might contained introns, they have been cloned from a cDNA library of *Scedosporium apiospermum* grown for seven days in SM2medium.

Unfortunately, genes CDS 8589, CDS 2597 and CDS 0469 were not amplified from the cDNA library. Lac1 was successfully cloned, but the obtained sequence was very different from that of the reference genome. 19 codon stops were detected in the reading frame starting from the putative first methionine suggesting that a functional protein cannot be obtained from this sequence. Therefore, Lac1 was not considered further. By contrast, Lac2, ITMO1, ITMO2, ITMO3, CDS 9845 were successfully amplified from cDNA and cloned. Their nucleotide sequences were in accordance with that of the reference genome. As shown in Table 10, the length of the genes amplified from the cDNA were shorter than the sequenced obtained *in silico* based on the genomic DNA. For instance, the theorical length of Lac2 is 1905 pb but the obtained gene from the cDNA was 1707 pb long. This suggests the presence of introns in the genomic DNA of *S. apiospermum*. The theorical genomic DNA sequence of each gene was aligned and compared to the corresponding gene sequence amplified from the cDNA. It revealed the presence of 3 introns in ITMO1, ITMO2 and ITMO3 genomic DNA sequences, 5 in ITMO2, and 7 in CDS9845.

2.6) Expression of *Scedosporium apiospermum* putative laccases in Yarrowia lipolytica.

The genes ITMO1, ITMO2, ITMO3, CDS 9845 and lac2 were ligated in expression vectors using the golden gate assembly method. The obtained expression vectors were then transformed in the dysmorphic yeast *Y. lipolytica*.

Y. lipolytica strains expressing genes ITMO1, ITMO2, ITMO3, CDS 9845 and Lac2 were grown in YPD medium for 72 h and the laccase activity was assessed in culture supernatant every 24h using ABTS as a substrate.

Unfortunately, despite an effective expression validated by qPCR (Table 10), no enzymatic activity can be detected in our experimental conditions in supernatant of strains expressing genes ITMO1, ITMO3 and CDS 9845. By contrast, laccase activity was detected in supernatant of strains expressing Lac2 and ITMO2 (Figure 12). No enzymatic activity was detected in heat denatured supernatants and in supernatant from the parental strain RIY145.

Moreover, the analysis of the culture supernantant of strains expression ITMO2 and Lac2. by SDS PAGE (Figure 1, supplementary material) showed a protein of approximately 66.2 kDa that is present only in the supernatant of the mutant which contains Lac2 gene. This confirmed the production and the secretion of the expected proteins that the parental strain (RIY 145) cannot produce. Similarly, a protein with molecular weight slightly under 66.2 kDa is present of culture supernatant of strain expressing ITMO2 encoding gene and not in that of the parental strain RIY145. As a further characterization those protein were characterized by mass spectrometry after excision form the gel and trypsin digestion. Seven peptides were identified to belong to ITMO2 giving a coverage of 9,7 % of ITMO2 amino acids sequence. Similarly, 14 peptides were identified to be characteristic of Lac2 giving a coverage of 17.1 %. Lac2 and ITMO2 are effectively produced by the yeast and are responsible of the laccase like activity detected.

2.7) Kinetic of recombinant enzymes production

Laccase production was monitored every 24h over 72h for three randomly chosen transformants producing ITMO2 and Lac 2.

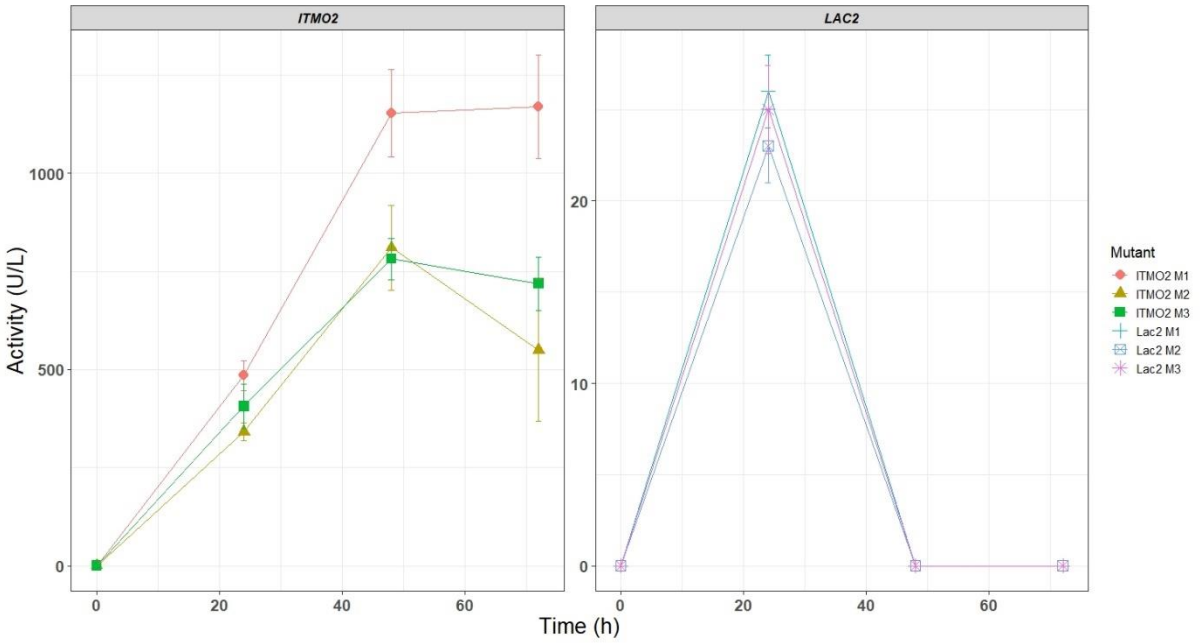

Figure 12: Recombinant ITMO2 and Lac2 production in *Y. lipolytica*: comparison between three different mutants for each gene. Laccase activity in the culture supernatant is presented as a function of time. All cultures were grown in triplicates and all measurement were also done in triplicates

As shown by Figure 12, no significant differences were detected with the three strains producing lac 2 as their supernatants both showed an activity around 24 $U.L^{-1}$ after 24 h of growth. However, no activity was longer detected after 48 hours. Transformant lac2-M1 was selected for further characterization as no differences in productivity was visible between them.

By contrast, activity titers were different for strains ITMO2 M1, ITMO2 M2, ITMO2 M3, producing ITMO2. Although, an activity of approximately 500 $U.l^{-1}$ was measured for the three transformants tested after 25h, that of ITMO2 M1 was 38% higher (ie 1168 $U.l^{-1}$) after 48 h as compared to the two other tested transformants. No further increase in enzymatic activity was detected after 48 h. Strain ITMO2 M1 was selected for further characterization.

2.8) Enzyme characterization

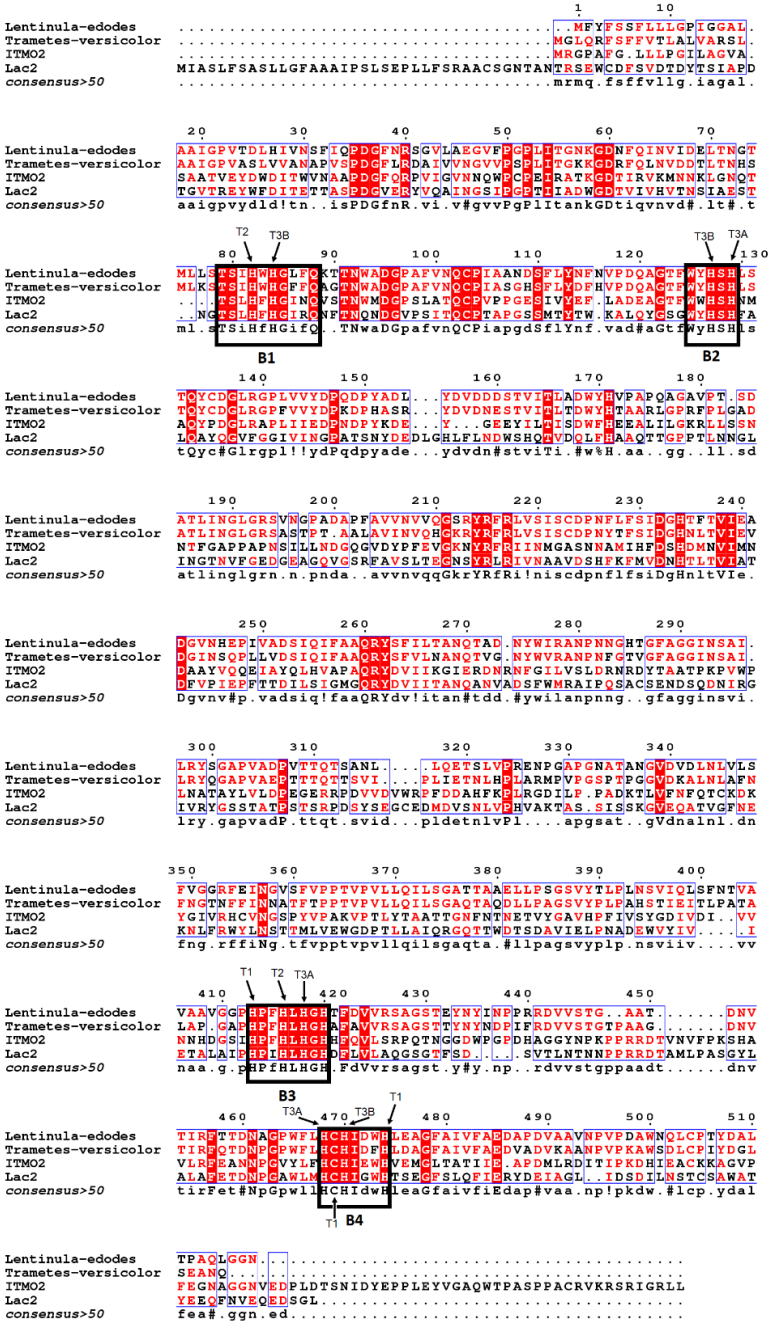

Figure 13 Multiple alignments of ITMO2 and Lac 2 from Scedosporium apiospermum and two well described laccases from *Lentinula edodes* (BAB83131) and *Trametes versicolor* (Q12718). Conserved amino acid are highlighted in red. The conserved domain involved in the copper in copper binding were indicated with the boxes: B1, B2, B3 and B4. T1, T2, T3A, and T3B indicate the putative corresponding type 1, 2, and 3 copper sites (T3 sites contains two copper atoms named A and B)

A multiple alignment was performed to compare the amino acid sequences of ITMO2 and Lac2 with that of two well described laccases from *Trametes versicolor* Q12718 and *Lentinula edodes* BAB83131 in order to visualize the putative conserved domains that ITMO2 and Lac2 could share with formally described laccase Figure 13. Four conserved domains (boxes B1 to B4, Figure 13) known involved in the coordination of copper atoms in the reference protein were also found in ITMO2 and Lac2 protein sequences (Yanfg et al 2021).

The arrows visible on Figure 13 display the amino acids involved in copper binding. The three types of copper coordination sites (T1, T2 and T3 with atoms A and B) contained by laccase from *Trametes versicolor* and *Lentinula edodes* are also visible in Lac2 and ITMO2.

Table 11 Comparison of characteristics of Lac2 and ITMO2. The Molecular weight and the isoelectric point were obtained using Compute pI/Mw

Enzyme	Protein length (Amino acids)	Molecular weight (kDa) (Compute Mw)	Isoelectric point (Compute pI)
ITMO2	566	63.07906	5.54
Lac2	568	61.88430	4.45

As shown in Figure 14, ITMO2 and Lac2 the molecular weight of Lac2 is between 66.2 and 116 kDa whereas ITMO2 is under 66.2 kDa. However, the molecular weight of Lac2 was calculated as 61.88 kDa by Expasy (Table 11) which is lower than what is observable on the gel. As Laccase are known to be glycosylated, ITMO2 and Lac2 have been treated with endoglycosidase H and analyzed by SDS-PAGE. As shown in Fig 1 in supplementary data, protein treated by Endo H showed an apparent rededuced molecular weight confirming that the two proteins are glycosylated.

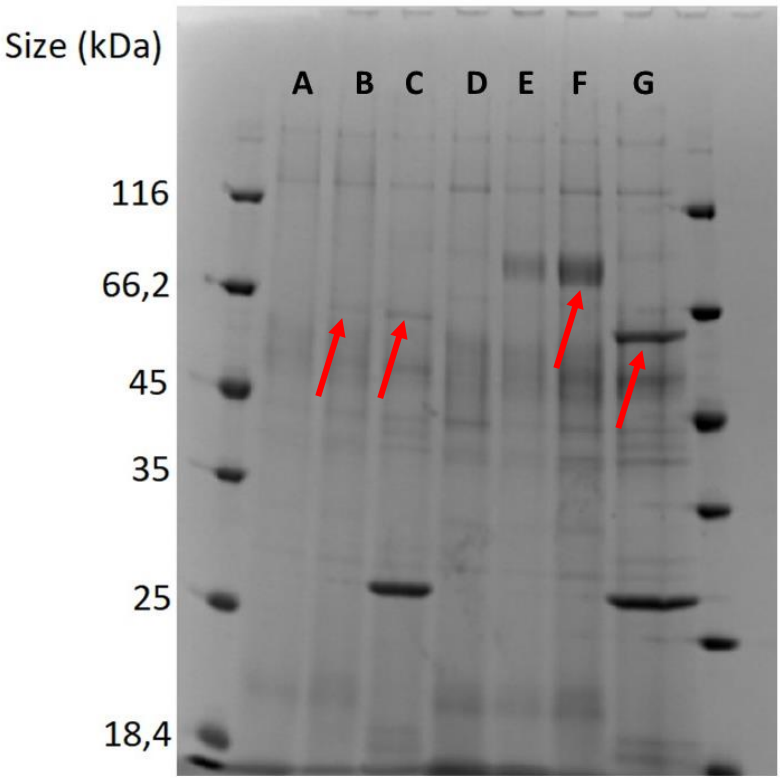

Figure 14 SDS PAGE of ITMO2 and Lac 2 supernatants, lane A: RIY 145, lane B: ITMO2, lane C: ITMO2+ Endoglycosidase Lane H, D: RIY 145, lane E and lane F: Lac 2, lane G: Lac 2+ Endoglycosidase H.

2.9) Oxidation of various substrate

Table 12: Activity of ITMO2 and Lac 2 supernatants on various substrates. The experiments were run in three replicates. The data are presented as average and standard deviation from triplicates

Substrate	ITMO2 (U.l-1)	Lac 2 (U.l-1)
ABTS	1330,8 ± 8,1	30,7 ± 0,7
O-dianisidine	592,6 ± 34,1	3,4 ± 0,13
2,6 dimethoxyphenol	12,3 ± 0,5	10,1 ± 0,25
Pyrogallol	41,6 ± 2,1	9,9 ± 0,22
Dopamine + MBTH	0,95 ± 0,04	1,93 ± 0,04

ITMO2 showed an activity on ABTS of 1330.8 $U.l^{-1}$ which is at least twice the activity measured on the other substrates (Table 12). Interestingly, the second substrate that showed the highest oxidation is O-dianisidine which is also a non-phenolic substrate. The phenolic substrates were also effectively oxidized by ITMO2 but at a slower rate. The enzymatic solution containing ITMO2 showed an activity of 41.6 $U.l^{-1}$ on pyrogallol and a lower of 12.3 $U.l^{-1}$ on DMP. A very poor activity, lesser than 1 $U.l^{-1}$, was detected for the oxidation of Dopamine.

Lac 2 showed also an ABTS activity more than twice higher than the other substrates. Contrary to ITMO2, Lac 2 showed a higher activity on phenolic substrates such as DMP and Pyrogallol than on O-dianisidine which is a non-phenolic substrate. Moreover, despite a much lower ABTS activity, Lac2 presented an activity twice higher than ITMO2 on the Dopamine plus MBTH test.

3) Discussion

The aim of this study was to develop a methodology for rapid identification, heterologous production and partial characterization of fungal ligninolytic enzymes such as laccase, Lip and Mn from environmental samples. In nature the degradation of lignin is mainly performed by fungi (Wong, 2009), therefore they were specifically targeted in the present work. In order to find new ligninolytic fungal strains, three different environments were selected, namely a forest, a parking lot and a vineyard infected with esca disease. All of them are likely to host ligninolytic fungi and sampling in these three environments could reveals much biodiversity than one specific ecosystem.

For fungal isolation PDA and Saboureau media supplemented with antibiotics were used as they were designed to foster the growth of fungi (Atlas, 2004).

71 pure isolated fungal strains were obtained from the three selected environments. The next step of the presented methodology is to reveal the ligninolytic enzymes of each isolate by a screening of enzymatic activities. As ligninolytic enzymes are meant to be secreted (Pollegioni et al., 2015), the fungi were grown in liquid culture and culture supernatants were tested for enzymatic activity. 96 wells deepwell (1,5 ml) were chosen for practical purposes as they enable the growth of a large number of strains in parallel.

Besides, ligninolytic enzymes are known to be triggered by different *stimuli* (Janusz et al., 2013) (Piscitelli et al., 2011). According to the literature, inductions involving lignocellulosic biomass and small aromatic compounds, seem to be very effective to trigger the production of laccase, Lip and Mnp (Daly et al., 2020) (Janusz et al., 2013). Therefore, three media supplemented or not with inductors were used for the screening. SM1 medium is a rich medium well described to be appropriate for the detection of ligninolytic enzymes (Peláez et al., 1995).Wheat straw was added to SM1 as a natural inductor (Elisashvili & Kachlishvili, 2009) to design SM2 medium. Similarly, guaiacol which is an aromatic compound derived from lignin, was used to design SM3. Also, sampling was performed after 7 and 14 days as the kinetics of enzyme production may vary for a given fungal strain and culture conditions (Galhaup, Wagner, et al., 2002). The positive control (*Trametes versicolor)* results show the importance of using inductor and the sampling timing in the detection of this kind of activities. For instance, Mnp was

detected only in the two inductions media after 14 days of growth and Lip was detected just once in SM2 medium at days 7. Without these two induction media Mnp and Lip would not have been detected with this fungus; Moreover ERSC18, ERSC11, or BRCR15 laccase production have been triggered only by SM2 or SM3. Similarly, BRMO5 and ERSC11 would not have been detected if only one sampling time was performed. Induction media and sampling time were thus key factors for this screening.

71 strains were tested for ligninolytic activities and 15 of them presented at least one enzymatic activity. Among them, twelve strains belong to species with already described ligninolytic activities such as *Fusarium oxysporum, Trichoderma sp., Aspergillus sp.* and *Alternaria alternata. Fusarium oxysporum* was demonstrated to present laccase activity (Hernández-Monjaraz et al., 2018). Some laccase genes were furthermore expressed with success in several hosts such as *Saccharomyces cerevisiae* (Kwiatos et al., 2020) or *Pichia pastoris*. Other studies have also demonstrated that this yeast shows some Mnp and Lip activities (I. S. Silva et al., 2009). Similarly, to *Trichoderma* sp, the *Aspergillus* genera is well-known as ligninolytic enzymes producer, including laccase, Lip and Mnp (Jin & Ning, 2013) (Sijinamanoj et al., 2021). The results obtained with *Alternaria alternata* during the screening is also in accordance with previous reports (Mostafa & Abd El Aty, 2018) (HAO et al., 2006). The presence of these fungi already known for their ligninolytic potential confirms the accuracy of this method which target this kind of activities.

Beside these well characterized fungal species, strains of *Peniophora versicolor*, *Piptoporus betulinus* and of the complex species *Pseudallescheria boydii / Scedosporium apiospermum* have been identified from samples collected in vineyard and forest environment. They are of particular interest as they are less described in the literature regarding their ligninolytic activities. For instance, *Piptoporus betulinus* displayed Laccase and Mnp activities. To our knowledge this basidiomycete, known to be responsible for a brown rot phenomenon of birch (Peláez et al., 1995), has not been reported to date with such activities. Similarly, another basidiomycete*, Peniophora versicolor* was found with laccase, Lip and Mnp. A laccase activity was already found in a near species *Peniophora cinerea* (Silvério et al., 2013) but no Lip and Mnp were reported to date for this fungus.

In addition of these two basidiomycetes, three ascomycete strains identified as *Pseudalecharia boydii* or *Scedosporium apiospermum* were found to interest.

S. *apiospermum* is known to be a human opportunistic pathogen (Bouchara & Papon, 2019) and to be resistant to the main antifungal molecules used in medicine. It is also known to degrade organic compounds and especially aromatics pollutants (Claußen & Schmidt, 1998). Two sequences of laccase like gene were detected *in silico* (Morales et al., 2017) in this fungus and nine putative coding sequences were found by this present study. Moreover, Martínez and collaborators (2020) have detected a laccase activity in *S. apiospermum* while another study did not reveal such activity with another strain of the same species (Han et al., 2021).The mechanism and the enzymes involved in the processes of organic compounds degradation by this species is thus not understood yet. No enzymes presenting laccase like activity were characterized yet. More investigations would be needed on this specific fungus to characterize its enzymatic arsenal. Furthermore, this fungus belongs to the ascomycetes which are less studied than the basidiomycetes for laccase activities. Besides, *S. apiospermum* presents a laccase activity and those enzymes have a major advantage over Lip and Mnp as they only require molecular oxygen to initiate their catalytic cycle (Baldrian, 2006). They do not request peroxide hydrogen and manganese ions which is a real asset when it comes to design industrial outputs. All those elements showed the potential of originality of working on this specific filamentous fungus. Therefore, this fungus was chosen for further experimentations including the heterologous expression of its putative ligninolytic genes.

First, the genome of *S. apiospermum* was screened for putative laccase, Lip and Mnp encoding genes using well characterized proteins as queries (Table *1*). The proteins used as queries were all described in the literature with evidence of their catalytic properties. Moreover, at least two different enzymes from different species were used for each type of ligninolytic activity to diversify the queries.

Only putative laccase genes were found which is in accordance with the results of the activity measurements where only laccase activity was detected. Nine putative laccase genes were found with identity superior to 25% with the laccase of *Trametes versicolor*. CDS 8589, CDS 2597 and CDS 0469 were not amplified

from cDNA library, most probably due to sequence divergence of gene-primer or to the lack of gene expression in our experimental conditions. As that second hypothesis is the most likely, those two genes were not considered further. ITMO1, ITMO2, ITMO3, Lac2 and CDS9845 were successfully amplified and their sequence analysis revealed the presence of introns. The cloning of cDNA instead of genomic DNA allowed to eliminate any splicing issue during heterologous expression. T*o* further characterize the proteins Lac2, ITMO1, ITMO2, ITMO3 and CDS9845, the corresponding genes were expressed in the yeast *Y. lipolytica* under the control of the strong constitutive pTEF promoter. ITMO1, ITMO3 and CDS 9845 were expressed with success as shown by the qPCR, but no oxidase activity on ABTS can be detected. This suggests that the experimental conditions might be inappropriate for the production or the detection of active recombinant enzymes with these three genes.

However, ITMO2 and Lac2 were expressed with success in *Y. lipolytica* and the two recombinant strains showed a laccase-like activity on ABTS. The lack of redox oxidase activity on ABTS in parental strain RIY145, nor in heat treated culture supernatant of producing strains, confirmed that the observed activity is the results of the Lac 2 and ITMO2 gene products. This was also confirmed by the proteomics analysis by LC-ESI-MS/MS which certified the presence of the two recombinant proteins in the protein extract of strains containing ITMO2 and Lac2 genes. These two genes are thus coding for enzymes with laccase like activity.

As the expression cassettes of Lac 2 and ITMO2 were randomly integrated in the *Y. lipolytica* genome. The kinetics of enzyme production of three strains producing ITMO2 and Lac2 was monitored for three days. The difference between ITMO2 M1 and the two other strains could be due to a different insertion of the gene in the genome of *Y. lipolytica*. This phenomenon was shown in *Saccharomyces cerevisiae* (Bai Flagfeldt et al., 2009). This transformant was thus chosen to produce ITMO2 for the next phases of this study.

The production kinetic of Lac2 was quite surprising as activity was detected only after 24h of growth and then vanished. The pH of the three transformants supernatants was around 8.5 after 48h of growth. Activity of active lac2 supernatant(24h) was assessed at pH 8 (data not shown). No redox activity was detected at pH 8. The absence of activity after 48h could be explained by the denaturation of the enzyme in such alkaline condition.

As no disparities were measured between the three strains expressing LAC2 a transformant was randomly chosen for the rest of the study.

Fungal laccases are glycoproteins with a molecular weight generally ranging between 50 and 110 kDa (Wong, 2009) .The treatment by Endo-H showed that both ITMO2 and Lac2 are glycoproteins and that their molecular weight correspond to the range of most fungal laccase. Moreover as it was shown by the multiple alignments, the active site of laccases has the particularity to contain four copper atoms of three different types of copper sites : type 1 (T1 one copper atom), type 2 (one copper atom) and type 3 (two copper atoms A and B on Figure 13) (Piontek et al., 2002). The region responsible for the copper binding are known to be very well conserved among the laccase family (Wong, 2009). The multiple alignment of ITMO2 and Lac2 with Laccase from *Trametes versicolor* and *Lentinula edodes* shows that both enzymes shared the typical copper sites of laccases. All those elements are clues suggesting that ITMO2 and Lac2 are probably laccase.

Laccases are phenol oxidase that are known to display a broad substrate specificity since they can oxidize a vast array of phenolic and non-phenolic substrates. The importance of these characteristics is very significant in lignin degradation (Ball et al., 1989) but also in textile dyes and aromatic pollutants removal (Peter Guengerich, 1990).

The ability of ITMO2 and lac 2 to oxidize non-phenolic molecules such as ABTS and O-dianisidine and phenolic compounds such as 2,6-Dimethoxyphenol, pyrogallol and dopamine, was assessed. Fungal laccase displayed generally a better affinity for ABTS than for other substrates (Dantán-González et al., 2008). Both enzymes reacted according to this assertion (Table 12) as Lac2 and ITMO2 showed an ABTS activity which is at least twice higher than their respective activity on the other substrate. Both enzymes were also able to oxidize O-dianisidine which is also a non-phenolic substrate.

Laccases can present disparities in their affinity with phenolic substrate in function of the nature and the location of the substituents linked to its aromatic ring (Baldrian, 2006). The phenolic substrates were chosen for this study because of their differences in the number, position and nature of their substitutions. The two enzymes were able to react with all the phenolic substrates, but they did not show the same preference toward DMP, pyrogallol and dopamine highlighting

their differences in their catalytic properties. ITMO2 and Lac 2 are thus able to oxidize either non-phenolic or phenolic compounds. These results confirm that ITMO2 and Lac 2 belong to the multicopper phenol oxidase family and present laccase activity. Their catalytic properties are nevertheless very different suggesting they can present distinct potent biotechnological outputs.

The fact that they can both operate on phenolic and non-phenolic compounds suggest that these enzymes could operate on substrate composed of either phenolics or non-phenolic bounds. Moreover, both enzymes are also able to oxidize the O-dianisidine which is a precursor to dyes used in the textile industries such as Direct Blue 1 (Hunger et al., 2011) . ITMO2 and Lac2 could be also good candidates for the degradation of this kind of industrial dyes.

This present study aims to present a method enabling the detection and the production of novel ligninolytic enzymes. To illustrate our approach, this method was implemented with the isolation of 71 fungal strains from three different environments. This led to the detection and the production of two novel enzymes from *Scedosporium apiospermum* with laccase like activity. The genes encoding these two enzymes were expressed and produced with success in *Yarrowia lipolytica.*

As planned by the method*,* this study also succeeds to described roughly the potential of the two enzymes showing that they can transform various organic compounds either phenolic, or non-phenolic. These capacities are very promising and indicate that ITMO2 and Lac2 could belong to the laccase family and be used for biotechnological outputs including, lignin modification, dyes removal or phenolic compounds transformation.

Acknowledgments

This project was funded by Gembloux Agro-Bio Tech -TERRA Teaching and Research Centre (ULg).

The authors wish to express their gratitude to Pr Florence Fontaine from Reims University for having kindly provided the vineyard samples.

We would like also to thank GIGA proteomics of University of Liege for the help provided in the proteomics analysis.

4) Détermination du pH optimum de Lac 2 et ITMO2

Le pH d'un milieu réactionnel est un facteur déterminant pour l'activité d'une enzyme. Chez les champignons, les enzymes de type laccases présentent généralement un pH optimum acide.

Dans l'objectif de caractériser Lac2 et ITMO2, les enzymes ont été produites ultrafiltrée puis diafiltrées afin d'éliminer des inhibiteurs potentiels provenant du milieu de culture. Les activités enzymatiques sont déterminées sur une gamme de pH allant de 2 à 9 avec l'ABTS comme substrat.

4.1) Matériels et méthodes

Production de Lac2 et ITMO2

Les souches Lac2 MUT1 et ITMO2 MUT1 (cf partie 1.2.7) ont été cultivés dans 400 ml de YPD supplémenté de $CUSO_4$ (0,1 mM). Les cultures ont été inoculées par des précultures de 17h pour une $DO_{(600nm)}$ initiale de 0,5. La culture des deux souches a été menée dans des Erlenmeyers de 5 litres placés sous agitation à 30 °C pendant 24 heures.

Les 400 ml de culture ont été prélevés après 24 heures de croissance puis centrifugés à 11 000 g à 4 °C pendant 10 min. Les surnageants ont ensuite été filtrés en utilisant des filtres en polyether sulfone (PES) de 0,2 µm afin d'éliminer les cellules de levure encore présentes. Les surnageants filtrés ont été maintenus à 4 °C en attendant d'autres expérimentations.

Ultrafiltration et diafiltration de Lac2 et ITMO2

350 ml de surnageant filtré ont été d'abord ultrafiltrés avec des Vivaspin® 20 en PES (Sartorius) avec un seuil de coupure de 30 kDa. En utilisant le même Vivaspin®20, une diafiltration ont ensuite été réalisée avec trois fois le volume initial de surnageant (1050 ml) d'eau physiologique (NaCl 9 $g.l^{-1}$). Les étapes de diafiltration ont été exécutées à 4 °C et à 4000 g. L'activité enzymatique des rétentats issus de la diafiltration ont été testée avec l'ABTS comme substrat.

Détermination du pH optimal de Lac2 et ITMO2

La détermination du pH optimal des deux enzymes a été réalisée en microplaque de 96 puits dans 200µl de milieu réactionnel. 50µl de solution enzymatique ont été additionnées à 100 µl de tampon de Britton Robinson (0,1 M) (Mongay & Cerda, 1974)et 50 µl d'ABTS (1,8 mM). L'augmentation de l'absorbance a été suivie à 420 nm pendant 30 min. à 30 °C. L'activité enzymatique a été exprimé en U. U étant défini comme représentant la quantité d'enzyme nécessaire pour traiter une micromole de substrat en une minute. Les tests ont été réalisés en triplicats.

4.2) Résultats

Tableau 6 Résultat de l'étape de diafiltration de ITMO2 et Lac2. L'activité enzymatique de chaque échantillon correspond à la moyenne de trois réplicas techniques.

Enzyme	Étape	Activité ($U.l^{-1}$)	Facteur de concentration (Activité)	Facteur de concentration (volume)
Lac 2	Surnageant de culture	28,2 ± 0,7	/	/
	Diafiltration	802,9 ± 19,7	29,2	35
ITMO2	Surnageant de culture	606,8 ± 6,8	/	/
	Diafiltration	11184,5 ± 341	18,43	35

Comme le montre le Tableau *6*, l'activité du surnageant brut de Lac2 a été multiplié par 29,2 passant de 28,18 à 802,88 $U.l^{-1}$. L'activité de ITMO2 est quant à elle passée de 606,84 à 11184,55 ce qui donne un facteur de concentration d'activité de 18,43.

Les solutions enzymatiques ayant été traitées par diafiltration ont été utilisées pour déterminer le pH optimal apparent des deux enzymes en utilisant l'ABTS comme substrat. Pour ce faire nous avons éliminé de potentiel inhibiteur par diafiltration. Les solutions enzymatiques diafiltrées ont été utilisées pour la détermination du pH optimum.

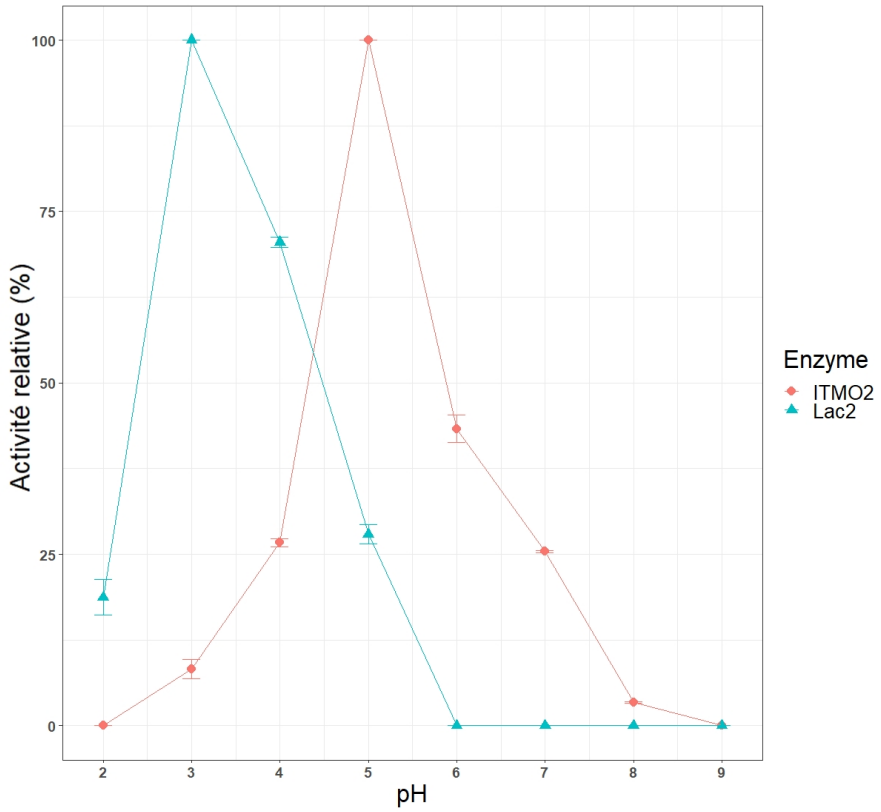

Figure 15 Effet du pH sur l'activité de ITMO2 et Lac2 avec l'ABTS comme substrat. Les tests ont été réalisés en triplicat dans du tampon de Britton-Robinson. Les résultats sont exprimés en activité relative.

Comme le montre la Figure 15, Lac2 et ITMO2 ne réagissent pas de la même manière face à la variation du pH. L'activité de Lac2 est maximale à pH 3, elle diminue de 30% à pH4 puis de 75% à pH 5 et devient nulle à pH 6.

ITMO2 présente un profil différent avec un pH optimal de 5. ITMO2 montre une activité diminuée de 56,7% à pH 6 ainsi qu'une activité diminuée de 75% à pH 7. À pH8, l'activité de ITMO2 ne représente plus que 3,4% de l'activité maximum de l'enzyme et disparait complètement à pH 9.

4.3) Discussion

Les surnageants contenant Lac2 et ITMO2 ont subi une étape de diafiltration afin d'éliminer d'éventuels inhibiteurs issues du milieu de culture. Le poids moléculaire de Lac 2 et ITMO2 a été estimé par SDS PAGE (cf partie 2.8). Le poids moléculaire de Lac2 se situe au-dessus de 66 kDa et celui de ITMO2 se situe entre 63 et 66 kDa. Un seuil de coupure (30 kDa) a été choisi afin de prévenir le passage d'une partie des enzymes dans le perméat.

Les solutions enzymatiques obtenues ont ensuite été utilisées pour déterminer leur pH optimal avec l'ABTS comme substrat dans un milieu réactionnel tamponné à l'aide d'un tampon de Britton Robinson. Ce tampon permet de tester une très grande gamme de pH (2 à 12) (Mongay & Cerda, 1974), rendant possible la détermination du pH optimal d'une enzyme avec un seul type de tampon. Cela évite d'utiliser des sels différents en fonction de la gamme de pH à tester. Les deux enzymes montrent un comportement différent par rapport à l'évolution du pH. Lac2 est active dans des gammes de pH acide avec un pH optimal de 3 et une activité nulle à partir de pH6. ITMO2 a la capacité d'opérer dans des pH moins acides que Lac2 avec un pH optimal de 5 et une activité d'environ 25% à pH neutre. Comme le montre Tableau *7*, les pH optimaux des deux enzymes sont proches de pH optimaux de laccases caractérisées dans la littérature.

Tableau 7: pH optimal de laccases connues avec l'ABTS comme substrat

Enzyme (n° accession)	Organisme	pH optimal	Référence
Lac2	*Scedosporium apiospermum*	3	Cette étude
ITMO2	*Scedosporium apiospermum*	5	Cette étude
Q12718	*Trametes versicolor*	4,5	(Litwińska et al., 2019)
AAF13052	*Pycnoporus cinnabarinus*	4	(Record et al., 2002)
Q70KY3	*Melanocarpus albomyces*	3,5	(Kiiskinen et al., 2002)
JN5559771	*Botrytis aclada*	3	(Kittl, Mueangtoom, et al., 2012b)
EF050081	*Monilinia fructigena*	3,5	(Bao et al., 2012)
MT450838	*Madurella mycetomatis*	4	(Tülek et al., 2021b)

5) Analyse bio-informatique des laccases putatives de *Scedosporium apiospermum*

5.1) Matériel et méthodes

Outil de prédiction de domaines caractéristiques dans les protéines

La présence d'une séquence signal putative dans la structure primaire des 9 enzymes putatives de *S. apiospermum* a été déterminé grâce à SignalP 6.0. La présence d'un domaine transmembranaire a également été vérifiée grâce au server DeepTMHMM (Hallgren et al., 2022)

Réalisation de l'arbre phylogénétique

Les 9 séquences d'acides aminés des laccase putatives de *S.apiospermum* ont été tout d'abord alignées avec 18 multicopper oxydases de familles différentes issues de la littérature (Tableau *8*). L'alignement a été effectué en utilisant l'algorithme MUSCLE disponible dans le logiciel MEGA 11 (Tamura et al., 2021). Au total de 27 séquences de protéines ont été utilisées pour l'analyse et les positions d'alignement ambiguës ont été retirées des données.

L'alignement a été ensuite utilisé pour construire l'arbre phylogénétique en utilisant la méthode du Neighbor-Joining method (Saitou & Nei, 1987) toujours avec le logiciel MEGA 11. une analyse de la robustesse doit être effectuée, d'habitude par le « bootstrap ». Les valeurs de « bootstrap » sont exprimées en pourcentage de 500 répétitions.

Tableau 8 Liste des protéines utilisées pour la construction de l'arbre phylogénétique.

Activité	Numéro d'accession	Organisme	Référence
Laccase	Q70KY3	*Mélanocarpus albomyces*	(Hakulinen et al., 2002)
	ADA41449	*Myceliophtora thermophila*	(Berka et al., 1997)
	AAA33105	*Cryphonectria parasitica*	(P. Wang & Nuss, 1998)
	KXX78172	*Madurella mycetomatis*	(Tülek et al., 2021a)
	AFC76164	*Botrytis aclada*	(Kittl, Gonaus, et al., 2012)
	Q12541	*Agaricus bisporus*	(Perry et al., 1993)
	AAD30964	*Coprinopsis cinerea*	(Yaver et al., 1999)
	AQX45447	*Pleurotus ostreatus*	(Zhuo et al., 2018)
	AAT99290	*Lentinula edodes*	(Sakamoto et al., 2008)
	AAF13052	*Trametes cinnabarina*	(Otterbein et al., 2000)
	Q12718	*Trametes versicolor*	(Ong et al., 1997)
Iron transport FET3	NP_013774	*Saccharomyces cerevisiae*	(D. M. de Silva et al., 1995)
	CAA70509	*Candida albicans*	(Eck et al., 1999)
	I1RMG9	*Gibberella zeae*	(GREENSHIELDS et al., 2007)
Ascorbate oxidase	BAA24288	*Acremonium sp.*	(Hirose et al., 1994)
	XP 003838546	*Leptosphaeria maculans*	(Rouxel et al., 2011)
Bilirubin oxidase	Q12737	*Myrothecium verrucaria*	(Koikeda et al., 1993)
	A0A1S7UJB9	*Rosellinia necatrix*	(Shimizu et al., 2018)

5.2) Résultats

Tableau 9 Résumé des prédictions de présence de séquence signal et de domaine transmembranaire

Enzyme	Probabilité de séquence signal	Position du Site de clivage (Acides aminés)	Probabilité de site de clivage	Présence d'un domaine transmembranaire
Lac1	0	0	0	Non
Lac2	1	28-29	0,75	Non
ITMO1	1	22-23	1	Oui
ITMO2	1	21-22	0,98	Non
ITMO3	0,98	29-30	0,95	Oui
CDS0469	1	17-18	1	Non
CDS9845	1	37-38	0,98	Non
CDS8589	0	0	0	Non
CDS2597	1	22-23	0,97	Non

On remarque sur le Tableau *9* que la présence d'une séquence signal putative est détectée chez toutes les enzymes sauf CDS8589 et Lac1. Lac2, ITMO2, CDS0469, CDS9845 et CDS2597 ne possèdent pas de domaine transmembranaire putatifs. Cependant un domaine transmembranaire putatif a été détecté dans la structure primaire de ITMO1 et ITMO3.

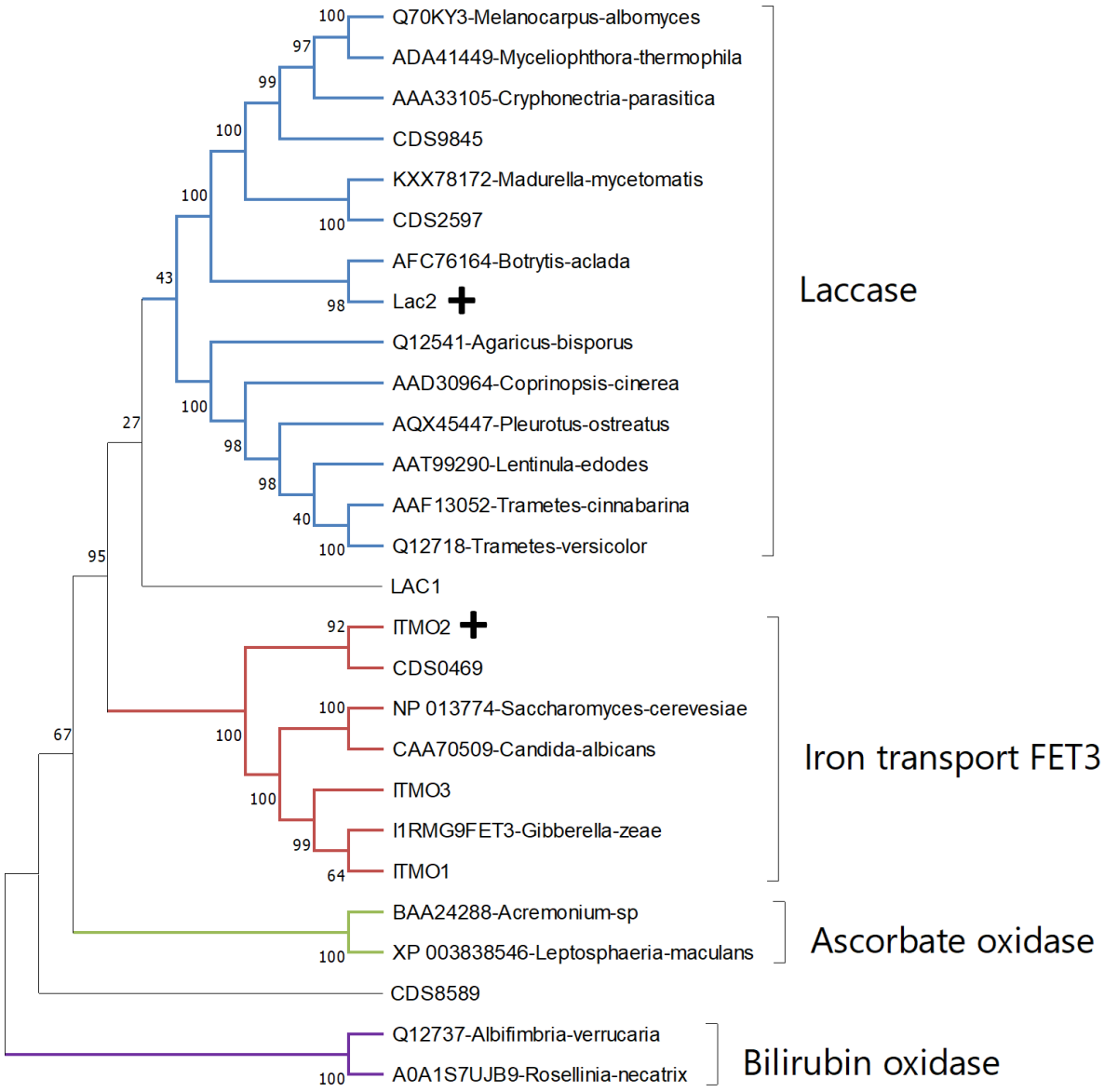

Figure 16 Arbre phylogénétique des principales familles de multicopper oxidases présentes chez les fungi. Toutes les enzymes représentées ont été validées biologiquement avec des preuves de leurs activité sauf la bilirubin oxidase de *Rosellinia necatrix* qui a été annotée par homologie. Les enzymes sont représentées avec leurs numéros d'accession ainsi que leur organisme d'origine. Les 9 enzymes putatives trouvées dans le génome de *S. apiospermum* ont été intégrées et soulignées par un trait. Les deux enzymes qui ont été exprimées avec succès ont été marquées d'une croix noire.

La Figure 16 représente un arbre phylogénétique des familles de multicopper oxidases (MCO) trouvées chez les champignons (N. Xie et al., 2018). Ainsi 4 grandes familles de MCO sont représentées, les bilirubine oxydase, les ascorbate oxydase, les iron transfert oxidase (FET3) et les laccases (N. Xie et al., 2018). À l'exception de la bilirubin oxidase de *Rosellinia necatrix*, les propriétés catalytiques de toutes les enzymes utilisées pour l'élaboration de l'arbre ont été validées comme telles par mesure de leur activité enzymatique dans la littérature.

Les différentes enzymes sont bien regroupées en clades correspondant à leurs familles respectives. On remarque que dans la famille des laccases, deux clusters séparés sont visibles en fonction de la division des organismes d'origines (ascomycète ou basidiomycète).

Suite au criblage *in silico* du génome de *Scedosporium apiospermum* en utilisant des laccases connues comme requête, 9 gènes correspondant à des laccases putatives ont été trouvés (cf partie 2.4). L'arbre phylogénétique généré montre que les 9 gènes ne sont pas tous classées dans le clade correspondant à la famille des laccases. En effet, ITMO1, ITMO2 et ITMO3 et CDS0469 ont été positionnées dans le clade correspondant au Iron multicopper oxydases et CDS8589 et Lac1 sont en dehors des clades définis. En revanche, CDS9845, CDS2597 et Lac2 se retrouvent bien dans le clade correspondant à la famille des laccases.

5.3) Discussion

Le criblage *in silico* associé à cet arbre phylogénétique permet de mettre en lumière la diversité des oxydases à cuivre présentes chez *Scedosporium apiospermum*. Cela permet également de préciser la nature des deux enzymes qui ont été exprimées et produites avec succès (Lac2 et ITMO2). En effet, Lac2 se trouve dans le clade correspondant à la famille des laccases, ce qui est un argument de plus en faveur de sa classification dans cette famille d'enzyme.

En revanche, ITMO2 est classé au sein des FET3. Les FET3 sont, à l'instar des laccases, capables d'oxyder de nombreux substrats phénoliques et non phénoliques dont l'ABTS et la dopamine (Lang et al., 2012) (Kinkar et al., 2019). Cela explique pourquoi ITMO2 a montré des activités contre les différents substrats détaillés dans la partie 2.9.

De nombreuses études ont été réalisées pour déterminer les éléments structuraux qui confèrent une activité ferroxidase aux multicopper oxydases.

Il s'avère que les résidus Glu-185 et Tyr-354 sont nécessaires à FET3 de *S. cerevisiae* pour oxyder Fe2+ en Fe3+ (Bonaccorsi di Patti et al., 2001)(Askwith & Kaplan, 1998) (di Patti et al., 2000). Ces deux résidus sont conservés chez les multicopper oxydases de type FET3 (Larrondo et al., 2003). ITMO2 présente l'équivalent de Glu-185 et de Tyr-354 dans sa structure primaire. Cela suggère que ITMO2 soit capable de présenter une activité ferroxidase. En outre, les enzymes de type FET3 sont ancrée dans la membrane plasmique. Une séquence signal et un domaine transmembranaire sont visibles dans leur structure primaire (Spizzo et al., 1997). Or l'outil de prédiction (DeepTHMMM) n'a pas détecté la présence d'un domaine transmembranaire dans la structure primaire de ITMO2 (Tableau *9*). En revanche, une séquence signal comprenant les 20 premiers acides aminés de ITMO2 a été détectée par SignalP-6.0 avec une probabilité de 1.

Ces éléments suggèrent que ITMO2 serait une multicopper oxydase, destinée à être sécrétée, présentant une activité ferroxidase mais également une activité rédox sur substrats phénoliques et non phénoliques. Une enzyme montrant des caractéristiques similaires a été trouvée dans le champignon *Phanerochaete chrysosporium* (Larrondo et al., 2003).

En perspective de ce travail, il faudrait tester l'activité ferroxidase de ITMO2 pour pouvoir trancher et définitivement classer cette enzyme. La méthode la plus courante est le suivie de l'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+}. Ce suivi peut être directe en observant l'apparition d'ion Fe^{3+} à 315 nm (Bonomi et al., 1996). Une autre méthode consiste en l'ajout de ferrozine qui agit en tant que chélateur des ions Fe^{2+} restant à la fin du temps de réaction. La diminution de l'absorbance due au complexe Fe^{2+}–ferrozine permet de déterminer le taux de transformation du Fe^{2+} en Fe^{3+} et donc l'activité ferroxidase de l'enzyme (Hoopes & Dean, 2004).

En outre, ITMO2 et Lac2 ont toutes les deux démontrées des activités redox vis à vis de nombreux substrats (cf. 2.9). Elles ont donc toutes les deux un intérêt biotechnologique qu'il serait intéressant d'étudier. Afin d'étudier d'éventuels applications de dégradation de la lignine, il serait intéressant de déterminer l'activité rédox de ces enzymes sur différents médiateurs connus, comme l'HBT, le TEMPO et l'acide violurique. L'activité de ces enzymes pourrait également être testée sur différents polluants aromatiques afin de déterminer si elles peuvent avoir des applications en dépollution ou en traitement de rejets industriels.

Chapitre 3 : Étude de l'influence des séquences signal sur la production de l'enzyme recombinante Lac2

Introduction

La méthodologie utilisée dans le chapitre 1 permettant de cribler la biodiversité pour trouver de nouvelles enzymes ligninolytiques, implique d'être en mesure de cloner en parallèle un nombre important de gènes. Les enzymes recherchées (laccase, Lip et Mnp) par le criblage d'activités sont destinées à être sécrétées majoritairement comme l'indique le Tableau 5 (chapitre 1). Il est connu que toutes les laccases ne sont pas destinées à être sécrétées (Nagai et al., 2003).

Dans la stratégie employée pour la production par *Y. lipolytica* (chapitre 1), les gènes d'intérêts ont été clonés sans considération de présence de séquence signal éventuelles. C'est-à-dire que les séquences signals natives sont potentiellement présentes en plus de la séquence signal propre à *Y. lipolytica.*

Il est donc important de vérifier si l'addition d'une séquence signal propre à *Yarrowia lipolytica* avec un gène contenant déjà une séquence signal native peut nuire à la production et à la sécrétion de l'enzyme recombinante. De plus, il peut être intéressant de confirmer la présence d'une séquence signal putative. Cela peut être déterminer en testant la capacité de la séquence signal native à effectuer la sécrétion de la protéine dans *Y. Lipolytica*.

La production de lac2 a été choisie pour vérifier ces hypothèses.

Dans le chapitre précédent, une séquence signal a été détectée dans la structure primaire de Lac2 avec une probabilité de 0,9992 et un site de clivage entre les acides aminés numéros 28 et 29 soit entre la 84ème et la 85ème paire de base du gène. Le gène de lac2 a été amplifié sans la séquence signal putative.

De nouveaux vecteurs d'expression ont été construits par assemblage Golden Gate en intégrant trois séquences signal différentes propres à *Yarrowia lipolytica* SP3 (spYALI0E22374g), SP10 (spXPR2pre) SP7 (spLip2pre 3xXA) et la partie codante de Lac2. Un vecteur d'expression intégrant seulement la séquence signal native de Lac2 a été également construit.

Trois combinaisons ont été testées comme le monte la Figure *17*.

La première combinaison est la séquence du gène de Lac2 complète avec l'addition de SP3, SP7 et P10. La deuxième consiste en la séquence de Lac 2 tronquée sans la séquence signal native avec l'addition de SP3, SP7 et SP10. La troisième consiste en la séquence de Lac2 avec la séquence signal native de *S. apiospermum.* Cette dernière permettra de savoir si la séquence signal native putative peut permettre la sécrétion de Lac2.

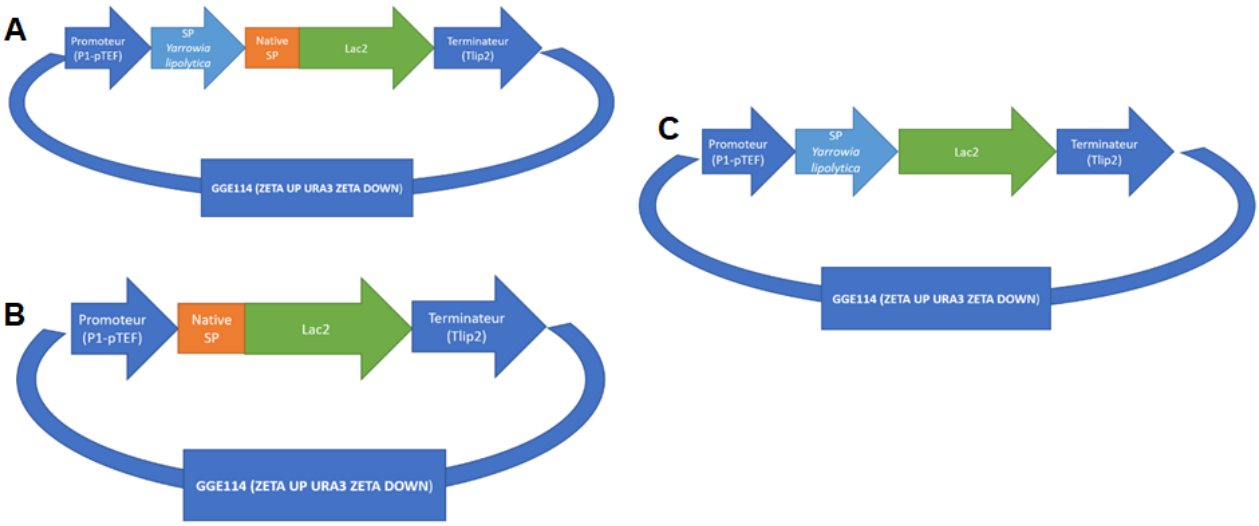

Figure 17 Schéma des constructions de vecteurs d'expression. A: Addition de la séquence signal native avec celle propre à *Yarrowia lipolytica*, B: Présence uniquement de la séquence signal native, C: présence uniquement de la séquence signal propre à *Yarrowia lipolytica*.

Le génotype des transformants obtenus avec ces constructions a été vérifié par PCR. Les transformants ont été cultivés pendant 72h et l'activité enzymatique des surnageants a été déterminée toutes les 24h.

1) Matériel et méthodes

1.1) Amplification de Lac2 sans séquence signal

La souche *E. coli* RIE358 porteuse du vecteur TOPO contenant le gène Lac2 a été cultivée pendant 17 heures. Le plasmide a ensuite été extrait et purifié. Lac2 a ensuite été amplifié par PCR sans la partie codant pour la séquence signal en utilisant en 5' une amorce débutant à la 85ème nucléotide du gène d'origine afin d'enlever la séquence signale putative. Pour le clonage un site *Bsa*I a été ajouté en 5' de l'amorce sens et en 3' de l'amorce anti-sens.

Les amorces utilisées sont les suivantes, amorce sens (SLac2 F) 5'-GTAGGTCTCTTGCCGCGGCCTGCTCCGGCA-3' et amorce anti-sens (Lac2 R) 5'-CACGGTCTCATAGACTATAGACCCGAGTCCTCCTG-3'. La version tronquée du gène (SLac2) a ensuite été intégrée dans un vecteur TOPO Blunt et transformée dans *E. coli*.

1.2) Construction du vecteur d'expression et transformation dans *Y. lipolytica*

Lac2 et Slac2 ont été intégrés dans des vecteurs d'expressions en utilisant la méthode d'assemblage du Golden Gate, comme spécifié dans le chapitre 1. Un promoteur constitutif P1-pTEF et un terminateur Tlip2 ont été utilisés. Trois séquences signal ont été testés SP3 (spYALI0E22374g), SP7 (spLip2pre 3xXA) et SP10 (spXPR2pre).

Les vecteurs d'expression ont ensuite été transformés dans *Y. lipolytica* de la même manière que dans le chapitre 1.

1.3) Culture et suivi de l'activité enzymatique des transformants.

Les transformants ont été cultivé dans 25 ml de YPD contenus dans des Erlenmeyer de 250 ml. Les cultures ont été maintenues à 30°C sous agitation pendant 72 h. Des prélèvements de 1 ml ont été effectués toutes les 24 h. Les échantillons ont ensuite été centrifugés et les surnageants stérilisés par filtration (22 µm). L'activité enzymatique des surnageants filtrés a été déterminée avec l'ABTS comme substrat.

2) Résultats

L'activité laccase de chaque transformant a été mesurée pendant trois jours, toutes les 24 heures. De manière similaire à ce qui a été obtenu précédemment, aucune activité enzymatique n'a été détectée chez les différents mutants après 48h et 72 heures de cultures.

L'activité enzymatique a été observée seulement au point 24h chez toutes les souches testées. C'est pourquoi seulement le point 24h est représenté sur la Figure 18.

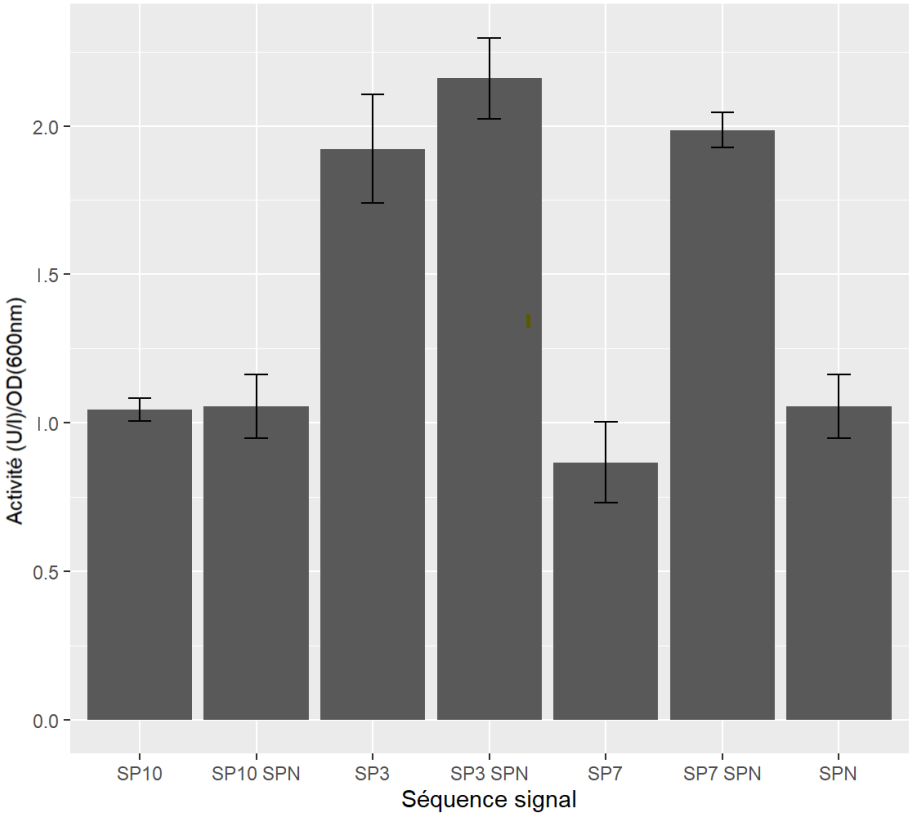

Figure 18 Activité enzymatique de type laccase dans le milieu de culture de Yarrowia lipolytica produisant la protéine recombinante Lac2 après 24h de croissance. Chaque valeur représente la moyenne de trois réplicats biologiques et techniques de chaque souche. Afin de prendre en compte d'éventuelles disparités de production d'enzyme dues à une différence de production de biomasse, les activités enzymatiques ont été rapportées à la $DO_{(600nm)}$ de chaque culture.

Comme le montre la Figure 18, une activité enzymatique de type laccase a été détectée dans les surnageants de cultures des sept transformants. Chaque vecteur d'expression a permis la production et la sécrétion de Lac2 après 24h de culture.

3) Discussion

Trois séquences signal propres à *Y. lipolytica* ont été choisies pour cette étude : SP3, SP7, et SP10. Toutes ont déjà été testées avec succès pour la production et la sécrétion de protéines recombinantes. SP3 correspond à la séquence signal de la protéine YALI0E22374g qui est une *Y. lipolytica* (Celińska et al., 2018). SP7 (spLip2pre-3xLA) est un variant modifié de la séquence signal native de la Lipase endogène Lip2, connue pour permettre un haut niveau de sécrétion (Ledesma-Amaro et al., 2015). SP10 est la séquence signal de la protéase extracellulaire alcaline XPR_2, une protéase sécrétée par *Y. lipolytica* (Matoba et al., 1997). Ces trois séquences signal ont été choisies car elles ont déjà été éprouvées et leurs capacités à conduire la sécrétion de protéines recombinantes dans *Y. lipolytica* sont reconnues(Celińska et al., 2018).

Une activité de type laccase a été détectée dans tous les surnageants, ce qui implique que toutes les constructions générées pour cette étude ont permis la production de Lac2 par *Y. lipolytica*.

Une activité laccase a été retrouvée dans le surnageant de SPN (la construction comprenant seulement la séquence signal native putative de *S. apiospermum).* Lac2 contient donc une séquence signal native ce qui confirme le résultat obtenu *in silico* avec SignalP-6.0. Cela confirme également que Lac2 est sécrétée par le champignon. Cela montre enfin que la séquence signal native de Lac2 est bien reconnue par la levure et permet la prise en charge de la sécrétion de l'enzyme recombinante.

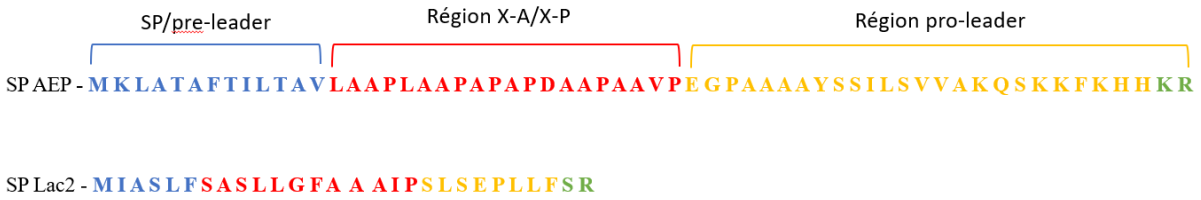

Figure 19 Représentation de la séquence signale de la protéase alcaline extracellulaire de Y. lipolytica (AEP) et de la séquence signale de Lac2 de S. apiospermum. En bleu la région pre-leader, en rouge la région X-A/X-P, en jaune la région pro-leader et en vert le motif signalant le site de clivage (Celińska et al., 2018).

Selon (Celińska et al., 2018), comme montré sur la Figure 19, les séquences signal natives de *Y. lipolytica* contiennent trois parties distinctes. Tout d'abord en N terminal il y a une région SP/ pre-leader débutant par un motif MK, de 7 à 15 acides aminés, suivit par une région hydrophobe commençant par un motif xA contenant 2 à 10 acides aminées terminée par un résidu P cette région est notée X-A/X-P. Ensuite vient une séquence appelée pro-leader constituée d'au moins 10 acides aminés terminée par un motif KR qui marque le site de clivage de la séquence signale. Comme on peut le voir sur la Figure 19, on retrouve en N terminale de Sp Lac2 un motif de 6 acides aminés qui pourrait correspondre à une séquence Pré-leader. On constate ensuite un motif de 13 acides aminés qui correspond à une région X-A/X-P. Vient ensuite une région de 10 acides aminés pouvant correspondre à une région pro-leader. Cependant les deux acides aminés (Ser et-Arg) qui précèdent le site de clivage diffères de ceux des séquences signal de *Y. lipolytica* (Lys-Arg). On observe donc des similitudes dans la structure des deux séquences signals mais également des différences notamment sur le site de clivage. Ces résultats montrent que malgré des différences sur le site de clivage, *Y. lipolytica* est en mesure d'assurer la sécrétion avec la séquence signal native de Lac2.

Des cas similaires ont été rapportés dans la littérature montrant que *Y. lipolytica* possède un système de sécrétion très proche de celui des champignons filamenteux (Madzak et al., 2004). Une glucose oxydase d'*Aspergillus niger*, notamment, a été produite et sécrétée avec succès par *Y. lipolytica* en utilisant la séquence signal native de l'enzyme (Darvishi et al., 2018).

En outre, l'ajout d'une séquence signal propre à *Y. lipolytica* à la séquence non tronquée de Lac2, contenant donc encore la séquence signal native de l'enzyme, n'empêche pas la production ni la sécrétion d'une protéine active. En effet, une activité enzymatique a été détectée dans le surnageant du transformant SP3 SPN. La même observation peut être faite pour SP7 SPN..

Pour certains organismes peu étudiés il peut être difficile de prédire la présence de séquence signal ou la position exacte de leur site de clivage. Afin d'avoir une méthode de clonage normée et efficace il a été décidé de ne pas retirer la séquence signal putative des gènes d'intérêts (chapitre 1). Les résultats de cette étude montrent que cette stratégie est pertinente.

Cette étude a également permis de confirmer que Lac2 est bien pourvu d'une séquence signal. Dans le chapitre 1 aucun motif de domaine transmembranaire n'a été détecté. Lac2 est donc une protéine destinée à être sécrétée dans le milieu extracellulaire.

Chapitre 4 : détermination de la capacité des enzymes présentes dans le surnageant de culture de *S. apiospermum* à modifier la lignine

Introduction

À l'issue du criblage d'activité présenté en première partie, le champignon *Scedosporium apiospermum* a attiré notre attention notamment la souche BRMO10. Ce champignon a montré une activité de type laccase sur tous les milieux utilisés pour le criblage. Ce champignon vivant majoritairement dans les sols très chargés de matière organique ou dans des environnements pollués, est principalement connu pour être un pathogène humain opportuniste (Bouchara & Papon, 2019). Des activités de type laccase ont déjà été démontrées dans le surnageant de culture de ce champignon ainsi qu'une capacité à dégrader certains polluants aromatiques (Claußen & Schmidt, 1998) (Kumaravel et al., 2022). Cependant, à notre connaissance, l'activité ligninolytique de ce champignon n'a jamais été démontrée. La souche BRMO10 de *Scedosporium apiospermum* a été isolée dans des prélèvements issus d'un tas de copeaux de *Cupressus macrocarpa* en décomposition. Le fait que ce champignon ait été retrouvé sur cette essence de bois difficilement putrescible (Zhang et al., 2012), est un indice qui indiquerait qu'il soit doté d'un arsenal enzymatique capable de modifier voire dégrader la lignine. L'activité de type laccase détectée lors du criblage apporte un indice supplémentaire, suggérant que ce champignon soit en mesure de dégrader la lignine. Afin de vérifier cette hypothèse, une démarche expérimentale en deux étapes a été mise en place.

Dans un premier temps, des essais de dégradation d'une lignine technique organosolv ont été menées avec du surnageant de culture de *S. apiospermum*. La capacité de dégradation du surnageant a été, évaluée et comparée à celle d'une laccase commerciale de *Trametes versicolor* dont la capacité ligninolytique est reconnue (Dillies et al., 2020).

1) Matériel et méthode

1.1) Culture de S. apiospermum et production de surnageant de culture

S. apiospermum souche BRMO10 a été cultivé en fiole dans 25 ml de SM1 (cf Chapitre 1 partie 1.2) contenu dans une fiole de 250 ml. La culture a été inoculée par une solution de conidies pour une concentration finale de $5x10^5$ conidies/ml de milieu de culture. La culture a duré 7 jours à 25 °C sous agitation (160 rpm)

La culture a ensuite été centrifugé à 4°C à 4000 g pendant 5 minutes. Le surnageant a été filtré à l'aide d'un filtre PES 0,2 µm puis concentré par ultrafiltration avec un Vivaspin® 20 en PES (Sartorius) avec un seuil de coupure de 30 kDa.

1.2) Mesure de l'activité phénol oxydase

La mesure de l'activité phénol oxydase des extraits enzymatiques a été réalisée en microplaque dans 200µl de milieu réactionnel. 50µl de solution enzymatique ont été additionnées à 100 µl de tampon de tartrate 200 mM et 50 µl d'ABTS (1,8 mM). L'augmentation de l'absorbance fut suivie à 420 nm pendant 30 minutes à 30 °C. La linéarité de l'évolution de l'absorbance fut contrôlée et les échantillons furent dilués quand cela était nécessaire.

1.3) Réaction de dépolymérisation de la lignine

Les tests de dépolymérisation de la lignine ont été menés dans un volume réactionnel de 1,5 ml. Le milieu réactionnel comprenait un tampon acétate 0,1 mM pH 4,6 ainsi que $2mg.ml^{-1}$ de lignine organosolv, 0,02 $mmol.ml^{-1}$ de médiateur (ABTS), et 50 mU de solution enzymatique. La réaction a durée 24h à 30°C sous agitation orbitale à 600 rpm.

Une réaction a été réalisée dans les mêmes conditions avec une solution enzymatique dénaturée thermiquement à 100°C pendant 15 min. L'absence d'activité de la solution enzymatique après dénaturation a été vérifiée. Une réaction sans lignine avec seulement le médiateur et la solution enzymatique active a été également réalisée.

Après réaction les échantillons ont été stockés à -20°C en attendant leur analyse.

1.4) Analyse de la lignine par chromatographie d'exclusion stérique

Les échantillons issus des tests de dépolymérisation de la lignine ont été analysés par chromatographie d'exclusion stérique en utilisant une elution isocratique avec comme phase mobile une solution de NaOH 0,2M comprenant 20% d'acétonitrile. Les échantillons furent élués pendant 90 minutes.

La phase stationnaire consistait en 3 colonnes connectée en série, la TSK-gel G 4 000PWXL, la TSK-gel G 3 000 PWXL et la TSK-gel G oligo PW (Tosoh Biosciences).

Ces colonnes permettent de séparer les molécules dans une large gamme de masses moléculaire : la TSKgel 4 000 PWXL permet de séparer les molécules de masse comprise entre 2 000 et 300 000 Da, la TSKgel 3 000 PWXL sépare les molécules ayant une masse inférieure à 50 000 Da et la TSKgel Oligo-PW sépare les molécules de masse inférieure à 2 000 Da.100 µl d'échantillon ont été injectés et élués à température ambiante. Un détecteur UV (280 nm) a été utilisé pour la détection des composés élués.

2) Résultats et discussion

Lors du criblage d'activité, le champignon *Scedosporium apiospermum* a montré uniquement une activité de type laccase sur l'ABTS. De plus l'étude de son génome a permis de détecter 9 gènes putatifs de laccase et mais aucun gène de Lip et Mnp. On peut donc supposer que ce champignon possède principalement des enzymes de type laccase dans son arsenal ligninolytique.

Or les laccases fongiques sont connues pour nécessiter la présence d'un médiateur pour agir sur une linine complexe (Christopher et al., 2014). Un médiateur est une molécule de petite taille jouant le rôle d'intermédiaire dans la réaction d'oxydation entre une laccase et un substrat de type lignine (Wong, 2009). Dans la nature les médiateurs peuvent être des composés générés par le champignon ou bien des oligomères issus de la lignine (Eggert et al., 1996b) (Camarero S et al., 2005)Plusieurs études ont aussi montré que sans médiateur, les laccases ont plutôt tendance à provoquer des réactions de repolymérisations (Maijala et al., 2012). La présence d'un médiateur est donc jugée nécessaire pour cette expérimentation. Il existe une grande diversité de médiateurs mais les plus utilisés sont l'ABTS, le 1-hydroxybenzotriazole (HBT) et le 2,2,6,6-tétraméthyl-pipéridin-1-yl)oxyl (TEMPO). Le criblage a permis de démontrer que les enzymes d'intérêts sécrétées par le champignon sont actives contre l'ABTS. C'est donc ce médiateur qui fut choisi pour les tests de dépolymérisations de la lignine.

La lignine technique organosolv a été choisie comme substrat car il s'agit d'une lignine technique dont la structure est moins modifiée que celles des autres lignines techniques issues du procédé aux sulfites ou Kraft (Werpy & Petersen, 2004). La structure de la lignine organosolv est donc plus proche de celle de la lignine naturelle.

S. apiospermum souche BRMO10 a été cultivé pendant 7 jours dans le milieu SM2. Le surnageant de culture a ensuite été filtré afin de le stériliser pour empêcher que *S. apiospermum* ne se développe pendant la réaction. Après cela le surnageant a été concentré par ultrafiltration. Comme indiqué sur Tableau *10*, une activité de 31,91 $U.l^{-1}$ a été déterminée dans le surnageant brut de BRMO10. Après ultrafiltration, l'enzyme a été concentrée 4,6 fois avec l'obtention d'une activité autour de 145 $U.l^{-1}$.

Tableau 10 Activité enzymatique du surnageant de BRMO10 obtenue avant et après concentration

Avant concentration $U.l^{-1}$	**Après concentration $U.l^{-1}$**	**Facteur de concentration**
31,9 ±0,3	145,5±17,7	4,6

Le surnageant concentré, a été ensuite utilisé pour déterminer sa capacité à dégrader une lignine technique de type organosolv. 50 mU d'extrait enzymatique ont été mis en contact de la lignine en présence d'ABTS comme médiateur. Après 24 h de réaction, les milieux réactionnels ont été analysés par chromatographie d'exclusion stérique moléculaires (Dillies et al., 2020). La laccase commerciale de *Trametes versicolor* (Sigma Aldrich) a été utilisée dans les mêmes conditions afin de servir de témoin positif. Un contrôle a été effectué afin de certifier que l'apparition de composés aux poids moléculaires différents dans les milieux réactionnels, soit bien issue d'une catalyse enzymatique. Ainsi une réaction avec du surnageant dénaturé thermiquement a été réalisée. Ce témoin est important car il permet de visualiser les éléments qui pourraient provenir de la lignine non dépolymérisée et ceux qui sont apportés par le surnageant de culture.

Les pics communs entre le contrôle et les échantillons n'ont pas été pris en compte dans l'analyse des chromatogrammes. Le chromatogramme de la condition réactionnelle a été donc comparé à ceux des contrôles négatifs pour

déterminer l'effet de l'activité des solutions enzymatiques sur la lignine organosolv.

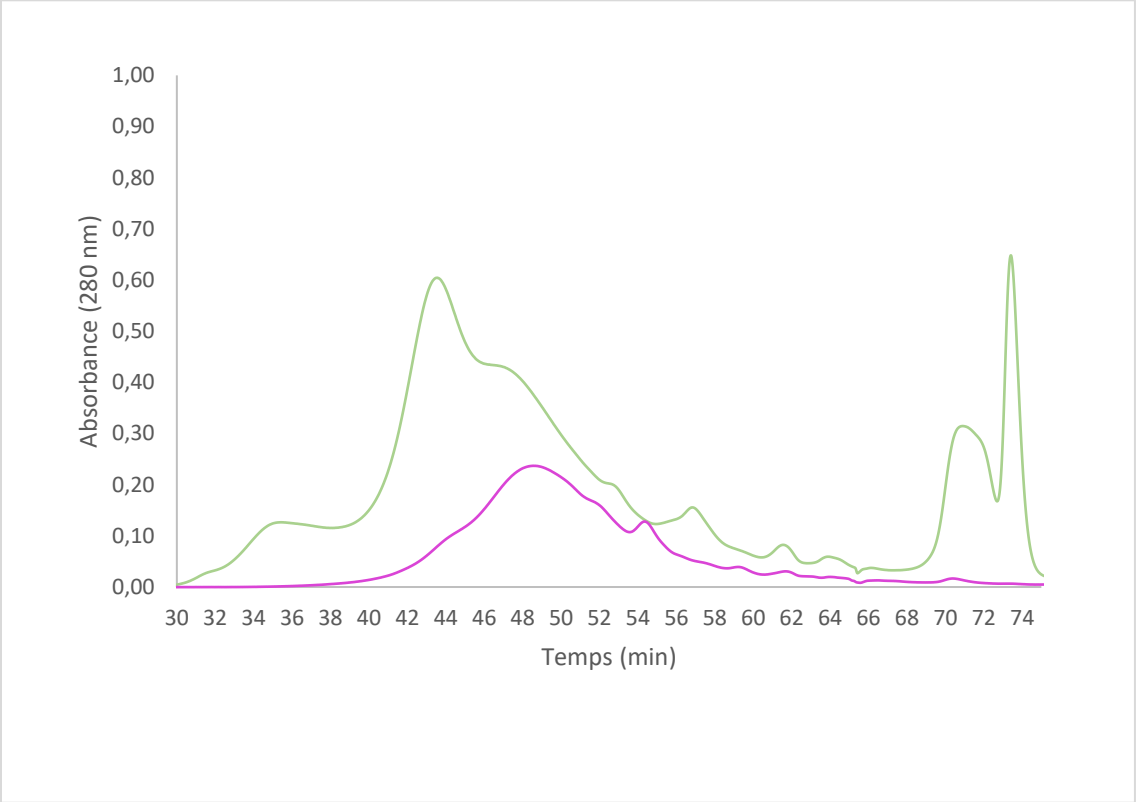

Figure 20 Profil d'exclusion stérique d'un échantillon de lignine organosolv ayant subi une dépolymérisation par système laccase médiateur (SLM) avec une laccase commerciale (50 mU) de *Trametes versicolor* et l'ABTS comme médiateur (courbe verte). Un échantillon d'enzyme inactivée thermiquement a été utilisé comme témoin négatif (courbe mauve)

La Figure 20 montre l'effet du système laccase-médiateur de l'enzyme commerciale de *T. versicolor* et l'ABTS sur de la lignine organosolv après 24h de réaction. Un témoin négatif avec de l'enzyme inactivée y est également représenté. Dans la condition où la laccase de *T.versicolor* est inactivée, on observe que a lignine est éluée de la colonne entre 37 et 60 minutes. En revanche dans la condition réactionnelle où l'enzyme est active on observe l'apparition de composés dès 30 minutes d'élution et jusqu'à 37 minutes. Il y a donc apparition de composés de poids moléculaire supérieurs à ce qui est observé quand l'enzyme est inactive. Ce phénomène a déjà été identifié par de nombreuses études dans la bibliographie. Cela résulte de la repolymérisation non contrôlée de radicaux libres, instables issus de la lignine (Toledano et al., 2014). Ces composés instables peuvent en effet s'associer entre eux pour former des polymères différents et souvent plus complexes que la molécule de lignine dont

ils proviennent (Miller et al., 2002). Les oligomères instables générés sont également susceptibles de se condenser de manière anarchique avec les polymères de lignine encore non dégradés engendrant des molécules de plus haut poids moléculaires (Toledano et al., 2014).

Ces nouveaux polymères plus complexes perturbent l'action du système laccase-médiateur ce qui réduit considérablement les rendements de dépolymérisation (Gasser et al., 2017).

En outre, dans la condition TVL active, on observe l'apparition de composés entre 70 et 75 minutes qui ne sont pas observés dans le contrôle négatif. Ces composés qui apparaissent 10 minutes après la lignine sont donc de poids moléculaire inférieur à cette dernière. Une dépolymérisation partielle de la lignine provoquée par l'action de la laccase et de son médiateur est donc constatée.

La même expérience a été menée avec un surnageant de culture de *S. apiospermum.* Les résultats de ces analyses sont présentés par la Figure 21.

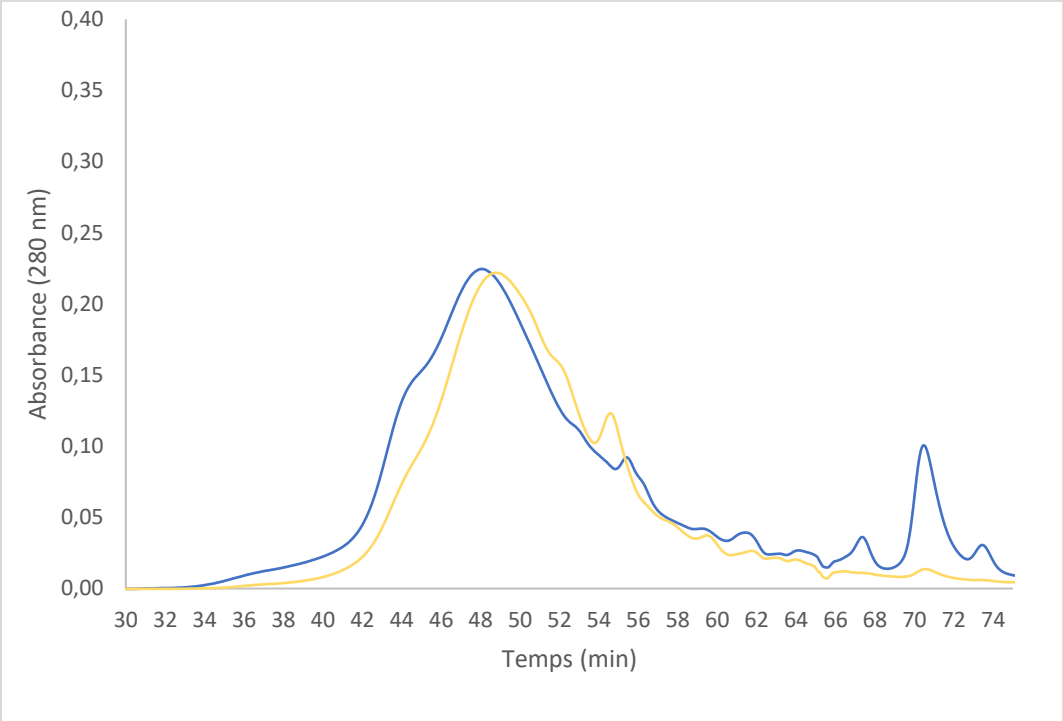

Figure 21 Profil d'exclusion stérique d'un échantillon de lignine organosolv ayant réagi 24h avec un surnageant concentré issu d'une culture de 7 jours de Scedosporium apiospermum avec le médiateur ABTS (courbe bleue). Un échantillon de surnageant inactivée thermiquement fut utilisé comme témoin négatif (courbe jaune)

Avec le surnageant dont les enzymes son actives, on constate un léger décalage vers la gauche du pic de lignine. Ce décalage ne fut pas jugé significatif il n'y a donc pas ou très peu de formation de composés issus d'une éventuelle repolymérisation de la lignine organosolv.

De plus, on remarque, en fin d'élution, l'apparition de composés signalés par trois pics visibles à 67, 71 et 73 minutes l'élution uniquement dans la condition où les enzymes du surnageant sont actives. Ces composés correspondent aux oligomères de lignine formés par une dépolymérisation partielle de la lignine par les enzymes.

En présence d'ABTS, le surnageant de *S. apiospermum* a donc été capable d'opérer une dégradation partielle du polymère de lignine organosolv.

Cependant, comme le montre la Figure 20, l'intensité du pic de correspondant à la lignine des conditions avec enzymes actives, est plus importante que celle du pic de lignine non traitée par une enzyme. Ce qui peut sembler paradoxal, on pourrait s'attendre à une diminution du pic de lignine lorsque celle-ci est dépolymérisée. Ce n'est pourtant pas le cas dans ces conditions de réaction. Il y a donc un biais de mesure avec cette méthode qui empêche une analyse quantitative de la dépolymérisation de la lignine.

Les analyses en chromatographie d'exclusion stérique ont mis en évidence la capacité de *Scedosporium* à dégrader partiellement une lignine technique de type Organosolv. Cette dégradation a généré des molécules de tailles inférieures au substrat d'origine. On observe donc un phénomène de dépolymérisation de la lignine avec l'apparition de composés à faible poids moléculaire. Cela suggère que *Scedosporium apiospermum* est en mesure de modifier la lignine dans son environnement avec les enzymes qu'il sécrète.

Conclusion générale et perspectives

L'objectif de cette thèse était de rechercher de nouvelles enzymes de dégradation de la lignine pour diverses applications biotechnologiques. Nous avons, dans un premier temps, cherché à isoler des souches de champignons issus de milieux naturels capables de produire et sécréter des enzymes ligninolytiques.

Nous avons choisi trois écosystèmes distincts. Le premier était un milieu forestier contenant des feuillus (hêtre et boulot) mais aussi des résineux comme le cyprès Lambert *Cupressus macrocarpa.* Le deuxième écosystème était un environnement agricole, une vigne de chardonnais atteinte de la maladie du bois de la vigne. Le troisième environnement était une souche en décomposition sur un parking. Ces trois niches écologiques ont été choisies car elles présentaient des caractéristiques distinctes. Par exemple, ces environnements n'ont pas subi les mêmes modifications par les activités humaines. L'objectif était d'isoler des souches aux caractéristiques différentes. Nous en avons obtenu 81 isolats.

Ensuite, nous avons effectué un criblage d'activité afin de sélectionner les souches produisant des enzymes d'intérêts. Afin de rendre ce criblage le plus exhaustif possible, nous avons décidé d'utiliser plusieurs milieux de cultures et évalué l'activité enzymatique après plusieurs durées d'incubation. L'étude de la bibliographie démontre en effet le rôle crucial de l'induction sur la production des enzymes ligninolytiques. Celle-ci peut être fortement augmentée par la présence de *stimuli* comme des ions métalliques, des molécules aromatiques ou de la biomasse lignocellulosique. C'est pour cette raison que nous avions décidé d'utiliser trois milieux pour le criblage, un milieu riche sans induction, un milieu contenant de la paille de blé et un autre contenant du gaïacol (monomère issue de la lignine). Ce criblage nous a permis de sélectionner 15 champignons présentant au moins une activité enzymatique d'intérêt. Sur ces 15 champignons, deux souches ont exprimé leurs activités ligninolytiques sur les milieux contenant un inducteur seulement.

Parmi les 15 champignons présentant au moins une activité ligninolytique, nous avons identifiés 2 basidiomycètes, *P. versicolor* et *P. betulinus* ainsi que 13 ascomycètes appartenant à 6 genres différents. Dans la littérature nous avons vu que la majorité des enzymes ligninolytiques étudiées provenaient de basidiomycètes. Nos résultats montrent que les ascomycètes issus des écosystèmes que nous avons choisis sont également des sources d'enzymes d'intérêts.

12 champignons étaient déjà bien décrits comme possédant des activités ligninolytiques et 3 espèces moins connues pour produire des enzymes de ce type. Les deux basidiomycètes, *P*. *versicolor* et *P. betulinus* n'avaient encore jamais été décrits comme possédant des activités ligninolytiques. En outre, l'ascomycète *Scedosporium. apiospermum* a montré une activité de type laccase lors du criblage. Ce champignon avait déjà été signalé comme présentant une activité rédox dans son surnageant de culture, capable de dégrader des colorants de synthèses. Cependant, aucune enzyme n'avait encore jamais été caractérisée.

Nous avons sélectionné ce champignon afin de vérifier si les enzymes détectées dans son surnageant pouvaient modifier une lignine technique de type Organosolv. Les résultats de nos expérimentations en chromatographie d'exclusion stérique ont montré que les enzymes de *S. apiospermum* modifiait partiellement le polymère de lignine en provoquant une légère repolymérisation ainsi que l'apparition de composés plus petits que le polymère d'origine.

Nous avons ensuite criblé le génome de *S. apiospermum* afin d'identifier les gènes potentiels responsables de l'activité ligninolytique détectée pendant le criblage d'activité et sur la lignine. Dans son génome, aucun gène codant pour des Lip et Mnp n'a été trouvé, ce qui concorde avec les résultats du criblage d'activité. Pour caractériser les gènes laccase nous avons décidé de les exprimer de manière hétérologue dans la levure *Y. lipolytica*. Cinq gènes ont été amplifiés et clonés avec succès. Dans nos conditions expérimentales, les gènes Lac2 et ITMO2 permirent chacun, d'obtenir une enzyme recombinante active.

D'après nos résultats, Lac2 et ITMO2 sont deux oxydoréductases à cuivre de type phénol oxydase, glycosylées, présentant une activité d'oxydoréduction de type laccase. Lors de nos expérimentations, ces enzymes ont en effet, permis d'oxyder des substrats phénoliques et non phénoliques. Nos résultats expérimentaux ainsi que nos analyses en bio-informatique indiquent que Lac2 fait très certainement partie de la famille des laccases. ITMO2 en revanche, semble être une oxydase à cuivre ayant potentiellement une activité ferroxidase qu'il faudra élucider. Les travaux réalisés lors de cette thèse ont donc permis de mettre en évidence et de décrire deux nouvelles enzymes avec des activités oxydoréductases provenant du champignon ascomycète *S. apiospermum*. Ces deux enzymes sont capables d'oxyder différents substrats, ce qui laisse présager plusieurs applications potentielles.

Perspectives de ce travail de thèse

Lors du criblage d'activités enzymatiques, nous avons détecté 15 souches nouvellement isolées présentant des activités laccases, Lip et Mnp. Ces champignons constituent une source de gènes d'intérêts conséquente. Il serait donc intéressant de reproduire le travail qui a été effectué sur *S. apiospermum* avec ces autres souches. Notamment avec *P. versicolor* et *P. betulinus* qui n'avaient pas encore été décrits comme produisant des enzymes de types laccases, Lip ou Mnp. Cela permettrait de constituer une collection de gènes codants pour des enzymes ligninolytiques et d'être en mesure de produire et caractériser une grande diversité d'enzymes.

Nos travaux nous ont permis de mettre en évidence la présence de deux oxydoréductases à cuivre provenant de l'ascomycète *S. apiospermum, ITMO2 et Lac2.* Nous les avons caractérisées partiellement. Ces enzymes ont montré une activité rédox sur plusieurs substrats phénoliques et non phénoliques. Cependant, pour réaliser une caractérisation plus poussée, il faudrait désormais purifier ces deux enzymes. Cela permettrait de déterminer plus précisément leurs caractéristiques et déterminer leur activité spécifique sur des substrats de références comme l'ABTS, le 2.6-dimétoxyphénol, ou le pyrogallol. Ainsi nous pourrions comparer ces enzymes avec celles qui sont décrites dans la littérature.

De même, il serait intéressant d'effectuer des tests de dépolymérisation de la lignine en utilisant Lac2 et ITMO2 purifiées. Cela permettrait de déterminer si ces deux enzymes possèdent réellement une activité ligninolytique. Ce serait également un moyen de comparer l'activité de ces enzymes sur le substrat lignine avec l'activité de laccases commerciales comme celle de *T. versicolor*.

En outre, nos analyses en exclusion stérique nous permettent de constater une modification de la lignine mais pas de caractériser la nature des composés formés. Il serait envisageable de réaliser un fractionnement des composés issus de la dégradation de la lignine en récupérant la fraction éluée entre 66 et 74 minutes (Cf chapitre 3) afin de caractériser les composés qui s'y trouvent par LC-MS/MS. Cela apporterait des informations sur l'action de l'enzyme sur le polymère de lignine.

Lors de nos essais de dépolymérisation de la lignine nous avons utilisé l'ABTS comme médiateur. Les enzymes de types laccases ont des affinités différentes en fonction du type de médiateurs (Moilanen et al., 2011). Nous avons vu dans la littérature que d'autre médiateurs ont été caractérisés comme l'acide violurique, l'HBT, l'acide vanillique et le TEMPO. En perspective de ce travail, il serait intéressant de tester plusieurs médiateurs avec ITMO2 et Lac2 afin de déterminer le meilleur couple enzyme/médiateur afin d'optimiser la dégradation de la lignine par ces enzymes.

De plus, nous avons vu dans la littérature que les enzymes ligninolytiques ont la capacité de dégrader un grand nombre de substrats dont des polluants organiques. La dégradation de xénobiotiques pourrait également constituer une application intéressante pour Lac2 et ITMO2. Des études ont notamment montré que *S. apiospermum* produit des enzymes capables de dégrader des colorants de synthèses comme le « reactive yellow » (Kumaravel et al., 2022) mais aussi le composé aromatique comme le p-crésol (Claußen & Schmidt, 1998). Cependant aucune enzyme n'a été caractérisée lors de ces deux études. Il serait intéressant, pour de la recherche fondamentale, de réaliser des tests de dégradation de ces deux polluants avec ITMO2 et Lac2 purifiées afin de déterminer si la présence de ces enzymes peut expliquer la capacité de *S. apiospermum* à dégrader le reactive yellow et le p-crésol. De même il faudrait tester l'activité d'oxydation de ces deux enzymes (purifiées ou en extrait enzymatique bruts), sur d'autres xénobiotiques comme des antibiotiques, des pesticides ou d'autres colorants de synthèses.

Références bibliographiques

Abe, Y. (1989). *Effect of moisture on decay of wood by xylariaceous and diatrypaceous fungi and quantitative changes in the chemical components of decayed woods*.

Adelakun, O. E., Kudanga, T., Green, I. R., le Roes-Hill, M., & Burton, S. G. (2012). Enzymatic modification of 2,6-dimethoxyphenol for the synthesis of dimers with high antioxidant capacity. *Process Biochemistry*, *47*(12), 1926–1932. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.06.027

Adelakun, O. E., Kudanga, T., Parker, A., Green, I. R., le Roes-Hill, M., & Burton, S. G. (2012). Laccase-catalyzed dimerization of ferulic acid amplifies antioxidant activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *74*(1), 29–35. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.08.010

Agarwal, U. P., & Atalla, R. H. (1986). In-situ Raman microprobe studies of plant cell walls: Macromolecular organization and compositional variability in the secondary wall of Picea mariana (Mill.) B.S.P. *Planta*, *169*(3), 325–332. https://doi.org/10.1007/BF00392127

Agustin, M. B., de Carvalho, D. M., Lahtinen, M. H., Hilden, K., Lundell, T., & Mikkonen, K. S. (2021). Laccase as a Tool in Building Advanced Lignin-Based Materials. *ChemSusChem*, *14*(21), 4615–4635. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cssc.202101169

Alic, M., Akileswaran, L., & Gold, M. H. (1997). Characterization of the gene encoding manganese peroxidase isozyme 3 from Phanerochaete chrysosporium1The sequence data reported in this paper have been submitted to the GenBank Data Library under the accession No. U70998.1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, *1338*(1), 1–7. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-4838(96)00235-X

Aljawish, A., Chevalot, I., Piffaut, B., Rondeau-Mouro, C., Girardin, M., Jasniewski, J., Scher, J., & Muniglia, L. (2012). Functionalization of chitosan by laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate under heterogeneous reaction conditions. *Carbohydrate Polymers*, *87*(1), 537–544. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.016

Andberg, M., Hakulinen, N., Auer, S., Saloheimo, M., Koivula, A., Rouvinen, J., & Kruus, K. (2009). Essential role of the C-terminus in Melanocarpus albomyces laccase for enzyme production, catalytic properties and structure. *The FEBS Journal*, *276*(21), 6285–6300.

Ander, P., & Messner, K. (1998). Oxidation of 1-hydroxybenzotriazole by laccase and lignin peroxidase. *Biotechnology Techniques*, *12*(3), 191–195. https://doi.org/10.1023/A:1008813206178

Anderson, A. J., Kwon, S.-I., Carnicero, A., & Falcón, M. A. (2005). Two isolates of Fusarium proliferatum from different habitats and global locations have similar abilities to degrade lignin. *FEMS Microbiology Letters*, *249*(1), 149–155.

Andlar, M., Rezić, T., Marđetko, N., Kracher, D., Ludwig, R., & Šantek, B. (2018). Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Engineering in Life Sciences*, *18*(11), 768–778. https://doi.org/10.1002/elsc.201800039

Arantes, V., & Milagres, A. M. F. (2006). Degradation of cellulosic and hemicellulosic substrates using a chelator-mediated Fenton reaction. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *81*(3), 413–419. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jctb.1417

Arantes, V., Milagres, A. M. F., Filley, T. R., & Goodell, B. (2011). Lignocellulosic polysaccharides and lignin degradation by wood decay fungi: the relevance of nonenzymatic Fenton-based reactions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *38*(4), 541–555. https://doi.org/10.1007/s10295-010-0798-2

Arfi, Y., Chevret, D., Henrissat, B., Berrin, J.-G., Levasseur, A., & Record, E. (2013). Characterization of salt-adapted secreted lignocellulolytic enzymes from the mangrove fungus Pestalotiopsis sp. *Nature Communications*, *4*(1), 1–9.

Askwith, C. C., & Kaplan, J. (1998). Site-directed mutagenesis of the yeast multicopper oxidase Fet3p. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(35), 22415–22419.

Atlas, R. M. (2004). *Handbook of microbiological media*. CRC press.

Ba, S., Jones, J. P., & Cabana, H. (2014). Hybrid bioreactor (HBR) of hollow fiber microfilter membrane and cross-linked laccase aggregates eliminate aromatic pharmaceuticals in wastewaters. *Journal of Hazardous Materials*, *280*, 662–670. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.08.062

Bach, C. E., Warnock, D. D., van Horn, D. J., Weintraub, M. N., Sinsabaugh, R. L., Allison, S. D., & German, D. P. (2013). Measuring phenol oxidase and peroxidase activities with pyrogallol, l-DOPA, and ABTS: Effect of assay conditions and soil type. *Soil Biology and Biochemistry*, *67*, 183–191. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.08.022

Bai Flagfeldt, D., Siewers, V., Huang, L., & Nielsen, J. (2009). Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in Saccharomyces cerevisiae. *Yeast*, *26*(10), 545–551. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/yea.1705

Baldrian, P. (2006). Fungal laccases–occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, *30*(2), 215–242.

Ball, A. S., Betts, W. B., & McCarthy, A. J. (1989). Degradation of lignin-related compounds by actinomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.*, *55*(6), 1642–1644.

Bankole, P. O., Semple, K. T., Jeon, B.-H., & Govindwar, S. P. (2021). Biodegradation of fluorene by the newly isolated marine-derived fungus, Mucor irregularis strain bpo1 using response surface methodology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *208*, 111619. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111619

Bao, W., Peng, R., Zhang, Z., Tian, Y., Zhao, W., Xue, Y., Gao, J., & Yao, Q. (2012). Expression, characterization and 2,4,6-trichlorophenol degradation of laccase from Monilinia fructigena. *Molecular Biology Reports*, *39*(4), 3871–3877. https://doi.org/10.1007/s11033-011-1166-7

Berka, R. M., Schneider, P., Golightly, E. J., Brown, S. H., Madden, M., Brown, K. M., Halkier, T., Mondorf, K., & Xu, F. (1997). Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of Myceliophthora thermophila and analysis of the recombinant enzyme expressed in Aspergillus oryzae. *Applied and Environmental Microbiology*, *63*(8), 3151–3157. https://doi.org/10.1128/aem.63.8.3151-3157.1997

Bi, C., Chen, F., Jackson, L., Gill, B. S., & Li, W. (2011). Expression of lignin biosynthetic genes in wheat during development and upon infection by fungal pathogens. *Plant Molecular Biology Reporter*, *29*(1), 149–161.

Bi, R., Huang, S., & Henriksson, G. (2016). Isolation of exceedingly low oxygen consuming fungal strains able to utilize lignin as carbon source. *Cellulose Chemistry and Technology*.

Bi, R., Spadiut, O., Brumer, H., & Henriksson, G. (2012). Isolation and identification of microorganisms from soil able to live on lignin as acarbon source and to produce enzymes which cleave the β-o-4 bond in a lignin model compound. *Cellulose Chemistry and Technology*, *46*(3–4), 227–242.

Bohlin, C., Jönsson, L. J., Roth, R., & van Zyl, W. H. (2006). Heterologous expression of Trametes versicolor laccase in Pichia pastoris and Aspergillus niger. *Twenty-Seventh Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, 195–214.

Bonaccorsi di Patti, M. C., Paronetto, M. P., Dolci, V., Felice, M. R., Lania, A., & Musci, G. (2001). Mutational analysis of the iron binding site of Saccharomyces cerevisiae ferroxidase Fet3. An in vivo study. *FEBS Letters*, *508*(3), 475–478.

Bonomi, F., Kurtz Jr, D. M., & Cui, X. (1996). Ferroxidase activity of recombinant Desulfovibrio vulgaris rubrerythrin. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, *1*(1), 67–72.

Bouchara, J.-P., & Papon, N. (2019). Scedosporium apiospermum. *Trends in Microbiology*, *27*(12), 1045–1046. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.07.003

Božič, M., Gorgieva, S., & Kokol, V. (2012a). Homogeneous and heterogeneous methods for laccase-mediated functionalization of chitosan by tannic acid and quercetin. *Carbohydrate Polymers*, *89*(3), 854–864. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.021

Božič, M., Gorgieva, S., & Kokol, V. (2012b). Laccase-mediated functionalization of chitosan by caffeic and gallic acids for modulating antioxidant and antimicrobial properties. *Carbohydrate Polymers*, *87*(4), 2388–2398. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.11.006

Brown, J. A., Li, D., Alic, M., & Gold, M. H. (1993). Heat Shock Induction of Manganese Peroxidase Gene Transcription in Phanerochaete chrysosporium. *Applied and Environmental Microbiology*, *59*(12), 4295–4299. https://doi.org/10.1128/aem.59.12.4295-4299.1993

Brown, M. E., & Chang, M. C. Y. (2014). Exploring bacterial lignin degradation. *Current Opinion in Chemical Biology*, *19*, 1–7. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.11.015

Camarero S, Ibarra D, Martínez MJ, & Martínez AT. (2005). Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(4), 1775–1784. https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1775-1784.2005

Cambria, M. T., Ragusa, S., Calabrese, V., & Cambria, A. (2011). Enhanced Laccase Production in White-Rot Fungus Rigidoporus lignosus by the Addition of Selected Phenolic and Aromatic Compounds. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *163*(3), 415–422. https://doi.org/10.1007/s12010-010-9049-2

Cañero, D. C., & Roncero, M. I. G. (2008). Functional Analyses of Laccase Genes from Fusarium oxysporum. *Phytopathology®*, *98*(5), 509–518. https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-5-0509

Carly, F., Vandermies, M., Telek, S., Steels, S., Thomas, S., Nicaud, J.-M., & Fickers, P. (2017). Enhancing erythritol productivity in Yarrowia lipolytica using metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, *42*, 19–24. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.05.002

Celińska, E., Borkowska, M., Białas, W., Korpys, P., & Nicaud, J.-M. (2018). Robust signal peptides for protein secretion in Yarrowia lipolytica: identification and characterization of novel secretory tags. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(12), 5221–5233. https://doi.org/10.1007/s00253-018-8966-9

Cesari, L. (2017). *Extraction de composés phénoliques à partir d'une bio-huile de lignine*.

Cherry, J., Nieuwenhuijsen, B. W., Kaftan, E. J., Kennedy, J. D., & Chanda, P. K. (2008). A modified method for PCR-directed gene synthesis from large number of overlapping oligodeoxyribonucleotides. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, *70*(6), 820–822. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jprot.2007.12.009

Christopher, L. P., Yao, B., & Ji, Y. (2014). Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. In *Frontiers in Energy Research* (Vol. 2, Issue MAR). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fenrg.2014.00012

Claußen, M., & Schmidt, S. (1998). Biodegradation of phenol and p-cresol by the hyphomycete Scedosporium apiospermum. *Research in Microbiology*, *149*(6), 399–406. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0923-2508(98)80322-7

Coconi Linares, N., Fernández, F., Loske, A. M., & Gómez-Lim, M. A. (2018). Enhanced delignification of lignocellulosic biomass by recombinant fungus phanerochaete chrysosporium overexpressing laccases and peroxidases. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *28*(1), 1–3. https://doi.org/10.1159/000485976

Colao, M. Ch., Garzillo, A. M., Buonocore, V., Schiesser, A., & Ruzzi, M. (2003). Primary structure and transcription analysis of a laccase-encoding gene from the basidiomycete Trametes trogii. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *63*(2), 153–158. https://doi.org/10.1007/s00253-003-1429-x

Collins, P. J., & Dobson, A. (1997). Regulation of Laccase Gene Transcription in Trametes versicolor. *Applied and Environmental Microbiology*, *63*(9), 3444–3450. https://doi.org/10.1128/aem.63.9.3444-3450.1997

Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*, *16*(22), 10881–10890. https://doi.org/10.1093/nar/16.22.10881

Cortés-Espinosa, D. v, Absalón, Á. E., Sanchez, N., Loera, O., Rodríguez-Vázquez, R., & Fernández, F. J. (2011). Heterologous Expression of Manganese Peroxidase in Aspergillus niger and Its Effect on Phenanthrene Removal from Soil. *Microbial Physiology*, *21*(3–4), 120–129. https://doi.org/10.1159/000331563

Cruz Ramírez, M. G., Rivera-Ríos, J. M., Téllez-Jurado, A., Maqueda Gálvez, A. P., Mercado-Flores, Y., & Arana-Cuenca, A. (2012). Screening for thermotolerant ligninolytic fungi with laccase, lipase, and protease activity isolated in Mexico. *Journal of Environmental Management*, *95*, S256–S259. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.10.045

Csarman, F., Obermann, T., Zanjko, M. C., Man, P., Halada, P., Seiboth, B., & Ludwig, R. (2021). Functional expression and characterization of two laccases from the brown rot Fomitopsis

pinicola. *Enzyme and Microbial Technology*, *148*, 109801. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109801

Dahl, C. F. (1884). Process of manufacturing cellulose from wood US Patent 296935 (Patent No. US296935A). In *US Patent 0,002,969 35* (No. US296935A). https://patents.google.com/patent/US296935A/en

Daly, P., Peng, M., Casado López, S., Lipzen, A., Ng, V., Singan, V. R., Wang, M., Grigoriev, I. v, de Vries, R. P., & Mäkelä, M. R. (2020). Mixtures of aromatic compounds induce ligninolytic gene expression in the wood-rotting fungus Dichomitus squalens. *Journal of Biotechnology*, *308*, 35–39. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.11.014

Dantán-González, E., Vite-Vallejo, O., Martínez-Anaya, C., Méndez-Sánchez, M., González, M. C., Palomares, L. A., & Folch-Mallol, J. (2008). Production of two novel laccase isoforms by a thermotolerant strain of Pycnoporus sanguineus isolated from an oil-polluted tropical habitat. *Int Microbiol*, *11*(3), 163–169.

Dao, A. T. N., Vonck, J., Janssens, T. K. S., Dang, H. T. C., Brouwer, A., & de Boer, T. E. (2019a). Screening white-rot fungi for bioremediation potential of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Industrial Crops and Products*, *128*, 153–161. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.059

Dao, A. T. N., Vonck, J., Janssens, T. K. S., Dang, H. T. C., Brouwer, A., & de Boer, T. E. (2019b). Screening white-rot fungi for bioremediation potential of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Industrial Crops and Products*, *128*, 153–161. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.059

Darvishi, F., Fathi, Z., Ariana, M., & Moradi, H. (2017). Yarrowia lipolytica as a workhorse for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal*, *127*, 87–96.

Darvishi, F., Zarei, A., & Madzak, C. (2018). In silico and in vivo analysis of signal peptides effect on recombinant glucose oxidase production in nonconventional yeast Yarrowia lipolytica. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *34*(9), 128. https://doi.org/10.1007/s11274-018-2512-x

de Silva, D. M., Askwith, C. C., Eide, D., & Kaplan, J. (1995). The FET3 Gene Product Required for High Affinity Iron Transport in Yeast Is a Cell Surface Ferroxidase (∗). *Journal of Biological Chemistry*, *270*(3), 1098–1101.

de Wilde, C., Uzan, E., Zhou, Z., Kruus, K., Andberg, M., Buchert, J., Record, E., Asther, M., & Lomascolo, A. (2008). Transgenic rice as a novel production system for Melanocarpus and Pycnoporus laccases. *Transgenic Research*, *17*(4), 515–527.

del Cerro, C., Erickson, E., Dong, T., Wong, A. R., Eder, E. K., Purvine, S. O., Mitchell, H. D., Weitz, K. K., Markillie, L. M., Burnet, M. C., Hoyt, D. W., Chu, R. K., Cheng, J. F., Ramirez, K. J., Katahira, R., Xiong, W., Himmel, M. E., Subramanian, V., Linger, J. G., & Salvachúa, D. (2021). Intracellular pathways for lignin catabolism in white-rot fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *118*(9). https://doi.org/10.1073/pnas.2017381118

Dey, S., Maiti, T. K., & Bhattacharyya, B. C. (1994). Production of some extracellular enzymes by a lignin peroxidase-producing brown rot fungus, Polyporus ostreiformis, and its comparative abilities for lignin degradation and dye decolorization. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*(11), 4216–4218. https://doi.org/10.1128/aem.60.11.4216-4218.1994

di Patti, M. C. B., Felice, M. R., Camuti, A. P., Lania, A., & Musci, G. (2000). The essential role of Glu-185 and Tyr-354 residues in the ferroxidase activity of Saccharomyces cerevisiae Fet3. *FEBS Letters*, *472*(2–3), 283–286.

Dillies, J., Vivien, C., Chevalier, M., Rulence, A., Châtaigné, G., Flahaut, C., Senez, V., & Froidevaux, R. (2020). Enzymatic depolymerization of industrial lignins by laccase-mediator systems in 1, 4-dioxane/water. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *67*(5), 774–782.

D'Souza, D. T., Tiwari, R., Sah, A. K., & Raghukumar, C. (2006). Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. *Enzyme and Microbial Technology*, *38*(3–4), 504–511. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.07.005

Eck, R., Hundt, S., Härtl, A., Roemer, E., & Künkel, W. (1999). A multicopper oxidase gene from Candida albicans: cloning, characterization and disruption b bThe EMBL accession number for the sequence reported in this paper is Y09329. *Microbiology*, *145*(9), 2415–2422. https://doi.org/10.1099/00221287-145-9-2415

Eggert, C., Temp, U., Dean, J. F. D., & Eriksson, K. E. L. (1996a). A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Letters*, *391*(1–2), 144–148. https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00719-3

Eggert, C., Temp, U., Dean, J. F. D., & Eriksson, K.-E. L. (1996b). A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Letters*, *391*(1–2), 144–148. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00719-3

Egidi, E., Delgado-Baquerizo, M., Plett, J. M., Wang, J., Eldridge, D. J., Bardgett, R. D., Maestre, F. T., & Singh, B. K. (2019). A few Ascomycota taxa dominate soil fungal communities worldwide. *Nature Communications*, *10*(1), 1–9.

Eichlerová, I., & Baldrian, P. (2020). Ligninolytic enzyme production and decolorization capacity of synthetic dyes by saprotrophic white rot, brown rot, and litter decomposing Basidiomycetes. *Journal of Fungi*, *6*(4), 301.

Elisashvili, V., & Kachlishvili, E. (2009). Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes. *Journal of Biotechnology*, *144*(1), 37–42.

Ezike, T. C., Udeh, J. O., Joshua, P. E., Ezugwu, A. L., Isiwu, C. v, Eze, S. O. O., & Chilaka, F. C. (2021). Substrate specificity of a new laccase from Trametes polyzona WRF03. *Heliyon*, *7*(1), e06080. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06080

F, L. L., Loreto, S., Francisco, M., Rafael, V., & Daniel, C. (2003). A Novel Extracellular Multicopper Oxidase from Phanerochaete chrysosporium with Ferroxidase Activity. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(10), 6257–6263. https://doi.org/10.1128/AEM.69.10.6257-6263.2003

Faraco, V., Giardina, P., & Sannia, G. (2003). Metal-responsive elements in Pleurotus ostreatus laccase gene promoters. *Microbiology*, *149*(8), 2155–2162. https://doi.org/10.1099/mic.0.26360-0

Ferrer-Miralles, N., Domingo-Espín, J., Corchero, J. L., Vázquez, E., & Villaverde, A. (2009). Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories*, *8*(1), 1–8.

Freudenberg, K., & Neish, A. C. (1968). Constitution and biosynthesis of lignin. *Constitution and Biosynthesis of Lignin.*

Fujian, X., Hongzhang, C., & Zuohu, L. (2001). Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by Phanerochaete chrysosporium using steam-exploded straw as substrate. *Bioresource Technology*, *80*(2), 149–151. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00082-7

Galhaup, C., Goller, S., Peterbauer, C. K., Strauss, J., & Haltrich, D. (2002a). Characterization of the major laccase isoenzyme from Trametes pubescens and regulation of its synthesis by metal ionsaaThe GenBank accession numbers for the lap2 and lap1a genes reported in this paper are AF414807 and AF414808, respectively. *Microbiology*, *148*(7), 2159–2169.

Galhaup, C., Goller, S., Peterbauer, C. K., Strauss, J., & Haltrich, D. (2002b). Characterization of the major laccase isoenzyme from Trametes pubescens and regulation of its synthesis by metal ionsaaThe GenBank accession numbers for the lap2 and lap1a genes reported in this paper are AF414807 and AF414808, respectively. *Microbiology*, *148*(7), 2159–2169.

Galhaup, C., & Haltrich, D. (2001). Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus Trametes pubescens in the presence of copper. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *56*(1), 225–232. https://doi.org/10.1007/s002530100636

Galhaup, C., Wagner, H., Hinterstoisser, B., & Haltrich, D. (2002). Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete Trametes pubescens. *Enzyme and Microbial Technology*, *30*(4), 529–536.

Galliano, H., Gas, G., Seris, J. L., & Boudet, A. M. (1991). Lignin degradation by Rigidoporus lignosus involves synergistic action of two oxidizing enzymes: Mn peroxidase and laccase. *Enzyme and Microbial Technology*, *13*(6), 478–482. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0141-0229(91)90005-U

Garcia-Morales, R., Rodríguez-Delgado, M., Gomez-Mariscal, K., Orona-Navar, C., Hernandez-Luna, C., Torres, E., Parra, R., Cárdenas-Chávez, D., Mahlknecht, J., & Ornelas-Soto, N. (2015). Biotransformation of endocrine-disrupting compounds in groundwater: bisphenol A, nonylphenol, ethynylestradiol and triclosan by a laccase cocktail from Pycnoporus sanguineus CS43. *Water, Air, & Soil Pollution*, *226*(8), 1–14.

Gasser, C. A., Čvančarová, M., Ammann, E. M., Schäffer, A., Shahgaldian, P., & Corvini, P. F.-X. (2017). Sequential lignin depolymerization by combination of biocatalytic and formic acid/formate treatment steps. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *101*(6), 2575–2588. https://doi.org/10.1007/s00253-016-8015-5

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *The Proteomics Protocols Handbook*, 571–607.

Gellissen, G., & Hollenberg, C. P. (1997). Application of yeasts in gene expression studies: a comparison of Saccharomyces cerevisiae, Hansenula polymorpha and Kluyveromyces lactis- a review. *Gene*, *190*(1), 87–97. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00020-6

Ghafarnejad Parto, S., Christensen, J., Pedersen, L., Tjosås, F., & Jensen, A. (2018). Solvothermal Conversion of Lignosulfonate Assisted by Ni Catalyst: Investigation of the Role of Ethanol and Ethylene Glycol as Solvents. *Catalysts*, *8*, 502. https://doi.org/10.3390/catal8110502

Giardina, P., Palmieri, G., Scaloni, A., Fontanella, B., FARACO, V., CENNAMO, G., & SANNIA, G. (1999). Protein and gene structure of a blue laccase from Pleurotus ostreatus. *Biochemical Journal*, *341*(3), 655–663.

Giatti Marques De Souza, C., Kirst Tychanowicz, G., Farani De Souza, D., & Peralta, R. M. (2004). Production of laccase isoforms by Pleurotus pulmonarius in response to presence of phenolic and aromatic compounds. *Journal of Basic Microbiology*, *44*(2), 129–136. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jobm.200310365

Gibson, A., Malek, L., Dekker, R. F. H., & Ross, B. (2015). Detecting volatile compounds from Kraft lignin degradation in the headspace of microbial cultures by selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS). *Journal of Microbiological Methods*, *112*, 40–45. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.03.008

Godfrey, B. J., Mayfield, M. B., Brown, J. A., & Gold, M. H. (1990). Characterization of a gene encoding a manganese peroxidase from Phanerochaete chrysosporium. *Gene*, *93*(1), 119–124. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90144-G

Gold, M. H., & Alic, M. (1993). Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. *Microbiological Reviews*, *57*(3), 605–622. https://doi.org/10.1128/mr.57.3.605-622.1993

Grandes-Blanco, A. I., Díaz-Godínez, G., Téllez-Téllez, M., Delgado-Macuil, R. J., Rojas-López, M., & Bibbins-Martínez, M. D. (2013). Ligninolytic activity patterns of pleurotus ostreatus obtained by submerged fermentation in presence of 2,6-dimethoxyphenol and remazol brilliant blue R dye. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, *43*(5), 468–480. https://doi.org/10.1080/10826068.2012.746233

GREENSHIELDS, D. L., LIU, G., FENG, J. I. E., SELVARAJ, G., & WEI, Y. (2007). The siderophore biosynthetic gene SID1, but not the ferroxidase gene FET3, is required for full Fusarium graminearum virulence. *Molecular Plant Pathology*, *8*(4), 411–421. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00401.x

Gu, L., Lajoie, C., & Kelly, C. (2003). Expression of a Phanerochaete chrysosporium manganese peroxidase gene in the yeast Pichia pastoris. *Biotechnology Progress*, *19*(5), 1403–1409.

Guo, D., Zhang, Z., Liu, D., Zheng, H., Chen, H., & Chen, K. (2014). A comparative study on the degradation of gallic acid by Aspergillus oryzae and Phanerochaete chrysosporium. *Water Science and Technology*, *70*(1), 175–181.

Gutiérrez, A., Rencoret, J., Ibarra, D., Molina, S., Camarero, S., Romero, J., del Río, J. C., & Martínez, Á. T. (2007). Removal of Lipophilic Extractives from Paper Pulp by Laccase and Lignin-Derived Phenols as Natural Mediators. *Environmental Science & Technology*, *41*(11), 4124–4129. https://doi.org/10.1021/es062723+

Hakulinen, N., Kiiskinen, L.-L., Kruus, K., Saloheimo, M., Paananen, A., Koivula, A., & Rouvinen, J. (2002). Crystal structure of a laccase from Melanocarpus albomyces with an intact trinuclear copper site. *Nature Structural Biology*, *9*(8), 601–605.

Hallgren, J., Tsirigos, K. D., Pedersen, M. D., Armenteros, J. J. A., Marcatili, P., Nielsen, H., Krogh, A., & Winther, O. (2022). DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. *BioRxiv*.

Han, Y., Huang, X., Wang, Y., Du, J., Ma, K., Chen, Y., Li, N., Zhang, Z., & Pan, J. (2021). Fungal Community and Biodeterioration Analysis of Hull Wood and Its Storage Environment of the Nanhai No. 1 Shipwreck. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 609475. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.609475

HAO, J.-J., TIAN, X.-J., SONG, F.-Q., HE, X.-B., ZHANG, Z.-J., & ZHANG, P. (2006). Involvement of Lignocellulolytic Enzymes in the Decomposition of Leaf Litter in a Subtropical Forest. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *53*(3), 193–198. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2006.00093.x

Hernández-Monjaraz, W. S., Caudillo-Pérez, C., Salazar-Sánchez, P. U., & Macías-Sánchez, K. L. (2018). Influence of iron and copper on the activity of laccases in Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici. *Brazilian Journal of Microbiology*, *49*, 269–275. https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.06.002

Hildén, K., Martinez, A. T., Hatakka, A., & Lundell, T. (2005). The two manganese peroxidases Pr-MnP2 and Pr-MnP3 of Phlebia radiata, a lignin-degrading basidiomycete, are phylogenetically and structurally divergent. *Fungal Genetics and Biology*, *42*(5), 403–419. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.01.008

Hirose, J., Sakurai, T., Imamura, K., Watanabe, H., Iwamoto, H., Hiromi, K., Itoh, H., Shin, T., & Murao, S. (1994). Characterization of Ascorbate Oxidase from Acremonium sp. HI-25. *The Journal of Biochemistry*, *115*(5), 811–813. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124420

Holladay, J. E., White, J. F., Bozell, J. J., & Johnson, D. (2007). *Top value-added chemicals from biomass-Volume II—Results of screening for potential candidates from biorefinery lignin*. Pacific Northwest National Lab.(PNNL), Richland, WA (United States).

Hong, Y., Xiao, Y., Zhou, H., Fang, W., Zhang, M., Wang, J., Wu, L., & Yu, Z. (2006). Expression of a laccase cDNA from Trametes sp. AH28-2 in Pichia pastoris and mutagenesis of transformants by nitrogen ion implantation. *FEMS Microbiology Letters*, *258*(1), 96–101.

Hoopes, J. T., & Dean, J. F. D. (2004). Ferroxidase activity in a laccase-like multicopper oxidase from Liriodendron tulipifera. *Plant Physiology and Biochemistry*, *42*(1), 27–33. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2003.10.011

Howell, C., Steenkjær Hastrup, A. C., Goodell, B., & Jellison, J. (2009). Temporal changes in wood crystalline cellulose during degradation by brown rot fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *63*(4), 414–419. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.11.009

Hunger, K., Mischke, P., & Rieper, W. (2011). *Azo Dyes, 1. General in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH, Weinheim.

Insights, R. (2015). *Lignin Market Size, Share, Trends And Growth Forecast Report By 2022*.

Irie, T., Honda, Y., Ha, -Hyo-Cheol, Watanabe, T., & Kuwahara, M. (2000). Isolation of cDNA and genomic fragments encoding the major manganese peroxidase isozyme from the white rot basidiomycete Pleurotus ostreatus. In *Springer*. https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF00776454.pdf

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

Janusz, G., Pawlik, A., Sulej, J., Świderska-Burek, U., Jarosz-Wilkolazka, A., & Paszczyński, A. (2017). Lignin degradation: Microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 41, Issue 6, pp. 941–962). Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/femsre/fux049

Janusz, G., Pawlik, A., Świderska-Burek, U., Polak, J., Sulej, J., Jarosz-Wilkołazka, A., & Paszczyński, A. (2020). Laccase properties, physiological functions, and evolution. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(3), 966.

Javadzadeh, S.-G., & Asoodeh, A. (2020). A novel textile dye degrading extracellular laccase from symbiotic bacterium of Bacillus sp. CF96 isolated from gut termite (Anacanthotermes). *International Journal of Biological Macromolecules*, *145*, 355–363. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.205

Ji, C., Nguyen, L. N., Hou, J., Hai, F. I., & Chen, V. (2017). Direct immobilization of laccase on titania nanoparticles from crude enzyme extracts of P. ostreatus culture for micro-pollutant degradation. *Separation and Purification Technology*, *178*, 215–223.

Jiang, W., Gao, H., Sun, J., Yang, X., Jiang, Y., Zhang, W., Jiang, M., & Xin, F. (2022). Current status, challenges and prospects for lignin valorization by using Rhodococcus sp. *Biotechnology Advances*, *60*, 108004. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108004

Jin, X., & Ning, Y. (2013). Laccase production optimization by response surface methodology with Aspergillus fumigatus AF1 in unique inexpensive medium and decolorization of different dyes with the crude enzyme or fungal pellets. *Journal of Hazardous Materials*, *262*, 870–877. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.09.024

Johansson, T., & Nyman, P. O. (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. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *300*(1), 49–56. https://doi.org/https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1007

Jones, L., Ennos, A. R., & Turner, S. R. (2001). Cloning and characterization of irregular xylem4 (irx4): a severely lignin-deficient mutant of Arabidopsis. *The Plant Journal*, *26*(2), 205–216. https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01021.x

Jönsson, L., & Nyman, P. O. (1992). Characterization of a lignin peroxidase gene from the white-rot fungus Trametes versicolor. *Biochimie*, *74*(2), 177–182. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0300-9084(92)90043-E

Jr, T. R., Nipper, V., Akileswaran, L., Gene, A. S.-, & 1991, undefined. (n.d.). Lignin peroxidase from the basidiomycete Phanerochaete chrysosporium is synthesized as a preproenzyme. *Elsevier*. Retrieved November 24, 2020, from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037811199190304T

Kalyani, D., Tiwari, M. K., Li, J., Kim, S. C., Kalia, V. C., Kang, Y. C., & Lee, J.-K. (2015). A highly efficient recombinant laccase from the yeast Yarrowia lipolytica and its application in the hydrolysis of biomass. *PloS One*, *10*(3), e0120156–e0120156. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120156

Kiiskinen, L.-L., Viikari, L., & Kruus, K. (2002). Purification and characterisation of a novel laccase from the ascomycete Melanocarpus albomyces. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *59*(2), 198–204.

Kim, J.-M., Park, S.-M., & Kim, D.-H. (2010). Heterologous expression of a tannic acid-inducible laccase3 of Cryphonectria parasitica in Saccharomyces cerevisiae. *BMC Biotechnology*, *10*(1), 1–9.

Kinkar, E., Kinkar, A., & Saleh, M. (2019). The multicopper oxidase of Mycobacterium tuberculosis (MmcO) exhibits ferroxidase activity and scavenges reactive oxygen species in activated THP-1 cells. *International Journal of Medical Microbiology*, *309*(7), 151324. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.06.004

Kirk, T. K., & Adler, E. (1970). Methoxyl-deficient structural elements in lignin of sweetgum decayed by a brown-rot fungus. *Acta Chem. Scand*, *24*(9).

Kittl, R., Gonaus, C., Pillei, C., Haltrich, D., & Ludwig, R. (2012). Constitutive expression of Botrytis aclada laccase in Pichia pastoris. *Bioengineered*, *3*(4), 232–235. https://doi.org/10.4161/bioe.20037

Kittl, R., Mueangtoom, K., Gonaus, C., Khazaneh, S. T., Sygmund, C., Haltrich, D., & Ludwig, R. (2012a). A chloride tolerant laccase from the plant pathogen ascomycete Botrytis aclada expressed at high levels in Pichia pastoris. *Journal of Biotechnology*, *157*(2), 304–314. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.11.021

Kittl, R., Mueangtoom, K., Gonaus, C., Khazaneh, S. T., Sygmund, C., Haltrich, D., & Ludwig, R. (2012b). A chloride tolerant laccase from the plant pathogen ascomycete Botrytis aclada expressed at high levels in Pichia pastoris. *Journal of Biotechnology*, *157*(2), 304–314.

Kleinert, T. N. (1971). *Organosolv pulping and recovery process*. Google Patents.

Knapp, S. B., & Wethern, J. D. (1958). *Rapid kraft pulping process for bagasse and other fibrous, non-woody lignocellulosic plant materials*. Google Patents.

Koikeda, S., Ando, K., Kaji, H., Inoue, T., Murao, S., Takeuchi, K., & Samejima, T. (1993). Molecular cloning of the gene for bilirubin oxidase from Myrothecium verrucaria and its expression in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(25), 18801–18809.

Kuddus, M., Joseph, B., & Wasudev Ramteke, P. (2013). Production of laccase from newly isolated Pseudomonas putida and its application in bioremediation of synthetic dyes and industrial effluents. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *2*(4), 333–338. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.06.002

Kumaravel, V., Bankole, P. O., Jooju, B., & Sadasivam, S. K. (2022). Degradation and detoxification of reactive yellow dyes by Scedosporium apiospermum: a mycoremedial approach. *Archives of Microbiology*, *204*(6), 324. https://doi.org/10.1007/s00203-022-02947-1

Kurisawa, M., Chung, J. E., Uyama, H., & Kobayashi, S. (2003a). Enzymatic Synthesis and Antioxidant Properties of Poly(rutin). *Biomacromolecules*, *4*(5), 1394–1399. https://doi.org/10.1021/bm034136b

Kurisawa, M., Chung, J. E., Uyama, H., & Kobayashi, S. (2003b). Laccase-catalyzed Synthesis and Antioxidant Property of Poly(catechin). *Macromolecular Bioscience*, *3*(12), 758–764. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mabi.200300038

Kurisawa, M., Chung, J., Uyama, H., & Kobayashi, S. (2003c). Enzymatic Synthesis and Antioxidant Properties of Poly(rutin). *Biomacromolecules*, *4*, 1394–1399. https://doi.org/10.1021/bm034136b

Kwiatos, N., Jędrzejczak-Krzepkowska, M., Krzemińska, A., Delavari, A., Paneth, P., & Bielecki, S. (2020). Evolved Fusarium oxysporum laccase expressed in Saccharomyces cerevisiae. *Scientific Reports*, *10*(1), 3244. https://doi.org/10.1038/s41598-020-60204-1

Lang, M., Braun, C. L., Kanost, M. R., & Gorman, M. J. (2012). Multicopper oxidase-1 is a ferroxidase essential for iron homeostasis in Drosophila melanogaster. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(33), 13337–13342. https://doi.org/10.1073/pnas.1208703109

Larroude, M., Park, Y., Soudier, P., Kubiak, M., Nicaud, J., & Rossignol, T. (2019). A modular Golden Gate toolkit for Yarrowia lipolytica synthetic biology. *Microbial Biotechnology*, *12*(6), 1249–1259.

Ledesma-Amaro, R., Dulermo, T., & Nicaud, J. M. (2015). Engineering Yarrowia lipolytica to produce biodiesel from raw starch. *Biotechnology for Biofuels*, *8*(1), 148. https://doi.org/10.1186/s13068-015-0335-7

Litwińska, K., Bischoff, F., Matthes, F., Bode, R., Rutten, T., & Kunze, G. (2019). Characterization of recombinant laccase from Trametes versicolor synthesized by Arxula adeninivorans and its application in the degradation of pharmaceuticals. *AMB Express*, *9*(1), 102. https://doi.org/10.1186/s13568-019-0832-3

Lloret, L., Eibes, G., Moreira, M. T., Feijoo, G., & Lema, J. M. (2013). Removal of estrogenic compounds from filtered secondary wastewater effluent in a continuous enzymatic membrane reactor. Identification of biotransformation products. *Environmental Science & Technology*, *47*(9), 4536–4543.

Loaiza, J. M., Alfaro, A., López, F., García, M. T., & García, J. C. (2019). Optimization of Laccase/Mediator System (LMS) stage applied in fractionation of Eucalyptus globulus. *Polymers*, *11*(4), 731.

Lozovaya, V. v, Lygin, A. v, Zernova, O. v, Li, S., Widholm, J. M., & Hartman, G. L. (2006). Lignin degradation by Fusarium solani f. sp. glycines. *Plant Disease*, *90*(1), 77–82.

Madzak, C., Nicaud, J.-M., & Gaillardin, C. (2004). Yarrowia lipolytica. In *Production of Recombinant Proteins* (pp. 163–189). https://doi.org/https://doi.org/10.1002/3527603670.ch8

Madzak, C., Otterbein, L., Chamkha, M., Moukha, S., Asther, M., Gaillardin, C., & Beckerich, J.-M. (2005). Heterologous production of a laccase from the basidiomycete Pycnoporus cinnabarinus in the dimorphic yeast Yarrowia lipolytica. *FEMS Yeast Research*, *5*(6), 635–646. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.10.009

Maestre-Reyna, M., Liu, W. C., Jeng, W. Y., Lee, C. C., Hsu, C. A., Wen, T. N., Wang, A. H. J., & Shyur, L. F. (2015). Structural and functional roles of glycosylation in fungal laccase from lentinus sp. *PLoS ONE*, *10*(4), e0120601. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120601

Maijala, P., Mattinen, M.-L., Nousiainen, P., Kontro, J., Asikkala, J., Sipilä, J., & Viikari, L. (2012). Action of fungal laccases on lignin model compounds in organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *76*, 59–67. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.12.009

Majumdar, S., Lukk, T., Solbiati, J. O., Bauer, S., Nair, S. K., Cronan, J. E., & Gerlt, J. A. (2014). Roles of Small Laccases from Streptomyces in Lignin Degradation. *Biochemistry*, *53*(24), 4047–4058. https://doi.org/10.1021/bi500285t

Mäkelä, M. R., Hildén, K. S., Hakala, T. K., Hatakka, A., & Lundell, T. K. (2006). Expression and molecular properties of a new laccase of the white rot fungus Phlebia radiata grown on wood. *Current Genetics*, *50*(5), 323–333. https://doi.org/10.1007/s00294-006-0090-1

Mandlekar, N., Cayla, A., Rault, F., Giraud, S., Salaün, F., Malucelli, G., & Guan, J.-P. (2018). An Overview on the Use of Lignin and Its Derivatives in Fire Retardant Polymer Systems. In *Lignin - Trends and Applications*. InTech. https://doi.org/10.5772/intechopen.72963

Mani, P., Fidal Kumar, V. T., Keshavarz, T., Chandra, T. S., & Kyazze, G. (2018). The role of natural laccase redox mediators in simultaneous dye decolorization and power production in microbial fuel cells. *Energies*, *11*(12), 3455.

Manubens, A., Canessa, P., Folch, C., Avila, M., Salas, L., & Vicuña, R. (2007). Manganese affects the production of laccase in the basidiomycete Ceriporiopsis subvermispora. *FEMS Microbiology Letters*, *275*(1), 139–145. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00874.x

Martini, M. C., Berini, F., Ausec, L., Casciello, C., Vacca, C., Pistorio, M., Lagares, A., Mandic-Mulec, I., Marinelli, F., & del Papa, M. F. (2021). Identification and Characterization of a Novel Plasmid-Encoded Laccase-Like Multicopper Oxidase from Ochrobactrum sp. BF15 Isolated from an On-Farm Bio-Purification System. *Food Technology and Biotechnology*, *59*(4), 519–529.

Martone, P. T., Estevez, J. M., Lu, F., Ruel, K., Denny, M. W., Somerville, C., & Ralph, J. (2009). Discovery of Lignin in Seaweed Reveals Convergent Evolution of Cell-Wall Architecture. *Current Biology*, *19*(2), 169–175. https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.12.031

Matoba, S., Morano, K. A., Klionsky, D. J., Kim, K., & Ogrydziak, D. M. (1997). Dipeptidyl aminopeptidase processing and biosynthesis of alkaline extracellular protease from Yarrowia lipolytica. *Microbiology*, *143*(10), 3263–3272. https://doi.org/10.1099/00221287-143-10-3263

Mayfield, M. B., Godfrey, B. J., & Gold, M. H. (1994). Characterization of the mnp2 gene encoding manganese peroxidase isozyme 2 from the basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. *Gene*, *142*(2), 231–235. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90266-6

Merino-Restrepo, A., Mejía-Otálvaro, F., Velásquez-Quintero, C., & Hormaza-Anaguano, A. (2020). Evaluation of several white-rot fungi for the decolorization of a binary mixture of anionic dyes and characterization of the residual biomass as potential organic soil amendment. *Journal of Environmental Management*, *254*, 109805. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109805

Mester, T., & 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*. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(25), 15412–15417. https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.273.25.15412

Mikiashvili, N., Wasser, S. P., Nevo, E., & Elisashvili, V. (2006). Effects of carbon and nitrogen sources on Pleurotus ostreatus ligninolytic enzyme activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *22*(9), 999–1002.

Miller, J. E., EVANS, L., Mudd, J. E., & Brown, K. A. (2002). *Batch microreactor studies of lignin depolymerization by bases. 2. Aqueous solvents*. Sandia National Lab.(SNL-NM), Albuquerque, NM (United States); Sandia ….

Mliki, A., & Zimmermann, W. (1992). Mliki, A., & Zimmermann, W. (1992). Purification and characterization of an intracellular peroxidase from Streptomyces cyaneus. Applied and

Environmental Microbiology, 58(3).Purification and characterization of an intracellular peroxidase from Streptomyce. *Applied and Environmental Microbiology*, *58*(3).

Moilanen, U., Kellock, M., Galkin, S., & Viikari, L. (2011). The laccase-catalyzed modification of lignin for enzymatic hydrolysis. *Enzyme and Microbial Technology*, *49*(6), 492–498. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.09.012

Mongay, C., & Cerda, V. (1974). A Britton-Robinson buffer of known ionic strength. *Ann. Chim*, *64*, 409–412.

Morales, L. T., González-García, L. N., Orozco, M. C., Restrepo, S., & Vives, M. J. (2017). The genomic study of an environmental isolate of Scedosporium apiospermum shows its metabolic potential to degrade hydrocarbons. *Standards in Genomic Sciences*, *12*(1), 71. https://doi.org/10.1186/s40793-017-0287-6

Mostafa, F. A., & Abd El Aty, A. A. (2018). Thermodynamics enhancement of Alternaria tenuissima KM651985 laccase by covalent coupling to polysaccharides and its applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, *120*, 222–229. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.081

Nagai, M., Kawata, M., Watanabe, H., Ogawa, M., Saito, K., Takesawa, T., Kanda, K., & Sato, T. (2003). Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis: purification and characterization of an intracellular laccase from Lentinula edodes fruit bodies. *Microbiology*, *149*(9), 2455–2462.

Nagai, M., Sakamoto, Y., Nakade, K., & Sato, T. (2007). Isolation and characterization of the gene encoding a manganese peroxidase from Lentinula edodes. *Mycoscience*, *48*(2), 125–130. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/S10267-006-0334-4

Ncanana, S., & Burton, S. (2007a). Oxidation of 8-hydroxyquinoline catalyzed by laccase from Trametes pubescens yields an antioxidant aromatic polymer. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *44*(2), 66–71. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.09.005

Ncanana, S., & Burton, S. (2007b). Oxidation of 8-hydroxyquinoline catalyzed by laccase from Trametes pubescens yields an antioxidant aromatic polymer. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *44*(2), 66–71. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.09.005

Ng, T. B., & Wang, H. X. (2004). A homodimeric laccase with unique characteristics from the yellow mushroom Cantharellus cibarius. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *313*(1), 37–41. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.11.087

Nicotra, S., Cramarossa, M. R., Mucci, A., Pagnoni, U. M., Riva, S., & Forti, L. (2004). Biotransformation of resveratrol: synthesis of trans-dehydrodimers catalyzed by laccases from Myceliophtora thermophyla and from Trametes pubescens. *Tetrahedron*, *60*(3), 595–600. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tet.2003.10.117

Obruca, S., Marova, I., Matouskova, P., Haronikova, A., & Lichnova, A. (2012). Production of lignocellulose-degrading enzymes employing Fusarium solani F-552. *Folia Microbiologica*, *57*(3), 221–227. https://doi.org/10.1007/s12223-012-0098-5

Omeje, K. O., Nnolim, N. E., Ezema, B. O., Ozioko, J. N., & Eze, S. O. O. (2020). Synthetic dyes decolorization potential of agroindustrial waste-derived thermo-active laccase from Aspergillus

species. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *29*, 101800. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101800

Ong, E., Pollock, W. B. R., & Smith, M. (1997). Cloning and sequence analysis of two laccase complementary DNAs from the ligninolytic basidiomycete Trametes versicolor. *Gene*, *196*(1–2), 113–119.

Otterbein, L., Record, E., Longhi, S., Asther, M., & Moukha, S. (2000). Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from Pycnoporus cinnabarinus I-937 and expression in Pichia pastoris. *European Journal of Biochemistry*, *267*(6), 1619–1625. https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01166.x

Patel, H., Gupte, S., Gahlout, M., & Gupte, A. (2014). Purification and characterization of an extracellular laccase from solid-state culture of Pleurotus ostreatus HP-1. *3 Biotech*, *4*(1), 77–84. https://doi.org/10.1007/s13205-013-0129-1

Peláez, F., Martínez, M. J., & Martínez, A. T. (1995). Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. *Mycological Research*, *99*(1), 37–42. https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80313-4

Periasamy, R., & Palvannan, T. (2010). Optimization of laccase production by Pleurotus ostreatus IMI 395545 using the Taguchi DOE methodology. *Journal of Basic Microbiology*, *50*(6), 548–556. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jobm.201000095

PERRY, C. R., MATCHAM, S. E., WOOD, D. A., & THURSTON, C. F. (1993). The structure of laccase protein and its synthesis by the commercial mushroom Agaricus bisporus. *Microbiology*, *139*(1), 171–178.

Perry, C. R., Smith, M., Britnell, C. H., Wood, D. A., & Thurston, C. F. (1993). Identification of two laccase genes in the cultivated mushroom Agaricus bisporus. *Journal of General Microbiology*, *139*(6), 1209–1218. https://doi.org/10.1099/00221287-139-6-1209

Peter Guengerich, F. (1990). Enzymatic Oxidation of Xenobiotic Chemical. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *25*(2), 97–153. https://doi.org/10.3109/10409239009090607

Piontek, K., Antorini, M., & Choinowski, T. (2002). Crystal Structure of a Laccase from the FungusTrametes versicolor at 1.90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(40), 37663–37669. https://doi.org/10.1074/JBC.M204571200

Piscitelli, A., Giardina, P., Lettera, V., Pezzella, C., Sannia, G., & Faraco, V. (2011). Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. *Current Genomics*, *12*(2), 104–112.

Piscitelli, A., Giardina, P., Mazzoni, C., & Sannia, G. (2005). Recombinant expression of Pleurotus ostreatus laccases in Kluyveromyces lactis and Saccharomyces cerevisiae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *69*(4), 428–439.

Plank, J. (2004). Applications of biopolymers and other biotechnological products in building materials. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *66*(1), 1–9.

Pollegioni, L., Tonin, F., & Rosini, E. (2015). Lignin-degrading enzymes. *The FEBS Journal*, *282*(7), 1190–1213.

Pylypchuk, I. v, Daniel, G., Kessler, V. G., & Seisenbaeva, G. A. (2020). Removal of diclofenac, paracetamol, and carbamazepine from model aqueous solutions by magnetic sol–gel encapsulated horseradish peroxidase and lignin peroxidase composites. *Nanomaterials*, *10*(2), 282.

Raulo, R., Heuson, E., Froidevaux, R., & Phalip, V. (2021). Combining analytical approaches for better lignocellulosic biomass degradation: a way of improving fungal enzymatic cocktails? *Biotechnology Letters*, *43*(12), 2283–2298. https://doi.org/10.1007/s10529-021-03201-2

Record, E., Punt, P. J., Chamkha, M., Labat, M., van den Hondel, C. A. M. J. J., & Asther, M. (2002). Expression of the Pycnoporus cinnabarinus laccase gene in Aspergillus niger and characterization of the recombinant enzyme. *European Journal of Biochemistry*, *269*(2), 602–609. https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02690.x

Reinhammar, B. (1970). Purification and properties of laccase and stellacyanin from Rhus vernicifera. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *205*(1), 35–47. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0005-2728(70)90059-9

Robert A, B. (1984). Screening Wood Decayed by White Rot Fungi for Preferential Lignin Degradation . *Applied and Environmental Microbiology*, *48*(3), 647–653. https://doi.org/10.1128/aem.48.3.647-653.1984

Robert, X., & Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research*, *42*(W1), W320–W324. https://doi.org/10.1093/nar/gku316

Ronne, H. (1995). Glucose repression in fungi. *Trends in Genetics*, *11*(1), 12–17.

Rouxel, T., Grandaubert, J., Hane, J. K., Hoede, C., van de Wouw, A. P., Couloux, A., Dominguez, V., Anthouard, V., Bally, P., Bourras, S., Cozijnsen, A. J., Ciuffetti, L. M., Degrave, A., Dilmaghani, A., Duret, L., Fudal, I., Goodwin, S. B., Gout, L., Glaser, N., … Howlett, B. J. (2011). Effector diversification within compartments of the Leptosphaeria maculans genome affected by Repeat-Induced Point mutations. *Nature Communications*, *2*(1), 202. https://doi.org/10.1038/ncomms1189

Ruttimann, C., Schwember, E., Salas, L., Cullen, D., & Vicuna, R. (1992). Ligninolytic enzymes of the white rot basidiomycetes Phlebia brevispora and Ceriporiopsis subvermispora. *Biotechnology and Applied Biochemistry (USA)*.

Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, *4*(4), 406–425. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454

Sakamoto, Y., Nakade, K., Yano, A., Nakagawa, Y., Hirano, T., Irie, T., Watanabe, H., Nagai, M., & Sato, T. (2008). Heterologous expression of lcc1 from Lentinula edodes in tobacco BY-2 cells results in the production an active, secreted form of fungal laccase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *79*(6), 971–980.

Salvachúa, D., Prieto, A., López-Abelairas, M., Lu-Chau, T., Martínez, Á. T., & Martínez, M. J. (2011). Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. *Bioresource Technology*, *102*(16), 7500–7506. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.027

Saparrat, M., Balatti, P. A., Martínez, M. J., & Jurado, M. (2010). Differential regulation of laccase gene expression in Coriolopsis rigida LPSC No. 232. *Fungal Biology*, *114*(11), 999–1006. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.09.010

Saravanakumar, T., Palvannan, T., Kim, D.-H., & Park, S.-M. (2013). Manganese Peroxidase H4 Isozyme Mediated Degradation and Detoxification of Triarylmethane Dye Malachite Green: Optimization of Decolorization by Response Surface Methodology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *171*(5), 1178–1193. https://doi.org/10.1007/s12010-013-0220-4

Scheel, T., Höfer, M., Ludwig, S., & Hölker, U. (2000). Differential expression of manganese peroxidase and laccase in white-rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *54*(5), 686–691. https://doi.org/10.1007/s002530000427

Sethupathy, S., Murillo Morales, G., Gao, L., Wang, H., Yang, B., Jiang, J., Sun, J., & Zhu, D. (2022). Lignin valorization: Status, challenges and opportunities. *Bioresource Technology*, *347*, 126696. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126696

Shimizu, T., Kanematsu, S., & Yaegashi, H. (2018). Draft genome sequence and transcriptional analysis of Rosellinia necatrix infected with a virulent mycovirus. *Phytopathology*, *108*(10), 1206–1211.

Shogren, R. L., & Biswas, A. (2013). Preparation of starch–sodium lignosulfonate graft copolymers via laccase catalysis and characterization of antioxidant activity. *Carbohydrate Polymers*, *91*(2), 581–585. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.079

Sijinamanoj, V., Muthukumar, T., Muthuraja, R., Rayappan, K., Karmegam, N., Saminathan, K., Govarthanan, M., & Kathireswari, P. (2021). Ligninolytic valorization of agricultural residues by Aspergillus nomius and Trichoderma harzianum isolated from gut and comb of Odontotermes obesus (Termitidae). *Chemosphere*, *284*, 131384. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131384

Silva, I. S., Grossman, M., & Durrant, L. R. (2009). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (2–7 rings) under microaerobic and very-low-oxygen conditions by soil fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *63*(2), 224–229. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.09.008

Silvério, S. C., Moreira, S., Milagres, A. M. F., Macedo, E. A., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2013). Laccase production by free and immobilized mycelia of Peniophora cinerea and Trametes versicolor: a comparative study. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *36*(3), 365–373. https://doi.org/10.1007/s00449-012-0793-2

Sjostrom, E. (1993). *Wood chemistry: fundamentals and applications*. Gulf professional publishing.

Sluiter, J. B., Ruiz, R. O., Scarlata, C. J., Sluiter, A. D., & Templeton, D. W. (2010). Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 1. Review and description of methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(16), 9043–9053. https://doi.org/10.1021/jf1008023

Soden, D. M., & Dobson, A. D. W. (2001). Differential regulation of laccase gene expression in Pleurotus sajor-caju The GenBank accession numbers for the sequences determined in this work are AF297525–AF297528. *Microbiology*, *147*(7), 1755–1763. https://doi.org/10.1099/00221287-147-7-1755

Songulashvili, G., Jimenéz-Tobón, G. A., Jaspers, C., & Penninckx, M. J. (2012). Immobilized laccase of Cerrena unicolor for elimination of endocrine disruptor micropollutants. *Fungal Biology*, *116*(8), 883–889. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.05.005

Spizzo, T., Byersdorfer, C., Duesterhoeft, S., & Eide, D. (1997). The yeast FET5 gene encodes a FET3 - related multicopper oxidase implicated in iron transport. *Molecular and General Genetics MGG*, *256*(5), 547–556. https://doi.org/10.1007/PL00008615

Stajić, M., Persky, L., Friesem, D., Hadar, Y., Wasser, S. P., Nevo, E., & Vukojević, J. (2006). Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected Pleurotus species. *Enzyme and Microbial Technology*, *38*(1), 65–73. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.03.026

Stielow, J. B., Levesque, C. A., Seifert, K. A., Meyer, W., Irinyi, L., Smits, D., Renfurm, R., Verkley, G. J. M., Groenewald, M., & Chaduli, D. (2015). One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, *35*(1), 242–263.

Suderman, R. J., Dittmer, N. T., Kanost, M. R., & Kramer, K. J. (2006). Model reactions for insect cuticle sclerotization: Cross-linking of recombinant cuticular proteins upon their laccase-catalyzed oxidative conjugation with catechols. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *36*(4), 353–365. https://doi.org/10.1016/J.IBMB.2006.01.012

Takahashi, N., & Koshijima, T. (1988). Ester linkages between lignin and glucuronoxylan in a lignin-carbohydrate complex from beech (Fagus crenata) wood. *Wood Science and Technology*, *22*(3), 231–241.

Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, *38*(7), 3022–3027. https://doi.org/10.1093/molbev/msab120

Tello, M., Corsini, G., Larrondo, L. F., Salas, L., Lobos, S., & Vicuña, R. (2000). Characterization of three new manganese peroxidase genes from the ligninolytic basidiomycete Ceriporiopsis subvermispora. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, *1490*(1), 137–144. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-4781(99)00227-4

Thampraphaphon, B., Phosri, C., Pisutpaisal, N., Thamvithayakorn, P., Chotelersak, K., Sarp, S., & Suwannasai, N. (2022). High Potential Decolourisation of Textile Dyes from Wastewater by Manganese Peroxidase Production of Newly Immobilised Trametes hirsuta PW17-41 and FTIR Analysis. *Microorganisms*, *10*(5), 992.

Theerachat, M., Emond, S., Cambon, E., Bordes, F., Marty, A., Nicaud, J.-M., Chulalaksananukul, W., Guieysse, D., Remaud-Siméon, M., & Morel, S. (2012). Engineering and production of laccase from Trametes versicolor in the yeast Yarrowia lipolytica. *Bioresource Technology*, *125*, 267–274. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.117

Thielemans, W., Can, E., Morye, S. S., & Wool, R. P. (2002). Novel applications of lignin in composite materials. *Journal of Applied Polymer Science*, *83*(2), 323–331. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/app.2247

Thurston, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. In *Microbiology* (Vol. 140, Issue 1, pp. 19–26). Microbiology Society. https://doi.org/10.1099/13500872-140-1-19

Tien, M., & Kirk, T. K. (1988). Lignin peroxidase of Phanerochaete chrysosporium. In *Methods in Enzymology* (Vol. 161, pp. 238–249). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)61025-1

Tinoco, R., Acevedo, A., Galindo, E., & Serrano-Carreón, L. (2011). Increasing Pleurotus ostreatus laccase production by culture medium optimization and copper/lignin synergistic induction. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *38*(4), 531–540. https://doi.org/10.1007/s10295-010-0797-3

Toledano, A., Serrano, L., & Labidi, J. (2014). Improving base catalyzed lignin depolymerization by avoiding lignin repolymerization. *Fuel*, *116*, 617–624. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.08.071

Tülek, A., Karataş, E., Çakar, M. M., Aydın, D., Yılmazcan, Ö., & Binay, B. (2021a). Optimisation of the Production and Bleaching Process for a New Laccase from Madurella mycetomatis, Expressed in Pichia pastoris: from Secretion to Yielding Prominent. *Molecular Biotechnology*, *63*(1), 24–39. https://doi.org/10.1007/s12033-020-00281-9

Tülek, A., Karataş, E., Çakar, M. M., Aydın, D., Yılmazcan, Ö., & Binay, B. (2021b). Optimisation of the Production and Bleaching Process for a New Laccase from Madurella mycetomatis, Expressed in Pichia pastoris: from Secretion to Yielding Prominent. *Molecular Biotechnology*, *63*(1), 24–39. https://doi.org/10.1007/s12033-020-00281-9

Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A., & Itävaara, M. (2000). Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology*, *72*(2), 169–183. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00104-2

Umar, A. (2021). Screening and evaluation of laccase produced by different Trichoderma species along with their phylogenetic relationship. *Archives of Microbiology*, *203*(7), 4319–4327. https://doi.org/10.1007/s00203-021-02420-5

Unuofin, J. O., Okoh, A. I., & Nwodo, U. U. (2019a). Aptitude of oxidative enzymes for treatment of wastewater pollutants: a laccase perspective. *Molecules*, *24*(11), 2064.

Unuofin, J. O., Okoh, A. I., & Nwodo, U. U. (2019b). Recovery of laccase-producing gammaproteobacteria from wastewater. *Biotechnology Reports*, *21*, e00320. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00320

Uzan, E., Portet, B., Lubrano, C., Milesi, S., Favel, A., Lesage-Meessen, L., & Lomascolo, A. (2011a). Pycnoporus laccase-mediated bioconversion of rutin to oligomers suitable for biotechnology applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *90*(1), 97–105. https://doi.org/10.1007/s00253-010-3075-4

Uzan, E., Portet, B., Lubrano, C., Milesi, S., Favel, A., Lesage-Meessen, L., & Lomascolo, A. (2011b). Pycnoporus laccase-mediated bioconversion of rutin to oligomers suitable for biotechnology applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *90*(1), 97–105. https://doi.org/10.1007/s00253-010-3075-4

Valle, J. S., Vandenberghe, L. P. S., Santana, T. T., Almeida, P. H., Pereira, A. M., Linde, G. A., Colauto, N. B., & Soccol, C. R. (2014). Optimum conditions for inducing laccase production in Lentinus crinitus. *Genetics and Molecular Research*, *13*(4), 8544–8551.

Valli, K., Wariishi, H., & Gold, M. H. (1990). Oxidation of monomethoxylated aromatic compounds by lignin peroxidase: role of veratryl alcohol in lignin biodegradation. *Biochemistry*, *29*(37), 8535–8539. https://doi.org/10.1021/bi00489a005

Vandeputte, P., Ghamrawi, S., Rechenmann, M., Iltis, A., Giraud, S., Fleury, M., Thornton, C., Delhaès, L., Meyer, W., & Papon, N. (2014). Draft genome sequence of the pathogenic fungus Scedosporium apiospermum. *Genome Announcements*, *2*(5), e00988-14.

Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., & Boerjan, W. (2010). Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiology*, *153*(3), 895–905. https://doi.org/10.1104/pp.110.155119

W, J. T., Suki, C., & Kent, K. T. (1981). Nutritional Regulation of Lignin Degradation by Phanerochaete chrysosporium. *Applied and Environmental Microbiology*, *42*(2), 290–296. https://doi.org/10.1128/aem.42.2.290-296.1981

Wang, H., Lu, F., Sun, Y., & Du, L. (2004). Heterologous expression of lignin peroxidase of Phanerochaete chrysosporium in Pichia methanolica. *Biotechnology Letters*, *26*(20), 1569–1573.

Wang, P., & Nuss, D. L. (1998). Identification of a Cryphonectria parasitica laccase gene promoter element involved in cycloheximide-inducible, hypovirus-repressible transcriptional activation. *Gene*, *210*(1), 79–84. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-1119(98)00035-3

Wang, Q.-W., Pieristè, M., Liu, C., Kenta, T., Robson, T. M., & Kurokawa, H. (2021). The contribution of photodegradation to litter decomposition in a temperate forest gap and understorey. *New Phytologist*, *229*(5), 2625–2636. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nph.17022

Wang, Z., Bleakley, B. H., Crawford, D. L., Hertel, G., & Rafii, F. (1990). Cloning and expression of a lignin peroxidase gene from Streptomyces viridosporus in Streptomyces lividans. *Journal of Biotechnology*, *13*(2–3), 131–144. https://doi.org/10.1016/0168-1656(90)90099-W

Werpy, T., & Petersen, G. (2004). *Top value added chemicals from biomass: volume I--results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas*. National Renewable Energy Lab., Golden, CO (US).

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, *18*(1), 315–322.

Wong, D. W. S. (2009). Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *157*(2), 174–209. https://doi.org/10.1007/s12010-008-8279-z

Xiao, Y. Z., Hong, Y. Z., Li, J. F., Hang, J., Tong, P. G., Fang, W., & Zhou, C. Z. (2006). Cloning of novel laccase isozyme genes from Trametes sp. AH28-2 and analyses of their differential expression. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *71*(4), 493–501. https://doi.org/10.1007/s00253-005-0188-2

Xie, M., Zhang, J., Tschaplinski, T. J., Tuskan, G. A., Chen, J.-G., & Muchero, W. (2018). Regulation of Lignin Biosynthesis and Its Role in Growth-Defense Tradeoffs. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 1427. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01427

Xie, N., Ruprich-Robert, G., Silar, P., Herbert, E., Ferrari, R., & Chapeland-Leclerc, F. (2018). Characterization of three multicopper oxidases in the filamentous fungus Podospora anserina: A new role of an ABR1-like protein in fungal development? *Fungal Genetics and Biology*, *116*, 1–13. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fgb.2018.04.007

Yang, J., Wang, G., Ng, T. B., Lin, J., & Ye, X. (2016). Laccase production and differential transcription of laccase genes in Cerrena sp. in response to metal ions, aromatic compounds, and nutrients. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 1558.

Yaver, D. S., Overjero, M. D. C., Xu, F., Nelson, B. A., Brown, K. M., Halkier, T., Bernauer, S., Brown, S. H., & Kauppinen, S. (1999). Molecular characterization of laccase genes from the basidiomycete Coprinus cinereus and heterologous expression of the laccase Lcc1. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(11), 4943–4948.

Yaver, D. S., Xu, F., Golightly, E. J., Brown, K. M., Brown, S. H., Rey, M. W., Schneider, P., Halkier, T., Mondorf, K., & Dalboge, H. (1996). Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete Trametes villosa. *Applied and Environmental Microbiology*, *62*(3), 834–841. https://doi.org/10.1128/aem.62.3.834-841.1996

Zdarta, J., Antecka, K., Frankowski, R., Zgoła-Grześkowiak, A., Ehrlich, H., & Jesionowski, T. (2018). The effect of operational parameters on the biodegradation of bisphenols by Trametes versicolor laccase immobilized on Hippospongia communis spongin scaffolds. *Science of the Total Environment*, *615*, 784–795.

Zeyer, E., Heuson, E., Himber, C., Phalip, V., le Bris, C., Dhulster, P., Brisabois, A., Flahaut, C., Cudennec, B., Grard, T., & Duflos, G. (2018). Novel approach to identify phenoloxidases inhibitors: Optimization of spectrophotometric MBTH assay for high throughput use enzymatic assays and analysis. *Food Control*, *93*, 83–91. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.043

Zhang, L. J., Zhang, Y. Y., Li, S. J., & Karchesy, J. J. (2012). Cupressus macrocarpa heartwood oil and its bioactivity against some wood decay fungi. *Advanced Materials Research*, *485*, 413–416.

Zheng, F., An, Q., Meng, G., Wu, X.-J., Dai, Y.-C., Si, J., & Cui, B.-K. (2017). A novel laccase from white rot fungus Trametes orientalis: Purification, characterization, and application. *International Journal of Biological Macromolecules*, *102*, 758–770. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.089

Zhou, H., Guo, W., Xu, B., Teng, Z., Tao, D., Lou, Y., & Gao, Y. (2017). Screening and identification of lignin-degrading bacteria in termite gut and the construction of LiP-expressing recombinant Lactococcus lactis. *Microbial Pathogenesis*, *112*, 63–69. https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2017.09.047

Zhou, S., Raouche, S., Grisel, S., Navarro, D., Sigoillot, J. C., & Herpoël-Gimbert, I. (2015). Solid-state fermentation in multi-well plates to assess pretreatment efficiency of rot fungi on lignocellulose biomass. *Microbial Biotechnology*, *8*(6), 940–949. https://doi.org/10.1111/1751-7915.12307

Zhuo, R., Yu, H., Yuan, P., Fan, J., Chen, L., Li, Y., Ma, F., & Zhang, X. (2018). Heterologous expression and characterization of three laccases obtained from Pleurotus ostreatus HAUCC 162 for removal of environmental pollutants. *Journal of Hazardous Materials*, *344*, 499–510. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.10.055

Zhuo, R., Yuan, P., Yang, Y., Zhang, S., Ma, F., & Zhang, X. (2017). Induction of laccase by metal ions and aromatic compounds in Pleurotus ostreatus HAUCC 162 and decolorization of different synthetic dyes by the extracellular laccase. *Biochemical Engineering Journal*, *117*, 62–72. https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.09.016

Tables summary

Table 1 Proteins used as queries for the screening in silico..... 46
Table 2 Primers sequences and restriction site for the amplification and the construction of expression vector for of the expression of the putative enzymes from cDNA of S.apiospermum..... 48
Table 3 Primers designed for BsaI sites removal of Lac2, CDS 9845, ITMO2 49
Table 4 List of the bio bricks used to perform the construction of the expression vectors for the heterologous expression of Lac2, ITMO1, ITMO2, ITMO3 and CDS9845..... 50
Table 5 List of the *E. coli* strains containing the replicative vector which contains the gene used for the construction of the expression vector 50
Table 6 List of the primers designed specifically to control the expression of each enzyme gene cloned in Y. lipolytica by qPCR..... 51
Table 7: Summary of the results of the isolation work 54
Table 8: Laccase, Mnp and Lip activity detected in the supernatant of the isolated fungi during the screening revealed by the oxidation of ABTS measured at 420 nm . (+) means the detection of an increase of the absorbance (420nm) after 2 hours of incubation 55
Table 9 : Identification of the 15 fungi of interest revealed by the screening of activity. The identification is based on the sequencing of the ITS region. The % of identity describe how similar the query (the sequence obtained by PCR) is to the sequences from the GenBank database. The higher the % of identity is the more relevant is the match..... 59
Table 10: Putative laccase genes found in the genome of Scedosporium apiospermum. 60
Table 11 Comparison of characteristics of Lac2 and ITMO2. The Molecular weight and the isoelectric point were obtained using Compute pI/Mw..... 65
Table 12: Activity of ITMO2 and Lac 2 supernatants on various substrates. The experiments were run in three replicates. The data are presented as average and standard deviation from triplicates 67

Table des tableaux

Tableau 1 Exemple de substrats utilisés pour la détection ou la caractérisation de laccases, Lip et Mnp. ..... **Erreur ! Signet non défini.**
Tableau 2 Exemple de présence d'introns dans des gènes de laccase, Mnp et Lip 28
Tableau 3 Exemple d'expressions recombinantes de laccases, Lip et Mnp dans plusieurs hôtes d'expression de type levure ou champignon filamenteux. 29
Tableau 4 Exemples de dégradation de xénobiotiques par des laccases, Lip et Mnp 32

Tableau 5 Exemples de synthèse de composés destinés à des applications en industrie pharmaceutique ou cosmétique 34
Tableau 6 Résultat de l'étape de diafiltration de ITMO2 et Lac2. L'activité enzymatique de chaque échantillon correspond à la moyenne de trois réplicas techniques..... 75
Tableau 7: pH optimal de laccases connues avec l'ABTS comme substrat 77
Tableau 8 Liste des protéines utilisées pour la construction de l'arbre phylogénétique. 79
Tableau 9 Résumé des prédictions de présence de séquence signal et de domaine transmembranaire 80
Tableau 10 Activité enzymatique du surnageant de BRMO10 obtenue avant et après concentration 96

Table des figures

Figure 1 Représentation des trois monolignols constituant le polymère de lignine 6

Figure 2 Représentation d'une lignine de peuplier. La structure a été prédite à partir d'analyse RMN. Figure extraite de (Vanholme et al., 2010)..... 7

Figure 3: Représentation d'une lignine Kraft tirée de (Cesari, 2017) et modifiée 8

Figure 4 Représentation d'une lignine issue du procédé aux sulfites tirée de (Ghafarnejad Parto et al., 2018)..... 9

Figure 5 Représentation d'une lignine organosolv tirée de (Cesari, 2017)..... 10

Figure 6 Mode d'action et mécanisme d'oxydoréduction des laccases..... 12

Figure 7 Fonctionnement du système laccase-médiateur (LMS) permettant l'oxydation indirect d'un substrat complexe par une laccase (Mani et al., 2018)..... 13

Figure 8: Représentation du cycle catalytique d'une Lip 14

Figure 9 Cycle catalytique des manganèses peroxydases..... 16

Figure 10 Exemples d'applications des enzymes ligninolytique..... 30

Figure 11 Graphical abstract of the workflow..... 41

Figure 12: Recombinant ITMO2 and Lac2 production in *Y. lipolytica*: comparison between three different mutants for each gene. Laccase activity in the culture supernatant is presented as a function of time. All cultures were grown in triplicates and all measurement were also done in triplicates 63

Figure 13 Multiple alignments of ITMO2 and Lac 2 from Scedosporium apiospermum and two well described laccases from *Lentinula edodes* (BAB83131) and *Trametes versicolor* (Q12718). Conserved amino acid are highlighted in red. The conserved domain involved in the copper in copper binding were indicated with the boxes: B1, B2, B3 and B4. T1, T2, T3A, and T3B indicate the putative corresponding type 1, 2, and 3 copper sites (T3 sites contains two copper atoms named A and B) ... 64

Figure 14 SDS PAGE of ITMO2 and Lac 2 supernatants, lane A: RIY 145, lane B: ITMO2, lane C: ITMO2+ Endoglycosidase Lane H, D: RIY 145, lane E and lane F: Lac 2, lane G: Lac 2+ Endoglycosidase H. 66

Figure 15 Effet du pH sur l'activité de ITMO2 et Lac2 avec l'ABTS comme substrat. Les tests ont été réalisés en triplicat dans du tampon de Britton-Robinson. Les résultats sont exprimés en activité relative..... 76

Figure 16 Arbre phylogénétique des principales familles de multicopper oxidases présentes chez les fungi. Toutes les enzymes représentées ont été validées biologiquement avec des preuves de leurs activité sauf la bilirubin oxidase de Rosellinia necatrix qui a été annotée par homologie. Les enzymes sont représentées avec leurs numéros d'accession ainsi que leur organisme d'origine. Les 9 enzymes putatives trouvées dans le génome de Scedosporium apiospermum ont été intégrées et soulignées par un trait. Les deux enzymes qui ont été exprimées avec succès ont été marquées d'une croix noire. 81

Figure 17 Schéma des construction de vecteurs d'expression. A: Addition de la séquence signal native avec celle propre à Yarrowia lipolytica, B: Présence uniquement de la séquence signal native, C: présence uniquement de la séquence signal propre à Yarrowia lipolytica..... 86

Figure 18 Activité enzymatique de type laccase dans le milieu de culture de Yarrowia lipolytica produisant la protéine recombinante Lac2 après 24h de croissance. Chaque valeur représente la moyenne de trois réplicats biologiques et techniques de chaque souche. Afin de prendre en compte d'éventuelles disparités de production d'enzyme dues à une différence de production de biomasse, les activités enzymatiques ont été rapportées à la $DO_{(600nm)}$ de chaque culture..... 88

Figure 19 Représentation de la séquence signale de la protéase alcaline extracellulaire de Y. lipolytica (AEP) et de la séquence signale de Lac2 de S. apiospermum. En bleu la région pre-leader, en rouge la région X-A/X-P, en jaune la région pro-leader et en vert le motif signalant le site de clivage (Celińska et al., 2018)..... 90

Figure 20 Profil d'exclusion stérique d'un échantillon de lignine organosolv ayant subi une dépolymérisation par système laccase médiateur (SLM) avec une laccase commerciale (50 mU) de Trametes versicolor et l'ABTS comme médiateur (courbe verte). Un échantillon d'enzyme inactivée thermiquement a été utilisé comme témoin négatif (courbe mauve) 97

Figure 21 Profil d'exclusion stérique d'un échantillon de lignine organosolv ayant réagi 24h avec un surnageant concentré issu d'une culture de 7 jours de Scedosporium apiospermum avec le médiateur ABTS (courbe bleue). Un échantillon de surnageant inactivée thermiquement fut utilisé comme témoin négatif (courbe jaune) 99

Recherche d'enzymes ligninolytiques dans la biodiversité, mise en évidence de deux enzymes de type oxydoréductase provenant de l'ascomycète Scedosporium apiospermum

Résumé

L'objectif de cette thèse était de rechercher de nouvelles enzymes de dégradation de la lignine à partir de souches de champignons issus de milieux naturels. Des prélèvements ont été effectués sur du bois dans trois écosystèmes différents : une forêt de feuillus (hêtre, boulot) et résineux (cyprès Lambert), un cep de chardonnay attaqué par la maladie du bois de la vigne et enfin une souche en décomposition sur un parking d'une zone urbaine. 71 souches de champignons ont été isolées à partir de ces prélèvements. Pour connaître les souches produisant des enzymes d'intérêt, un criblage d'activité ligninolytique a été effectué. Afin de rendre ce criblage le plus exhaustif possible, différentes conditions de culture ont été mises en place. Trois milieux de cultures avec des éléments inducteurs spécifiques ont été testés afin de stimuler la production d'enzymes ligninolytiques par les champignons. Les trois milieux de culture utilisés pour le criblage furent donc un milieu riche sans induction, un milieu avec de la paille de blé et un autre avec du gaïacol. De même, pour prendre en compte l'aspect cinétique de production des enzymes par les champignons, deux temps de mesure à 7 et 14 jours ont été observés. Ce criblage a permis de sélectionner 15 champignons présentant au moins une activité enzymatique d'intérêt. Sur ces 15 champignons, deux souches ont produit leurs activités ligninolytiques seulement sur les milieux contenant un inducteur. Parmi ces 15 champignons, deux basidiomycètes ainsi que 13 ascomycètes appartenant à 6 genres différents ont été identifiés. 12 ascomycètes étaient déjà décrits dans la littérature pour produire des enzymes de type laccase, Lip et Mnp. Les deux basidiomycètes, *Peniophora versicolor* et *Piptoporus betulinus* n'étaient pas connus pour cette activité ligninolytique. En outre, l'ascomycète *Scedosporium apiospermum* a montré une activité de type laccase lors du criblage. Des expérimentations de dégradation de la lignine ont pu déterminer que les enzymes présentes dans le surnageant de culture de ce champignon, possèdent une activité de modification du polymère de lignine. *S. apiospermum* a donc été sélectionné afin de caractériser ses enzymes de type laccase, détectées lors du criblage. Grâce à un criblage in silico dans le génome de *S. apiospermum*, neuf gènes putatifs de laccase ont été détectés. Après avoir généré une librairie d'ADNc, cinq gènes putatifs de laccase ont été amplifiés puis clonés avec succès dans la levure Yarrowia lipolytica. Dans les conditions de l'étude, deux gènes Lac2 et ITMO2 permirent d'obtenir des enzymes recombinantes actives. Dans leur structure primaire, les enzymes Lac2 et ITMO2 présentent chacune les sites de coordination du cuivre, spécifiques des oxydases à cuivre. Lac2 et ITMO2 possèdent un pH optimum de 3 et 5 respectivement. Les deux enzymes ont démontré qu'elles possèdent une activité d'oxydation sur des substrats phénoliques comme le 2.6 dimétoxyphénol, le pyrogallol et la dopamine, mais aussi sur des substrats non phénoliques comme le 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) et l'o-Dianisidine.

Mots clés : Lignine, Enzymes ligninolytiques, criblage, biodiversité, *Scedosporium apiospermum*

Research of ligninolytic enzymes in the biodiversity, discovery of two novel oxidoreductases belonging to the ascomycete Scedosporium apiospermum

Abstract

The goal of this thesis was to search for new fungal ligninolytic enzymes from the environment. Samples of woody biomass were collected in three different ecosystems: a forest composed of deciduous trees (beech, birch) and gymnosperm (Cupressus macrocarpa), a cep of chardonnay infected with grapevine trunk disease and finally a decaying tree stump in a parking lot of an urban area. 71 strains were isolated from these environments. To select the fungal strain able to produce enzymes of interest a screening for laccase, Lip and Mnp was carried out. In order to maximize the completeness of this screening different culture conditions were used. To trigger the production of ligninolytic enzymes by the fungi Three culture media supplemented or not with inductors were used for the screening. The first medium tested was a rich medium without induction. The two other media contained respectively wheat straw and guaiacol as inductors. Besides, sampling was performed after 7 and 14 days as the kinetics of enzyme production could vary for a given fungal strain and culture conditions. 71 strains were tested for ligninolytic activities and 15 of them presented at least one enzymatic activity. Two of them showed their ligninolytique activities only on the media with inductors. Among the 15 fungi with enzymatic activities of interest, two basidiomycetes and 13 ascomycetes belonging to 6 different genera were identified. 12 ascomycetes were already described in the literature with laccase, Lip or Mnp activity. To our knowledge, the two basidiomycetes Peniophora versicolor and Piptoporus betulinus were not described for producing ligninolytic activities. Besides Scedosporium apiospermum showed laccase activity during the screening. Experiments of lignin degradation were carried out with the culture supernatant of this fungus. The results showed that the enzymes contained in S. apiospermum were able to modify the lignin polymer. This fungus was thus selected to further characterize its laccase like enzymes detected by the screening. Thanks to an in-silico screening in the genome of S. apiospermum 9 putative laccase genes were detected. Five putative laccase genes were then amplified with success from a cDNA library obtained from the mRNA of the fungus. Those five genes were cloned in the yeast Yarrowia lipolytica. In the conditions of the study, two genes called Lac2 and ITMO2 allowed the production of two active enzymes. In their primary structure, the two enzymes present the characteristic sites of copper coordination of multicopper oxidases. Lac2 and ITMO2 present an optimum pH of 3 and 5 respectively. Those two enzymes show an oxidative activity on various phenolic substrates such as 2.6 dimetoxyphenol, pyrogallol and dopamine but also on non-phenolic substrates including 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) and o-Dianisidine

Key words: Lignin, Ligninolytic enzymes, screening, Biodiversity, *Scedosporium apiospermum*